

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



**Atividade anticâncer de uma furano-naftoquinona em modelos de
cultura celular de melanoma**

JOSÉLIA SOBRAL CAVALCANTE

MANAUS
2016

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

JOSÉLIA SOBRAL CAVALCANTE

**Atividade anticâncer de uma furano-naftoquinona em modelos de
cultura celular de melanoma**

Dissertação de mestrado apresentada 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

MANAUS
2016

Ficha Catalográfica

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

C376a Cavalcante, Josélia Sobral
Atividade anticâncer de uma naftoquinona em modelos de cultura celular de melanoma / Josélia Sobral Cavalcante. 2016
92 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Mame Carvalho de Vasconcellos
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. melanoma. 2. equivalente-dérmico. 3. furano-naftoquinona. 4. citotoxicidade. 5. genotoxicidade. I. Vasconcellos, Mame Carvalho de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Josélia Sobral Cavalcante

Atividade anticâncer de uma naftoquinona em modelos de cultura celular de melanoma

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profª. Drª. Marne Carvalho de Vasconcellos
Orientadora/Presidente

Profª Drª Raquel Carvalho Montenegro
Membro externo a UFAM

Profa. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza
Membro

*Ao senhor José Chaves e a senhora Rosa,
meus pais, por me fazerem ser o que sou
hoje.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por guiar cada um dos meus passos;

Aos meus pais, seu José e dona Rosa, por me apoiarem e propiciarem o melhor de todos os afetos, o amor;

À minha filha Maria Clara, por me mostrar o verdadeiro sentido da vida;

Ao meu namorado, Marcelo César, pelo companheirismo e carinho;

À todos os meus familiares que sempre torceram por minhas conquistas e vitórias;

À Prof.^a. Dr.^a. Marne Carvalho de Vasconcellos, pela oportunidade, pela confiança, pela paciência e pelos ensinamentos compartilhados, meu muito obrigada;

Às minhas companheiras de laboratório que hoje se tornaram amigas que levarei para o resto da vida: Elenn Aranha e Ana Paula Boletti, obrigada pela amizade, pelo carinho, pelos conselhos trocados, pela parceria e por tornarem os meus dias no laboratório mais alegres;

À Leilane Bentes e Caio Ferreira, pela amizade, companhia e colaboração nos experimentos até altas horas da noite na faculdade, jamais vou esquecer;

À Tatiana Pedrosa, pela colaboração e ensinamentos compartilhados, foi fundamental;

Aos queridos Laíne Celestino e Bruno Moreira, pela recepção e colaboração no momento que eu mais precisei, nossa! Muito obrigada mesmo;

Aos demais companheiros de laboratório: Márcia de Jesus, Rayane Souza, Bárbara Janaína, Larissa de Oliveira, Gleyce Barbosa, Glauber Palma, Patrícia Danielle, Anderson Kehl, pelo crescimento juntos e pelas horas de alegrias no laboratório;

Aos queridíssimos alunos do Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará, Emerson Lucena e Felipe Mesquita, pela acolhida, colaboração e por me receberem tão bem;

Aos Laboratórios de Atividade Biológica e Biophar da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, especialmente o prof^o. Dr. Emerson Silva Lima por disponibilizar equipamentos e reagentes;

Ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário Getúlio Vargas, em nome da doutora Luciana, por viabilizar as análises histopatológicas deste projeto;

Ao Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará pela acolhida e por viabilizarem a conclusão dos experimentos complementares;

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo incentivo a pesquisa;

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado;

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais. Dentre as principais neoplasias, o melanoma é a principal doença relacionada à pele por possuir alta agressividade e resistência a quimioterapia convencional em estágios mais avançados da doença, sendo responsável por 80% das mortes por cânceres de pele. Em busca de novas alternativas terapêuticas, tem-se investigado a utilização de modelos de cultura celular que mimetizem o microambiente tumoral *in vivo* possibilitando analisar de forma mais fidedigna *in vitro* a atividade de drogas promissoras para o tratamento do câncer. Uma das alternativas é o modelo tridimensional de estrutura dérmica da pele, também denominado de equivalente dérmico. A 1H-ciclopenta[b]nafto[2,3-d]furano-5,10(3aH,10bH)-diona (IVS320), uma furano naftoquinona sintetizada a partir de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lausona), apresentou excelentes resultados de citotoxicidade frente às linhagens de melanoma justificando a seleção desta substância para este projeto de pesquisa e a necessidade do desenvolvimento de outras análises que comprovem realmente seu potencial. Sendo assim, o presente estudo objetivou padronizar o modelo de cultura celular em equivalente dérmico, bem como avaliar a atividade anticâncer de IVS320 em linhagem de melanoma humano SK-Mel-28. O modelo de estudo proporcionou a comparação da atividade citotóxica, genotóxica e atividade inibitória de metaloproteinases de IVS320 em SK-Mel-28 cultivada em equivalente dérmico e cultura em monocamada, a capacidade de inibir a migração da célula e mecanismo de morte celular. IVS320 apresentou-se citotóxica para SK-Mel-28 nos dois modelos de cultura celular pelo método do MTT, no entanto sua atividade foi diminuída quando testada no modelo de equivalente dérmico. A média da CI50 de IVS320 em SK-Mel-28 cultivada em monocamada foi 0,5 µM nos três tempos de tratamento. Avaliando a citotoxicidade no modelo de equivalente dérmico, IVS320 apresentou aumento no valor da CI50 de forma concentração e tempo dependente, 8,05, 5,22 e 2,7 µM em 24, 48 e 72 horas de tratamento respectivamente. No teste do cometa evidenciaram-se quebras de fitas simples nas três concentrações testadas e quebras de fitas duplas somente na maior concentração em células cultivadas em monocamada. Já no modelo de equivalente dérmico foram detectados danos somente no cometa pH neutro nas duas maiores concentrações. Através do ensaio da zimografia foi possível avaliar a atividade de metaloproteinases -2 e -9. Nos resultados obtidos, observou-se o efeito inibitório da atividade enzimática de IVS320 nas três concentrações testadas nos dois modelos de cultura celular no tempo de tratamento de 18 horas. Adicionalmente, no ensaio de motilidade celular, foi observado que IVS320 também se mostrou eficaz quanto à inibição dessa atividade nos três tempos de tratamento (6, 12 e 24 horas) quando testada na maior concentração (1,0 µM). 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. Os resultados desta pesquisa contribuem com informações acerca da IVS320 e auxiliam nos estudos sobre meios alternativos na farmacologia experimental por meio da utilização dos modelos de cultura celular em equivalente dérmico e evidencia a importância de novos modelos experimentais.

Palavras-chave: melanoma, equivalente-dérmico, furano-naftoquinona, citotoxicidade, genotoxicidade, metaloproteinases.

ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by the uncontrolled growth and spread of abnormal cells. Among the main neoplasms, melanoma is the leading disease related to the skin by having high aggressiveness and resistance to conventional chemotherapy in advanced stages of the disease, accounting for 80% of deaths from skin cancer. In search of new therapeutic alternatives, has investigated the use of cell culture models that mimetizem the Tumor Microenvironment *in vivo* allowing more reliable analysis of *in vitro* activity of promising drugs for cancer treatment. One of the alternatives is the three-dimensional model of dermal skin structure, also called dermal equivalent. The 1 h-ciclopenta [b] nafto [2.3-d] furan-5.10 (3aH, 10bH)-Dione (IVS320), a furan naphthoquinone synthesized from 2-hydroxy-1.4-naphthoquinone (Lausona), presented excellent results of cytotoxicity against the strains of melanoma justifying the selection of this substance for this research project and the need for the development of other analysis showing their potential. Thus, the present study aimed to standardize the cell culture model in dermal equivalent, as well as assess the anticancer activity of IVS320 in human melanoma line SK-Mel-28. The model of study provided a comparison of the cytotoxic activity is genotoxic activity of Metalloproteinases and of IVS320 in SK-Mel-28 cultivated dermal equivalent culture in monolayer and the ability to inhibit cell migration and cell death mechanism. IVS320 performed for SK-cytotoxic Mel-28 in both cell culture models by the method of the MTT, however its activity was decreased when tested in the dermal equivalent model. CI50 average of IVS320 in SK-Mel-28 grown in monolayer was 0.5 μM in three days of treatment. Assessing the cytotoxicity in dermal equivalent model, introduced IVS320 increase in value from the CI50 concentration and time dependent, 8.05, 5.22 and 2.7 μM in 24, 48 and 72 hours of treatment respectively. The Comet test showed themselves simple tape breaks in three concentrations tested and double tape breaks only in the highest concentration in cells grown in monolayer. In the dermal equivalent model only damage were detected in neutral pH Comet in the two largest concentrations. By zymography assay was possible to assess the activity of Metalloproteinases-2 and-9. The results obtained showed the inhibitory effect of IVS320 enzyme activity in three concentrations tested in both cell culture models in treatment time of 18 hours. Additionally, cell motility test, it was observed that IVS320 also proved effective as the inhibition of this activity in all the three days of treatment (6, 12 and 24 hours) when tested in highest concentration. On differential staining LA/BE, noted an increase in the number of apoptotic cells of concentration dependent manner, however, the number of necrotic cells not varied. The results of this survey provide information about IVS320 and help in studies on alternative means in experimental Pharmacology through use of cell culture models dermal equivalent, and highlights the importance of new experimental models.

Key words: melanoma, dermal equivalent, furano-naphthoquinone, cytotoxicity, genotoxicity, Metalloproteinases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Características do Câncer. As quatro características funcionais do câncer. Duas características funcionais descobertas recentemente (instabilidade genômica e estado inflamatório na progressão do tumor) e duas características não funcionais que possibilitam a existência do tumor (reprogramação do metabolismo energético e resistência a destruição do sistema imune).....19
- Figura 2 - Camadas da pele e seus componentes celulares. Localização dos melanócitos.....21
- Figura 3 - Desenho esquemático das fases do desenvolvimento do melanoma cutâneo, através dos processos de iniciação, promoção e progressão.....25
- Figura 4 - Visão geral da via de sinalização MAPK após a ligação de fatores de crescimento a receptores tirosina-quinase (RTK).....28
- Figura 5 - Esquema mostrando a diferença no arranjo espacial das células cultivadas em monocamada e em modelos de cultura 3D.....37
- Figura 6 - Esquema do rearranjo das células de fibroblasto e melanoma no modelo de cultura 3D denominado equivalente dérmico.....37
- Figura 7 - Estrutura química da 1,2-naftoquinona e 1,4-naftoquinona.....39
- Figura 8 - Estrutura química da (IVS320).....41
- Figura 9 - Esquema da obtenção do equivalente dérmico e plaqueamento da linhagem SK-Mel-28 sob o equivalente dérmico.....46
- Figura 10 - Esquema do plaqueamento da mistura de colágeno composta de colágeno tipo 1, HAM F12 (10x) e tampão de reconstituição (10x) com posterior plaqueamento da linhagem SK-Mel-28 sob o colágeno gelificado.....47
- Figura 11 - Células de melanoma metastático SK-MEL-28 cultivadas em equivalente dérmico (fibroblastos + colágeno tipo I) após 5 e 10 dias de cultivo.....62
- Figura 12 - Análise de fragmentação do DNA às células MRC-5 cultivadas em monocamada após tratamento por 3 horas com IVS320. A – Dano grau 1 na concentração de 1,0 μ M no cometa de pH alcalino; B e C – Dano grau 1 nas concentrações 0,5 μ M e 1 μ M respectivamente no cometa de pH neutro.....67

Figura 13 - Análise de fragmentação do DNA às células SK-Mel-28 cultivadas em monocamada após tratamento por 3 horas com IVS320.....	68
Figura 14 - Análise de fragmentação do DNA às células SK-Mel-28 cultivadas em equivalente dérmico após tratamento por 3 horas com IVS320.....	69
Figura 15 - Avaliação da inibição da motilidade das células SK-Mel-28 cultivadas em monocamada quando tratadas com IVS320.....	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Índice e frequência de dano ao DNA em células MRC-5 cultivada em monocamada, após 3h de tratamento com IVS320. A- Cometa alcalino; B- Cometa neutro. $**p<0,01$, $***p<0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA <i>one way</i> seguido de teste Tukey.....	67
Gráfico 2 - Índice e frequência de dano ao DNA em células SK-Mel-28 cultivada em monocamada, após 3h de tratamento com IVS320. A- Cometa alcalino; B- Cometa neutro. $***p<0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA <i>one way</i> seguido de teste Tukey.....	68
Gráfico 3 - Índice e frequência de dano ao DNA em células SK-Mel-28 cultivada em equivalente dérmico monocamada, após 3h de tratamento com IVS320. A- Cometa alcalino (não houve índice de dano significativos quando comparados com controle negativo); B- Cometa neutro. $**p<0,01$, $***p<0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA <i>one way</i> seguido de teste Tukey.....	69
Gráfico 4 - Atividade de MMP-2 e MMP-9 em células SK-Mel-28 cultivada em monocamada, após o tratamento com IVS320 no tempo de 18 horas. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA <i>two way</i> seguido de Bonferroni <i>posttest</i>	71
Gráfico 5 - Atividade de MMP-2 e MMP-9 em células SK-Mel-28 cultivada em equivalente dérmico, após o tratamento com IVS320 no tempo de 18 horas. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA <i>two way</i> seguido de Bonferroni <i>posttest</i>	71
Gráfico 6 - Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular <i>in vitro</i> – a inibição da migração celular ocorreu somente na maior concentração testada 1,0 μ M de IVS320 nos três tempos de tratamento 6, 12 e 24 horas. $**p<0,01$, $***p<0,001$ foi considerado estatisticamente quando comparado ao controle negativo DMSO (0,2%) pelo teste ANOVA	

seguido	de
Tukey.....	73

Gráfico 7 - Tipo de morte celular induzida por IVS320 (0,25µM, 0,5µM e 1,0µM) na célula SK-Mel-28 cultivada em monocamada após tratamento de 24 horas. São apresentados os resultados de dois experimentos independentes em triplicata (± desvio padrão). Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado controle negativo DMSO (0,2%). Os resultados foram analisados por ANOVA *two way* seguido de Bonferroni *posttests*.....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características genéticas da linhagem neoplásica utilizada. p53 R273H: mutação *hot spot* da proteína, resultando na substituição de arginina por histidina no códon 273. Esta mutação ocasiona ganho de função, por perda de funções supressoras de tumor e aquisição de novas atividades oncogênicas; - B-RAF (V599E): mutação ocasionada pela substituição de timina por adenina, no códon 1796 (A1796T), resultando na substituição de valina por ácido glutâmico no códon 599; N-Ras (éxon 3) Q61R: mutação majoritariamente no códon 61, presente no éxon 3, ocasionada pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 182 (A182G), que resulta na substituição de glutamina por arginina; Wt: *wild-type* (selvagem).....45

Tabela 2 - Efeito da IVS320 sobre a linhagem de melanoma humano (SK-Mel-28) cultivado no modelo de cultura celular em monocamada e equivalente dérmico nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72h. Os valores estão representados como CI₅₀ (intervalo de confiança de 95%). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.....64

Tabela 3 - Efeito da IVS320 sobre a linhagem de fibroblasto humano (MRC-5) cultivado no modelo de cultura celular em monocamada nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72h. Os valores estão representados como CI₅₀ (intervalo de confiança de 95%). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.....64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Câncer.....	17
2.2 Melanoma.....	20
2.2.1 Epidemiologia do melanoma.....	23
2.2.2 Formas clínicas do melanoma.....	23
2.2.3 Patogenia do melanoma.....	25
2.2.4 Genética do melanoma.....	26
2.2.5 Metaloproteinases.....	29
2.2.6 Tratamento do melanoma.....	30
2.3 Modelo de cultura celular em equivalente dérmico.....	34
2.4 Naftoquinonas.....	38
2.4.1 Furano naftoquinona.....	41
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4. METODOLOGIA.....	44
4.1 Delineamento experimental.....	44
4.2 Obtenção da amostra.....	45
4.3 Linhagens celulares.....	45
4.4 Padronização do modelo de cultura celular 3D – Equivalente Dérmico.....	45
4.5 Cultura celular em monocamada (modelo 2D).....	51
4.6 Condições experimentais de cultura celular.....	51
4.7 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT.....	51
4.8 Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa – pH alcalino e pH neutro.....	54
4.9 Avaliação da inibição da atividade de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9).....	57
4.10 Avaliação da motilidade celular pelo ensaio de raspagem <i>in vitro</i>	58
4.10.1 Avaliação da morte celular por coloração diferencial pelo Brometo de Etídio (BE)/ Laranja de Acridina (LA).....	59
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61

6. RESULTADOS.....	62
6.1 Padronização do modelo de cultura celular 3D – Equivalente Dérmico.....	62
6.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT.....	63
6.3 Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa – pH alcalino e pH neutro.....	65
6.4 Avaliação da inibição da atividade de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9).....	70
6.5 Avaliação da motilidade celular pelo ensaio de raspagem <i>in vitro</i>	72
6.6 Avaliação da morte celular por coloração diferencial pelo Brometo de Etídio (BE)/ Laranja de Acridina (LA).....	73
7. DISCUSSÃO.....	75
8. CONCLUSÃO.....	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

O corpo humano é constituído de tecidos e órgãos formados por diferentes tipos celulares, sendo sua manutenção inteiramente realizada através de um processo fisiológico denominado ciclo celular, que em circunstâncias normais mantém o equilíbrio entre proliferação e morte celular programada (apoptose) permitindo a integridade dos órgãos e tecidos. O câncer envolve mudanças dinâmicas no genoma celular, caracterizadas por uma sucessão de alterações no material genético de células normais que podem ocorrer de forma espontânea ou induzidas por agentes externos. Essas alterações causam desequilíbrio no processo fisiológico celular e conferem às células características importantes que ajudam no desenvolvimento do tumor. Dentre essas características estão a perda do controle de proliferação celular, resistência à morte celular e capacidade de invadir tecidos adjacentes ocasionando a metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MAURO et al., 2011).

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e sua incidência triplicou em populações brancas nos últimos 20 anos. A exposição à radiação ultravioleta (UV) juntamente com ativação de proto-oncogenes associada a histórico genético são fatores-chaves para o aparecimento da doença. A incapacidade do melanoma em sofrer apoptose em resposta à quimioterapia e outros estímulos externos representa vantagem na progressão tumoral, formação de metástases, bem como a resistência a várias terapias (KO; FISHER, 2010).

O melanoma pode surgir em áreas expostas ao sol como face, braços e costas, porém, também pode ocorrer em áreas pouco expostas como palma das mãos, solas dos pés e embaixo das unhas ou surgir de nevos atípicos pré-existentes que tornam-se posteriormente displásicos. O melanoma aparece como mancha escura assimétrica com bordas irregulares com cores escuras. A detecção precoce é de suma importância para um bom prognóstico, se diagnosticado

logo no primeiro estágio as chances de cura e sobrevida do paciente aumentam consideravelmente (CALIFANO; NANCE 2009).

Os avanços na pesquisa do melanoma têm ajudado a entender melhor a fisiopatologia desta doença, como por exemplo, as mutações que ocorrem no gene *BRAF*. O gene *BRAF* codifica uma das três serina/treonina quinase da família RAF em que mais de 75 mutações neste gene já foram identificados em melanoma cutâneo. A descoberta de mutações no gene *BRAF* pôde não só demonstrar uma relação causal com progressão da doença, como também abrir margens para a busca de inibidores específicos na sinalização deste gene (SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011; FORNO; SALDANHA, 2011; MENZIES; LONG, 2013).

A progressão do melanoma também está associada à presença de metaloproteínases (MMPs) que estão superexpressas nesta neoplasia maligna. Tais proteínas atuam na degradação de proteínas da matriz extracelular (MEC), primeira barreira para invasão tumoral. Buscar inibidores específicos para estas proteases pode ser uma estratégia terapêutica no combate do melanoma. Apesar dos avanços no estudo do melanoma, ainda não se obteve grandes progressos na descoberta de terapias alvo, que venham inibir o melanoma metastático (BROHEM et al., 2010).

A maioria dos dados atualmente disponíveis sobre o melanoma humano foram obtidos a partir de modelos bidimensionais (2D) utilizando culturas celulares em monocamada de células *in vitro*. No entanto, as células tumorais crescem *in vivo* em um ambiente tridimensional (3D), em que existe relação cruzada entre as subpopulações de células diferenciadas do câncer, das mesmas com as células hospedeiras vizinhas não tumorais e a matriz extracelular. Conseqüentemente, os modelos 3D de reconstrução da pele bem como estruturas isoladas da pele, vêm se tornando ferramentas importantes em testes pré-clínicos na busca de novas abordagens terapêuticas (MEIER et al., 2007).

A tendência, no universo científico, é buscar novas substâncias de origem natural ou sintética, que possuam outros mecanismos de ação e possam servir de modelos no desenvolvimento de novas e futuras drogas anticâncer (WANG et al., 2012).

As naftoquinonas representam uma importante classe de moléculas biologicamente ativas que são comumente encontradas na natureza. O uso destas substâncias tem sido intensificado nos últimos anos devido à sua ampla gama de atividades biológicas. Muitas naftoquinonas naturais e sintéticas são conhecidas por serem agentes anti-inflamatórios, antibacterianos, leishmanicida e tripanocida. Um estudo também demonstrou que os derivados de naftoquinona apresentam atividades particularmente acentuadas contra fungos e até mesmo contra células tumorais (FREIRE et al., 2010).

Um estudo realizado por Freire et al., (2010) relatou a potente atividade antifúngica de uma furano naftoquinona sintetizada denominada IVS320, em que a atividade apresentou-se superior ao fármaco de escolha utilizado na clínica, fluconazol. O estudo relatou também que o composto não foi citotóxico em células de fibroblasto humano (FERREIRA et al., 2014).

Diante das diversas atividades biológicas de naftoquinonas já relatadas, propõe-se avaliar a atividade anticâncer de IVS320 em células de melanoma humano em modelo de reconstrução de derme *in vitro*. Com o intuito de demonstrar que a utilização de plataformas inovadoras como reconstrução de pele *in vitro* em ensaios citotóxicos é uma ferramenta promissora na busca de regimes terapêuticos eficazes para o tratamento do câncer por mimetizar com mais fidelidade o microambiente *in vivo*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

A palavra câncer é atribuída a um amplo conjunto de doenças que tem em comum o crescimento descontrolado de células malignas. Há mais de 200 tipos diferentes de câncer, cada um dos quais com nomenclaturas de acordo com o tipo de tecido da célula de origem (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O câncer ocorre por uma sucessão de eventos moleculares como: mutações gênicas, instabilidade cromossômica e alterações epigenéticas. As alterações frequentemente encontradas ocorrem em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. Tais alterações resultam na proliferação descontrolada de células anormais com características autônomas e imortais. Os danos causados ao DNA podem ser devido à ação de agentes exógenos, como exemplo fatores ambientais e agentes xenobióticos, ou induzidos por fatores endógenos, como danos oxidativos, erros na replicação do DNA ou fatores hereditários (HANAHAN; WEINBERG, 2011)

Após o dano sofrido pela célula e quando não há reparo do dano e nem indução de apoptose, inicia-se o processo de carcinogênese. Este processo é composto por três estágios: o estágio de iniciação, promoção e progressão. No estágio de iniciação ocorrem os danos no DNA da célula transformando-a em uma célula mutada. O segundo estágio, a promoção tumoral, envolve a expansão celular iniciando uma lesão local pela modulação da expressão do gene que resulta em um aumento no número de células. Finaliza-se com a progressão tumoral em que as células adquirem imortalidade replicativa (MAURO et al., 2011; TANAKA et al., 2013; ZIECH et al., 2012)

A desregulação do crescimento celular normal de células alteradas é resultante de mutações, amplificações ou ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores tumorais e genes envolvidos em mecanismos de reparo do DNA, que desempenham papel fundamental na iniciação tumoral (TYSNES; BJERKVIG, 2007).

As características importantes da célula que determinam a malignidade do tumor são mecanismos de escape da apoptose e seu potencial metastático iniciando com a invasão local e subsequentemente o extravasamento das células cancerígenas para as proximidades através de vasos linfáticos e sanguíneos (TANAKA et al., 2013).

Essas características estão entre as funções biológicas complementares propostas por Hanahan & Weinberg (2011), em que as células malignas adquirem no decorrer da formação tumoral permitindo sua sobrevivência, proliferação e disseminação tais como: (1) auto-suficiência em sinais de crescimento, (2) redução dos fatores supressores de crescimento, (3) resistência à morte celular por apoptose, (4) potencial replicativo (imortalidade), (5) indução da angiogênese e (6) ativação da invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Tais características são possíveis devido a quatro mecanismos importantes que também estão ativos durante as fases da formação tumoral (figura 1) sendo dois deles, cruciais para a aquisição das seis capacidades citadas anteriormente: a instabilidade genômica em células cancerosas, que leva a formação de mutações aleatórias incluindo rearranjo cromossômico, e o estado inflamatório das lesões pré-malignas que atua diretamente na progressão do tumor, fornecendo para o microambiente tumoral fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa e fatores de sobrevivência (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

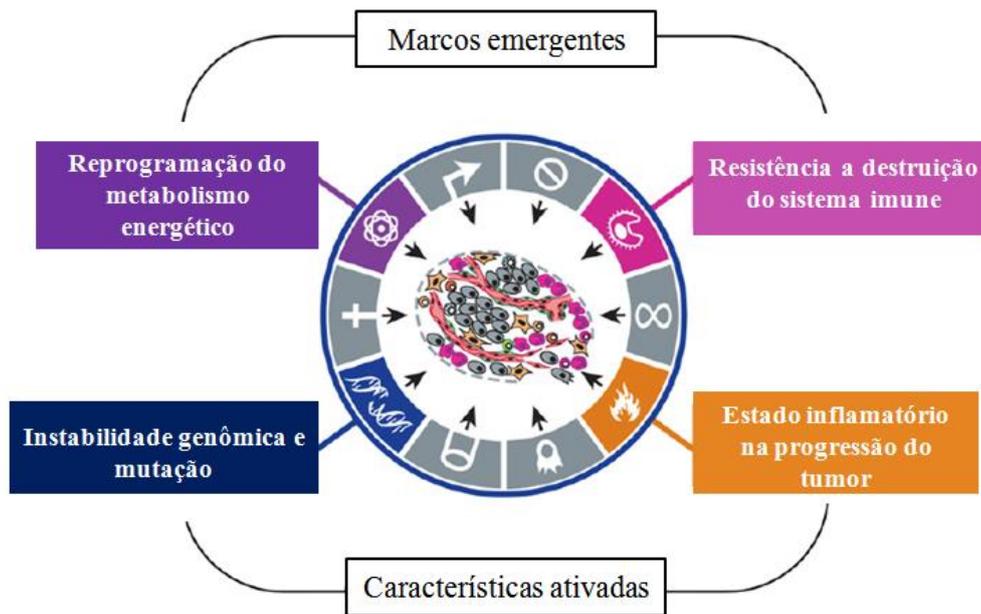


Figura 1: Características do Câncer. As quatro características funcionais do câncer. Duas características funcionais descobertas recentemente (instabilidade genômica e estado inflamatório na progressão do tumor) e duas características não funcionais que possibilitam a existência do tumor (reprogramação do metabolismo energético e resistência a destruição do sistema imune).

Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Atualmente, o câncer configura-se como um dos problemas de saúde pública mais complexos, pela sua magnitude epidemiológica que independe de classe social e econômica e por ser a segunda principal causa de morte por doença no mundo, estando abaixo apenas das doenças cardiovasculares. A detecção precoce e o tratamento adequado do câncer são fatores importantes para o estado clínico e sobrevivência do paciente, uma vez que a precocidade no diagnóstico do tumor irá influenciar no êxito da terapia (FERREIRA et al., 2013).

Aproximadamente 8,2 milhões de pessoas morrem anualmente de câncer (IARC, 2012). A mais recente estimativa mundial apontou a ocorrência de 27% de mortes por câncer no ano de 2012 numa população de 16 milhões de pessoas acometidas com doenças não transmissíveis em países de baixa e média renda, perdendo apenas para doenças cardiovasculares. As estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que em 2030 podem ocorrer 13,1 milhões de mortes por câncer no mundo (OMS, 2014).

Em regiões como África, Ásia, América Central e América do Sul, a incidência de câncer é maior que 60%, sendo essas regiões responsáveis por 70% das mortes por câncer no mundo (WHO, 2015).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para o Brasil, biênio 2016/2017, a incidência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer entre homens e mulheres. Destes os mais incidentes são: câncer de próstata (61 mil); mama (57 mil); colón e reto (17.330 mil em homens, 17.620 mil em mulheres); traquéia, brônquio e pulmão (17.330 mil em homens, 10.890 mil em mulheres); colo do útero (16.340 mil); estômago (12.920 mil em homens, 7.600 mil em mulheres). Para a região norte estima-se para os anos de 2016/2017 a ocorrência de mais de 21.400 casos novos de câncer (INCA, 2016).

A quimioprevenção é vista como um caminho promissor para o controle do câncer, e tornou-se cada vez mais importante nos últimos anos. Embaravários agentes anticancerígenos estejam disponíveis, a maioria deles também causam danos as células normais acarretando em diversos efeitos secundários, tais como a imunossupressão, inflamação do revestimento do trato digestivo e queda capilar, diante disso o arsenal quimioterápico exige novas drogas mais seletivas e menos tóxicas para o corpo humano visando a qualidade de vida do paciente(PÉREZ; DANISHEFSKY, 2007; EGGERMONT; ROBERT, 2012).

2.2 Melanoma

O melanomaé uma neoplasia maligna que surge a partir de alterações genéticas e da proliferação dos melanócitos ou células progenitoras dos melanócitos localizados na pele (CALIFANO; NANCE, 2009).

A pele é formada por duas camadas, a epiderme e a derme (figura 2). A epiderme, camada mais externa, é 80% composta por queratinócitos que estão dispostos ao longo dos cinco

estratos que compõe a epiderme (estrato germinativo, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo). Cada estrato representa uma fase de maturação dos queratinócitos. Já a camada dérmica é composta por fibroblastos, colágeno tipo I e vasos sanguíneos, e tem como função propiciar a pele suporte mecânico e nutricional. Os melanócitos, que habitam a junção dermo-epidérmica ou camada basal, e que estão dispostos entre cada 5-10 queratinócitos basais, são células responsáveis por produzir o pigmento melanina, o qual tem como função conferir pigmentação da pele e proteção contra radiações UV (HSU; MEIER; HERLYN, 2002; BROHEM et al., 2010).

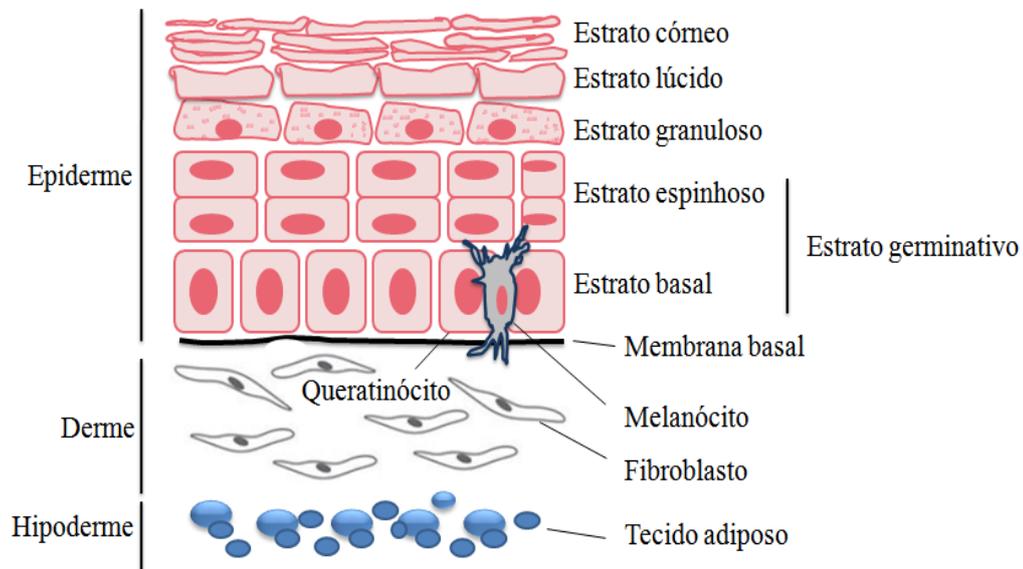


Figura 2: Camadas da pele e seus componentes celulares. Localização dos melanócitos.

Fonte: Adaptado de BROHEM et al., 2010.

Descrito pelo Dr. Robert Carswell em 1838 como um tumor “preto fatal”, o melanoma é caracterizado como o mais agressivo tipo de câncer de pele, com elevado poder metastático e resistência a agentes quimioterápicos em estágios mais avançados da doença (CAPORALI et al., 2012).

A etiologia do melanoma está associada à exposição excessiva a radiação UV e predisposição do paciente. Vários fatores de riscos relacionados ao desenvolvimento do melanoma também já foram elucidados, dentre eles estão, pessoas de pele clara ou de origem caucasiana, presença de nevos displásicos (atípicos), aumento no número de nevos típicos ou lesões pré-existentes na pele, em adição aos fatores ambientais, fatores genéticos, histórico familiar e imunossupressão (GANDINI et al., 2005; GORANTLA; KIRKWOOD, 2014; PALUNCIC, J. et al., 2016).

O melanoma pode se desenvolver no interior ou próximo a uma lesão pré-existente ou na pele saudável sem evidências de lesão precursora (CALIFANO; NANCE 2009). Morfologicamente o melanoma manifesta-se como uma lesão na pele caracterizada por diferentes formas clínicas. Geralmente essas lesões se apresentam como placas, nódulos ou tumores, inicialmente assimétricos, com variações na cor ou apenas como manchas escuras com bordas irregulares que se alargam ao longo do tempo (COCKERREL, 2012).

O curso clínico do melanoma é determinado pela disseminação do tumor, dependendo do tipo, espessura, localização, crescimento vertical ou horizontal, e da histologia do tumor primário. Com a progressão do tumor, que ocorre tanto em diâmetro quanto em profundidade, as células malignas invadem a epiderme e a derme e o tecido conjuntivo resultando em disseminação local e sistêmica até a fase final, a metástase (HSU; MEIER; HERLYN, 2002).

Na presença de metástase a sobrevida do paciente reduz consideravelmente, na maioria dos casos apresentam média de sobrevivência de apenas 6 a 9 meses dependendo do órgão comprometido. No entanto pacientes diagnosticados com melanoma na fase primária sem presença de metástase possuem sobrevida de 10 anos na maioria dos casos. O melanoma pode causar metástase em quase todos os órgãos, sendo os nódulos linfáticos e pulmões os mais afetados (LEONG et al., 2011; EGGERMONT; ROBERT, 2012).

2.2.1 Epidemiologia

O melanoma é um tipo de câncer poucofrequente, porém, é um dos mais agressivos e de maior letalidade entre os cânceres de pele, devido sua alta capacidade de metástase. A última estimativa mundial revelou a ocorrência de 232 mil casos novos de melanoma no ano de 2012, com 55 mil óbitos. Mais de 80% dos diagnósticos de melanoma e 65% dos óbitos por esse câncer foram verificados na Oceania, Europa e América do Norte, porém, as mais altas taxas de incidência de melanoma estão em países com população caucasiana (INCA, 2016).

Para o Brasil, no ano de 2016, estima-se a ocorrência de 5.670 mil casos novos de melanoma entre homens e mulheres, onde as maiores taxas estão para as regiões Sul e Sudeste. Os estados de São Paulo e Rio Grande do Sul serão os mais afetados, com 1.440 mil e 850 casos novos respectivamente. Os estados de Santa Catarina (480 casos novos), Paraná (620 casos novos) e Rio de Janeiro (370 casos novos) também estão entre os cinco estados com maior incidência desta neoplasia no Brasil (BRASIL, 2016).

Para a Região Norte, estimam-se 160 casos novos de melanoma entre homens e mulheres, sendo que desses, 80 estão previstos para o estado do Amazonas. Em Manaus a estimativa para 2016 são de 20 casos de melanoma entre homens e mulheres (INCA, 2016)

2.2.2 Formas clínicas do melanoma

Considerando o perfil clínico e histológico o melanoma pode ser classificado em cinco tipos: melanoma expansivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma lentigo maligno (LM), melanoma lentiginoso acral (MLA) e melanoma mucosa lentiginosa (MML) (CALIFANO; NANCE 2009; EGGER et al., 2012).

Dentre os tipos mencionados o (MES) é o tipo mais frequente e abrange aproximadamente 70% dos melanomas malignos (MMs), o qual surge a partir de um nevo estável pré-existente ocasionando alterações típicas tais como: ulceração, ampliação, sangramento e mudanças de cores que vão do rosa, azul, cinza, marrom e preto (CAINI et al., 2009; COCKERREL, 2012; EGGER et al., 2013).

O segundo mais comum é o MN, ocorre em 10% a 15% dos casos e apresenta-se como uma lesão nodular simétrica e uniforme da superfície cutânea que segue invadindo o tecido conjuntivo, possui cor castanha, negra ou azulada (CALIFANO; NANCE 2009; SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011).

Com menor frequência ocorre o LM, representa apenas 10% dos casos, atinge principalmente idosos em regiões expostas ao sol caracterizado como manchas acastanhadas ou enegrecidas que atingem uma região relativamente grande quando comparado com outros tipos de melanoma (EGGER et al., 2012; DUNCAN, 2009).

O MLA ocorre com a mesma frequência entre pessoas negras e brancas e é o tipo histológico mais agressivo, com rápida progressão da fase de crescimento radial para vertical. Nos Estados Unidos acomete entre 1,8 por 1.000.000 pessoas/ano. Ocorrem nas regiões palmo plantares, extremidades digitais e as áreas sub-ungueal (EGGER et al., 2012; ZEBARY et al., 2013).

O MML é outro tipo raro, com fatores de risco e etiologia pouco estabelecida, ocorrem em apenas 3% dos casos e acometem principalmente epitélios de revestimento de mucosas (CALIFANO; NANCE 2009; TACASTACAS et al., 2014).

2.2.3 Patogenia do melanoma

Após a transformação maligna dos melanócitos, inicia-se a fase de proliferação na junção dermo-epidérmica (figura 3) onde as células individuais aparecem dispersas formando agrupamentos celulares com o passar do tempo, nesta fase apresentam-se clinicamente como manchas claras bem discretas. Com a progressão, as células malignas invadem a epiderme estendendo-se para as camadas mais externas da pele. Nesta fase, as lesões já se manifestam apresentando anormalidades visíveis, com pigmento marrom ou preto, assimétricas e com bordas irregulares (HSU; MEIER; HERLYN2002; HAASS; HERLYN, 2005).

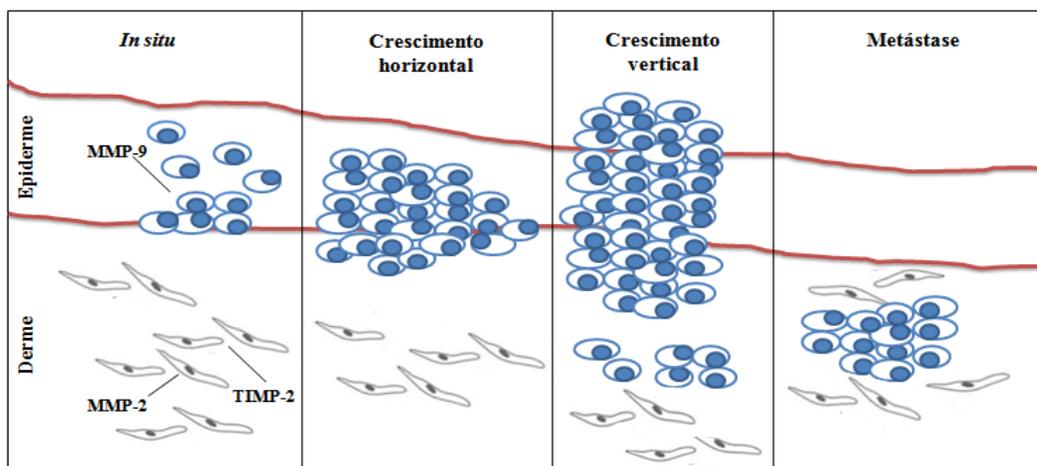


Figura 3: Desenho esquemático das fases do desenvolvimento do melanoma cutâneo, através dos processos de iniciação, promoção e progressão.

Fonte: Adaptado de HOFMANN et al., 2000.

A partir deste processo, inicia-se a fase de crescimento radial, as estruturas que rodeiam a lesão também passam a ser ocupadas pelos melanócitos atípicos. É o primeiro estágio

reconhecível do melanoma primário. Subsequentemente ocorre à fase de crescimento vertical em que a massa melanocítica infiltra-se na extensão da derme e a neoplasia se expande. Nesta etapa as lesões já são bem características, apresentam-se como nódulos ou manchas com bordas irregulares ligeiramente elevadas, superior a 6 mm de diâmetro. A invasão progride para o tecido subcutâneo ocorrendo a partir daí a disseminação sistêmica por vias linfáticas ou hematológicas com a progressão do tumor para as regiões próximas e distantes no corpo humano, caracterizando a metástase (Figura 3) (COCKERREL, 2012).

2.2.4 Genética do melanoma

Sabe-se que o melanoma possui etiologia multifatorial que requer a interação de fatores genéticos e ambientais (AVILÉS; LÁZARO, 2006). A transformação maligna dos melanócitos ocorre como resultado secundário, devido a uma ativação oncogênica, seja de origem genética, incluindo mutação gênica, deleção, amplificação ou translocação, ou de eventos epigenéticos, como metilação do DNA e/ou alterações na cromatina ou modificação de histonas. Tais alterações estão relacionadas principalmente com genes que regulam o metabolismo do ciclo celular. Em resposta a essas alterações, ocorre a geração de clones melanocíticos com capacidade replicativa auto-suficiente, capazes de sustentar o crescimento e viabilidade do tumor (PALMIERI et al., 2009; PALUNCIC et al., 2016).

Vários genes relacionados com desenvolvimento e progressão do melanoma já foram elucidados. A mutação mais comum nesta neoplasia ocorre no gene *BRAF* detectada em aproximadamente 40% a 50% dos casos configurando-se como o principal biomarcador para esse tumor. Essa mutação envolve a mudança da valina por ácido glutâmico no códon 600 conhecido como mutação V600E (DAVIES et al., 2002; DONG et al., 2003; XING et al., 2005; UGUREL et al., 2015).

Outramutação no gene *BRAF* em que há troca da valina por uma arginina (V600K) também já foi descoberta, porém, ocorre com menor frequência no melanoma. Tais mutações estão fortemente ligadas a superativação da via MAPK (SULLIVAN; FISHER, 2014).

A via MAPK é uma via de proteínas quinase ativadas por mitógeno (RAS-RAF-MEK-ERK). Os componentes principais desta via são a proteína RAS, uma proteína transmembrana ligada a proteína G que possui a função de converter sinais da membrana para o núcleo; Proteínas RAF (*Rapidly growing fibrosarcoma*) que constituem uma família de serina-treonina quinases (ARAF, BRAF e CRAF); MEK 1/2 e ERK 1/2. Tais moléculas são responsáveis por regular vários processos celulares através de uma cascata de fosforilação desencadeada por sinais extracelulares da membrana celular que vão diretamente para o núcleo induzindo o crescimento celular, proliferação, diferenciação e evasão da apoptose (figura 4) (DHOMEN; MARAIS, 2009; SHEPHERD; PUZANOV; SOSMAN, 2010).

A via MAPK é ativada por vários receptores, incluindo c-KIT, receptor FGF e c-MET. Em condições fisiológicas normais ocorre estimulação fraca da via, insuficiente para induzir uma proliferação melanocítica (PALMIERI et al., 2009).

No melanoma a ativação da via pode ocorrer através da interação da proteína RAS com oncoproteínas RAF (BRAF e CRAF) levando ao início da cascata de sinalização (figura 4). No entanto a aquisição da mutação V600E desestabiliza a conformação da proteína quinase BRAF inativa para a forma ativa levando a atividade constitutiva da proteína sem a necessidade de ativação pelo RAS, isso culmina na superativação da via MAPK conferindo ao melanoma o poder de auto-suficiência em sinais de crescimento (AVILÉS; LÁZARO, 2006).

Mutação no NRAS também pode ocorrer em 15% a 20% dos casos de melanoma. NRAS foi um dos primeiros oncogenes do melanoma a ser caracterizado, é uma proteína de baixo peso molecular associada à membrana, responsável por receber e transferir sinais de crescimento da

superfície da célula para o núcleo através das vias MAPK e PI3K/AKT (SULLIVAN; FISHER, 2014).

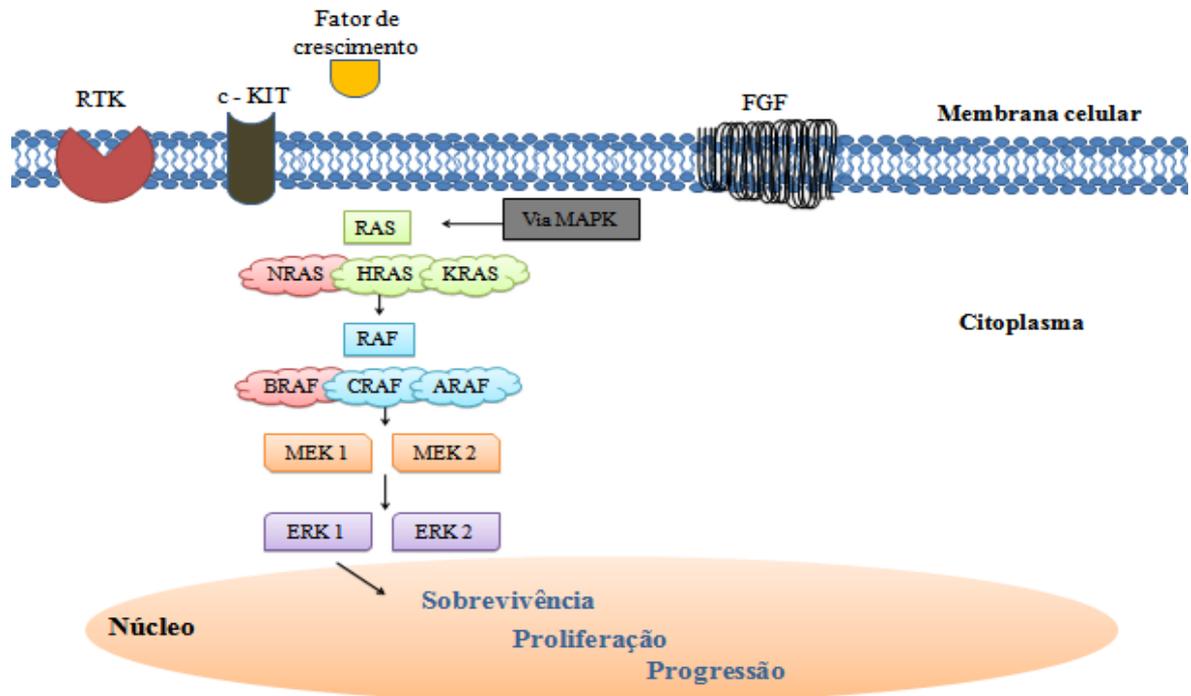


Figura 4: Visão geral da via de sinalização MAPK após a ligação de fatores de crescimento a receptores tirosina-quinase (RTK). RAS é ativada na membrana plasmática. RAS ativado recruta RAF para a membrana plasmática, que por sua vez torna-se ativada. RAF ativada fosforila e ativa MEK, que por sua vez fosforila e ativa a ERK. ERK ativado medeia várias respostas celulares, tais como a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Mutações no BRAF o mantém ativo desencadeando a cascata de sinalização dispensando a ativação pelo RAS.

Fonte: Adaptado de DHOMEN; MARAIS, 2009.

A ativação de BRAF e ERK pode ocorrer em virtude da cascata de sinalização dependente de AMP cíclico por consequência dos estímulos hormonais de α -melanócito (*α -melanocyte stimulating hormone* - α -MSH) e outros peptídeos derivados de proopiomelanocortina que se ligam ao receptor de melanocortina 1 em resposta à radiação UV (BUSCA et al., 2000; DAVIES et al., 2002).

2.2.5 Metaloproteinases

A malignidade do melanoma está particularmente associada ao seu fenótipo invasivo e a capacidade de desenvolver metástase, sendo esta a principal causa de morte desta doença. A formação de metástase inicia-se com a disseminação de células tumorais do tumor primário para tecidos adjacentes (CURRAN; MURRAY, 1999; LEEMAN; CURRAN; MURRAY, 2004).

Para que ocorra a invasão tumoral e metástase, é necessária a degradação e remodelação da lamina basal e da matriz extracelular (MEC), que funcionam como barreira física para migração celular. Enzimas proteolíticas possuem importante papel nesta etapa (BLÀZQUEZ et al., 2008).

As metaloproteinases (MMPs) constituem uma família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes que possuem habilidade de degradar um grupo particular de proteínas da MEC. Tais enzimas são expressas em tecidos normais atuando na remodelação do tecido conjuntivo que ocorre em muitos processos fisiológicos. A superexpressão destas proteínas contribui para diversos efeitos patológicos em virtude da degradação da MEC, dentre os quais, artrite reumatóide, aterosclerose e a invasão e metástase em tumores, estando constantemente aumentadas na maioria das neoplasias malignas (BLÀZQUEZ et al., 2008; HWANG et al., 2010; PEREIRA et al., 2006).

Já foram relatados oito tipos de MMPs, em que três são MMPs tipo membrana (MT-MMPs), ligadas covalentemente à membrana celular, enquanto que as outras cinco são MMPs secretadas que se localizam na superfície da célula (HSU et al., 2002).

No melanoma as MMPs envolvidas no processo de progressão tumoral são as gelatinases MMP-2 e MMP-9. Essas enzimas são superexpressas no melanoma e estão amplamente

associadas com a agressividade e o potencial metastático desse tumor. Elas atuam promovendo a desnaturação da laminina e colágeno tipo IV, elementos fundamentais da membrana basal e primeira barreira a ser degradada durante o processo de invasão, facilitando a migração das células de melanoma para a derme e outros tecidos da pele e corrente sanguínea (HSU et al., 2002; HOFMANN et al., 2005; RIBEIRO et al., 2008; BROHEM et al., 2010). As MMPs também atuam em estágios mais tardios do desenvolvimento do melanoma promovendo o crescimento sustentado do tumor pela ativação de fatores de crescimento e hormônios, como por exemplo, o α -MSH, hormônio responsável por ativar o ciclo celular nos melanócitos (CROWSON et al., 2007).

No decorrer da evolução do melanoma, a MMP-2 é secretada na sua forma inativa (pró-MMP-2). A pró-MMP2 por sua vez é ativada pelo complexo TIMP-2/MT1-MMP. Particularmente a MMP-2 atua promovendo a clivagem de proteínas da matriz extracelular e segundo Hofmann et al. (2005) ela ainda age interagindo com moléculas de adesão célula-célula principalmente sobre o complexo E-caderina/ β -catenina e fatores de crescimento promovendo a motilidade celular e invasão enquanto que as MMP-9 modulam a permeabilidade do endotélio vascular e vascularização do tumor. A inibição dessas proteínas ou da atividade delas pode ser uma estratégia terapêutica relevante contra o melanoma (GALIS et al., 1994; LEVICAR; NUTTALL; LAH, 2003).

2.2.6 Tratamento do melanoma

A prática padrão para tumores sólidos em casos que a doença está menos avançada é a excisão do tumor primário juntamente com o tecido circundante para evitar a recorrência local. Essa prática geralmente é associada à quimioterapia, radioterapia e terapia hormonal (STUCKY et al., 2010; DAVEY; WESTHUZEN; BOWDEN, 2015).

Devido à limitada compreensão da fisiopatologia do melanoma, poucos novos tratamentos foram aprovados pelo órgão regulador americano Food and Drug Administration (FDA) para o melanoma nos últimos 40 anos. Atualmente a abordagem terapêutica convencional para esta neoplasia é o uso da Dacarbazina e outras drogas citotóxicas como Carboplatina e Paclitaxel que atuam como complemento à remoção cirúrgica. No entanto, em casos avançados do melanoma, a resposta à essa droga resulta em um tempo médio de sobrevida de 6 a 7 meses para o paciente, e nenhum outro regime terapêutico provou ser superior a Dacarbazina em termos de sobrevivência (TARHINI; AGARWALA, 2006).

A Dacarbazina - 5-(3,3-dimetiltraiazeno)imidazol-4-carboxamida é um derivado imidazol-carboxamida da classe das purinas. Seu mecanismo de ação constitui com a adição de um grupo alquilo nas bases de ADN, impedindo a replicação celular (TREISMAN; GARLIE, 2010).

Felizmente o tratamento do melanoma metastático tem progredido nos últimos 10 anos em virtude dos avanços na pesquisa sobre o desenvolvimento e progressão desta neoplasia. Desde então a aplicação de terapias desenvolvidas que atuem especificamente nesses pontos como, por exemplo, “mutações motoristas” oncogênicas e bloqueio do sistema imune têm aumentado gradativamente (DAVEY; WESTHUZEN; BOWDEN, 2015).

A imunoterapia passou a ser uma abordagem válida e potencialmente eficaz no tratamento do melanoma. Essa terapia envolve a utilização de citocinas, vacinas e anticorpos direcionados com potenciais promissores. Nos Estados Unidos (EUA) foi aprovado pela FDA o uso da interleucina-2 (IL-2), uma citocina que estimula a produção de células assassinas ativadas por linfocinas (LAK) que detectam e lisam as células tumorais. Cerca de 8% dos pacientes de fase IV tratados com alta dose IL-2 apresentaram sobrevivência a longo prazo (EGGERMONT; ROBERT, 2011; GORANTLA; KIRKWOOD, 2014).

Estudos com anticorpo monoclonal anti-linfócito T citotóxico associado à proteína 4 (CTLA-4) também demonstrou bom potencial anti câncer. O Ipilimumab foi o primeiro anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 testado para o tratamento do melanoma. Este ativa o sistema imune ligando-se ao receptor da CTLA-4 expresso nas células T impedindo a ligação de CD86. Com isso a atividade e sobrevivência das células T são aumentadas. Tais células são então capazes de identificar e iniciar a destruição do tecido tumoral. Outros anticorpos monoclonais anti-CTLA-4 também estão sendo investigados, como Tremelimumab, bem como sua associação com Ipilimumab (SHTIVELMAN et al., 2014).

A proteína de morte celular programada também conhecido como PD-1 e CD279 (cluster de diferenciação 279), é uma proteína que em seres humanos é codificada pelo gene PDCD1. PD-1 é um receptor expresso na superfície de células T CD8. PD-1 liga-se a dois ligantes, PD-L1 e PD-L2 que são expressos pelo tumor e microambiente tumoral, tal fato funciona como ponto de controle imunológico com regulação negativa do sistema imune evitando a ativação das células T-CD8. Em resposta, ocorre a proteção das células tumorais da morte imune mediada, um processo denominado resistência imune adaptativa. Com os avanços na pesquisa do melanoma, já foi detectada uma alta expressão de PD-L1 nessas células tumorais. Ensaios clínicos utilizando antagonistas de DP-1 e DP-11 resultaram na aprovação pelo FDA a terapia com Pembrolizumab em pacientes com melanoma avançado. Esses ensaios exibiram uma taxa de 38% de resposta com sobrevida maior que 7 meses (SHTIVELMAN et al., 2014; GORANTLA; KIRKWOOD, 2014).

A descoberta das vias de sinalização que estão desreguladas no melanoma, também possibilitou o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Estes tratamentos visam à interrupção das vias que estão excessivamente ativas nas células de melanoma e que são responsáveis por regular a proliferação celular, como exemplo, a via RAS/RAF/MEK/ERK. Os

componentes dessas vias responsáveis por ativar as cascatas de sinalizações são os alvos mais promissores para tratamentos específicos (TREISMAN; GARLIE, 2010).

O primeiro fármaco desenvolvido para atuar nessa via foi o inibidor PLX4032, conhecido como vemurafenib. Este atua especificamente como inibidor de BRAF mutante exibindo resultados promissores com uma taxa de resposta de 69% em ensaios clínicos (EGGERMONT; ROBERT, 2011; ASHWORTH; DAUD, 2014).

Terapias que atuem na inibição de NRAS também demonstraram ser promissoras no tratamento do melanoma. Exemplos desses fármacos são os inibidores da farnesiltransferase (FTIs). FTIs alteram a modificação pós-traducional de NRAS impedindo a sua inserção na membrana. Um estudo de fase II do FTI R115777 em pacientes com melanoma avançado resultou na potente inibição de FT no tecido tumoral (JACOMASSO, 2010).

Outro foco na terapia do melanoma, está na inibição da atividade das MMPs que há muitos anos vem sendo investigada como um método para controlar a propagação metastática do tumor. A busca por inibidores específicos para estas proteases pode ser mais uma estratégia terapêutica para esta neoplasia maligna. Estudos têm avaliado o efeito de Batimastate e Marimastate como inibidores de MMPs (HOFMANN et al., 2005).

O Batimastate, inibidor do tipo hidroxamato sintético e Marimastate apresentam atividade inibitória em relação ao crescimento de tumores e metástases de pulmão em diferentes modelos de tumor de rato. Estudos utilizando o Marimastate, em que foi testado na dose de 100 mg duas vezes ao dia observou a redução do tumor. Porém, em pacientes com câncer em que o tratamento foi dado por várias semanas, ocorreu o surgimento de vários efeitos tóxicos, como síndrome do músculo esquelético com inflamação periarticular, e dessa forma tais efeitos limitam o uso contínuo deste medicamento (WATSON, 1999; QUIRT et al., 2002).

Grupos que incluem hidroxamatos, carboxilatos, fosfinatos, e tiolatos também atuam como inibidores de MMPs. Destes, os hidroxamatos que são caracterizados pela presença do ácido hidroxâmico apresentam efeito inibidor mais potente. No entanto, existem preocupações sobre a farmacocinética desfavorável, baixa solubilidade e toxicidade, tornando seu uso clínico problemático (HU; SHELVER, 2002).

Apesar dos avanços na pesquisa de novas estratégias terapêuticas para o melanoma, ainda há uma grande lacuna em relação a terapias mais eficazes visando à cura ou melhora do prognóstico do melanoma metastático. Embora haja várias opções para o tratamento desta neoplasia, tornou-se evidente que qualquer tratamento é improvável obter a cura, principalmente em casos avançados da doença devido à natureza altamente agressiva do melanoma e capacidade de desenvolver resistência a terapia. Com isso, ainda há grande necessidade de buscar terapias mais promissoras que visem o bom prognóstico para esta neoplasia ou até mesmo a cura, através da compreensão das alterações moleculares que fundamentam o desenvolvimento do melanoma, bem como qualquer interação do tumor, seja ela, interação célula-célula, interação com microambiente tumoral ou até mesmo com a ajuda de novas plataformas para o estudo de novas drogas (LI et al., 2012; SHUPTRINE; SURANA; WEINER, 2012).

2.3 Modelo de cultura celular em equivalente dérmico

Uma das maiores descobertas no meio científico foi o desenvolvimento de métodos de cultura celular com a manutenção de células vivas independentes do seu organismo de origem. Este método assumiu um importante papel no estudo da biologia celular, bem como o uso desse mecanismo como plataforma de estudo para desenvolvimento de fármacos (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012; ASTASHKINA; GRAINGER, 2014).

Os desafios no tratamento do melanoma é desenvolver drogas com atividade potencial para obter a cura ou melhorado prognóstico de pacientes com doença avançada, desviando ainda dos mecanismos de resistência da célula tumoral em questão (TALUKDAR et al., 2011; BRAUCHLE et al., 2013).

Vários estudos têm demonstrado a importância do microambiente tumoral na biologia do melanoma e sua implicação na progressão e tratamento. Sabe-se que os componentes do microambiente e de autofagia contribuem para os mecanismos de sobrevivência e resistência do tumor à quimioterapia (OLUMI, A. F., et al., 1999; KALLURI, R.; ZEISBERG, M., 2006; TIAGO et al., 2014).

A partir desta constatação várias perspectivas surgiram sobre a validação de modelos de cultura celular que mimetizem o microambiente tumoral *in vivo*, na pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas pro câncer (TIAGO et al., 2014).

O microambiente tumoral é caracterizado por um complexo de componentes celulares e não celulares que viabiliza o desenvolvimento e progressão tumoral. Esta rede reguladora inclui moléculas da MEC (colágeno, laminina, fibronectina e proteoglicanos), fibroblastos, células do sistema imune entre outros. Além disso, moléculas bioativas como citocinas, fatores de crescimento e hormônios também são elementos importantes do microambiente tumoral (KALLURI, R.; ZEISBERG, M., 2006; BROHEM et al., 2010).

As interações entre as células tumorais e os elementos do microambiente são fatores determinantes para progressão tumoral. Um exemplo disso pode-se citar a MEC, um dos principais componentes do microambiente tumoral e primeira barreira para invasão das células tumorais. Ao longo da progressão do tumor, os componentes do microambiente contribuem para várias fases do processo carcinogênico promovendo crescimento tumoral, metástase e resistência às drogas (SEO; DELNERO; FICHBACH, 2014).

A utilização de modelos que mimetizem o microambiente tumoral parecem estar mais próximos de promover uma resposta fidedigna frente à atividade de agentes com potencial quimioterápico conferindo resultados mais reais e racionais. Tais plataformas contribuem ainda para a diminuição de testes em animais (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012; ASTASHKINA; GRAINGER, 2014).

A inovação em modelos de cultura celular traz para o âmbito da pesquisa plataformas de cultura 3D. Esses modelos de cultura celular têm como objetivo propiciar um microambiente tumoral que equivale ao organismo de origem, em que as células assumem sua morfologia natural envolvendo ainda mecanismos de sinalização intercelular que são essenciais nos processos de migração, diferenciação e desenvolvimento do tumor (SEO; DELNERO; FICHBACH, 2014).

No estudo do melanoma, o microambiente tumoral é necessário para a proliferação e expressão do fenótipo invasivo da célula, pois este é capaz de controlar os processos que determinam a proliferação, diferenciação e apoptose. Controle esse mediado pela comunicação extracelular através de fatores de crescimento e redes de sinalização, bem como por interações físicas entre as células através da adesão célula-célula e adesão célula-matriz (TALUKDAR et al., 2011; BRAUCHLE et al., 2013; VORSMANN et al., 2013).

Sistemas de cultura celular em monocamada (2D) são limitados para este fim, pois além de não mimetizar a complexa estrutura fisiológica da pele humana, causam mudanças na morfologia e na expressão de genes relacionados ao crescimento, migração e invasão tumoral, que não refletem o do fenótipo *in situ*. Isso mascara as atividades biológicas de células tumorais *in vitro* que reflete na resposta às drogas, que em muitos casos tem sua atividade potencializada (BROHEM et al, 2010; MARRERO; HELLER, 2012; ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012).

Melanoma em cocultura com queratinócitos e/ou fibroblastos na presença de matriz extracelular assumem um fenótipo semelhante ao que ocorre *in vivo*, com morfologia multidendrítica, mantendo constante a razão numérica em relação às outras células, além de assumirem um arranjo espacial no microambiente 3D (BRAUCHLE et al., 2013; VORSMANN et al., 2013).

A utilização de modelos experimentais 3D paracultura de melanoma propicia o resgateda fisiopatologia tumoral, pois, em contato com a MEC as células tumorais tornam-se capazes de evadir mecanismos de morte por apoptose e aumentar a secreção de MMPs e citocinas que favorecem a evolução tumoral. Diferentemente das culturas em monocamada, onde as células apresentam-se dispersas numa estrutura plana formando um tapete de células sem presença de matriz extracelular (figura 5), estando totalmente expostas aos efeitos da droga (TALUKDAR et al., 2011; BRAUCHLE et al., 2013; VORSMANN et al., 2013).

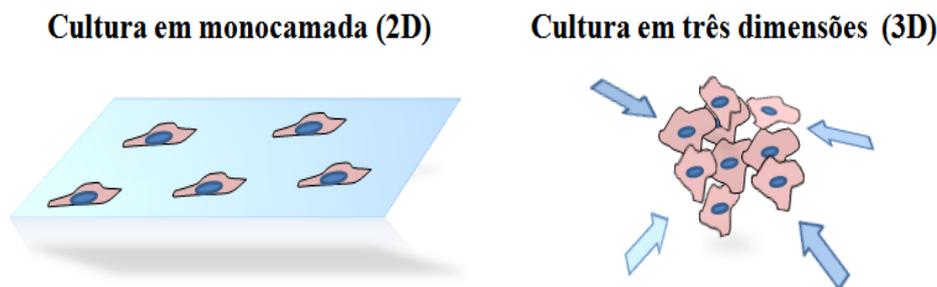


Figura 5: Esquema mostrando a diferença no arranjo espacial das células cultivadas em monocamada e em modelos de cultura 3D.

Com os avanços na tecnologia de cultura 3D, hoje é possível reproduzir *in vitro* estruturas da pele baseadas no modelo 3D colonizada por células dérmicas (fibroblastos) dispostas em uma matriz de colágeno tipo I recobertas por células de melanoma, denominadas de equivalente dérmico (figura 6). Com esse modelo é possível avaliar a interação das células de melanoma com a matriz extracelular determinando a invasão celular, interação da célula de melanoma com

as células de fibroblasto, secreção de citocinas e de proteínas como as MMPs, que influenciam na progressão do melanoma, bem como avaliar a resposta das células e desses componentes à atividade citotóxica ou reguladora de drogas submetidas a essas plataformas (SEMLIN et al., 2011; MATTEI-PAILLER et al., 2014).

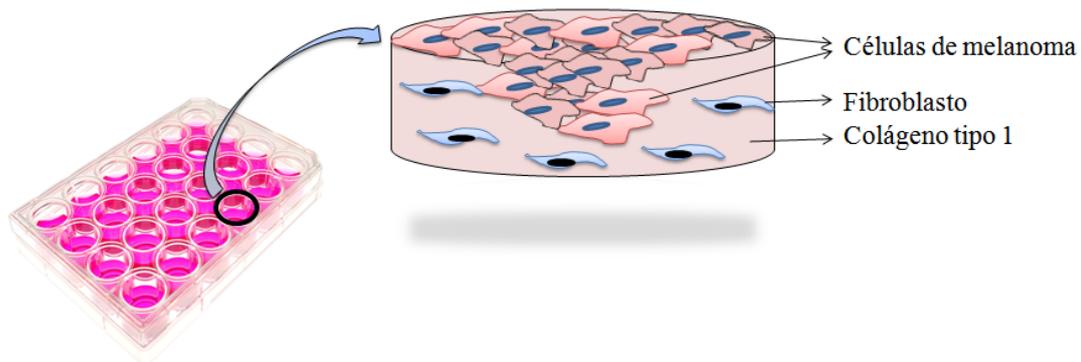


Figura 6: Esquema do rearranjo das células de fibroblasto e melanoma no modelo de cultura 3D denominado equivalente dérmico.

Fonte: Adaptado de TIAGO et al., 2014.

Vários estudos vêm utilizando essa nova abordagem. Schittek et al., (2007) utilizaram um compartimento dérmico reconstituído *in vitro* para análise de proliferação, migração e invasão de células de melanoma metastático humano da linhagem SK-Mel-28. Poncic & Kempenaar (1995) utilizaram recombinações de duas subcamadas de pele humana, para estudar o efeito citotóxico de lauril sulfato de sódio. Um dos modelos utilizados por eles foi a reconstrução da matriz dérmica utilizando colágeno tipo 1 povoado por fibroblastos.

Logo, os modelos de reconstrução da pele 3D que recriem com mais fidelidade o microambiente tumoral parecem ser plataformas promissoras no estudo e desenvolvimento de novos fármacos, objetivando-se alcançar modelos ainda mais complexos e completos a fim de se obter doses terapêuticas reais de drogas que possam ser utilizadas em estudos de fases clínicas e pré-clínicas minimizando os efeitos colaterais e potencializando os efeitos da droga, bem como, diminuindo os testes em animal.

2.4 Naftoquinonas

Os primeiros relatos sobre a utilização de compostos contendo naftoquinonas são do antigo Egito (cerca de 4000 anos). Lausona, uma naftoquinona encontrada em extrato de *Lawsonia inermis* é utilizada na Ásia há séculos por possuir propriedades cosmetológicas, como tintura de cabelo e pintura de pele e unhas, sendo utilizada para estes fins pelo mercado mundial desde 1890 (SAURUASARI et al., 2007).

As naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza como metabólito secundário de bactérias, fungos, animais e plantas. Destacam-se como objetos de interesse em muitas pesquisas por possuir potente atividade antitumoral, antiparasitária, leishmanicida, tripanocida, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (JORDÃO et al., 2013; ELAVARASAN; GOPALAKRISHNAN, 2014).

Vários compostos contendo a porção quinona já são utilizados na clínica atuando como importantes fármacos anticâncer. Dentre eles estão doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona e mitomicina (CAMPOS et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; MALLAVADHANI et al., 2014).

As naftoquinonas compõem um grupo de compostos dicetônicos com um esqueleto básico aromático derivado do naftaleno pertencentes à família das quinonas. Elas apresentam na sua conformação anel naftaleno com dois grupos carbonílicos nas posições 1,2 (*orto*-quinonoídica) ou 1,4 (*para*-quinonoídica) (Figura 7) (DIOGO et al., 2013; LUCAS et al., 2014).

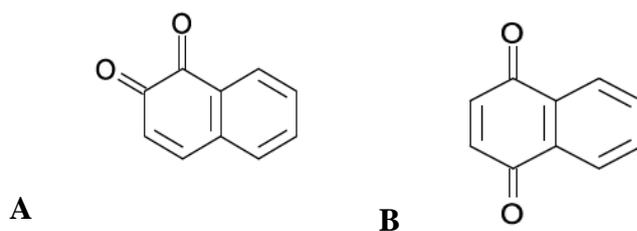


Figura 7: Estrutura química da 1,2-naftoquinona (A) e 1,4-naftoquinona (B).

O mecanismo de ação das naftoquinonas ainda é pouco esclarecido, no entanto, estudos já relataram que parte do mecanismo envolve a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (HO^\bullet) induzidas pela biorredução do complexo quinônico, resultando no estresse oxidativo das células ou induzindo a apoptose por inibição do complexo das topoisomerasas, em que as células perdem a habilidade de reparo, determinando o potencial desses compostos em causar danos ao DNA pela quebra de fitas simples e/ou dupla. Também são propostos os mecanismos de intercalação na dupla hélice do DNA e alquilação dos nucleotídeos (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; CAMPOS et al., 2012; SUNASSEE et al., 2013).

A capacidade desses compostos de produzirem ROS relaciona-se com o potencial de redução da molécula associado aos substituintes presentes no anel bem como a posição em que se encontram, o substituinte hidroxila diminui a toxicidade do composto, em contrapartida o anel bezeno aumenta a toxicidade formando a glutaciona dissulfeto por oxidação da glutaciona que por sua vez diminui a capacidade da célula de remover os radicais livres (FERREIRA et al., 2010).

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol [2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona] originalmente isolado a partir da madeira de várias espécies de árvores brasileiras da família Bignoniaceae, seus derivados isoméricos α e β -lapachona apresentam

atividade antitumoral. Estudos anteriores como o de Salas, et al. (2008) em que avaliou a atividade tripanocida de derivados de lapachol, α e β -lapachona através da inibição do crescimento e viabilidade de *T. cruzi* epimastigota, descreve também a boa atividade destes derivados frente a esse parasita, através da capacidade em produzir radicais livres (SALAS et al., 2008).

Sunasse e colaboradores (2013) também avaliaram a atividade citotóxica de derivados do lapachol, α e β -lapachona em células de câncer esofágico (WHCO1) em que a maioria exibiram boa citotoxicidade (CI50 1.6e11.7 mM) em comparação com o fármaco de escolha atual cisplatina (CI50 ¼ 16.5 mM), também foi observado que os compostos não foram tóxicos em células NIH3T3 de fibroblastos normais (SUNASSE et al., 2013).

2.4.1 Furano Naftoquinona

A 1H-ciclopenta[b]nafto[2,3-d]furano-5,10(3aH,10bH)-diona, denominada de IVS320 (Figura 8), é uma furano naftoquinona sintetizada a partir de uma 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lausona) (FREIRE et al., 2010).

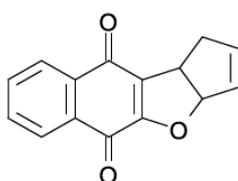


Figura 8: Estrutura química da 1H-ciclopenta[b]nafto[2,3-d]furano-5,10(3aH,10bH)-diona (IVS320).

IVS320 foi sintetizada como descrito em Freire et al., (2010) em que também avaliaram a atividade antifúngica do composto contra 6 espécies de *Candida sp.* isoladas da cavidade bucal de pacientes com próteses removíveis. A atividade apresentada foi significativamente superior a fármacos de escolha como o Fluconazol. Um dos mecanismos proposto para IVS320 em

células fúngicas é a despolarização da membrana, uma vez que este não altera a estrutura da parede celular dos fungos. O estudo também demonstrou que IVS320 não apresenta toxicidade contra fibroblastos humanos, despertando interesse na avaliação da citotóxica de IVS320 em células humanas tumorais (FREIRE et al., 2010).

Em um estudo por Ferreira et al. (2014) também avaliou-se a atividade antifúngica de IVS320 em 89 microrganismos, incluindo agentes de leveduras oportunistas, dermatófitos e fungos filamentosos. IVS320 exibiu boa atividade apresentando menor MIC (concentração inibitória mínima) através das espécies testadas. O MIC de IVS320 foi particularmente baixo para dermatófitos (valores variando 5-28 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e de *Cryptococcus sp.* (3-5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (FERREIRA et al., 2014)

Estudos utilizando outras furano naftoquinonas relataram citotoxicidade em quatro linhagens celulares de leucemia, MOLT-4 e CEM (linha de células linfóides) e K562 e KG1 (linhas de células mielóides), apresentando alto potencial citotóxico contra todas as linhagens testadas, mostrando resultados ainda melhores do que os compostos terapêuticos clássicos, como a doxorrubicina ou cisplatina (CARDOSO et al., 2014).

Esse trabalho se propõe avaliar o potencial citotóxico de IVS320 na linhagem de melanoma humano (SK-Mel-28) cultivado em dois modelos de cultura celular, modelo em monocamada (2D) e modelo de equivalente dérmico (3D), para efeito de comparação da atividade citotóxica da substância frente aos dois modelos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

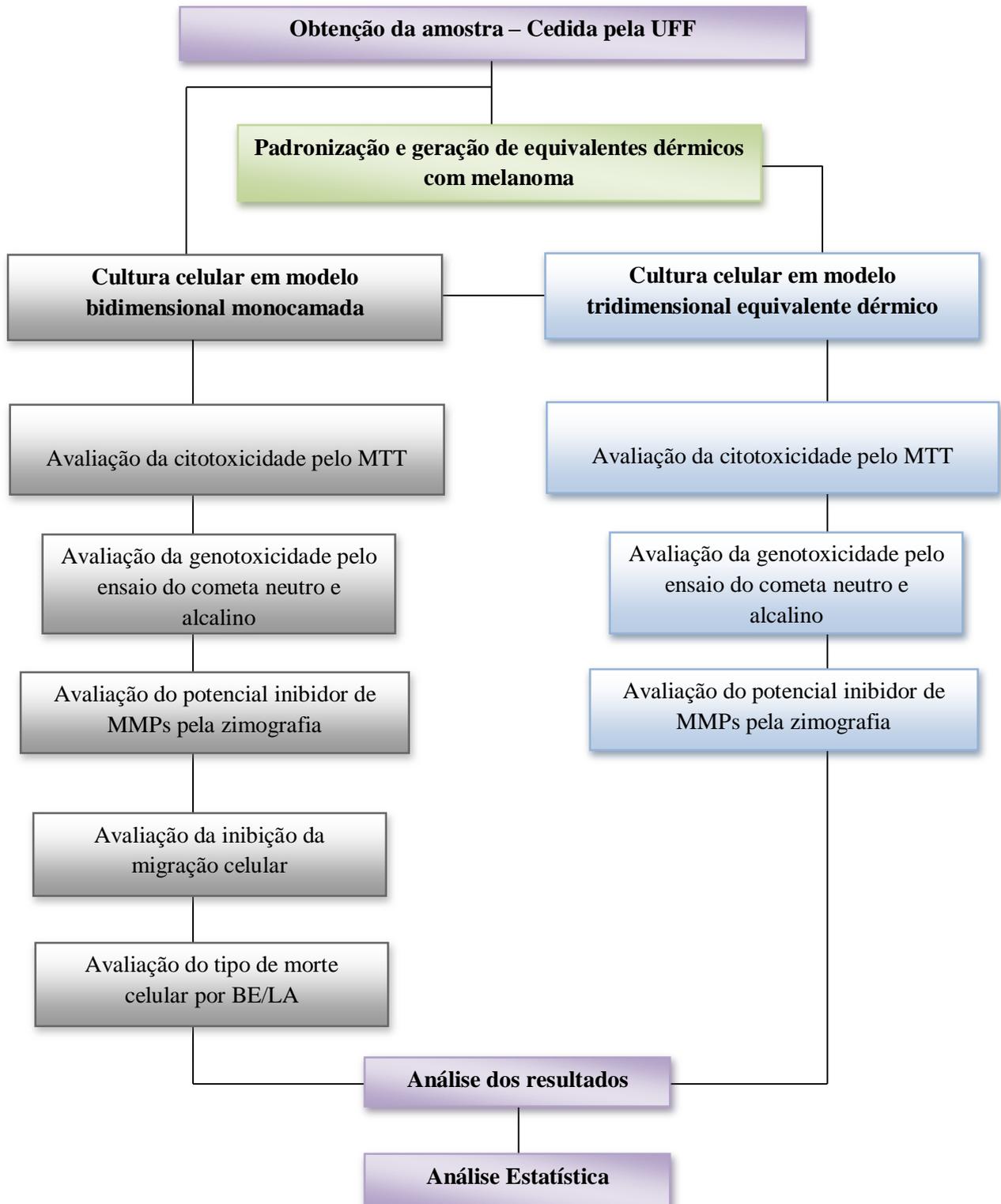
Avaliar a atividade anticâncer da 1H-ciclopenta[b]nafto[2,3-d]furano-5,10(3aH,10bH)-diona (IVS320) em modelos de cultura celular.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar o potencial citotóxico da IVS320 em monocamada e em equivalente dérmico;
- Determinar o potencial genotóxico da IVS320 em monocamada e em equivalente dérmico;
- Avaliar o potencial da IVS320 sobre as metaloproteinases MMP2 e MMP9 em monocamada e em equivalente dérmico;
- Avaliar a atividade da IVS320 sobre a motilidade de células de melanoma humano cultivada em monocamada;
- Determinar o tipo de morte celular induzido pela IVS320 em células cultivadas em monocamada;
- Comparar os resultados obtidos da cultura em equivalente dérmico humano com cultura em monocamada do tratamento da linhagem de melanoma SK-Mel-28 com IVS320.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental



4.2 Obtenção da amostra

A amostra utilizada, 1H-ciclopenta[b]nafto[2,3-d]furano-5,10(3aH,10bH)-diona, denominada de IVS320, foi obtida sinteticamente a partir de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lawsona – C₁₀H₆O₃) pelo grupo de pesquisa do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense-UFF como descrito em Freire et al., (2010) e foi cedida pelo Prof. Vitor Francisco Ferreira da Universidade Federal Fluminense.

4.3 Linhagens celulares

Neste estudo foi utilizada a linhagem de melanoma metastático humano (SK-Mel-28) gentilmente doada pela Profa. Dra. Silvyta Stuch Maria-Englerda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP e linhagem não neoplásica de fibroblasto humano (MRC-5) doada pela Profa. Dra. Raquel Montenegro da Universidade Federal do Pará – UFPA.

	p53	p53	p14	p16	BRAF	NRAS	Apaf-1	Casp8	Bcl-2	Bcl-xL	Mcl1
Linhagem		induzido	(RNAm)	(RNAm)	(V599E)	(éxon 3)	(prot)	(prot)	(prot)	(prot)	(prot)
SK-Mel-28	R273H ^R	-*	ND	+***	Mutant	Wt	-/+	++	++	++	++

Tabela 1: Características genéticas da linhagem neoplásica utilizada. p53 R273H: mutação *hot spot* da proteína, resultando na substituição de arginina por histidina no códon 273. Esta mutação ocasiona ganho de função, por perda de funções supressoras de tumor e aquisição de novas atividades oncogênicas; - B-RAF (V599E): mutação ocasionada pela substituição de timina por adenina, no códon 1796 (A1796T), resultando na substituição de valina por ácido glutâmico no códon 599; N-Ras (éxon 3) Q61R: mutação majoritariamente no códon 61, presente no éxon 3, ocasionada pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 182 (A182G), que resulta na substituição de glutamina por arginina; Wt: *wild-type* (selvagem).

Fonte: Adaptado de SANTOS, 2011.

4.4 Padronização do modelo de cultura celular 3D – Equivalente Dérmico

O ensaio de geração de equivalentes dérmicos com melanomas foi realizado de acordo com Santos (2011) com modificações. O colágeno foi obtido na forma de gel hidratado e estéril,

proveniente de extração de colágeno tipo I de tendão de cauda de ratos Wistar. O equivalente dérmico foi obtido mediante a ressuspensão de fibroblasto humano (MRC-5) em mistura de colágeno composta de 2,5mg/mL de colágeno tipo I (750µL volume final), soro fetal bovino (SFB) (50µL volume final), tampão de reconstituição 10X (TR 10x) (NaOH 0,05 M, NaHCO₃ 2,2%, HEPES 200 mM – 100µL volume final) e meio de cultura HAM-F12 10X (GIBCO – 100µL volume final).

Ressuspendeu-se 15×10^4 de MRC-5 na mistura de colágeno, que foi transferida para placas de 24 poços (1mL/ poço) e, após a gelificação em estufa à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, foi adicionado meio de cultura *Dulbeco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (1mL/poço) contendo células de melanoma metastático humano SK-Mel-28 (10×10^4 células/mL), com posterior cultivo em estufa em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C. O meio DMEM foi trocado a cada dois dias. O cultivo foi realizado durante 5 e 10 dias para a análise do melhor tempo de cultura do modelo. O procedimento está representado na figura 9.

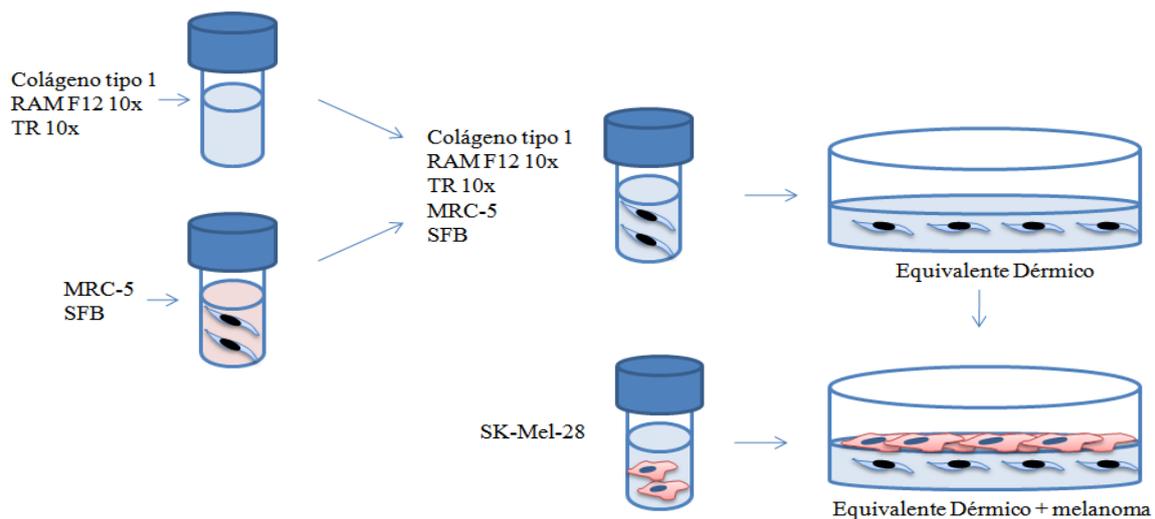


Figura 9: Esquema da obtenção do equivalente dérmico e plaqueamento da linhagem SK-Mel-28 sob o equivalente dérmico. Preparou-se uma mistura de colágeno, composta de colágeno tipo I, HAM F12 (10x) e tampão de reconstituição (10x). Adicionou-se MRC-5 já ressuspendida em SFB à mistura. Após gelificação do colágeno adicionou-se meio DMEM contendo a linhagem de melanoma SK-Mel-28.

Para o ensaio do cometa em equivalente dérmico foi realizada uma adaptação ao modelo. Em que, foi plaqueada a mistura de colágeno composta de 2,5mg/mL de colágeno tipo I (750µL volume final), tampão de reconstituição 10X (NaOH 0,05 M, NaHCO₃ 2,2%, HEPES 200mM – 100µL volume final) e meio de cultura HAM-F12 10X (GIBCO – 100µL volume final) sem a adição de fibroblasto humano. A mistura foi então adicionada em poços de placa de 24 poços (1mL/ poço) e, após a gelificação em estufa à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, foi adicionado meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (1mL/poço) contendo células de melanoma metastático humano SK-Mel-28 (10x10⁴células/mL), com posterior cultivo em estufa em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C. O procedimento está representado na figura 10.

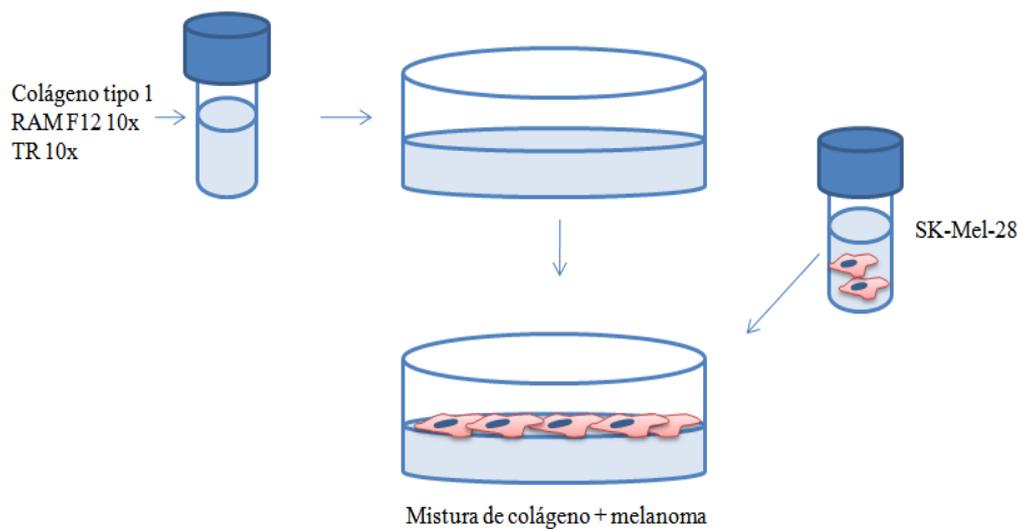


Figura 10: Esquema do plaqueamento da mistura de colágeno composta de colágeno tipo 1, HAM F12 (10x) e tampão de reconstituição (10x) com posterior plaqueamento da linhagem SK-Mel-28 sob o colágeno gelificado.

Para avaliação da morfologia celular tridimensional no equivalente dérmico após o período de incubação de 10 dias. Foi realizado cortes histológicos corados em H&E (Hematoxilina e eosina).

Após os tempos de incubação do equivalente dérmico com células de melanoma SK-Mel-28, foi retirado todo meio de cultura do poço e os poços foram lavados com PBS. Cada

equivalente foi retirado da placa com auxílio de pinças e envolvido em esponja histológica embebida com formaldeído 10% com posterior armazenamento em cassete histológico. Cada cassete foi mergulhado em um recipiente contendo formaldeído a 10% e incubado overnight a 4°C. Após o período de incubação o cassete foi estocado em recipiente contendo etanol 70% a 4°C até ser processado.

- Processamento Histotécnico

Após este processo, os cassetes foram alocados no Aparelho Histotécnico (HISTOTÉCNICO OMA) que é constituído por dez cubas contendo as seguintes substâncias na respectiva ordem:

1. Formol Tamponado à 10%.
2. Álcool Etílico à 80%.
3. Álcool Etílico à 95%.
4. Álcool Etílico Absoluto à 100%.
5. Álcool Etílico Absoluto à 100%.
6. Xilol I.
7. Xilol II.
8. Xilol III.
9. Parafina.
10. Parafina.

O formol foi utilizado para fixação do material. Na sequência, o álcool foi utilizado nas concentrações crescentes com o objetivo de desidratar o tecido para que este pudesse receber o xilol, que faz a clarificação. A parafina foi usada por último a fim de fornecer a consistência necessária ao material.

- Inclusão

Depois desse procedimento o equivalente foi retirado do cassete histológico e locado dentro de um molde de ferro, sendo derramada sobre ele parafina aquecida. Após isso, foram submetidos à temperatura de -20°C por 5 minutos para a solidificação da parafina. Após esse período, os blocos de parafina contendo os equivalentes foram retirados dos moldes de ferro e conservados em suporte específico.

- Preparação das lâminas

As lâminas foram imersas em solução sulfocrômica por 24 horas. Após término desse período, foram lavadas abundantemente em água corrente e em seguida, em água destilada. As lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente e depois devidamente numeradas e identificadas.

- Microtomia

Os blocos foram retornados ao congelador antes de serem cortados no micrótomo rotativo (REICHERT-JUNG, modelo 820). Os blocos contendo os equivalentes foram cortados na micragem 2 e 5 (mc). Em seguida as tiras do material foram distendidas no banho-histológico (ANCAP-430 WATTS). Do banho-histológico, o material foi recolhido com a própria lâmina, já previamente enumerada de acordo com cada amostra.

- Coloração

A coloração das lâminas foi realizada de acordo com o esquema a seguir:

A. Desparafinização pelo Xilol.

B. Hidratação (Do maior para o menor):

- B.1. Álcool Etílico Absoluto à 100%.
- B.2. Álcool Etílico Absoluto à 100%.
- B.3. Álcool Etílico à 80%.
- B.4. Álcool Etílico à 70%.
- B.5. Três lavagens com água para retirar o álcool.
- C. Coloração
 - C.1. Hematoxilina (DE CARAZZI) por 10 minutos ou mais.
 - C.2. Lavagem em Água corrente.
 - C.3. Eosina por 1 minuto.
 - C.4. Lavagem em Água corrente.
- D. Desidratação
 - D.1. Desidratação com álcool etílico 70%.
 - D.2. Álcool Etílico à 80%.
 - D.3. Álcool Etílico Absoluto.
 - D.4. Álcool Etílico Absoluto.
- E. Clarificação em xilol
- F. Montagem com Entellan
- G. Identificação com a etiqueta
- H. Realização da leitura.

- Montagem das Lâminas

As lâminas foram clarificadas com xilol filtrado e colada a lamínula com Entellan.

- Leitura das Lâminas

As lâminas foram lidas em microscopia óptica comum, fotografadas e analisadas, comparando os cortes de micragem 2 e 5 (mc) e os grupos cultivados em 5 e 10 dias para avaliar o melhor tamanho de corte e o melhor tempo de cultivo do modelo, para posterior realização dos ensaios. O resultado foi analisado de forma qualitativa verificando de forma visual a morfologia e população celular.

4.5 Cultura celular em monocamada (modelo 2D)

As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular estéreis contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Para a realização dos experimentos, as células foram descoladas das garrafas por mecanismo enzimático utilizando a enzima tripsina, e em seguida transferidas para placas onde foram realizados os testes.

4.6 Condições experimentais de cultura celular

Para a realização dos ensaios, as células utilizadas neste estudo foram submetidas a duas condições experimentais diferentes de cultura, cultura celular em equivalente dérmico (3D) e cultura celular em monocamada (2D).

4.7 Avaliação da viabilidade celular pelo MTT

O MTT é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann em 1983 para estimar a proliferação e sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs, ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-defenitetrazolio) ou MTT, que é hidrossolúvel e de cor

amarela, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica nos permite analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula (BONCLER et al., 2014).

Em modelo 2D

Para a realização deste ensaio foram utilizadas as células cultivadas em garrafas de cultura celular. As células foram transferidas para placas de 96 poços na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço (100 μ L/poço) e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após 24 horas foi realizado o tratamento das células com a substância IVS 320 nas concentrações 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10 e 20 μ M tendo como controle negativo DMSO 0,2% e controle positivo Doxorrubicina, nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas para obtenção da Concentração Inibitória Média (CI50). No tempo de 3 horas antes de completar o tempo de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi recolhido, adicionando logo após 100 μ L/poço da solução MTT (0,5mg/mL) diluído em DMEM. Após 3 horas, tempo estipulado para metabolização do reagente, o sobrenadante contendo a solução MTT foi retirado e a placa foi mantida sob abrigo da luz a temperatura ambiente por 24 horas. Passadas 24 horas foram adicionados 100 μ L/poço de DMSO na placa e a mesma foi mantida sob agitação por 10 minutos até a completa dissolução dos cristais de formazan. Após este procedimento foi realizada a leitura em leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter) no comprimento de onda de 570 nm.

O mesmo procedimento também foi realizado em linhagem não neoplásica de fibroblasto humano MRC-5, para testar a segurança da substância IVS320 nas mesmas concentrações e tempo de tratamento.

Em modelo 3D

Para a realização deste ensaio as células SK-Mel-28 foram cultivadas em equivalente dérmico durante 10 dias. Após este período as células foram submetidas ao tratamento com a substância IVS320 nas concentrações 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10 e 20 μ M tendo como controle negativo DMSO 0,2% e controle positivo Doxorubicina, nos tempos de 24, 48 e 72 horas de tratamento para obtenção da Concentração Inibitória Média (CI50). Em seguida, no tempo de 3 horas antes de completar o tempo de tratamento, o sobrenadante foi retirado e o equivalente foi lavado com PBS por 2 vezes para retirar os resquícios de meio contendo a substância. Logo após, o PBS foi retirado e sobre cada equivalente dérmico foi adicionado 600 μ L da solução de MTT (1mg/mL) e incubada por 3 horas em estufa. Após as 3 horas a solução de MTT foi aspirada e o poço foi lavado com PBS retirando-o logo em seguida. Após este procedimento, os poços foram preenchidos com 1000 μ L de DMSO, e a placa submetida a agitação por 2 horas para a dissolução dos cristais de formazan. Após esse período, o conteúdo dos poços foi homogeneizado por 3 vezes, e transferidos alíquotas de 200 μ L para placas de 96 poços (3 alíquotas por equivalente). Em seguida foi realizada a leitura em leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter) a um comprimento de onda de 570 nm.

A viabilidade relativa foi determinada pela comparação entre a média do tratamento com a média do controle negativo:

$$\text{Viabilidade (\%)} = 100 \times \frac{\text{Abs (amostra)}}{\text{Abs (controle negativo)}}$$

A análise foi realizada através do percentual de inibição x log da concentração, determinadas suas CI50 e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

4.8 Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa – pH alcalino e pH neutro

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 teste do cometa pH alcalino e pH neutro foi realizado com células da linhagem não neoplásica de fibroblasto humano MRC-5 e linhagem neoplásica SK-Mel-28 cultivadas em duas condições de cultura celular distintas. Cultura em monocamada (2D) e equivalente dérmico (3D). Para cada linhagem e para cada modelo de cultura foram realizados experimentos independentes.

Para a realização do ensaio do cometa com as linhagens cultivadas em monocamada, as células foram transferidas para placas de 24 poços na densidade celular 20×10^4 /poço. A placa foi incubada em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24h. Após esse tempo, as células foram tratadas com IVS320 nas concentrações de 0,25µM, 0,5µM e 1µM; DMSO (0,2%) como controle negativo, e Doxorubicina (10µM) como controle positivo, durante 3 horas. Para a obtenção das células, foi utilizado tripsina para remoção da população celular do fundo da placa. Após isso o conteúdo foi centrifugado para a obtenção do pellete celular.

No entanto, para a realização do ensaio do cometa com a linhagem SK-Mel-28 em equivalente dérmico, o procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.4 na página 44

deste documento. Após o período de incubação de 10 dias as células foram tratadas com IVS320 nas concentrações de 0,25 μ M, 0,5 μ M e 1 μ M; DMSO (0,2%) como controle negativo, e Doxorubicina (10 μ M) como controle positivo, durante 3 horas. Para a obtenção das células foi necessário a digestão da matrix de colágeno para a coleta das células após o tempo de tratamento estabelecido. Foi utilizada colagenase tipo I (Sigma-Aldrich) na concentração de 1mg/mL em cada poço, durante 2 horas em banho-maria a 37°C. Após isso o conteúdo foi centrifugado para a obtenção do pellet celular.

A partir de cada tratamento, foi retirado o volume celular de 10 μ L e adicionado a 110 μ L de agarose de baixo ponto de fusão, e então colocadas em lâminas de microscopia, pre-cobertas com agarose de ponto de fusão normal e cobertas com lamínulas, para distribuição homogênea das amostras. As lâminas foram mantidas por 5 minutos a 4°C, para solidificação da agarose (para cada amostra foram preparadas duas lâminas). Após a solidificação, as lâminas foram incubadas em solução de lise *overnight* a 4°C para remoção dos componentes celulares restando o DNA (“nucleoide”), ocupando o espaço que antes seria o núcleo da célula. Após esse período, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese, e adicionada a solução de eletroforese pH alcalino (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH>13), permanecendo por 20 minutos a 4°C para permitir o desempacotamento do DNA (SINGH, et al., 1988)

A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 20 minutos, a 20V e com corrente de 300mA. Posteriormente, colocou-se as lâminas em solução de neutralização por 5 minutos, para retirar a alcalinidade, secas e fixadas em etanol. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando 40 μ L de Syber Green 10000x (SIGMA) diluído 1:10000 em tampão borato de EDTA 1x (TBE), sobre as lâminas.

Os procedimentos para o ensaio do cometa em pH neutro foram iguais aos realizados para o cometa alcalino, com exceção da solução de eletroforese, a qual foi preparada com acetado

de sódio a 300mM e 100mM Tris-HCl, pH 8,5 e a corrida foi conduzida na ausência de luz por 20min, a 25V ou corrente de 300mA (WOJEWODZKA; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2002).

A análise dos cometas foi realizada de acordo com tamanho e intensidade da cauda, seguindo os seguintes padrões: classe 0: sem dano, sem a cauda; classe 1: com a cauda menor que o diâmetro da cabeça (nucleóide); classe 2: com o comprimento da cauda 1-2x o diâmetro da cabeça; classe 3: com a cauda maior que 2x o diâmetro da cabeça e classe 4: desintegrado, cometa sem a cabeça definida.

Para cada lâmina foram contados 50 cometas, sendo classificados de acordo com o tamanho da “cauda” do cometa, indicando o grau de quebra do DNA. O índice de dano foi calculado como o total de produtos da multiplicação entre os números de cometa de cada classe e grau de cada cometa.

$$\text{Índice total de dano} = 0. (\text{n Classe 0}) + 1. (\text{n Classe 1}) + 2. (\text{n Classe 2}) + 3. (\text{n Classe 3}) + 4. (\text{n Classe 4})$$

A frequência de dano foi calculada como a porcentagem de todos os tipos de cometa encontrado (grau 0 a grau 4) em relação ao total de cometas contados (50):

$$\text{Frequência de danos} = [(50 - \text{n Classe 0}). 100] / 50$$

4.9 Avaliação da inibição de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9)

O potencial inibidor de MMPs foi realizado por método zimográfico de acordo como descrito por Kaji et al., (2003). Essa técnica foi realizada para avaliar a inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9. Para esse ensaio foi usada a linhagem SK-Mel-28.

- Obtenção das proteínas coletadas no sobrenadante celular:
- Em Modelo 2D

Para a obtenção das proteínas em modelo 2D, as células foram transferidas para placas de 12 poços na concentração de 20×10^4 células/poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com IVS320 nas concentrações de $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$ e $1 \mu\text{M}$ no tempo de 18 horas de tratamento. Após o tempo de tratamento, o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 3000rpm durante 5 minutos. As proteínas do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

- Em Modelo 3D

Para a obtenção das proteínas. Os equivalentes foram tratados com IVS320 nos valores $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$ e $1 \mu\text{M}$ no tempo de 18 horas de tratamento. Após o tempo de tratamento, o sobrenadante de cada equivalente foi retirado e centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. As proteínas do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

- Mobilidade eletroforética das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina

Para separação das proteínas, foi utilizado gel de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis*) com 10% de acrilamida e 1% de gelatina, no qual foram colocados $30 \mu\text{g}$ de proteínas por poço do gel. O gel foi submetido à eletroforese (120 V por 1 hora e 30 minutos) para separação das proteínas.

- Incubação e revelação do gel

Após a corrida, o gel foi lavado 2 vezes por 15 minutos com 2,5% Triton X-100, para retirar o SDS. Em seguida, o gel foi incubado com tampão de incubação (0,05M TrisHCl pH 8, 5mM CaCl₂, 5μM ZnCl₂), *overnight*, a 37°C, para a degradação do substrato pelas MMPs. Logo depois, o gel foi corado com 0,5% coomassie brilliant blue R-250 por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante, e descorado com metanol 10% e ácido acético 10%. As bandas mais claras, que representam a degradação, foram comparadas com o grupo controle e analisadas utilizando o software ImageJ.

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

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

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

Assim, para a realização deste ensaio, as células foram cultivadas em placas de 12 poços numa densidade de 14×10^4 /poço, e incubadas durante 24 horas. Após esse período foi feita uma descontinuidade nas células com uma ponteira de 100μM, e as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações de IVS320 (0,25μM, 0,5μM e 1μM), tendo como controle negativo

DMSO (0,2%). O comportamento das células foi observado e fotografado durante um período de 6, 12 e 24 horas.

4.10.1 Avaliação da morte celular por coloração diferencial pelo Brometo de Etídio (BE)/Laranja de Acridina (LA)

Neste ensaio utilizou-se fluorescência para diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose utilizando como ferramenta a marcação diferencial com BE/LA. A LA é capaz de atravessar membranas intactas e intercalar-se ao DNA celular conferindo aparência verde ao núcleo. Enquanto, o BE, por sua vez, só consegue intercalar ao DNA e marcar o núcleo em vermelho se a membrana celular estiver danificada. Com este ensaio pode-se distinguir quatro tipos de células de acordo com a emissão de fluorescência e o aspecto morfológico de condensação da cromatina nos núcleos corados. (1) As células viáveis com membrana íntegra apresentam núcleos uniformes corados por LA apresentando cor verde brilhante. (2) Células em apoptose inicial (que ainda tem membranas íntegras, mas já começaram a sofrer clivagem no DNA) têm núcleos verdes corado por LA, mas a condensação da cromatina perinuclear é visível como mancha verde brilhante ou fragmentos. (3) Células em apoptose tardia ou secundária são coradas pelo BE apresentando núcleos com cromatina condensada ou fragmentada com coloração que vai do laranja para vermelho, pode-se observar ainda alterações na membrana celular em decorrência da formação de corpos apoptóticos, (4) em células necróticas (membrana danificada) o BE é incorporado majoritariamente conferindo cor laranja uniforme e núcleos vermelhos com estrutura organizada (BASKIC' et al., 2006).

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços a uma densidade de 10×10^4 células/poço e mantidas por 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para as células aderirem. Após este período, foi realizado o tratamento com IVS320 nos valores de 0,25µM, 0,5µM e 1µM no tempo de tratamento de 24 horas. O controle positivo foi Doxorrubicina 2,5µM e o controle negativo DMSO 0,2%. Após o tempo de tratamento, as

células foram recolhidas da placa por método enzimático utilizando tripsina, em seguida transferidas para tubo falcon e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspendidas em aproximadamente 10 μ L de meio DMEM. Em seguida, foi adicionado 1 μ L da solução 1:1 de BE/LA ao tubo e homogeneizadas, após isso o conteúdo do tubo foi transferido para lâmina de microscopia. A lâmina foi montada com lamínula para contagem em microscópio de fluorescência. Foram contadas 300 células de cada para quantificar o percentual de eventos celulares (viáveis, apoptóticas e necróticas).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios de citotoxicidade frente as linhagens celulares, foram realizados experimentos em triplicata e os valores obtidos foram utilizados para cálculos de CI50, a partir das curvas de concentração dose-resposta, com intervalo de confiança de 95%.

As análises estatísticas dos demais ensaios foram realizadas por análise de variância (ANOVA) *one-way*, e *two-way* seguido de teste Tukey e Bonferroni para comparação entre os grupos. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e os dados foram analisados no programa Graph Pad prism 5.0.

6. RESULTADOS

6.1 Padronização de equivalente dérmico

Para todas as condições experimentais (equivalente dérmico cultivado durante 5 e 10 dias e equivalente dérmico mais melanoma cultivado durante 5 e 10 dias) foram realizados cortes histológicos em micrótomo rotativo com espessura de 2 e 5 micras (Figura 11). Contudo, ao analisar as lâminas no microscópio óptico, verificou-se que os cortes com 2 micras de espessura apresentaram-se inapropriados, pouco corados, com dificuldade na visualização da densidade celular e, portanto, foram descartados. Sendo assim, foram padronizados para os experimentos posteriores cortes com 5 micras de espessura.

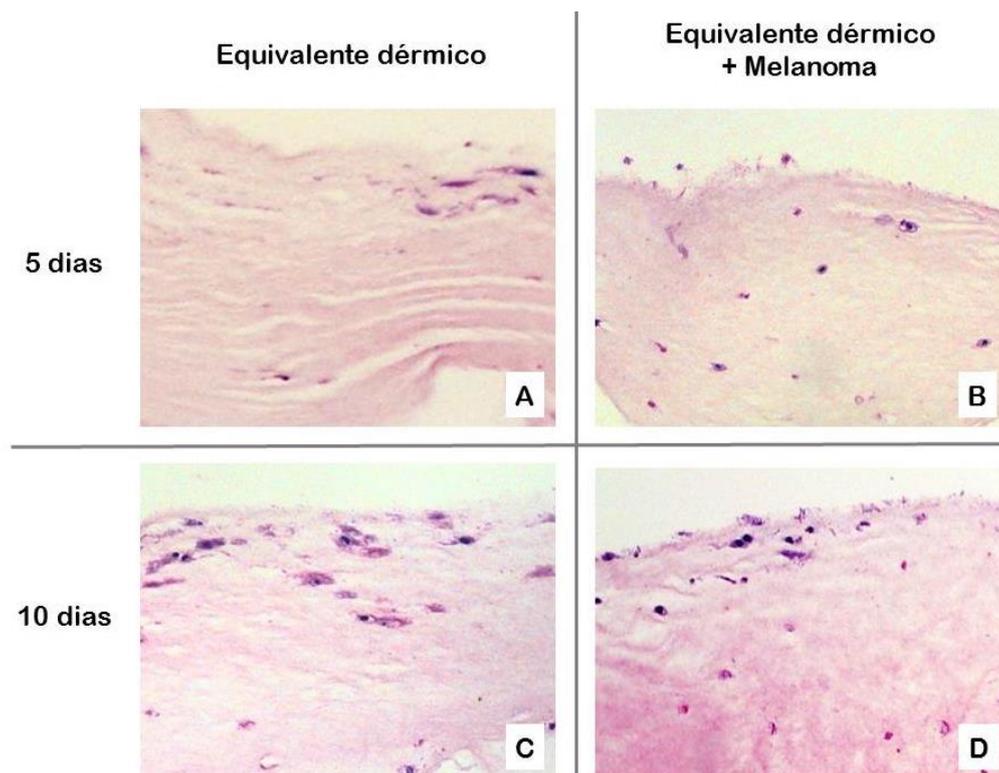


Figura 11: Células de melanoma metastático SK-MEL-28 cultivadas em equivalente dérmico (fibroblastos + colágeno tipo I) após 5 e 10 dias. A, Equivalente dérmico após cultivo de 5 dias; B, Células de melanoma metastático SK-MEL-28 cultivadas em equivalente dérmico após 5 dias; C, Equivalente dérmico após cultivo de 10 dias; D – Células de melanoma metastático SK-MEL-28 cultivadas em equivalente dérmico após 10 dias. Aumento de 400X. Coloração hematoxilina e eosina.

Da mesma forma que a espessura dos cortes, os tempos de cultivo 5 e 10 dias apresentaram variações em todas as condições experimentais realizadas. Como demonstrado pela figura 11, os cortes histológicos depositados nas lâminas e corados evidenciaram que o tempo ideal para cultivo, tanto em equivalente dérmico quanto este acrescido de melanoma, são 10 dias. Um maior tempo de cultivo, neste caso 10 dias, facilita a visualização do modelo tridimensional de pele artificial visto que a densidade de células é maior.

6.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT

A partir dos resultados obtidos no ensaio do MTT em monocamada na linhagem de melanoma SK-Mel-28, a substância IVS320 teve valor de CI50 0,54 μ M, 0,47 μ M e 0,49 μ M, já quando avaliada a citotoxicidade em equivalente dérmico a substância apresentou CI50 8,05 μ M, 5,22 μ M e 2,7 μ M, nos tempos de 24, 48 e 72 horas respectivamente (tabela2).

Considerando os valores de CI50 obtidos nesse ensaio, foram utilizados para os experimentos subsequentes as concentrações de 0,25 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M da substância IVS320.

Substância	CI ₅₀ (µM)		
	24 h	48 h	72 h
IVS320 (monocamada)	0,54	0,47	0,49
IVS320 (equivalente dérmico)	8,05	5,22	2,7
Doxorrubicina (monocamada)	4,90	1,3	1,0
Doxorrubicina (equivalente dérmico)	8,3	5,5	3,4

Tabela 2: Efeito da IVS320 sobre a linhagem de melanoma humano (SK-Mel-28) cultivado no modelo de cultura celular em monocamada e equivalente dérmico + SK-MEL-28 nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72h. Os valores estão representados como CI₅₀ (intervalo de confiança de 95%). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

O efeito da IVS320 sob a viabilidade celular na linhagem não neoplásica de fibroblasto humano MRC-5 cultivado em monocamada estão representados na Tabela 3.

Substância	CI ₅₀ (µM)		
	24 h	48 h	72 h
IVS320	3,83	3,44	3,76
Doxorrubicina	3,90	0,43	0,34

Tabela 3: Efeito da IVS320 sobre a linhagem de fibroblasto humano (MRC-5) cultivado no modelo de cultura celular em monocamada nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72h. Os valores estão representados como CI₅₀ (intervalo de confiança de 95%). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

6.3 Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa

A substância IVS320 nas concentrações 0,25 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M foi testada para avaliar a capacidade de causar danos ao DNA, na linhagem não neoplásica MRC-5 e linhagem neoplásica de melanoma humano SK-Mel-28 nos modelos de cultura celular, monocamada e equivalente dérmico, utilizando a versão em pH alcalino e pH neutro. Para ambos, foi utilizado para análise comparativa o índice e frequência de danos ao DNA. Tal parâmetro reflete a extensão de DNA lesionado.

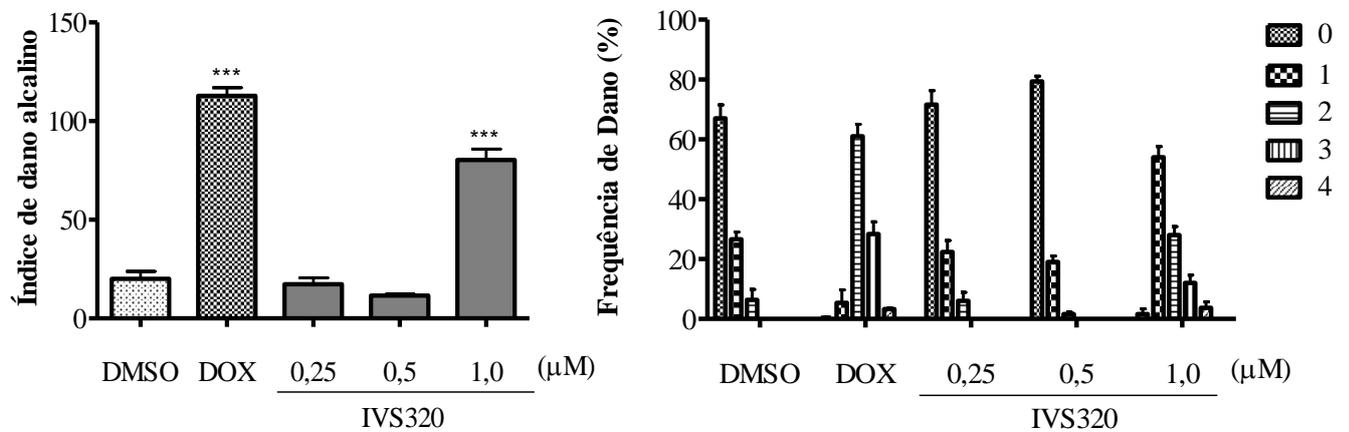
A MRC-5 cultivada em modelo de cultura celular em monocamada, tratada com IVS320 no ensaio do cometa alcalino, apresentou maior índice de dano significativo apenas quando tratada na concentração de 1,0 μ M ($p < 0,001$) quando comparado com o controle negativo (DMSO 0,2%), sendo o tipo de dano mais frequente o de grau 1 (54%). Nas concentrações 0,25 μ M e 0,5 μ M não houve diferença significativa. No ensaio do cometa neutro a IVS320 apresentou maiores índices de dano nas concentrações de 0,5 μ M e 1,0 μ M ($p < 0,01$) quando comparadas ao controle negativo, sendo os tipos de dano mais frequentes o de grau 1 em ambas as concentrações (89% e 74%, respectivamente). Os dados estão representados no gráfico 1.

A SK-Mel-28 quando cultivada em monocamada, no ensaio do cometa alcalino, apresentou maior índice de dano nas três concentrações testadas de IVS320 (0,25 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M) ($p < 0,001$) ao comparar com o controle negativo (DMSO 0,2%), sendo os tipos de dano mais frequentes o de grau 1 nas concentrações 0,25 μ M e 1,0 μ M (76% e 83%, respectivamente) e o tipo de dano grau 2 na concentração de 0,5 μ M (74%). No ensaio do cometa neutro o maior índice de dano foi na concentração de 1,0 μ M ($p < 0,001$), sendo o tipo de dano mais frequente o de grau 2 (55%). Os dados estão representados no gráfico 2.

No entanto, SK-Mel-28 cultivada em equivalente dérmico, tratada com IVS320 no ensaio do cometa alcalino não apresentou danos ao DNA nas três concentrações testadas, ou seja, não

houve diferença significativa quando comparada ao controle negativo (DMSO 0,2%). Porém, no ensaio do cometa neutro, a IVS320 apresentou maior índice de dano nas concentrações 0,5 μ M e 1,0 μ M ($p < 0,01$) quando comparadas ao controle negativo (DMSO 0,2%), os tipos de danos visualizados mais freqüentes foram o tipo de grau 2 na concentração de 0,5 μ M (52%) e os tipos de dano grau 2 e 3 na concentração de 1,0 μ M (47% e 41%, respectivamente). Os dados estão representados no gráfico 3.

A



B

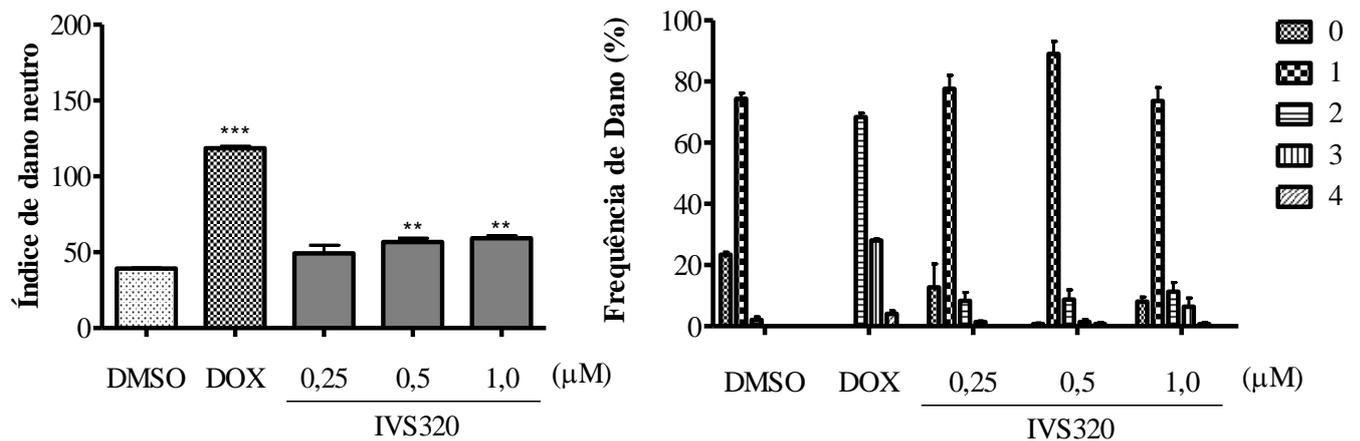


Gráfico 1: Índice e frequência de dano ao DNA em células MRC-5 cultivadas em monocamada, após 3h de tratamento com IVS320. A- Cometa alcalino; B- Cometa neutro. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA *one way* seguido de teste Tukey.

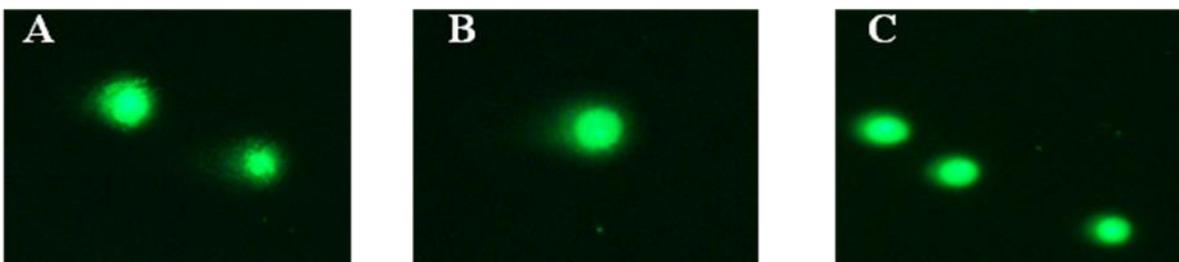


Imagem 12: Análise de fragmentação do DNA às células MRC-5 cultivadas em monocamada após tratamento por 3 horas com IVS320. A – Dano grau 1 na concentração de 1,0µM no cometa de pH alcalino; B e C – Dano grau 1 nas concentrações 0,5µM e 1µM respectivamente no cometa de pH neutro

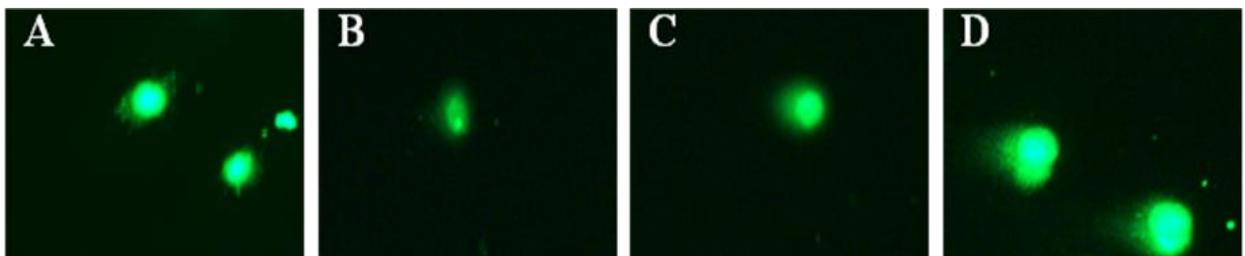
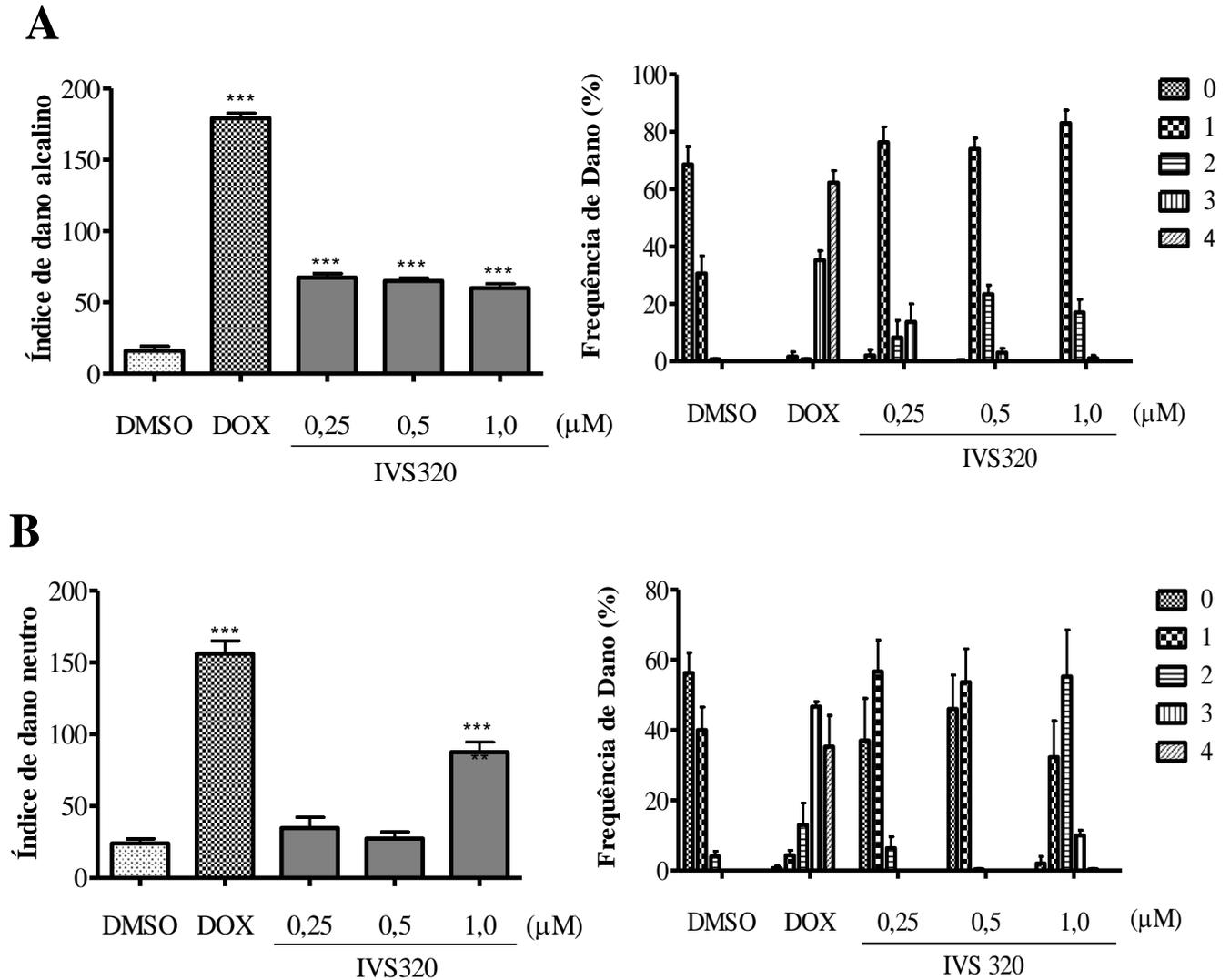


Imagem 13: Análise de fragmentação do DNA nas células SK-Mel-28 cultivadas em monocamada após tratamento por 3 horas com IVS320. A e B – Dano grau 1 nas concentrações de 0,25 μ M e 1,0 μ M no cometa de pH alcalino; C – Dano grau 2 na concentração 0,5 μ M no cometa pH alcalino; D – Dano grau 2 na concentração de 1 μ M no cometa de pH neutro

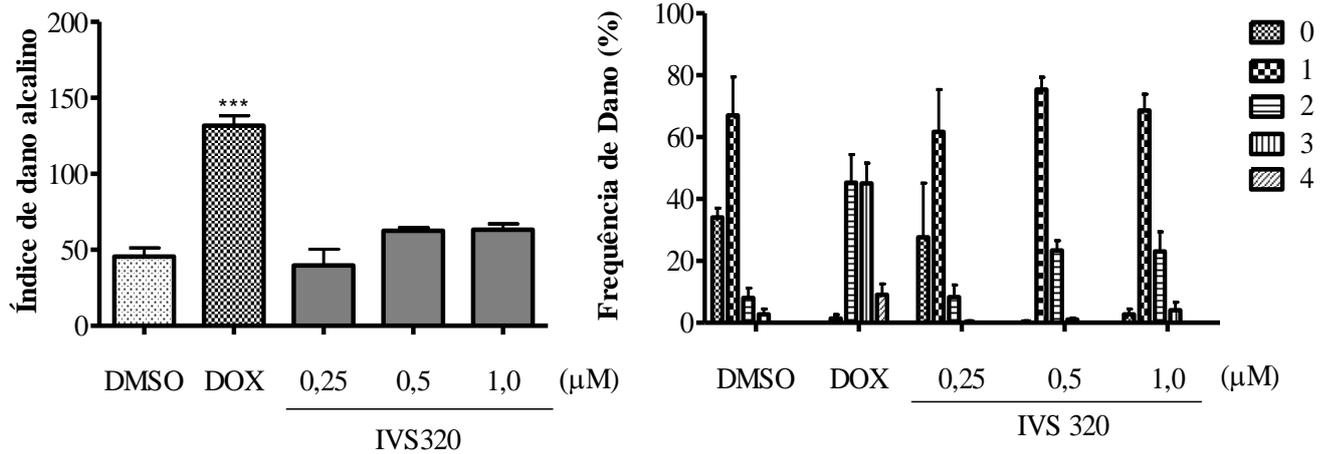
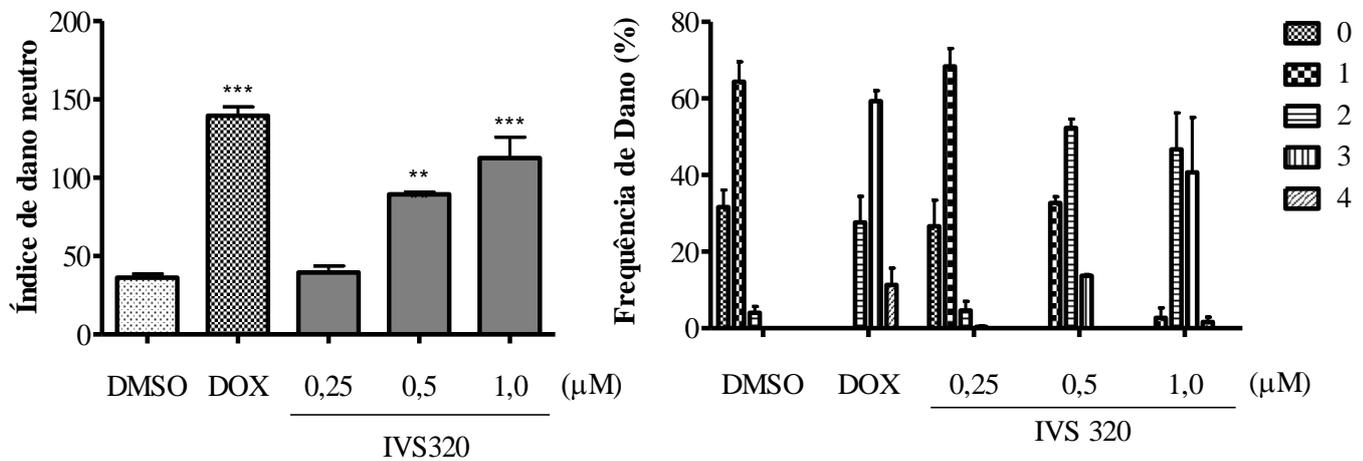
A**B**

Gráfico 3: Índice e frequência de dano ao DNA em células SK-Mel-28 cultivada em equivalente dérmico monocamada, após 3h de tratamento com IVS320. A- Cometa alcalino (não houve índice de dano significativos quando comparados com controle negativo); B- Cometa neutro. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA *one way* seguido de teste Tukey.

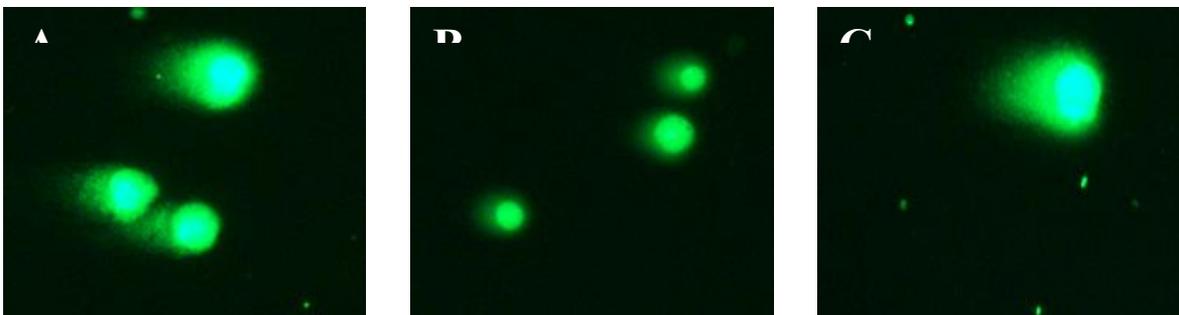


Imagem 14: Análise de fragmentação do DNA às células SK-Mel-28 cultivadas em equivalente dérmico após tratamento por 3 horas com IVS320. A e B – Dano grau 2 nas concentrações de 0,5μM e 1,0μM no cometa de pH neutro; C – Dano grau 3 na concentração 1,0μM no cometa pH neutro.

6.4 Avaliação da inibição de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9).

A atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 foi avaliada por método zimográfico. No ensaio realizado em monocamada, IVS320 apresentou efeito inibitório frente à MMP-2 e MMP-9, reduzindo significativamente a atividade enzimática nas três concentrações testadas 0,25µM, 0,5µM e 1,0µM no tempo de tratamento de 18 horas quando comparado com o controle negativo DMSO 0,2%. Os dados estão representados no gráfico 4.

A porcentagem de inibição para MMP-2 nas três concentrações testadas 0,25µM, 0,5µM e 1,0µM foi de 36% ($p<0,01$), 43% ($p<0,001$) e 50% ($p<0,001$) respectivamente. Para MMP-9 a porcentagem de inibição nas três concentrações testadas 0,25µM, 0,5µM e 1,0µM foi de 36% ($p<0,01$), 37% ($p<0,001$) e 44% ($p<0,001$) respectivamente.

A atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 no ensaio realizado em equivalente dérmico, também apresentou redução significativa nas três concentrações testadas 0,25µM, 0,5µM e 1,0µM por IVS320 no tempo de tratamento de 18 horas, quando comparadas com o controle negativo DMSO 0,2%. Os dados estão representados no gráfico 5.

A porcentagem de inibição para MMP-2 nas três concentrações testadas 0,25µM, 0,5µM e 1,0µM foi de 34% ($p<0,001$), 44% ($p<0,001$) e 57% ($p<0,001$) respectivamente. Para MMP-9 a porcentagem de inibição nas três concentrações testadas 0,25µM, 0,5µM e 1,0µM foi de 30% ($p<0,05$), 41% ($p<0,01$) e 58% ($p<0,001$) respectivamente.

Destaca-se que não houve diferença significativa nas porcentagens de inibição em relação aos dois ensaios, monocamada e equivalente dérmico, determinando então a capacidade de IVS320 em inibir a atividade enzimática das metaloproteinases -2 e -9.

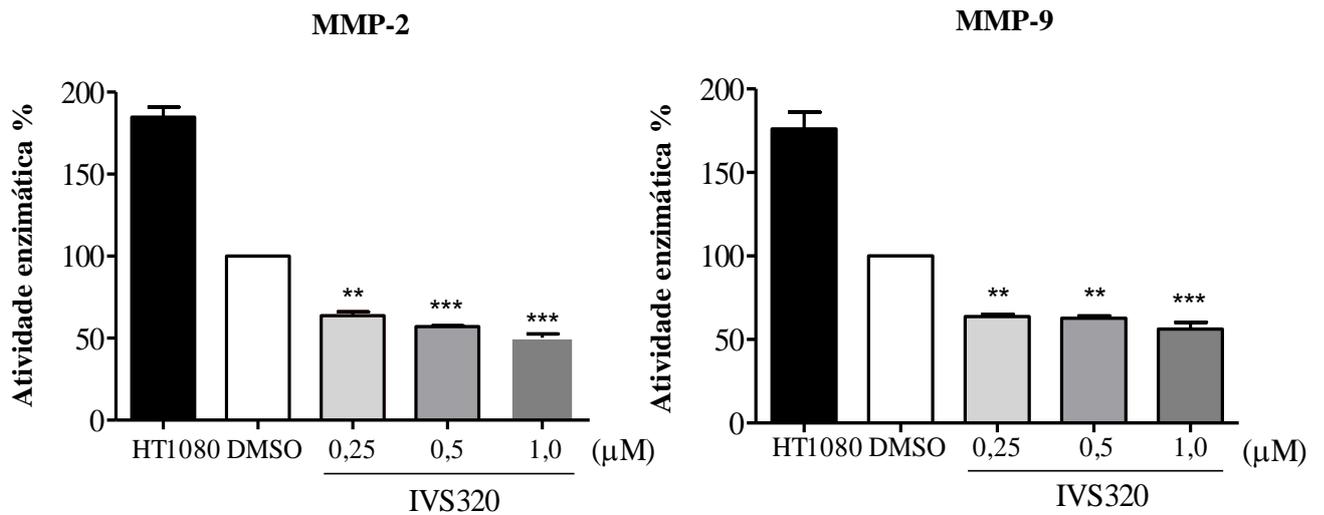


Gráfico 4: Atividade de MMP-2 e MMP-9 em células SK-Mel-28 cultivada em monocamada, após o tratamento com IVS320 no tempo de 18 horas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ foiconsiderado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA *two way* seguida de Bonferroni *posttest*.

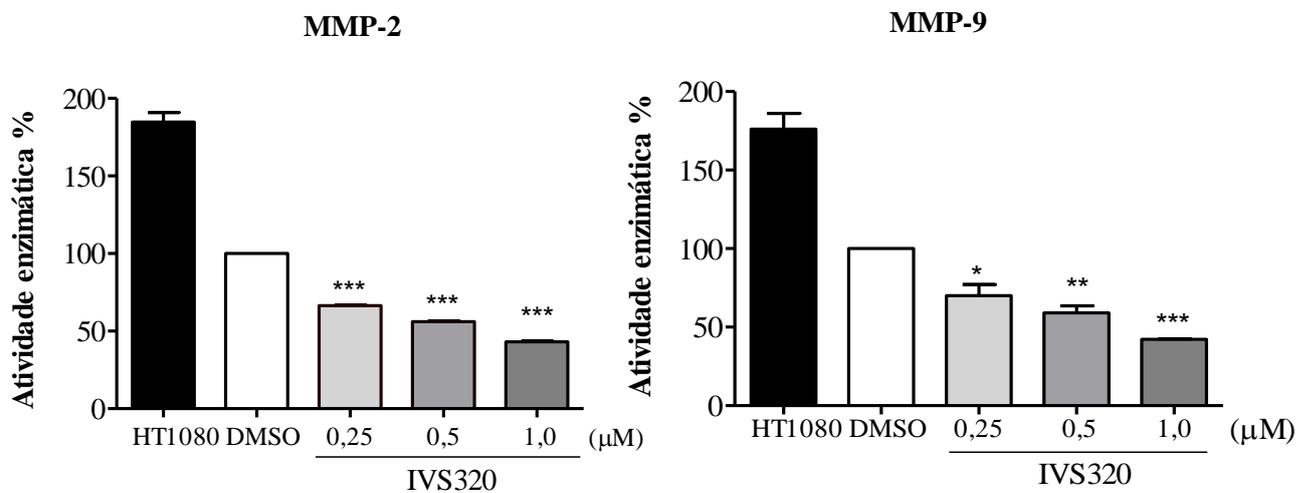


Gráfico 5: Atividade de MMP-2 e MMP-9 em células SK-Mel-28 cultivada em equivalente dérmico, após o tratamento com IVS320 no tempo de 18 horas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ foiconsiderado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA *two way* seguida de Bonferroni *posttest*.

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

O efeito inibitório da motilidade de IVS320 nas concentrações 0,2 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M, quando avaliado em monocamada na linhagem SK-Mel-28, pode ser observado na figura 14. A análise microscópica após o tratamento indicou redução significativa ($p < 0,01$) na taxa de motilidade celular somente na concentração (1,0 μ M) nos três tempos (6, 12 e 24 horas), quando comparadas ao controle negativo (DMSO 0,2%). Todos dados estão representados no gráfico 6.

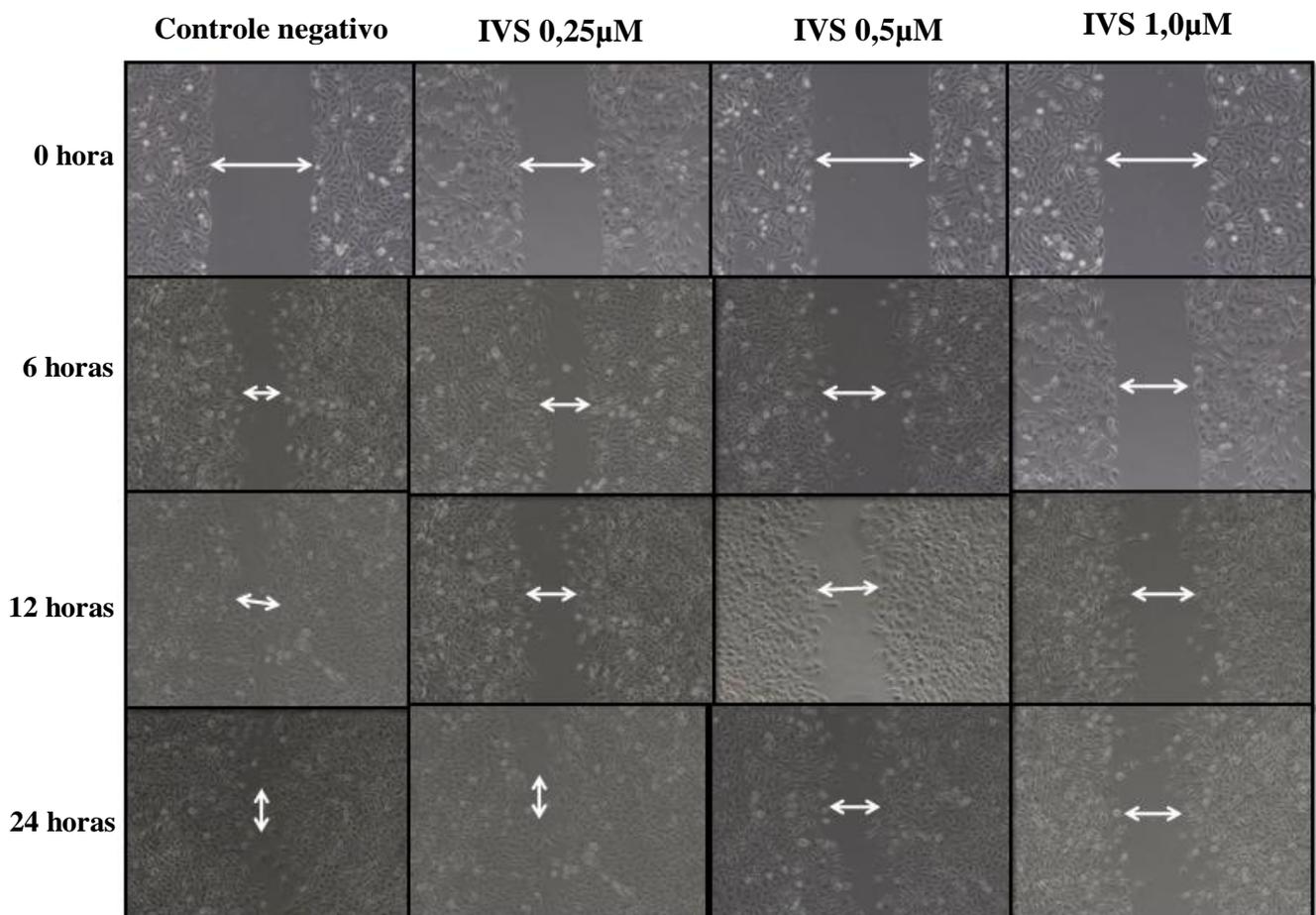


Figura 15: Avaliação da inibição da motilidade das células SK-Mel-28 cultivadas em monocamada quando tratadas com IVS320. Houve inibição na motilidade de SK-Mel-28 na maior concentração testada de IVS320 (1,0 μ M) nos três tempos de tratamento 6, 12 e 24 horas.

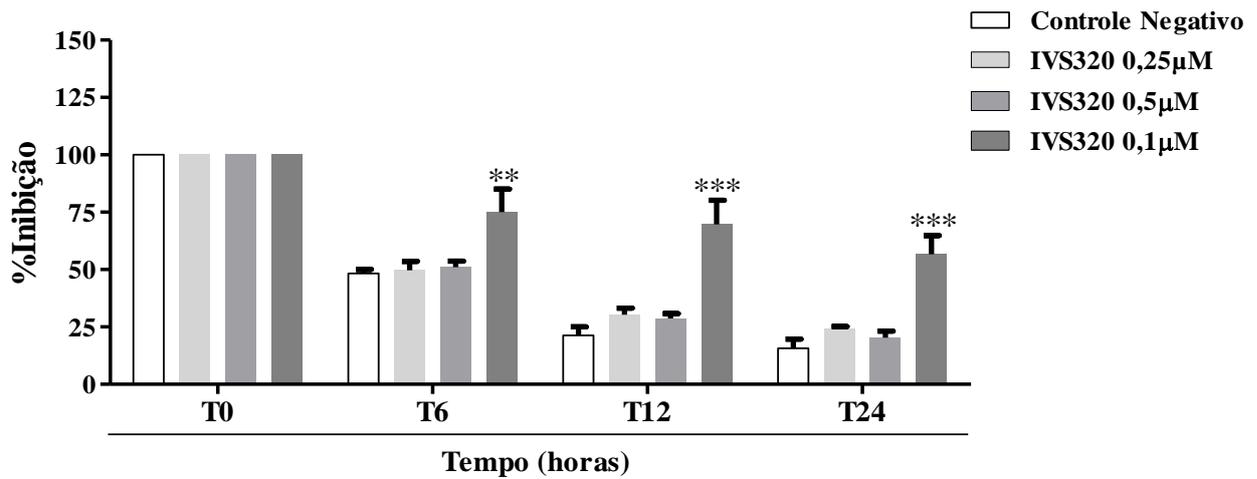


Gráfico 6: Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular *in vitro* – a inibição da migração celular ocorreu somente na maior concentração testada 1,0µM de IVS320 nos três tempos de tratamento 6, 12 e 24 horas. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente quando comparado ao controle negativo DMSO (0,2%) pelo teste ANOVA seguido de Tukey.

6.6 Avaliação do tipo de morte celular por coloração diferencial de Laranja de Acridina e Brometo de Etídio (LA/BE)

Os resultados de indução de morte celular em SK-Mel-28 mostram que houve diminuição significativa de células viáveis e aumento significativo ($p < 0,05$) de células apoptóticas quando comparadas com controle negativo (DMSO 0,2%), após 24 horas de tratamento com IVS320, em todas as concentrações testadas 0,25 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M (gráfico7).

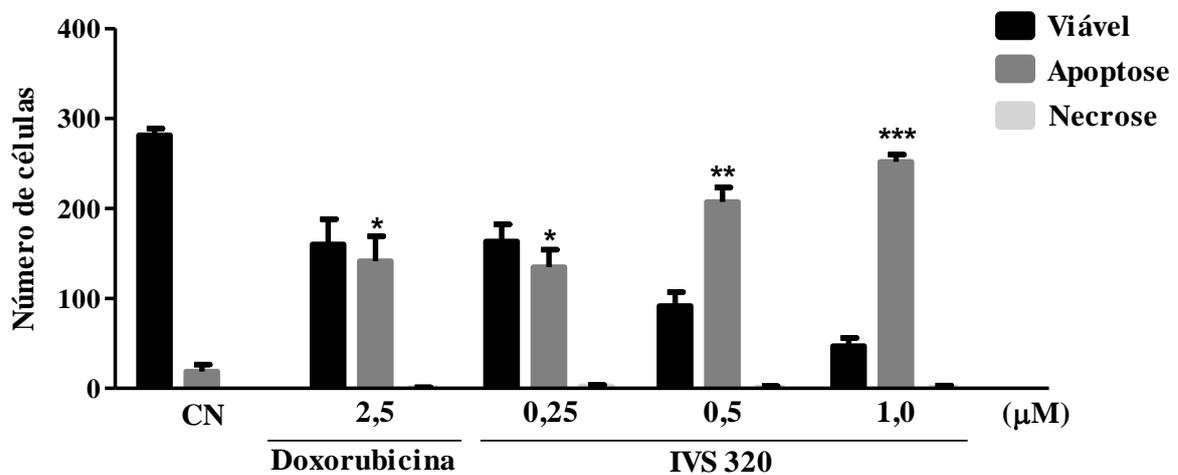


Gráfico 7: Tipo de morte celular induzida por IVS320 (0,25 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M) na célula SK-Mel 28 cultivada em monocamada após tratamento de 24 horas. São apresentados os resultados de dois experimentos independentes em triplicata (\pm desvio padrão). Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ quando comparado com controle negativo DMSO (0,2%). Os resultados foram analisados por ANOVA two way seguido de Bonferroni posttests.

7. DISCUSSÃO

Os tumores consistem em uma população diferenciada de células que inclui não somente células neoplásicas como também células normais presentes no estroma que desempenham papel importante na iniciação, progressão e resistência, podendo contribuir para a quimioresistência do tumor e/ou diminuição da absorção da droga pelo tumor, como exemplo os fibroblastos, que parecem estar particularmente ligados com a progressão tumoral, sendo responsáveis pela secreção de vários fatores de crescimento e citocinas. As células tumorais *in vivo* modulam o estroma alterando a matriz extracelular através da excreção de proteases, além da liberação de fatores de crescimento. Todo esse mecanismo propicia um ambiente favorável para a progressão tumoral, bem como a quimioresistência (OLUMI, A. F., et al., 1999; KALLURI, R.; ZEISBERG, M., 2006; TIAGO et al., 2014).

A utilização de modelos que recriem esse microambiente tumoral permite determinar resultados terapêuticos mais eficazes e fidedignos sem a necessidade da realização de testes em animais. (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012; ASTASHKINA; GRAINGE, 2014). Com o intuito de mimetizar a estrutura dérmica *in vitro*, proporcionando assim um microambiente mais próximo do que ocorre *in vivo*, foi padronizado o modelo de cultura celular denominado equivalente dérmico.

O tempo de cultivo estabelecido para o modelo através da análise dos cortes histológicos foi de 10 dias, pelo fato de que a densidade de células nesse tempo de cultivo ser maior, facilitando a visualização da população celular e migração celular. O mesmo não foi possível de visualizar com tanta facilidade no tempo de cultivo de 5 dias, tanto em equivalente dérmico quanto este acrescido de melanoma.

Este modelo de padronização foi realizado com base nos estudos de Tiago et al (2011), com modificações, em que foi utilizado fibroblastos de prepúcio humano e nessa pesquisa, foi

utilizada a linhagem de fibroblasto humano (MRC-5) estabelecido, onde observou-se o crescimento gradual de células tumorais de melanoma em equivalente dérmico a partir do 5º dia de cultura e também a invasão progressiva dessas células no substrato até o 10º dia de cultura por meio de cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina. Como este modelo de cultura celular ainda não havia sido desenvolvido no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, onde a pesquisa foi realizada, foi necessário padronizar a quantidade de dias que antecederiam o tratamento com a substância teste, de forma a possibilitar um ambiente com populações celulares, tanto de fibroblastos não-neoplásicos, quanto células de melanoma, em quantidade ideal para melhor análise dos resultados.

A padronização do modelo foi realizada com intuito de comparar a atividade de IVS320 nos ensaios de viabilidade celular bem como avaliação da genotoxicidade e atividade de metaloproteinases em células cultivadas no modelo de equivalente dérmico e modelo de cultura celular em monocamada. Tal padronização também foi realizada para possíveis ensaios posteriores de invasão celular no modelo de equivalente dérmico

As naftoquinonas destacam-se como objetos de estudo de muitas pesquisas por possuir potente atividade antiparasitária, antibacteriana, antifúngica e antitumoral. Vários fármacos da classe das quinonas têm sido utilizados clinicamente para o tratamento do câncer, como doxorrubicina, daunorrubicina, mitoxantrona e mitomicina. O mecanismo de ação proposto para a classe das naftoquinonas está relacionado com produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) resultando no estresse oxidativo das células; atuando também como intercalantes de DNA e na alquilação de nucleotídeos (SUNASSEE et al., 2013; FERREIRA et al., 2013; MALLAVADHANI et al., 2014; JORDÃO et al., 2013; ELAVARASAN; GOPALAKRISHNAN, 2014).

Para avaliação da citotoxicidade de IVS320 na linhagem SK-Mel-28 utilizou-se o ensaio do MTT. Para efeito de comparação da atividade citotóxica da substância, o ensaio foi realizado em modelo de cultura celular (2D) e modelo de cultura celular (3D). Os resultados encontrados para este ensaio de citotoxicidade mostram que há sensibilidade da linhagem neoplásica à substância testada (Tabela 2). No entanto, quando comparados os resultados dos ensaios nos dois modelos de cultura celular, observou-se que houve diferença nos valores de CI50, onde IVS320 apresentou ser menos citotóxica em células cultivadas em equivalente dérmico quando comparada em células cultivadas em monocamada, porém a substância se mostrou ativa nos dois ensaios. No ensaio realizado em monocamada a substância IVS320 demonstrou ter um excelente potencial citotóxico apresentando valores de CI50 0,54 μ M, 0,47 μ M e 0,49 μ M em 24, 48 e 72 horas de tratamento respectivamente. Já no ensaio realizado em equivalente dérmico, os valores de CI50 da IVS320 foram 8,05 μ M, 5,22 μ M e 2,7 μ M em 24, 48 e 72 horas de tratamento respectivamente (AGUDELO et al., 2014; MA; MUMPER, 2013).

Esses resultados ressaltam o levantamento proposto por estudos que visam à criação de modelos que mimetizem o microambiente, que favorece às células o resgate da fisiopatologia tumoral, em que as mesmas conseguem evadir mecanismos de morte por apoptose favorecendo a evolução tumoral (TALUKDAR et al., 2011; BRAUCHLE et al., 2013; VORSMANN et al., 2013).

Estes resultados assemelham-se aos encontrados nos estudos de Flach et al., (2012) que analisaram o comportamento das células de melanoma humano frente a presença de fibroblasto e matriz de colágeno contribuindo para a resistências às drogas, na secreção de fatores de crescimento, e na proteção contra apoptose.

Tiago et al., (2014) também obtiveram resultados semelhantes analisando este modelo de cultura celular e verificaram que o equivalente dérmico proporciona um ambiente protetor para

as células de melanoma por meio da diminuição da resposta ao tratamento com a doxorubicina, permitindo uma percentagem mais elevada de células de melanoma viáveis nestas condições de cultura quando comparado com a cultura de monocamada em plástico.

Ensaio de genotoxicidade também são importantes a fim de detectar substâncias que possuam capacidade de interagir com o DNA (DEMMA, et al.,2009; KAMDEM, et al., 2013). O ensaio do cometa tem sido descrito como uma das técnicas mais importantes para pesquisas de genotoxicidade, por ser uma técnica rápida, simples e sensível. Através do uso de sua versão neutra e alcalina, esse ensaio é capaz de diferenciar danos ao DNA de fitas simples, duplas e ligações cruzadas, entre outras (KUMARAVEL; JHA, 2006).

O ensaio do cometa alcalino ($\text{pH} > 13$), é a versão mais usada, pois detecta todos os possíveis tipos de danos ao DNA, danos de fita simples e dupla. Para distinguir as quebras de fitas duplas a versão em pH neutro tem sido utilizada. Essa versão, pH neutro ($\text{pH} 8-9$), permite a detecção de fitas duplas no DNA, caracterizando especificidade ao ensaio (SHARMA, et al., 2011).

Nos resultados obtidos referentes ao cometa alcalino, o tratamento com a IVS320 após 3 horas de incubação em SK-Mel-28 cultivada em monocamada, apresentou maior índice de dano nas três concentrações testadas ao comparar com o controle negativo, sendo os tipos de dano mais frequentes o de grau 1 nas concentrações $0,25\mu\text{M}$ e $1\mu\text{M}$ (76% e 83%, respectivamente) e o tipo de dano grau 2 na concentração de $0,5\mu\text{M}$ (74%). No entanto, na análise genotóxica no cometa alcalino, em SK-Mel-28 cultivada em equivalente dérmico, IVS320 não apresentou danos ao DNA em nenhuma das três concentrações testadas quando comparada ao controle negativo (DMSO 0,2%).

Na versão do ensaio do cometa neutro em SK-Mel-28 cultivada em monocamada o índice de dano causado por IVS320 foi apenas na maior concentração testada de $1,0\mu\text{M}$, sendo o tipo de dano mais frequente o de grau 2 (55%). De forma intrigante, no ensaio do cometa neutro

realizado em SK-Mel-28 cultivada em equivalente dérmico, IVS320 apresentou maiores índices de dano nas concentrações 0,5 μ M e 1,0 μ M quando comparadas ao controle negativo (DMSO 0,2%), sendo os tipos de danos mais frequentes o de grau 2 na concentração de 0,5 μ M (52%) e os tipos de dano grau 2 e 3 na concentração de 1,0 μ M (47% e 41%, respectivamente). Tais resultados demonstram uma controvérsia quando comparados com os resultados de citotoxicidade nos dois modelos de cultura celular, haja vista que IVS320 demonstrou ser menos citotóxica em células cultivadas em equivalente dérmico do que em células cultivadas em monocamada. Divergindo dos resultados de genotoxicidade, em que IVS320 demonstrou ser mais genotóxica em células cultivadas em equivalente dérmico, causando danos de fitas duplas do tipo de grau 2 e 3.

Tal resultado corrobora tanto com os resultados da citotoxicidade e da coloração laranja de acridina-brometo de etídio, em que se visualiza a sensibilidade da linhagens SK-Mel 28 frente a ação da substância. O dano existente pode ser justificado pelo fato da IVS ter a capacidade de interagir com o DNA e causar apoptose, conforme visualizado pela laranja de acridina-brometo de etídio(VAN GENT; HOEIJMARKES; KANAAR, 2001).

Compostos quinoides policíclicos, tais como naftoquinonas, são capazes de produzir quebras na fita de DNA contribuindo para a citotoxicidade desses compostos. Em um estudo realizado por Neves et al., (2013) o derivado da 2-hidroxi-3-(aminometil)-1,4-naftoquinona, apresentou CI50 6,4 μ M após tratar a linhagem de melanoma MDA-MB-435, acarretando na quebras das fitas de DNA que resultou em dano irreparável e consequente indução de morte celular.

Embora nenhum estudo de avaliação da genotoxicidade da IVS320 ainda não tenha sido feito, nas últimas décadas, inúmeros estudos demonstraram que as naftoquinonas promovem diferentes tipos de danos no DNA das células de mamíferos, como quebras simples e/ou duplas

do DNA, formação de bases oxidadas (MORRINSON et al. 1985; MARTINS & MENEGHIN, 1990; MORGAN et al. 1992). Afrasiabi et al. (2005) demonstraram que, em ensaios *in vitro*, a 1,2-naftoquinona é capaz de interagir fracamente com o DNA e pode promover quebra de fitas duplas.

Os efeitos genotóxicos de novas alternativas terapêuticas podem ser biologicamente relevantes, como uma alternativa para matar células tumorais. A presença desse efeito sugere que a citotoxicidade da IVS320 está relacionada aos danos no DNA. No entanto, mais estudos devem ser realizados principalmente em virtude da diferença nos resultados obtidos em relação aos dois modelos de cultura. Esse efeito sobre o DNA deve ser cuidadosamente avaliado, para garantir a segurança do uso de fármacos. É necessário estudar minuciosamente concentrações que possam garantir os efeitos biológicos e terapêuticos da IVS320, sem causar efeitos tóxicos consideráveis, para assim garantir a eficácia e segurança do produto.

A principal causa de morte do melanoma está associada ao seu fenótipo invasivo e a capacidade de desenvolver metástase (CURRAN; MURRAY, 1999; LEEMAN; CURRAN; MURRAY, 2004). Para a invasão celular ocorrer é necessário a degradação da matriz extracelular (MEC), principal barreira física para migração. O colágeno tipo I é o principal constituinte da MEC da derme, no processo de invasão celular, seu remodelamento ocorre por ação enzimática de metaloproteinases (MMPs) que representam uma família de mais de vinte endopeptidases sintetizadas pelas células tumorais ou por células do estroma (WESTERMARCK; KAHARI, 1999; BORNSTEIN; SAGE, 2002).

No melanoma, as MMP-2 e MMP-9 são as proteases envolvidas nesse processo, e um dos principais focos de estudo na inibição da invasão do melanoma (RIBEIRO et al., 2008; BROHEM et al., 2010).

No presente estudo, IVS320 reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 em todas as concentrações testadas (0,25 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M) no tempo de tratamento de 18 horas quando comparada com o controle negativo DMSO (0,2%). O resultado foi obtido para os dois modelos de estudo, cultura celular em monocamada e cultura celular em equivalente dérmico.

O resultado obtido sugere que as MMP-2 e MMP-9 podem ser alvos específicos para estudos futuros com IVS320, principalmente no objetivo de diminuir a progressão e invasão do melanoma, visto que quando a atividade dessas enzimas é inibida, a capacidade de invasão celular é suprimida (LEE et al., 2007).

O processo de migração celular também está particularmente envolvido no processo de metástase. Para a invasão ocorrer primeiramente é necessário a remodelação e degradação da MEC bem como a motilidade celular, caracterizada como capacidade da célula em sair do tumor primário e invadir outros sítios. (PALMER et al., 2011). Substâncias que possam atuar neste processo bloqueando a capacidade de motilidade da célula bem como a capacidade de inibir a atividade de MMPs estão como principais objetos de interesse na pesquisa de tratamento contra o câncer (NGUYEN et al., 2013).

O teste de migração celular através da raspagem *in vitro* evidenciou a redução significativa ($p < 0,01$) na taxa de motilidade celular na concentração (1,0 μ M) nos três tempos tratamento (6, 12 e 24 horas), quando comparadas ao controle negativo (DMSO 0,2%).

Desse modo, de acordo com os resultados com IVS320, nos ensaios de motilidade celular e inibição de MMPs, pode-se gerar para esta substância expectativas positivas a respeito de pesquisas futuras com alvo direcionado a invasão do tumoral do melanoma. Segundo, Lampugnani (1999) o ensaio de motilidade celular, utilizado nesse estudo, é comumente empregado para estudar a migração celular.

Para o direcionamento de estudos futuros com IVS320 em linhagem de SK-Mel-28, na investigação de possíveis mecanismos de ação, realizou-se o ensaio para verificação do tipo de morte celular por coloração diferencial laranja de acridina e brometo de etídio. Em que durante a análise observou-se a formação de corpos apoptóticos, fragmentação do núcleo e formação de vacúolos, o que segundo Takano (2010) sugere indução de apoptose.

As análises das células SK-Mel-28 tratadas com IVS320 realizadas através da coloração com a mistura LA/BE a 100µg/mL, permitiu diferenciar as células em viáveis, apoptóticas e necróticas. Os resultados mostram que houve diminuição significativa de células viáveis e aumento significativo ($p < 0,05$) de células apoptóticas quando comparadas com controle negativo (DMSO 0,2%), após 24 horas de tratamento com IVS320, em todas as concentrações testadas 0,25µM, 0,5µM e 1µM. Entretanto, o número de células em necrose não variou. As células tratadas com Doxorrubicina a 2,5µM também apresentaram características apoptóticas.

Em um estudo feito por Montenegro e colaboradores (2010) demonstraram que Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) causou apoptose após observar as células a coloração de laranja de acridina/brometo de etídio em células de melanoma.

Um outro estudo por Aithal et al., (2009) também demonstraram resultados semelhantes, em que Juglona causou apoptose em célula de melanoma humano na linhagem B16F1.

Estudos por Kretschmer e colaboradores (2012) demonstraram que naftoquinonas isoladas de *Onosma paniculata* nas linhagens isoladas de melanoma humano WM35, WM9 e WM164 induziram parada na fase G1-S e apoptose (KRETSCHMER et al., 2012).

8. CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos pode-se concluir que:

- É possível desenvolver o modelo de cultura celular em equivalente dérmico utilizando linhagens não primárias de fibroblasto não neoplásico humano e que este modelo propõe resultados mais fidedignos à realidade ao comparar com o modelo de cultura em monocamada;
- A ação citotóxica da IVS320 apresentou relativa diminuição de sua atividade em equivalente dérmico quando comparado em monocamada;
- Ao avaliar o dano no DNA, a IV320 apresentou-se genotóxica em SK-Mel-28 nas maiores concentrações testadas, tanto no teste do cometa em pH Alcalino e pH alacalino.
- IVS320 atua diminuindo significativamente a atividade de MMP-2 e MMP-9 após 18 horas de tratamento nos dois modelos de cultura celular utilizados;
- De forma complementar IVS320 também mostrou ser eficaz na inibição da motilidade celular;
- A morte celular por apoptose induzida por IVS320 de forma concentração e tempo dependente, associada aos danos ao DNA detectados pelo ensaio do cometa, se mostram importantes para determinar o nível de interação da substância com o DNA e no direcionamento de possíveis mecanismos de ação;

Os resultados obtidos nesta pesquisa contribuem com informações acerca da IVS320 e sugerem o direcionamento de estudos futuros com objetivo de definir quais os mecanismos de morte e ação da mesma no câncer.

9. REFERÊNCIAS

American cancer society. Cancer Statistics Report: Deaths Down 20% in 2 Decades. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/news/news/cancer-statistics-report-deathsdown-20-percent-in-2-decades>>. Acesso em: 25 fevereiro 2016.

AGUDELO, D. et al. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 144–150, 2014.

ASHWORTH, M.T.; DAUD, A.I. Combinatorial approach to treatment of melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, p. 601-612, 2014.

ASTASHKINA, A.; MANN, B.; GRAINGER, D.W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, p. 82-106, 2012.

ASTASHKINA, A.; GRAINGER, D.W. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69–70, p. 1-18, 2014.

ATALLAH, E. ; FAHERTY, L. Treatment of metastatic malignant melanoma. **Curr Treat Opt. Oncol**, v. 6, p. 185–193, 2005.

AVILÉS, J.A; LÁZARO, P. Predisposición genética en el melanoma cutâneo. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 97, n. 4, p. 229-240, 2006.

BASKIC´, D. et al. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. **Cell Biology International**, v. 30, p. 924-932, 2006.

BLAZQUEZ, C. et al. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down regulating matrix metalloproteinase-2 expression. **Cancer Research**, v. 68, p. 1945-1952, 2008.

BONCLER, M. et al. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, n. 1, p. 9-16, 2014.

BRASIL. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128p.

BRAUCHLE, E. et al. Design and analysis of a squamous cell carcinoma in vitro model system. **Biomaterials**, v. 34, p. 7401-7407, 2013.

BRAUD, F. et al. Malignant melanoma. **Oncology & Hematology**, v. 47, p. 35-63, 2003.

BRASIL. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 2016.

BROHEM, C.A. et al. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment Cell & Melanoma**, v. 24, p. 35-50, 2010.

CAINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. **European Journal of Cancer**, v. 45, p. 3054-3063, 2009.

CALIFANO, J. ; NANCE, M. Malignant melanoma. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 17, p. 337-348, 2009.

CAMPOS, V.R. et al. Synthesis of carbohydrate-based naphthoquinones and their substituted phenylhydrazono derivatives as anticancer agents. **RSC Advances**, v. 2, p. 11438-11448, 2012.

CAPORALI, S. et al. Down-regulation of the PTTG1 proto-oncogene contributes to the melanoma suppressive effects of the cyclin-dependent kinase inhibitor PHA-848125. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 598-611, 2012.

CARDOSO, M.F.C. et al. Synthesis and evaluation of the cytotoxic activity of 1,2-furanonaphthoquinones tethered to 1,2,3-1H-triazoles in myeloid and lymphoid leukemia cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 708-717, 2014.

CARLSON, J.A. et al. Molecular diagnostics in melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, p. 743-775, 2005.

COCKERELL, C.J. The pathology of melanoma. **Dermatologic Clinics**, v. 30, p. 445-468, 2012.

CURRAN, S., MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis, **J. Pathol**, v. 189, p. 300-308, 1999.

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

DEMMA, J. et al. Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 136-142, 2009.

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

DIOGO, E.B.T. et al. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of naphthoquinone-containing triazoles: Electrochemical studies on the effects of the quinoidal moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6337-6348, 2013.

- DONG, J. et al. *BRAF* oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation on human melanoma. **Cancer Res**, v. 14, p. 3883-3885, 2003.
- DUNCAN, L.D. The classification of cutaneous melanoma. **Hematol & Oncol Clinic**, v. 23, p. 501–513, 2009.
- EGGERMONT, A.; ROBERT, C. Melanoma in 2011: a new paradigm tumor for drug development. **Nat. Rev. Clin. Oncol**, v. 10, p. 74-76. 2012.
- EGGER, M.E. et al. Outcomes and prognostic factors in superficial spreading melanoma. **The American Journal of Surgery**, v. 206, p. 861-868, 2013.
- ELAVARASAN, S.; GOPALAKRISHNAN, M. Synthesis, structural analysis, theoretical studies of some lawsone derivatives. **SpectrochimicaActa Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 1-6, 2014.
- FERREIRA, S.B. et al. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.
- FERREIRA, F.R. et al. Arylated α - and β -dihydrofuran naphthoquinones: Electrochemical parameters, evaluation of antitumor activity and their correlation. **Electrochimica Acta**, v. 110, p. 634-640, 2013.
- FERREIRA, M.P.S.B.C. et al. Antifungal activity of synthetic naphthoquinones against dermatophytes and opportunistic fungi: preliminary mechanism-of-action tests. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2014.
- FLACH, E. H. et al. Fibroblasts contribute to melanoma tumour growth and drug resistance. **Mol Pharm**, v. 5, p. 2039–2049, 2012.
- FREIRE, C.P.V. et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agentes. **Med. Chem. Commun.**, v. 1, p. 229-232, 2010.
- GALIS, Z. et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. **Circulation Research**, v. 75, p. 181- 189, 1994.
- 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.
- GARATE, M.; WANI, A. A.; LI, G. The NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 induces cell cycle progression and proliferation of melanoma cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 1601–1609, 2010.
- GLAIRE, M.A. et al. The mesenchyme in malignancy: A partner in the initiation, progression and dissemination of cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 136, p. 131-141, 2012. 54

GORANTLA, V.C.; KIRKWOOD, J.M. State of melanoma: An historic overview of a field in transition. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, p. 415-435, 2014.

HAASS, N.K.; HERLYN, M. Normal Human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, p. 153-163, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646- 674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 21, p. 309-322, 2012.

HOFMANN, U.B. et al. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, p. 337–344, 2000.

HOFMANN, U.B. et al. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. **Biochimie**, v. 87, p. 307-314, 2005.

HSU, M.; MEIER, F.; HERLYN, M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. **Differentiation**, v. 70, p. 522–536, 2002.

HU, X. ; SHELVER, W.H. Docking studies of matrix metalloproteinase inhibitors: zinc parameter optimization to improve the binding free energy prediction. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 22, p. 115–126, 2003.

HWANG, Y.P. et al. Suppression of PMA-induced tumor cell invasion by dihydroartemisinin via inhibition of PKCa/Raf/MAPKs and NF-kB/AP-1-dependent mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 1714–1726, 2010.

INCA. **Estimativa 2016 - Incidência do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro-RJ: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016.

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

JORDÃO, A.K. et al. Synthesis using microwave irradiation and antibacterial evaluation of new N,O-acetals and N,S-acetals derived from 2-amino-1,4-naphthoquinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 196-201, 2013.

KAIKARIS, V. et al. Measurement of melanoma thickness e comparison of two methods: ultrasound versus morphology. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 64, p. 796-802, 2011.

KAJI, M. et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in lung cancer studied using film in situ zymography stamp method. **Lung Cancer**, v. 39, p. 125-130, 2003.

KALLURILLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, p. 392, 2006.

KAMDAM, J.P. et al. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 26- 34, 2013.

KIM, M. et al. Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. **Life Sciences**, v. 79, p. 1436 – 1443, 2006.

KO, M. J., FISHER, D. E. A new era: melanoma genetics and therapeutics. **Journal of Pathology**, v. 223, p. 241–250, 2010.

KUMARAVEL, T.S.; JHA, A.N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research**, v. 605, p. 7–16, 2006.

KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, p. 205 –209, 2010.

LEEMAN, M.F., CURRAN, S., MURRAY, G.I. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression, **J. Pathol**, v. 201, p. 528-534, 2004.

LEONG, S.P.L. et al. Cutaneous melanoma: a model to study cancer metastasis. **Surgical Oncology**, v. 103, p. 538–549, 2011.

LEVICAR, N. ;NUTTALL, R.K. ; LAH, T.T. Proteases in brain tumour progression. **Acta Neurochirurgica**, v. 145, p. 825-838, 2003.

LI, W. et al. SBF-1, a synthetic steroidal glycoside, inhibits melanoma growth and metastasis through blocking interaction between PDK1 and AKT3. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 172–181, 2012.

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

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCAS, N.C. et al. Photosensitizing properties of triplet furano and pyrano-1,2 naphthoquinones. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 276, p. 16-30, 2014.

MA, P.; MUMPER, R.J. Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review. **Nano Today**, v. 8, p. 313- 331, 2013.

MATTEI-PAILLER, C. et al. Rheological behaviour of reconstructed skin. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 37, p. 251 – 263, 2014.

- MALLAVADHANI, U.V. et al. Synthesis and anticancer activity of some novel 5,6-fused hybrids of juglone based 1,4-naphthoquinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 83, p. 84-91, 2014.
- MANDALÀ, M.; VOIT, C. Targeting BRAF in melanoma: biological and clinical challenges. **Oncology & Hematology**, v. 87, p. 239–255, 2013.
- MARRERO, B.; HELLER, R. The use of an in vitro 3D melanoma model to predict in vivo plasmid transfection using electroporation. **Biomaterials**, v. 33, p. 3036-3046, 2012.
- MAURO, M.O. et al. Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. **Mutation Research**, v. 715, p. 7-12, 2011.
- MEIER, F., et al. Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment. **Br J Dermatol**, v.156, p.1204-1213. 2007.
- OLUMI, A.F. et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. **Cancer Res**, v. 59, p. 5002, 1999.
- ORAMAS-ROYO, S. et al. Synthesis and cytotoxic activity of metallic complexes of lawsone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 2471-2477, 2013.
- PALMIERI, G. et al. Main roads to melanoma. **J Transl Med**, v. 14, p. 7-86, 2009.
- PALUNCIC, J. et al. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signalling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1863, p. 770–784, 2016.
- PEREIRA, A.C. et al. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 3, p. 257-262, 2006.
- PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- PÉREZ, L.; DANISHEFSKY, L. Chemistry and biology in search of antimetastatic agents. **ACS Chem. Biol**, v. 2, p. 159–162, 2007.
- QUIRT, I. et al. Phase II study of marimastat (BB-2516) in malignant melanoma, Invest. **New Drugs**, v. 20, p. 431-437, 2002.
- RIBEIRO, R.L.M.A. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 2, p. 115-121, 2008.
- 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, 1999.
- SALAS, C. et al. Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and a- and b-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 668–674, 2008.

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

SAURIASARI, R. et al. Cytotoxicity of lawsone and cytoprotective activity of antioxidants in catalase mutant *Escherichia coli*. **Toxicology**, v. 235, p. 103-111, 2007.

SCHITTEK, B. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. **Int. J. Cancer**, v. 120, p. 2110–2118, 2007.

SCOLYER, R.A.; LONG, G.V.; THOMPSON, J.F. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. **Molecular Oncology**, v. 5, p. 124-136, 2011.

SEMLIN, L. et al. In vitro models for human skin disease. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 3, p. 132-139, 2011.

SEO, B.R.; DEL-NERO, P.; FISCHBACH, C. In vitro models of tumor vessels and matrix: Engineering approaches to investigate transport limitations and drug delivery in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69–70, p. 205–216, 2014.

SHARMA, A. et al. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research**, v. 721, p. 142–146, 2011.

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, 2010.

SHUPTRINE, C., SURANA, R., WEINER, L. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. **Semin. Cancer Biol.**, v. 22, p. 3-13, 2012.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

STUCKY, C-C.H. et al. Risk factors associated with local and in-transit recurrence of cutaneous melanoma. **The American Journal of Surgery**, v. 200, p. 770-775, 2010.

SULLIVAN, R.J.; FISHER, D.E. Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, p. 437–453, 2014.

SUNASSEE, S.N. et al. Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 98-110, 2013.

TACASTACAS, J.D. et al. Update on primary mucosal melanoma. **Jornal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, p. 366-375, 2014.

TAKAHASHI, N.; TAKEDA, K.; IMAI, M. Inhibitory effects of p-dodecylaminophenol on the invasiveness of human fibrosarcoma cell line HT1080. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6015–6021, 2013.

TALUKDAR, S. et al. Engineered silk fibroin protein 3D matrices for in vitro tumor model. **Biomaterials**, v. 32, p. 2149-2159, 2011.

TANAKA, T. et al. Chemical-induced Carcinogenesis. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 5, p. 203-209, 2013.

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

TREISMAN, J.; GARLIE, N. Systemic therapy for cutaneous melanoma. **Clinics in plastic surgery**, v. 37, n. 1, p. 127–46, jan. 2010.

TYSNES, B.B.; BJERKVIG, R. Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1775, p. 283-297, 2007.

UGUREL, S. et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: The impact of novel therapies. **European Journal of Cancer**, v. 53, p. 125-134, 2016.

UMEDA, M. et al. Premalignant melanocytic dysplasia and malignant melanoma of the oral mucosa. **Oral Oncology**, v. 38, p. 714–722, 2002.

VÖRSMANN, H. et al. Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. **Cell Death and Disease**, v.4, p. 719, 2013.

WATSON, S.A. et al. Bone, Inhibition of tumour growth by marimastat in a human xenograft model of gastric cancer: relationship with levels of circulating CEA, *Br. J. Cancer*, v. 81, p. 19-23, 1999.

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, 2002.

XING, M. *BRAF* mutation in thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 2, p. 245-262, 2005.

ZEBARY, A. et al. KIT, NRAS, BRAF and PTEN mutations in a sample of Swedish patients with acral lentiginous melanoma. **Dermatological Science**, v. 72, p. 284-289, 2013.

ZIECH, D. et al. Pleiotrophic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 327, p. 16-25, 2012.

