

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Estudo do composto STX140, um análogo do estradiol, em linhagens de
melanoma humano

Ylana Adami Franco

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Silvy Maria Stuchi Engler

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Estudo do composto STX140, um análogo do estradiol, em linhagens de
melanoma humano

Ylana Adami Franco

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Silvy Maria Stuchi Engler

São Paulo

2022

Ylana Adami Franco

Estudo do composto STX140, um análogo do estradiol, em linhagens de melanoma humano

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler
Orientadora/Presidente

Otávio Cabral Marques
1o. Examinador

Enrique Mario Boccardo Pierulivo
2o. Examinador

Tiago Rodrigues
3o. Examinador

São Paulo, 25 de maio de 2022.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F825e Franco, Ylana Adami
Estudo do composto STX140, um análogo do estradiol, em linhagens de melanoma humano / Ylana Adami Franco. - São Paulo, 2022.
56 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).

Orientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi

1. melanoma. 2. progressão tumoral. 3. resistência. 4. senescência. 5. STX140. I. T. II. Maria-Engler, Silvy Stuchi, orientador.

*Ao meu amado Rafael, por sempre me apoiar
e me incentivar nesse projeto.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Maior Mestre, por sua infinita graça em minha vida e por tornar possível esse projeto.

Ao meu marido Rafael, por todo amor, incentivo, confiança e companheirismo incondicionais. Sem o seu apoio jamais teria conseguido!

A minha família, pelo amor, auxílio e comunhão constantes. Mãe, obrigada por sempre acreditar em mim!

À Profa. Silvy Stuchi, minha orientadora. Muito obrigada por me aceitar como aluna e me dar o privilégio de trabalhar no seu laboratório. Sua liderança, competência, experiência e dedicação me inspiram e foram essenciais para a conclusão desse projeto.

À Profa. Silvia Berlanga por compartilhar com os alunos seu conhecimento e sabedoria. Ao Prof. Agostinho Machado Neto e sua aluna Keli Lima pela colaboração nos ensaios de PCR.

À Dra. Larissa Carvalho pela colaboração e auxílio na bancada. Obrigada por me ensinar tanto!

Aos técnicos de laboratório do departamento Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Edson, Renatinha pelo auxílio nos ensaios de citometria de fluxo, Walter pelo auxílio com o ensaio Clonogênico e principalmente à técnica do nosso laboratório Silvinha por todo o ensinamento em cultura de células e estar sempre de prontidão para me ajudar!

Aos meus companheiros de laboratório JuliaR, JuliaB, Claudinha, Érica, Larissa C., Denisse, Manoel, Rodrigo, Isabela e Renaira, muito obrigada a todos por me receberem tão bem, pelos momentos de descontração, parcerias e auxílio na bancada. Agradeço especialmente à Isabela por toda ajuda de sempre e Renaira pelo auxílio com os experimentos de Senescência e ELISA.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela prontidão e simpatia dos funcionários.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelas aulas e espaço físico.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Às agências de Fomento: CNPq (Processos: 309440/2021-1/ 304339/2017-2/ 408769/2018-1) e Fapesp (Projeto Temático 2017/04926-6) que contribuíram para a realização do projeto com financiamento ao nosso laboratório.

RESUMO

FRANCO, Y. A. **Estudo do composto STX140, um análogo do estradiol, em linhagens de melanoma humano**. 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O câncer de pele pode ser classificado como não melanoma e melanoma. O melanoma apresenta baixa incidência entre os cânceres de pele, porém é a forma mais letal e é considerado um dos tipos mais resistentes ao tratamento. Devido à infiltração de células malignas nos tecidos, vasos linfáticos e vasos sanguíneos, o melanoma invade e se espalha rapidamente. Suas metástases são frequentemente localizadas em linfonodos, cérebro, fígado e outros órgãos. Melanomas metastáticos abrigam múltiplas mutações gênicas e muitos tumores apresentam resistência aos tratamentos, como por exemplo com inibidores BRAF, devido à mutações e ativação de vias paralelas. Ou seja, existe uma necessidade clara da busca de novas opções de tratamento. Em trabalho realizado por nosso grupo, *Massaro et al* mostraram que o derivado de estradiol 2-Metoxiestradiol induz apoptose em células de melanoma e senescência. Neste sentido, o composto STX140, (um análogo do estradiol com biodisponibilidade superior), que já se mostrou eficaz no combate ao câncer de mama em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, será então avaliado para sua ação no melanoma de forma inédita. Este trabalho teve como principal objetivo explorar a ação antitumoral em células de melanoma do composto STX140, especialmente a indução de senescência. Utilizando a cultura de células de melanoma foram realizados os ensaios de: viabilidade celular - IC50, formação de colônias, análise do ciclo celular e caracterização de morte celular por citometria de fluxo, ensaio *In vitro scratch*, coloração para β -galactosidase, PCR quantitativo e ELISA. Os resultados mostraram que o composto STX140: diminui a viabilidade celular, inibe a proliferação, formação de colônias e migração em linhagens de melanoma (não resistentes e resistentes ao vemurafenibe, inibidor de BRAF). Além do mais, o composto atuou diminuindo a secreção da interleucina pró-tumoral IL-8 em células resistentes. O STX140 induziu senescência nas células de melanoma que foram positivas para β -galactosidase, também havendo aumento da expressão de genes chave de vias de senescência (CDKN1A e GADD45A) nas células de melanoma resistentes tratadas com o composto. Em conclusão, o STX140 mostrou ter um potencial antitumoral contra o melanoma, diminuindo sua viabilidade celular, inibindo sua proliferação e migração, induzindo senescência, diminuindo a secreção de interleucina pró-tumoral, com efeito mais acentuado nas linhagens de melanoma resistente.

Palavras-chave: STX140, melanoma, progressão tumoral, resistência, senescência.

ABSTRACT

FRANCO, Y. A. **STX140 compound study in human melanoma**. 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Skin cancer can be classified as non-melanoma and melanoma. Melanoma has a low incidence among skin cancers, but it is the most lethal form and is considered one of the most resistant to treatment. Due to the infiltration of malignant cells into tissues, lymphatic vessels and blood vessels, melanoma invades and spreads rapidly. Its metastases are often located in lymph nodes, brain, liver and other organs. Metastatic melanomas presents multiple gene mutations and many tumors are resistant to treatments, such as with BRAF inhibitors, due to mutations and activation of parallel pathways. In other words, there is a clear need to search for new treatment options. In work carried out by our group, *Massaro et al* showed that the estradiol derivative 2-Methoxyestradiol induces apoptosis in melanoma cells and senescence. In this sense, the compound STX140, (an estradiol analogue with superior bioavailability), which has already been shown to be effective against breast cancer *in vitro* and *in vivo* studies will be then evaluated for its action on melanoma. The main objective of this work is to explore the antitumor action of the compound STX140 in melanoma cells, especially the induction of senescence. Using the melanoma cell culture the following assays were performed: cell viability - IC50, clonogenic, cell cycle analysis and cell death characterization by flow cytometry, wound assay, staining for β -galactosidase, quantitative PCR and ELISA. Preliminary data from this work showed that the compound STX140: decreases cell viability, inhibits proliferation, colony formation and migration in melanoma cell lines (non-resistant and resistant to vemurafenib, BRAF inhibitor). It also decreased the secretion of pro-tumor interleukin IL-8 in resistant cells. STX140 induced senescence in melanoma cells, that were positive for β -galactosidase, and there was also increased expression of key genes of senescence pathways (CDKN1A and GADD45A) in resistant melanoma cells treated with the compound. In conclusion, STX140 has been shown to have antitumor potential against melanoma, decreasing its cell viability, inhibiting its proliferation and migration, inducing senescence, decreasing pro-tumor interleukin secretion, with a more pronounced effect on resistant melanoma cell lines.

Keywords: STX140, melanoma, tumor progression, resistance, senescence.

LISTA DE ABREVIATURAS

Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRAF	BRAF B-Raf proto-oncogene proteína quinase serina/treonina
BRAFV600E	Mutação que resulta de uma substituição de uma valina (V) a um ácido glutâmico (E) na posição 600 em BRAF.
CAIX	<i>Carbonic Anhydrase IX</i>
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A.
CDK4	Quinase dependente de ciclina 4
CSD	<i>Chronically Sun Damage</i>
DMEM	<i>DMEM Dulbelcco's Modified Eafle's Medium</i>
DMSO	Dimetil Sufóxido
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> ou Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> . Tradução: Transição epitelial-mesenquimal
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
H3K9me3	Histona H3 trimetilada na lisina 9
KIT	Proto-oncogene, receptor de tirosina quinase
MAPK	<i>Mitogen actived protein kinase</i> – proteínas quinases ativadas por sinal mitogênico.
MC1R	Receptor de melanocortina 1
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MDSCs	Células supressoras derivadas de mieloides
MP	Melanócito primário
NMSC	<i>Non-melanoma skin cancers</i>
NF1	Neurofibromina 1
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
PBSA	<i>Phosphate Saline Buffer</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i> (Iodeto de Propídeo)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
REA	Relação Estrutura-Atividade

TIS	Terapia Indutora de Senescência (do inglês, <i>Therapy-induced senescence</i>)
UV	Ultravioleta
γ H2Ax	Histona H2AX fosforilada
2-ME	2-Metoxiestradiol
28P	Sk-Mel-28 Parental
28R	Sk-Mel-28 Resistente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Surgimento e evolução do melanoma ilustrado por imagens clínicas de um nevo isolado, um nevo displásico, melanoma in situ e melanoma invasivo. Também pode-se observar um esquema que figura as etapas de transformação da célula normal a um tumor invasivo.
Figura 2	Transformação maligna do melanócito onde é possível verificar a ação da radiação UV no processo ao induzir as mutações que levam ao desenvolvimento do melanoma, além dos genes envolvidos nessa transformação.
Figura 3	Linha do tempo com os principais tratamentos para pacientes com melanoma avançado aprovados pela FDA. Fonte: Adaptado de PATTON, <i>et al.</i> , 2021.
Figura 4	Representação molecular do composto STX140 (2-Metoxiestradiol-3,17-O, O-bis-sulfamato) e a Relação Estrutura-Atividade da molécula.
Figura 5	Ilustração da interação molecular do STX140 com a tubulina, agindo como disruptor do microtúbulo, e com a anidrase carbônica – atuando como inibidor dessa enzima.
Figura 6	Gráfico que ilustra os dados do ensaio de IC50 – apresenta os valores da concentração de células relativa ao controle vs concentração de STX140 em nM, também em escala logarítmica.
Figura 7	Fotos do ensaio clonogênico que mostra as colônias de linhagens de melanoma humano após tratamento com STX140 nas concentrações indicadas.
Figura 8	Dados do ensaio clonogênico – temos a representação da área ocupada pelas colônias relativa ao controle vs concentração de STX140.
Figura 9	Avaliação da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo após o tratamento com STX140 por 48 h.
Figura 10	<i>In vitro scratch assay</i> . Migração celular das células de melanoma não tratadas e tratadas com STX140 por 48h.
Figura 11	<i>In vitro scratch assay</i> . Representação gráfica das áreas da fenda em diferentes tempos.

Figura 12	Gráfico da quantificação dos eventos mostrados no Dot-plot da citometria de fluxo das células de melanoma tratadas por 48h com STX140 na concentração do IC50 de cada célula.
Figura 13	Dot-plot das células marcadas com Anexina e PI e submetidas a citometria de fluxo após tratamento com STX140 na concentração do IC50 de cada linhagem por 48h.
Figura 14	Ensaio de senescência. As células positivas para β -Galactosidase apresentam coloração azul acentuada.
Figura 15	Gráfico com valores da porcentagem de células senescentes e não senescentes nos grupos tratados e não tratados com STX140.
Figura 16	Gráfico que apresenta a expressão relativa de mRNA de genes relacionadas a vias de senescência em células de melanoma após tratamento com STX140 por 48h.
Figura 17	Gráfico que apresenta quantificação das interleucinas IL-8 e IL-6 através do ensaio ELISA, em células de melanoma não tratadas e tratadas com STX140 por 48h.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Sequência e concentração dos iniciadores utilizados no PCR quantitativo</i>
Tabela 2	<i>Valores de IC50 calculados através do software GraphPad Prism versão 5 para as linhagens de melanoma humano após tratamento com STX140 por 24, 48 e 72 horas.</i>

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Epidemiologia do Melanoma.....	15
1.2 Fisiopatologia do Melanoma.....	16
1.3 Terapias para o Melanoma.....	19
1.4 STX140.....	20
1.5 Senescência.....	24
1.6 Hipótese do trabalho.....	25
2.OBJETIVOS.....	25
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 STX140.....	26
3.2 Cultura de células.....	26
3.3. Ensaio de viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán – IC50.....	27
3.4. Ensaio Clonogênico ou Ensaio de formação de colônias.....	27
3.5 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	28
3.6 <i>In vitro scratch assay</i>	28
3.7. Ensaio de Morte Celular por citometria de fluxo.....	28
3.8. Coloração para β -galactosidase associada à senescência.....	29
3.9 PCR quantitativo para análise da expressão de genes relacionados as vias de senescência.....	29
3.10 Quantificação de IL-6 e IL-8 por ELISA.....	30
3.11 Análise Estatística.....	31
4.RESULTADOS.....	31
4.1 Viabilidade e proliferação celular.....	31
4.1.1 Determinação do IC50.....	31
4.1.2 Ensaio de formação de colônias.....	34
4.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	37
4.3 Migração celular.....	38
4.3.1 Avaliação da migração celular pós tratamento com STX140 - <i>In vitro scratch assay</i>	38
4.4 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo (Anexina V e Iodeto de Propídeo.....	40
4.5 Senescência.....	42
4.5.1 Coloração para β -galactosidase associada à senescência.....	42

4.5.2 PCR quantitativo para análise da expressão de genes relacionados as vias de senescência.....	44
4.6 Quantificação de IL-6 e IL-8 por ELISA.....	45
5. DISCUSSÃO.....	45
5.1 STX140 reduz viabilidade celular das linhagens de melanoma em baixas concentrações.....	45
5.2 STX140 inibe a migração de células de melanoma sem induzir morte celular.....	47
5.3 STX140 induz senescência em células de melanoma.....	47
5.4 STX140 diminui a secreção de IL-8, interleucina pró-tumoral, em células de melanoma resistente.....	48
5.5 STX140 apresentou maior efeito nas linhagens resistentes.....	49
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Melanoma

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo sendo responsável por cerca de 10 milhões de mortes em 2020. Câncer de mama, pulmão, cólon, próstata e pele estão entre os mais comuns. Cerca de um terço das mortes por câncer são devido ao uso de tabaco, alto índice de massa corporal, consumo de álcool, baixa ingestão de frutas e vegetais e falta de atividade física. (WHO, 2022).

O câncer de pele não melanoma corresponde a aproximadamente 30% dos tumores malignos no Brasil, sendo o mais frequente no país (INCA, 2022). Os principais fatores de risco do câncer de pele são: exposição prolongada e repetida ao sol (raios UV), exposição a câmara de bronzeamento artificial, histórico familiar de câncer de pele, ter fototipos de pele 1 e 2. A radiação UV é o maior fator ambiental para o desenvolvimento de melanoma (ALI et al. 2013). O câncer de pele está frequentemente localizado nas regiões expostas ao sol da cabeça e pescoço. As opções de tratamento incluem excisão cirúrgica, crioterapia, quimioterapia, imunoterapia e radioterapia. A segurança adequada contra o sol é de extrema importância para prevenir o câncer de pele (GRUBER e ZITO, 2021).

O câncer de pele pode ser classificado como não melanoma e melanoma. O câncer de pele não melanoma (em inglês é abreviado como NMSC - *Non-melanoma skin cancers*) têm como principais tipos o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular e representam cerca de 99% de todos os NMSCs (CIAŻYŃSKA, et al. 2021).

Melanoma é um câncer de baixa incidência entre os cânceres de pele, porém é a forma mais letal. A radiação UV é o maior fator ambiental para o desenvolvimento dessa neoplasia (ALI et al. 2013). É considerado um dos tipos mais resistentes a tratamento (TSAO, et al. 2012). Pacientes com melanoma metastático avançado apresentam baixa sobrevida. Devido à infiltração de células malignas nos tecidos, vasos linfáticos e vasos sanguíneos, o melanoma invade e se espalha rapidamente. Suas metástases são frequentemente localizadas em linfonodos, cérebro, fígado e outros órgãos (UZDENSKY et al. 2013).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer, a estimativa de novos casos de melanoma em 2020 foi de 8.450, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres. De acordo com a Sociedade Americana do Câncer é previsto para 2022 99.780 novos casos de melanoma de pele nos Estados Unidos – 57.180 em homens e 42.600 em mulheres - e são esperadas 7.650 mortes por melanoma para ambos os sexos. (SIEGEL, et al. 2022)

Melanoma é uma doença cuja incidência tem crescido anualmente, mais rapidamente que qualquer outro câncer, atingindo uma parcela considerável de pacientes mais jovens (ALI et al. 2013). Os homens são 55% mais propensos a morrer de melanoma que as mulheres, quando pareados por idade e ajustados para a espessura do tumor, subtipo histológico, localização anatômica e extensão da metástase (MITKOV, et al. 2015). No geral, as mulheres tem uma sobrevida maior do que os homens em casos de melanoma cutâneo. Em um estudo realizado com dados de 2.672 pacientes diagnosticados com melanoma em estágio I/II (48% homens e 52% mulheres) concluiu-se que as mulheres tem uma vantagem em todos os aspectos da progressão do melanoma de aproximadamente 30%, provavelmente por uma diferença sexual biológica subjacente (JOOSSE, et al. 2012). Existem algumas hipóteses que podem explicar esse fato: diferenças no comportamento, detecção, atraso no diagnóstico e triagem levam a melanomas mais avançados em homens, resultando em pior sobrevida; e/ou diferenças biológicas entre os sexos ainda desconhecidas afetam a progressão do melanoma e sobrevivência (JOOSSE, et al. 2012).

1.2 Fisiopatologia do Melanoma

Neoplasias melanocíticas podem ser lesões benignas chamadas nevos melanocíticos - pequenas manchas marrons regulares na pele, salientes ou não, conhecidas como pintas e sinais – ou lesões malignas chamadas melanomas. Essas lesões se originam dos melanócitos - células derivadas da crista neural que, durante o desenvolvimento, colonizam a pele, o olho e, em menor grau, uma ampla gama de outros tecidos em todo o corpo (SHAIN e BASTIAN, 2016). Na figura 1 temos a representação de como uma neoplasia melanocítica pode surgir em uma pele normal e se desenvolver até ser caracterizada como um melanoma invasivo.

Os melanomas cutâneos podem ser classificados pela sua origem que pode ter sido ou não causada pela exposição crônica ao sol – em inglês denominados CSD (*Chronically Sun Damaged*) e *non-CSD* melanomas. Os melanomas do tipo CSD originam-se na cabeça, no pescoço e nas superfícies dorsais das extremidades distais de indivíduos idosos (> 55 anos de idade). Eles têm uma alta carga de mutação e estão associados a mutações na neurofibromina 1 (NF1), NRAS, BRAF (nonV600E) ou KIT – verificar figura 2. Em contraste, os melanomas tipo *non-CSD* afetam áreas como o tronco e as extremidades proximais de indivíduos mais jovens (<55 anos de idade) e estão associados com uma carga de mutação moderada e uma predominância de mutações BRAF (V600E) (SHAIN e BASTIAN, 2016).

O melanoma é considerado uma doença multifatorial, que engloba suscetibilidade genética e exposição ambiental. O principal fator ambiental relacionado ao desenvolvimento do melanoma é a exposição aos raios ultravioleta (UV), tanto raios decorrentes da exposição solar (UVB) quanto raios decorrentes de exposição artificial (UVA). A exposição à radiação ultravioleta é conhecida por causar efeitos genéticos e alterações na pele, que modulam a resposta imune cutânea e aumentam a produção de diversos fatores de crescimento. Outros fatores de risco incluem a quantidade de nevos presentes na pele, histórico familiar da doença e suscetibilidade genética (RASTRELLI, *et al.* 2014).

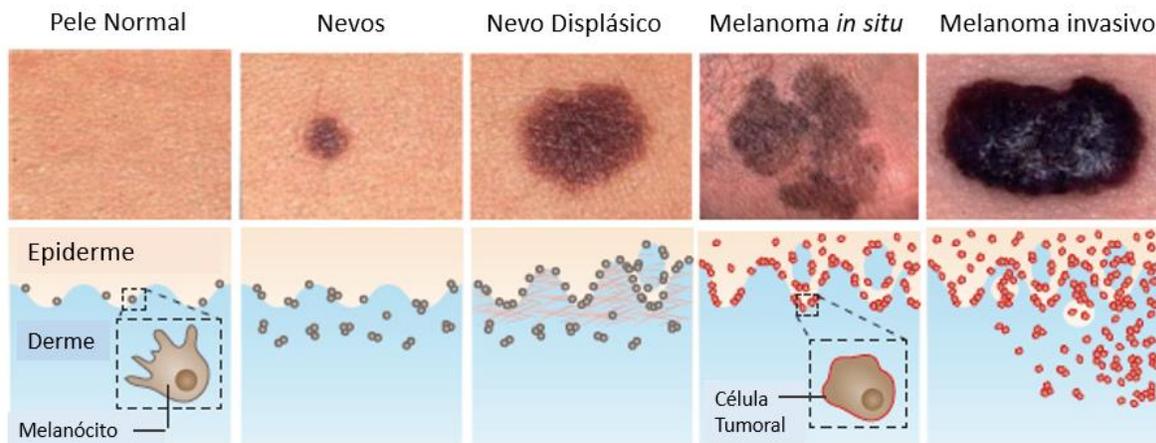


Figura 1. Surgimento e progressão do melanoma. Na primeira linha apresentam-se imagens clínicas mostrando a pele normal, um nevo autônomo, um nevo displásico, melanoma *in situ* e melanoma invasivo. Na segunda linha apresentam-se um esquema que ilustra as etapas de transformação da célula normal a um tumor invasivo. Fonte: Adaptado de SHAIN e BASTIAN, 2016

O histórico familiar de melanoma tem sido fortemente associado com um aumento do risco de melanoma. Aproximadamente 5-10% dos casos de melanoma ocorrem em um contexto familiar e os genes envolvidos são na maioria dos casos o CDKN2A, CDK4 e MC1R (DE SIMONE, *et al.* 2017). A pigmentação tem uma importante influência na susceptibilidade da pele a mudanças malignas. Os diferentes polimorfismos do gene MC1R, resulta nos diversos fenótipos de tons de pele em humanos. Variantes como cabelo ruivo e pele clara expressam baixa pigmentação e conseqüentemente, aumento da sensibilidade aos raios UV – aumentando o risco de desenvolver melanoma (ALI *et al.* 2013). Isso porque a melanina, uma macromolécula complexa, absorve a radiação UV e protege o núcleo dos queratinócitos na epiderme dos danos ao DNA (SHAIN e BASTIAN, 2016).

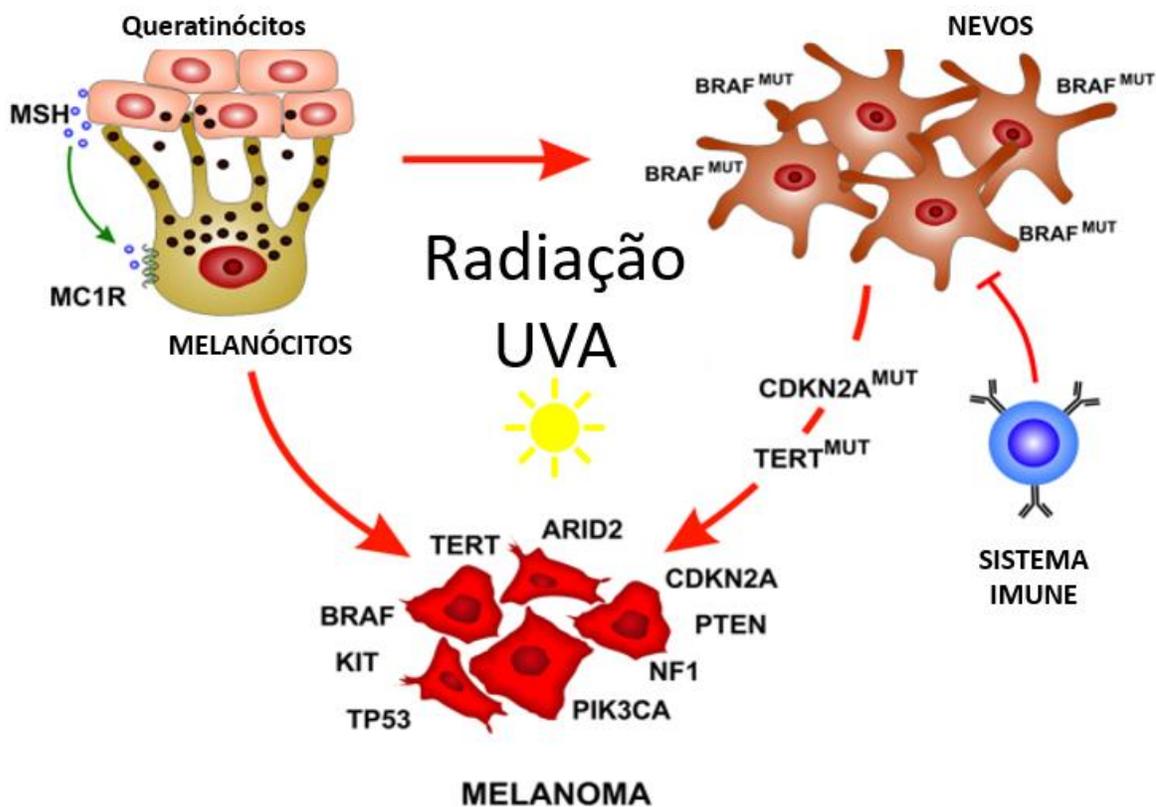


Figura 2. Transformação maligna do melanócito. É possível verificar a ação da radiação UV no processo ao induzir as mutações que levam ao desenvolvimento do melanoma. Fonte: Adaptado de LEONARDI, et al. 2018.

Melanomas totalmente evoluídos abrigam múltiplas mutações gênicas. As mutações mais recorrentes em melanomas afetam os genes nas principais vias de sinalização que governam a proliferação (BRAF, NRAS e NF1), crescimento e metabolismo (PTEN e KIT), identidade celular (ARID2), resistência à apoptose (TP53 - em aproximadamente 20% dos melanomas metastáticos), controle do ciclo celular (CDKN2A) e tempo de vida replicativo (TERT) (SHAIN e BASTIAN, 2016). Esses genes são alvos terapêuticos no desenvolvimento de fármacos para o tratamento do melanoma. Porém, alguns tumores apresentam resistência aos tratamentos com inibidores BRAF, devido a mutações em vários genes na maioria dos casos (RODRÍGUEZ-CERDEIRA, et al. 2017).

Cerca de 90% dos melanomas apresentam uma ativação anormal da via MAPK, sendo responsável pela desregulação do ciclo celular e inibição da apoptose (LEONARDI, et al. 2018). Entre os diferentes mecanismos responsáveis pela via da MAPK constitutivamente ativa no melanoma, as anormalidades genéticas mais frequentes são de longe as mutações

BRAF. O gene BRAF sofre mutação em cerca de 50% dos melanomas; 80% a 90% dessas mutações envolvem uma única substituição de valina na posição 600 com ácido glutâmico (V600E) (MARZAGALLI, *et al.* 2016).

A proteína BRAF é uma serina/treonina proteína quinase de 766 aminoácidos organizados em 3 domínios: 2 com função regulatória e um com função catalítica responsável pela fosforilação da MEK. O domínio catalítico é ainda responsável por manter a proteína na sua conformação ativa (LEONARDI, *et al.* 2018). As mutações BRAF imitam a fosforilação no domínio regulatório da proteína aumentando a atividade quinase da proteína e ativação dos seus alvos MEK e ERK. A ativação desta via desencadeia a transição G1/S do ciclo celular através da síntese de ciclina D1 e regulação negativa do inibidor do ciclo celular p27 (MARZAGALLI, *et al.* 2016).

1.3 Terapias para o Melanoma

A quimioterapia durante muitos anos foi a base das opções de tratamento para o melanoma em estágio avançado. Em 2011 o FDA (Food and Drug Administration) aprovou dois novos tratamentos para melanoma: Vemurafenib, um inibidor de BRAF, e ipilimumab, anticorpo monoclonal humano que atua ativando o sistema imune através da interação com o receptor CTLA-4 (WILSON e SCHUCHTER, 2016). Em 2013 os fármacos dabrafenib (inibidor de BRAF) e trametinib (inibidor de MEK) também foram aprovados, mostrando o avanço no tratamento para o melanoma o que resultou na melhora clínica dos pacientes (WILSON e SCHUCHTER, 2016). Na figura 3 podemos observar a evolução no tratamento do melanoma avançado com a aprovação de novos fármacos ao longo dos anos.

A inibição da via MAPK por meio de inibidores de BRAF em terapia única, aumenta a sobrevida de pacientes com melanoma metastático com mutações BRAF(V600E) em comparação com a quimioterapia padrão (FILIPP, *et al.* 2018). Embora esse tipo de melanoma com mutações BRAF seja um dos mais responsivos a terapia, ele pode desenvolver resistência ao tratamento (FILIPP, *et al.* 2018). Vemurafenibe é um inibidor específico de BRAF, que tem especificidade maior pelo BRAF com a mutação V600E. Esse fármaco apresentou boa eficácia no tratamento de melanoma por BRAF mutante, porém por curto período (KIM e COHEN, 2016) O tratamento a longo prazo mostrou que os tumores frequentemente se tornaram resistentes a inibidores BRAF (MASSARO, *et al.* 2017). Essa resistência pode ser mediada por vários mecanismos com reativação da via de sinalização

RAF-MEK-ERK, sendo a mais prevalente em mais de 70% dos casos (MASSARO, et al. 2017). Ou seja, existe uma necessidade clara da busca de novas opções de tratamento, como a terapia combinada por exemplo.

Wilson e Schuchter (2016) concluem na sua revisão sobre quimioterapia para melanoma que, apesar do aumento da sobrevida global observado no tratamento com ipilimumabe e inibidores de BRAF, alguns pacientes apresentam doença refratária ao tratamento, desenvolvem resistência ao tratamento ou apresentam recidiva da doença. Porém, mesmo que não seja mais considerada a terapia de primeira linha, a quimioterapia ainda tem um papel no tratamento do melanoma, com opções de tratamento paliativo para os pacientes, especialmente quando são necessárias respostas tumorais rápidas, e oferece aos pacientes opções alternativas adicionais de tratamento.

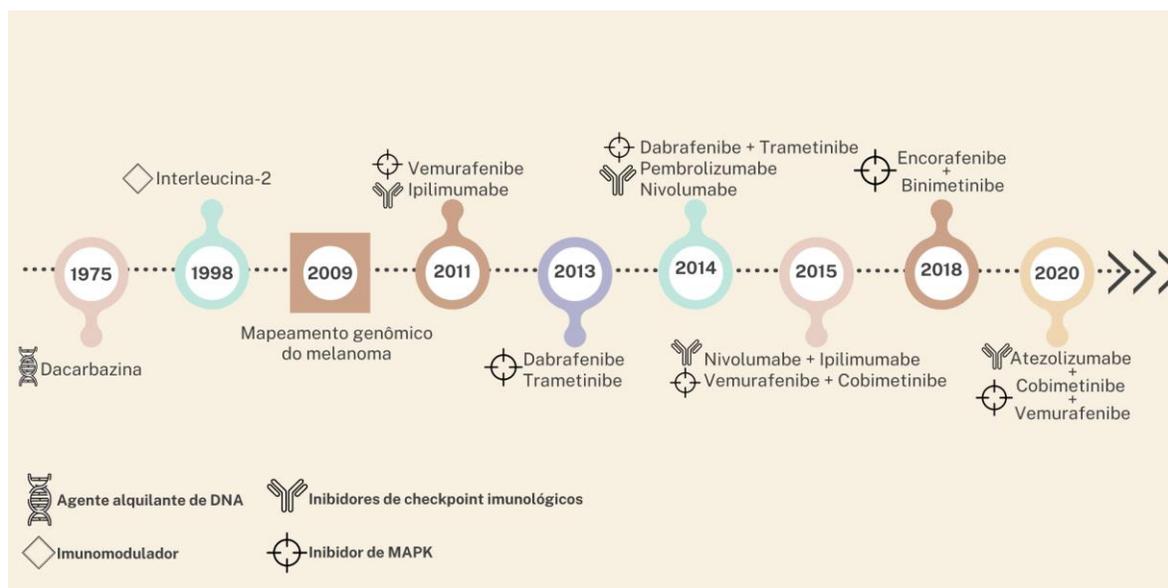


Figura 3. Linha do tempo com os principais tratamentos para pacientes com melanoma avançado aprovados pela FDA. De 2011 a 2020 13 novos tratamentos foram aprovados, incluindo terapias com agente único e terapias combinadas. Fonte: Adaptado de PATTON, et al., 2021.

1.4 STX140

A molécula STX140 (2-Metoxiestradiol-3,17-O,O-bis-sulfamato), Figura 4, é um derivado de estradiol cujo potencial anti-angiogênico e antitumoral já foram bem documentados em células de câncer de mama e de próstata (DAY et al, 2003; HO et al,

2003; NEWMAN *et al.*, 2004). Sua atividade é independente do receptor de estrógeno, apesar de ser um derivado de estrógeno (JOURDAN, *et al.*, 2010). A classe de moléculas STX, que apresenta o grupo farmacofórico aril O-sulfamato, foi inicialmente desenvolvida como inibidoras da enzima esteróide sulfatase – enzima que catalisa a hidrólise do sulfato de estrógeno para estrógeno, sendo um alvo terapêutico na terapia endócrina de doenças hormônio-dependentes (JOURDAN, *et al.*, 2010).. Posteriormente, identificou-se novos alvos terapêuticos dessas moléculas resultando em sua ação antitumoral (JOURDAN, *et al.*, 2010).

Através de estudos de relação estrutura-atividade (REA), identificou-se que: o grupo 3-O-sulfamato (assinalado em verde na figura 4) confere à molécula um efeito antiproliferativo em células tumorais humanas estrógeno-independente *in vitro*; também se mostrou que essa ação antiproliferativa é otimizada com a presença do grupo 2-methoxi (assinalado em laranja na figura 4). A presença do grupo sulfamato no C-17 (assinalado em azul na figura 4), proporciona um aumento significativo dos efeitos antitumorais da molécula *in vivo* (JOURDAN, *et al.*, 2010). Além disso, a presença de aceptores da ligação de hidrogênio na posição C-17 (grupo SO₂) também confere ao STX140 um alto nível de atividade antiproliferativa (JOURDAN, *et al.*, 2010). Ou seja, a combinação desses grupos otimiza significativamente a atividade da molécula, sendo o STX140 um dos compostos mais promissores da sua classe com excelente perfil *in vivo*. O grupo sulfamato promove fortes interações com enzimas como a sulfatase e anidrase carbônica e proteínas como a tubulina (JOURDAN, *et al.*, 2010).

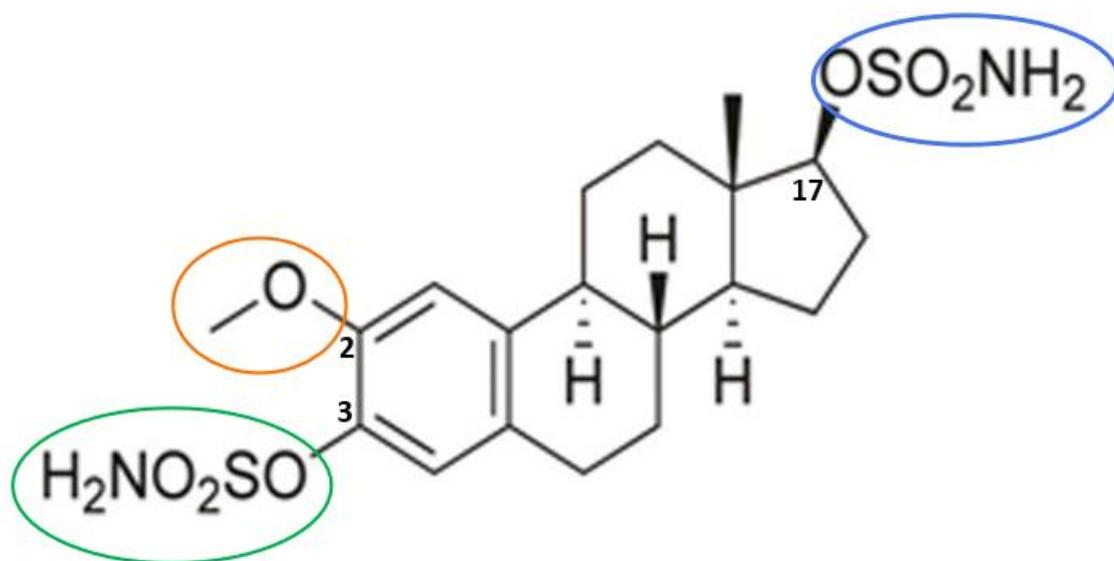


Figura 4. Molécula STX140. Ao analisar a relação estrutura-atividade (REA) da molécula, temos destacados os grupos: **3-O-sulfamato** (assinalado em verde) que confere à molécula um efeito antiproliferativo, **2-methoxi** (assinalado em laranja) que otimiza esse efeito antiproliferativo, **sulfamato no C-17** (assinalado em azul) que aumenta significativamente os efeitos antitumorais da molécula. Fonte: Adaptado de FOSTER, et al., 2008.

O STX140 atua em múltiplos alvos terapêuticos. Como mecanismo de ação, o composto interage com a tubulina e interrompe os microtúbulos na interfase, levando a parada do ciclo celular e a apoptose *in vitro* e *in vivo*, além de inibir a angiogênese (STENGEL *et al.* 2015). Uma das hipóteses para explicar seu mecanismo de ação anti-angiogênico é de que o mesmo é mediado pela inibição do fator induzível 1 da hipóxia (HIF1) (STENGEL *et al.*, 2015). O STX140 também atua inibindo a atividade da enzima CAIX (figura 5), levando a desregulação do pH intracelular da célula tumoral (ANDRING, *et al.*, 2019). A anidrase carbônica é uma glicoproteína de superfície celular. Pertence à família da anidrase carbônica α , das metaloenzimas de zinco que catalisa a hidratação reversível do dióxido de carbono em íons e prótons de bicarbonato (PASTOREKOVA e GILLIES, 2019). Existem 15 isoformas da AC em humanos que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos como, regulação do pH e respiração (ANDRING, *et al.*, 2019). A anidrase carbônica IX é fortemente associada ao câncer e recentemente foi identificada como um potencial alvo terapêutico para células de câncer de mama triplo negativo – células que não têm receptores de estrogênio ou progesterona e não produzem a proteína HER2 (ANDRING, *et al.*, 2019).

Estudos mostram que alterações na regulação do pH em células tumorais estão envolvidas na resistência aos medicamentos. O meio extracelular dos tumores sólidos é substancialmente mais ácido que o dos tecidos normais e o pH mais baixo do microambiente tumoral pode prejudicar a captação de medicamentos quimioterápicos (FEDERICI, *et al.*, 2016). A inibição desse mecanismo das células tumorais de alteração do pH extracelular parece ser uma estratégia terapêutica promissora.

A molécula STX140, derivada do 2-methoxyestradiol (2-ME), mostrou ter excelente biodisponibilidade –um mecanismo que explica o fato do STX140 ser biodisponível é a habilidade do grupo sulfamato (assinalado em verde na figura 4) em bloquear o metabolismo inativador, desativar a conjugação e por interagir de modo reversível com a anidrase carbônica (JOURDAN, *et al.*, 2010). Essa interação reversível pode minimizar o metabolismo hepático de primeira passagem, através do sequestro de sulfamatos nos glóbulos vermelhos (JOURDAN, *et al.*, 2010). A atividade antitumoral do STX140 deve-se, em grande parte, a

sua habilidade em romper os microtúbulos nas células (JOURDAN, *et al.*, 2010). O STX140 é um componente mais potente em inibir o crescimento de câncer de mama que o seu análogo 2-ME (FOSTER, *et al.* 2008).

Em um estudo importante, *Newman, et al* (2008) apresenta a eficácia do STX140 como agente antitumoral *in vitro* em células de câncer de mama resistentes – induzindo parada de ciclo celular e apoptose através do bloqueio da atividade de Bcl-2 (um inibidor de apoptose). Nesse mesmo trabalho avaliou-se a atividade do STX140 em modelos xenográficos que apresentaram falha no tratamento com taxano: O composto mostrou atividade antitumoral *in vivo* após tratamento via oral em 2 dos 3 modelos xenográficos avaliados: um dos modelos apresentou parada no crescimento e o outro regressão do tumor. O autor conclui que a atividade do STX140 contra tumores multirresistentes e sua excelente biodisponibilidade e baixa toxicidade sugerem esse fármaco como uma terapia anticâncer promissora.

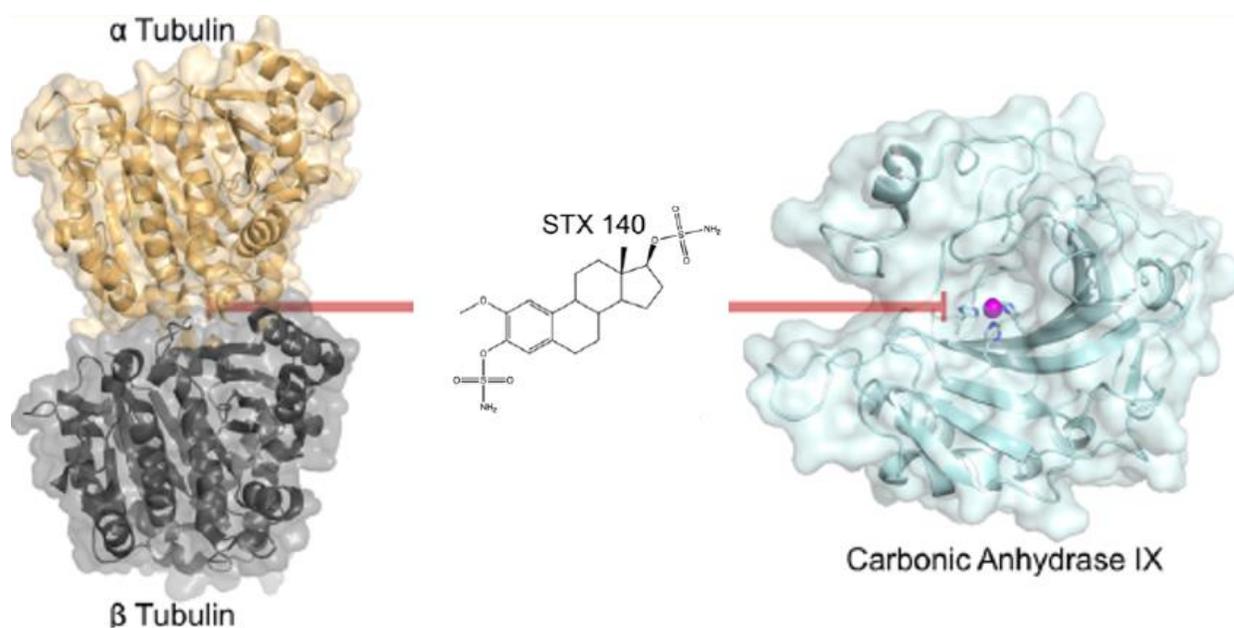


Figura 5. Ilustração adaptada de FOSTER, *et al.*, 2008 que mostra a interação molecular do STX140 com a tubulina, agindo como rompedor do microtúbulo e interagindo com a enzima CAIX.

1.5 Senescência

As células tornam-se senescentes após extensa replicação que causa o encurtamento dos telômeros ou pela exposição ao estresse genotóxico, oncogênico e/ou oxidativo (PRASANNA, *et al* 2021). A senescência é irreversível no sentido de que estímulos fisiológicos conhecidos não podem forçar as células senescentes a reentrar no ciclo celular (SHARPLESS e SHERR, 2015). As células tumorais não sofrem senescência naturalmente, pois expressam a enzima telomerase que neutraliza o encurtamento dos telômeros (GORJALA e GARY, 2010).

Duas vias principais de sinalização de senescência que são supressoras de tumor estão bem estabelecidas: a via p16/pRB e a via p53/p21, com sua importância variando entre os tipos de células (BENNETT, 2015). As células senescentes induzidas pela ativação de p53 exibem morfologia achatada, tamanho celular aumentado, expressão de β -Galactosidase (QIAN e CHEN, 2013). As mudanças na forma celular e atividade de β -Galactosidase específica da senescência são relatadas como as principais características da senescência celular (KRAYEM, *et al.* 2018).

Um efetor principal das funções da p53 é p21, um potente inibidor de quinase dependente de ciclina. O p21 mostrou estar envolvido tanto no controle dependente quanto no independente de p53 da proliferação celular (FANG, *et al*, 1999). O controle transcricional da expressão de p21 pode ocorrer por mecanismos dependentes ou independentes de p53 e sua expressão pode ser regulada a nível gênico (STIVALA, CAZZALINI, PROSPERI, 2012). A p21 é uma proteína amplamente expressa em células senescentes (EWALD, *et al*, 2010).

A senescência celular é um mecanismo de supressão tumoral essencial que impede a propagação de células ativadas por oncogenes, geneticamente instáveis e/ou danificadas. A indução da senescência nas células tumorais é um mecanismo antitumoral (PRASANNA, *et al* 2021). O tratamento com fármacos que induzem senescência e inibem a proliferação celular sem induzir morte celular se apresenta como uma alternativa às terapias tradicionais citotóxicas que podem causar efeitos adversos graves nos pacientes e frequentemente desenvolvem resistência (EWALD, *et al* 2010). Os tratamentos citostáticos, que são assim chamados pois inibem a proliferação celular sem induzir morte celular, se mostraram promissores em prevenir o crescimento tumoral, apresentando sobrevivência prolongada com baixos efeitos adversos graves relacionados a citotoxicidade (EWALD, *et al* 2010). Em contrapartida, é importante considerar que efeitos indesejados podem ser apresentados com esse tipo de terapia, denominada Terapia Indutora de Senescência (do inglês, *Therapy-induced senescence* – TIS), tais como secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células

senescentes, resistência ao tratamento e metástase (PRASANNA, *et al* 2021). Pensando nesses possíveis cenários é sempre importante considerar o contexto celular e tecidual.

Krayem et al descreve em seu trabalho que BRAF oncogênico é conhecido por desencadear senescência induzida por oncogene (SIO) tanto em nevos quanto em melanoma. É mencionado que em muitos casos, a inibição do BRAF por vemurafenib reforçou o fenótipo de senescência em vez de revertê-lo. Em contraste, a expressão de EGFR em melanoma ou sinalização hiperativa BRAF-MEK induz marcadores de senescência, um processo que é inibido pelo vemurafenibe. Assim, *Krayem et al* conclui que tanto a ativação quanto a inibição do BRAF mutante podem desencadear características semelhantes à senescência, mas o impacto desse processo em células de melanoma com resistência intrínseca/adquirida à inibição de BRAF ainda não é explorado.

1.6 Hipótese do trabalho

A hipótese desse trabalho foi desenvolvida a partir dos dados apresentados em *Massaro et al*, cujo estudo mostrou que o composto 2-ME apresenta múltiplas propriedades antitumorais como a indução da parada do ciclo celular e senescência em células de melanoma.

O composto STX140, é um análogo do estradiol de baixa toxicidade e com biodisponibilidade superior ao 2-ME, que já se mostrou eficaz no combate ao câncer de mama *in vitro* e *in vivo* e está sendo avaliado para sua ação no melanoma. Nossa hipótese é de que o STX140 atua como agente citostático em células de melanoma, apresentando efeito antiproliferativo, antimigratório, induzindo senescência.

2. OBJETIVO(S)

Este trabalho tem como objetivo explorar os efeitos do composto STX140 em células de melanoma.

Objetivo específico 1

Investigar o efeito do composto STX140 sobre a viabilidade de células de melanoma humano.

Objetivo específico 2

Investigar se o STX140 induz senescência em células de melanoma.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados tem como base o trabalho publicado por MASSARO, *et al.* 2017.

3.1 STX140

O composto foi sintetizado e fornecido pelo grupo de pesquisa do professor e pesquisador Barry V. L. Potter do Departamento de Farmacologia da Universidade de Oxford, UK.

3.2 Cultura de células

Os melanócitos e fibroblastos primários foram isolados de amostras de prepúcio doadas no Hospital da Universidade de São Paulo (CEP/HU-USP 943/09, SISNEP CAEE 0062.0.198.000-9) conforme aprovado pelo comitê de ética local (CEP/FCF-USP 534). Eles foram isolados e cultivados de acordo com o protocolo previamente descrito pelo nosso grupo.

As células resistentes ao BRAF foram geradas durante o tratamento com concentrações crescentes de vemurafenibe (inibidor de BRAF, Zelboraf, PLX4032/RG7204, Daiichi Sankyo/Roche, Japão) por 4-6 semanas até que as colônias fossem isoladas de acordo com *Sandri, et al*, 2016.

Todas as culturas foram testadas regularmente e confirmadas como negativas para infecção com *Mycoplasma* spp. Utilizou-se PCR (reação em cadeia da polimerase) com primers específicos para detecção de *Mycoplasma* (sentido - 5' GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG 3' e antisense - 5' CGG ATA ACG GTT GCG ACC TAT 3'). Além disso, todas as células foram autenticadas e confirmadas como tendo perfis STR (short-tandem repeat profile) equivalentes aos publicados na literatura.

As linhagens celulares de melanoma SK-Mel-28 e A375 parentais e resistentes ao vemurafenibe com mutações BRAF (V600E) foram utilizadas. O cultivo é feito em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) para a célula SK-Mel-28 e RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) para a célula A375, suplementados com 10% ou 5% de soro fetal bovino e antibióticos (25 u/mL de ampicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). As linhagens resistentes ao PLX4032 (vemurafenibe) foram sempre mantidas na presença do composto, nas concentrações de 4,5 µM para A375R e 3,0 µM para a SK-Mel-28R. Todas as células

foram mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ para manutenção de pH próximo ao fisiológico.

3.3 Ensaio de viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán - IC50

A sensibilidade a diferentes concentrações de STX140 em células de melanoma humano, melanócitos e fibroblastos foi avaliada pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripan (0,4% em tampão fosfato salino, PBS) no qual as células são consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentarem no seu interior a coloração azul.

Sendo assim, as células foram semeadas (2×10^4 por poço) em placas de 24 poços e após 24h o meio foi trocado por outro com as seguintes concentrações do composto em todas as linhagens: 50 nM, 100 nM, 200 nM e 400 nM de STX140.

As células foram incubadas em meio de cultura contendo STX140 por 24 horas, 48 horas e também 72 horas. Após essa etapa, as células foram coletadas através de tripsinização foram suspendidas com a adição do corante azul de tripan (0,4%). Após a adição do corante, as células viáveis foram contadas em câmaras de Neubauer.

3.4 Ensaio Clonogênico ou Ensaio de Formação de Colônias

Foram semeadas 800 células em placas de cultura de células de 6 poços. Após 24h, as células já aderidas foram tratadas com o composto STX140 nas concentrações de 25 nM, 50 nM, 100 nM e 200 nM ou somente com o meio de cultura (grupo não tratado) e mantidas em cultura de 10 a 17 dias, sendo o tratamento realizado 2 vezes por semana com a troca do meio. Após este período, o meio de cultura foi descartado, as placas lavadas com tampão fosfato salino (PBS), e as colônias formadas foram coradas com solução de 50% metanol com água e 0,5% de cristal violeta. As placas foram fotografadas para comparação do crescimento das colônias nos diferentes tratamentos em relação ao controle não tratado. Através de uma análise computacional, para cada poço também foram quantificados a porcentagem da área relativa ao controle ocupada pelas colônias. Os valores foram plotados em um gráfico para melhor visualização dos dados.

3.5 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

As linhagens de melanoma SK-Mel-28 Parental, SK-Mel-28 Resistente, A375 Parental e A375 Resistente foram semeadas em placas de 6 poços (5×10^4 células por poço). Após 24 horas foram tratadas com STX140 nas concentrações de 0nM e IC50 de cada célula. Após 48h de tratamento as células foram coletadas. Após a coleta das células aderidas e presentes no sobrenadante, as mesmas foram passadas para um tubo Falcon e centrifugadas a 1000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi lavado e ressuspendido com PBS gelado. Após nova centrifugação a 1000 rpm por 3 minutos as células contidas no sedimento foram ressuspendidas em tampão de permeabilização (PBS contendo 10mg/mL de RNase, 0,1% de triton x-100 e 50µg/mL de Iodeto de Propídio). Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente a fluorescência foi medida em um citômetro de fluxo (FACSCantheo Beckton Dickinson, CA, USA) em canal FL2 - 620nm.

3.6 Ensaio *in vitro* scratch

As células foram semeadas (1×10^5 por poço) em placa de 24 poços. Após 24h atingiram a confluência de aproximadamente 90%. Com o auxílio de uma ponteira de 200 µL foram realizadas fendas no centro de cada poço. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e adicionados os tratamentos com meio de cultura DMEM +1% de SFB com STX140 (100 nM) para a linhagem parental ou tratamento combinado (STX140 100nM + vemurafenibe) para a resistente. O experimento foi realizado por 48 horas até quase o fechamento total das fendas nos controles. As análises das áreas livres de células foram realizadas com o software Image J.

3.7 Ensaio de Morte celular por citometria de fluxo

Este ensaio foi feito seguindo as instruções do kit utilizado - *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (AB_2869085, BD Pharmingen)*. As linhagens de melanoma SK-Mel-28 Parental e SK-Mel-28 Resistente foram semeadas em placas de 6 poços (2×10^5 células por poço). Após 24 horas foram tratadas com STX140 nas concentrações de 0nM e IC50 de cada célula. Após 48h de tratamento as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS e ressuspendidas em 100 µL de tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM, NaCl₂, 5 mM CaCl₂) na concentração de 1×10^6 células por mL. Adicionou-se Anexina V – FITC e Iodeto

de Propídeo e as células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. Foram adicionados mais 400 μ L de tampão de ligação e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. Utilizaram-se os softwares FlowJo™ e GraphPad Prism versão 5® para confecção dos gráficos.

3.8 Coloração para β -galactosidase associada à senescência

As células de melanoma foram semeadas (2×10^4 células por poço) em placas de 6 poços. No dia seguinte, após a adesão das células, estas foram tratadas com STX140 nas concentrações de 0nM e IC50 de cada célula. Após 48h de tratamento, as células foram fixadas para a coloração da β -galactosidase. No dia seguinte, foi feita a contagem de células senescentes e não senescentes no microscópio em 6 campos diferentes para cada grupo (tratado e não tratado). A fixação e coloração da β -galactosidase associada à senescência foi realizada utilizando o kit *Senescence β -galactosidase Staining Kit #9860 (Cell Signaling Technology)* seguindo as instruções do fabricante.

3.9 PCR quantitativo para análise da expressão de genes relacionados às vias de senescência e apoptose.

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Professor Dr. João Agostinho Machado-Neto e a doutoranda Keli Lima do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As amostras de RNA total foram extraídas utilizando reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Um total de 1 μ g de RNA foi reversamente transcrito em cDNA com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). A amplificação gênica em tempo real foi realizada no aparelho realizada no equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR System e o reagente Power SybrGreen (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) com iniciadores específicos (tabela 1). Quinze nanogramas de cada amostra de cDNA foram utilizados nas reações e um controle negativo, com adição de água (nuclease free) no lugar de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. HPRT1 e ACTB foram utilizados como gene de referência. A expressão relativa foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (PMID: 11846609)

Gene	Sequência/ Identificação Catálogo	Concentração
TP53	FW: GGCACACAGAGGAAGAGAAT RV: GGAGAGGAGCTGGTGTGTTG	300 nM
TP73	FW: GCACCACGTTTGAGCACCTCT RV: GCAGATTGAACTGGGCCATGA	300 nM
CDKN1A	FW: TGTCCTGTCTTGTACCCTTGT RV: GCCGGCGTTTGGAGTGGTAG	300 nM
CDKN1B	FW: ACTCTGAGGACACGCATTTGGT RV: TCTGTTCTGTTGGCTCTTTTGT	300 nM
BBC3	FW: GACCTCAACGCACAGTACGAG RV: AGGAGTCCCATGATGAGATTGT	300 nM
PMAIP1	FW: CGCGCAAGAACGCTCAACC RV: CACTCGACTTCCAGCTCTGCT	300 nM
BAX	FW: GAGCTGCAGAGGATGATTGC RV: CAGCTGCCACTCGGAAAA	300 nM
CDKN2A	FW: CACCGAATAGTTACGGTCGGA RV: CACGGGTCCGGTGAGAGTG	300 nM
GADD45A	FW: AAGGATGGATAAGGTGGGG RV: CTGGATCAGGGTGAAGTGG	300 nM
SIVA1	FW: TCTTCGAGAAGACCAAGCG RV: TGCCCAAGGCTCCTGATC	300 nM
ACTB	FW: AGGCCAACCGCGAGAAG RV: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	150 nM
HPRT1	FW: GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA RV: TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	150 nM

Tabela 1. Sequência e concentração dos iniciadores utilizados no PCR quantitativo.

*Sondas obtidas da Thermo Fisher Scientific (EUA) e utilizadas de acordo com instruções do fabricante.

3.10 Quantificação de IL-6 e IL-8, por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Com o objetivo de detectar e quantificar as interleucinas IL-6 e IL-8 nos grupos tratado e não tratado nas monoculturas das células de melanoma, o sobrenadante das culturas foi coletado e congelado a -80°C para ser utilizado no ensaio de ELISA (R&D Systems). As citocinas, IL-6 e IL-8 foram analisadas conforme instruções dos fabricantes dos kits comerciais. IL-6 (R&D Systems®, Catalog. # QC193), IL-8 (R&D Systems®, Catalog # AF-208-NA). A densidade óptica foi medida imediatamente, em 450 nm em espectrofotômetro de microplaca. A concentração de interleucina foi determinada por interpolação a partir da curva padrão.

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para análise dos dados e comparação dos grupos não tratado e tratado, foi realizado o teste 2way ANOVA, sendo considerados valores estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Os dados são representados pela média \pm SEM (erro padrão da média). Todos os ensaios foram realizados em 3 ou mais replicatas independentes.

4. RESULTADOS

4.1 Viabilidade e proliferação celular

4.1.1 Determinação do IC50

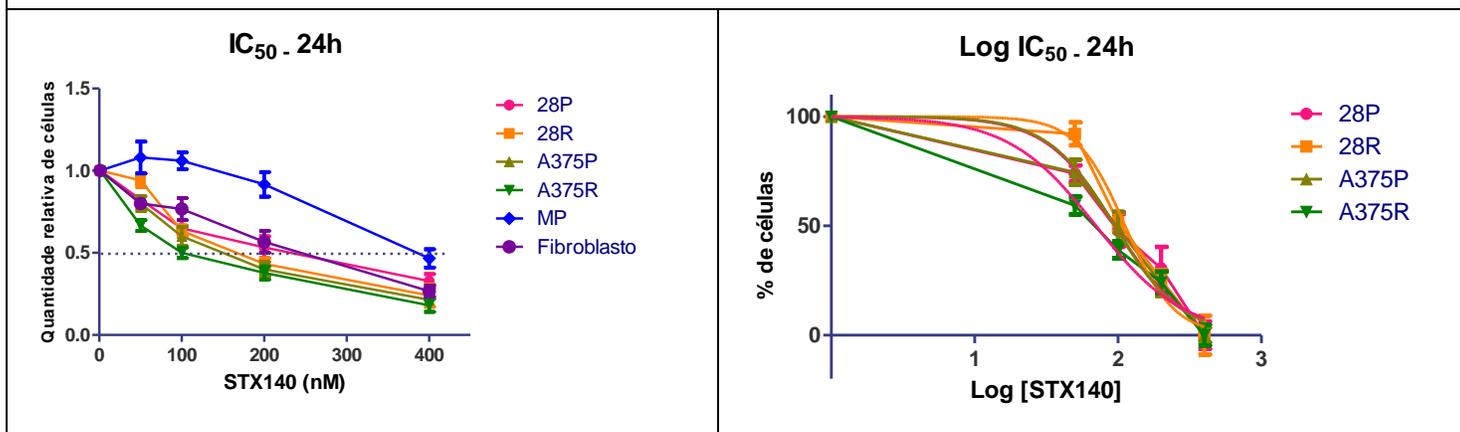
Metade da concentração inibitória máxima (IC_{50}) é a medida mais amplamente utilizada e informativa da eficácia de um medicamento, molécula isolada ou formulação. Indica o quanto do fármaco é necessário para inibir um processo biológico pela metade, fornecendo assim uma medida da potência de um composto em pesquisas farmacológicas (AYKUL, MARTINEZ-HACKERT, 2016). A maioria das abordagens para determinar a IC_{50} de um composto farmacológico é baseada em ensaios que utilizam sistemas de células *in vitro*. (AYKUL, MARTINEZ-HACKERT, 2016).

O cálculo da concentração inibitória de 50% (IC_{50}) foi realizado com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. O experimento foi realizado após tratamento das células com STX140 em concentrações de 50 nM, 100 nM, 200 nM e 400 nM por 24 horas, 48 e 72 horas.

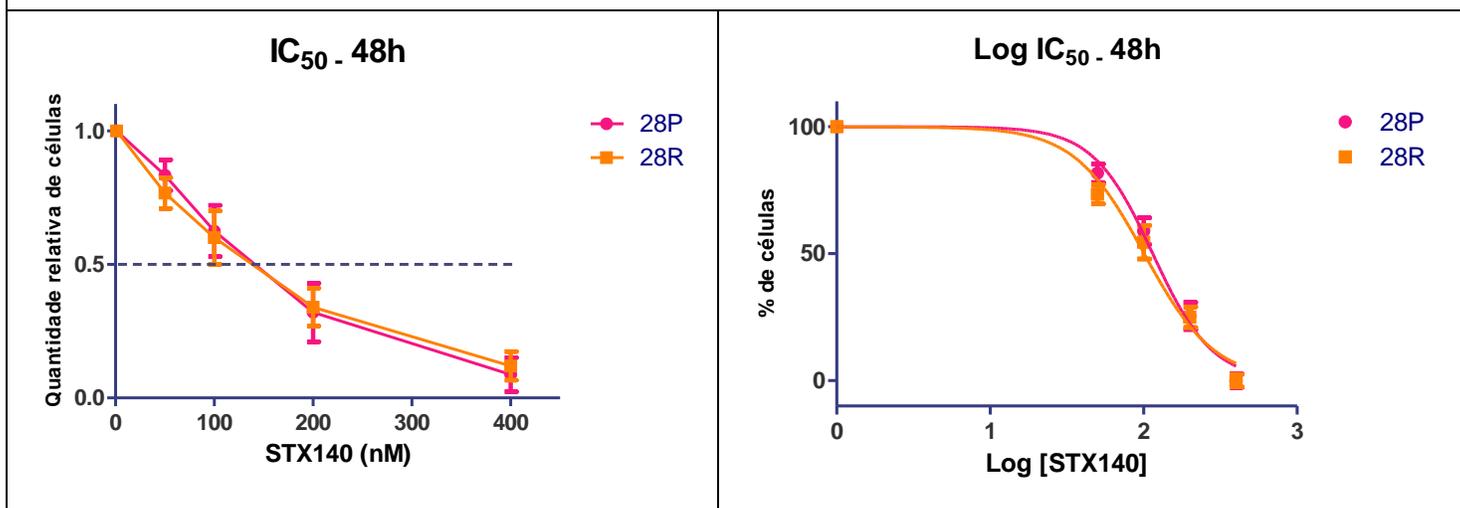
Os resultados mostram inibição da proliferação e viabilidade celulares de forma concentração dependente (Figura 6), com exceção dos melanócitos que mostram um pequeno aumento no seu crescimento quando submetidos a concentração de STX140 de 50 nM. Após inserção dos dados nos gráficos, foram plotadas curvas ajustadas para o cálculo dos valores de IC_{50} para cada tempo de tratamento (Tabela 2 e 3). Na figura 6 para o tratamento de 24h é possível observar que as linhagens de melanoma são mais sensíveis a ação do composto em comparação com as células primárias (fibroblastos e melanócitos que apresentam os maiores IC_{50}), o que sugere uma maior sensibilidade do melanoma ao STX140. As linhagens A375 parental e resistente mostraram-se mais sensíveis à ação do composto, pois apresentam valores menores de IC_{50} das demais células.

No tratamento de 48h observamos um pequeno aumento do IC50 para a linhagem SK-Mel-28 parental e uma diminuição do IC50 para a linhagem resistente. No tratamento de 72 horas tivemos uma queda de 46% no IC50 da linhagem parental e de 32% no IC50 da linhagem resistente.

24h



48h



72h

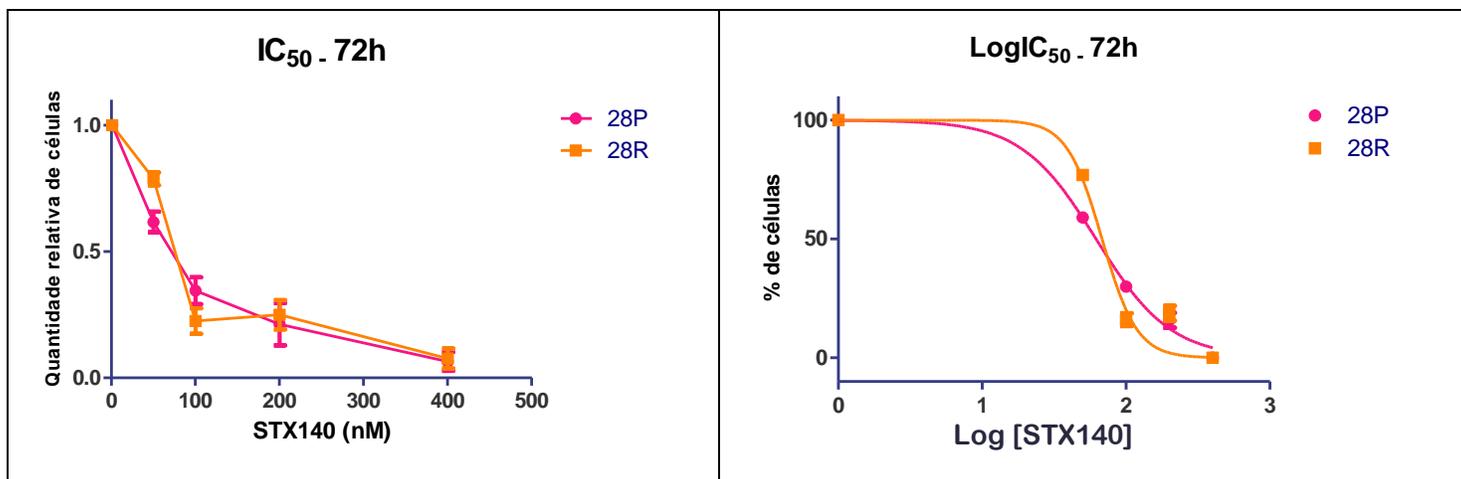


Figura 6. Gráficos com valores da quantidade das células relativa ao controle vs concentração de STX140 em nM e gráfico com valores de IC₅₀ em escala logarítmica. As células foram semeadas (2×10^4 por poço) em placas de 24 poços e após 24h o meio foi trocado por outro com as seguintes concentrações do composto STX140 em todas as linhagens: 0; 50nM; 100nM; 200nM e 400nM. As células foram incubadas em meio de cultura contendo STX140 por 24, 48 e 72 horas. Após essa etapa, as células foram coletadas e suspensas com a adição do corante azul de tripan (0,4%). Com a adição do corante, as células viáveis foram contadas em câmaras de Neubauer.

Valores de IC ₅₀ de STX140 (nM)						
	A375P	A375R	Sk-Mel-28P	Sk-Mel-28R	Melanócito	Fibroblasto
IC ₅₀ - 24h	94	70	95	112	222	134
IC ₅₀ - 48h			115	101		
IC ₅₀ - 72h			62	68		

Tabela 2. Valores de IC₅₀ calculados através do software GraphPad Prism versão 5 para as linhagens de melanoma humano após tratamento com STX140 por 24, 48 e 72 horas.

4.1.2 Ensaio de formação de colônias

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias é um ensaio de sobrevivência celular *in vitro* com base na capacidade de uma única célula de crescer em uma colônia, sendo usado para determinar a eficácia dos agentes citotóxicos (FRANKEN et al, 2006). Neste ensaio avaliamos a capacidade do composto STX140 de inibir a formação e crescimento das colônias de células de melanoma.

As células de melanoma e fibroblastos humanos foram tratadas por um período de 10 a 17 dias (dependendo da linhagem) com concentrações crescentes de STX140. O objetivo era observar um efeito inibitório progressivo da ação do composto na formação de colônias. As células de melanócitos não foram utilizadas por não formarem colônias. O tratamento com o STX140 foi realizado, com as concentrações crescentes de 25nM, 50nM, 100nM e 200nM, como trocas de meio a cada 72 horas. A formação de colônias mostrou-se inibida no tratamento com as concentrações a partir de 50 nM, sendo que em 200 nM observa-se a inibição quase total do crescimento de colônias nas linhagens de melanoma humano. Isso mostra o potencial deste composto em inibir o crescimento destas células mesmo em concentrações baixas – figura 7.

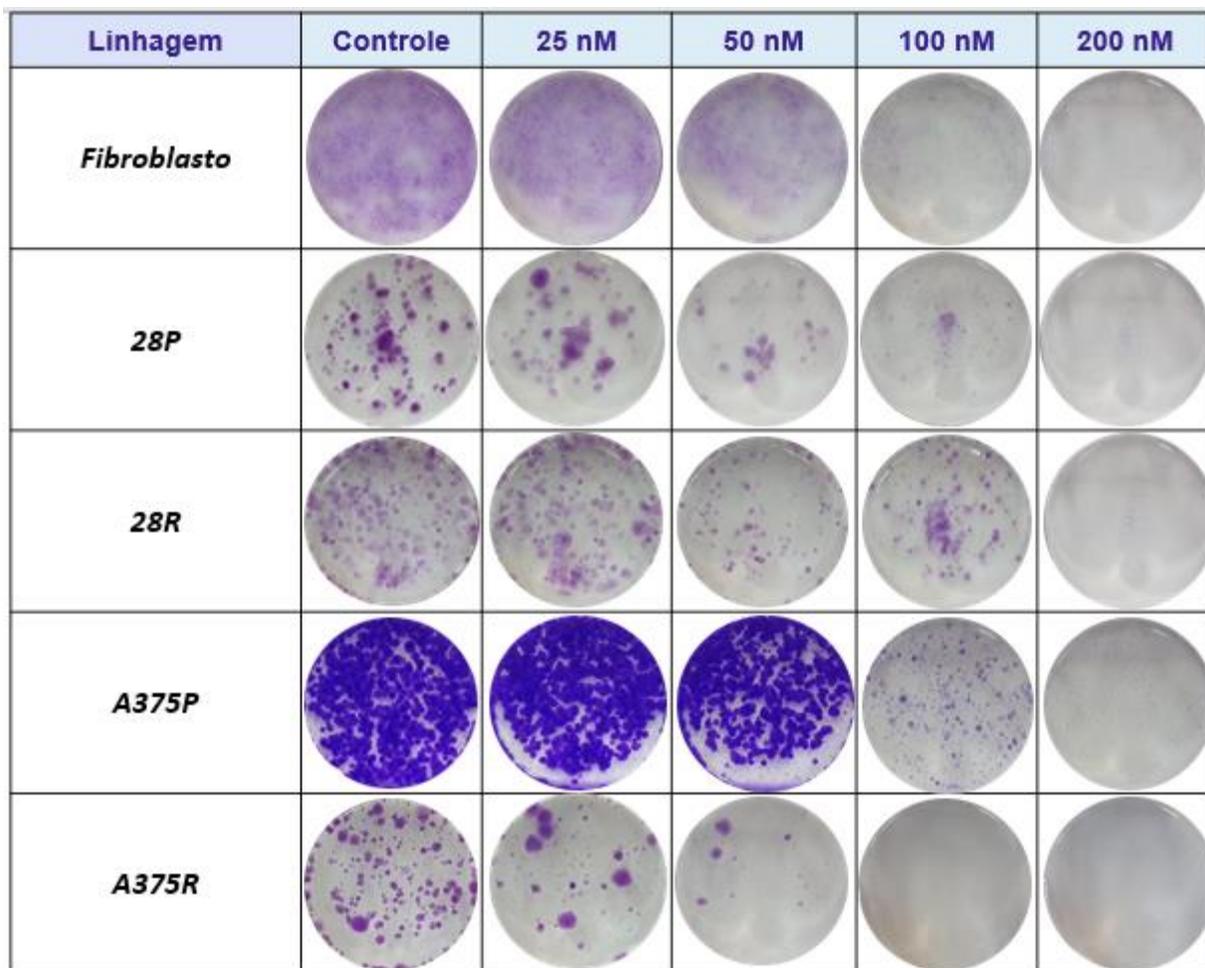


Figura 7. Crescimento de colônias de linhagens de melanoma humano e fibroblastos após tratamento com STX140 nas concentrações indicadas. Foram semeadas 800 células em placas de cultura de células de 6 poços e após 24h, as células foram tratadas com o composto STX140 nas concentrações de 25 nM, 50 nM, 100 nM e 200 nM e mantidas em cultura de 10 a 17 dias (de acordo com o crescimento de cada linhagem), sendo o tratamento realizado 2 vezes por semana com a troca do meio. Após este período as colônias formadas foram coradas e as placas fotografadas,

Os dados da figura 8 nos mostram os resultados da análise computacional feita para cada poço, onde quantificou-se a porcentagem de área ocupada pelas colônias relativa ao controle. Observamos que com o aumento das concentrações de STX140 há uma diminuição da área ocupada com diferença estatística para as concentrações de 50 nM e 100 nM— correspondendo com as imagens da Figura 7. Para as células de fibroblastos

observamos uma menor diminuição da área ocupada conforme se aumenta a concentração de STX140.

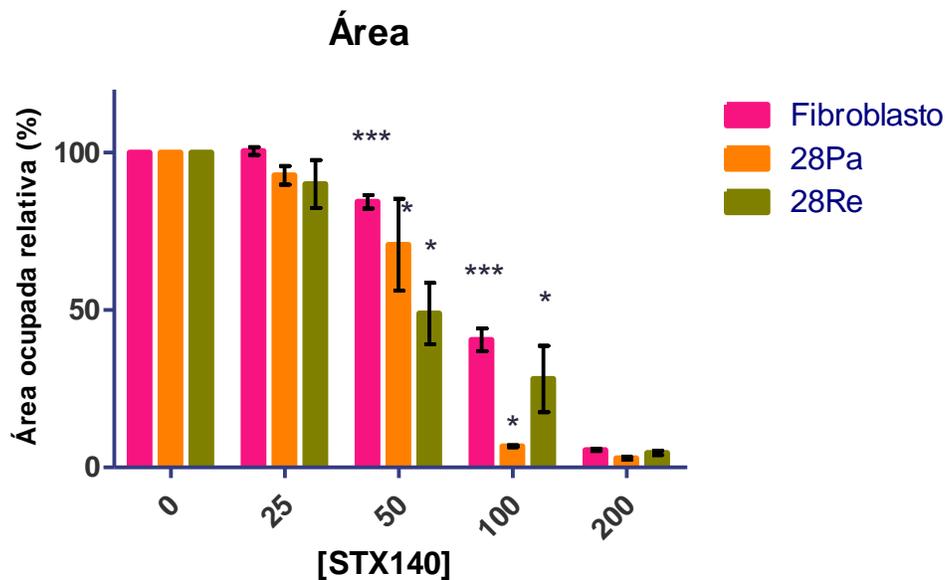


Figura 8. Área relativa ao controle ocupada pelas colônias vs Concentração de STX140. Através do software Image J, calculou-se a área ocupada pelas colônias em cada poço e os dados foram plotados nesse gráfico. A análise estatística 2way ANOVA foi feita para comparação dos dados entre os grupos de cada concentração. A diferença entre as concentrações foi considerada significativa quando valor de $P < 0,05$. Legenda: (*)= $P < 0,05$, (***)= $P < 0,001$.

4.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

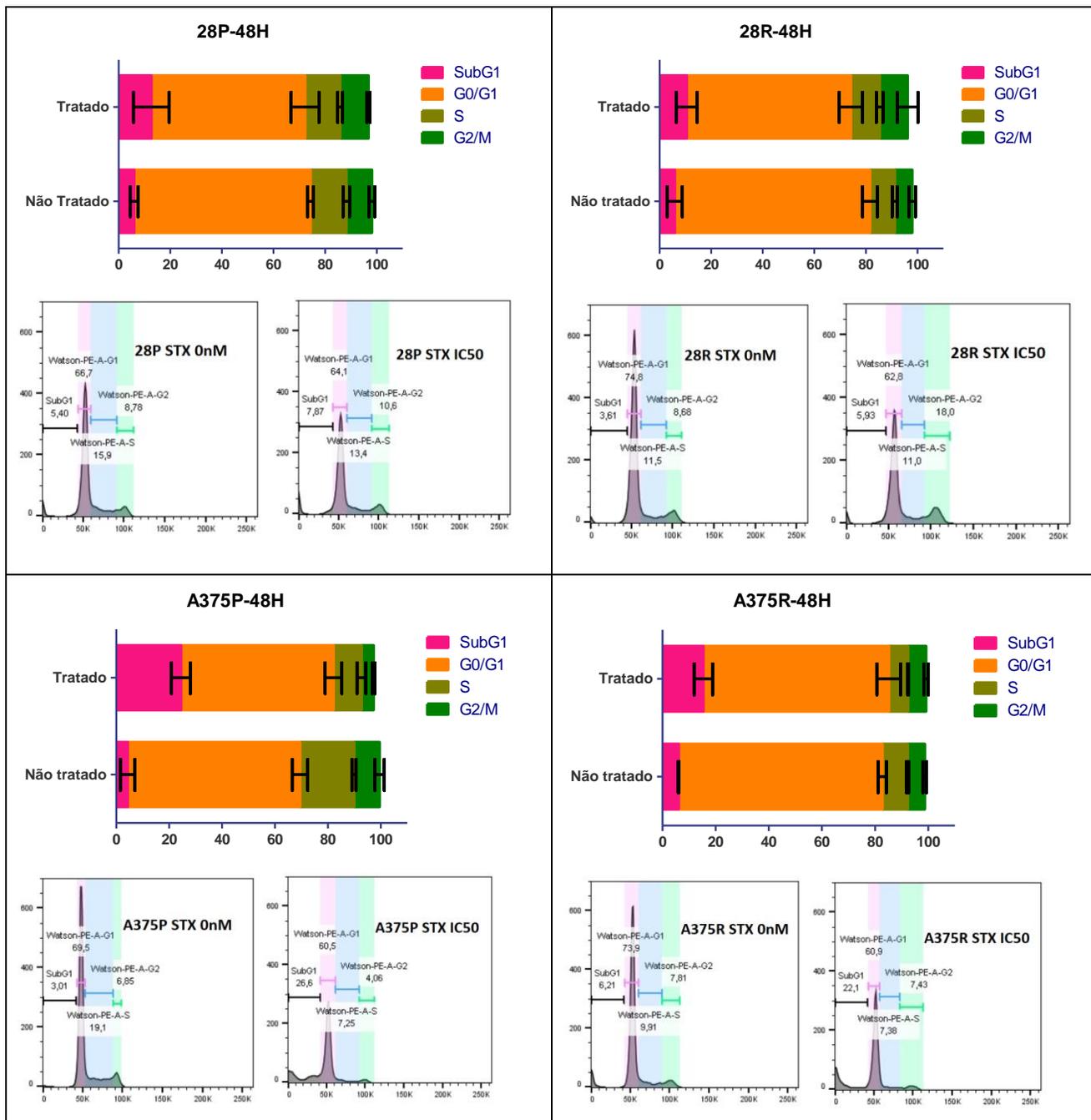


Figura 9. Avaliação da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo após o tratamento com STX140 por 48 h. Gráficos e histograma da citometria de fluxo ilustrando as subpopulações das células em diferentes fases do ciclo celular do grupo controle e após o

tratamento com STX140 por 48 h. A partir dessas imagens podemos observar aumento da subpopulação em SubG1 para as linhagens A375 parental e resistente.

O ensaio de ciclo celular foi realizado a fim de verificar se o STX140 induz parada de ciclo celular. Podemos observar (figura 9) uma diferença no aumento das populações em Sub G1 (que apresentam DNA fragmentado) no grupo tratado. Para a linhagem 28P temos um aumento de 2 vezes da população com DNA fragmentado do grupo não tratado para o tratado; para 28R, houve também aumento de aproximadamente 2 vezes das populações em SubG1 em comparação com o grupo controle. Para a linhagem A375 P houve aumento de 5 vezes da população em SubG1 no grupo submetido ao tratamento e para a A375R houve um aumento de um pouco mais de 2 vezes da população com DNA fragmentado no grupo tratado em comparação com o não tratado. Esse aumento das populações em SubG1 com o tratamento mostram uma diminuição da viabilidade celular pelo STX140. É possível notar a predominância de células na fase G0/G1 do ciclo celular em todos os grupos - não tratados e tratados. Nos histogramas apresentados podemos observar uma diminuição da população de células pós tratamento com STX140. O eixo das abscissas mostra a quantidade de DNA presente em cada evento com a marcação de iodeto de propídeo (PI) e no eixo das ordenadas está plotado o número de eventos. Para as linhagens da A375 Parental e Resistente são mais evidentes os efeitos do tratamento com STX140.

4.3 Migração celular

4.3.1 Avaliação da migração celular pós tratamento com STX140 - *In vitro* scratch assay

Este ensaio é um método fácil, de baixo custo e bem desenvolvido para medir a migração celular *in vitro*. As etapas básicas envolvem a criação de um "risco" em uma monocamada de células, capturando as imagens no início e em intervalos regulares durante a migração das mesmas para fechar a fenda. As imagens são comparadas para quantificação da taxa de migração das células (LIANG , PARK, GUAN, 2007).

Ao analisar a figura 10 se pode observar que há maior migração de células nas linhagens não tratadas, tanto na parental quanto na resistente, havendo o fechamento da fenda quase que completo. Também observamos que nas linhagens tratadas não ocorre o fechamento total da fenda e há maior presença de células com morfologia modificada, o que sugere que o STX140 pode inibir a migração dessas células.

Na figura 11, após 24h de tratamento a linhagem SK-Mel-28 parental já apresenta diferenças no fechamento da fenda entre os grupos tratado (T) e não tratado (NT): O grupo NT apresenta fechamento da fenda em 87% e o grupo tratado apresenta fechamento da fenda de apenas 34%. Para esta mesma linhagem após 48h de tratamento temos o grupo NT com fechamento de 98% da fenda enquanto que no tratado a fenda está fechada em apenas 66%. Para a linhagem SK-Mel-28 resistente a diferença entre os grupos também é significativa após 24h de tratamento – nesse tempo temos o grupo não tratado com fechamento de 45% da fenda e o grupo tratado com fechamento de 26% da fenda. Em 48h para essa linhagem o grupo não tratado já está fechado em quase 90% e o grupo tratado em 50% apenas.

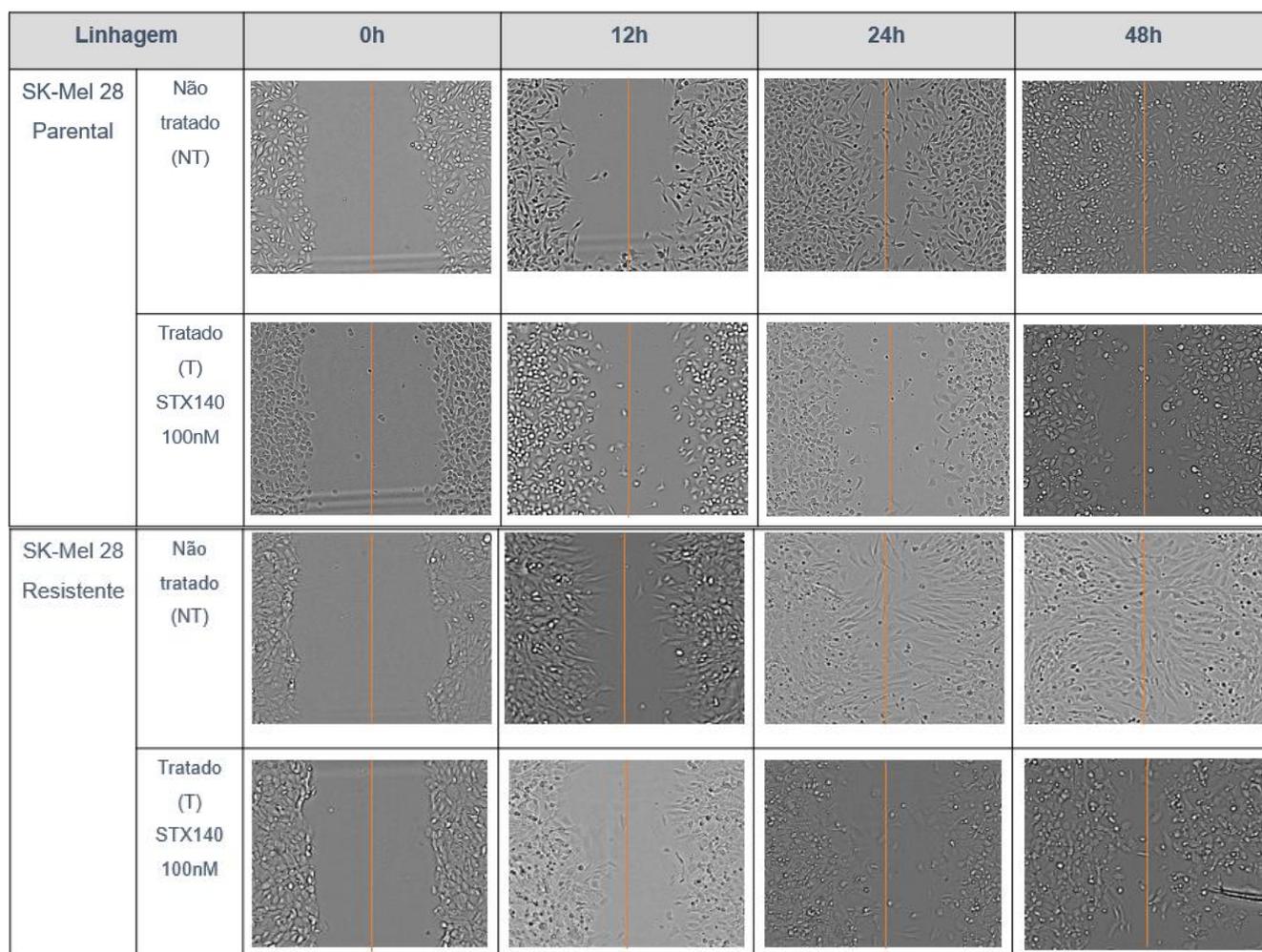


Figura 10. *In vitro* scratch assay. As células foram semeadas e após atingirem a confluência de aproximadamente 90% foram realizadas fendas no centro de cada poço.

As células foram tratadas com meio de cultura DMEM +1% de SFB com STX140 (100 nM). O experimento foi realizado até o momento em que a fenda se fechou nos controles (aproximadamente 48 horas).

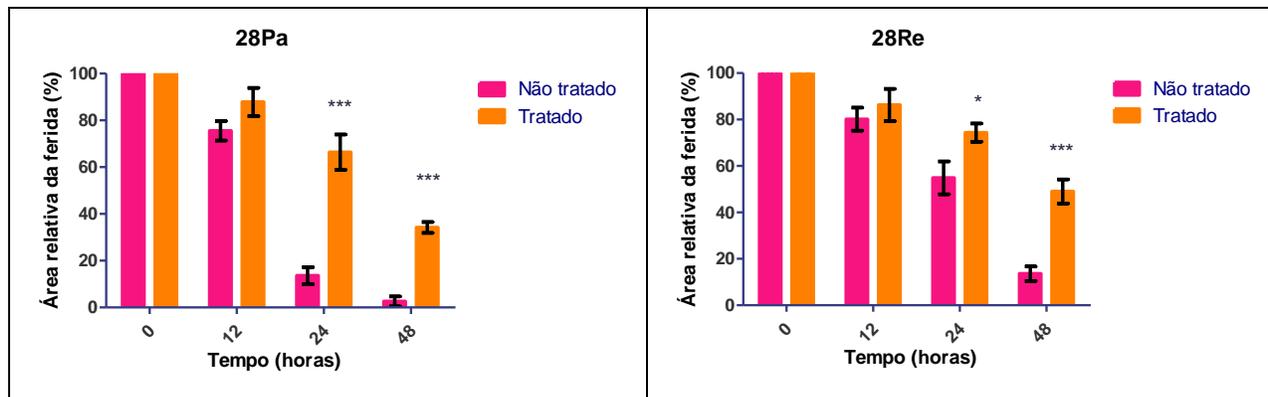


Figura 11. *In vitro* scratch assay. Através do software Image J, as áreas da fenda em diferentes tempos foi medida e calculou-se a área relativa ao controle para plotagem dos dados no gráfico. Os resultados da análise estatística 2way ANOVA mostraram uma diferença significativa para os tempos de 24h e 48h comparando-se os grupos tratados e não tratados. Legenda (*)= $P < 0,05$, (***)= $P < 0,001$.

4.4 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo (Anexina V e Iodeto de Propídeo)

Para avaliarmos se o STX140 induz morte celular e também o tipo de morte induzida nas linhagens de melanoma esse ensaio foi realizado. As células viáveis não apresentam marcação positiva para anexina e PI; as células em apoptose apresentam marcação positiva para Anexina V e células em estado de necrose apresentam marcação negativa para anexina e positiva para PI. Células que possuem membrana celular apresentando o receptor para fosfatidilserina incorporam o fluoróforo Anexina V-FITC, sugerindo processo apoptótico. Nas células mortas, o PI tem acesso ao DNA celular em função da perda da integridade da membrana plasmática sugerindo processo necrótico.

Na figura 13 temos o Dot-plot das células marcadas com Anexina-FITC e PI – No quadrante 4 (Q4) temos representado o grupo de células viáveis, em Q1 temos representado o grupo de células em necrose e em Q2 e Q3 temos as células em processo apoptótico representadas. No grupo não tratado observamos mais de 80% das células em estado viável, o que indica que houve uma morte basal dentro do aceitável nesse grupo.

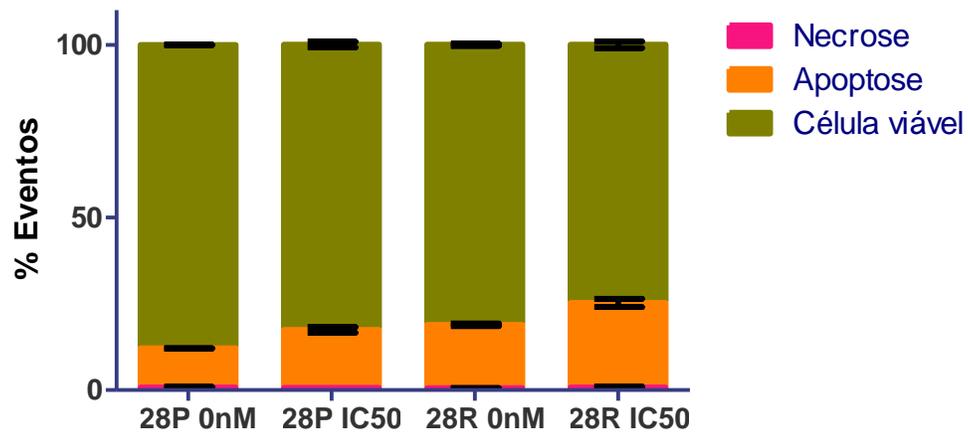


Figura 12: Gráfico da quantificação dos eventos mostrados no Dot-plot da citometria de fluxo das células de melanoma tratadas por 48h com STX140 na concentração do IC50 de cada célula. Observa-se um leve aumento no número de células apoptóticas no grupo tratado, porém sem significância estatística.

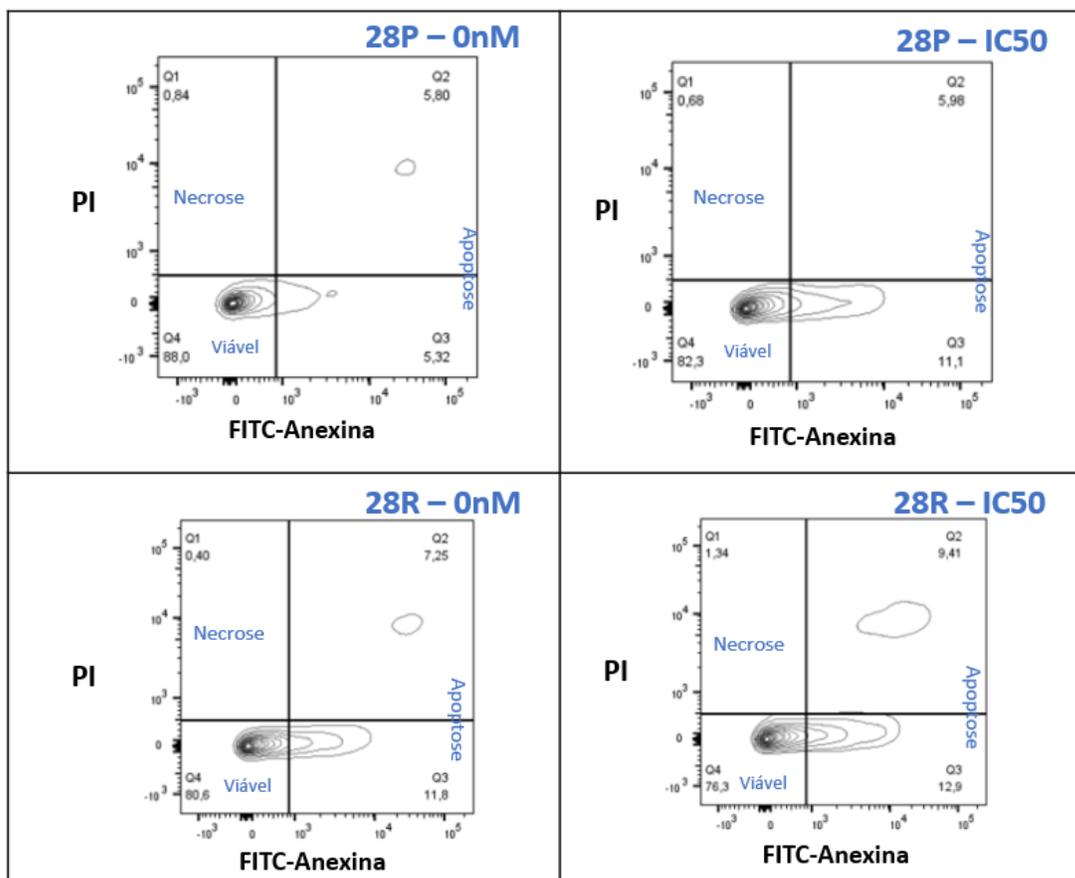


Figura 13. Dot-plot das células marcadas com Anexina-FITC e PI e submetidas a citometria de fluxo após tratamento com STX140 na concentração do IC50 de cada linhagem por 48h.

Ao analisarmos os resultados, podemos identificar no gráfico (Figura 12) e Dot-plot (Figura 13) um pequeno aumento de células apoptóticas no grupo tratado, porém sem significância estatística. Esses resultados sugerem que o composto STX140 não induz de modo significativo a apoptose e necrose nas linhagens de melanoma.

4.5 Senescência

4.5.1 Coloração para β -galactosidase associada à senescência

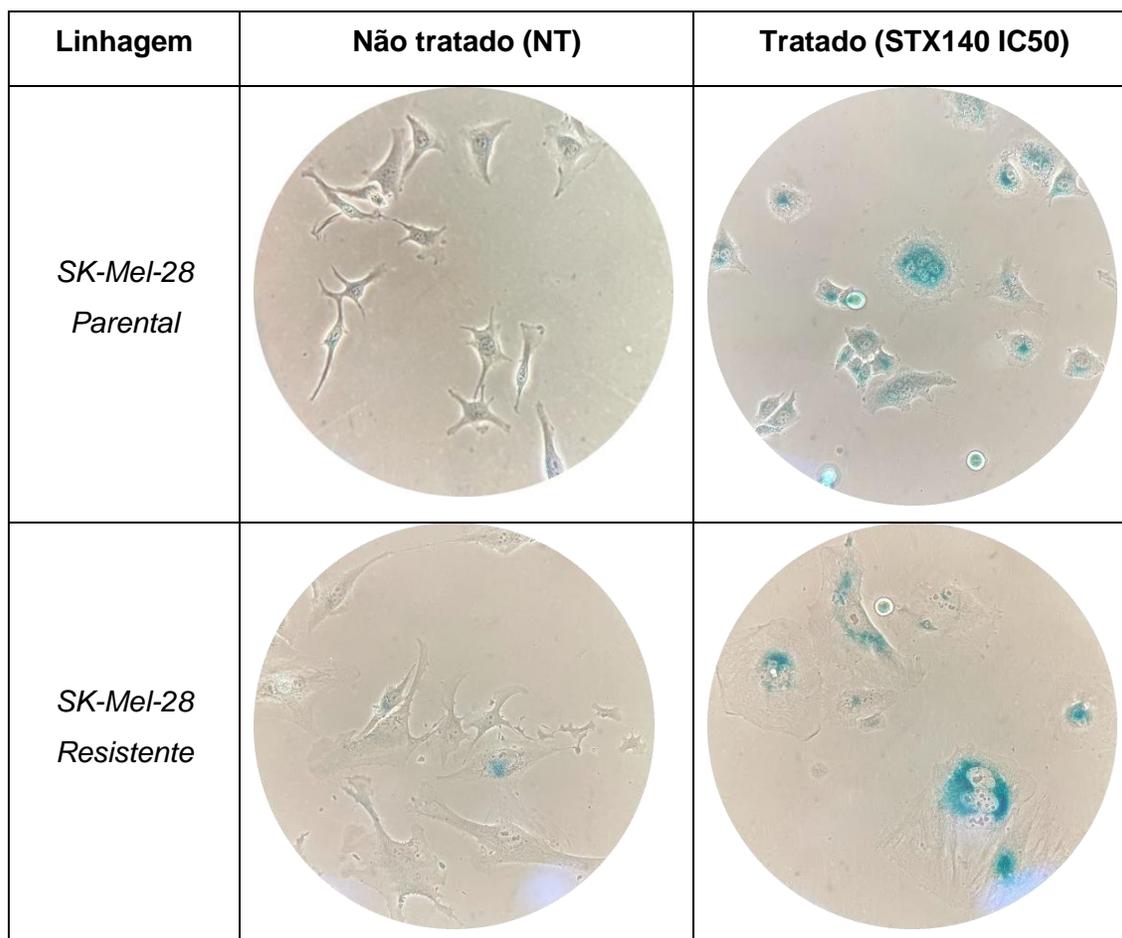


Figura 14. Ensaio de senescência. Fotos dos grupos tratados e não tratados. É possível observar uma diferença na coloração azul e na morfologia das células em cada grupo.

Senescência celular é um processo que pode ocorrer com as células normais quando desafiadas por estresse potencialmente oncogênico, fazendo-as perder permanentemente a capacidade de proliferar (DEBACQ-CHAINIAUX, 2009). A atividade de β -galactosidase associada à senescência (SA- β gal), detectável em pH 6,0, permite a identificação de células senescentes em cultura e tecidos de mamíferos (DEBACQ-CHAINIAUX, 2009).

Uma das hipóteses do nosso trabalho é a de que o composto STX140 induz senescência em células de melanoma o que explicaria a alteração morfológica dessas células e a diminuição da sua viabilidade celular como observado nos ensaios de viabilidade celular, clonogênico e ensaio *in vitro scratch* sem no entanto observarmos morte celular significativa. Células senescentes apresentam alargamento da sua morfologia e não se proliferam. Na figura 14 podemos observar os efeitos do tratamento com STX140: 1. As células tratadas apresentam coloração azul muito mais acentuada sendo positivas para β -galactosidase, 2. Fenótipo das células modificado (citoplasma mais espalhado).

Os dados da figura 15 reforçam o que identificamos nas imagens – as linhagens tratadas apresentam maior número de células senescentes: A SK-Mel-28 parental tratada apresenta 4 vezes mais células senescentes que a não tratada. A SK-Mel-28 resistente tratada apresenta 10 vezes mais células senescentes que a não tratada.

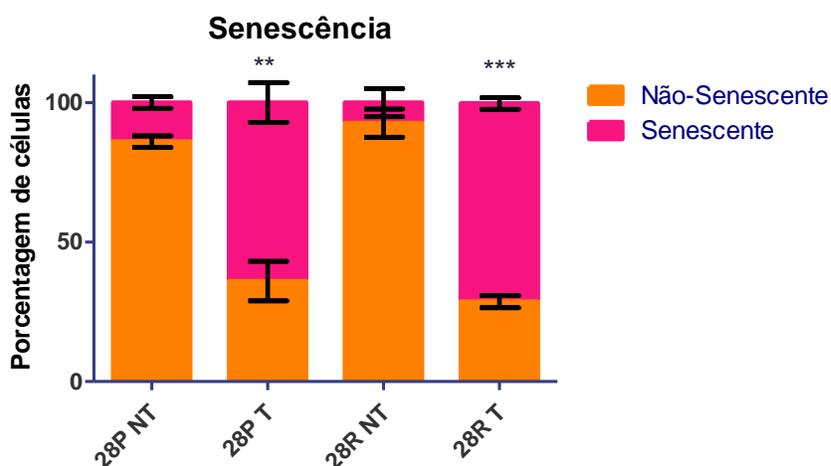


Figura 15. Gráfico com valores da porcentagem de células senescentes e não senescentes em cada grupo. Legenda: **28P NT** - Sk-Mel-28 parental não tratada, **28P T** - Sk-Mel-28 parental tratada, **28R NT** - Sk-Mel-28 resistente não tratada, **28R T** - Sk-Mel-28 resistente tratada. Os resultados da análise estatística 2way ANOVA mostraram uma diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados de cada linhagem. Legenda (**)= $P < 0,01$, (***)= $P < 0,001$.

4.5.2 PCR quantitativo para análise da expressão de genes relacionados as vias de senescência

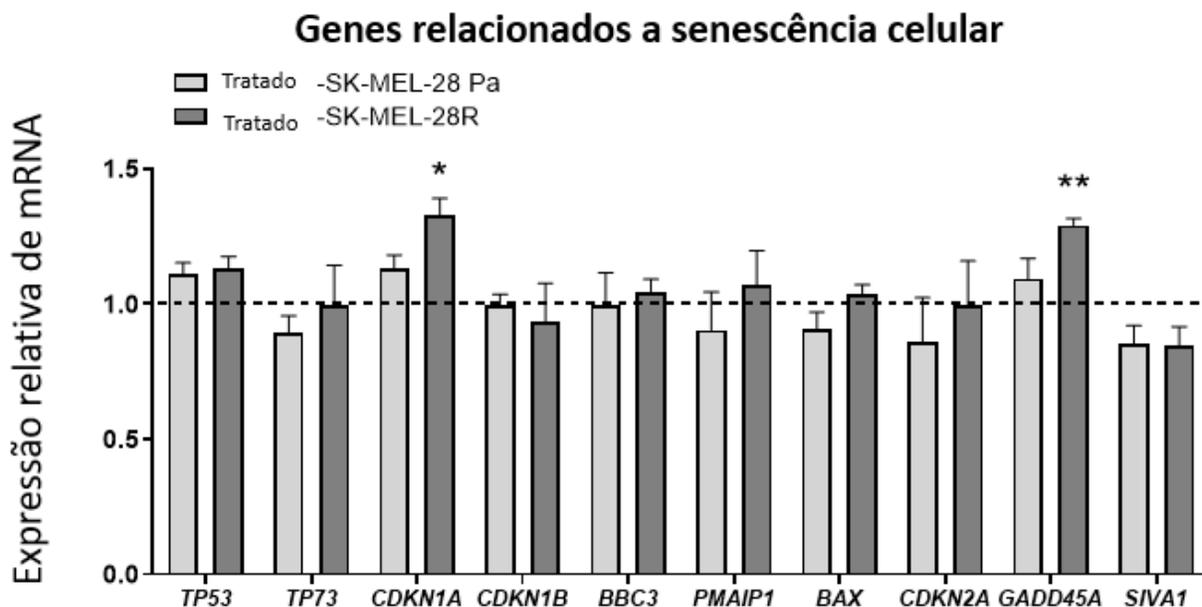


Figura 16. Gráfico que apresenta a expressão relativa de mRNA de genes relacionadas a vias de senescência. Observamos aumento estatístico significativo na expressão dos genes CDKN1A e GADD45A no grupo tratado da célula SK-Mel-28 resistente. Legenda: (*)= $P < 0,05$; (**)= $P < 0,01$.

Este ensaio foi realizado a fim de avaliarmos a expressão de genes relacionados a senescência celular nos grupos tratados e não tratados e reforçar os resultados obtidos no ensaio de coloração para β -galactosidase associada à senescência. Podemos observar na figura 16 um aumento estatístico significativo na expressão dos genes CDKN1A e GADD45A no grupo tratado da linhagem SK-Mel-28 resistente.

O gene CDKN1A é um gene cujo produto (p21) é um inibidor de quinase dependente de ciclina que bloqueia a progressão do ciclo celular. A p21 é uma proteína altamente elevada em células senescentes, assim como observado nas células Sk-Mel 28 resistentes tratadas com STX140. O gene GADD45A também está envolvido no processo de senescência celular em resposta a diversos estresses, induzindo a expressão de p21.

4.6 Quantificação de IL-6 e IL-8, por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

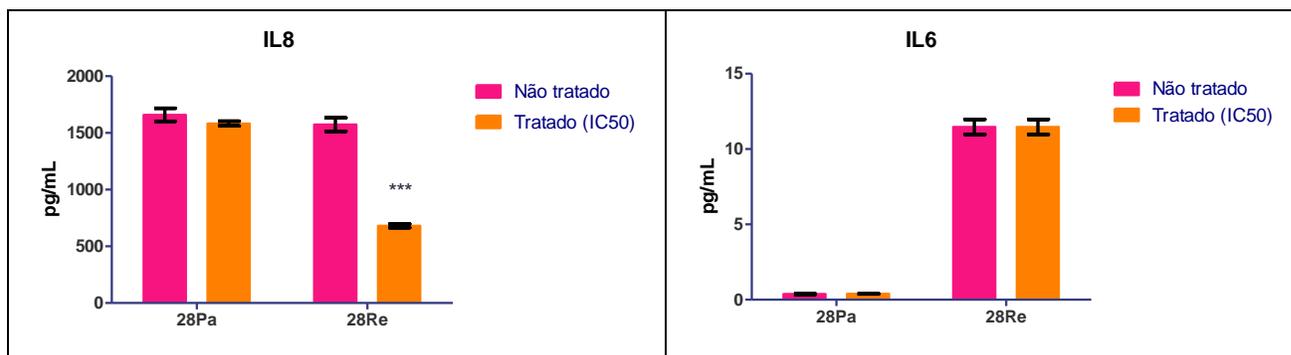


Figura 17. Gráfico que apresenta quantificação das interleucinas IL-8 e IL-6 através do ensaio ELISA, em células de melanoma não tratadas e tratadas com STX140 por 48h. Observa-se uma diminuição significativa de IL-8 nas células Sk-Mel-28 resistentes tratadas. Legenda: (***)= $P < 0,001$.

Este ensaio foi realizado a fim de quantificar as interleucinas pró-tumorais IL-6 e IL-8 em células de melanoma tratadas e não tratadas com STX140. Podemos observar na figura 17 que para a célula SK-Mel-28 Parental não há diferença na expressão das interleucinas no grupo tratado e não tratado. Porém, observa-se uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de IL-8 no grupo tratado da SK-Mel-28 Resistente. Na expressão de IL-6 não se observa diferença entre os grupos tratado e não tratado da linhagem resistente.

5. DISCUSSÃO

5.1 STX140 reduz viabilidade celular das linhagens de melanoma com baixas concentrações

O STX140, classificado como um bis-sulfamato esteroidal não estrogênico, mostrou em diversos estudos um potencial terapêutico antitumoral. Esse composto age rompendo o microtúbulo ao interagir com a tubulina o que acarreta na despolimerização do microtúbulo levando a parada do ciclo celular e apoptose (ANDRING, et al, 2019). Em modelos de ratos, o STX140 em administração oral superou o quimioterápico Paclitaxel– que também desintegra o microtúbulo – no tratamento de câncer de mama, reduzindo o tamanho do

tumor e impedindo a metástase sem apresentar neurotoxicidade (MEYER-LOSIC, et al, 2013). Também em outro estudo *in vivo* publicado na revista *Clinical Cancer Research*, o STX140 mostrou excelente eficácia quando administrado por via oral em ambos os modelos de xenoinxerto de câncer de mama MCF-7WT e MCF-7DOX, em contraste com Taxol e 2-Metoxiestradiol (NEWMAN, et al, 2008). Atualmente não há estudos clínicos com o STX140, porém o composto já mostrou resultados bem promissores em estudos pré-clínicos.

Com o ensaio de viabilidade celular – IC50 mostramos que o STX140 é capaz de reduzir a viabilidade das células de melanoma com concentrações a nM. *Massaro, et al*, apresentou em seu trabalho que o composto 2-Metoxiestradiol inibiu a proliferação de linhagens de melanoma. No ensaio para identificação do IC50, o valor para a linhagem SK-Mel-28 foi de 2,74 μ M para 3 dias de tratamento, 6,81 μ M para 5 dias e 4,41 μ M para 7 dias de tratamento. No nosso estudo o STX140, um composto análogo ao 2-ME, apresenta maior eficiência na redução da viabilidade das células de melanoma com concentrações menores de IC50 para 24 horas de tratamento (Tabela 2). Além disso, nesse ensaio observamos valores maiores de IC50 para células não tumorais – fibroblastos e melanócitos – o que sugere uma sensibilidade do melanoma ao STX140. Em um estudo feito com células de câncer de ovário, próstata e mama (FOSTER, *et al*, 2009) o STX140 inibiu a viabilidade tumoral com valores de IC50 de 280 nM, 260 nM e 250 nM respectivamente. Os valores corroboram com os apresentados no nosso trabalho, sendo que as linhagens de melanoma se mostraram mais sensíveis a ação do STX140 com valores menores de IC50.

No ensaio de formação de colônias observamos que o STX140 inibe a viabilidade celular e formação de colônias de células de melanoma. Em *Massaro et al* o composto 2-ME mostrou inibição da formação de colônias de linhagens de melanoma com concentrações a partir de 0,5 μ M (MASSARO, *et al*, 2017). No nosso trabalho, as células de melanoma se mostraram mais sensíveis ao STX140, que inibiu a formação de colônias com concentrações a partir de 50 nM. Além disso, podemos observar que a inibição das colônias pelo composto STX140 corresponde aos dados de IC50 das células – a linhagem A375R de menor IC50 (70nM) apresenta maior inibição da formação de suas colônias a partir de 50 nM, e a linhagem Sk-Mel-28 R apresenta menor inibição da formação de suas colônias, sendo a célula com maior IC50 para 24 horas de tratamento (112nM). Todas as linhagens tiveram a formação de colônias inibidas com a concentração de 200nM com 10 a 17 dias de tratamento. Os dados da figura 8 nos mostram uma diminuição da área ocupada pelas colônias em cada poço com o aumento da concentração de STX140 – correspondendo ao que observamos nas imagens desse ensaio (Figura 7). É também possível observar nesses

gráficos que os efeitos do STX140 são mais acentuados nas células de melanoma, principalmente na linhagem A375 resistente, coincidindo com os dados de IC50.

5.2 STX140 inibe a migração de células de melanoma sem induzir morte celular

No ensaio de migração celular (*in vitro scratch assay*) fica evidente que o STX140 inibe a migração das células de melanoma, não havendo fechamento da fenda nos grupos tratados. Com os resultados do ensaio de caracterização de morte celular por Anexina-FITC e PI, concluímos que a inibição da migração não é por indução de morte celular - já que o STX140 não induz morte celular (apoptose/necrose) de modo significativo nas células de melanoma. Esse resultado também colabora para a hipótese de que o STX140 induz senescência nessas células o que explicaria a inibição da migração celular no ensaio *in vitro scratch* e a baixa concentração de células apoptóticas no grupo tratado no ensaio de morte celular, pois estas podem estar em estado de senescência.

5.3 STX140 induz senescência em células de melanoma

No ensaio de ciclo celular submetemos às células a concentrações de STX140 na faixa dos IC50 de cada linhagem. No trabalho de *Massaro et al*, foi observada parada do ciclo celular em G2/M em linhagens submetidas 10 μ M de 2-ME – um valor maior que o IC50 das linhagens. Em outros trabalhos foram utilizados valores próximos ou acima do IC50 dos compostos estudados (CHEN, et al 2021). Nesse ensaio não houve diferença estatística entre os grupos tratados e não tratados, que apresentaram subpopulações predominantes em G0/G1. Esse dado reforça a hipótese de que o STX140 induz senescência nessas células, já que a célula senescente apresenta parada de ciclo celular em G0/G1.

No ensaio de coloração para β -galactosidase associada à senescência as células tratadas foram positivas para β -galactosidase, apresentando coloração azul e morfologia característica de célula senescente: morfologia achatada com núcleo proeminente e citoplasma espalhado. Esse marcador da atividade de β -galactosidase associada a senescência é amplamente aceito e usado, e cora o compartimento perinuclear em azul (EWALD, et al, 2010). Em complemento a esse ensaio, foi realizado PCR quantitativo para análise da expressão de genes relacionados as vias de senescência e como resultado tivemos um aumento significativo da expressão de CDKN1A e GADD45A, genes importantes envolvidos com o processo de senescência celular. GADD45 tem como produto proteínas

que inibem a proliferação em células tumorais e em resposta a diferentes estresses podem induzir senescência através da interação com p21 (ZHANG, YANG, LIU, 2014). CDKN1A tem como produto a proteína p21, um potente inibidor de quinase dependente de ciclina que bloqueia a progressão do ciclo celular sendo uma proteína altamente elevada em células senescentes (STIVALA, CAZZALINI, PROSPERI, 2012). Além disso, p21 faz parte de uma das principais vias de senescência que são supressoras de tumor: a via p53/p21.

5.4 STX140 diminui a secreção de IL-8, interleucina pró-tumoral, em células de melanoma resistente

A interleucina IL-8 é uma importante citocina que modula a proliferação celular no melanoma e também a migração celular através da degradação da matriz extra celular além de induzir a neovascularização, fatores importantes para o crescimento e metástase do melanoma (SINGH, VARNEY, 2000). Além disso, a expressão de IL-8 está associada com uma maior agressividade do tumor (SINGH, VARNEY, 2000).

A IL-8 é um fator angiogênico conhecido por ser superexpresso e envolvido na progressão do melanoma (KRAYMER, et al 2018). *Kraymer et al* mostrou que células de melanoma com mutação em BRAF como a SK-Mel- 28 apresentaram alta expressão de IL-8. Em seu trabalho ele afirma que essa citocina desempenha um papel importante na resistência a terapias direcionadas e imunoterapias.

Sanmamed et al em seu estudo mostra que alterações nos níveis séricos de interleucina-8 (IL-8) podem prever a resposta ao tratamento anti-PD-1 em pacientes com melanoma. Nesse trabalho vinte e nove pacientes com melanoma tratados com nivolumabe ou pembrolizumabe foram estudados - Em pacientes responsivos ao tratamento, os níveis séricos de IL-8 diminuíram significativamente e aumentaram significativamente após a progressão da doença. As diminuições nos níveis séricos de IL-8 foram associadas a uma sobrevida global mais longa no melanoma.

Nesse ensaio o composto STX140 diminuiu a secreção de IL-8 significativamente na linhagem de SK-Mel-28 resistente. Esse é um dado importante e que corrobora com os outros ensaios apresentados nesse trabalho, os quais mostram o potencial do STX140 no combate ao melanoma ao inibir viabilidade e migração celular, além de induzir senescência.

5.5 STX140 apresentou maior efeito nas linhagens resistentes

O composto, testado de forma inédita para melanoma, apresentou efeito mais acentuado em linhagens celulares com a mutação BRAF V600E que são resistentes ao vemurafenibe. Em um estudo importante feito para testar a eficácia do STX140 *in vitro* e *in vivo* em células de câncer de mama resistentes a taxano (NEWMAN, et al, 2008) o tratamento com o composto apresentou melhores resultados com as células resistentes – induzindo parada de ciclo celular e apoptose. Além disso, em um dos modelos xenográficos resistentes estudados, o STX140 induziu parada no crescimento e em outro modelo induziu a regressão do tumor. Esses resultados colaboram com os apresentados no presente trabalho: nos ensaios de senescência o composto apresentou melhores resultados com as células resistentes – No PCR quantitativo aumentou significativamente a expressão de genes das vias de senescência na linhagem 28R. No ensaio de ELISA, observamos uma diminuição importante de IL-8 uma interleucina pró-tumoral na linhagem resistente. O melanoma é uma neoplasia conhecida pela alta taxa de resistência ao tratamento – por isso o STX140 apresenta-se como um composto promissor que deve ser melhor explorado como um possível agente antitumoral no tratamento de células de melanoma resistentes a vemurafenib.

6. CONCLUSÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de inibidores direcionados a oncogenes e a imunoterapia revolucionaram os cuidados e melhoraram a sobrevida global dos pacientes com melanoma. Os inibidores seletivos direcionados aos principais efetores da via MAPK revolucionaram o tratamento de pacientes com melanoma metastático avançado com mutação BRAF. No entanto, a resistência à terapia é quase universal e continua sendo um grande desafio no atendimento clínico, com a maioria dos pacientes evoluindo à morte.

O composto STX140 mostrou ser um composto citostático que atuou inibindo a viabilidade e migração celular nas células de melanoma sem induzir morte celular significativa, apresentou um importante efeito que é a indução de senescência nessas células, também aumentando a expressão dos genes CDK1NA e GADD45A das vias de senescência. O composto também atuou diminuindo a secreção da interleucina pró-tumoral IL-8 em células resistentes – sendo que tais efeitos foram observados com concentrações consideravelmente baixas (em nM). Podemos concluir que o STX140 é um agente citostático

com potencial antitumoral em células de melanoma e com efeitos por ora mais acentuados nas células resistentes ao vemurafenibe em comparação com as células parentais, sendo este um atributo importante do composto que contribui para a superação da resistência.

7. REFERÊNCIAS

- ALI, Z. , *et al.* Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **EJC supplements : EJC : official journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer**, v.11, n.2, p.81-91, 2013.
- ANDRING, J. T., *et al.* 3,17 β -Bis-sulfamoyloxy-2-methoxyestra-1,3,5(10)-triene and Nonsteroidal Sulfamate Derivatives Inhibit Carbonic Anhydrase IX: Structure-Activity Optimization for Isoform Selectivity. **Journal of medicinal chemistry**, v.62, n.4, p.2202-2212, 2019.
- APLIN, A. E., KAPLAN, F. M., & SHAO, Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. **The Journal of investigative dermatology**, v.131, n.9, p.1817–1820, 2011.
- AYKUL, S., & MARTINEZ-HACKERT, E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. **Analytical biochemistry**, v.508, p.97-103, 2016.
- BARDIN, A., *et al.* Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. **Endocrine-related cancer**, v.11, n.3, p.537-51, 2004.
- BENNETT D. C., Genetics of melanoma progression: the rise and fall of cell senescence. **Pigment cell & melanoma research**, v. 29, n. 2, p.122–140, 2015.
- CHEN, C., *et al.* Neoisoliquiritin exerts tumor suppressive effects on prostate cancer by repressing androgen receptor activity. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v.85; Maio 2021.
- CIAŻYŃSKA, M., *et al.* The incidence and clinical analysis of non-melanoma skin cancer. **Scientific Reports**, v.11, n.1, p.4337, 2021.
- CORRIE, P., *et al.* Management of melanoma. **British medical bulletin**, v.111, n.1, p.149-62, 2014.
- DAVIES, H., *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v.417, n.6892, p.949-54, 2002.
- DAY, J. M., *et al.* BCRP expression does not result in resistance to STX140 *in vivo*, despite the increased expression of BCRP in A2780 cells *in vitro* after long-term STX140 exposure. **British journal of cancer**, v.100, n.3, p. 476-86, 2009.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., *et al.* Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. **Nature protocols**, v. 4, n.12, p.1798-806, 2009.

DE SIMONE, P., VALIANTE, M., SILIPO, V. Familial melanoma and multiple primary melanoma. **Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia**, v.152, n.3, p.262-265, 2017.

EWALD, J. A., *et al.* Therapy-Induced Senescence in Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.102, n.20, p.1536-46, 2010.

FAIÃO-FLORES, F., *et al.* Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. **Oncogene**, v.36, n. 13, p.1849–1861, 2017.

FANG, L., *et al.* p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. **Oncogene**, V.18, p.2789/2797,1999.

FEDERICI, C. *et al.* Lansoprazole and carbonic anhydrase IX inhibitors synergize against human melanoma cells. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, p.119–125, 2016.

FILIPP, F. V., *et al.* Frontiers in pigment cell and melanoma research. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v.31, n.6, p.728–735, 2018.

FOSTER, P. A., *et al.* A New Micronized Formulation of 2-Methoxyestradiolbis-sulfamate (STX140) is Therapeutically Potent against Breast Cancer. **Anticancer Research**, v.28, p.577-582, 2008.

FOSTER, P. A., *et al.* STX140 and STX641 Cause Apoptosis via the Intrinsic Mitochondrial Pathway and Down-regulate Survivin and XIAP Expression in Ovarian and Prostate Cancer Cells. **Anticancer Research**, v.29, n.10, p.3751-3758, 2009.

FRANKEN, N. A., *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n.5, p.2315-9, 2006.

GORJALA, P., GARY, R. K. Beryllium sulfate induces p21CDKN1A expression and a senescence-like cell cycle arrest in susceptible cancer cell types. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 23, n.6, p.1061–1073, 2010.

GRUBER, P., ZITO, P. M. Skin Cancer Book. **StatPearls**. 15 Nov 2021.

HOMET, B., RIBAS, A. New drug targets in metastatic melanoma. **The Journal of pathology**, v.232, n.2, p.134-41, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Câncer de pele melanoma - versão para profissionais de saúde**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>. Acesso em: 28 fev. 2022.

JOOSSE, A., *et al.* Superior outcome of women with stage I/II cutaneous melanoma: pooled analysis of four European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trials. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n.18, p.2240-7, 2012.

JOURDAN, F., *et al.* Synthesis, Antitubulin, and Antiproliferative SAR of Analogues of 2-Methoxyestradiol-3,17-O,O-bis-sulfamate. **Journal of medicinal chemistry**, v.53, n.7, p.2942–2951, 2010.

KIM, A., COHEN, M. S. The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. **Expert opinion on drug discovery**, v.11, n.9, p.907-916.

KRAYEM, M., *et al.* Acquired resistance to BRAFi reverses senescence-like phenotype in mutant BRAF melanoma. **Oncotarget**, v.9, n.61, p.31888-31903, 2018.

LEONARDI, G. C., *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International journal of oncology**, v. 52, n.4, p.1071–1080, 2018.

LIANG, C. C., PARK, A. Y., GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n.2, p.329-333, 2007.

MARZAGALLI, M., *et al.* Estrogen Receptor β Agonists Differentially Affect the Growth of Human Melanoma Cell Lines. **PLoS One**, v.10, n.7, 2015.

MARZAGALLI, M., *et al.* Estrogen Receptor β in Melanoma: From Molecular Insights to Potential Clinical Utility. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, p.140. 2016.

MASSARO, R. R., *et al.* Inhibition of proliferation and invasion in 2D and 3D models by 2-methoxyestradiol in human melanoma cells. **Pharmacological Research**, v.119, p.242–250, 2017.

MEYER-LOSIC, F., *et al.* STX140, but Not Paclitaxel, Inhibits Mammary Tumour Initiation and Progression in C3(1)/SV40 T/t-Antigen Transgenic Mice. **PLoS One**, v.8, n.12, 2013.

MITKOV, M., JOSEPH, R., COPLAND, J. Steroid hormone influence on melanoma genesis. **Molecular and cellular endocrinology**, v.417, p.94-102, 2015.

NEWMAN, S. P., *et al.* Inhibition of in vitro angiogenesis by 2-methoxy- and 2-ethylestrogen sulfamates. **International Journal of Cancer**, v.109, n.4, p.533 – 540, 2004.

NEWMAN, S. P., *et al.* STX140 Is Efficacious In vitro and In vivo in Taxane-Resistant Breast Carcinoma Cells. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v.14, n. 2, p.597-606, 2008.

OLIVEIRA, É. A., *et al.* Toxicogenomic and bioinformatics platforms to identify key molecular mechanisms of a curcumin-analogue DM-1 toxicity in melanoma cells. **Pharmacological research**, v.125, p.178–187, 2017.

- PASTOREKOVA, S., GILLIES, R. J. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 38, p.65–77, 2019.
- PATTON, E. E., *et al.* Melanoma models for the next generation of therapies. **Cancer Cell**, v. 39,5, p.610-631, 2021.
- PRASANNA, P. G., *et al.* Therapy-Induced Senescence: Opportunities to Improve Anticancer Therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v.113, n.10, p.1285-1298, 2021.
- QIAN, Y., & CHEN, X. Senescence regulation by the p53 protein family. **Methods in molecular biology**, v. 965, p.37-61, 2013.
- RASTRELLI, M. *et al.* Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. **In Vivo**, v.28, n.6, p.1005-11, 2014.
- RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C., *et al.* Advances in Immunotherapy for Melanoma: A Comprehensive Review. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.
- SANDRI, S., *et al.* Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. **Pharmacological research**, v.111, p.523-533, 2016.
- SANMAMED, M. F., *et al.* Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology**, v.28, n.8, p.1988-1995, 2017.
- SCHMIDT, A. N., *et al.* Oestrogen receptor-b expression in melanocytic lesions. **Experimental Dermatology**, v.15, p.971–980, 2006.
- SHAIN, A.H.; BASTIAN, B.C. From melanocytes to melanomas. **Nature reviews Cancer**, v.16: p. 345-358, 2016.
- SHARPLESS, N. E., SHERR, C. J.. Forging a signature of in vivo Senescence. **Nature Reviews**, v.15, n.7, p.397-408, 2015.
- SIEGEL, R. L., *et al.* Cancer statistics, 2022. **CA: a cancer journal for clinicians**, v.72, n.1, p.7–33. 2022.
- SINGH, R. K., VARNEY, M. L. IL-8 expression in malignant melanoma: implications in growth and metastasis. **Histology and histopathology**, v.15, n.3, p.843-849, 2000.
- STENGEL, C., *et al.* The in vitro and in vivo activity of the microtubule disruptor STX140 is mediated by Hif-1 alpha and CAIX expression. **Anticancer Research**, v.35, n.10, p.5249–5261, 2015.

STIVALA, L. A., CAZZALINI, O., PROSPERI, E. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21CDKN1A as a Target of AntiCancer Drugs. **Current cancer drug targets**, v.12, n.2, p.85-96, 2012.

TSAO, H., *et al.* Melanoma: from mutations to medicine. **Genes & development**, v.26, n.11, p.1131–1155, 2012.

UZDENSKY, A. B., DEMYANENKO, S. V., & BIBOV, M. Y. Signal transduction in human cutaneous melanoma and target drugs. **Current cancer drug targets**, v.13, n.8, p.843–66, 2013.

WILSON, M. A., SCHUCHTER, L. M. Chemotherapy for Melanoma. **Cancer treatment and research**, v.167, p.209-29, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. 2022. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 16 Abr 2022.

ZHANG, L., YANG, Z., LIU, Y. GADD45 proteins: roles in cellular senescence and tumor development. **Experimental biology and medicine**, v.239, n.7, p. 773-778, 2014.