

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Patologia

Bruna Mendes Lima

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CD44-ICD E A
INIBIÇÃO DE METALOPROTEINASES NA PROGRESSÃO
DE MELANOMAS: estudo *in vitro* e *in vivo***

Belo Horizonte

2025

Bruna Mendes Lima

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CD44-ICD E A
INIBIÇÃO DE METALOPROTEINASE NA PROGRESSÃO
DE MELANOMAS: estudo *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia – área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

Coorientadora: Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto

Belo Horizonte

2025

043

Lima, Bruna Mendes.

Relação entre a expressão de CD44-ICD e a inibição de metaloproteinases na progressão de melanomas: estudo in vitro e in vivo [manuscrito] / Bruna Mendes Lima. – 2025.

154 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira. Coorientadora: Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Melanoma. 3. Metástase Neoplásica. 4. Doxíciclina. I. Ferreira, Enio. II. Puerto, Helen Lima Del. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - ICB/UFMG

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 494 DE BRUNA MENDES LIMA

Realizou-se, no dia 17 de janeiro de 2025, às 14:00 horas, formato remoto, a defesa de Tese, intitulada *"Relação entre a Expressão de Cd44-lcd e a Inibição de Metaloproteínas na Progressão de Melanomas: Estudo in vitro e in vivo"*, apresentada por **Bruna Mendes Lima**, número de registro 2019752950, graduada no curso de Biomedicina, e como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Istéfani Luciene Dayse da Silva**, UFF/RJ; **Profa. Dra. Juliana de Oliveira Silva**, UNA/MG; **Profa. Dra. Karine Araujo Damasceno**, FIOCRUZ/BA; **Profa. Dra. Fabiana Alves**, Newton Paiva Wyden; **Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto**, ICB/UFMG – COORIENTADORA; **Prof. Dr. Enio Ferreira**, ICB/UFMG – ORIENTADOR.

A Comissão considerou a Tese:

(x) APROVADO

() REPROVADO

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 17 de janeiro de 2024.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Doutorado.



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira**, Professor do Magistério Superior, em 17/01/2025, às 18:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Oliveira Silva**, Usuária Externa, em 05/02/2025, às 12:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Alves**, Usuário Externo, em 05/02/2025, às 12:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto**, Membro de comissão, em 05/02/2025, às 13:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karine Araujo Damasceno**, Usuária Externa, em 05/02/2025, às 15:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Istéfani Luciene Dayse da Silva**, Usuária Externa, em 07/02/2025, às 20:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3880658 e o código CRC 90EF2418.



Este trabalho foi realizado no Laboratório do
Comportamento Celular do Departamento de
Patologia Geral – Instituto de Ciências
Biológicas / Universidade Federal de Minas
Gerais, com apoio financeiro do CNPq,
FAPEMIG e CAPES.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar só poderia agradecer a Deus. Ele permitiu minha entrada na pós-graduação e agora está permitindo a finalização de ciclo. Ele me sustentou nos momentos difíceis e permitiu a realização desse sonho.

Agradeço aos amores da minha vida: minhas avós Luzia e Meiry. Me deram amparo, amor incondicional, conselhos, abraços e sempre me incentivaram a seguir meus sonhos.

Aos meus pais Cristiane e Ricardo, por me mostrarem o caminho que devo seguir e quem quero ser. Aos meus irmãos Caio, Luiz e Átala, que sempre entendem meus momentos de ausência. Aos meus tios Ranussy e Marcelo, que são anjos na minha vida e sempre foram incentivadores e parceiros nessa trajetória acadêmica e na vida. Sou grata por tudo que fizeram e ainda fazem na minha vida. Sou abençoada por ter uma família gentil e amorosa que sempre me apoia e incentiva. Aos meus primos, especialmente minhas primas irmãs Brendda e Bianca, que muitas vezes me ancoram na realidade e estão sempre embarcando nas minhas loucuras. Marina e Helena que sempre estão dispostas a me ouvir falando e divagando sobre meus projetos, vocês duas desde crianças ouvindo meus delírios acadêmicos com paciência.

Aos meus orientadores Enio e Helen, vocês são fora da curva. Helen: gentil, acolhedora, professora encantadora e incrível, sempre tentando encaixar na sua agenda de mil tarefas um tempinho para auxiliar nas tarefas e objetivos que queremos seguir. Obrigada por ouvir e me ensinar a ser uma pesquisadora melhor. Enio, talvez a pessoa mais difícil de agradecer. Que privilégio poder tê-lo como orientador, acho que o universo não poderia ter mandado uma pessoa melhor. É maravilhoso saber que nesse mundo acadêmico exista uma pessoa como você: empática, sempre disposta a ouvir e conversar, aberta a novas ideias e loucuras dos alunos com direito a muitas risadas e deboches. Você é um professor que inspira e faz os alunos amarem a patologia e terem prazer de aprender, como pesquisador tem tanto conhecimento e discernimento do que vai dar certo ou não, não pensa duas vezes em ajudar e explicar mil vezes se necessário. Obrigada por me receber, acolher na pós e amparar nos diversos momentos difíceis que passei na maior parte do doutorado. Se consigo finalizar essa etapa agora é por sua ajuda, calma e empatia.

Aos meus amigos da vida Déborah, Jéssica, João Pedro e Ayeska, que sempre me tiram uma risada, me trazem a vida real e perdoam minhas frequentes ausências em suas vidas. Aos meus Amadinhos: Bárbara, Camila, Felipe, Thaís e Emerson (que me aguenta mais de 15 anos), que são os presentes desse ciclo da pós, sinônimos de amizade, companheirismo, inteligência, empatia e risadas. Vocês fizeram toda a diferença nesses quase 7 anos, me fizeram crescer como pessoa e pesquisadora.

Ao Laboratório do Comportamento Celular que em janeiro de 2018 passou a ser um local: bloco F3 e sala 312. Que orgulho tenho deste laboratório e de ter estado presente desde o início! Aos que passaram e deixaram sua marca e de certa forma uma mãozinha no meu trabalho: Istéfani, Vitor, Stella, Bhianca, Déborah, Renato, Flávia, Santuza, Isabella, Marina, Pedro Dias e Ana Paula. Ao Professor Geovanni Cassali, por emprestar o espaço do LPC para nos acomodar no começo do LCC, e também por nos permitir colaborações, proporcionar risadas, cafézinhos e ensinamentos da patologia.

A todos muita gratidão!

RESUMO

Melanoma é uma neoplasia altamente metastática, com comportamento agressivo, invasivo e alta resistência ao tratamento. Tem sido demonstrado durante sua progressão a importância do remodelamento da matriz extracelular (MEC) via metaloproteinases (MMPs), facilitando processos como a migração, invasão e formação de metástases. Nesse contexto, as MMPs interagem com moléculas de adesão, como o CD44 promovendo sua clivagem, gerando o domínio intracitoplasmático (ICD) que é translocado para o núcleo ativando transcrição de genes relacionados a migração, invasão e implantação tumoral. Consequentemente, se a clivagem puder ser impedida por inibidores de metaloproteinases, pode servir como possível alvo de inibição da progressão tumoral e metástase. Assim, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da inibição de metaloproteinases a partir do uso de doxíciclina, sobre a progressão de melanoma no modelo murino. Foram utilizadas células B16-F10 cultivadas sob condições normais e tratadas com 1, 5 e 10 μ M de doxíciclina por 24 e 48 horas. Foi avaliada a viabilidade pelo ensaio do MTT, seguido dos ensaios de migração, invasão, ciclo celular e zimografia. Para o ensaio *in vivo*, as células tratadas com as mesmas concentrações de doxíciclina foram inoculadas em camundongos C57BL/6, fêmeas, de 10 semanas, pela veia caudal. Após 21 dias os animais foram anestesiados e a função pulmonar avaliada por espirometria, posteriormente foram eutanasiados e o pulmão coletado para análise histopatológica e imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que a doxíciclina induziu aumento na viabilidade das células B16-F10, com resultados significativos em 24 horas e 48 horas no grupo que recebeu células tratadas com doxíciclina 10 μ M, comparado aos grupos controle e que recebeu células tratadas com doxíciclina 1 μ M ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente). A análise da capacidade gelatinolítica indicou redução da atividade da MMP-9 na concentração de 1 μ M em 24 horas e inibição na concentração 10 μ M em 24 e 48 horas ($p < 0,01$; $p < 0,001$ respectivamente). A análise da mecânica pulmonar revelou redução nos níveis de FVC, Cdyn e FEV100 nos animais que receberam células tratadas com 10 μ M quando comparados ao controle ($p < 0,05$). As áreas pulmonares afetadas por metástases nos animais que receberam células tratadas com 1 μ M e 10 μ M de doxíciclina foram maiores do que as dos animais do controle ($p < 0,05$). A imunohistoquímica revelou menor expressão de MMP-14 e CD44 em pulmões com implantes pulmonares de animais que receberam células tratadas com doxíciclina quando comparado ao controle ($p < 0,0001$), sem alterações relevantes na expressão de CD44-ICD ($p < 0,0001$) e diminuição na expressão de MMP-9. Além disso, observou-se relação entre índice proliferativo CDC47 e a área afetada por metástases ($r = 0,9505$; $p < 0,05$), além da expressão de MMP-9 e MMP-14 ($r = 0,7959$; $r = 0,814$ respectivamente, $p < 0,05$). Nossos dados sugerem que o tratamento *in vitro* de células B16-F10 com doxíciclina, considerado inibidor seletivo de metaloproteinases, aumenta a viabilidade celular *in vitro*, inibe a atividade gelatinolítica da MMP-9, além de promover, no modelo *in vivo*, redução da expressão de MMP-14 e CD44, sem alterações consideráveis da expressão de CD44-ICD e MMP-9, além de aumentar o desenvolvimento de metástases pulmonares, sem alteração considerável na proliferação celular, e reduzindo a função pulmonar em modelo experimental de células B16-F10.

Palavras-chave: melanoma; doxíciclina; progressão neoplásica; metástase pulmonar.

ABSTRACT

Melanoma is a highly metastatic neoplasm, with aggressive, invasive behavior and high resistance to treatment. During its progression, the importance of extracellular matrix remodeling via metalloproteinases has been demonstrated, facilitating processes such as migration, invasion and metastasis formation. Matrix metalloproteinases MMPs interact with adhesion molecules, such as CD44, promoting their cleavage, generating the intracytoplasmic domain (ICD) that is translocated to the nucleus, activating the transcription of genes related to migration, invasion and tumor implantation. Hence, the CD44 cleavage inhibition through metalloproteinase blockage, could function as a possible target for inhibition of tumor progression and metastasis. Thus, this work aimed to investigate the effects of metalloproteinase inhibition from the use of doxycycline on melanoma progression in the murine model. B16-F10 cells grown under normal conditions and treated with 1, 5 and 10 μM of doxycycline for 24 hours were used. Viability was evaluated by the MTT assay, followed by migration, invasion, cell cycle and zymography assays. For the *in vivo* assay, cells were treated and inoculated into 10-week-old female C57BL/6 mice via the tail vein. After 21 days, the animals were anesthetized and lung function was evaluated by spirometry, later they were euthanized and the lung collected for histopathological and immunohistochemical evaluation of metastases. The results to date showed that doxycycline induced an increase in the viability of B16-F10 cells, with significant results at 24 hours and 48 hours in the 10 μM treated group, compared to the control and 1 μM treated groups ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively). The analysis of gelatinolytic capacity indicated a reduction in MMP-9 activity at a concentration of 1 μM in 24 hours and inhibition at a concentration of 10 μM in 24 and 48 hours ($p < 0.01$; $p < 0.001$ respectively). The analysis of lung mechanics during the formation of metastases revealed a reduction in the levels of FVC, Cdyn and FEV100 in the groups treated with 10 μM when compared to the control ($p < 0.05$). The lung areas affected by metastases in the animals treated with 1 μM and 10 μM of doxycycline were larger than those of the control animals ($p < 0.05$). Immunohistochemistry revealed a lower expression of MMP-14 and CD44 in cases treated with doxycycline when compared to the control ($p < 0.0001$), with no relevant changes in the expression of CD44-ICD ($p < 0.0001$) and a decrease in the expression of MMP-9. Furthermore, a relationship was observed between the CDC47 proliferative index and the area affected by metastases ($r = 0.9505$; $p < 0.05$) and expression of MMP-9 and 14 ($r = 0.7959$; $r = 0.814$ respectively). Our data suggest that *in vitro* treatment of B16-F10 cells with doxycycline, considered a selective inhibitor of metalloproteinases, increases cell viability, inhibits the gelatinolytic activity of MMP-9, and promotes, in the *in vivo* model, a reduction in MMP-14 and CD44, without considerable changes in CD44-ICD and MMP-9, increases the development of lung metastases and reduces lung function in an experimental model of B16-F10 cells.

Keywords: melanoma; doxycycline; neoplastic progression; lung metastasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos domínios estruturais das metaloproteinases.....	30
Figura 2. Expressão, localização e atividade das MMPs na progressão do melanoma.....	35
Figura 3. Estrutura química da doxíciclina.....	38
Figura 4. Estrutura da proteína e gene CD44.....	40
Figura 5. Clivagem do CD44.....	43
Figura 6. Delineamento experimental dos grupos de inoculação tumoral.....	54
Figura 7. Padrão morfológico da linhagem B16-F10 após tratamento com doxíciclina por 48 horas.....	58
Figura 8. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratadas com doxíciclina e não tratada.....	59
Figura 9. Migração celular da linhagem B16-F10 tratadas com doxíciclina em diferentes tempos.....	60
Figura 10. Efeito dos tratamentos com doxíciclina após 24 e 48 horas sobre o ciclo celular em linhagem B16-F10.....	62
Figura 11. . Efeito do tratamento com doxíciclina sobre a atividade gelatinolítica da MMP-9.....	64
Figura 12. Avaliação da mecânica pulmonar após inoculação de células B16-F10 tratadas com 1 μ M, 5 μ M ou 10 μ M de doxíciclina em camundongos C57BL/6.....	67
Figura 13. Macroscopia de formação neoplásica de melanoma encontradas no pulmão de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10.....	69
Figura 14. Fragmento histológico de pulmão, em HE, de camundongos inoculados com células B16-F10, sem tratamento com doxíciclina.....	70
Figura 15. Fragmento histológico de pulmão, em HE, de camundongos inoculados com células B16-F10, tratadas com 1 μ M de doxíciclina.....	71
Figura 16. Fragmento histológico de pulmão, HE, de camundongos inoculados com células B16-F10, tratadas com 5 μ M de doxíciclina.....	72

Figura 17. Fragmento histológico de pulmão, HE, de camundongos inoculados com células B16-F10, tratadas com 10 µM de doxíciclina.....	73
Figura 18. Efeito dos tratamentos com doxíciclina sobre a implantação pulmonar de células B16-F10 em camundongos C57BL/6.....	75
Figura 19. Expressão imunohistoquímica de CD44 em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.....	78
Figura 20. Expressão imunohistoquímica de CD44-ICD em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.....	80
Figura 21. Expressão imunohistoquímica de MMP-9 em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.....	82
Figura 22. Expressão imunohistoquímica de MMP-14 em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.....	84
Figura 23. Expressão imunohistoquímica de CDC47 em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.....	86
Figura 24. Carta de aprovação do CEUA/UFMG.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaios <i>in vitro</i> realizados com as respectivas placas utilizadas e densidade celular.....	49
Tabela 2. Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação do anticorpo primário, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário para imunohistoquímica.....	56
Tabela 3. Frequências das análises imunohistoquímicas das amostras tumorais incluídas no estudo para CD44, CD44-ICD, MMP-9 e MMP-14.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC: Do inglês *American Joint Committee on Cancer*

AKT: Proteína Quinase B

ATP: Adenosina Trifosfato

ATCC: Do inglês *American Type Culture Collection*

BRAF: Quinase Citoplasmática de Serina/Treonina da Família RAF

B16-F10: Linhagem Celular de Melanoma Humano

Ca²⁺: Cálcio

CDKN2: Inibidor de Cinase Dependente de Ciclina 2

Cdyn: Complacência Dinâmica

CD44: Do inglês *Cluster of Differentiation 44*

CETEA/CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

cm: Centímetro

CO₂: Gás Carbônico

CSC: Do inglês *Cancer Stem Cells*

DAB: 3.3'-Diaminobenzidina

DEPC: Dietil Pirocarbonato

DMEM: Do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DP: Desvio Padrão

ECD: Domínio Extracelular

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico

ERK: Quinase Regulada por Sinais Extracelulares

EUA: Estado Unidos da América

FAK: Quinase de Adesão Focal

FDA: Do inglês *Food and Drug Administration*

FEV100: Volume Expiratório Forçado

FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos

FVC: Capacidade Vital Forçada

g: Grama

GTPase: Enzima hidrolase de GTP

HE: Hematoxilina-Eosina

HFS: Solução Fluorocrômica Hipotônica

HGF: Fator de Crescimento de Hepatócito

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

IC: Capacidade Inspiratória

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ICD: Domínio Intracitoplasmático

IL: Interleucina

INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

kg: Quilograma

KIT: Proto-Oncogene, Receptor Tirosina Quinase

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MEC: Matriz Extracelular

MEK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

mg: Miligrama

MHC I: Complexo Principal de Histocompatibilidade I

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: milímetros

MMP: Metaloproteinase

mRNA: RNA Mensageiro

mtDNA: DNA Mitocondrial

MT-MMP: Metaloproteinase Ligada à Membrana

MTT: 3-(4,5-dimethylthi-azol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

nm: Nanômetro

NRAS: Quinase pertencente à família RAS

NOTCH1: Proteína Homóloga de Entalhe do Locus Neurogênico 1

OCT-4: Fator de Transcrição de Ligação ao Octâmero 4

PBS: Tampão Fosfato-Salino

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

pH: Potencial Hidrogeniônico

PI: Iodeto de Propídeo

PI3K: Fosfoinosítídeo 3-Quinases

PKC: Proteína Quinase C

PTEN: Fosfatase Homóloga à Tensina

RAF: Quinases Citoplasmáticas de Serina/Treonina

RANKL: Ativador de Receptores do Fator Nuclear Kappa-Beta Ligante

RAS: Família de GTPases

RI: Resistência Pulmonar

RNA: Ácido Ribonucleico

rpm: Rotações por minuto

rRNA: RNA Ribossômico

RTK: Receptor Tirosina-Quinase

RUNX2: Fator de Transcrição 2 Relacionado à Runt

SFB: Soro Fetal Bovino

SOX2: SRY (sex determining region Y)-box 2

TEM: Transição Epitelial-Mesenquimal

TERT: Transcriptase Reversa da Telomerase

TGF- β : Fator de Crescimento Transformador

TIMP: Inibidores Teciduais das Metaloproteinases

TM: Transmembrana

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral

tRNA: RNA Transportador

TRP2: Proteína 2 Relacionada à Tirosinase

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

UV: Ultravioleta

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Zn²⁺: Zinco

μ M: Micromolar

μ m: Micrômetro

μ L: Microlitro

%: Por cento

° C: Grau Celsius

3D: 3 Dimensões

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Melanoma	21
2.1.1 Definição e Epidemiologia	21
2.1.2 Fatores de risco e Etiopatogênese.....	22
2.1.3 Caracterização Histopatológica e Clínica.....	24
2.2 Modelos Para Estudo do Melanoma.....	26
2.3 Metaloproteinases.....	28
2.3.1 Características Gerais.....	28
2.3.2 Metaloproteinases e Câncer.....	31
2.3.3 Metaloproteinases no Melanoma.....	34
2.3.4 Fármacos inibidores de Metaloproteinases	36
2.4 O Receptor Hialurônico – CD44.....	39
2.4.1 Características Gerais.....	39
2.4.2 Interação com Ligantes.....	42
2.4.3 CD44 e Câncer.....	44
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	46
4. OBJETIVOS.....	47
4.1 Objetivo Geral.....	47
4.2 Objetivos Específicos.....	47
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
5.1 Cultivo Celular.....	48
5.2 Plaqueamento da Linhagem B16-F10.....	48

5.3 Tratamento com Doxíciclina.....	49
5.4 Avaliação da Citotoxicidade e Viabilidade Celular.....	49
5.5 Ensaio de Migração.....	50
5.6 Ensaio de Invasão.....	51
5.7 Avaliação do Ciclo Celular.....	51
5.8 Zimografia.....	52
5.9 Aspectos Éticos do Protocolo <i>in vivo</i>	52
5.10 Avaliação <i>in vivo</i> de Implante Pulmonar de Células B16-F10.....	53
5.11 Análise da Função Pulmonar Por Espirometria.....	54
5.12 Análise Histopatológica dos Pulmões.....	55
5.13 Imunohistoquímica.....	55
5.14 Avaliação da Imunohistoquímica.....	56
5.15 Análise Estatística.....	57
6. RESULTADOS.....	57
6.1 Viabilidade Celular e Citotoxicidade Após Tratamento com Doxíciclina.....	57
6.2 Capacidade Migratória da Linhagem B16-F10 Após Tratamento com Doxíciclina.....	59
6.3 Efeito do Tratamento Com Doxíciclina Sobre o Ciclo Celular.....	61
6.4 Efeito do Tratamento Com Doxíciclina Sobre a Atividade das Metaloproteinases.....	63
6.5 Efeito do Tratamento Com Doxíciclina Sobre a Função Pulmonar.....	65
6.6 Efeito do Tratamento das Células B16-F10 com Doxíciclina Sobre a Implantação Pulmonar nos Camundongos C57BL/6.....	68
6.7 Efeito da Inoculação de Células B16-F10 Tratadas com Doxíciclina Sobre a Implantação Pulmonar de Células B16-F10 em Camundongos C57BL/6.....	74

6.8 Efeito do Tratamento com Doxíciclina Sobre a Expressão Proteica de CD44, CD44-ICD, MMP-9, MMP-14 e CDC47.....	75
7. DISCUSSÃO.....	88
8. CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXOS.....	107
Anexo A - Aprovação Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG).....	107
Anexo B - Produção Científica.....	108

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia decorrente da transformação maligna dos melanócitos da epiderme, trato uveal dos olhos, cóclea e folículos capilares (ARRANGOIZ et al., 2016). Sua incidência tem aumentado nas últimas décadas e apesar de ser menos frequente do que outras neoplasias de pele, apresenta letalidade mais elevada devido a sua característica invasiva, com alta proliferação celular e forte habilidade de disseminação metastática (RASTRELLI et al., 2014), causando mais que 75% das mortes por câncer de pele em humanos (ARRANGOIZ et al., 2016).

Na homeostase tecidual normal, a interação das proteases e seus inibidores naturais mantém um equilíbrio proteolítico. Na progressão neoplásica, no entanto, esse equilíbrio é perturbado pela superexpressão de proteases e diminuição da expressão de seus inibidores, desse modo o compartimento não-celular é alterado e ativa efetores que levam ao estabelecimento de um meio permissivo para o desenvolvimento tumoral, invasão e disseminação (NOE, JOST & MAQUOI, 2008).

A progressão tumoral em melanomas está diretamente vinculada à expressão de proteínas envolvidas na transição epitelial-mesenquimal e expressão de metaloproteinases. Ocorre proliferação desordenada dos melanócitos, perda de características epiteliais, degradação da membrana basal e MEC, com consequente migração e invasão de tecidos adjacentes (ARRANGOIZ et al., 2016). Sendo a degradação e remodelamento da MEC e membrana basal por enzimas proteolíticas - as metaloproteinases -, essenciais nesse processo.

Já foi demonstrado que as MMPs interagem com moléculas de adesão como caderinas e CD44, facilitando a interação com moléculas presentes na superfície das células vizinhas ou na MEC (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). Especificamente a interação com o CD44 é importante para os processos de invasão, metastização e implantação. O CD44 pode ser sequencialmente clivado pela MMP-14 produzindo fragmento do domínio intracelular (ICD) que é translocado para o núcleo, ativando a transcrição de várias proteínas incluindo o próprio CD44 e de MMP-9 com consequente aumento na regulação do seu gene. Além disso, sua translocação para o núcleo inicia o processo de regulação transcricional de vários genes como NOTCH1 e RANKL, que estão envolvidos na invasão tumoral (MILETTI-GONZÁLEZ

et al., 2012).

Baseado nisso, diversos inibidores de MMPs estão sendo testados e desenvolvidos. A Doxíciclina, um antibiótico da família das tetraciclina, tem despertado interesse por apresentar propriedade antineoplásica (BAHRAMI et al., 2012). Esse fármaco inibe de modo não-seletivo a atividade das MMPs e seu mecanismo está relacionado a sua capacidade de se ligar ao Ca^{2+} associado à pró-enzima e alterar a conformação da MMP (SMITH et al., 1999; ROK et al., 2020).

Devido a relevância clínica e recursos terapêuticos ineficazes ou controversos no melanoma, faz-se necessários estudos que aprofundem a elucidação da progressão tumoral e de fatores que contribuem para a sua agressividade, visando o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas e melhor manejo dos pacientes. Portanto, destaca-se a importância da compreensão acerca da complexidade da relação da clivagem do CD44 com a atividade de metaloproteinases em neoplasias, principalmente correlacionando a sua regulação com o impacto de protocolos de inibição de MMPs na progressão tumoral do melanoma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MELANOMA

2.1.1 Definição e Epidemiologia

O melanoma é uma neoplasia caracterizada pela malignização dos melanócitos (ALI et al., 2013; FERLAY et al., 2010), células produtoras de melanina que podem ser encontradas na epiderme, cóclea e folículos capilares (SCHATTON et al., 2008). Embriologicamente, os melanócitos derivam de células pluripotentes da crista neural e durante o desenvolvimento fetal migram por toda a epiderme, e outros locais contendo pigmentos extra-cutâneos, como os olhos, meninges, esôfago e membranas mucosas (SCHADENDORF et al., 2015).

Por derivarem de uma linhagem de células pluripotentes os melanócitos apresentam características importantes de autorrenovação e migração, o que se hipotetiza ser uma das razões pelas quais o melanoma é extremamente agressivo e metastático (MORT, JACKSON & PATTON, 2015). Na epiderme, localizam-se na camada basal e interagem com os queratinócitos presentes na razão de 1:5, sendo que por meio dos dendritos cada melanócito pode interagir com 30 a 40 queratinócitos das camadas superiores da epiderme (HAASS & HERLYN, 2005). A ruptura da homeostase da associação íntima entre melanócitos e queratinócitos basais pode desencadear uma proliferação contínua dos melanócitos, o que pode levar ao desenvolvimento do melanoma (HAASS, SMALLEY & HERLYN, 2004).

Cânceres de pele representam uma das neoplasias com maior incidência global, em ambos os sexos (BRAY et al., 2018). E embora o melanoma represente o câncer de pele com menor frequência, sua incidência mundial tem aumentado anualmente a uma taxa mais rápida em comparação com qualquer outro tipo de neoplasia (ALI, YOUSAF & LARKIN, 2013).

Entre os cânceres de pele, o melanoma é conhecido por ser o mais agressivo, com alta taxa de metástase e de mortalidade (MILLER e MIHM, 2006; FERLAY, 2010), possuindo atualmente as maiores taxas de crescimento e de acometimento dentre outras neoplasias (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023).

O melanoma é o décimo sétimo tipo de tipo de câncer mais comum no mundo, com mais de 320 mil casos diagnosticados e a causa de mais de 57.000 óbitos no mundo em 2020, com

estimativa para 2040 de 500 mil novos diagnósticos (GLOBOCAN, 2022). No Brasil em 2022, foram registrados 8.980 novos casos e taxa de mortalidade de 1.832 casos (INCA, 2022).

Sua incidência varia muito entre os países e estes diferentes padrões são atribuídos a variações raciais, fenótipos da pele, bem como diferenças na exposição ao sol (RASTRELLI et al., 2014). Além disso, está sujeita a grandes áreas geográficas e variações étnicas, sendo as populações residentes próximas à linha do equador as que apresentam maior incidência (SCHERER & KUMAR, 2010; GLOBOCAN, 2022). É cerca de 20 vezes maior a incidência em indivíduos brancos em relação à indivíduos afrodescendentes, com risco de desenvolvimento de 2,5% para brancos, 0,5% para hispânicos e 0,1% afrodescendentes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Globalmente, as taxas de incidência de melanoma cutâneo variam até 100 vezes entre diferentes populações, com as maiores taxas em todo o mundo sendo relatada na Austrália e Nova Zelândia, onde a taxa de incidência chega a aproximadamente 60 casos a cada 100.000 habitantes por ano. Já na Europa, a taxa é de aproximadamente 20 casos a cada 100.000 habitantes por ano, enquanto nos Estados Unidos uma taxa de 30 casos por 100.000 habitantes. Em comparação, as taxas de incidência em populações de pele escura da África e da Ásia são de aproximadamente 1 caso a cada 100.000 habitantes por ano (ERDMANN, et al., 2013; SCHADENDORF et al., 2015; GLOBOCAN, 2022).

Ao contrário do que observado em outros tumores sólidos, o melanoma afeta principalmente indivíduos de meia-idade, com idade mediana de diagnóstico aos 57 anos. Além disso, a incidência aumenta linearmente após os 25 anos até a idade de 50 anos, quando observa-se uma redução da sua incidência, particularmente no sexo feminino (RASTRELLI et al., 2014). As mulheres jovens têm frequência 1,7 vezes maior do que em comparação com os homens antes dos 39 anos, assim como é 2,2 vezes maior em homens que em mulheres com mais de 70 anos de idade (LITTLE, EIDE, 2012), e especificamente o risco de desenvolver melanoma ao longo de sua vida é 1,5 vezes maior quando comparado às mulheres (RASTRELLI et al., 2014).

2.1.2) Fatores de Risco e Etiopatogênese

O maior fator de risco para o desenvolvimento de melanoma é a exposição intermitente à radiação ultravioleta (UV), especialmente quando associados a fatores endógenos, tais como

fototipos de pele I (pele muito clara, sempre queima, nunca bronzeia) e II (pele clara, sempre queima e algumas vezes bronzeia), com presença de características como olhos azuis, verdes, cabelos loiros, ruivos e presença de sardas, além da predisposição genética do indivíduo (FITZPATRICK, 1988; LEBOIT et al., 2006; INCA, 2015).

Exposição ao sol em indivíduos geneticamente suscetíveis, principalmente durante a infância e adolescência induz a formação de nevos melanocíticos que muitas vezes estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento de melanoma. Já foi demonstrado que indivíduos com mais de 100 nevos melanocíticos possuem um risco sete vezes maior de desenvolvimento de melanoma ao longo da vida (GANDINI et al., 2005). Aliado a isso, a presença de nevos melanocíticos atípicos com mudança de forma, assimetria e irregularidade são um fator de risco adicional (BONNIOL et al., 2012).

Dentre todos os tumores humanos, o melanoma é considerado o que carrega a maior carga mutacional, com número médio de mais de 10 mutações por megabase de DNA, e ainda abriga um número altíssimo de mutações como as transições Citosina > Timina ou Guanina > Timina, que são induzidas por exposição aos raios solares UVB e UVA respectivamente, e conhecidas como “assinatura UV” (HODIS et al., 2012; ALEXANDROV et al., 2013). Por essa razão a exposição solar é considerada o principal fator ligado a carcinogênese do melanoma.

Concomitante a exposição à radiação UV, alterações genéticas também têm sido associadas ao melanoma, complicando a ideia de que é exclusivamente dependente de UV. Tendo como exemplo, o desenvolvimento em órgãos não expostos ao sol ou em órgãos internos, e que a maioria das mutações na cascata MAPK, envolvida na proliferação celular e que atualmente é a via de maior relevância oncogênica e terapêutica para o melanoma, não é atribuída diretamente a danos por UV (HODIS et al., 2012; BASTIAN, 2014).

A via MAPK/ERK ou via das proteínas quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinais extracelulares, envolvida na proliferação celular, frequentemente encontra-se alterada no melanoma. A ativação de mutações dentro dessa via pode levar à perda do controle de feedback negativo e, por sua vez, à ativação excessiva da própria via, levando à proliferação celular descontrolada. Na via, a ligação de uma molécula de sinalização extracelular, como os fatores de crescimento, a receptores de tirosina-quinase (RTKs) promove a ativação de GTPases da família RAS através da ligação com o GTP. A RAS ativada interage com as quinases

citoplasmáticas de serina/treonina da família RAF, promovendo a fosforilação e dimerização da RAF, que passa então a ter atividade quinase e fosforila proteínas quinase da família MEK. A MEK ativada por sua vez, estimula indiretamente por meio da indução da fosforilação de ERK, a expressão de genes que promovem a proliferação celular (GRIEWANK et al., 2014; DANKNER et al., 2018).

As principais mutações observadas em melanomas ocorrem nos proto-oncogenes BRAF e NRAS e no gene supressor de tumor NF1 (NOONAN et al., 2012; AKBANI et al., 2015; SCHADENDORF et al., 2018). De acordo com o *Catalog Of Somatic Mutations In Cancer* (COSMIC), as mutações mais frequentemente observadas no melanoma são as que afetam o BRAF (44%), NRAS (17%), TERT (25%), CDKN2A (18%), KIT (8%), NF1 (17%) e PTEN (10%) (TATE et al., 2019). Em particular, mutações em BRAF ocorrem em cerca de 50% dos melanomas (ZEHIR et al., 2017) e podem ser classificadas em BRAFV600 e BRAFnonV600 (DANKNER et al., 2018). Em 90% dos casos, esta mutação é representada pela mutação BRAFV600E onde a valina 600 é substituída pelo ácido glutâmico (p.V600E) que leva à superexpressão e hiperativação de BRAF. As mutações BRAFV600E e NRAS estão relacionadas a ativação da parte final da cascata de sinalização MAPK/ERK mesmo na ausência da ligação de fatores de crescimento à célula, o que induz a regulação positiva de genes envolvidos na sobrevivência e proliferação de células neoplásicas (GARNETT & MARAIS, 2004; MUÑOZ-COUSELO et al., 2017).

2.1.3) Caracterização Histopatológica e Clínica

A progressão do melanoma cutâneo inicia-se com uma proliferação controlada de melanócitos normais originando um nevo benigno, o nevo melanocítico comum adquirido. A evolução continua com uma proliferação anormal dos melanócitos em um nevo pré-existente ou em um novo local, resultando em uma lesão pré-maligna com atipia citológica aleatória, denominado como nevos atípicos/displásicos. Essas lesões aparecem como máculas planas, de tamanho superior a cinco milímetros, com bordas irregulares e pigmentação variável. Com o tempo, os melanócitos adquirem a capacidade de proliferar horizontalmente na epiderme (crescimento radial) e histologicamente mostram atipia contínua (melanoma *in situ*). Algumas células podem invadir a derme papilar e numerosos eventos de adesão celular e interação com a matriz da membrana basal auxiliam na proliferação vertical dessas células na derme como um nódulo em expansão com potencial metastático (crescimento vertical). Com essa progressão, melanócitos

malignos podem se disseminar para outras áreas do corpo, primeiramente para os nódulos linfáticos e depois para a pele, tecido mole subcutâneo, pulmões e cérebro (SCHADENDORF et al., 2015). A metástase ocorre como um evento tardio, no entanto, a disseminação metastática também pode ser iniciada mais precocemente, mesmo durante a formação do tumor primário, levando ao modelo de progressão metastática paralela (DAMSKY, THEODOSAKIS & BOSENBERG, 2014).

Mais de 90% dos melanomas são encontrados na pele e 4% são descobertos como metástases sem identificação do sítio primário (ARRANGOIZ et al., 2016). Além disso, apresenta heterogeneidade histológica, oferecendo um maior desafio para o seu diagnóstico por apresentar diferentes subtipos (SMOLLER, 2006). Dentre os subtipos destaca-se: lentigo maligno melanoma, melanoma de espalhamento superficial, melanoma nodular e melanoma lentiginoso acral, que se diferem em comportamentos clínicos e epidemiológicos (SCHADENDORF et al., 2015).

Histologicamente os melanomas são identificados por ninhos de melanócitos na derme e/ou epiderme, variando de tamanho, forma e distribuição, com células de citoplasma abundante, núcleos alongados ou ovalados e nucléolos evidentes apresentando padrão celular fusiforme e/ou epitelióide (GOLDSCHMIDT et al., 1998).

Pode ser observada ainda em camadas da epiderme superiores a basal a presença de melanócitos neoplásicos, configurando o crescimento pagetoide. A presença de fibras colágenas entremeando as células neoplásicas, a desmoplasia, também pode ser observada, principalmente nos casos de morfologia fusiforme. Em casos de crescimento vertical, a massa de células neoplásicas pode comprometer camadas mais profundas, como a derme reticular e hipoderme (KIBBI, KLUGER & CHOI, 2016).

Os dois principais parâmetros prognósticos para avaliação do melanoma são os níveis de Clark e o índice de Breslow. Os níveis de Clark são definidos de acordo com as camadas da pele acometidas pela lesão, sendo o nível I: crescimento intraepidérmico; nível II: invasão da derme papilar; nível III: comprometimento da junção derme papilar/derme reticular; nível IV: invasão da derme reticular; nível V: invasão do tecido subcutâneo (CLARK et al., 1969). O índice de Breslow proposto em 1970, é definido a partir da mensuração, em milímetros, da distância entre a camada granulosa da epiderme ou em caso de úlcera da célula mais superficial até a célula

neoplásica mais profunda (BRESLOW, 1970), parâmetro que se correlaciona com os níveis de Clark. Atualmente o índice de Breslow é mais utilizado, sendo o nível de Clark adotado apenas em tumores com espessura menor que 1mm (BALCH et al., 2001).

Além da classificação histológica e parâmetros de Clark e Breslow outra importante ferramenta para avaliação prognóstica é o estadiamento clinicopatológico segundo o sistema TNM, padronizado pelo *American Joint Commission on Cancer* (AJCC). Nele T determina o tamanho da neoplasia e ainda a presença ou ausência de úlceras, que se faz importante visto que a sobrevida de pacientes com tumores ulcerados é semelhante à de pacientes com tumores não ulcerados em um estadio acima no que se refere ao tamanho da lesão (IN 'T HOUT et al., 2012). N determina as metástases regionais e a sua carga tumoral e M determina as metástases à distância (PAYETTE et al., 2009; SITUM et al., 2014; GERSHENWALD et al., 2017).

2.2) MODELOS PARA ESTUDO DO MELANOMA

O melanoma tem grande importância devido a sua alta agressividade, elevado índice metastático e baixa resposta terapêutica, fazendo com que as modalidades tradicionais de tratamento para estágios mais avançados apresentem resultados insatisfatórios (CAINI et al., 2009; FERLAY et al., 2008). Nesse contexto foram desenvolvidos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* tanto para auxiliar na compreensão e elucidação da biologia tumoral, quanto para avaliação da eficácia de fármacos com potencial antineoplásico.

Estudos *in vivo* são importantes para observação de eventos como iniciação tumoral e da progressão com invasão do tecido adjacente, além da resposta inflamatória e imunológica local, angiogênese e disseminação metastática, eventos de difícil avaliação *in vitro* (POTÉZ, et al., 2014).

Muitos modelos de melanoma foram desenvolvidos: como xenoenxertos, derivados de tumores humanos; modelos singênicos que são derivados de tumores geneticamente idênticos; tumores induzidos por carcinógeno ou exposição UV e os chamados modelos geneticamente modificados que apresentam superexpressão de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor (FIDLER & KRIPKE, 1977; GIOVANELLA, et al., 1978; BERKELHAMMER et al., 1982; LARUE & BEERMANN, 2007; FAIRCHILD & CARSON, 2011).

Modelos singênicos com desenvolvimento espontâneo têm sido utilizados com diferentes tipos de melanoma, como o Cloudman S91 em camundongos DBA/2, o Harding-Passey em BALB/c e melanoma B16 em camundongos C57BL/6 (POTÉZ, et al., 2014). Esses modelos datam da década de 1950 e sua utilidade é reconhecida para avaliação do comportamento do melanoma e metástase. Também possui benefícios importantes sobre aqueles modelos que usam camundongos imunocomprometidos, pois permite a interação de células de neoplásicas com células T e B competentes encontradas naturalmente no microambiente (TEICHER, 2010; MCKINNEY & HOLMEN, 2011).

A linhagem B16 é o principal modelo singênico de melanoma utilizado atualmente (KUZU et al., 2015). Essa linhagem obtida por Fidler em 1973 a partir da coleta de células de um tumor subcutâneo primário de camundongo C57BL/6, dá origem a um espectro diversificado de subclones com várias propensões para proliferação, invasão e metástase (FIDLER, 1973). Dois subclones bem estabelecidos da linhagem B16 obtidos a partir de passagem *in vivo*, incluem as variantes B16-F1 e B16-F10. A B16-F1 é caracterizada por baixo potencial metastático e, importante em estudos de crescimento do tumor primário. Em contrapartida a F10 tem alto potencial metastático para órgãos viscerais distantes, principalmente os pulmões, com padrão de crescimento rápido e mortalidade induzida pelo tumor entre duas e quatro semanas (FIDLER, 1973; FIDLER, 1978).

Essa linhagem expressa baixos níveis de moléculas de MHC I e altos níveis de antígenos associados ao melanoma humano, como gp100 ou TRP2, que são conhecidos alvos imunoterapêuticos (KUZU et al., 2015). Foi demonstrado que a vacinação de camundongos com o epítipo TRP2 induz uma resposta imune que inibe o crescimento de B16-F10 e protege o camundongo de metástase pulmonar e parcialmente da formação do tumor (MANSOUR et al., 2007; KUZU et al., 2015).

Além disso, apresenta mutações inativadoras em CDKN2A que é responsável pelos inibidores de quinase dependentes de ciclina, como p16^{INK4a} e p19^{Arf}, e poucas mutações ativadoras em BRAF, mutação que ocorre em pelo menos 60% dos tumores (MELNIKOVA et al., 2004).

O modelo de melanoma B16 geralmente envolve 2 tipos de “transplantes”: o primeiro é espontâneo, por via intradérmica ou subcutânea na pata do C57/BL6, e é necessária a ressecção do tumor primário para a formação de metástases distantes. O segundo é artificial e via intravascular, por meio de injeção na veia caudal lateral, e resulta em metástases pulmonares

(BOBEK et al., 2010). Apesar do modelo de metástases espontâneas apresentar maior similaridade com a clínica, o modelo de metástases experimentais é mais utilizado devido à sua maior reprodutibilidade e menor tempo necessário para desenvolvimento de metástases (NAKAMURA et al., 2002).

2.3) METALOPROTEINASES

2.3.1) Características Gerais

Metaloproteinases de matriz são enzimas pertencentes à família de endopeptidases, zinco-dependentes, secretadas como pró-enzimas e por uma variedade de células, tais como mesenquimais, fibroblastos, queratinócitos, polimorfonucleares, macrófagos e tumorais. Têm como função mais estudada a degradação de componentes da matriz extracelular (MEC), especificamente proteoglicanos, glicoproteínas e colágenos da membrana basal (CUI, HU & KHALIL, 2017).

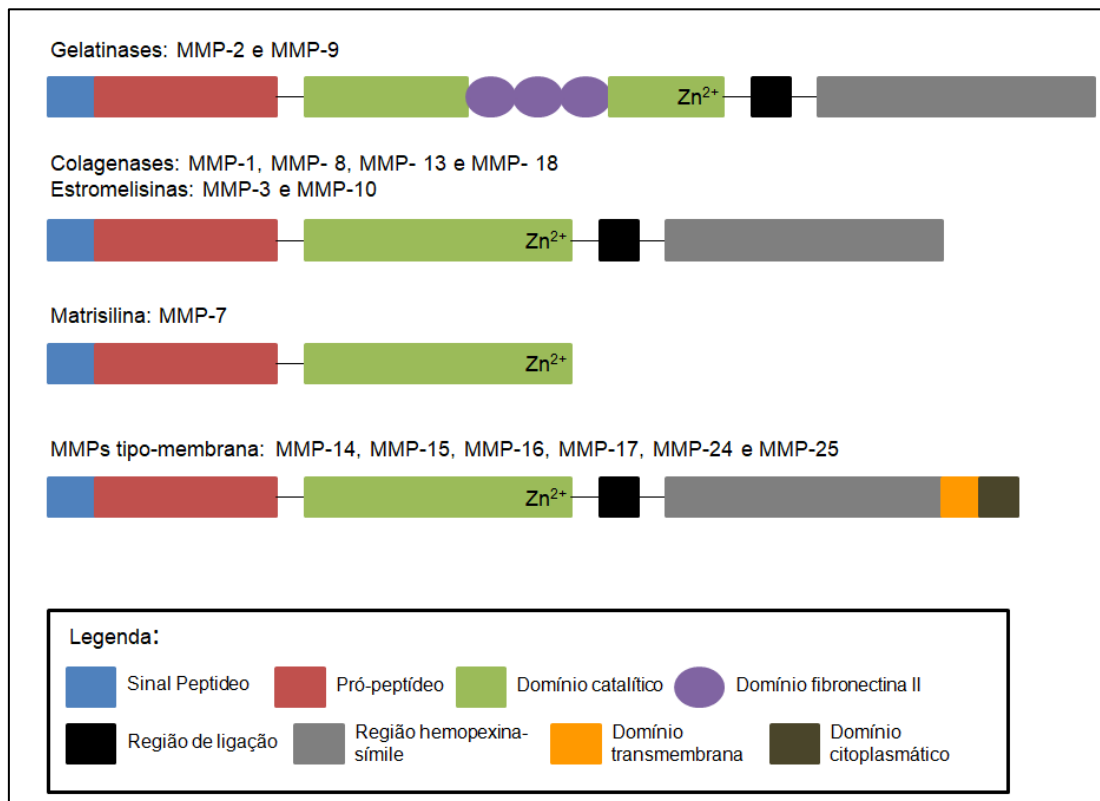
Essas enzimas estão envolvidas em processos fisiológicos como fertilização, implantação embrionária, embriogênese, morfogênese e diferenciação e em processos patológicos tais como inflamação, cicatrização, artrite, fibrose hepática, enfisema, aterosclerose e neoplasias (AMĂLINEI et al., 2010). Suas ativações são dependentes de ligação com um íon de metal como Zn^{2+} ou Ca^{2+} em seus sítios de ativação, sendo que para o funcionamento adequado é necessária a ligação de Ca^{2+} para manter a conformação da molécula, e de Zn^{2+} ligado ao sítio ativo da enzima (JABŁON'SKA-TRYPUC' et al., 2016).

Existem mais de 28 metaloproteinases descritas, e de acordo com sua estrutura, especificidade do substrato e localização celular, podem ser divididas em cinco grupos: collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-7, MMP-10 e MMP-11), tipo membranas (MT-MMP-1 a MT-MMP-6) e matrilisinases (MMP-12, MMP-18, MMP-19 até MMP-26) (ARAUJO et al., 2011). As MT-MMPs são ligadas covalentemente à membrana celular, enquanto as MMPs secretadas (collagenases, gelatinases, estromelisinases e matrilisinases), localizam-se na superfície celular através da ligação com integrinas ou interação com proteoglicanas e colágeno tipo IV (JABŁON'SKA-TRYPUC' et al., 2016; Gonzalez-Avila et al., 2019).

As metaloproteinases apresentam várias características em comum. Todas contêm zinco na região ativada unida à sequência conservada de aminoácidos HEXXHXXGXXHXXXXXXXXM, onde H é uma histidina, E corresponde ao ácido glutâmico, X representa um aminoácido variável e M é uma metionina. Estruturalmente, são constituídas por um pró-domínio, com aproximadamente 80 aminoácidos, responsável por manter a latência enzimática das pró-MMPs, um domínio catalítico, composto de aproximadamente 170 aminoácidos, e um domínio C-terminal semelhante à hemopexina com cerca de 210 aminoácidos. Além desses, as metaloproteinases tipo-membrana possuem um domínio transmembrana (YADAV et al., 2014).

A figura 1 apresenta os domínios estruturais das principais metaloproteinases. Estruturalmente, as duas gelatinases MMP-2 e MMP-9 possuem um adicional domínio de fibronectina tipo II, que é inserida entre o domínio catalítico e o domínio do sítio ativo. Já as seis MMPs de tipo-membrana (MMP-14 a 17 e MMP-24 e 25) possuem um domínio transmembrana adjacente ao domínio C-terminal e um domínio intracelular (HOFMANN et al., 2000; YADAV et al., 2014).

Figura 1. Representação esquemática dos domínios estruturais das metaloproteinases



Fonte: Adaptado de HOFMANN et al., 2000.

Dentro da célula ocorre a síntese das MMPs, iniciando-se com o mRNA especificando uma sequência de sinal hidrofóbica (sinal peptídeo) que tipicamente contém de 18 a 30 aminoácidos, e essa região é cortada durante a passagem da pró-enzima ao meio extracelular. O domínio pró-peptídeo estende-se do N-terminal criado após a remoção do sinal peptídeo até o começo do domínio catalítico em um comprimento de 80 aminoácidos. O resíduo de cisteína da sequência conservada PRCGVPD fica posicionado de forma diretamente oposta ao Zn^{2+} no centro ativo, e a remoção desse resíduo ativa a pró-enzima. Uma vez que a MMP está parcialmente ativa, ela remove autocataliticamente seu pró-peptídeo obtendo atividade enzimática completa (GONZALEZ-AVILA et al., 2019).

O domínio fibronectina II apresenta 58 resíduos em três repetições e é responsável pela especificidade da ação colagenolítica. O domínio catalítico por sua vez, apresenta cerca de 170 aminoácidos com o centro ativo catalítico com 50-54 resíduos C-terminais. Notavelmente, o domínio catalítico requer 2 ou 3 íons de cálcio para sua atividade enzimática adequada

(GONZALEZ-AVILA et al., 2019). A região de ligação liga a região hemopexina-símile com o domínio catalítico, e a região hemopexina-símile possui aproximadamente de 210 resíduos e determina substratos e inibidores de cada MMP (VISSE & NAGASI, 2003; JABŁON'SKA-TRYPUC' et al., 2016).

A atividade biológica das MMPs é regulada ao nível de transcrição gênica, modulação da meia-vida do mRNA, regulação da secreção pelas células, ativação da forma pró-enzimática, inibição de enzimas cataliticamente ativas e inibição de ativação enzimática (YADAV et al., 2014). Além disso, sua expressão é mantida nos tecidos em um nível basal constante.

A regulação da transcrição no nível celular está sob a influência de fatores de crescimento, citocinas, hormônios, interações como célula-célula e célula-MEC, e de fatores físicos como radiação UV. Por sua vez, a ativação e inibição de MMPs é baseada em uma cascata de processos altamente controlados. Dentre os fatores que aumentam sua expressão pode-se destacar: citocinas inflamatórias como IL-1 e 6, TNF- α , hormônios e fatores de crescimento como TGF- β , EGF e PDGF (HRABEC et al., 2007; JABŁON'SKA-TRYPUC' et al., 2016).

Podem ser ativadas diretamente pela ação de proteases como plasmina e elastase, e por outras MMPs: como MMP-1, -2, -8, -9 e principalmente pelas do tipo membrana (MT-MMPs). Como inibidores de MMPs pode-se incluir: corticosteróides, ácido retinóico, heparina, e IL-4. As propriedades proteolíticas das MMPs são controladas durante a ativação das pró-enzimas catalíticas inativas (pró-MMP) pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Esses inibidores são glicoproteínas, constituída por quatro membros, TIMP-1, -2, -3 e -4, que inibem de forma seletiva, reversível, não covalente e com estequiometria molecular na razão 1:1 (JACKSON et al., 2017). Podem inibir as formas ativas de MMPs e o processo de ativação ou conversão de pró-MMP em MMP ativada, já sua expressão é regulada por citocinas e fatores de crescimento (HRABEC et al., 2007).

2.3.2) Metaloproteinases e Câncer

A MEC é composta principalmente por proteínas fibrosas como o colágeno e elastina, e glicoproteínas incluindo a fibronectina, proteoglicanos e laminina (MOUW et al., 2014). Destaca-se seu papel na regulação da homeostase celular e na regulação das interações célula-célula. Mudanças na sua regulação leva a mudanças morfológicas e estruturais, que são eventos

chave no crescimento tumoral e na migração celular favorecendo processo como a perda de adesão celular (WALKER & MOJARES, 2018).

De fato, a interação entre célula-MEC é mediada por diversos receptores e moléculas secretoras, capazes não apenas de regular a migração celular, mas também a modulação da expressão de genes envolvidos no crescimento célula e diferenciação (POLTAVETS et al., 2018). Neste contexto, vários estudos têm demonstrado que as interações célula-MEC regulam os processos que estão relacionados a diferenciação celular, homeostase celular, processos de cicatrização e invasão neoplásica (WATT & FUJIWARA, 2011; XUE & JACKSON, 2011; POLTAVETS et al., 2018). Especificamente em neoplasias, tem-se evidenciado que as interações das células tumorais com as proteínas da MEC desempenham papel fundamental no desenvolvimento e na progressão do tumor (LIN & YUN, 2010; JABŁON'SKA-TRYPUC' et al., 2016).

Por exemplo, quando a MEC não é muito rígida, as células neoplásicas usam o tipo de migração amebóide, no qual se movem através de caminhos pré-existentes na MEC gerados por células estromais que degradam os componentes da MEC (YAMAGUCHI & SAKAI, 2015). Assim, a forma e a motilidade das células neoplásicas dependem da contratilidade celular e da rigidez, alinhamento, porosidade e geometria da MEC. Por sua vez, as interações das células neoplásicas com os colágenos tipo I e tipo III favorecem o deslocamento mesenquimal, enquanto o contato com o colágeno tipo IV induz a migração amebóide (GONZALEZ-AVILA et al., 2019).

As MMPs foram inicialmente associadas somente a formação de metástases por serem responsáveis pela degradação das barreiras físicas da MEC. No entanto, atualmente já é sabido que exercem múltiplas funções biológicas em todos os estágios do câncer, desde o início até o desenvolvimento de metástases (NOEL, JOST & MAQUOI, 2008; NAPOLI et al., 2020). Atuam na degradação dos componentes da MEC através da sua atividade proteolítica, auxiliam no crescimento do tumor primário e na metástase por meio do intravasamento de células tumorais nos vasos sanguíneos e subsequente extravasamento, e estabelecimento em um nicho metastático distante (ROY et al., 2020). Interessantemente são sintetizadas pelas células neoplásicas em quantidades pequenas. Entretanto, conseguem aumentar essa expressão de maneira parácrina, por meio da secreção de interleucinas (IL), interferon e fatores de crescimento que atuam estimulando as células hospedeiras vizinhas a produzir as MMPs necessárias (NOEL, JOST & MAQUOI, 2008).

A degradação da MEC por diferentes membros da família MMP além de remover as “barreiras físicas” para o tumor em crescimento, também favorece a liberação de moléculas biologicamente ativas que afetam o comportamento celular (UNGEFROREN et al., 2011). Atuam influenciando o crescimento tumoral por diversos mecanismos, dentre eles a modulação da biodisponibilidade de fatores de crescimento, uma vez que muitos em sua forma inativa estão presentes na MEC; e regulação indireta de sinais proliferativos por moléculas de adesão. Por exemplo, a expressão e atividade regulada positivamente de MMP/ADAM levam ao aumento da eliminação de ligantes ativos de EGFR e à ativação de quinases de EGFR, resultando em proliferação descontrolada, migração e sobrevivência celular (ROY et al., 2020).

Também interagem com moléculas de adesão, dentre elas as caderinas e integrinas. Essas por sua vez, pertencem a um grupo de receptores de superfície celular que interagem especificamente com as moléculas presentes na superfície das células vizinhas ou na MEC. Os receptores nas superfícies celulares pertencem a cinco classes principais: caderina, integrina, superfamília de imunoglobulinas, selectinas e receptores hialurônicos (CD44) (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010; ROY et al., 2020).

O CD44 por exemplo, exerce um papel importante pelas células neoplásicas a apresentarem em níveis aumentados e em diversas isoformas. Interessantemente, os receptores CD44 ligam-se à MMP-9 em suas superfícies, e o complexo resultante está envolvido na degradação do colágeno tipo IV. A ativação de MMP-9 com CD44 causa alterações na capacidade invasiva e na angiogênese. Em contraste, a MMP-14 está envolvida na clivagem do CD44, e desse modo auxilia na promoção da migração celular (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010; MEDRANO-GONZÁLEZ et al., 2021).

Em suma, a migração e invasão estromal de células tumorais, bem como a formação de metástases, é um processo complexo que envolve o destacamento de células neoplásicas do tumor primário, rompimento da membrana basal, invasão do tecido adjacente, intravasamento para a circulação linfática ou sanguínea e, finalmente, extravasamento para órgãos distantes para formar um segundo tumor. A degradação e remodelamento da MEC e membrana basal por enzimas proteolíticas são essenciais nesse processo (WINER, ADAMS & MIGNATTI, 2018).

2.3.3) *Metaloproteinases no Melanoma*

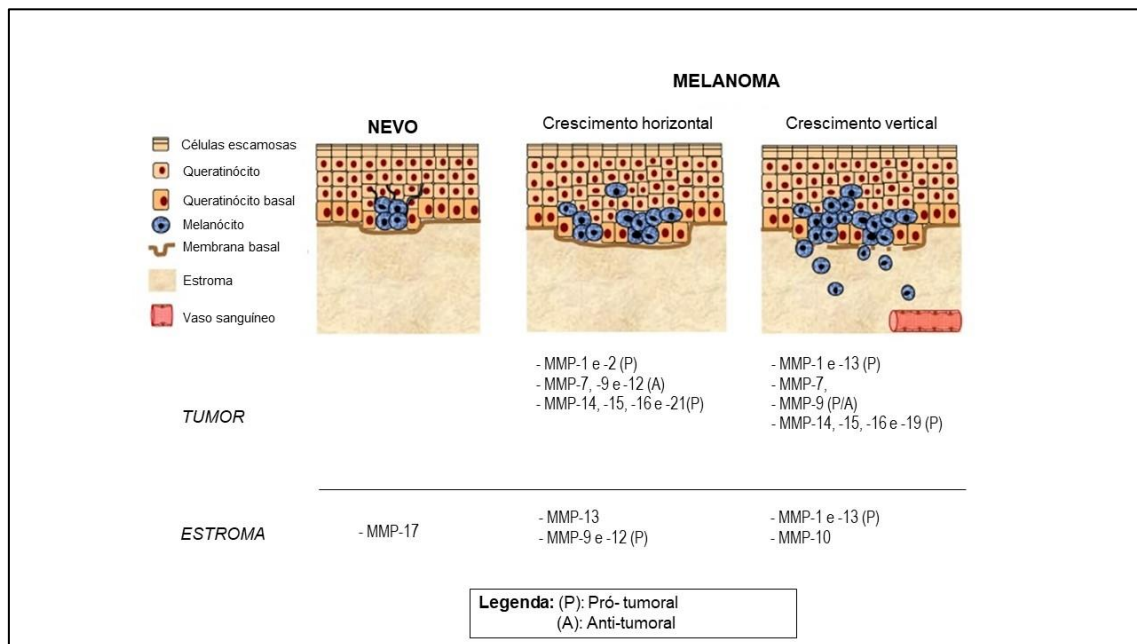
Uma vez que os melanócitos se transformam malignamente, o tumor primário inicialmente cresce horizontalmente dentro da epiderme e então começa a aumentar e invadir os níveis mais profundos da derme, caracterizando a fase de crescimento vertical. Nessas etapas ocorre de modo contínuo uma comunicação e interação das células neoplásicas com o epitélio vizinho, células estromais e inflamatórias (GAGGIOLI & SAHAI, 2007; MORO et al., 2014).

No melanoma já é demonstrado que a proteólise nos compartimentos pericelular e estromal estão envolvidos na alteração do microambiente tumoral, exercendo então papel fundamental na sua promoção e progressão da invasão. Diversas famílias de proteases estão envolvidas nestes processos, destacando-se o papel das MMPs (MORO et al., 2014).

Em um dos principais estudos relacionando as metaloproteinases com o melanoma humano, Hofmann e colaboradores demonstraram que tanto as células tumorais quanto as estromais associadas ao tumor apresentam expressão aumentada de várias MMPs, bem como de seus inibidores teciduais, os TIMPs (HOFMANN et al., 2000).

Embora o papel das MMPs no melanoma permaneça controverso por se apresentarem com atividade pró-tumoral ou como anti-tumoral (HOFMANN et al., 2000; MORO et al., 2014; NAPOLI et al., 2020), frequentemente encontram-se superexpressas no tumor ou estroma, tanto em nevos como nas fases de crescimento horizontal e vertical. Ainda se encontram associadas a estágios avançados do tumor, casos mais invasivos, agressivos e de pior prognóstico (HOFMANN et al., 2000; MORO et al., 2014). A figura 2 demonstra a expressão, localização e atividade das MMPs na progressão do melanoma.

Figura 2. Expressão, localização e atividade das MMPs na progressão do melanoma



Fonte: Adaptado de MORO et al., 2014.

As gelatinases A e B, MMP-2 e MMP-9 respectivamente, desempenham papel fundamental na degradação da MEC, favorecendo a invasão para os tecidos adjacentes até a formação de metástases à distância (GUARNERI et al., 2017; LEONARDI et al., 2018). Estudos demonstraram que a regulação positiva de MMP-9 é estritamente influenciada por várias alterações genéticas ou modificações do microambiente tumoral (ZHAO & BENVENISTE, 2008; BERA et al., 2013; NAPOLI et al., 2020). Ademais, são observadas em áreas periféricas dos tumores e relacionadas a clivagem do colágeno tipo I e fibronectina, desse modo agem promovendo a adesão e migração (KURCHAT et al., 2002; JIAO et al., 2012).

A MMP-9 não apenas medeia a degradação da MEC, mas também está envolvida na neoangiogênese, migração celular e formação de metástases (KESSENBROCK, PLAKS & WERB, 2010). Dado comprovado, uma vez que fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), são ativados quando a MMP-9 degrada a MEC (KESSENBROCK, PLAKS & WERB, 2010; NAPOLI et al., 2020).

Muitas vias moleculares, incluindo a MAPK e PI3K/AKT, estão associadas à regulação de MMP-9. Desregulações nessas vias podem levar a uma superexpressão aberrante de várias proteínas inflamatórias e, conseqüentemente, ao aumento da expressão de várias proteases da MEC, como a própria MMP-9 (FALZONE et al., 2016).

As collagenases, MMP-1 e -13, são expressas durante a fase de crescimento vertical, sendo sua expressão maior quando o tumor começa a invadir os tecidos circundantes. Além disso, há evidências crescentes de que a expressão de MMP-13 no estroma circundante desempenha um papel importante no crescimento tumoral (MORO et al., 2014).

A MMP-14 foi a primeira MMP do tipo de membrana descrita por Sato e colaboradores, e sua localização foi vista principalmente no *front* tumoral (SATO et al., 1994; KURSCHAT et al., 2002; JIAO et al., 2012). Curiosamente, geralmente são observadas a expressão conjunta de MMP-2 no estroma e de MMP-14 no *front* tumoral, isso pode ser explicado pela ativação de MMP-2 pela MMP-14, destacando desse modo, a ação coordenada para promover a progressão do tumor (SATO & TAKINO, 2010). Clinicamente pode ser relacionada como fator prognóstico, pois sua expressão está altamente associada à progressão, metástase e pior prognóstico (KONDRATIEV et al., 2008).

2.3.4) Fármacos Inibidoras de Metaloproteinases

Dadas as evidências robustas experimentais e clínicas associando as MMPs com a progressão tumoral e pior prognóstico, desde a década de 1980 inibidores de têm sido desenvolvidos e testados (CATHCART, CAO & BROOK, 2015).

De acordo com a literatura, existem três estratégias principais de inibição das MMPs: ao nível transcricional, ativação e inibição. Ao nível da transcrição, a inibição pode ser realizada por interferência de fatores extracelulares, como por exemplo com o interferon e bloqueando vias de transdução de sinal, como via MAPK ou ERK (FOLGUERAS et al., 2004; GONZALEZ-AVILA et al., 2019). Ao nível de ativação sabe-se que são secretadas como zimogênios inativos, e o objetivo é que continuem sem serem ativadas, esse é o motivo pelo qual os anticorpos monoclonais são considerados efetivos. A terceira estratégia é a de inibição uma vez, que quando ativadas podem ser inibidas por fatores exógenos e endógenos, como os TIMPs (VIHINEN & KAHARI, 2002; JABŁON'SKA-TRYPUC' et al., 2016).

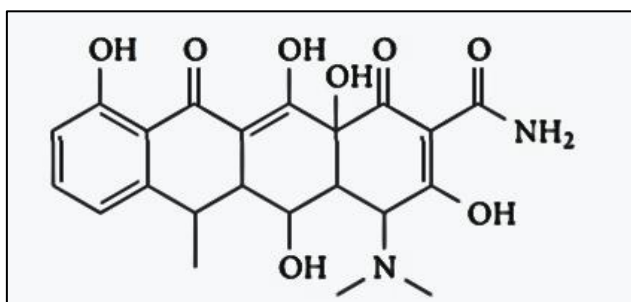
Os inibidores podem ser divididos em dois grupos principais: naturais, como os TIMPs por exemplo; e os sintéticos. Alguns inibidores sintéticos selecionados estão em ensaios clínicos em humanos, como por exemplo: peptídeos sintéticos, moléculas não peptídicas, tetraciclinas quimicamente modificadas e bifosfonatos. Inibidores sintéticos por sua vez, podem ser divididos em 2 grupos: os peptidomiméticos e os não-peptidomiméticos (YAN et al., 2009; GIALELI, THEOCHARIS & KARAMANOS, 2011).

Os peptidomiméticos são derivados pseudopeptídicos que atuam como inibidores competitivos que inibem a atividade das MMPs principalmente pela interação com íons Zn^{2+} localizados em sítios catalíticos da enzima. Um dos primeiros medicamentos dessa classe que entrou na fase de ensaio clínico foi o Batimastat (YAN et al., 2009).

O segundo grupo são os não-peptidomiméticos, possuem alta especificidade, pois esses são baseados na conformação 3D do sítio ativo da MMP. Essa categoria compreende Prinomastat, Tanomastat e tetraciclinas quimicamente modificadas, como a Minociclina e Doxíciclina (SAPADIN & FLEISCHMAJER, 2006; CHAUDHARY et al., 2010). Possuem a capacidade de inibir a atividade enzimática das MMPs ligando-se aos íons zinco e cálcio, interferindo na ativação das formas latentes das MMPs e reduzindo sua transcrição (GONZALEZ-AVILA et al., 2019).

Doxíciclina faz parte do grupo das tetraciclinas, antibióticos amplamente utilizados desde a sua invenção em 1948 (GRIFFIN et al., 2010). Esses antibióticos devem sua popularidade a uma série de propriedades benéficas, como: amplo espectro de ação contra bactérias gram positivas e gram negativas, boa tolerância e propriedades farmacocinéticas favoráveis (BORGHI & PALMA, 2014). A figura 3 demonstra sua estrutura química.

Figura 3. Estrutura química da doxiciclina



Fonte: VANDENBROUCKE & LIBERT, 2014.

Seu efeito está ligado a interrupção da síntese de proteínas, por meio da sua ligação com o rRNA 16S na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, consequentemente impedindo a ligação do aminoacil tRNA ao sítio A (CHUKWUDI, 2016). Além dos efeitos antibióticos bem conhecidos, a literatura já demonstra propriedades não antibióticas importantes: efeitos anti-inflamatórios, imunossuppressores e antineoplásicos (BAHRAMI et al., 2012). Dentre suas funções não antibióticas destaca-se a capacidade de inibir de modo não-seletivo a atividade das metaloproteinases, mas também sua síntese, bloquear a atividade das MMPs maduras, interferir na hidrólise e na ativação das pró-MMPs, reduzir a expressão da protease e proteção da degradação proteolítica e oxidativa (YANG et al., 2016).

Atualmente é o único inibidor das MMPs que foi aprovado para uso pelo *Food and Drug Administration* (FDA) no tratamento da periodontite, em dose sub-antibiótica, na qual estão envolvidas MMP-7 e MMP-8 (CATON & RYAN, 2011; ROK et al., 2020).

O possível efeito antineoplásico da doxiciclina despertou muito interesse em sua compreensão, nesse âmbito Sun e colaboradores em 2009 demonstraram que o fármaco tem a capacidade de inibir a adesão e migração, e além disso, também foi capaz de afetar o crescimento, proliferação e induzir a apoptose em linhagem de melanoma (SUN et al., 2009; ROK et al., 2020). Os mecanismos moleculares da ação antineoplásica ainda não são totalmente esclarecidos, todavia, até o momento tem sido comprovado a associação com a inibição da ativação das MMPs (SMITH et al., 1999; SUN et al., 2009; VANDENBROUCKE & LIBERT, 2014; ROK et al., 2020).

Inicialmente acreditava-se que o mecanismo pelo qual as tetraciclina inibem a atividade das MMPs, era pela sua capacidade de quelar Ca^{2+} e Zn^{2+} (GOLUB et al., 1984; ARSENIS et al., 1990). Entretanto, dois estudos robustos de Smith e colaboradores avaliaram como as variações na estrutura influenciaria a sensibilidade de uma determinada MMP à inibição pela doxíciclina. Os dados demonstraram que o inibidor de fato se liga ao Ca^{2+} associado à enzima e altera a conformação da MMP. E ainda mostraram que seria improvável que o fármaco removesse o Ca^{2+} , e ainda, que se a interação envolvesse a ligação com Zn^{2+} no sítio ativo, a atividade de MMP seria inibida independentemente da natureza do substrato (SMITH, BRANDT & HASTY, 1996; SMITH et al., 1999).

Ademais, ainda explicam que se a doxíciclina se ligasse ao Zn^{2+} no sítio ativo uma inibição competitiva seria esperada, pois a ligação só poderia ocorrer com a enzima livre. Além disso, se a interação envolvesse a remoção Zn^{2+} , a inibição não seria reversível. A inibição não competitiva observada, é consistente com mecanismos que envolvem a ligação entre o inibidor e a enzima e/ou o inibidor e o complexo enzima-substrato, resultando em mudanças conformacionais na enzima (SORSA et al., 1994; SMITH et al., 1999). A doxíciclina inibe com alta especificidade a ativação das MMP-2 e MMP-9, e também funciona como um inibidor não competitivo da atividade enzimática dessas MMPs (YANG et al., 2016).

2.4) O Receptor hialurônico - CD44

2.4.1) Características Gerais

CD44 é uma molécula de adesão à superfície celular - glicoproteína transmembrana, envolvida em interações célula-célula, adesão celular e migração. Em mamíferos é expressa na linhagem hematopoiética, células endoteliais e epiteliais. Seu principal ligante é o ácido hialurônico, um polissacarídeo abundantemente presente na MEC, mas que também pode se ligar a outros componentes e desempenhar diferentes funções dependendo da estrutura da proteína à qual se liga. Conforme demonstra a figura 4A, a glicoproteína é composta por um domínio amino-terminal extracelular (ECD), um domínio transmembranar (TM) e um domínio carboxi-terminal intra-citoplasmático (ICD) (MEDRANO-GONZÁLEZ, et al., 2021).

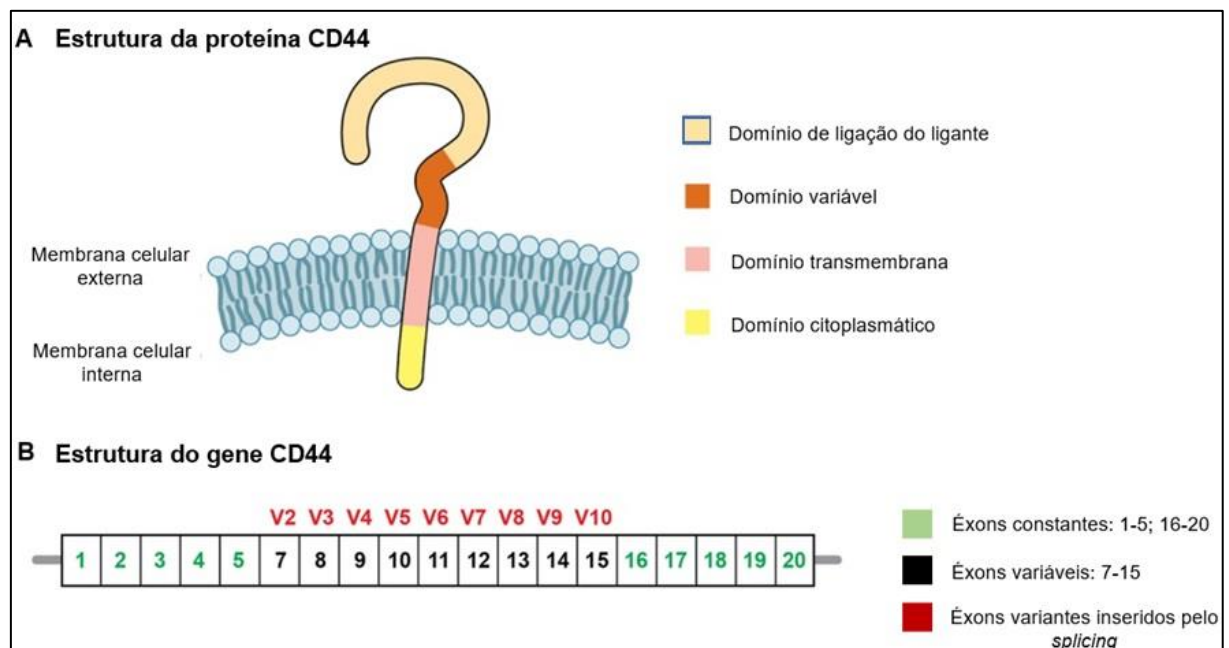
O domínio extracelular interage com o microambiente externo e detecta estímulos. O domínio transmembranar é a plataforma para interação com co-fatores e proteínas adaptadoras. Por sua

vez, o domínio intracelular tem uma configuração de cauda curta e longa com funções na localização nuclear e mediação de transcrição (SENBANJO & CHELLAIAH, 2017).

É codificado pelo gene CD44 altamente conservado no cromossomo 11 em humanos, seu gene completo consiste em 20 éxons e 19 íntrons. Desses 20 éxons, 10 são constantes e expressos em todas as suas isoformas (éxons 1-5 e 16-20), e através de *splicing* alternativo, os éxons restantes (éxons 7-15) se tornam variáveis por meio de incisão ou exclusão, gerando diversas isoformas no domínio extracelular (Figura 4B) (NAOR et al., 2008).

O domínio extracelular possui uma região altamente conservada (85% de identidade), que corresponde aos éxons 1-5, e uma região variável onde éxons variáveis são inseridos. A região proximal da membrana, codificada pelos éxons 16 e 17 é menos conservado (35%), enquanto o éxon 18 que codifica a região transmembrana é 100% conservado (MEDRANO-GONZÁLEZ, et al., 2021). A genômica e estrutura do CD44 é altamente conservada entre humanos e camundongos, e o comprimento dos íntrons nas regiões envolvidas no *splicing* alternativo é quase idêntico (BELL & SCREATON, 1998).

Figura 4. Estrutura da proteína e do gene do CD44



Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2018.

A isoforma padrão (CD44s) não possui todos os éxons variáveis e é expressa na maioria das células de animais vertebrados, enquanto as isoformas variantes (CD44v) são expressas apenas em algumas células sob condições específicas (YAN, ZUO & WEI, 2015). O domínio intracitoplasmático também pode ser submetido a *splicing* alternativo, pois o uso diferencial dos éxons 19 e 20 gera uma versão curta com 3 resíduos de aminoácidos e uma versão mais longa com 70 resíduos de aminoácidos, sendo a versão mais longa a mais abundante (MEDRANO-GONZÁLEZ, et al., 2021).

Além disso, diferentes modificações pós-traducionais geram diversidade adicional em sua estrutura. Sabe-se que diferentes isoformas do CD44 adquirem funções distintas dependendo dos éxons variáveis incluídos em sua estrutura, uma vez que induzem mudanças conformacionais que permitem que as novas isoformas gerem novos sítios de ligação. Por exemplo, a sequência que é codificada pelo éxon variável 6 tem um sítio de ligação para o HGF e VEGF (TREMMELE et al., 2009).

Em humanos, o CD44 é expresso em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central, pulmões, epiderme, fígado e pâncreas. Também exerce papel importante na regulação do metabolismo do hialuronano, ativação de linfócitos e liberação de citocinas (SENBANJO & CHELLAIAH, 2017). As isoformas variáveis do CD44 têm uma distribuição mais restrita do que o CD44 padrão, sugerindo que o *splicing* alternativo desta proteína é um processo altamente regulado (SNEATH & MANGHAM, 1998).

Queratinócitos, macrófagos e células epiteliais selecionadas expressam as isoformas variantes. Ademais, foi relatada a expressão de isoformas distintas durante diferentes estágios embrionários, por exemplo: a isoforma v9 é predominantemente expressa na epiderme, traqueia, pulmões, glândula tireóide, ductos mesonéfricos e ductos paramesonéfricos, enquanto a isoforma v6 pode ser detectada na epiderme e traqueias de fetos humanos de 10 semanas. No timo fetal humano, a forma padrão é expressa na região cortical, enquanto a isoforma v9 é expressa em células medulares, estabelecendo assim que a expressão de diferentes isoformas pode ser específica do tecido e estágio (RUIZ, SCHWÄRZLER & GÜNTHER, 1995; MEDRANO-GONZÁLEZ, et al., 2021).

Naor e colaboradores descreveram que a superexpressão de várias isoformas são encontradas em muitos tipos de tumores humanos e, que uma das suas principais funções é fazer linhagens

que não são metastáticas tornarem-se mais metastáticas (NAOR et al., 2008; SENBANJO & CHELLAIAH,2017).

2.4.2) Interação com Ligantes

De forma generalizada o CD44 funciona como receptor, interagindo com diversos ligantes como ácido hialurônico, osteopontina, collagenases e metaloproteinases. Os detalhes que conferem potencial metastático em neoplasias está diretamente relacionado com sua interação com diversos ligantes (SENBANJO & CHELLAIAH,2017).

Ácido hialurônico é um dos principais componentes da MEC e o principal ligante do CD44. Pode se ligar às isoformas expressas em qualquer localização. Através da ligação o ácido hialurônico pode ativar a sinalização do citoesqueleto e das MMPs envolvidas na progressão do tumor (BOURGUIGNON et al., 2014). Vários estudos têm demonstrado uma expressão elevada de osteopontina em neoplasias invasivas e altamente metastáticas, e ainda que a interação CD44/osteopontina induz migração celular (TUCK et al.,2007; SENBANJO & CHELLAIAH,2017).

Outro ligante de grande destaque são as MMPs, dos quais pode se citar: MMP-2, MMP-9, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24 e MMP-25, com grande destaque para MMP-9 e -14 (SENBANJO & CHELLAIAH,2017). No melanoma por exemplo, a interação com a MMP-9 na superfície celular promove a degradação do colágeno IV e a invasão (MEDRANO-GONZÁLEZ, et al., 2021).

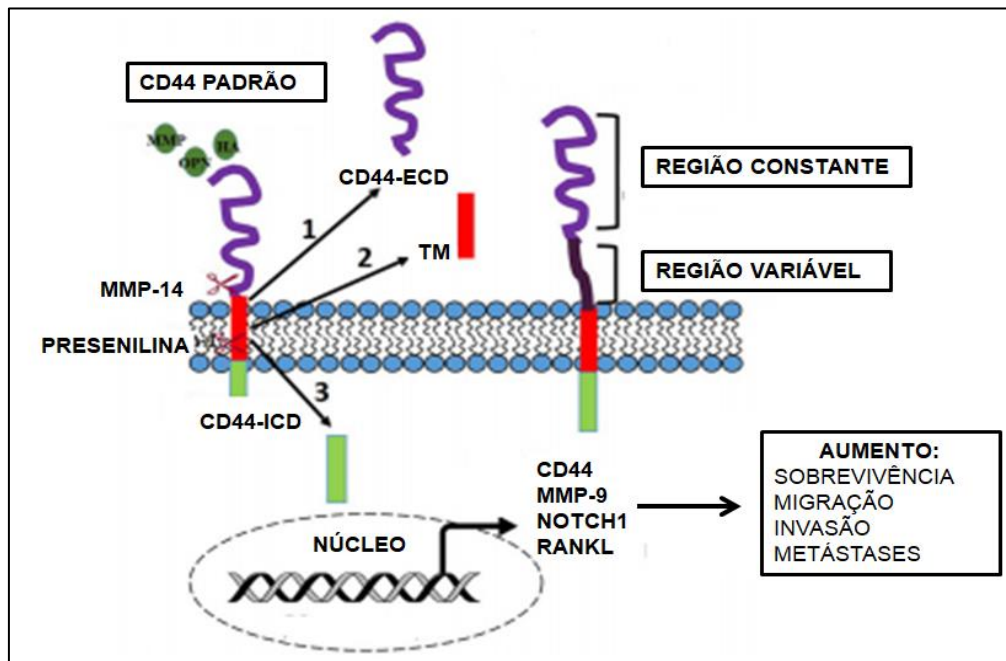
A interação entre MMPs e CD44 gera a clivagem do domínio extracelular, que está envolvido na secreção e ativação de MMP-9 e promoção da migração celular (CHETTY et al., 2012). Curiosamente, embora MMP-17 e MMP-25 também sejam ligantes, o CD44 não é clivado (MEDRANO-GONZÁLEZ, et al., 2021).

A clivagem do CD44 libera fragmentos do domínio extracelular com diferentes pesos moleculares, e essa clivagem é uma etapa necessária para a geração do ICD por um mecanismo chamado proteólise intramembranar regulada (THORNE et al., 2004; MEDRANO-GONZÁLEZ, et al., 2021).

O CD44 pode ser sequencialmente clivado pela MMP-14 e Presenilina-1/y secretase produzindo fragmento do domínio intracelular que é translocado para o núcleo, ativando a transcrição de vários genes incluindo o próprio CD44 (THORNE et al.,2004; SENBANJO & CHELLAIAH,2017) e de MMP-9. Além disso, sua translocação para o núcleo inicia o processo de regulação transcricional de vários genes como NOTCH1 e RANKL, que estão envolvidos na sobrevivência celular durante o estresse, inflamação e invasão tumoral (MILETTI-GONZÁLEZ et al., 2012). A figura 5 mostra a clivagem do CD44.

Além disso, o ICD regula a expressão do fator de transcrição RUNX2 e pode interagir com ele como um co-fator nuclear, também pode se ligar à sequência consenso CCTGCG do CD44, chamada elemento de resposta CD44-ICD em um local próximo ao sítio de ligação de RUNX2 no promotor de MMP-9, regulando sua expressão (SENBANJO et al., 2019). De modo intrigante, pode regular e ativar a expressão de alguns fatores de transcrição relacionados à manutenção de características de células-tronco, como SOX2 e Oct-4 (CHO et al., 2015).

Figura 5. Clivagem do CD44



Fonte: Adaptado de SENBANJO & CHELLAIAH, 2017.

A clivagem do ECD é regulada por ésteres de forbol, sugerindo um papel importante da PKC, e por citocinas como IL-1, TGF-beta ou interferon gama (MEDRANO-GONZÁLEZ, et al., 2021). Modificações pós-traducionais também regulam a clivagem. Nos melanócitos por exemplo, uma O-glicosilação total ou parcial na região proximal da membrana são necessários para a clivagem espontânea do ECD; mutações nesses locais prejudicam essa clivagem (GASBARRI et al., 2003). Além disso, mutações em certas regiões ou modificações pós-traducionais no ICD podem prejudicar a homodimerização do CD44 e prejudicar a clivagem do ECD, uma vez que regulam o acesso das proteases aos seus locais de reconhecimento induzindo alterações conformacionais (PARRA et al., 2016).

2.4.3) CD44 e Câncer

O CD44 foi inicialmente identificado como um receptor para ácido hialurônico e receptor de endereçamento de linfócitos, participando de processos fisiológicos e patológicos como: adesão celular, angiogênese, inflamação e desenvolvimento tumoral (NAOR et al., 2008; JANG et al., 2011). Desde que sua expressão em diversos tipos tumorais foram observadas sendo diferentes da contraparte normal, diversos estudos foram realizados para investigar o papel do CD44 no desenvolvimento do câncer.

Diversos estudos indicam que a alta expressão de CD44 está intimamente ligado a parâmetros clínicos e possível indicador prognóstico promissor em vários tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão, mama, gástrico e de cólon (ROSS et al., 2001; LEUNG et al., 2010; BROWN et al., 2011; SU et al., 2011; XU et al., 2014; YU et al., 2014).

Uma das principais descobertas, foi que sua expressão é regulada por muitos fatores extracelulares ou intracelulares, como por exemplo alvo da via Wnt, sabidamente envolvida nos processos de diferenciação e migração celular (KWONG & DOVE, 2009; XU et al., 2015). Atualmente também se sabe que o CD44 é crítico na transição epitelial-mesenquimal (TEM) e que é um dos principais biomarcadores para o isolamento e caracterização de células-tronco tumorais (UCHINO et al., 2012; WU et al., 2013).

A TEM é um processo celular fortemente regulado onde uma célula muda de um fenótipo epitelial para um mesenquimal, resultando na aquisição de propriedades semelhantes a fibroblastos. Desempenha um papel crucial não apenas na embriogênese normal e na

remodelação tecidual, mas também na progressão de várias doenças, incluindo inflamação, fibrose e, especialmente na proliferação tumoral, invasão, metástase, aquisição de característica de células-tronco, recorrência e resistência a drogas (LI & ZHOU, 2011; XU et al., 2015).

Também é descrita na literatura que a TEM promove a expressão de CD44, e que genes mesenquimais, como TWIST, SNAIL, ZEB e SLUG encontram-se correlacionados a sua expressão (BHAT-NAKSHATRI et al., 2010; LI & ZHOU, 2011; MARIN-AGUILERA et al., 2014; MASUI et al., 2014). Em contrapartida, estudos já demonstraram que o CD44 promove a TEM pela regulação positiva de marcadores mesenquimais e regulação negativa de marcadores epiteliais em muitos tipos de câncer, como de cólon, gástrico, pâncreas e próstata (XU et al., 2015).

Fortes evidências suportam que as CSC impulsionam a iniciação tumoral e metástase. Baseado nisso o CD44 é selecionado como um marcador para CSC em muitos tipos de neoplasias, por desempenhar papel fundamental na autorrenovação e tumorigênese (ARIF et al., 2015; XU et al., 2015). Além disso, as CSCs mostram plasticidade e são capazes de mudar de um fenótipo não-CSC para um CSC e vice-versa. Outras características que o tornam um candidato interessante como potencial marcador está relacionado a sua alta variabilidade funcional devido à existência de muitas variantes, que se diferem em termo de glicosilações e o fato de que o CD44 tem uma função chave nas interações microambientais. Interessantemente o CD44 foi um dos primeiros receptores *homing* descritos de células-tronco hematopoiéticas e o primeiro biomarcador definido para células iniciadoras de leucemia (JIN et al., 2006).

CD44 pode promover, inibir ou não ter efeito na invasão dependendo de seus níveis de expressão e da atividade de enzimas que regulam sua clivagem, como metaloproteinases (MEDRANO-GONZÁLEZ, et al., 2021). A regulação dos processos de migração e invasão dependem das variantes criadas pelo *splicing* alternativo, que por sua vez é regulado por sinais mitogênicos ou oncogênicos (SENBANJO & CHELLAIAH, 2017).

O papel na promoção da invasão e formação de metástases em parte está ligado a facilitação da adesão de células tumorais ao endotélio. Já foi demonstrado em câncer de mama e cólon que variantes do CD44 possuem atividade de ligante de E-selectina, e desse modo aumenta a adesão a célula endotelial e se correlaciona com o potencial de metástase (SHIRURE et al., 2015). Outro estudo em câncer de mama relacionou o silenciamento de CD44 com redução da adesão

às células endoteliais e invasão, e *in vivo* que sua expressão elevada aumentou eventos pós-intravasamento e metástase à distância (MCFARLANE et al., 2015).

Gupta e colaboradores relataram que a relação entre CD44 e MMP-9 na superfície da célula resulta na secreção de MMP-9 ativa e consequente migração e invasão, e ainda que a interrupção dessa interação CD44/MMP-9 reduz esse processo (GUPTA et al., 2013). Posteriormente, Gao e colaboradores também observaram que a expressão de CD44 é muito maior na metástase do que no tumor primário, e que sua regulação negativa inibe as capacidades de migração e invasão (GAO et al., 2015).

Na década de 1990, Birch e sua equipe relataram que camundongos nude que receberam inoculação de células de melanoma humano expressando altos níveis de CD44 formaram significativamente mais metástases pulmonares do que variantes das mesmas linhagens celulares que tinham baixa expressão de CD44. Posteriormente foi demonstrado a correlação entre altos níveis de expressão do CD44 com progressão e pior prognóstico (BIRCH et al., 1991; DIETRICH et l., 1997).

No entanto, no melanoma, a expressão do CD44 e sua relação com agressividade ainda não é claro. Em alguns estudos relata-se a redução da expressão de CD44 na superfície celular em associação a pior prognóstico (KARJALAINEN et al., 2000), em outros indicam que o aumento na expressão é acompanhado por aumento na agressividade do tumor (SENBANJO & CHELLAIAH, 2017; FÄNDER et al., 2019).

Enquanto os melanócitos expressam apenas CD44 padrão, lesões melanocíticas benignas, lesões de melanoma e linhagens de melanoma expressam heterogeneamente tanto a forma padrão quanto variantes. Curiosamente, os pacientes com maior expressão de CD44 apresentam uma sobrevida global significativamente reduzida em 5 anos. Já em modelos experimentais *in vivo* ocorre aumento na taxa de sobrevida (DIETRICH et l., 1997; FÄNDER et al., 2019).

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O entendimento da progressão tumoral em neoplasias altamente agressivas e com respostas terapêuticas baixas ou até mesmo controversas, como o melanoma, sempre se faz necessário. Estudos demonstram a importância do remodelamento da MEC por meio da atividade das

MMPs e proteínas de adesão, como o CD44, durante a progressão do melanoma, facilitando os processos de migração, invasão e de formação de metástases. No entanto, ainda pouco se compreende acerca da complexidade do mecanismo entre a relação e clivagem do CD44 por MMPs e a progressão tumoral. Assim, tornam-se necessários trabalhos que evidenciem tanto o mecanismo deste evento, quanto o impacto da inibição de MMPs sobre o CD44 e a progressão tumoral em melanomas. Sugere-se que a doxíciclina iniba a ativação das metaloproteinases e consequentemente a clivagem do CD44 e formação do CD44-ICD e, portanto, a progressão tumoral e formação de metástases é inibida ou ocorre com menor agressividade.

4. OBJETIVO

4.1) Objetivo Geral

Investigar os efeitos da inibição de metaloproteinases, a partir do uso de doxíciclina, sobre o comportamento celular e desenvolvimento neoplásico no modelo de melanoma murino *in vitro* e *in vivo*.

4.2) Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a viabilidade celular em modelo *in vitro* de melanoma murino a partir da linhagem B16-F10, submetida ao tratamento com doxíciclina nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M;
- 2) Avaliar os efeitos da inibição de metaloproteinases, a partir do uso de doxíciclina nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, sobre a atividade proliferativa, migratória, invasiva e sobre o ciclo celular em modelo *in vitro* de melanoma murino B16-F10;
- 3) Avaliar a atividade enzimática da MMP-9 em modelo *in vitro* de melanoma murino a partir da linhagem B16-F10, submetida ao tratamento com doxíciclina nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M;
- 4) Avaliar a função pulmonar em camundongos C57BL/6 inoculados na veia caudal com as células B16-F10, previamente tratadas com doxíciclina nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M;
- 5) Avaliar morfológicamente e mensurar a área pulmonar comprometida das formações metastáticas em camundongos C57BL/6 inoculados com as células B16-F10 tratadas e não tratadas com doxíciclina nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M;

6) Determinar e correlacionar a expressão e localização das proteínas MMP-9, MMP-14, CD44, CD44-ICD e CDC47 por imunohistoquímica, no modelo de melanoma murino de camundongos C57BL/6 inoculados na veia caudal com células B16-F10, previamente tratadas com doxiciclina nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1) Cultivo celular

Foram utilizadas células B16-F10 de melanoma metastático oriunda de camundongos C57BL/6, cedidas pela pesquisadora Miriam Teresa Paz Lopes do Laboratório de Substâncias Antitumorais do ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais, proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA).

As células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A), e 1% de penicilina sódica (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A), e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Para expansão e plaqueamento para a realização dos experimentos, alíquotas das linhagens celulares previamente congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas, transferidas para tubo Falcon com 5mL de meio DMEM e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em 10mL de DMEM suplementado com 10% de SFB, foram transferidas para placa de cultivo de 100mm (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil), e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento das células foi acompanhado diariamente e quando necessário era realizada a troca do meio. Para realização dos experimentos as células foram utilizadas quando apresentavam cerca de 70-80% de confluência.

5.2) Plaqueamento da linhagem B16-F10

Após as células atingirem uma confluência de 70-80%, o meio foi retirado, e a monocamada de células lavada com PBS 1X estéril. Em seguida as células foram tripsinizadas com 2mL de tripsina a 0,025% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e incubadas por 2 minutos em estufa a 37°C, para destacar a monocamada de células aderidas a placa. Após a tripsinização, foi adicionado 5mL de meio contendo SFB para inativar a ação da tripsina. Em seguida as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em meio de cultura e uma

alíquota de 50µL foi retirada para a contagem utilizando a Câmara de Neubauer. Após a contagem realizou-se o plaqueamento em placas e densidades específicas para cada experimento.

No plaqueamento para os ensaios utilizou-se meio DMEM com SFB a 5% e penicilina a 1%, sendo todos os experimentos realizados em triplicatas. Na Tabela 1 estão listados os ensaios *in vitro* realizados, bem como as respectivas placas utilizadas e densidade celular.

Tabela1. Ensaios *in vitro* realizados com as respectivas placas utilizadas e densidade celular.

Ensaio	Placa	Densidade celular por poço
Citotoxicidade e Viabilidade Celular	96 poços	4.000 células
Migração Celular	12 poços	15.000 células
Invasão Celular	24 poços	25.000 células
Ciclo Celular	12 poços	1x10 ⁵ células
Fluorescência	24 poços	1x10 ⁵ células
Zimografia	6 poços	3x10 ⁶ células

5.3) Tratamento com a doxíciclina

Após 24 horas do plaqueamento da B16-F10 a doxíciclina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) 0,5 miligramas (mg) foi diluída em 50 µL de água DEPC (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Inicialmente foi realizada diluição seriada do fármaco nas concentrações de 1µM; 2,5 µM; 5µM; 7,5 µM e 10µM para determinação das concentrações de interesse no estudo (SUN et al., 2009). Posteriormente, determinou-se as concentrações de 1µM, 5µM e 10µM para os estudos subsequentes. Para o tratamento das células, após a diluição seriada a doxíciclina foi adicionada em meio sem SFB e penicilina a 1%, além do grupo controle (com adição apenas do volume correspondente de meio DMEM). Nas placas de 96 poços foram adicionados 100µL e nas de 12 poços 500µL.

5.4) Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular

Após a contagem, as células foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços na densidade de 4.000 células por poço e incubadas por 24 horas para aderência. Após o tempo de aderência, as células foram tratadas com as concentrações de 1µM, 5µM e 10µM de doxíciclina. Após 24

horas da adição da doxíciclina o meio foi retirado e adicionou-se 100µL de 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração 0,25 mg/mL diluído em meio DMEM sem SFB. A placa foi incubada por 4 horas em estufa 37°C e fora do abrigo da luz. Após o período de incubação procedeu-se com a retirada do MTT e adição de 200µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para lise das células e liberação do cristal de formazan formado a partir da metabolização do MTT. A leitura da absorbância foi realizada em aparelho leitor de microplacas (SpectraMax 190 absorbance microplate reader, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA.) em 570 nm. Com a obtenção dos valores de absorbância foi realizado a correção com a subtração da leitura do branco e determinação do percentual de viabilidade celular sendo o valor de absorbância encontrado para o controle a base determinada como 100% (VELOSO, et al., 2022).

5.5) Ensaio de migração

Para avaliar o efeito da doxíciclina sobre a migração celular, as células foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços contendo insertes de silicone (Ibidi, Grärfelfing, Germany) que possuem um *gap* de 500µm entre duas câmaras, na densidade de 15.000 células por poço e incubadas por 24 horas em estufa para aderência. Após 24 horas os insertes foram retirados da placa e uma “ferida” originada do *gap* foi formada, em seguida os poços foram lavados com PBS para remoção de células não viáveis. Procedeu-se com o tratamento com a doxíciclina nas concentrações de 1µM, 5µM e 10µM e do antiproliferativo mitomicina na concentração de 10µg/mL, ambas os fármacos foram diluídos em DMEM sem SFB e com 1% de penicilina. Posteriormente, as células que migraram para a ferida foram fotografadas nos tempos de 0, 12, 24 e 36 horas com auxílio de microscópio invertido (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany), usando-se a objetiva de 4x e 2400 megapixel de câmera de *smartfone* Motorola G9 Plus. Por fim, a largura das feridas foi medida em cada imagem em dois pontos diferentes pelo software ImageJ (National Institute of Health, U.S.A), para cálculo da proporção de área livre de células neoplásicas em cada tempo. O percentual de fechamento da ferida foi calculado de acordo com a fórmula adaptada de Rotzer e colaboradores (ROTZER et al., 2016).

$$\text{Fechamento da ferida (\%)} = \frac{A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} \times 100$$

Sendo $A_{t=0h}$: área da ferida no tempo de 0 horas, e $A_{t=\Delta h}$: área da ferida no tempo de interesse.

5.6) Ensaio de invasão

Para avaliar o efeito da doxíciclina sobre a invasão celular, foi utilizado o *Kit BioCoat Matrigel Invasion Chambers* (BD Biosciences) que apresenta membranas com poros de 8µm em placas de 6 poços. Primeiramente foi adicionado 500 µl de DMEM sem SFB e com 1% de penicilina nos poços de cada câmara e incubado a 37°C em 5% de CO₂ por 2 horas para reidratação do matrigel. Depois da hidratação do matrigel o DMEM foi removido dos poços e procedeu-se com a tripsinização, ressuspensão das células em DMEM suplementado, contagem em câmara de Neubauer e lavagem em PBS para remoção de células não viáveis e remoção de resquícios de SFB. Posteriormente as células foram ressuspensas em DMEM sem SFB e com 1% de penicilina na densidade de 50.000 células por mL. Foi adicionado em cada poço inferior DMEM contendo SFB e 1% de penicilina, o qual agiu como quimioatraente indutor da invasão, já na parte superior de cada poço da câmara 500µl da suspensão de células ressuspensas em DMEM sem SFB acrescida do tratamento com doxíciclina nas concentrações de 1µM, 5µM e 10µM. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂, e em seguida, as células que não invadiram pelo matrigel foram removidas da superfície da membrana com auxílio de um cotonete. As células invasoras, que penetraram pelos poros e migraram para a superfície interna do matrigel foram fixadas em metanol 100% durante 10 minutos, e coradas com cristal violeta por 10 minutos. As câmaras foram lavadas com água destilada, o excesso de colorante removido com auxílio de cotonete e secas ao ar livre. A placa foi levada ao aparelho *Cytation 5 Cell Imaging* (Biotek, Winooski, Vermont, EUA) e a leitura da imagem realizada no *software* Gen5 (Biotek, Winooski, Vermont, EUA) para tratamento dos dados e análises (VELOSO et al., 2022).

5.7) Avaliação do ciclo celular

Para avaliar o efeito do tratamento com doxíciclina sobre o ciclo celular, foram semeadas 100.000 células por poço em duas placas de 12 poços e incubadas por 24 horas. Após a aderência as células foram tratadas com as concentrações de 1µM, 5µM e 10µM de doxíciclina e novamente incubadas por 24 horas e 48 horas em estufa.

Após o tratamento o sobrenadante dos poços foi coletado e as células aderidas foram tripsinizadas e também coletadas, formando um pool de células. As células foram lavadas com

solução PBS e centrifugadas durante 5 minutos em 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 300µL de solução fluorocrômica hipotônica 0,5% (HFS), contendo 50µg/mL de Iodeto de Propídeo (PI, Calbiochem, EUA) e 0,1% de triton X-100 em citrato de sódio a 0,1%. As células foram incubadas a 4° C durante 1 hora e meia e levadas para análise no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA) utilizando o programa FACSDiva (BD Biosciences, EUA). A análise dos dados adquiridos foi realizada utilizando o programa FlowJo versão v.10 (Tree Star, EUA).

5.8) Zimografia

Para avaliação da atividade enzimática da MMP-9 foram plaqueadas 3×10^6 células por poço em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas. Após a aderência as células foram tratadas com as concentrações de 1µM, 5µM e 10µM de doxiciclina e novamente incubadas por 24 horas e 48 horas em estufa.

Após o tratamento o sobrenadante dos poços foram coletados em eppendorf e PBS foi adicionado ao poço para desagregação mecânica e coleta das células aderidas. Foram centrifugados por 6 minutos em 10.000G, após a centrifugação foi determinada a concentração proteica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Posteriormente, 30µg de proteína de cada amostra acompanhadas de padrão de peso molecular, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%, contendo 1mg/mL de gelatina. A eletroforese foi desenvolvida a 90 volts durante 90 minutos e o gel incubado por 30 minutos em tampão de lavagem. Após, o gel foi incubado com tampão de desenvolvimento durante 18 horas e em seguida, corado em solução de Azul de Coomassie 0,5% por 15 minutos. A atividade de quebra da estrutura da gelatina pelas MMPs no gel foi identificada como áreas de proteólise em um fundo azul. A quantificação foi feita por densitometria, com auxílio do *software* ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) (HU & BEETON, 2010). Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade total de metaloproteinases, em relação ao controle.

5.9) Aspectos éticos do protocolo *in vivo*

A segunda etapa do trabalho, com modelo do tumor experimental de células B16-F10, foi realizada de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA/CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais com o protocolo 188/2020.

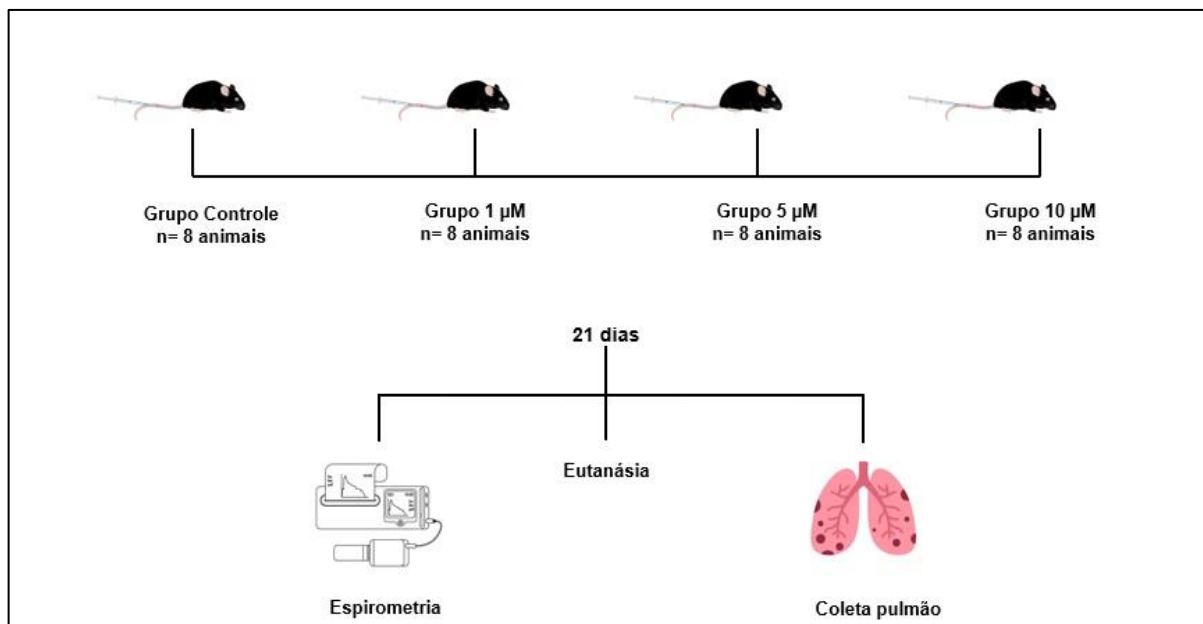
5.10) Avaliação *in vivo* de implante pulmonar de células B16-F10

Foram utilizados 32 camundongos C57BL/6, fêmeas, com 10 semanas de idade, pesando 20g, provenientes do Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas, com água e ração comercial balanceada à vontade e controle artificial de ciclos de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro).

Para avaliação da implantação neoplásica pulmonar em modelo *in vivo*, as células B16-F10 foram previamente semeadas em garrafas de cultivo T75 com 15mL de meio DMEM suplementado com 5% de SFB e 1% de penicilina. Ao atingirem confluência de 70-80% o meio foi retirado, seguida da lavagem das garrafas com PBS estéril, tripsinização e ressuspensão em meio DMEM com SFB a 5% e 1% de penicilina. Depois de 24 horas de aderência foi realizada o tratamento com doxiciclina nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M e o grupo controle (sem doxiciclina), com adição do volume correspondente de DMEM sem SFB. Após 24 horas de tratamento as células foram removidas da placa por tripsinização, coletadas, centrifugadas por 5 minutos em 1000 rpm, o sobrenadante descartado e ressuspensas em PBS estéril. Para inoculação das células no modelo *in vivo*, uma alíquota de 10 μ L foi retirada para contagem em câmara de Neubauer.

A inoculação foi realizada em 32 camundongos C57BL/6 pela veia caudal, com uma suspensão de 5×10^5 células B16-F10 em 100 μ L PBS tratadas (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M) ou não tratadas (grupo controle) com doxiciclina (VELOSO, et al., 2022). Para a inoculação os animais foram estratificados em 4 grupos: grupo 1) controle, que receberam células sem tratamento *in vitro* (n= 8 animais); e os grupos que receberam as células com tratamento prévio com doxiciclina *in vitro* em diferentes concentrações: doxiciclina 1 μ M (grupo 2); doxiciclina 5 μ M (grupo 3); doxiciclina 10 μ M (grupo 4), todos com 8 animais por grupo. Decorridos 21 dias da inoculação os animais foram anestesiados com injeção subcutânea de cetamina e xilazina (8,5 mg/kg de xilazina e 130 mg/kg de cetamina) para a realização da avaliação pulmonar por espirometria, e, após a avaliação, foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, necropsiados para coleta de pulmão e demais órgãos que possam ter apresentado formações metastáticas, visíveis à macroscopia. A figura 6 apresenta o delineamento experimental.

Figura 6. Delineamento experimental dos grupos de inoculação tumoral



5.11) Análise da função pulmonar por espirometria

Após 21 dias da inoculação tumoral, os animais foram anestesiados com injeção subcutânea de cetamina e xilazina (8,5 mg/kg de xilazina e 130 mg/kg de cetamina) para manter a respiração espontânea sob anestesia. Posteriormente foram traqueostomizados, colocados em um pletismógrafo corporal e conectados a um ventilador controlado por computador (*Forced Pulmonary Maneuver System, Buxco Research Systems*, Wilmington, Carolina do Norte, EUA), conforme descrito anteriormente por Russo *et al.* Esta configuração é projetada especificamente para uso em camundongos, tem apenas um volume de cânula de 0,8 mL e fornece três manobras semiautomáticas diferentes: Lei de Boyle FRC, pressão-volume quase estático e manobra de volume de fluxo rápido. Primeiramente, uma frequência respiratória média de 160 respirações/min foi imposta ao animal anestesiado por ventilação controlada por pressão até que um padrão respiratório regular e expiração completa a cada ciclo respiratório fosse obtido. Sob respiração mecânica a Complacência Dinâmica (C_{dyn}) e a Resistência Pulmonar (R_l) foram determinadas pelo teste de Resistência e Complacência RC. Para medir a Capacidade Vital Forçada (CVF) e a Capacidade Inspiratória (CI), foi realizada a manobra pressão-volume quase estática, que insufla os pulmões a uma pressão padrão de +30 cm H₂O e depois exala lentamente até uma pressão negativa de -30 cm H₂O é alcançado. A complacência quase estática da corda (de 0 a +10 cm H₂O) foi calculada com esta manobra considerando o volume/pressão

da expiração. Com a manobra de volume de fluxo rápido, os pulmões foram primeiro inflados a +30cm H₂O e imediatamente conectados a uma pressão altamente negativa para forçar a expiração até -30 cm H₂O. O volume expiratório forçado (volume expiratório forçado a 100 milissegundos, FEV 100) foi registrado durante esta manobra. Manobras abaixo do ideal foram ejetadas e para cada teste em cada camundongo pelo menos três manobras aceitáveis foram realizadas para obter uma média confiável para todos os parâmetros numéricos.

5.12) Análise histopatológica dos pulmões

Os pulmões foram coletados e fixados em formol neutro e tamponado a 10% (pH 7,4) durante 24 horas. Posteriormente, os órgãos foram incluídos em parafina e obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (H&E) e examinado sob microscópio Olympus BX41 em aumento de 40x. Células neoplásicas que formaram agregados, ou nódulos tumorais foram consideradas lesões pulmonares metastáticas. A área pulmonar total e a área de lesão pulmonar metastática foram medidas usando imagens capturadas no microscópio Olympus BX41 no software SPOT 3.4.5.

5.13) Imunohistoquímica

O procedimento imunohistoquímico foi realizado pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (Novolink Polymer Detection Sistem; Leica 43 Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido pressurizado a 125°C (Pascal® Pressure Cooker; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) ou 20 minutos em banho-maria a 98°C com *Target Retrieval Solution Citrate* - pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por três tempos de 5 minutos em solução de H₂O₂ 10% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 15 minutos em *Protein Block Serum Free Ready to Use* (Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 16 horas (*overnight*) e do cromógeno 3'3-diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen system; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA), de 3 minutos. Após a incubação no DAB os cortes foram contracorados com Giemsa (1:5) por 30 minutos e então rinsados em solução de ácido clorídrico (1:100), álcool absoluto e por fim ácido isopropílico. Com este tratamento após a contracoloração o pigmento melânico adquire

tonalidade esverdeada, permitindo a visualização amarronzada da reação cromogênica com DAB (VELOSO, et al., 2022). Na tabela 2 estão listados os anticorpos com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário utilizados na técnica. Para controle negativo foi omitida a etapa de incubação do anticorpo primário, com sua substituição pelo diluente de anticorpo (Antibody Diluent with Background Reducing Components; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA).

Tabela 2. Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação do anticorpo primário, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário para imunohistoquímica.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Tempo incubação	Recuperação antigênica	Anticorpo secundário
MMP-9	Abcam	EP1254	1:150	16h	Citrato + Calor úmido pressurizado	Novolink
MMP-14	Abcam	Policlonal	1:100	16h	Citrato + Calor úmido pressurizado	Novolink
CD44	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	1:200	16h	Citrato + Calor úmido pressurizado	Novolink
CD44- ICD	Cosmo Bio	Policlonal	1:200	16h	Citrato + Calor úmido pressurizado	Novolink
CDC47	Neomarks	47CD141	1:300	16h	Citrato + Banho-maria	Novolink

5.14) Avaliação da imunohistoquímica

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em aumento de 40x (Olympus – BX41). A expressão de MMP-9, MMP-14, CD44 e CD44-ICD foram categorizadas com base na porcentagem de células positivas: 0 (0-5% células), 1 (6-

25% células), 2 (26–50% células), 3 (51– 75% células), e 4 (>75% células); e da intensidade de marcação: 0 (negativo), 1 (fraco), 2 (moderado), 3 (forte). A pontuação dos escores foram somados gerando um escore semi-quantitativo, sendo negativo: escore <2 ou ligeiramente positivo (escore 2-3); positivo: moderadamente positivo: (escore 4-5) e fortemente positivo: (escore 6-7) (PIRES et al., 2013; ZHAO et al., 2015). A expressão de CDC47 foi quantitativamente avaliada em 500 células tumorais e a porcentagem de células positivas foi determinada (VELOSO, et al., 2022).

5.15) Análise estatística

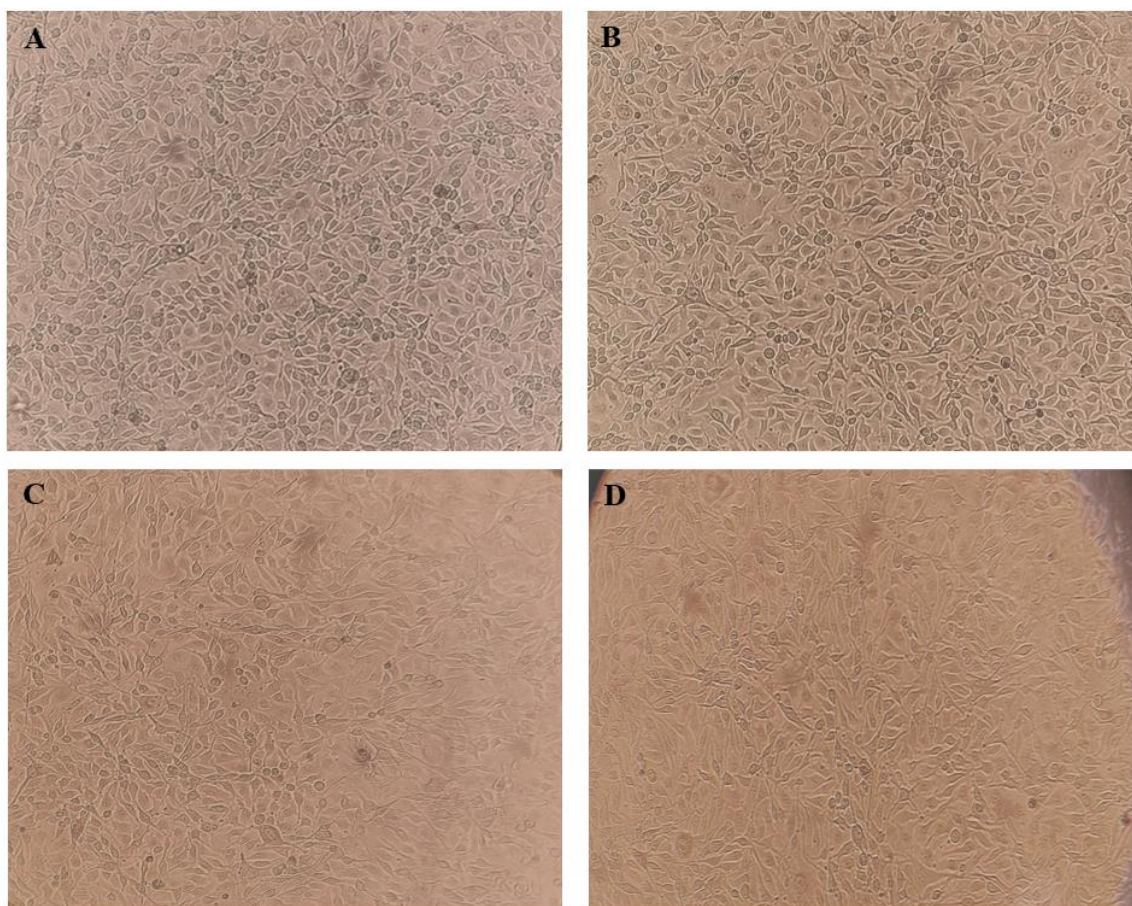
Todos os dados representam pelo menos, três experimentos independentes e foram expressos com média $\pm$ desvio padrão (DP). A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de D'Agostino & Pearson ou Shapiro-Wilk. Possíveis correlações dos dados foram avaliadas pelo Teste de Spearman ou Pearson. As relações entre variáveis qualitativas foram investigadas com o teste de Qui-quadrado. Os resultados quantitativos foram avaliados quanto à variância por meio do One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey ou de Dunnet. Foi utilizado o software GraphPad Prism v8 e considerados como significativos resultados cuja probabilidade de significância do teste foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1) Viabilidade celular e citotoxicidade após tratamento com doxiciclina

Por meio do ensaio de MTT, foi possível observar que nenhuma das concentrações de doxiciclina utilizada foi capaz de apresentar efeitos prejudiciais significativos à viabilidade celular na linhagem B16-F10. Além disso, ao também analisarmos a morfologia celular após o tratamento, nenhuma mudança significativa no padrão celular foi observada. (Figura 7).

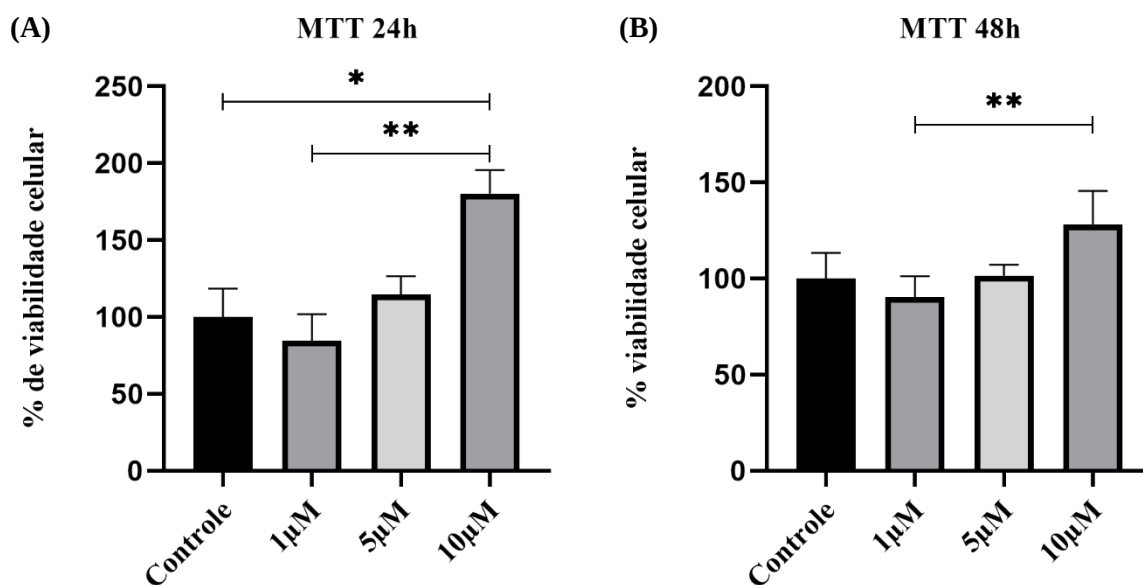
Figura 7. Padrão morfológico da linhagem B16-F10 após tratamento com doxiciclina por 48 horas. As fotomicrografias demonstram que não houve mudanças no padrão morfológico após o tratamento. Foi avaliado sob microscópio invertido (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany) e fotografado com ampliação de 10X. (A) Células controle, (B) Células tratadas com 1 μ M, (C) Células tratadas com 5 μ M e (D) Células tratadas com 10 μ M. Aumento de 20X.



Considerando a quantificação do cristal de formazan produzido pelas células do grupo controle como 100% de metabolização celular, observou-se nas células tratadas com 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, 84%, 114% e 180% de metabolização respectivamente após 24h de tratamento. Para 48h foi observada uma metabolização de 90%, 101 % e 128% nas mesmas concentrações citadas anteriormente (Figura 8A e 8B).

Figura 8. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com doxíciclina e não tratada.

Percentuais de metabolização celular, inferido a partir do ensaio MTT, da linhagem B16-F10 tratadas com 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M de doxíciclina por 24h (A) e 48h (B) com doxíciclina na concentração de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M. * p <0.05; ** p <0.01 (One-way ANOVA).

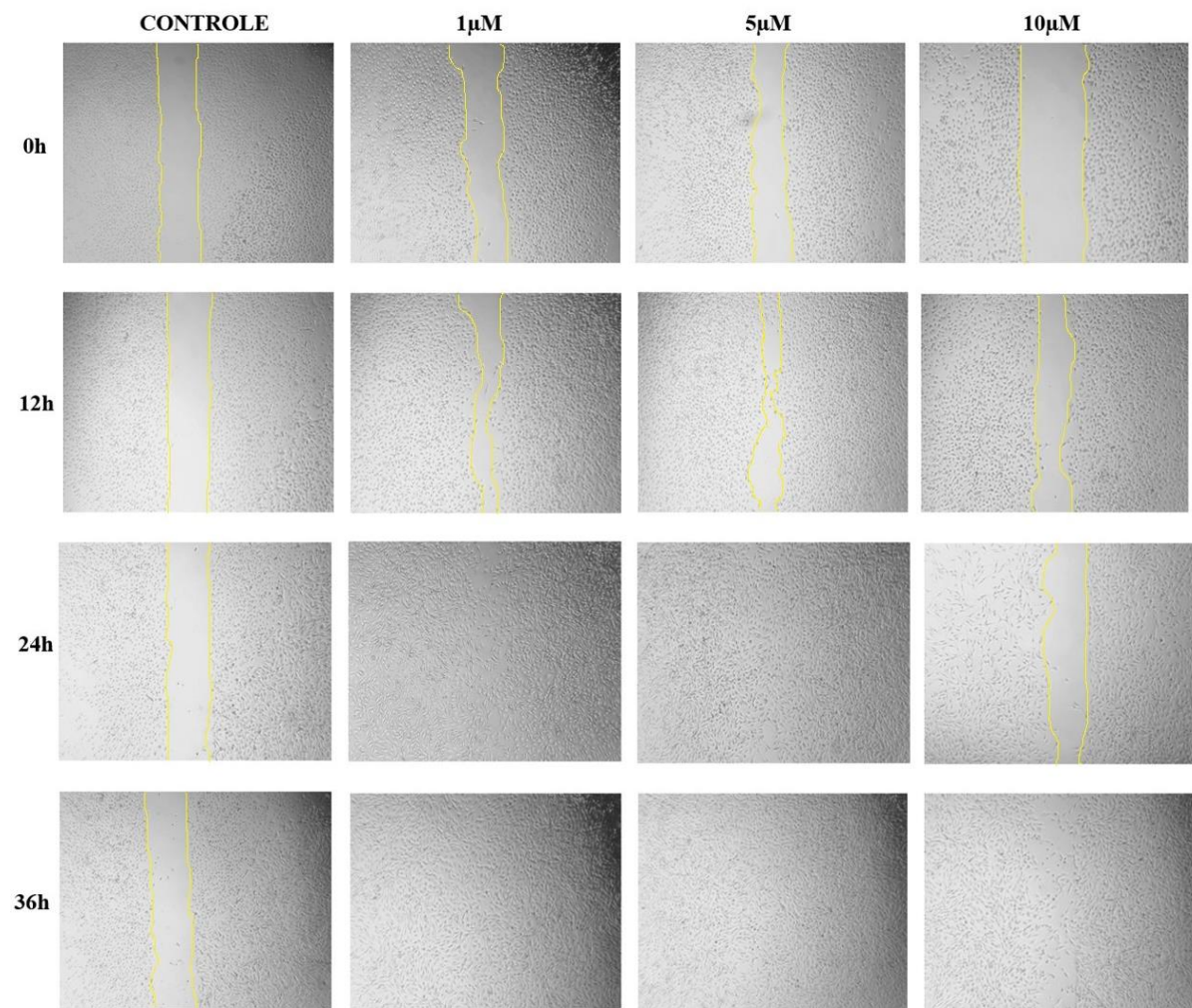


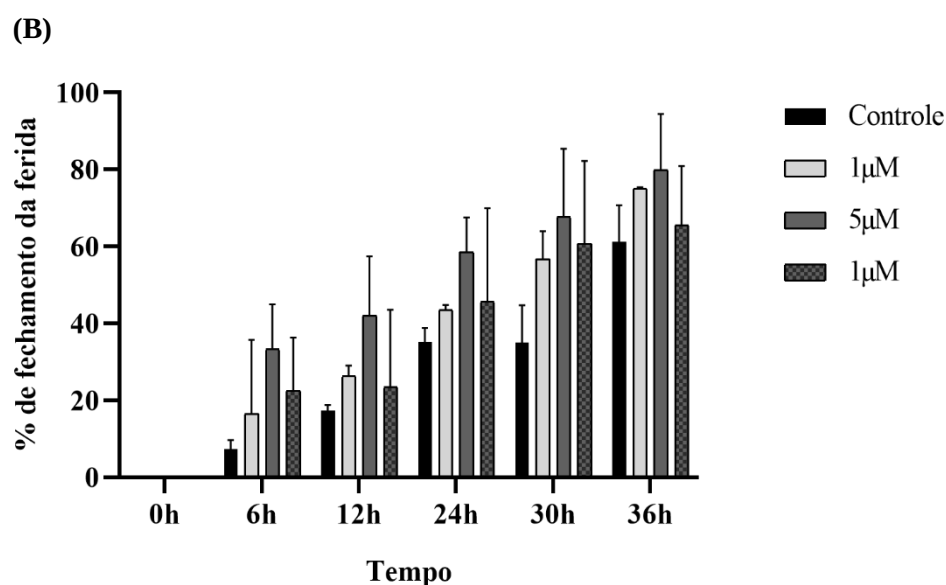
6.2) Capacidade migratória da linhagem B16-F10 após tratamento com doxíciclina

A eficiência do fechamento de feridas das células B16-F10 após o tratamento com doxíciclina em diferentes tempos foram expressos como porcentagem do fechamento da ferida, considerando a área medida no tempo zero como 0% (Figura 9). Apesar de ser observado um padrão fechamento da ferida em um ritmo mais alto nas células tratadas, sobretudo nas concentrações 1 μ M, 5 μ M e após o tempo de 12h, não foi observada diferença entre os grupos em estudo (Figura 9A e 9B). Esses dados demonstram que o fármaco não é capaz de diminuir a migração celular, na presença do inibidor de proliferação celular, a mitomicina. Além disso, as células B16-F10 tanto na presença ou ausência de doxíciclina não apresentaram diferenças significativas na invasão celular pelo matrigel, demonstrando a incapacidade de invasão *in vitro* dessas células.

Figura 9. Migração celular da linhagem B16-F10 tratadas com doxiciclina em diferentes tempos. As células controle receberam apenas meio de cultura. (A) Migração celular da linhagem B16-F10 tratadas com doxiciclina nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M em diferentes tempos. Células controle receberam apenas DMEM. Fotomicrografia mostra o fechamento da ferida sob microscópio invertido (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany) ao longo do tempo e fotografado com ampliação de 4X. As linhas amarelas destacam as bordas da ferida. (B) Percentual de fechamento de feridas de células B16-F10 tratadas com doxiciclina 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M (One-way ANOVA).

(A)



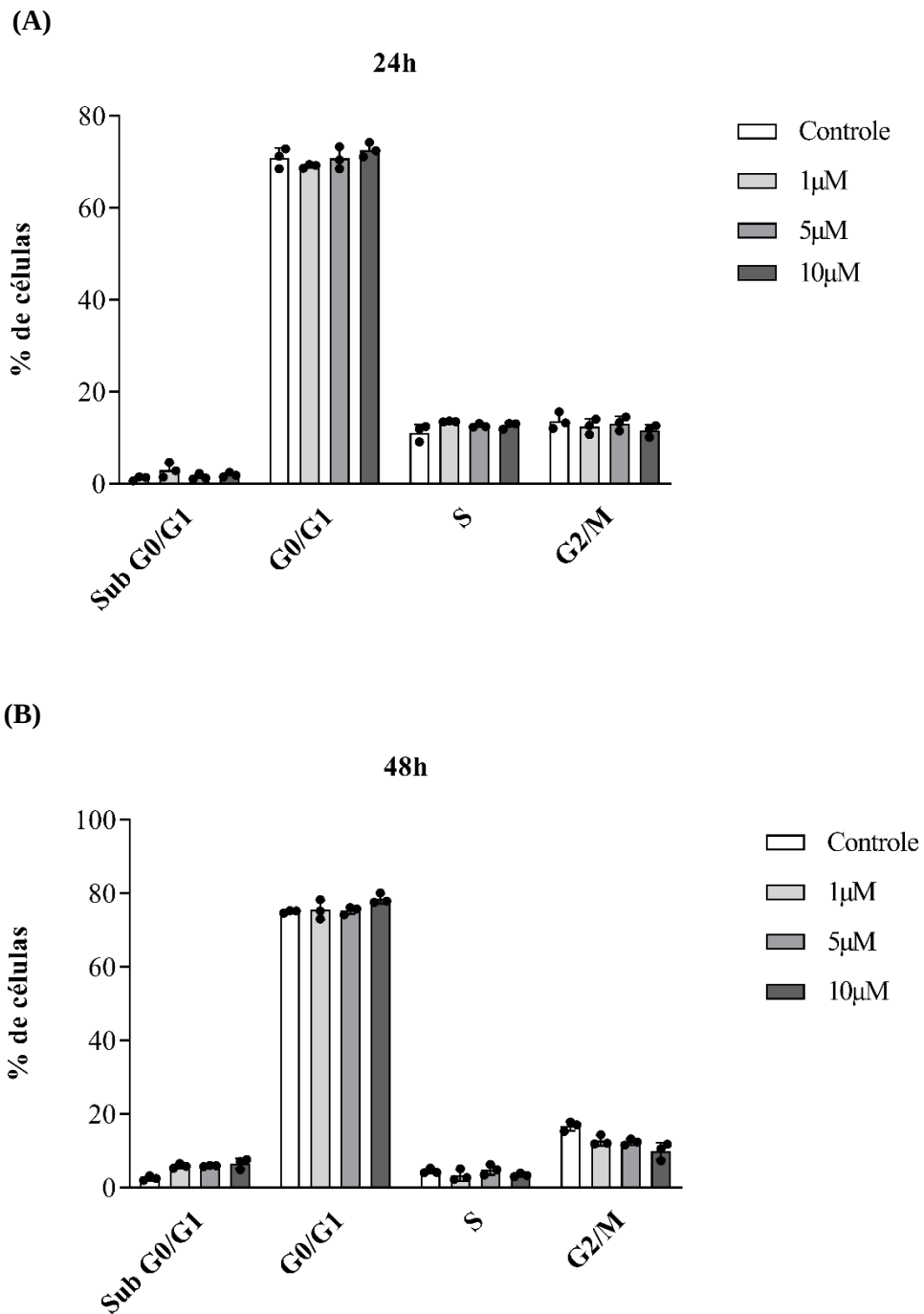


6.3) Efeito do tratamento com doxíciclina sobre o ciclo celular

O resultado da citometria de fluxo, utilizando o protocolo de marcação simples com PI, demonstrou um perfil com predominância de células na fase G0/G1 do ciclo celular, após tratamento por 24h e 48h com doxíciclina semelhante às células sem tratamento (Figura 10A e 10B). Esses resultados demonstram que o tratamento com o fármaco não foi capaz de alterar o perfil no ciclo celular em padrão de dose e tempo.

Além disso, o protocolo utilizado para a avaliação do ciclo celular também permitiu a avaliação da fragmentação de DNA, representado pela fase sub G1, podendo ser interpretado como morte celular. A vista dos dados obtidos, podemos inferir que o tratamento com a doxíciclina não foi capaz de induzir a morte das células, bem como não foi um fator estimulador da proliferação celular, corroborando com os dados do MTT e ensaio de migração, onde se foi observada maior viabilidade celular após os tratamentos, porém sem relação com a proliferação.

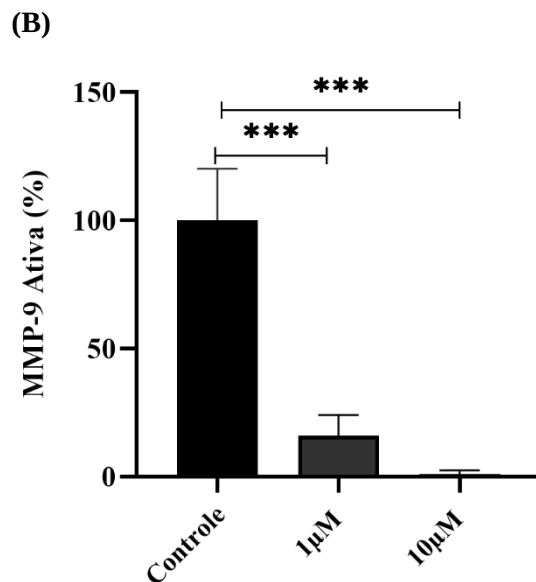
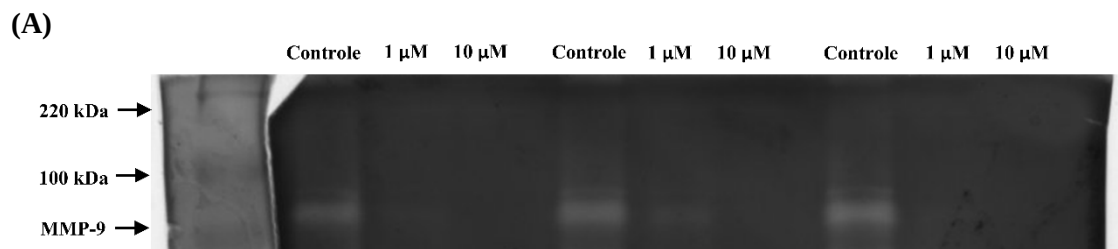
Figura 10. Efeito dos tratamentos com doxiciclina após 24 e 48 horas sobre o ciclo celular em linhagem B16-F10. Células foram tratadas com diferentes doses de doxiciclina por 24 e 48 horas. As células foram marcadas com PI, após tempo de marcação e a fluorescência foi medida utilizando citômetro de fluxo FACSCanto II. (A) Ciclo celular após 24 horas e (B) Ciclo celular após 48 horas (One-way ANOVA).

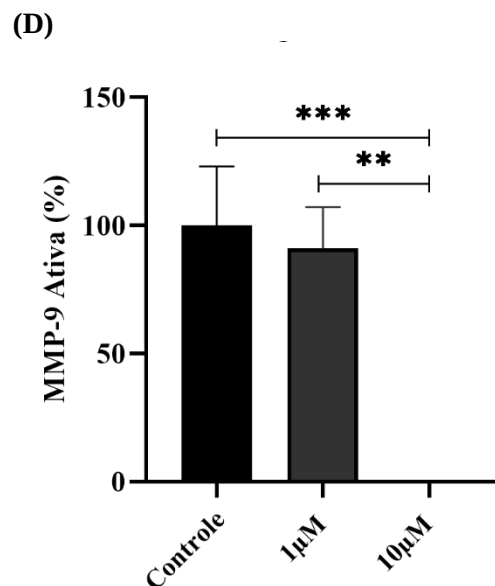
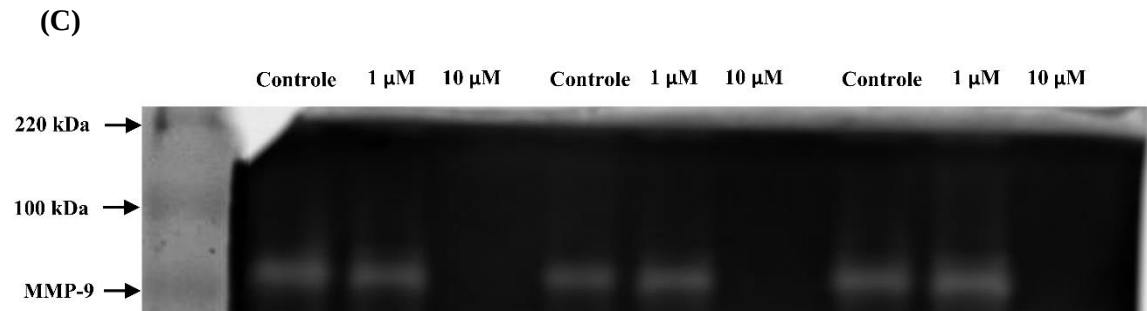


6.4) Efeito do tratamento com doxíciclina sobre a atividade das metaloproteinases

Para verificar a influência da inibição da atividade das metaloproteinases sobre a invasão celular investigou-se a atividade dessas enzimas pelo método de zimografia, utilizando a gelatina como substrato. Após a corrida eletroforética, as análises densitométricas das bandas mostraram que em nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento com doxíciclina, foi observado no sobrenadante das células diferentes comportamentos inibitórios. Nos sobrenadantes das células tratadas com a concentração de 1 μ M de doxíciclina houve redução da atividade gelatinolítica da MMP-9, e na concentração de 10 μ M observou-se inibição da atividade gelatinolítica quando comparado aos sobrenadantes controles, para ambos os tempos de 24 horas (Figura 11A e 11B) e 48 horas (Figura 11C e 11D).

Figura 11. Efeito do tratamento com doxíciclina sobre a atividade gelatinolítica da MMP-9. Células B16-F10 foram tratadas com doxíciclina nas concentrações de 1µM e 10µM por 24 e 48 horas. A atividade da gelatinase foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. (A) Zimograma demonstra halo de atividade da MMP-9 em 24 horas, (B) Gráfico da porcentagem de atividade gelatinolítica da MMP-9 em 24 horas, (C) Zimograma demonstra halo de atividade da MMP-9 em 48 horas, (D) Gráfico da porcentagem de atividade gelatinolítica da MMP-9 em 48 horas. **p<0.01; ***p<0.001 (One-way ANOVA).





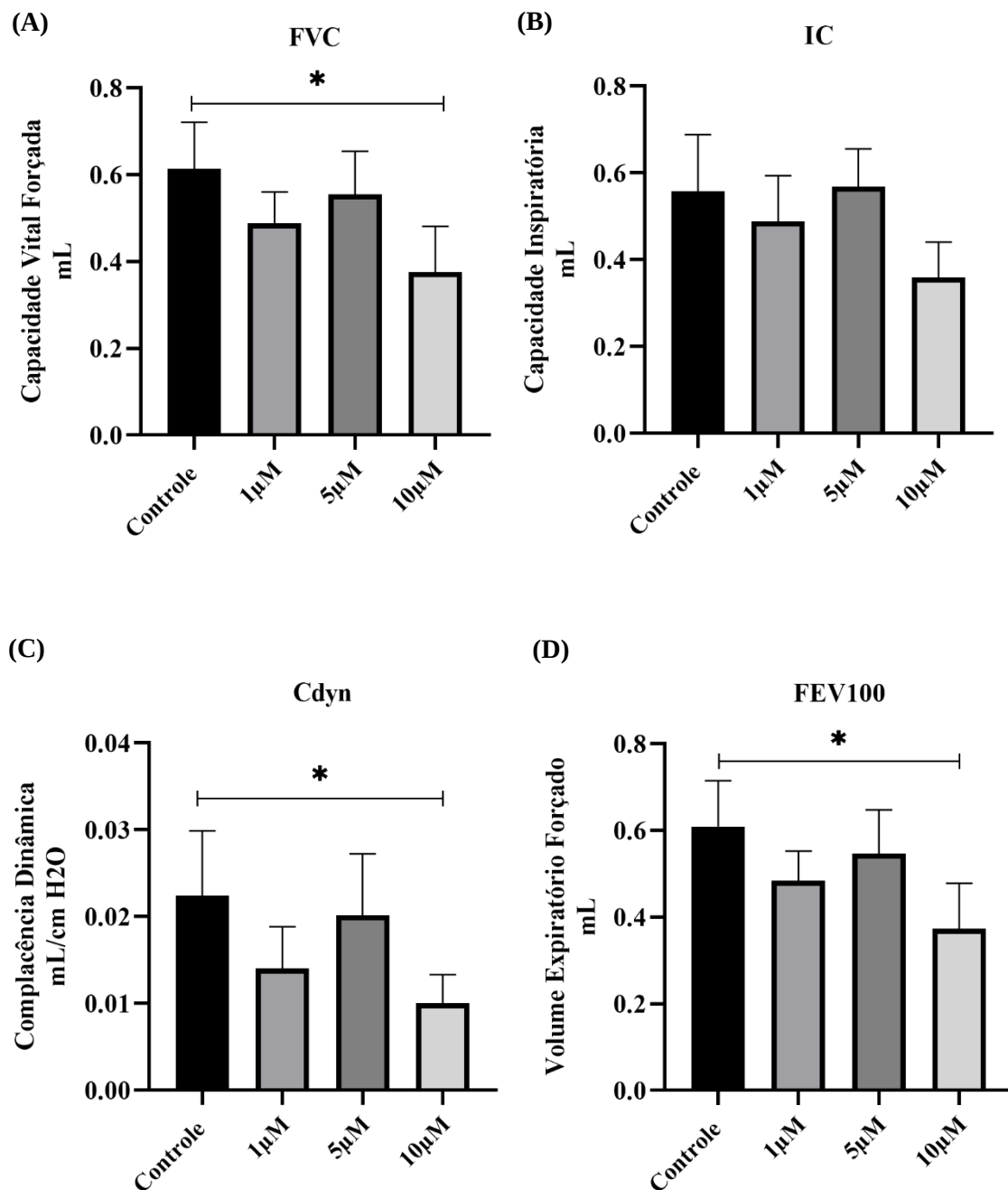
6.5) Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a função pulmonar

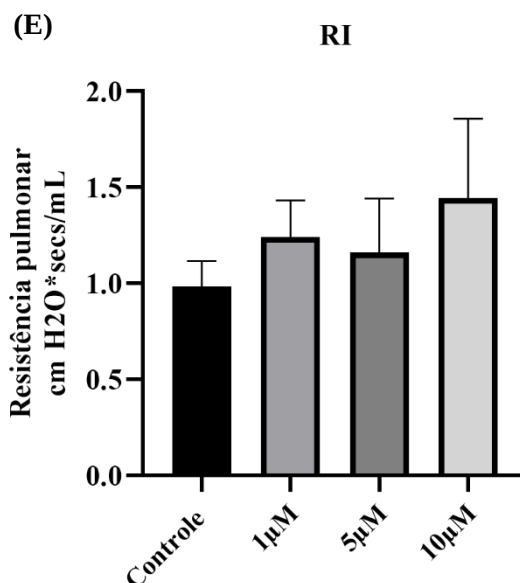
A análise da mecânica pulmonar foi realizada pela técnica de espirometria forçada, para investigar as modificações fisiológicas das funções pulmonares, após 21 dias de inoculação tumoral.

Usando manobras pulmonares forçadas, observamos que as formações neoplásicas nos pulmões causaram perda de área respiratória, conforme indicado pela redução significativa nos valores de Capacidade Vital Funcional (Figura 12A) e Capacidade Inspiratória (Figura 12B), quando comparados aos respectivos controles. Tais achados são comumente associados à formação de edema e/ou espessamento dos septos pulmonares. Com relação à avaliação da elasticidade pulmonar, pela complacência pulmonar, detectamos que os animais que receberam células tratadas apresentaram redução da Complacência Dinâmica (Figura 12C), indicando

modificação nos componentes da matriz extracelular pulmonar. Além disso, camundongos apresentaram alterações no fluxo das vias aéreas respiratórias com diminuição do Volume Expiratório Forçado em 100 milissegundos (FEV100) quando comparados aos controles (Figura 12D), sugerindo que as formações neoplásicas no pulmão reduziram o fluxo de ar nas vias aéreas. Foi detectada uma elevação progressiva da Resistência Pulmonar (Figura 12E), indicando perda de elasticidade pulmonar nos animais que receberam células tratadas, porém mais pronunciada no grupo doxíciclina 10 μ M. Juntos, nossos dados mostram que os animais inoculados com as células B16-F10 tratadas com doxíciclina apresentaram alteração no fluxo das vias aéreas, perda de área respiratória e redução da elasticidade do tecido.

Figura 12. Avaliação da mecânica pulmonar após inoculação de células B16-F10 tratadas com 1 μ M, 5 μ M ou 10 μ M de doxiciclina em camundongos C57BL/6. A espirometria forçada foi realizada para investigar lesão por modificações nas funções pulmonares. Os parâmetros avaliados foram: (A) Capacidade Vital Funcional, (B) Capacidade Inspiratória, (C) Complacência Dinâmica, (D) Volume Expiratório Forçado e (E) Resistência Pulmonar. * $p < 0.05$. (One-way ANOVA).





6.6) Efeito do tratamento das células B16-F10 com doxiciclina sobre a implantação pulmonar nos camundongos C57BL/6

Durante a análise diária dos camundongos inoculados, não foram observadas alterações clínicas/comportamentais nos animais. Na análise da presença de formações neoplásicas nos pulmões, foi observado que 100% dos animais (32/32 animais) apresentavam comprometimento neoplásico (Figura 13). De modo geral as metástases observadas nos grupos tanto controle quanto de animais que receberam células tratadas com doxiciclina, apresentavam-se como formações nodulares, com presença de pigmentos melânicos isolados, de aproximadamente 3mm a 5mm de diâmetro, por vezes se confluindo e formando nódulos com mais de 10mm de diâmetro. Esses nódulos estavam presentes predominantemente próximo a região bronquiolar e/ou próximo à vasos sanguíneos. Células neoplásicas apresentavam acentuada anisocariose, elevado pleomorfismo, presença de nucléolos múltiplos e evidentes. Em todos os grupos foi possível observar uma variação de 6 a 10 figuras de mitoses por campo de maior aumento (40x). Associado, observou-se discreto infiltrado inflamatório mononuclear com a presença predominante de macrófagos, nos septos alveolares. A figura 14 representa o grupo sem tratamento, e as figuras 15, 16 e 17 representam os grupos que receberam células tratadas com 1µM, 5 µM e 10 µM de doxiciclina respectivamente.

Figura 13. Macroscopia pulmão com formações neoplásicas de melanoma, em camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10. Superfície pulmonar apresentando vários tumores circulares de coloração preta variando de tamanho e com distribuição multifocal, ou acometendo todo o órgão. (A) Pulmão de camundongo controle com presença de metástases de distribuição multifocal. (B) Pulmão de camundongo que recebeu células tratadas com 1 μ M de doxíciclina com presença de metástases acometendo todo o órgão. (C) Pulmão de camundongo que recebeu células tratadas com 5 μ M de doxíciclina com presença de metástases de distribuição multifocal que por vezes se confluem e (D) Pulmão de camundongo que recebeu células tratadas com 10 μ M de doxíciclina com presença de metástases de distribuição multifocal que se confluem acometendo grande parte do órgão.

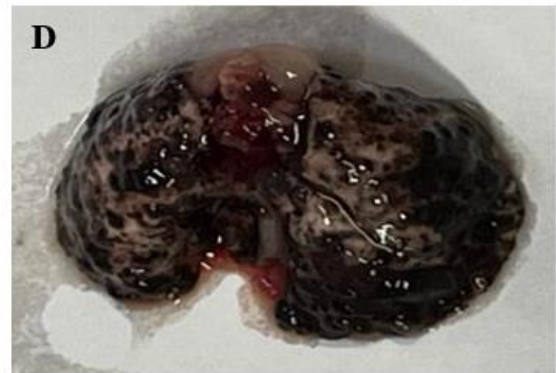


Figura 14. Fragmento histológico de pulmão, em HE, de camundongos inoculados com células B16-F10, sem tratamento com doxiciclina. (A) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando áreas de formação neoplásica (Setas) de melanoma B16-F10. Aumento 4X. **(B)** Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando grande formação neoplásica de melanoma B16-F10 (Asterisco). Aumento 10X. **(C)** Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando células com elevado pleomorfismo, nucléolos evidentes (Asterisco), presença de necrose (Seta) e pigmento melânico (Cabeça da seta). Aumento 40X.

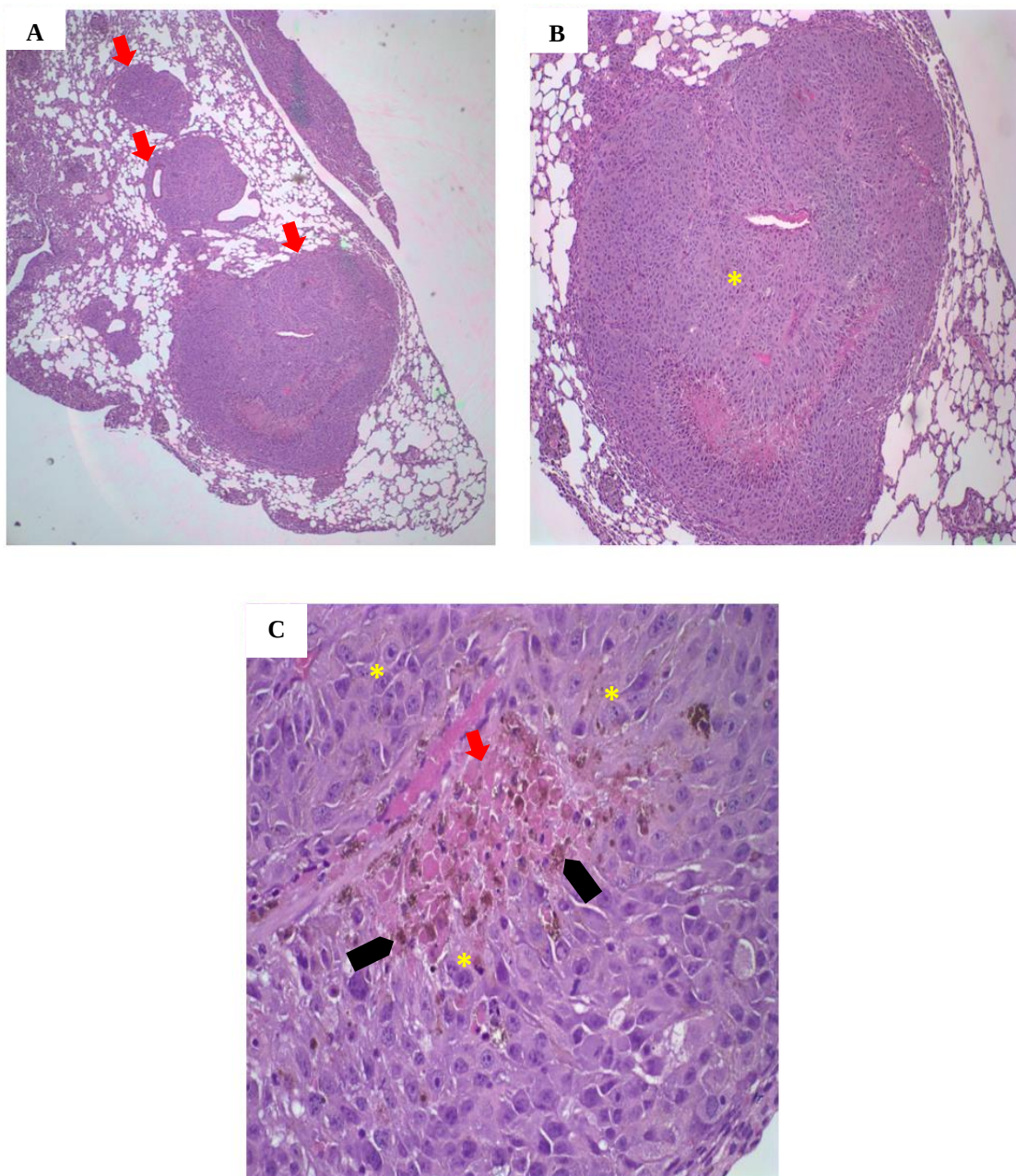


Figura 15. Fragmento histológico de pulmão, em HE, de camundongos inoculados com células B16-F10, tratadas com 1 μ M de doxiciclina. (A) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando formações neoplásicas de melanoma B16-F10 próximas a região bronquiolar ou de vasos sanguíneos (Setas). Aumento 10X. (B) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando nódulo com organização mais frouxa e células com elevado pleomorfismo e nucléolos evidentes (Asterisco). Aumento 40X. (C) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando moderada hiperemia nos septos alveolares (Cabeça da seta). Aumento 40X.

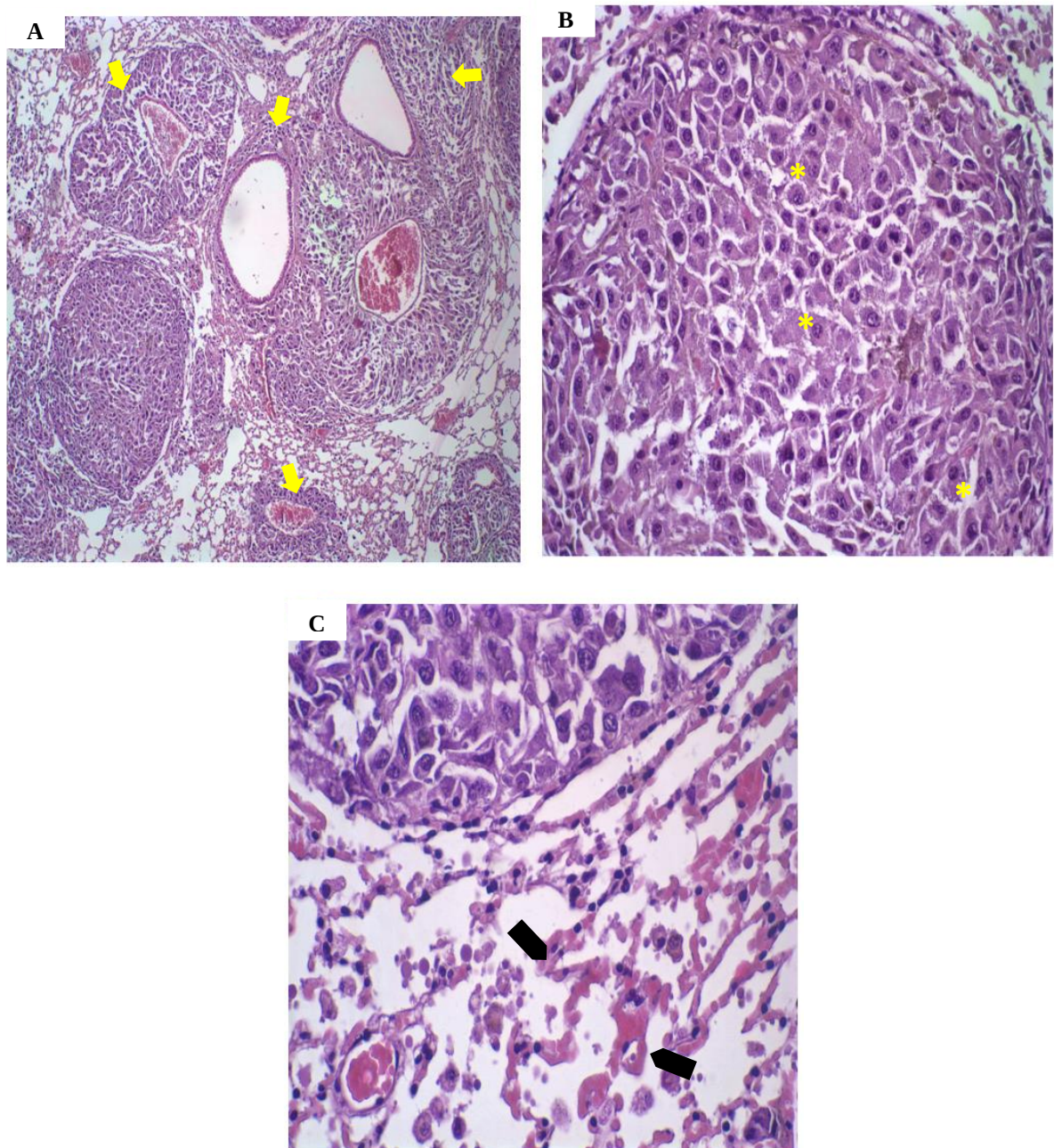


Figura 16. Fragmento histológico de pulmão, em HE, de camundongos inoculados com células B16-F10, tratadas com 5 μ M de doxíciclina. (A) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando grande área de formação neoplásica (Asterisco) de melanoma B16-F10 tratadas com doxíciclina. Aumento 4X. (B) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando formação neoplásica de células B16-F10 próximos a região bronquiolar (Seta). Aumento 20X.

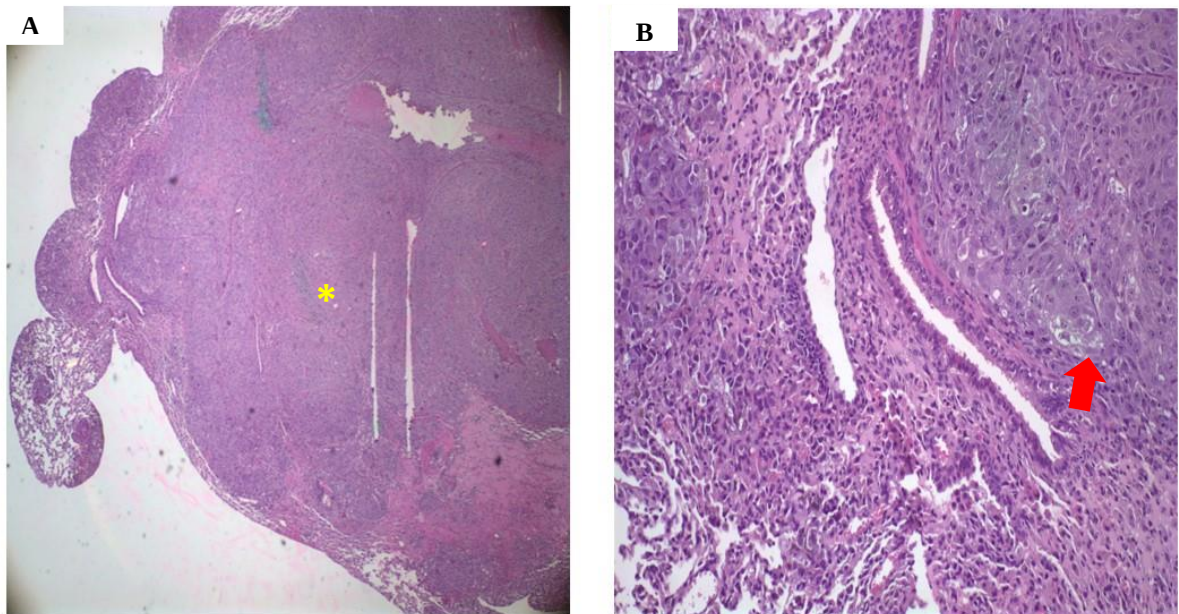
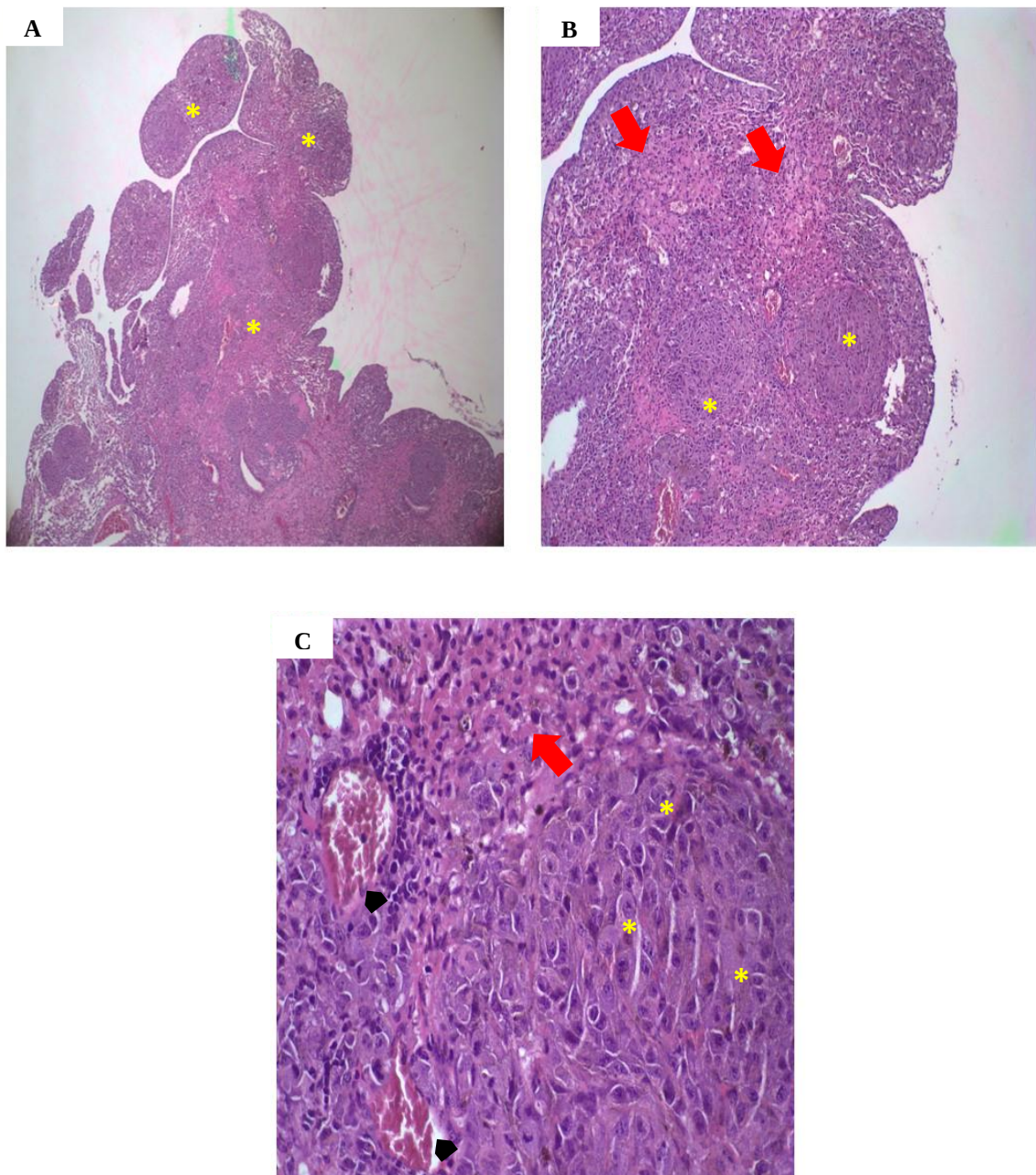


Figura 17. Fragmento histológico de pulmão, em HE, de camundongos inoculados com células B16-F10, tratadas com 10 μ M de doxíciclina. (A) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando grandes áreas de formação neoplásica (Asterisco) de melanoma B16-F10 tratadas com doxíciclina. Aumento 4X. (B) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando grande formação neoplásica de melanoma B16-F10 (Asterisco) e áreas de necrose (Seta). Aumento 20X. (C) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando células com elevado pleomorfismo, nucléolos evidentes (Asterisco), presença de necrose (Seta) e hiperemia (Cabeça da seta). Aumento 40X.

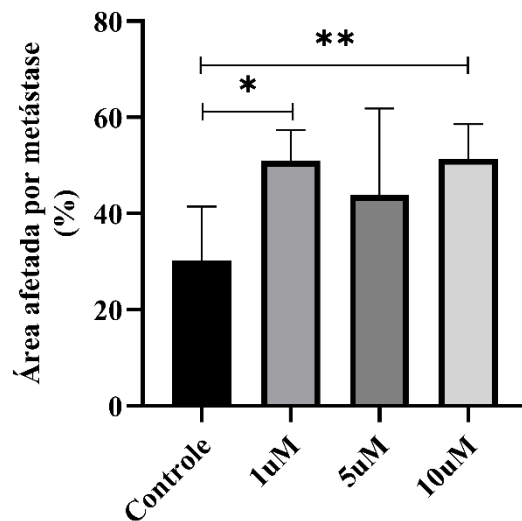


6.7) Efeito da inoculação de células B16-F10 tratadas com doxiciclina sobre a implantação pulmonar de células B16-F10 em camundongos C57BL/6

As áreas pulmonares totais e pulmonares metastáticas foram usadas para determinar a porcentagem de áreas pulmonares com metástases. As áreas pulmonares afetadas por metástases observadas nos animais que receberam células tratadas com 1 μ M e 10 μ M de doxiciclina foram significativamente maiores do que aquelas observadas nos animais do controle ($p=0,0167$ e $p=0,0089$ respectivamente). A figura 18A demonstra a mensuração da área pulmonar afetada por metástases.

Figura 18. Efeito dos tratamentos com doxiciclina sobre a implantação pulmonar de células B16-F10 em camundongos C57BL/6. As áreas pulmonares totais e pulmonares metastáticas foram usadas para determinar a porcentagem de áreas pulmonares com metástases. (A) Mensuração da área pulmonar afetada por metástases. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (One-way ANOVA).

(A)



6.8) *Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a expressão proteica de CD44, CD44-ICD, MMP-9, MMP-14 e CDC47*

A imunomarcção do CD44 foi considerada a partir da marcação na membrana celular (Figura 19 A-D) dos casos avaliados, com positividade em 100% dos casos no grupo controle, 67% no grupo que recebeu células tratadas com doxiciclina na concentração 1 μ M, 75% no grupo 5 μ M e 62,5% no 10 μ M (Figura 19E). O escore 4-5 foi o mais frequentemente observado no grupo controle e nos tratados com doxiciclina, representando 85,71% dos casos controle e 45,45% de todos os casos dos animais dos grupos tratados.

A expressão do CD44-ICD foi observada na membrana celular (Figura 20 A-D), com positividade em 100% casos analisados do grupo controle e grupos que receberam células tratadas com doxiciclina na concentração 1 μ M e 10 μ M, enquanto no grupo doxiciclina 5 μ M observou-se negatividade para a marcação em 12,5% dos casos avaliados (Figura 20E). O escore 6-7 foi detectado em 100% dos casos no grupo controle, já nos grupos tratados com

doxíciclina o mais frequente foi o escore 4-5, representando 51,72% de todos os casos. Além disso, foi observada relação significativa entre o aumento da dose de doxíciclina e a redução da expressão de CD44-ICD ($r=-0.64$ e $p<0,001$).

A expressão citoplasmática da MMP-9 (Figura 21 A-D) foi detectada em 78,13% dos casos avaliados, contudo sempre com escore abaixo de 2, sendo assim 100% dos casos considerados negativos (Figura 21E). O score 2-3 foi o mais frequentemente observado, com predominância para os grupos tratados com 1 μ M e 10 μ M de doxíciclina (100%).

Por sua vez a imunomarcação membranar da MMP-14 (Figura 22 A-D) foi observada a frequência de 71,44% dos casos no grupo controle, 33,33% no grupo que recebeu células tratadas com 1 μ M de doxíciclina, 62,5% no 5 μ M e 87,5% dos casos negativos no grupo 10 μ M (Figura 22 E). Contudo, o score 6-7 foi o mais frequentemente detectado no grupo controle, em 57,15% dos casos, e score 4-5 nos grupos tratados com doxíciclina representando 44,82% dos casos analisados. A tabela 3 detalha as frequências das análises imunohistoquímicas das amostras tumorais incluídas no estudo para CD44, CD44-ICD, MMP-9 e MMP-14.

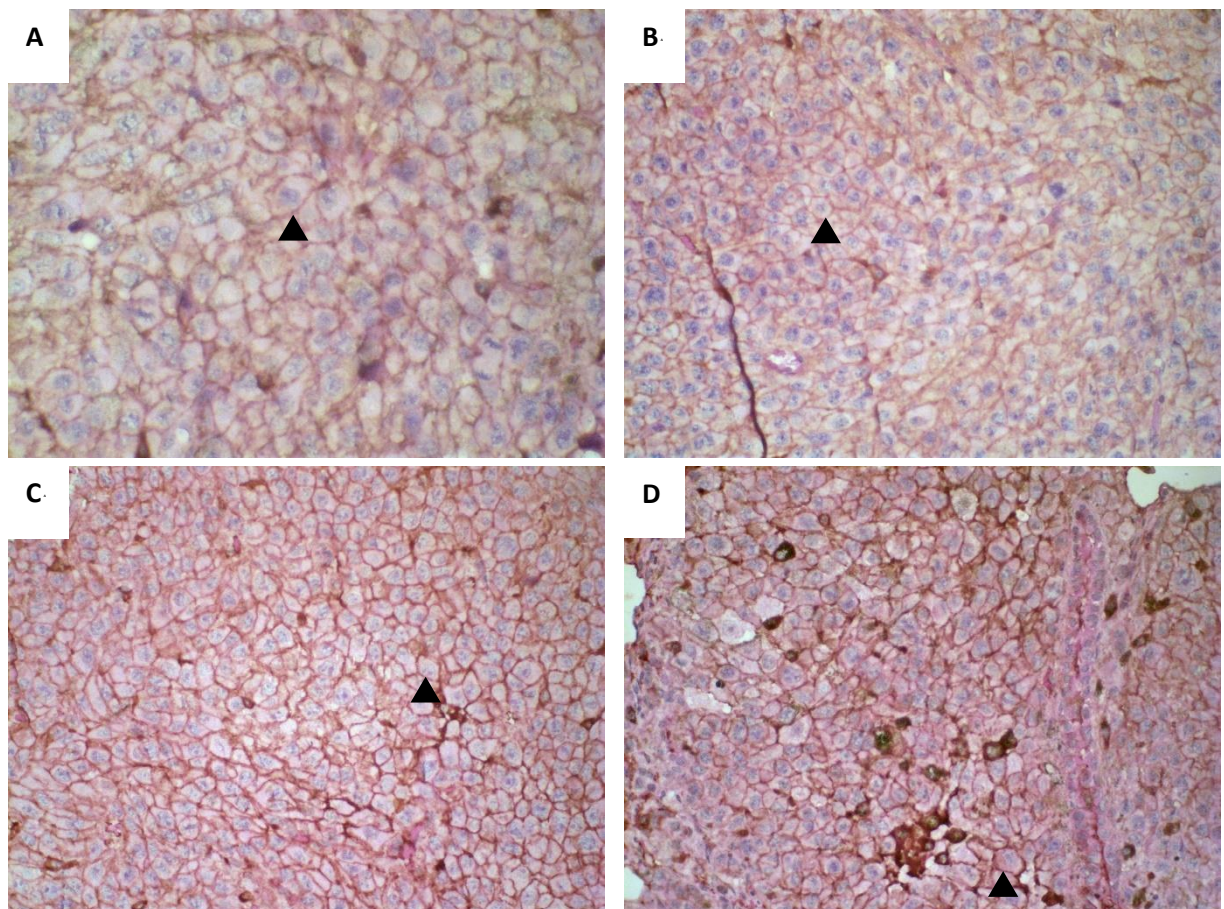
Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na avaliação do índice proliferativo de células neoplásicas metastáticas (Figura 23E), medido pela expressão nuclear de CDC47 (Figura 23 A-D). Entretanto, foi observada correlação positiva significativa entre sua expressão e a área pulmonar acometida por metástases ($r=0.9505$; $p=0.0036$). Além disso, foi observada relação positiva entre a sua expressão com a porcentagem de células marcadas para MMP-9 ($r=0.9150$; $p=0.0039$), bem como o escore de expressão de MMP-9 ($r=0.7959$; $p=0.0323$) e de MMP-14 ($r=0.8114$; $p=0.0145$).

Tabela 3. Frequências das análises imunohistoquímicas das amostras tumorais incluídas no estudo para CD44, CD44-ICD, MMP-9 e MMP-14.

Todos os casos (N=29)				
	N=7	N=6	N=8	N=8
	Controle	1μM	5μM	10μM
CD44				
Negativo	0	0	0	0
2 - 3	0	2 (33,33%)	2 (25%)	3 (37,5%)
4 - 5	6 (85,71%)	2 (33,34%)	4 (50%)	4 (50%)
6 - 7	1 (14,29%)	2 (33,33%)	2 (25%)	1 (12,5%)
CD44-ICD				
Negativo	0	0	0	0
2 - 3	0	0	1 (12,5%)	0
4 - 5	0	4 (66,67%)	3 (37,5%)	8 (100%)
6 - 7	7 (100%)	2 (33,33%)	4 (50%)	0
MMP-9				
Negativo	4 (57,14%)	0	3 (37,5%)	0
2 - 3	3 (42,86%)	6 (100%)	5 (62,5%)	8 (100%)
4 - 5	0	0	0	0
6 - 7	0	0	0	0
MMP-14				
Negativo	1 (14,28%)	0	1 (12,5%)	0
2 - 3	1 (14,28%)	4 (66,67%)	2 (25%)	1 (12,5%)
4 - 5	1 (14,29%)	2 (33,33%)	4 (50%)	7 (87,5%)
6 - 7	4 (57,15%)	0	1 (12,5%)	0

Figura 19. Expressão imunohistoquímica de CD44 em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.

(A) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de CD44 21 dias após a inoculação de células B16-F10 sem tratamento com doxíciclina. Aumento 40X. (B) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de CD44 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 1 μ M. Aumento 40X. (C) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de CD44 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 5 μ M. Aumento 40X. (D) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de CD44 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 10 μ M. Aumento 40X. Ponta de seta: Células neoplásicas com imunomarcção positiva. (E) Frequência de casos com positividade para o anticorpo CD44 (Teste de Qui-quadrado).



(E)

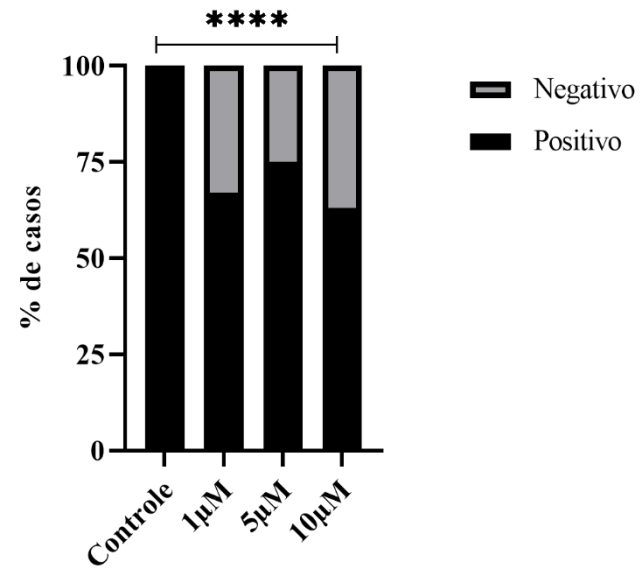
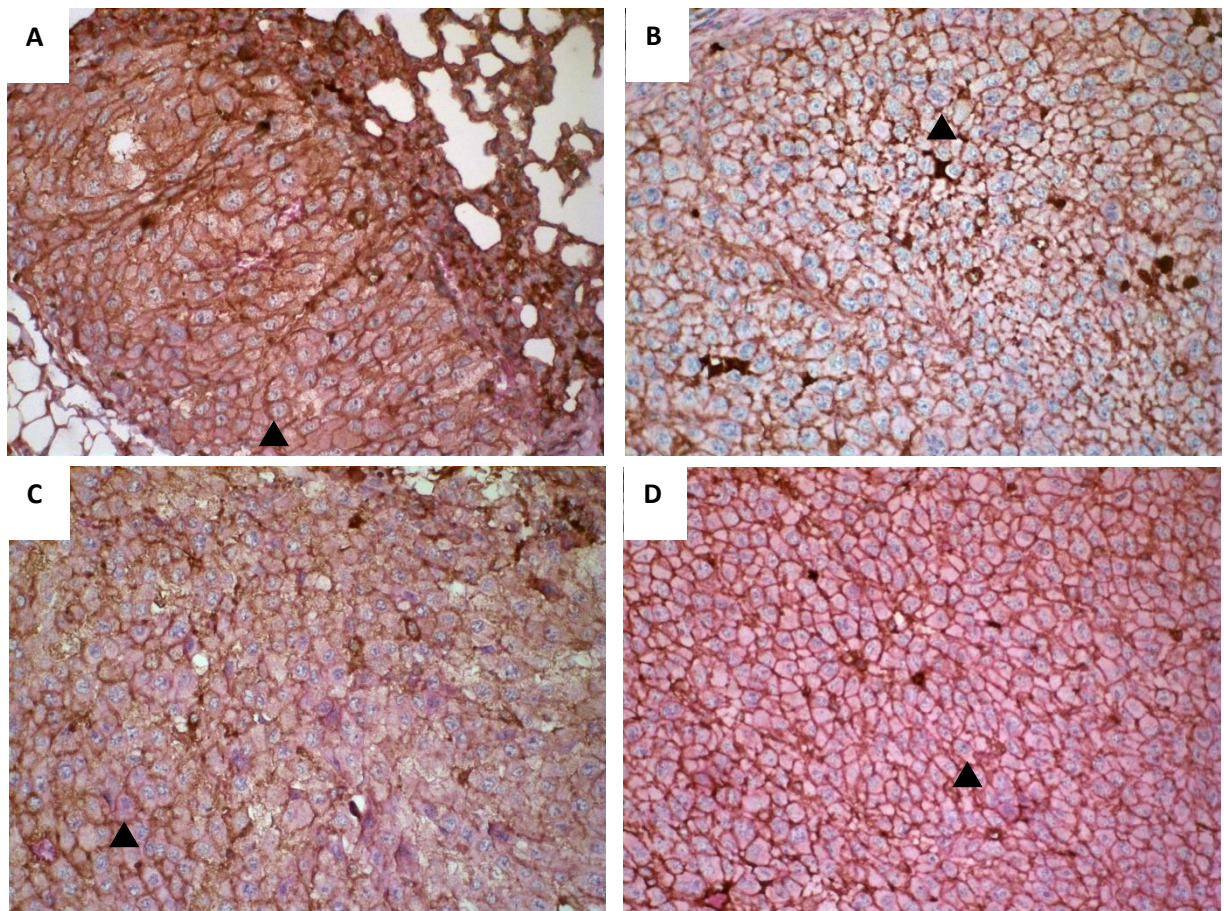


Figura 20. Expressão imunohistoquímica de CD44-ICD em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.

(A) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de CD44-ICD 21 dias após a inoculação de células B16-F10 sem tratamento com doxíciclina. Aumento 40X. (B) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de CD44-ICD após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 1 μ M. Aumento 40X. (C) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de CD44-ICD após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 5 μ M. Aumento 40X. (D) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de CD44-ICD após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 10 μ M. Aumento 40X. Ponta de seta: Células neoplásicas com imunomarcção positiva. (E) Frequência de casos com positividade para o anticorpo CD44-ICD (Teste de Qui-quadrado).



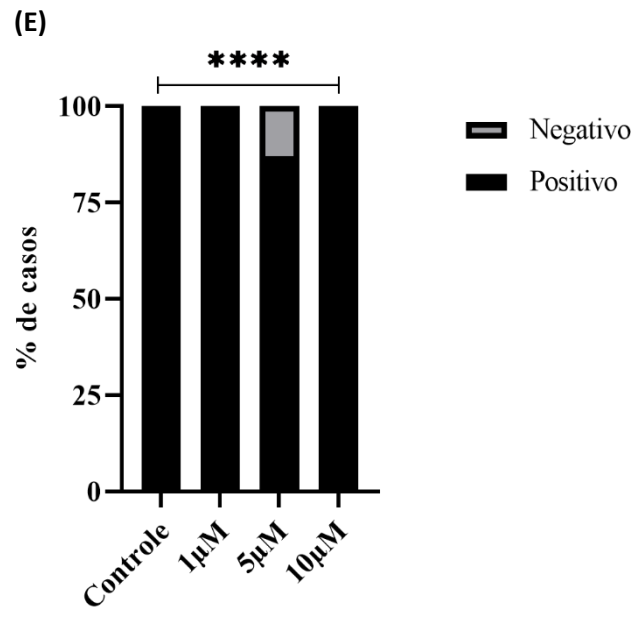
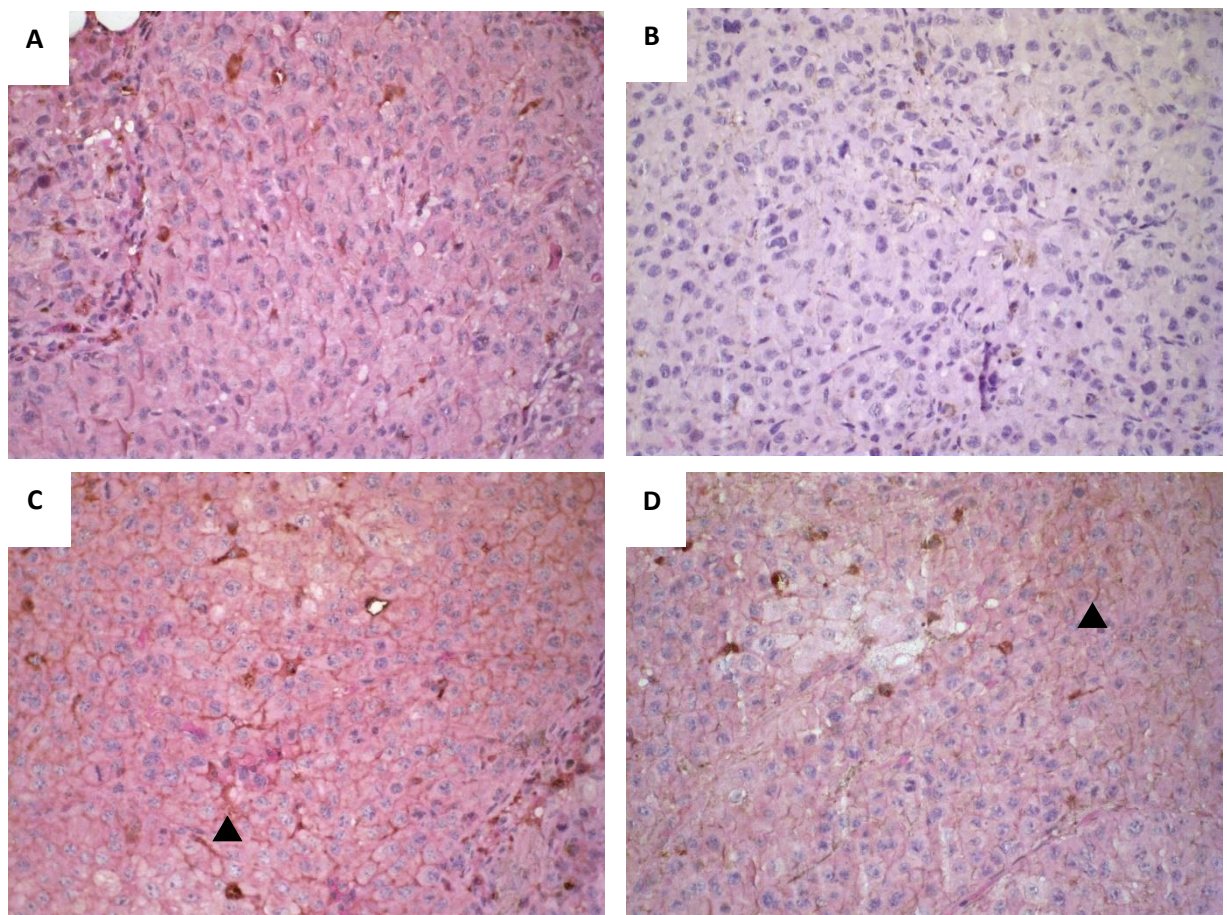


Figura 21. Expressão imunohistoquímica de MMP-9 em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.

(A) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção citoplasmática negativa de MMP-9 21 dias após a inoculação de células B16-F10 sem tratamento com doxíciclina. Aumento 40X. (B) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando negatividade de imunomarcção citoplasmática de MMP-9 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 1 μ M. Aumento 40X. (C) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção citoplasmática e membranas fraca para MMP-9 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 5 μ M. Aumento 40X. (D) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção citoplasmática e membranas fraca para MMP-9 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 10 μ M. Aumento 40X. (E) Frequência de casos com positividade para o anticorpo MMP-9 (Teste de Qui-quadrado).



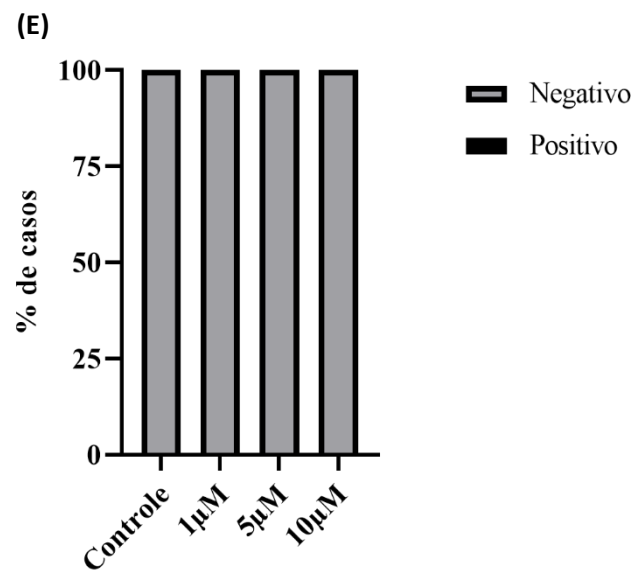
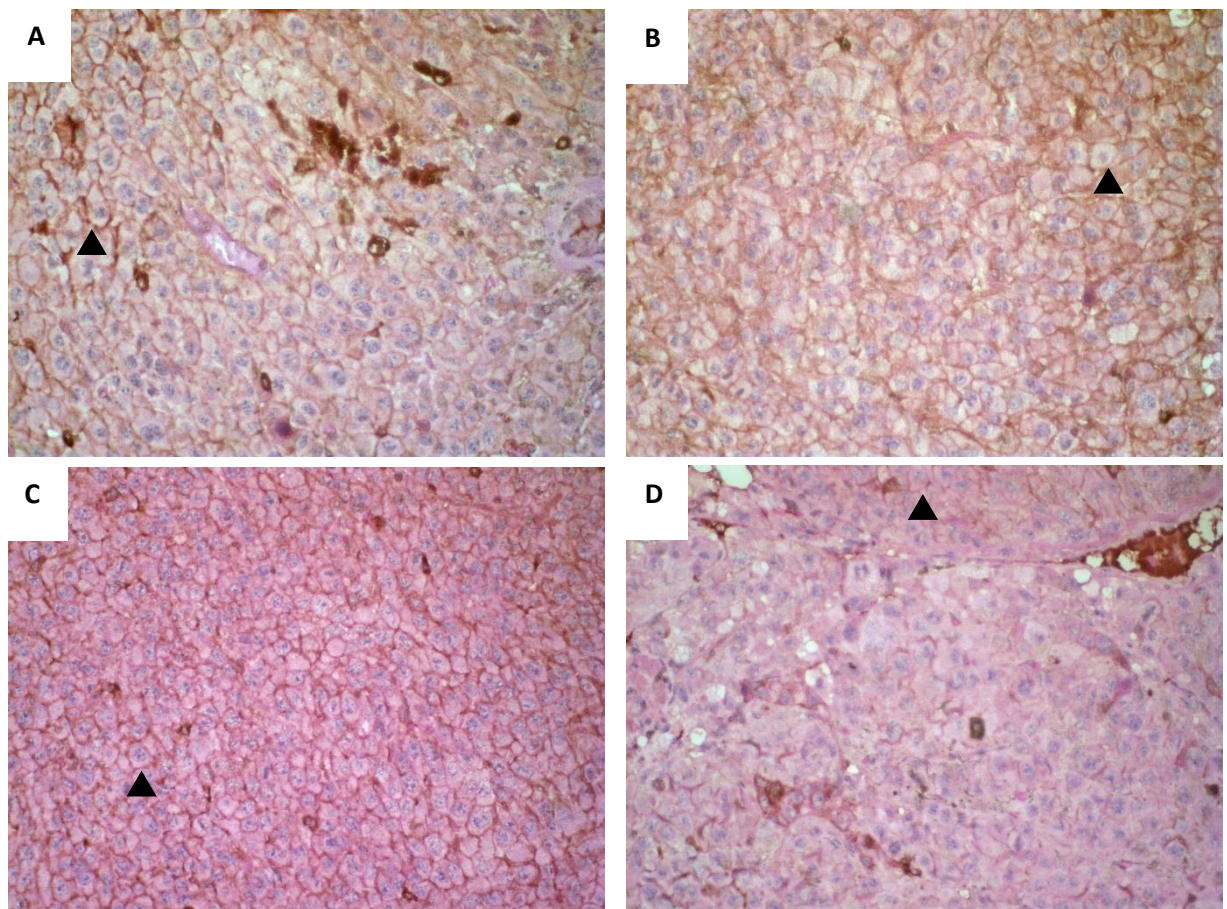


Figura 22. Expressão imunohistoquímica de MMP-14 em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.

(A) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de MMP-14 21 dias após a inoculação de células B16-F10 sem tratamento com doxíciclina. Aumento 40X. (B) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de MMP-14 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 1 μ M. Aumento 40X. (C) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar de MMP-14 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 5 μ M. Aumento 40X. (D) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção membranar fraca de MMP-14 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 10 μ M. Aumento 40X. Ponta de seta: Células neoplásicas com imunomarcção positiva. (E) Frequência de casos com positividade para o anticorpo MMP-14 (Teste de Qui-quadrado).



(E)

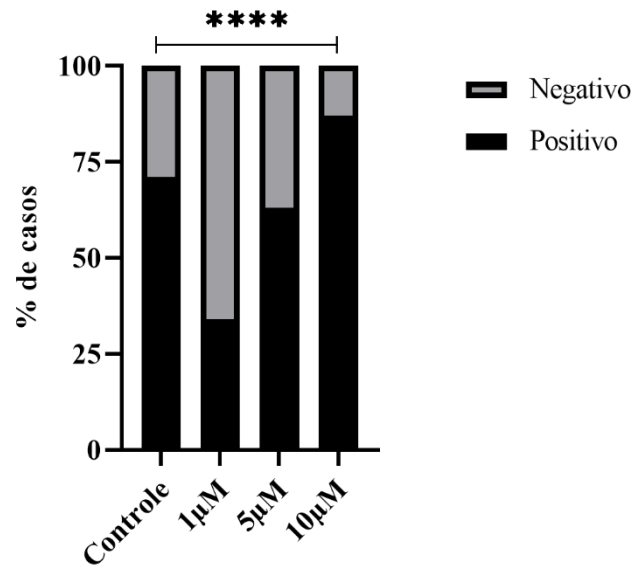
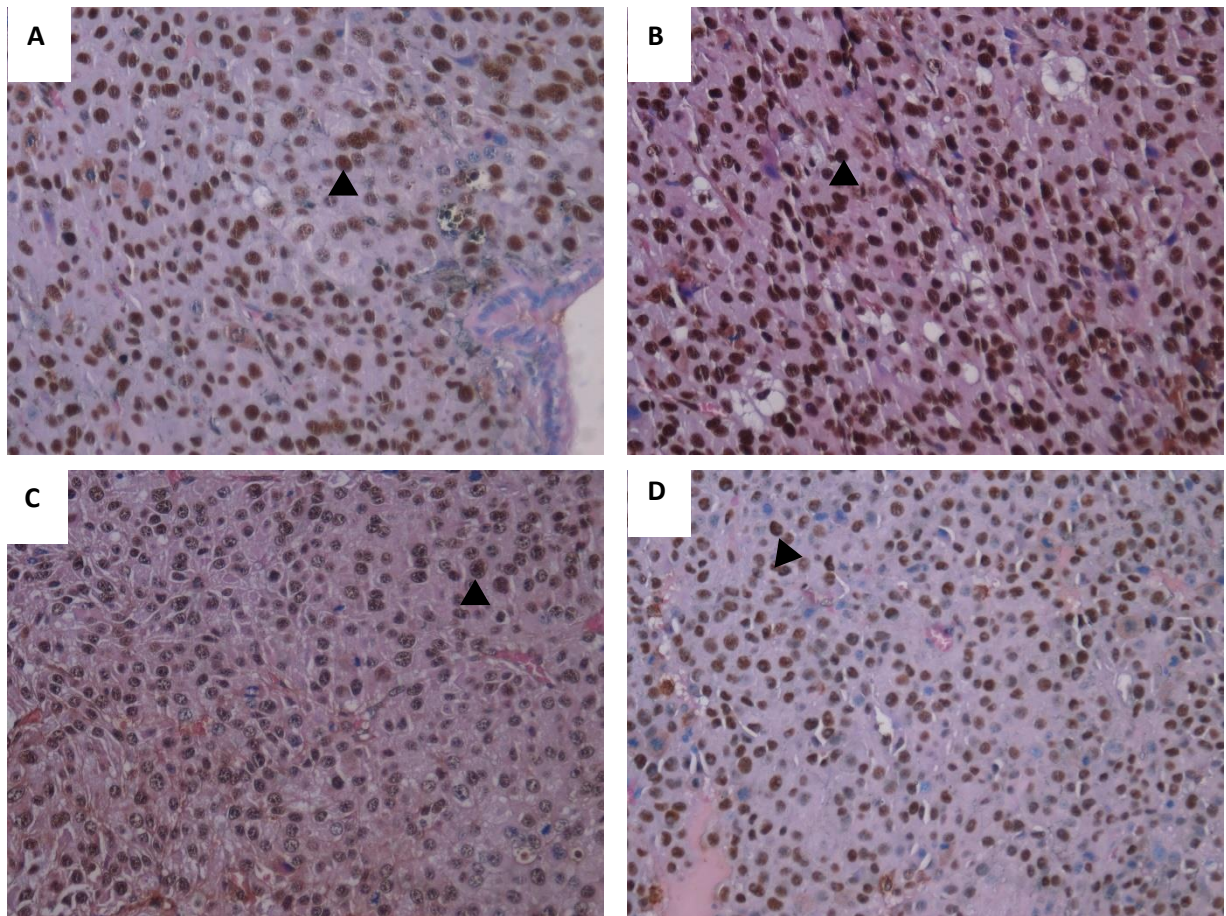
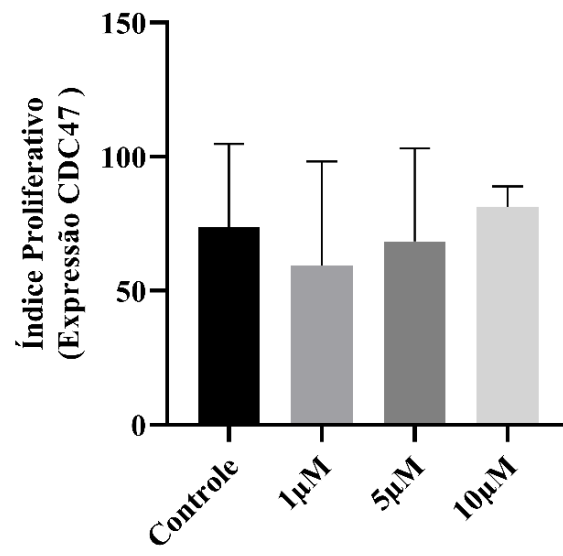


Figura 23. Expressão imunohistoquímica de CDC47 em metástases pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 tratadas ou não com doxíciclina.

(A) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção nuclear de CDC47 21 dias após a inoculação de células B16-F10 sem tratamento com doxíciclina. Aumento 40X. (B) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção nuclear de CDC47 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 1 μ M. Aumento 40X. (C) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção nuclear de CDC47 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 5 μ M. Aumento 40X. (D) Fragmento de pulmão de camundongo C57BL/6 mostrando imunomarcção nuclear de CDC47 após a inoculação de células B16-F10 tratadas com doxíciclina 10 μ M. Aumento 40X. Ponta de seta: Células neoplásicas com imunomarcção positiva. (E) Índice proliferativo das metástases pulmonares (One-way ANOVA).



(E)



7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos que o modelo de melanoma murino B16-F10 representa uma neoplasia com elevada capacidade de disseminação metastática. Assim, buscamos avaliar nesse modelo os efeitos da inibição de metaloproteinases após tratamento com doxiciclina, na viabilidade celular, invasão, migração e ciclo celular tanto no modelo *in vitro* quanto *in vivo*.

Em um aspecto geral, observa-se que o tratamento com doxiciclina *in vitro* promoveu aumento da viabilidade celular sem alteração na proliferação celular, parada do ciclo celular em G1 e não foi capaz de alterar a capacidade migratória e invasiva na linhagem de melanoma B16-F10, além disso, demonstrou potencial inibitório da MMP-9. No modelo *in vivo*, destaca-se a sua capacidade de alterar a expressão de MMP-14 e capacidade proliferativa em implantes pulmonares, comprometendo a função pulmonar dos animais e aumentando a capacidade de implantação metastática.

Inicialmente realizamos o ensaio MTT para descartar efeitos prejudiciais da doxiciclina sobre a viabilidade celular, o que poderia comprometer as avaliações *in vitro* e *in vivo*. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que nenhuma das concentrações de doxiciclina utilizadas, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, apresentou efeitos citotóxicos sobre as células B16-F10. Os efeitos deletérios da doxiciclina não observados nas condições empregadas em nosso estudo, pode ter relação com a dose utilizada bem como o tempo de tratamento, sendo mais frequente sua observação em tratamentos com concentrações mais elevadas, acima de 50 μ M, ou por períodos acima de 48h (DJIK et al., 2020; ROK et al., 2020; ROK et al., 2022).

Curiosamente, nossos dados também demonstram uma maior viabilidade celular em comparação com o controle, após o tratamento com a doxiciclina. Esse dado se difere do evidenciado pela literatura, uma vez que é comprovado que o fármaco inibe a proliferação e viabilidade celular (SUN et al., 2009; ROK et al., 2022).

Rok e colaboradores observaram em linhagem de melanoma COLO 829 aumento da viabilidade celular após tratamento com doxiciclina em 24 e 48 horas e, efeitos citotóxicos em 72 horas com concentrações acima de 50 μ M (ROK et al., 2020). Além disso, Brattsand relatou em linhagem de câncer de próstata que após o tratamento com 10ng/mL de doxiciclina não houve variação na sua viabilidade, entretanto após o tratamento com 100 ng/mL e 1000 ng/mL essa variação foi perceptível (BRATTSAND, 2020). Desse modo, conclui-se que a doxiciclina

diminui a viabilidade das células e inibe a proliferação celular de maneira dependente do tempo de exposição e de concentrações acima do nosso estudo.

A doxíciclina promove efeito citoprotetor em linhagem de células embrionárias pluripotentes e células neuronais por meio da ativação de sinalização PI3K/AKT, envolvidos na sobrevivência celular (SINGH et al., 2012; CHANG et al., 2014). Aliado a isso, é sugerido que as células tumorais em ambientes nutricionalmente comprometidos dependem do metabolismo mitocondrial para o metabolismo energético e sobrevivência (TAN et al., 2017; CASSIM et al., 2020).

Tetraciclinas conhecidamente inibem a síntese de proteínas mitocondriais, levando a uma diminuição dos níveis da subunidade de fosforilação oxidativa e da produção de ATP mitocondrial, inibindo assim a proliferação celular, que é um processo que demanda energia. Por sua vez, a doxíciclina causa diminuição da capacidade de geração de energia mitocondrial nas células neoplásicas consequentemente levando a uma taxa de proliferação marcadamente mais lenta (DJIK et al., 2020; ROK et al., 2020). Em um estudo de Djik e colaboradores com células A549 de carcinoma pulmonar, foi observado que a doxíciclina reduziu o potencial de membrana mitocondrial causando estresse oxidativo. Porém, o tratamento não induziu atividade de caspase 9, 8 ou 3/7 nas células e nem da pró-caspase 3 (DJIK et al., 2020).

De acordo com o resultado encontrado, sugere-se que provavelmente o tratamento com baixas concentrações de doxíciclina pode ter induzido uma disfunção mitocondrial, promovendo adaptação de vias metabólicas e alteração do seu metabolismo energético, levando desse modo ao aumento da viabilidade celular, porém sem relação com aumento da proliferação celular e apoptose.

Como a progressão tumoral está relacionada à expressão de proteínas envolvidas na TEM e expressão de MMPs favorecendo a proliferação desordenada e migração de células neoplásicas, a próxima etapa do trabalho foi avaliar o impacto do tratamento com doxíciclina sobre a capacidade migratória e invasiva das células B16-F10. Os resultados demonstram que o tratamento não foi capaz de alterar a capacidade migratória e/ou invasora das células.

É descrito que a doxíciclina tem um forte efeito inibitório nas células com características mesenquimais, influenciando a FAK e adesão celular, fazendo com que as células percam âncoras durante a migração (QIN et al., 2015). FAK é um componente de sinalização crucial ativado por vários estímulos, incluindo receptores de fator de crescimento, como de fator de

crescimento endotelial e epidérmico e vascular e integrinas, a fim de regular a proliferação, sobrevivência e motilidade em células normais, bem como células tumorais (WANG, et al., 2015). Em estudo com linhagem de melanoma humano WM35 e de camundongo B16-F10, foi observado que doxíciclina inibiu a adesão e a migração por meio da regulação negativa da via de sinalização FAK (SUN et al., 2009).

Contudo, o processo de migração e invasão é complexo e depende de um processo coordenado que envolve mudanças rápidas no citoesqueleto, alteração da adesão celular, perda de expressão de marcadores epiteliais e ganho de marcadores mesenquimais (SUN et al., 2009). É possível que a não alteração da migração e invasão possa ser devido à pressão seletiva durante o processo do tratamento com a doxíciclina, ou aumento da geração de quimiocinas de células tumorais, bem como de alterações relacionadas a transição epitelial-mesenquimal ou vias de sinalização relacionadas a adesão celular (SUN et al., 2009; QIN et al., 2015).

Além disso, a expressão de receptores de motilidade são frequentemente alterados à medida que as células tumorais se tornam metastáticas e invasivas. Entretanto, nas variantes invasivas do melanoma B16, a expressão de receptores de motilidade como $\beta 1$ integrina e CD44 permanecem inalterados (RANJAN, BANE & KALRAIYA, 2014; RANJAN & KALRAIYA, 2014). Ademais, hipotetiza-se a possibilidade da linhagem B16-F10 possuir uma baixa capacidade de metastatização e maior capacidade de implantação.

Já foi evidenciado em linhagem de câncer de pulmão que a doxíciclina aumenta os níveis de e-caderina e diminui a expressão de vimentina. Ainda, estudos de ativação do promotor e proteômica após o tratamento com doxíciclina revelaram que inibe a atividade de fatores de transcrição relacionado à transição epitelial-mesenquimal, como Twist1, Twist2, SNAI1 e 2, STAT-3, e NF- κ B, exercendo seu efeito antitumoral interferindo na TEM da célula tumoral. Essas descobertas mostram que a doxíciclina possivelmente pode influenciar na transdução de sinais relacionados à TEM para inibir funções como migração celular, manutenção do citoesqueleto, proliferação celular, adesão e diferenciação (QIN et al., 2015).

Nossos resultados do ciclo celular demonstram que a doxíciclina nas concentrações usadas para tratamento, levou a um perfil com predominância de células na fase G0/G1 do ciclo celular, corroborando o descrito na literatura. É relatado que as tetraciclinas de modo geral, em concentrações usadas para tratamento antibacteriano causam uma parada do ciclo celular G1 *in vitro* e suprimem o crescimento de vários tumores *in vivo*, por bloquear a síntese de proteínas,

reduzir o fornecimento de ATP e perturbar o metabolismo energético (VAN DEN BOGERT, et al., 1986; DJIK et al., 2020; ROK et al., 2020).

Com o objetivo de avaliar se a doxíciclina inibe a MMP-9 foi realizado o ensaio para avaliação da sua capacidade de atividade gelatinolítica. Os resultados das análises da zimografia para avaliação dos efeitos do tratamento com as diferentes concentrações da doxíciclina, demonstraram que foi capaz de diminuir ou inibir a atividade da MMP-9 nos tempos de estudo. Esses resultados consolidam a literatura de que a doxíciclina possui de fato, a capacidade de inibir a atividade das metaloproteinases, principalmente a MMP-2 e MMP-9 (CATON & RYAN, 2011; VANDENBROUCKE & LIBERT, 2014).

Modelos *in vivo* e *in vitro* diferem-se em termos de complexidade, desse modo para relacionar as análises *in vitro* com potencial *in vivo*, utilizou-se o modelo de implantação neoplásica pulmonar de células B16-F10, previamente tratadas com doxíciclina, em camundongos C57BL/6.

Foi realizada a avaliação da expressão e localização das proteínas MMP-9, MMP-14, CD44, CD44-ICD e índice proliferativo (CDC47) nos implantes pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados na veia caudal com células B16-F10 previamente tratadas com doxíciclina. Os resultados da imunohistoquímica revelam imunomarcagem citoplasmática reduzida de MMP-9 em todos os grupos analisados, baixa expressão membranar de MMP-14 e CD44 nos pulmões de animais que receberam células tratadas com a doxíciclina quando comparados ao controle, e ainda, relação entre as doses mais elevadas de doxíciclina com diminuição da expressão do CD44-ICD. Além disso, demonstram a relação entre aumento do índice proliferativo com a expressão de metaloproteinases e áreas afetadas por metástases pulmonares.

As metaloproteinases estão envolvidas em diversas fases da progressão tumoral, desde fases iniciais no tumor primário até fases mais avançadas, como intravasão e extravasão de vasos sanguíneos e estabelecimento no nicho metastático (WINER et al., 2018; LAZAR et al., 2024). Em estudos em linhagens de melanoma verificando a ação da doxíciclina e sua possível ação inibitória de MMPs, foi demonstrado que age na viabilidade, migração celular e inibe a atividade da MMP-2 e 9, além de alterar a atividade e expressão das outras MMPs (SUN et al., 2007; SUN et al., 2009). Nossas análises imunohistoquímicas revelam diminuição na expressão da MMP-9 e 14 nos implantes pulmonares dos animais que receberam células tratadas com a

doxíciclina em comparação com o grupo sem tratamento. Esses resultados confirmam os outros estudos em linhagem de melanoma, e notadamente ainda demonstram que a doxíciclina possui capacidade de diminuir a expressão de MMP-14 na linhagem murina B16-F10.

CD44 medeia múltiplas vias de sinalização incluindo proteínas quinases, ativando fatores de transcrição e modulando a arquitetura do citoesqueleto, induzindo transição epitelial-mesenquimal, invasão, proliferação, crescimento e metástase (CHEN et al., 2018). Nossos dados evidenciam que a forma padrão do CD44 encontra-se superexpressa nas células B16-F10 e que a interação entre MMP-14 e CD44 promove a migração e implantação celular pulmonar por meio de mecanismo que depende da clivagem do ectodomínio e geração do fragmento intracitoplasmático (MEDRANO-GONZÁLEZ et al., 2021). O CD44-ICD translocado para o núcleo age como fator de transcrição, regulando a expressão de diversos genes como do próprio CD44 por mecanismo de *feedback* positivo, MMP-9, NOTCH1, RANKL, importantes para as vias de proliferação, diferenciação celular e também de implantação em sítio metastático (MILETTI-GONZÁLEZ et al., 2012; SENBANJO & CHELLAIAH, 2017; MEDRANO-GONZÁLEZ et al., 2021).

Os resultados imunohistoquímicos demonstram e confirmam que o mecanismo de formação do domínio intracitoplasmático por meio da clivagem do CD44 pela MMP-14, promoveu maior implantação de células neoplásicas e, ainda favoreceu vias de proliferação celular nos implantes pulmonares de camundongos C57BL/6 após o tratamento prévio das células B16-F10 com doxíciclina.

Com o objetivo de avaliar as modificações fisiológicas das funções pulmonares após 21 dias de inoculação tumoral, foi realizada a mecânica pulmonar pela técnica de espirometria forçada.

A partir dos nossos resultados, observamos que as formações neoplásicas nos pulmões causaram perda de área respiratória, conforme indicado pela redução significativa nos valores de FVC, IC, Cdyn e FEV100, e aumento na RI. Resultados esses, compatíveis com os achados da mensuração da área afetada por metástases, de maior implantação pulmonar após o tratamento prévio com doxíciclina. No teste de função pulmonar observamos que os animais que receberam células submetidas ao tratamento com doxíciclina apresentaram alteração no fluxo das vias aéreas, perda de área respiratória e redução da elasticidade do tecido como consequência de intensa lesão parenquimatosa e edema (NOGUEIRA et al., 2016).

O presente trabalho mostra que o uso de doxíciclina para regulação da atividade de metaloproteinases pode influenciar o potencial migratório, invasivo e metastático do melanoma, reforçando a importância das metaloproteinases e a clivagem do CD44 na progressão neoplásica. Contudo, estudos terapêuticos *in vivo* são necessários para melhor estabelecer o papel da doxíciclina no desenvolvimento neoplásico. Além disso, ter em vista vias moleculares e de sinalização associadas à clivagem do CD44 pelas MMPs pode fornecer mais informações e estratégias para o tratamento do melanoma.

8. CONCLUSÕES:

A partir dos achados nesse estudo podemos concluir que:

- A doxíciclina, nas condições utilizadas, não promoveu comprometimento a viabilidade celular, proliferação celular e não foi capaz de alterar a capacidade migratória e invasiva da linhagem B16-F10;
- A doxíciclina, nas condições utilizadas promoveu diminuição ou inibição da atividade gelanólítica da MMP-9 na linhagem B16-F10;
- O implante pulmonar de células B16-F10, previamente tratadas com doxíciclina, compromete a função pulmonar dos camundongos C57BL/6, com alteração no fluxo das vias aéreas, perda de área respiratória e redução da elasticidade do tecido;
- O tratamento *in vitro* com doxíciclina de células B16-F10, nas concentrações estudadas, promoveu significativo desenvolvimento de implantes pulmonares, em camundongos C57BL/6, após a inoculação celular pela veia caudal;
- Em implantes pulmonares de células B16-F10, previamente tratadas *in vitro* com doxíciclina, observa-se baixa expressão MMP-9, menor expressão de MMP-14, sem afetar o índice de expressão de CDC47;
- Em implantes pulmonares de células B16-F10, previamente tratadas *in vitro* com doxíciclina, a menor expressão MMP-9 de MMP-14 apresenta correlação com uma menor proliferação celular (definida pela expressão de CDC47);
- Em implantes pulmonares de camundongos C57BL/6 inoculados na veia caudal com células B16-F10, o tratamento com as diferentes concentrações de doxíciclina reduziu a expressão do CD44 e não foi capaz de alterar relevantemente a expressão do CD44-ICD.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, N.R. et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. **The Journal of the American Medical Association**, v.222, n. 22, p.: 2771- 2776, 2004
- AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 2015.
- ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, p. 415–421, 2013.
- ALI, Z. et al. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **EJC Supplements**, v. II, p. 81-91, 2013.
- AMĂLINEI, C. et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 51, n. 2, p.: 215–228, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Key Statistics for Melanoma Skin Cancer**. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/types/melanoma-skin-cancer/about/keystatistics.html> > Acesso em: 28 jun. 2024.
- ARRANGOIZ, R. et al. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Journal of Cancer Treatment and Research**, v. 4, p. 1-15, 2016.
- ARAÚJO, R.V.S. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82-88, 2011.
- ARIF, K. et al. The role of Nanog expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells. **OncoTargets and Therapy**, v.8, p.: 1327–1234, 2015.
- ARSENIS, C.A. et al. Inhibition of neutral metalloproteinase activities (MTP) in epiphyseal and articular cartilages by tetracyclines (TETs) both in vivo and in vitro. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 15:268, 1990.
- ARRANGOIZ, R. et al. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Journal of Cancer Treatment and Research**, v. 4, p. 1-15, 2016.
- BAHRAMI, F. et al., 2012. Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n.1, p.: :44-52, 2012.
- BASTIAN, B. C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p.: 239–271, 2014.
- BELL, M.V.; SCREATON, G.R. “Influence of intron length on alternative splicing of CD44, **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 10, p.: 5930–5941, 1998.
- BERA, A. et al. Oncogenic K-Ras and loss of Smad4 mediate invasion by activating an EGFR/NF-κB Axis that induces expression of MMP9 and uPA in human pancreas progenitor cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
- BERKELHAMMER, J. et al. Development of a new melanoma model in C57BL/6 mice. **Cancer Research**, v. 42, p.: 3157–3163, 1982.
- BHAT-NAKSHATRI, P. et al. SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. **BMC Cancer**, v. 10, n.411, 2010.

- BIRCH, M. et al. Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. **Cancer Research**, v. 51, p.: 6660-6607, 1991.
- BOBEK, ET AL., A Clinically Relevant, Syngeneic Model of Spontaneous, Highly Metastatic B16 Mouse Melanoma. **Anticancer Research**, v. 30, p.: 4799-4804, 2010.
- BONJOL, M. et al. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 345, n. 4757, 2012.
- BORGHI, A.A.; PALMA, M.S.A. Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, 2014.
- BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology**, v. 20, p.:161–168, 2010.
- BOURGUIGNON, L. Y. et al. Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. **Advanced Cancer Research**, v. 123, p.: 255-275, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitative estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRATTSSAND, M. Doxycycline at low concentrations could influence your experimental results when working with prostate cancer cell lines. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 28, n. 2, p.: 21515-21519, 2020.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of Surgery**, v. 172, n. 5, p. 902–908, 1970.
- BROWN, R.L. et al. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 3, p.:1064–1074, 2011.
- CASSIM, S. et al. Warburg and beyond: the power of mitochondrial metabolism to collaborate or replace fermentative glycolysis in cancer. **Cancers**, v. 12, n. 5, p.: 1119, 2020.
- CATHCART, J.M.; CAO, J.; BROOK, S. MMP inhibitors: past, present and future. **Frontiers in Bioscience**, v. 20, p.:1164–78, 2015.
- CATON, J.; RYAN, M.E. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). **Pharmacological Research**, v. 63, n. 2, p.: 114-120, 2011.
- CHANG, M.Y. et al. Doxycycline enhances survival and self-renewal of human pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 2, p.: 353-364, 2014.
- CHAUDHARY, A.K., et al. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant lesions of the head and neck. **Journal of Biomedical Science**, v.17, n. 10, 2010.

- CHEN, C. et al. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 64, 2018.
- CHETTY, C. et al. MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 2, p.: 549–559, 2012.
- CHO, Y. et al. Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer. **ONCOTARGET**, v. 6, n. 11, p.: 8709–8721, 2015.
- CHUKWUDI, C.U. rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracyclines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p.: 4433–4441, 2016.
- CLARK, W. H. et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer research**, v. 29, n. 3, p. 705–27, 1969.
- CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R.A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v.147, p.:1–73, 2017.
- DAMSKY, W. E.; THEODOSAKIS, N.; BOSENBERG, M2. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. **Oncogene**, v. 33, n. 19, p. 2413–2422, 2014.
- DANKNER, M. et al. Classifying BRAF alterations in cancer: New rational therapeutic strategies for actionable mutations. **Oncogene**, v. 37, n. 24, p. 3183–3199, 2018.
- DIETRICH, A. et al. High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. **European Journal of Cancer**, v. 33, p. 926–930, 1997.
- DIJK, S.N. et al. Mitochondria as target to inhibit proliferation and induce apoptosis of cancer cells: the effects of doxycycline and gemcitabine. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p.: 4363, 2020.
- ERDMANN, F. et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk? **International Journal of Cancer**, v. 132, p.: 385–400, 2013.
- FAIRCHILD, E.T.; CARSON, W.E. Animal Models of Melanoma. Tumor Models in Cancer Research. **Humana Press**, p.: 259–285, 2011.
- FALZONE, L. et al. MMP-9 overexpression is associated with intragenic hypermethylation of MMP9 gene in melanoma. **Aging**, v. 8, p.: 933–944, 2016.
- FÄNDER, J. et al. Characterizing CD44 regulatory microRNAs as putative therapeutic agents in human melanoma. **Oncotarget**, v. 10, n. 60, p.: 6509–6525, 2019.
- FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893– 2917, 2010.
- FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, n. 118, p. 148–149, 1973.
- FIDLER, I.; KRIPKE, M. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. **Science**, v. 80.; n. 197, p.: 893–895, 1977.
- FIDLER, I.J. The biology of cancer invasion and metastasis. **Advanced Cancer Research**, v. 28, p.: 149–250, 1978.

- FITZPATRICK, T. B., The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 6, p. 869-871, 1988.
- FOLGUERAS, A.R. Matrix metalloproteinases in cancer: from new function to improved inhibition strategies. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 48, p.: 411–24, 2004.
- GAGGIOLI, C., SAHAI, E. Melanoma invasion – current knowledge and future directions. **Pigment Cell Research**, v. 20, p.: 161–172, 2007.
- GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. **European Journal of Cancer**, v. 41, p.: 28–44, 2005.
- GAO, Y. et al. Up-regulation of CD44 in the development of metastasis, recurrence and drug resistance of ovarian cancer. **Oncotarget**, v.6, n. 11, p.:9313–9326, 2015.
- GARNETT, M. J.; MARAIS, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer Cell**, v. 6, n. 4, p. 313–319, 2004.
- GERSHENWALD, J. E. et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 6, p. 472–492, 2017.
- GASBARRI, A. et al. CD44s adhesive function spontaneous and PMA-inducible CD44 cleavage are regulated at post-translational level in cells of melanocytic lineage. **Melanoma Research**, v.13, n. 4, p.: 325–337, 2003.
- GIALELI, C.; THEOCHARIS, A.D.; KARAMANOS, N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **FEBS Journal**, v. 278, p.:16–27, 2011.
- GIOVANELLA, B.C. et al. Heterotransplantation of human cancers into nude mice: a model system for human cancer chemotherapy. **Cancer**, v. 42, p.: 2269– 2281, 1978.
- GLOBOCAN. Global Cancer observatory. Cancer Tomorrow. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?types=0_1&sexes=1_2&mode=cancer&group_populations=0&multiple_populations=0&multiple_cancers=1&cancers=16&populations=900&apc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5. Acesso em: 01 jul 2024.
- GOLDSCHMIDT, M.H. et al. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. **World Health Organization International Classification of Tumors of Domestic Animals**. p. 38–41, 1998.
- GOLUB, L.M. et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity: a new mechanism in the treatment of periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**,v. 19:651–655, 1984.
- GONZALEZ-AVILA, G. et al. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 137, p.:57–83, 2019.
- GRIEWANK, K. G. et al. Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 2, 2014.
- GRIFFIN, M.O. et al. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 299, n. 3, p.:539-548, 2010.

- GUARNERI, C. et al. NF- κ B inhibition is associated with OPN/MMP-9 downregulation in cutaneous melanoma. **Oncology Reports**, v. 37, p.: 737–746, 2017.
- GUPTA, A. et al. Promising noninvasive cellular phenotype in prostate cancer cells knockdown of matrix metalloproteinase 9. **Scientific World Journal**, v. 493689, 2013.
- HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, n. 2, p. 153–163, 2005.
- HODIS, E. et al. A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell**, v. 150, p.: 251–263, 2012.
- HOFMANN, U.B. et al. Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 15, n. 3, p. 337–344, 2000.
- HONG, C.-H.; HO, J.-C.; LEE, C.-H. Steroid receptor RNA activator, a long noncoding RNA, activates p38, facilitates epithelial-mesenchymal transformation, and mediates experimental melanoma metastasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 7, p. 1355–1363.e1, 2020.
- HRABEC, E. et al. Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates—intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors. **Postepy Biochemistry**, v.53, p.:37–45, 2007.
- HU, X.; BEETON, C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. **The Journal of Visualized Experiments**, v.45, p. 2445, 2010.
- IN 'T HOUT, F. E. M. et al. Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma. **Annals of Surgery**, v. 255, n. 6, p. 1165–1170, 2012.
- INCA. Estimativa 2016 - **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde, 2015.
- INCA. **Câncer de pele melanoma**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>>. Acesso em: 29 jun. 2024.
- JABŁON'SKA-TRYPUC' et al. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, p.: 177–183, 2016.
- JACKSON, H.W. et al TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 1, p.:38–53, 2017.
- JANG, B.I.; LI, Y.; GRAHAM, D.Y.; CEN, P. The role of CD44 in the pathogenesis, diagnosis, and therapy of gastric cancer. **Gut and Liver**, v. 5, n. 4, p.:397–405, 2011.
- JIAO, Y., et al. 2012. Matrix metalloproteinase-2 promotes alphavbeta3 integrin-mediated adhesion and migration of human melanoma cells by cleaving fibronectin. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.
- JIN, L. et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. **Nature Medicine**, v. 12, p.: 1167–1174, 2006.

KARJALAINEN, J.M. et al. Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. **The American Journal of Pathology**, v. 157, p.: 957-965, 2000.

KIBBI, N.; KLUGER, H.; CHOI, J. N. Melanoma: Clinical Presentations. In:

KAUFMAN, H. L.; MEHNERT, J. M. (Eds.). **Melanoma**. Cancer Treatment and Research. Cham: Springer International Publishing, v. 167p. 107–129, 2016.

KESSENBROCK, K. et al. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumour microenvironment. **Cell**, v.141,p.52–67, 2010.

KONDRATIEV, S. et al. Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. **Human Pathology**, v. 39, p.: 337–343, 2008.

KURCHAT, P. et al. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. **Journal of Pathology**, v. 197, p.: 179–187, 2002.

KUZU, O. F. et al. Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 8, n. S1, p. 81–94, 2015.

KWONG, L.N.; DOVE, W.F. APC and its modifiers in colon cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 656, p.:85–106, 2009.

LARUE, L.; BEERMANN, F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. **Pigment Cell Research**, v.20, p.: 485–49, 2007.

LAZAR, A.M. et al. Skin Malignant Melanoma and Matrix Metalloproteinases: Promising Links to Efficient Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 14, p. 7804, 2024.

LEBOIT, F.E. et al. World health organization classifications of tumors. In: Pathology and genetics of skin tumors. **International Agency for Research on Cancer**, 3ª Edição, v. 6, 2006.

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

LEUNG, E.L. et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. **PLoS One**, v. 5, n. 11, 2010.

LI, J.; ZHOU, B.P. Activation of beta-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. **BMC Cancer**, v. 11, p.:4 9, 2011.

MARC MANSOUR ET al. Therapy of established B16-F10 melanoma tumors by a single vaccination of CTL/T helper peptides in VacciMax®. **Journal of Translational Medicine**, v. 5, n.20, 2007.

MARIN-AGUILERA, M. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition mediates docetaxel resistance and high risk of relapse in prostate cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 5, p.: 1270–1284, 2014.

MASUI, T. et al. Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. **International Journal of Oncology**, v.44, n. 3, p.:693–699, 2014.

MCFARLANE, S. et al. CD44-mediated activation of $\alpha 5 \beta 1$ -integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and Fibronectin-enriched matrices. **Oncotarget**, v. 6, n. 34, p.:36762–36773, 2015.

MCKINNEY, A.J.; HOLMEN, S.L. Animal models of melanoma: a somatic cell gene delivery mouse model allows rapid evaluation of genes implicated in human melanoma. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 3, p.:153–162, 2011.

MEDRANO-GONZÁLEZ et al. Proteolytic Processing of CD44 and Its Implications in Cancer. **Stem Cells International**, p.: 1-12, 2021.

MELNIKOVA, V.O. et al. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. **Oncogene**, v. 23, n. 13, p.:2347–2356, 2004.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. **Melanoma. New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 2006.

MILETTI-GONZÁLEZ, K. E. et al. Identification of function for CD44 intracytoplasmic domain (CD44-ICD): modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) transcription via novel promoter response element. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, p. 18995–19007, 2012.

MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. **Development**, v. 142, n. 4, p. 620-632, 2015.

MOUW, J.K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Molecular and Cellular Biology**, v.15, p.771-785, 2014.

MUÑOZ-COUSELO, E. et al. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. **OncoTargets and Therapy**, v.10, p.: 3941–3947, 2017.

NAKAMURA, K. et al. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, n. 7, p. 791–798, 2002.

NAOR, D. et al. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 4, p. 260–267, 2008.

NAPOLI et al. Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma. **Cells**, v. 9, n. 5, p.: 1151, 2020.

NOEL, A.; JOST, M.; MAQUOI, E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, p.: 19:52–60, 2008.

NOGUEIRA, D.S. et al. Multiple exposures to *ascaris suum* induce tissue injury and mixed th2/th17 immune response in mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, 2016.

NOONAN, F. P. et al. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. **Nature Communications**, v. 3, p. 810–884, 2012.

PARRA, L.M. et al. Growth factor and co-receptor release by structural regulation of substrate metalloprotease accessibility. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

PAYETTE, M.J. et al. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report. **Clinics in dermatology**, v. 27, n. 1, p. 53-74, 2009.

PIRES, I. et al. Expression in Canine Cutaneous Melanocytic Tumours: Evidence of a Relationship with Tumoral Malignancy. **In: Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma**. IntechOpen 2013.

POLTAVETS, V. et al. The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. **Frontiers in Oncology**, v., 8, p.: 431, 2018.

POTTEZ, M. et al. Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. **PLOS One**, v. 13, n. 11, 2018.

QIN, Y. et al. Doxycycline reverses epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses the proliferation and metastasis of lung cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 38, p.: 40667-40679, 2015.

RANJAN, A.; BANE, S.M.; KALRAIYA, R.D. Glycosylation of the laminin receptor ($\alpha 3 \beta 1$) regulates its association with tetraspanin CD151: Impact on cell spreading, motility, degradation and invasion of basement membrane by tumor cells. **Experimental Cell Research**, v. 322, n. 2, p. 249-264, 2014.

RANJAN, A.; KALRAIYA, R.D. Invasive Potential of Melanoma Cells Correlates with the Expression of MT1-MMP and Regulated by Modulating Its Association with Motility Receptors via N-Glycosylation on the Receptors. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 804680, 2014.

RASTRELLI, M. et al. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. **In: In vivo**, n. 28, p. 105-1012, 2014.

ROK, J. et al. The anticancer potential of doxycycline and minocycline-a comparative study on amelanotic melanoma cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p.: 831, 2022.

ROK, J. et al. Cytotoxic and proapoptotic effect of doxycycline – An in vitro study on the human skin melanoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 65, 2020.

ROSS, J.S. et al. Decreased CD44 standard form expression correlates with prognostic variables in ovarian carcinomas. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 116, n. 1, p.: 122–128, 2001.

ROTZER, V. et al., Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 1, p.: 301-310, 2016.

ROY, R. et al. Metalloproteinases and Their Roles in Human Cancer. **The Anatomical Record**, v.303, n.6, p. 1557-1572, 2020.

RUIZ, P.; SCHWÄRZLER, C.; GÜNTHER, U. CD44 isoforms during differentiation and development. **BioEssays**, v. 17, n. 1, p.: 17–24, 1995.

RUSSO, R.C. et al. The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2+ and CCR5+ IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells in mice. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 314, p.:1010–25, 2018.

SAPADIN, A.N.; FLEISCHMAJER, R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p.: 258–65, 2006.

SATO, H.; TAKINO, T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. **Cancer Science**, v. 101, p.: 843–847, 2010.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature reviews Disease primers**, v. 1, n. 1, p. 1-20, 2015.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018.

SCHATTON, T. et al. Identification of cells initiating human melanomas. **Nature**, v. 451. n. 7176, p. 345–349, 2008.

SCHERER, D.; KUMAR, R. Genetics of pigmentation in skin cancer: a review. **Mutation Research**, v. 705, n. 2, p. 141-153, 2010.

SENBANJO, L.T.; CHELLAIAH, M.A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, 2017.

SENBANJO, L.T. et al. Characterization of CD44 intracellular domain interaction with RUNX2 in PC3 human prostate cancer cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p.: 80, 2019.

SHIRURE V. S. et al. CD44 variant isoforms expressed by breast cancer cells are functional E-selectin ligands under flow conditions. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 308, n. 1, p.: 68–78, 2015.

SINGH, A.M. et al. Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 3, p.: 312–326, 2012.

SITUM, M. et al. Melanoma—clinical, dermatoscopic, and histopathological morphological characteristics. **Acta Dermatovenereologica Croatica**, v. 22, n. 1, p. 2-2, 2014.

SMITH, G. N. JR.; BRANDT, K.D.; HASTY, K.A. Activation of recombinant human neutrophil procollagenase in the presence of doxycycline results in fragmentation of the enzyme and loss of enzyme activity. **Arthritis & Rheumatology**, v. 39, p.:235–44, 1996.

SMITH, G.N. et al. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline. **Arthritis & Rheumatology**, v. 42, n. 6, p.: 1140–1146, 1999.

SMOLLER, B. R. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. **Modern Pathology**, v. 19, n. S2, p. S34–S40, 2006.

- SNEATH, R.J.S.; MANGHAM, D.C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. **Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology**, v. 51, p.: 191–200, 1998.
- SORSA, T. et al. Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival, and salivary collagenases: a functional and western-blot assessment with special reference to their cellular sources in periodontal diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 732, p.:112–131, 1994.
- SU, Y.J. et al. Direct reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44. **EMBO Journal**, v. 30, n. 15, p.:3186–3199, 2011.
- SUN, B. et al. Doxycycline influences microcirculation patterns in B16 melanoma. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 10, p.: 1300-1307, 2007.
- SUN, T. et al. Doxycycline inhibits the adhesion and migration of melanoma cells by inhibiting the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK). **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p.: 141-150, 2009.
- TAN, Q. et al. Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative damage by antibiotic drug doxycycline enhances the responsiveness of glioblastoma to chemotherapy. **Medical Science Monitor**, v. 23, p.: 4117-4125, 2017.
- TATE, J.G et al. COSMIC: The Catalogue of Somatic Mutations In Cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p.:941–947, 2019.
- TEICHER, B.A. Tumor Models in Cancer Research. **Humana Press**, 2010.
- THORNE, R.F.; LEGG, J.W.; ISACKE, C.M. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in coordinating adhesive and signalling events. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 3, p.: 373–380, 2004.
- TREMMELE, M. et al. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. **Blood**, v. 114, n. 25, p.: 5236–5244, 2009.
- TUCK, A. B.; CHAMBERS, A. F.; ALLAN, A. L. Osteopontin overexpression in breast cancer: knowledge gained and possible implications for clinical management. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, p.: 859–868, 2007.
- UCHINO, M. et al. Nuclear beta-catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive MCF-7 breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 10, n. 414, 2010.
- UNGEFROREN, H. et al. Interaction of tumor cells with the microenvironment. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.9, n. 18, 2011.
- VANDENBROUCKE, R.E.; LIBERT, C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, p.: 904–27, 2014.
- VAN DEN BOGERT, C. et al. Inhibition of mitochondrial protein synthesis leads to proliferation arrest in the G1-phase of the cell cycle. **Cancer Letters**, v. 32, n. 1, p.: 41-51, 1986.
- VELOSO, E.S. et al. Epithelial-mesenchymal transition inhibition by metformin reduces melanoma lung metastasis in a murine model. **Scientific Reports**, v.12, n.1, p.: 17776, 2022.
- VIHINEN, P.; KAHARI, V.M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. **International Journal of Cancer**, v. 99, p.: 157–66, 2002.

- VISSE, R. & NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.
- WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3028, 2018.
- WANG, C. et al. Doxycycline inhibits leukemic cell migration via inhibition of matrix metalloproteinases and phosphorylation of focal adhesion kinase. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 3, p.: 3374-3380, 2015.
- WATT, F.M.; FUJIWARA, H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, 2011.
- WINER, A.; ADAMS, S.; MIGNATTI, P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures into Future Successes. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.17, n. 6, p.: 1147-1155, 2018.
- WU, K. et al. Silibinin inhibits beta-catenin/ZEB1 signaling and suppresses bladder cancer metastasis via dual-blocking epithelial-mesenchymal transition and stemness. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 12, p.: 2625–2633, 2013.
- XU, G.F. et al. Combined epithelial-mesenchymal transition with cancer stem cell-like marker as predictors of recurrence after radical resection for gastric cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 12, n. 368, 2014.
- XUE, M.; JACKSON, C.J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 4, p.: 119–136, 2015.
- YADAV, L. et al Matrix metalloproteinases and cancer – roles in threat and therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p.: 1085–1091., 2014.
- YAMAGUCHI, H.; SAKAI, R. Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion. **Cancers**, v. 7, n.4, p. 2054-2062, 2015.
- YAN, Y.L. et al. Synthesis of hydroxypyrrone- and hydroxythiopyrrone-based matrix metalloproteinase inhibitors: developing a structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p.: 1970–1976, 2009.
- YAN, Y.; ZUO, X.; WEI, D. Concise review: emerging role of CD44 in cancer stem cells: a promising biomarker and therapeutic target. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 4, n. 9, p.: 1033–1043, 2015.
- YANG, J. et al. Pharmacodynamic considerations in the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 12, n. 2, p. 191-200, 2016.
- YU, G. et al. MicroRNA-34a functions as an anti-metastatic microRNA and suppresses angiogenesis in bladder cancer by directly targeting CD44. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 779, 2014.
- ZEHIR, A. et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. **Nature Medicine**, v. 23, n. 6, p. 703–713, 2017.

ZHAO, X.; BENVENISTE, E.N. Transcriptional activation of human matrix metalloproteinase-9 gene expression by multiple co-activators. **Journal of Molecular Biology**, v. 383, p.: 945–956, 2008.

ZHAO, L.H. *et al.* CD44v6 expression in patients with stage II or stage III sporadic colorectal cancer is superior to CD44 expression for predicting progression. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.8, p. 692-701, 2015.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG)

Figura 24. Carta de aprovação do CEUA/UFMG

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a): Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação. Protocolo CEUA: 188/2020 Título do projeto: Relação entre a expressão de CD44-ICD e a inibição de metaloproteinase na progressão de melanomas: estudo in vitro e in vivo Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Enio Ferreira Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas Departamento: Departamento de Patologia	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião on-line do dia 09/11/2020. Validade: 09/11/2020 à 08/11/2025 Belo Horizonte, 11/11/2020.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/ Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br	

ANEXO B - Produção Científica

Title: Doxycycline Modulates Cellular Behavior and Metalloproteinase Expression in Murine Melanoma: Insights from *In Vitro* and *In Vivo* B16-F10 Models.

Running title: *In Vitro* and *In Vivo* Effects of Doxycycline in a Murine Melanoma Model

Authors: Bruna M. Lima^a, Emerson S. Veloso^a, Bárbara A. Carvalho^a, Felipe H. S. Silva^a, Pedro H. D. M. Prazeres^a, Vitor H. S. R. Silva^a, Stela M. Quirino^a, Déborah S. Vieira^a, Geovanni D. Cassali^b, Remo C. Russo^c, Miriam T. P. Lopes^d, Kátia M. Freitas^d, Helen L. Del Puerto^a e Enio Ferreira^a

^a Cell Behavior Laboratory, Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^b Comparative Pathology Laboratory, Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^c Immunology and Pulmonary Mechanic Laboratory, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^d Antitumor Substances Laboratory, Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding Author: Dr. Enio Ferreira. Cell Behavior Laboratory, Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais.

Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Email: enioferreira@icb.ufmg.br.

Conflicts of Interest

There are no conflicts of interest.

Funding Source

This work received financial support from the funding agencies FAPEMIG and CAPES.

ABSTRACT

Melanoma is characterized by aggressive behavior, high metastatic potential, and resistance to treatment. During progression, the cleavage of the cell surface glycoprotein CD44 by metalloproteinases promotes cell migration, invasion, and metastasis formation. This study examined the effects of doxycycline treatment on cellular behavior and melanoma progression using the murine B16-F10 cell and animal model. Cells were treated with 1, 5, or 10 μM doxycycline for 24 or 48 hours. In vitro assays assessed cell viability (MTT assay), migration, invasion, cell cycle, and zymography. In vivo, B16-F10 cells were injected into the caudal vein of C57BL/6 mice, and pulmonary metastasis was evaluated after 21 days through spirometry, histopathology, and immunohistochemistry. In vitro, doxycycline reduced the gelatinolytic activity of MMP-9 and increased cell viability after 24 and 48 hours ($p < 0.05$). In vivo, mice inoculated with cells treated with 1 μM or 10 μM doxycycline exhibited larger metastatic areas ($p < 0.05$), decreased MMP-14 and CD44 expression, and reduced pulmonary function. A strong positive correlation was observed between the proliferative index (CDC47) and metastatic area ($r = 0.9505$, $p < 0.05$), as well as between MMP-9 and MMP-14 expression ($r = 0.7959$ and $r = 0.814$, respectively; $p < 0.05$). These findings suggest that while doxycycline inhibits metalloproteinase activity in vitro, it does not suppress cellular invasiveness, promotes pulmonary metastasis development, and impairs pulmonary function in the B16-F10 melanoma model.

Keywords: B16-F10, melanoma, doxycycline, neoplastic progression, pulmonary metastasis.

INTRODUCTION

During melanoma progression, cellular behavior changes can be observed and identified to promote tumor aggressiveness. In addition to the uncontrolled proliferation of melanocytes, there is a loss of epithelial characteristics and degradation of the basement membrane and extracellular matrix (ECM), leading to migration and invasion of adjacent tissues [1]. This process is directly linked to the expression of proteins involved in epithelial-mesenchymal transition and to the degradation and remodeling of the ECM and basement membrane by proteolytic enzymes, such as metalloproteinases (MMPs) [1, 2].

Although the role of MMPs in melanoma remains controversial due to their pro-tumoral or anti-tumoral activities, these enzymes are frequently overexpressed in tumors or peritumoral stroma, in both nevi and during the horizontal and vertical growth phases of melanoma [3,4,5]. The expression of these proteins has also been associated with advanced tumor stages, more invasive and aggressive cases, and poorer prognoses [3,5]. Metalloproteinases interact with adhesion molecules such as CD44, facilitating interactions with molecules on the surface of neighboring cells or within the ECM [6]. Notably, the interaction between MMP-14 and CD44 triggers sequential cleavage of CD44, producing an intracellular domain (ICD) fragment that translocates to the nucleus. This translocation activates the transcription of several proteins, including CD44 and MMP-9, leading to upregulation of its gene. Additionally, this process initiates the transcriptional regulation of genes like NOTCH1 and RANKL, which are involved in tumor invasion, metastasis, and implantation [7].

Given the experimental and clinical evidence linking MMPs to tumor progression and poorer prognoses, inhibitors have been developed and tested since the 1980s [8]. Doxycycline, part of the tetracycline group of antibiotics widely used since its discovery in 1948 [9], has well-known antibiotic effects but exhibits significant non-antibiotic properties, including anti-inflammatory, immunosuppressive, and antineoplastic effects [10]. Its non-antibiotic effects are attributed to its

ability to non-selectively inhibit MMP activity by binding to Ca^{2+} associated with the enzyme and altering its conformation [11,12]. Doxycycline has been reported to inhibit adhesion and migration, affect growth and proliferation, and induce apoptosis in B16-F10 melanoma cell lines [13,14,15].

Given the clinical relevance and lack of effective therapeutic options for melanoma, further studies are needed to deepen our understanding of tumor progression and the factors contributing to its aggressiveness. ECM remodeling, driven by MMP activity, plays a key role in melanoma progression by facilitating migration, invasion, and metastasis formation. However, the complex mechanisms underlying the relationship between CD44 cleavage by metalloproteinases and tumor progression remain poorly understood. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of doxycycline treatment on MMP expression and activation, CD44 cleavage, and neoplastic progression in the murine melanoma B16-F10 cell model.

METHODS

Cell Culture and Doxycycline Treatment

B16-F10 metastatic melanoma cell line, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), was used in the in vitro and in vivo experiments. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% or 5% fetal bovine serum (FBS; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and 1% sodium penicillin (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Cells in culture were maintained in an incubator at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere. All experiments were performed in triplicate. Doxycycline (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was diluted in DEPC water (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and used at concentrations of 1 µM, 5 µM, and 10 µM. The control group received only the corresponding volume of DMEM medium.

Cytotoxicity and Cell Viability Assays

Cells at 4×10^3 were seeded and incubated for 24 hours before the doxycycline treatment. Subsequently, the cells were treated with 1 µM, 5 µM, and 10 µM doxycycline and maintained for 24 and 48 hours. After this period, the cells were incubated for 4 hours at 37°C with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 0.25 mg/mL. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cells to induce lysis and release formazan, allowing colorimetric measurement of absorbance using a microplate reader at 570 nanometers (SpectraMax 190 absorbance microplate reader, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA).

Migration Assay

Cells at 15×10^3 were seeded into 24-well plates containing silicone inserts (Ibidi, Gräfelfing, Germany) for the wound healing assay. After 24 hours, the inserts were removed, and the cells

were treated with doxycycline at concentrations of 1 μ M, 5 μ M, and 1 μ M in combination with the antiproliferative agent mitomycin (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) at 10 μ g/mL. Two points of the wound area were photographed at 0, 12, 24, and 36 hours using an inverted microscope (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany). ImageJ software measured the area covered by migrating cells (National Institute of Health, USA). The percentage of wound closure was calculated using the formula described by Rötzer et al. (2016) [16].

Invasion Assay

Cells at 2.5×10^4 per well were plated in the upper chambers of the Corning® Biocoat™ Matrigel® Invasion Chamber-354480 (Discovery Labware, Inc., Two Oak Park, Bedford, MA, USA) using DMEM without FBS, supplemented with 1% penicillin and doxycycline at concentrations of 1 μ M, 5 μ M, and 10 μ M. The lower chambers were filled using DMEM containing 5% FBS and 1% penicillin as a chemoattractant. The plate was incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 hours. Non-invasive cells on the upper side of the chamber were removed. In contrast, invasive cells that transmigrated through the Matrigel and adhered to the lower side were fixed with methanol for 10 minutes and stained with 0.1% crystal violet for 10 minutes. Migrated cells were examined using Cytation 5 Cell Imaging (Biotek, Winooski, Vermont, USA), and image analysis was performed using Gen5 software (Biotek, Winooski, Vermont, USA) for data processing and analysis.

Cell Cycle

After seeding 1×10^5 cells and incubating for 24 hours, the cells were treated with 1 μ M, 5 μ M, and 10 μ M doxycycline and incubated for an additional 24 or 48 hours. Following treatment, the supernatant and adherent cells were collected, centrifuged, and resuspended in a 0.5% hypotonic fluorochrome solution (HFS). The cells were incubated at 4°C for 90 minutes and analyzed using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, USA) with FACSDiva software (BD

Biosciences, USA). Data analysis was performed using FlowJo software version 10 (Tree Star, USA).

Zymography

Cells at 3×10^6 per well were seeded and incubated for 24 hours. Following this period, the cells were treated with 1 μ M, 5 μ M, and 10 μ M doxycycline and incubated for 24 and 48 hours. After the treatment, the supernatants were collected and centrifuged at 10,000 g for 6 minutes, and protein concentration was determined [17]. Subsequently, 30 μ g of protein from each sample and a molecular weight standard were subjected to electrophoresis on a 7.5% polyacrylamide gel for 90 minutes. The gel was then incubated for 30 minutes in a washing buffer, followed by 18 hours in the development buffer. Next, the gel was stained with 0.5% Coomassie Blue solution for 15 minutes. The proteolytic activity of MMPs, evidenced by gelatin degradation, was visualized as clear zones on a blue background. Quantification was performed using densitometry with ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Results were expressed as a percentage of total metalloproteinase activity relative to the control [18].

In Vivo B16-F10 Cell in Animal Experimental Model

Thirty-two female C57BL/6 mice, 5 weeks old, were used in this study in compliance with ethical principles for animal experimentation and following approval by the Ethics Committee on Animal Use at the Federal University of Minas Gerais (protocol no. 188/2020). This study is reported following ARRIVE guidelines. B16-F10 cells, 24 hours after treatment with doxycycline at concentrations of 1 μ M, 5 μ M, and 10 μ M, were mechanically detached, collected, centrifuged, resuspended in PBS, and quantified using a Neubauer chamber. Four experimental groups of mice were established, each with eight animals. Mice were inoculated via the caudal vein with 5×10^5 B16-F10 cells per animal - Control group: mice injected with untreated cells; Treatment groups: mice injected with cells treated with 1 μ M, 5 μ M, or 10 μ M doxycycline, respectively. At 21 days

post-inoculation, all mice were anesthetized with a subcutaneous injection of ketamine/xylazine (8.5 mg/kg xylazine and 130 mg/kg ketamine) for pulmonary evaluation via spirometry. Following this assessment, mice were euthanized by deepening the anesthesia, and the lungs were collected for histopathological analysis.

Spirometry

Twenty-one days after B16-F10 cell inoculation, mice were anesthetized with a subcutaneous injection of xylazine/ketamine, tracheostomized, and placed in a whole-body plethysmograph (Forced Pulmonary Maneuver System, Buxco Research Systems, Wilmington, North Carolina, USA) [19]. A controlled pressure ventilation system imposed an average respiratory rate of 160 breaths per minute until a regular breathing pattern and complete expiration during each respiratory cycle were achieved. Under mechanical ventilation, Dynamic Compliance (C_{dyn}) and Pulmonary Resistance (R_I) were determined. To measure Forced Vital Capacity (FVC) and Inspiratory Capacity (IC), a quasi-static pressure-volume maneuver was performed, inflating the lungs to a standard pressure of +30 cm H₂O and then slowly exhaling until a negative pressure of -30 cm H₂O was reached. The quasi-static compliance of the cord (from 0 to +10 cm H₂O) was calculated using this maneuver by considering the volume/pressure relationship during exhalation. Using a rapid flow-volume maneuver, the lungs were first inflated to +30 cm H₂O and immediately connected to a highly negative pressure to force expiration to -30 cm H₂O. Forced Expiratory Volume at 100 milliseconds (FEV₁₀₀) was recorded during this maneuver. Suboptimal maneuvers were excluded, and for each mouse, at least three acceptable maneuvers were performed to obtain a reliable average for all numerical parameters.

Histopathology

The lungs were collected and fixed in 10% neutral buffered formalin (pH 7.4) for 24 hours. Subsequently, they were embedded in paraffin, and 4 µm-thick histological sections were

prepared, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined under an Olympus BX41 microscope. Neoplastic cells forming aggregates or tumor nodules were considered metastatic lung lesions. The total lung and metastatic lesion areas were measured using images captured with the Olympus BX41 microscope and analyzed with SPOT 3.4.5 software.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry reactions were performed using the polymerized secondary antibody and 3'3-diaminobenzidine chromogen system (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). Antigen retrieval was carried out in a pressurized humid heat chamber at 125°C (Pascal® Pressure Cooker; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) or by incubating the slides in a water bath at 98°C for 20 minutes with Target Retrieval Solution Citrate - pH 6.0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). (See Supplementary Digital Content 1, listing manufacturers, clones, dilutions, and incubation times for all antibodies used). Slides were counterstained with Giemsa (1:5) for 30 minutes and rinsed in hydrochloric acid solution (1:100), absolute ethanol, and isopropyl alcohol for 1 minute. The Giemsa staining allows the differentiation of melanin pigment, which acquires a greenish hue distinct from the chromogenic reaction. The expression of MMP-9, MMP-14, CD44, and CD44-ICD was categorized based on the percentage of positive cells: 0 (0-5% cells), 1 (6-25% cells), 2 (26-50% cells), 3 (51-75% cells), and 4 (>75% cells); and staining intensity: 0 (negative), 1 (weak), 2 (moderate), 3 (strong). Scores were summed to generate a quantitative score: negative (<2 or slightly positive (2-3)), positive (moderately positive (4-5), and strongly positive (6-7))[20, 21]. The expression of CDC47 was quantitatively evaluated in 500 tumor cells in high-power fields (40x), with the percentage of positive cells determined.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Relationships between qualitative variables were assessed using the Chi-square test. Depending on the normality of the data distribution, potential correlations were analyzed using either Spearman's or Pearson's test. Quantitative results were evaluated using one-way ANOVA followed by Tukey's or Dunnett's post-hoc test. The significance level was set at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Doxycycline Increases Cell Viability Without Altering the Cell Cycle Profile in a Dose- and Time-Dependent Manner in B16-F10 Cells

None of the doxycycline concentrations tested significantly impaired cell viability in the B16-F10 cell line. However, after 24 hours of treatment, cell metabolism increased in the 10 μ M group compared to the control and 1 μ M groups (Figure 1a). A similar pattern was observed at 48 hours, with a significant difference between the 1 μ M and 10 μ M groups (Figure 1b).

In the cell cycle analysis, a predominance of cells in the G0/G1 phase was observed across all groups following treatment, with no statistical differences (Figures 1c, 1d). These findings suggest that doxycycline treatment neither stimulates cell proliferation nor induces cell death.

Migration and Invasion Capacity of B16-F10 Cells Are Unaffected by Doxycycline Treatment

Although a higher rate of wound closure was observed in treated cells, particularly at 1 μ M and 5 μ M concentrations after 12 hours, no significant differences were found between the groups (Figures 2a-b). These data indicate that doxycycline does not reduce cell migration even with the proliferation inhibitor mitomycin. Furthermore, in the Matrigel chamber assay, no significant alterations in cell invasion were observed under any conditions tested.

Doxycycline Reduces Gelatinolytic Activity of MMP-9

After electrophoresis, densitometric analysis of the bands showed different inhibitory patterns in the cell supernatants depending on treatment duration. At 24 hours, 1 μ M doxycycline reduced the gelatinolytic activity of MMP-9 (Figures 3a and 3b), while at 48 hours, the 10 μ M concentration showed significant inhibition (Figures 3c and 3d) compared to control supernatants.

Pulmonary Implantation of Doxycycline-Treated B16-F10 Cells Impairs Pulmonary Function in C57BL/6 Mice

Using forced pulmonary maneuvers, neoplastic formations in the lungs led to a loss of respiratory area, indicated by a significant reduction in FVC (Figure 4a) and IC (Figure 4b) values compared to controls. These findings are commonly associated with edema formation and thickening of pulmonary septa. Regarding pulmonary elasticity, a reduction in dynamic compliance (C_{dyn}) was detected in treated animals (Figure 4c), indicating modifications in extracellular matrix components of the lungs. Additionally, airway flow alterations were observed, with a decrease in FEV₁₀₀ compared to controls (Figure 4d), suggesting that neoplastic formations reduced airway flow. A progressive increase in pulmonary resistance (RI) was detected (Figure 4e), indicating a loss of elasticity, most pronounced in the 10 μ M group. These findings show that mice inoculated with doxycycline-treated cells exhibited airway flow alteration, respiratory area loss, and reduced tissue elasticity.

***In Vitro* Doxycycline Treatment Alters the Development of Pulmonary Implants of B16-F10 Cells**

Twenty-one days post-inoculation, all animals (control and those receiving doxycycline-treated cells) developed multiple isolated metastatic lung nodules within the pulmonary parenchyma (Figures 5a-d). These nodules occasionally merged to form larger tumors exceeding 10 mm in diameter (Figures 5c-d), predominantly located perivascularly and peribronchiolarly (Figure 5b). A mild mononuclear inflammatory infiltrate was also observed in the alveolar septa. Total and metastatic lung areas were used to calculate the percentage of lung area affected by metastases. Compared to controls, the lung areas affected by metastases were significantly larger in animals treated with 1 μ M and 10 μ M doxycycline ($p=0.0167$ and $p=0.0089$, respectively; Figure 5e). No significant differences were observed in the proliferative index of metastatic neoplastic cells, as

measured by CDC47 nuclear expression. However, a significant positive correlation was found between CDC47 expression and lung area affected by metastases ($r=0.9505$; $p=0.0036$).

Doxycycline Treatment Reduces the Expression of CD44, CD44-ICD, and Metalloproteinases in Pulmonary Implants

CD44 positivity was identified based on membrane immunoexpression (Figures 6a-b). Scores of 4-5 were most frequently observed in the control group (85.71%) and 45.45% of cases in doxycycline-treated groups. CD44-ICD expression was observed on the cell membrane (Figures 6c-d), with a score of 6-7 detected in 100% of control cases, while a score of 4-5 was noted in 51.72% of doxycycline-treated cases. A significant correlation was observed between increased doxycycline dose and reduced CD44-ICD expression ($r=0.64$, $p<0.001$). Cytoplasmic expression of MMP-9 was not detected in 24.13% of tumors. The control group had a higher frequency of negative MMP-9 cases (57.14%). Among positive cases (75.86%), a score of 2-3 was most frequent (Figure 6e-f), predominantly in the 10 μ M doxycycline group (100%). Furthermore, the CDC47 proliferative index significantly correlated with the percentage of marked cells ($r=0.9150$; $p=0.0039$) and score ($r=0.7959$; $p=0.0323$). Membrane immunostaining for MMP-14 was observed in 93.10% of cases, with a score of 6-7 most frequently detected in the control group (57.15%) and a score of 4-5 in doxycycline-treated groups (44.82%; Figures 6g-h). Additionally, a correlation was found between the CDC47 proliferative index and the MMP-14 score ($r=0.8114$; $p=0.0145$). (See Supplementary Digital Content 2 for detailed frequencies of immunohistochemical analyses for CD44, CD44-ICD, MMP-9, and MMP-14).

DISCUSSION

Melanoma is a highly complex and aggressive neoplasm characterized by high resistance to chemotherapy, an elevated capacity for metastatic dissemination, and high lethality. This study aimed to understand the effects of doxycycline, a well-known metalloproteinase inhibitor, on invasion, migration, and cell proliferation in the B16-F10 melanoma cell line both *in vitro* and *in vivo*. The findings indicate that doxycycline treatment inhibits MMP-9 activity without altering *in vitro* cell proliferation or migration. Additionally, doxycycline altered MMP-14 expression and proliferative capacity in pulmonary implants, compromising pulmonary function and increasing metastatic implantation in the *in vivo* model.

The MTT assay results showed that none of the doxycycline concentrations used had cytotoxic effects on B16-F10 cells. The absence of deleterious effects in this study may be related to the doses and treatment durations used, as cytotoxic effects are more frequently observed with higher concentrations (>50 μ M) or longer exposure times (>48 hours) in the same cell line [14,15,22,23].

Interestingly, our data revealed increased cell viability compared to controls after treatment. This finding contrasts with reports in the literature, which suggest that doxycycline inhibits cell proliferation and viability [24]. In the COLO 829 melanoma cell line, increased viability was observed after 24 and 48 hours of doxycycline treatment, with cytotoxic effects emerging at 72 hours with concentrations above 50 μ M [14]. In prostate cancer cell lines, treatment with 10 ng/mL showed no effect on viability, but significant changes were observed with 100 ng/mL and 1,000 ng/mL [24]. This suggests that doxycycline reduces viability and inhibits proliferation in a time- and dose-dependent manner, likely beyond the conditions of our study.

Doxycycline has been reported to exert a cytoprotective effect in embryonic pluripotent and neuronal cell lines by activating PI3K/AKT signaling, which is involved in cell survival [25,26]. Tumor cells in nutritionally compromised environments often rely on mitochondrial metabolism for energy and survival [25,27-29]. Tetracyclines inhibit mitochondrial protein synthesis,

reducing oxidative phosphorylation subunit levels and ATP production, thereby inhibiting cell proliferation. Doxycycline, in particular, reduces mitochondrial energy generation in neoplastic cells, leading to markedly slower proliferation rates [14,30]. Doxycycline reduced mitochondrial membrane potential in A549 lung carcinoma cells, causing oxidative stress without inducing caspase 9, 8, or 3/7 activity or pro-caspase 3 activation [30].

Low concentrations of doxycycline may have induced mitochondrial dysfunction, prompting metabolic pathway adaptations and altering energy metabolism. This could explain the increased cell viability without a corresponding increase in proliferation.

Our cell cycle analysis revealed that doxycycline treatment predominantly arrested cells in the G0/G1 phase, consistent with literature reports. Tetracyclines, at antibacterial treatment concentrations, typically cause G1 phase arrest in vitro and suppress tumor growth in vivo by blocking protein synthesis, reducing ATP supply, and disrupting energy metabolism [14,22].

Gelatinolytic activity assays were performed to evaluate doxycycline's ability to inhibit metalloproteinases. The results demonstrated reduced or inhibited MMP-9 activity at 24 and 48 hours, corroborating evidence that doxycycline inhibits metalloproteinase activity, particularly MMP-2 and MMP-9 [31,32].

While metalloproteinase inhibition is linked to tumor progression by facilitating uncontrolled proliferation and migration of neoplastic cells, the migration and invasion assays revealed no significant changes in these capacities following doxycycline treatment. Doxycycline exerts a strong inhibitory effect on cells with mesenchymal characteristics by influencing FAK and cell adhesion, causing cells to lose anchorage during migration [28]. However, migration and invasion are complex processes requiring coordinated changes in cytoskeletal dynamics, cell adhesion, and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) marker expression [13,14].

To validate the *in vitro* findings, the expression and localization of MMP-9, MMP-14, CD44, CD44-ICD, and CDC47 were assessed in pulmonary implants of C57BL/6 mice inoculated with doxycycline-treated B16-F10 cells. The results revealed reduced immunoexpression of these proteins in doxycycline-treated groups compared to controls, with higher doxycycline doses associated with lower CD44-ICD expression. Additionally, a relationship was observed between increased proliferative indices, metalloproteinase expression, and areas affected by pulmonary metastases.

Metalloproteinases are involved in various stages of tumor progression, from early stages in primary tumors to advanced stages like intravasation, extravasation, and metastatic niche establishment [33,34]. Studies on doxycycline's inhibitory effects on MMPs in melanoma cell lines have demonstrated its impact on viability, migration, and MMP-2 and MMP-9 activity and expression [13,35]. Our immunohistochemical analyses confirmed reduced MMP-9 and MMP-14 expression in pulmonary implants from doxycycline-treated groups, consistent with prior findings and highlighting doxycycline's ability to reduce MMP-14 expression in the murine B16-F10 model.

CD44 mediates multiple signaling pathways, activating transcription factors and modulating cytoskeletal architecture to induce EMT, invasion, proliferation, growth, and metastasis [36]. Our data indicate that CD44 is overexpressed in B16-F10 cells and that MMP-14-CD44 interaction facilitates pulmonary cell migration and implantation through ectodomain cleavage and generation of the intracellular fragment (CD44-ICD) [37]. Translocated to the nucleus, CD44-ICD acts as a transcription factor, regulating genes such as CD44 (via positive feedback), MMP-9, NOTCH1, and RANKL, which are critical for proliferation, differentiation, and metastatic implantation [7,34,38].

Pulmonary function was assessed 21 days post-tumor inoculation using forced spirometry. Neoplastic lung formations caused respiratory area loss, indicated by significant reductions in

FVC, IC, Cdyn, and FEV100, alongside increased RI. These results correlated with larger metastatic areas, suggesting that doxycycline-treated cells led to more significant pulmonary impairment, airway flow alterations, respiratory area loss, and reduced tissue elasticity due to parenchymal lesions and edema caused by increased neoplastic cell implantation [39].

Our study demonstrates that doxycycline regulates metalloproteinase activity, does not directly affect *in vitro* migratory potential, but alters proliferative and implantation capacities in a murine melanoma model. These findings underscore the role of metalloproteinases and CD44 cleavage in neoplastic progression, as their inhibition favored pulmonary neoplastic development in the studied model. Understanding the molecular and signaling pathways associated with CD44 cleavage by MMPs could provide insights and strategies for melanoma treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Process: 140269/2018-5), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

REFERENCES

- 1 Arrangoiz R, Cordera J, Juarez M, Paquentin E, León E. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. *J Cancer Treat Res* 2016; **4**: 1-15.
- 2 Rastrelli M, Tropea S, Rossi C, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In vivo* 2014; **28**:105-1012.
- 3 Hofmann U, Westphal J, Van Muijen G, Ruiter D. Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; **15**: 337-344.
- 4 Napoli S, Scuderi C, Gattuso G, Di Bella V, Candido S, Basile M, *et al.* Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma. *Cells* 2020; **9**: 1151.
- 5 Moro N, Mauch C, Zigrino P. Metalloproteinases in melanoma. *Eur J Cell Biol* 2014; **93**: 23-29.
- 6 Bourboulia D, Stetler-Stevenson W G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin. Cancer Biol* 2010; **20**: 161–168.
- 7 Milette-González K, Murphy K, Kumaran M, Ravindranath A, Wernyj R, Kaur S. *et al.* Identification of function for CD44 intracytoplasmic domain (CD44-ICD): modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) transcription via novel promoter response element. *J Biol Chem* 2012; **287**: 18995-19007.
- 8 Cathcart J, Cao J. MMP inhibitors: past, present and future. *Front Biosci* 2015; **20**: 1164-1178.
- 9 Griffin M, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; **299**: 539-548.

- 10 Bahrami F, Morris D, Pourgholami M. Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem* 2012; **12**: 44-52.
- 11 Smith Jr G, Brandt K, Hasty K. Activation of recombinant human neutrophil procollagenase in the presence of doxycycline results in enzyme fragmentation and loss of enzyme activity. *Arthritis Rheum* 1996; **39**: 235-244.
- 12 Smith Jr G, Mickler E, Hasty K, Brandt K. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 1140-1146.
- 13 Sun T, Zhao N, Ni C, Zhao X, Zhang W, Su W, *et al.* Doxycycline inhibits the adhesion and migration of melanoma cells by inhibiting the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK). *Cancer Lett* 2009; **285**: 141-150.
- 14 Rok J, Karkoszka M, Rzepka Z, Respondek M, Banach K, Beberok A, *et al.* Cytotoxic and proapoptotic effect of doxycycline – An in vitro study on the human skin melanoma cells. *Toxicol In Vitro* 2020; **65**.
- 15 Rok J, Rzepka Z, Banach K, Kowalska J, Wrzeźniok D. The Assessment of the Phototoxic Action of Chlortetracycline and Doxycycline as a Potential Treatment of Melanotic melanoma—Biochemical and Molecular Studies on COLO 829 and G-361 Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2023; **24**: 2353.
- 16 Rötzer V, Hartlieb E, Winkler J, Walter E, Schlipp A, Sardy M, *et al.* Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. *J Invest Dermatol* 2016; **136**: 301-310.
- 17 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitative estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.

- 18 Hu X, Beeton C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *J Vis Exp* 2010; **45**: 2445.
- 19 Russo R, Savino B, Mirolo M, Buracchi C, Germano G, Anselmo A, *et al.* The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2⁺ and CCR5⁺ IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2018; **314**: 1010-1025.
- 20 Pires I, Gomes J, Prada J, Pereira D, Queiroga F. Expression in Canine Cutaneous Melanocytic Tumours: Evidence of a Relationship with Tumoral Malignancy. **In:** Recent Advances in Biology, Therapy and Management of Melanoma. IntechOpen 2013.
- 21 Zhao L H, Lin Q L, Weai J, Huai Y L, Wang K J, Yan H Y. CD44v6 expression in patients with stage II or stage III sporadic colorectal cancer is superior to CD44 expression for predicting progression. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;**8**: 692-701.
- 22 Dijk S, Protasoni M, Elpidorou M, Kroon A, Taanman J. Mitochondria as target to inhibit proliferation and induce apoptosis of cancer cells: the effects of doxycycline and gemcitabine. *Sci Rep* 2020; **10**: 4363.
- 23 Singh A, Reynolds D, Cliff T, Ohtsuka S, Mattheyses A, Sun Y, *et al.* Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2012; **10**: 312–326.
- 24 Brattsand M. Doxycycline at low concentrations could influence your experimental results when working with prostate cancer cell lines *Biomed J Sci Tech Res* 2020; **28**: 21515-21519.
- 25 Chang M, Rhee Y, Yi S, Lee S, Kim R, Kim H, *et al.* Doxycycline enhances survival and self-renewal of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 2014; **3**: 353-364.
- 26 Tan Q, Yan X, Song L, Yi H, Li P, Sun G, *et al.* Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative damage by antibiotic drug doxycycline enhances the responsiveness of glioblastoma to chemotherapy. *Med Sci Monit* 2017; **23**: 4117-4125.

- 27 Qin Y, Zhang Q, Lee S, Zhong W, Liu Y, Liu H, *et al.* Doxycycline reverses epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses the proliferation and metastasis of lung cancer cells. *Oncotarget* 2015; **6**: 40667-40679.
- 28 Wang C, Xiang R, Zhang X, Chen Y. Doxycycline inhibits leukemic cell migration via inhibition of matrix metalloproteinases and phosphorylation of focal adhesion kinase. *Mol Med Rep* 2015;**12**: 3374-3380.
- 29 Cassim S, Vučetić M, Ždralović M, Pouyssegur J. Warburg and beyond: the power of mitochondrial metabolism to collaborate or replace fermentative glycolysis in cancer. *Cancers* 2020; **12**: 1119.
- 30 Dijk S, Protasoni M, Elpidorou M, Kroon A, Taanman J. Mitochondria as target to inhibit proliferation and induce apoptosis of cancer cells: the effects of doxycycline and gemcitabine. *Sci Rep* 2020; **10**: 4363.
- 31 Caton J, Ryan M. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). *Pharmacol Res* 2011; **63**: 114-120.
- 32 Vandenbroucke R, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov* 2014; **13**: 904-927.
- 33 Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures into Future Successes. *Mol Cancer Ther* 2018; **6**: 1147-1155.
- 34 Lazar A, Costea D, Popp C, Mastalier B. Skin Malignant Melanoma and Matrix Metalloproteinases: Promising Links to Efficient Therapies. *Int J Mol Sci* 2024; **25**: 7804.
- 35 Sun B, Zhang S, Zhang D, Yin X, Wang S, Gu Y, *et al.* Doxycycline influences microcirculation patterns in B16 melanoma. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; **231**: 1300-1307.
- 36 Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman J. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol* 2018; **11**: 64.

- 37 Medrano-González P, Rivera-Ramírez O, Montaña L, Rendón-Huerta E. Proteolytic Processing of CD44 and Its Implications in Cancer. *Stem Cells Int* 2021; 1-12.
- 38 Senbanjo L, Chellaiah M. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol* 2017; **7**.
- 39 Nogueira D, Gazzinelli-Guimarães P, Barbosa F, Resende N, Silva C, Oliveira L, *et al*. Multiple exposures to *Ascaris suum* induce tissue injury and mixed Th2/Th17 immune response in mice immune response in mice. *PLOS Negl Trop Dis* 2016; **10**.

FIGURES LEGENDS:**Fig 1. Effects of doxycycline treatment on cell viability and cell cycle in B16-F10 cells.** (a, b)

Cell viability was assessed using the MTT assay after 24 hours (a) and 48 hours (b) of treatment with doxycycline at concentrations of 1 μ M, 5 μ M, and 10 μ M. (c, d) Cell cycle analysis was performed using PI staining and FACSCanto II flow cytometer after 24 hours (c) and 48 hours (d) of treatment. Statistical significance: * p <0.05; ** p <0.01 (One-way ANOVA).

Fig 2. Effects of doxycycline treatment on cell migration in B16-F10 cells. (a) Representative photomicrographs from the wound healing assay show the migration of cells treated with doxycycline (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) or untreated (control, DMEM only). Images were taken at different time points using an inverted microscope (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany) at 4x magnification. Yellow lines indicate wound edges. (b) Quantification of wound closure (%) at each time point. Statistical analysis was performed using One-way ANOVA.

Fig 3. Effects of doxycycline treatment on MMP-9 gelatinolytic activity in B16-F10 cells. (a, c) Zymograms show MMP-9 activity halos in cells treated with doxycycline (1 μ M and 10 μ M) for 24 hours (a) and 48 hours (c). (b, d) Quantification of MMP-9 gelatinolytic activity (%) at 24 hours (b) and 48 hours (d). Statistical significance: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (One-way ANOVA).

Fig 4. Pulmonary mechanics in C57BL/6 mice after inoculation with doxycycline-treated B16-F10 cells. Pulmonary function was analyzed 21 days after inoculation of B16-F10 cells treated *in vitro* with doxycycline (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M). Parameters evaluated using forced spirometry: (a) Forced Vital Capacity (FVC); (b) Inspiratory Capacity (IC); (c) Dynamic Compliance (C_{dyn}); (d) Forced Expiratory Volume (FEV); (e) Pulmonary Resistance (R_p). Statistical significance: * p <0.05 (One-way ANOVA).

Fig 5. Development of pulmonary metastases in C57BL/6 mice inoculated with doxycycline-treated B16-F10 cells. (a–d) Lung sections stained with H&E 21 days after inoculation. (a) Neoplastic formation areas (arrowhead) in untreated B16-F10 cells (4x magnification). (b) Neoplastic formations near bronchiolar regions or blood vessels (arrowhead) in untreated cells (10x magnification). (c, d) Large neoplastic formations (asterisk) in cells treated in vitro with 5 μ M doxycycline (c: 4x magnification; d: 20x magnification). (e) Quantification of the pulmonary area affected by metastases (%). Statistical significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (One-way ANOVA).

Fig 6. Immunohistochemical analysis of CD44, CD44-ICD, MMP-9, and MMP-14 expression in pulmonary implants of C57BL/6 mice inoculated with doxycycline-treated B16-F10 cells. (a, b) Membrane immunoexpression of CD44: untreated cells (a) and cells treated with 10 μ M doxycycline (b). (c, d) Membrane immunoexpression of CD44-ICD: untreated cells (c) and cells treated with 10 μ M doxycycline (d). (e, f) Cytoplasmic immunoexpression of MMP-9: untreated cells (e) and cells treated with 10 μ M doxycycline (f). (g, h) Membrane immunoexpression of MMP-14: untreated cells (g) and cells treated with 10 μ M doxycycline (h). (i, j) CDC47 nuclear immunoexpression was evaluated in 500 neoplastic cells, allowing the determination of the mean proliferative index: untreated cells (i) and cells treated with 10 μ M doxycycline (j). Images captured at 40x magnification with a scale bar of 50 μ m. Arrowheads indicate neoplastic cells with positive immunoexpression.

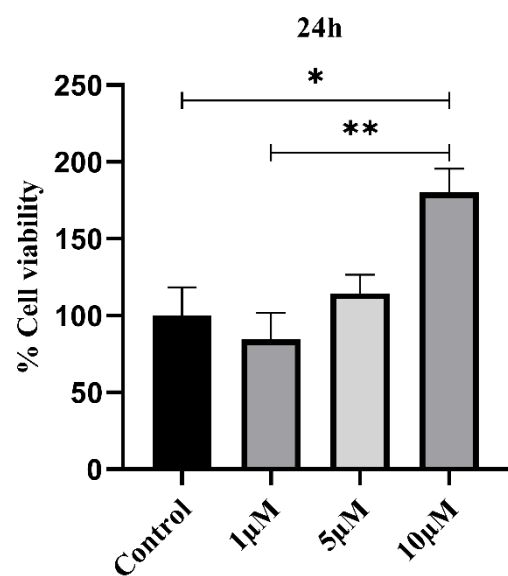
LISTING OF SUPPLEMENTAL DIGITAL CONTENT

Supplemental Digital Content 1. table

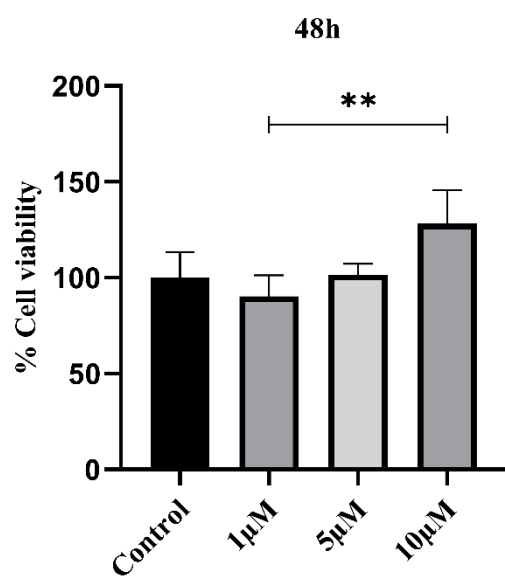
Supplemental Digital Content 2. table

Fig. 1

(A)



(B)



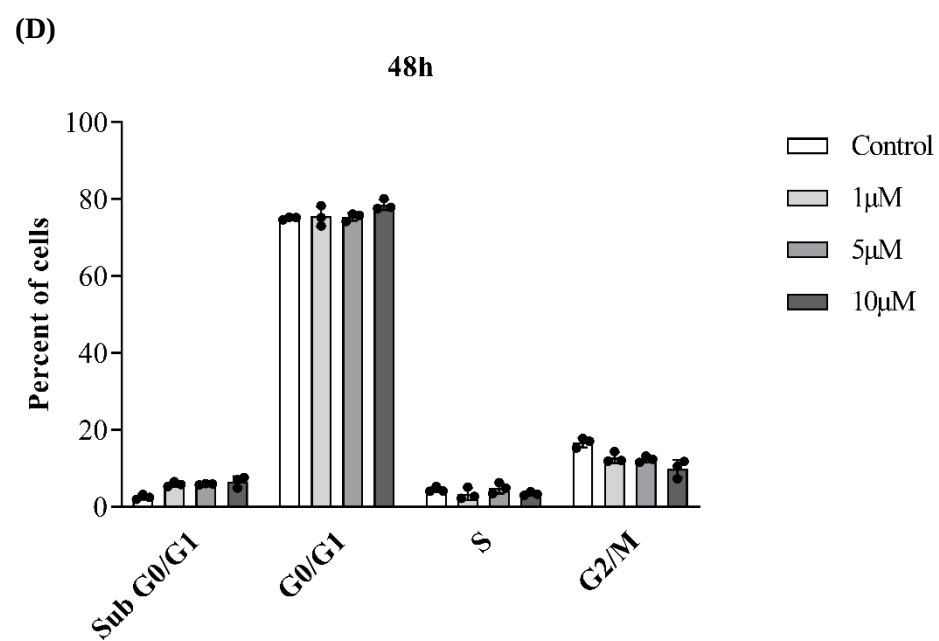
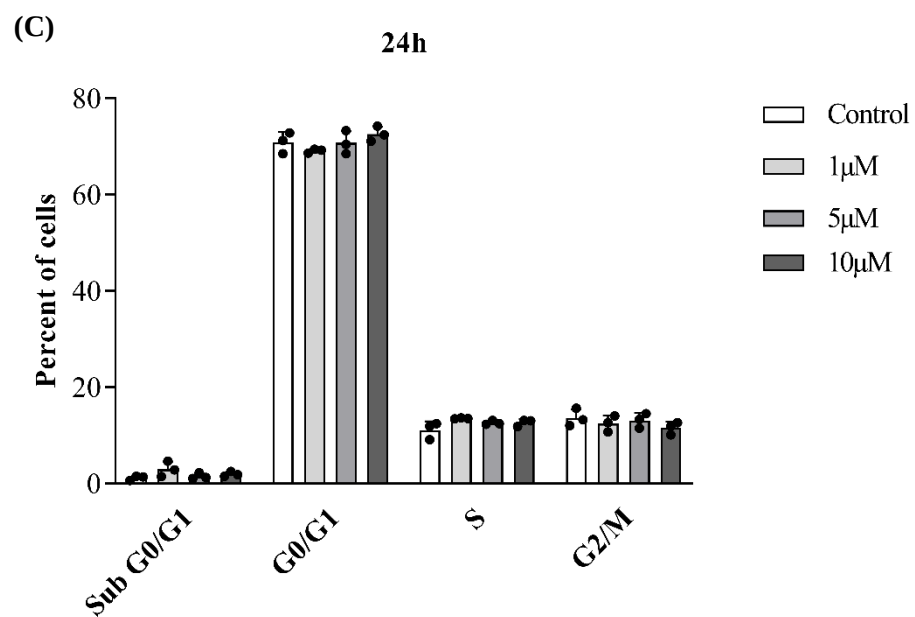
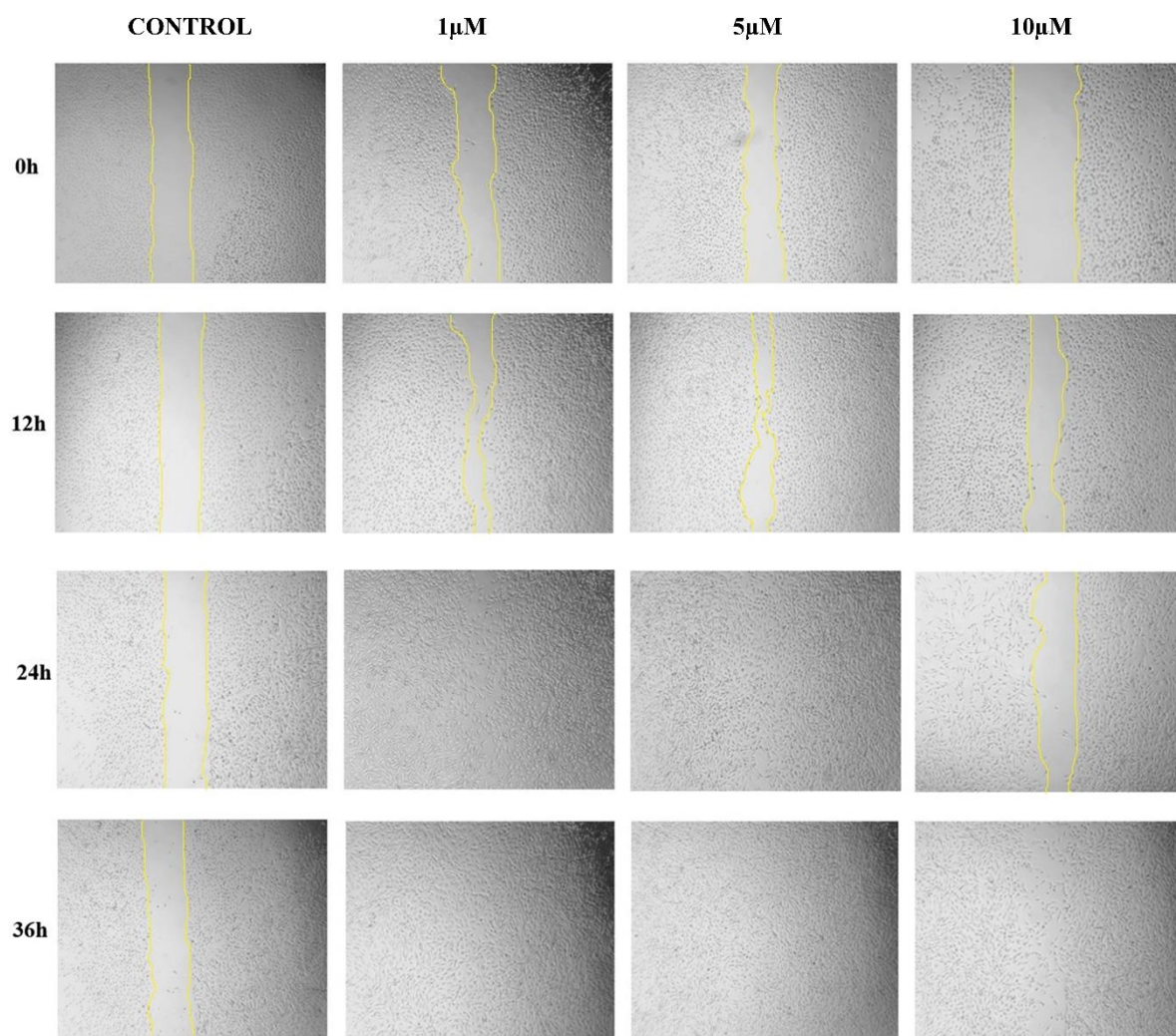


Fig. 2**(A)**

(B)

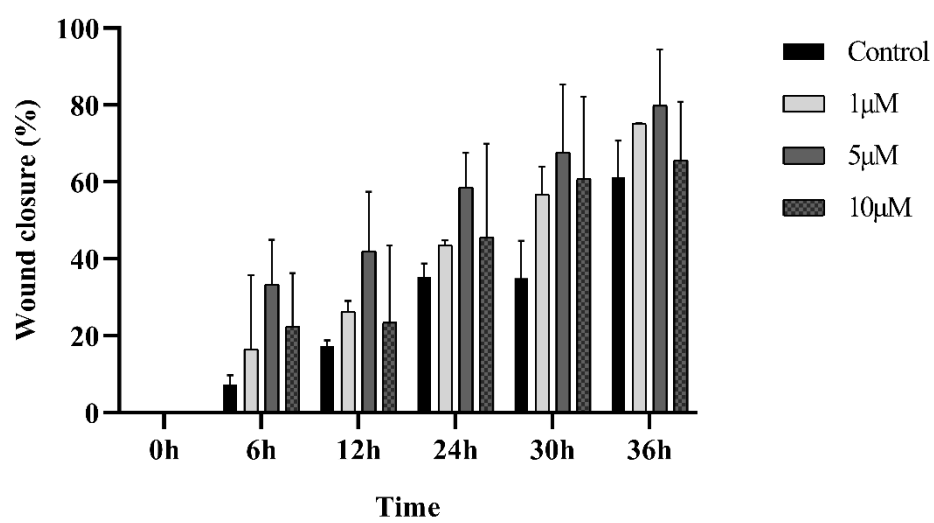
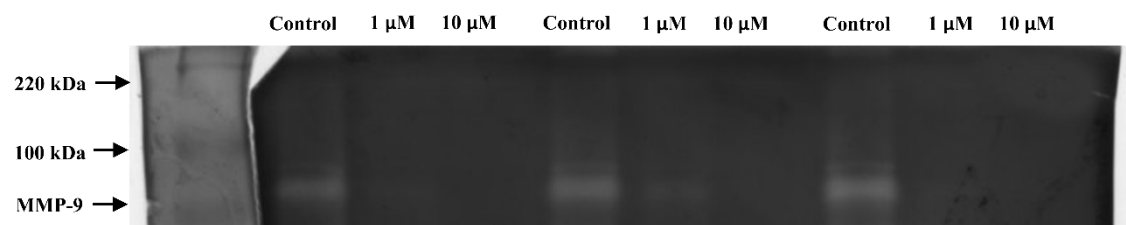
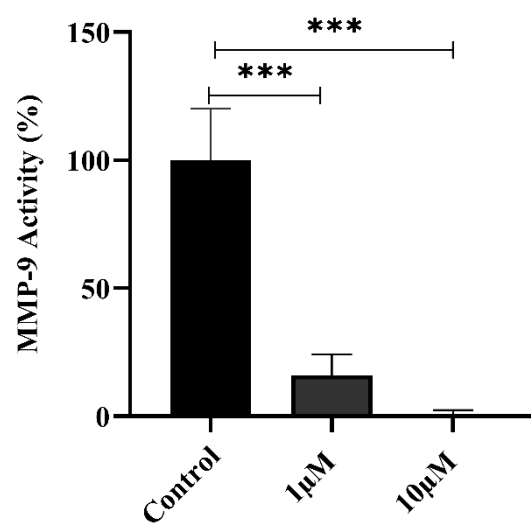
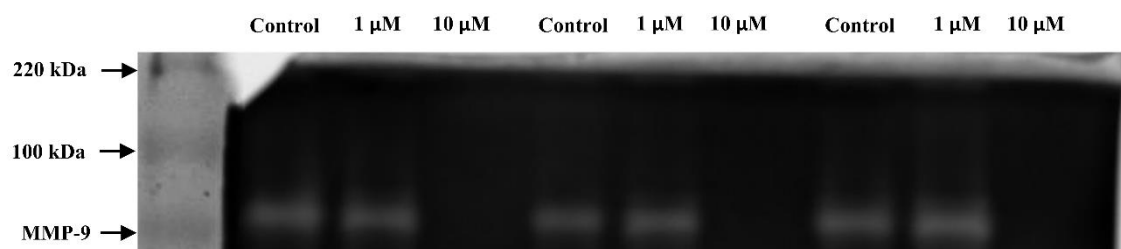


Fig. 3**(A)****(B)**

(C)



(D)

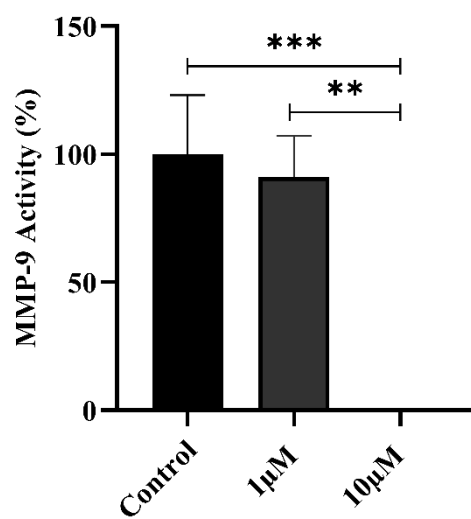
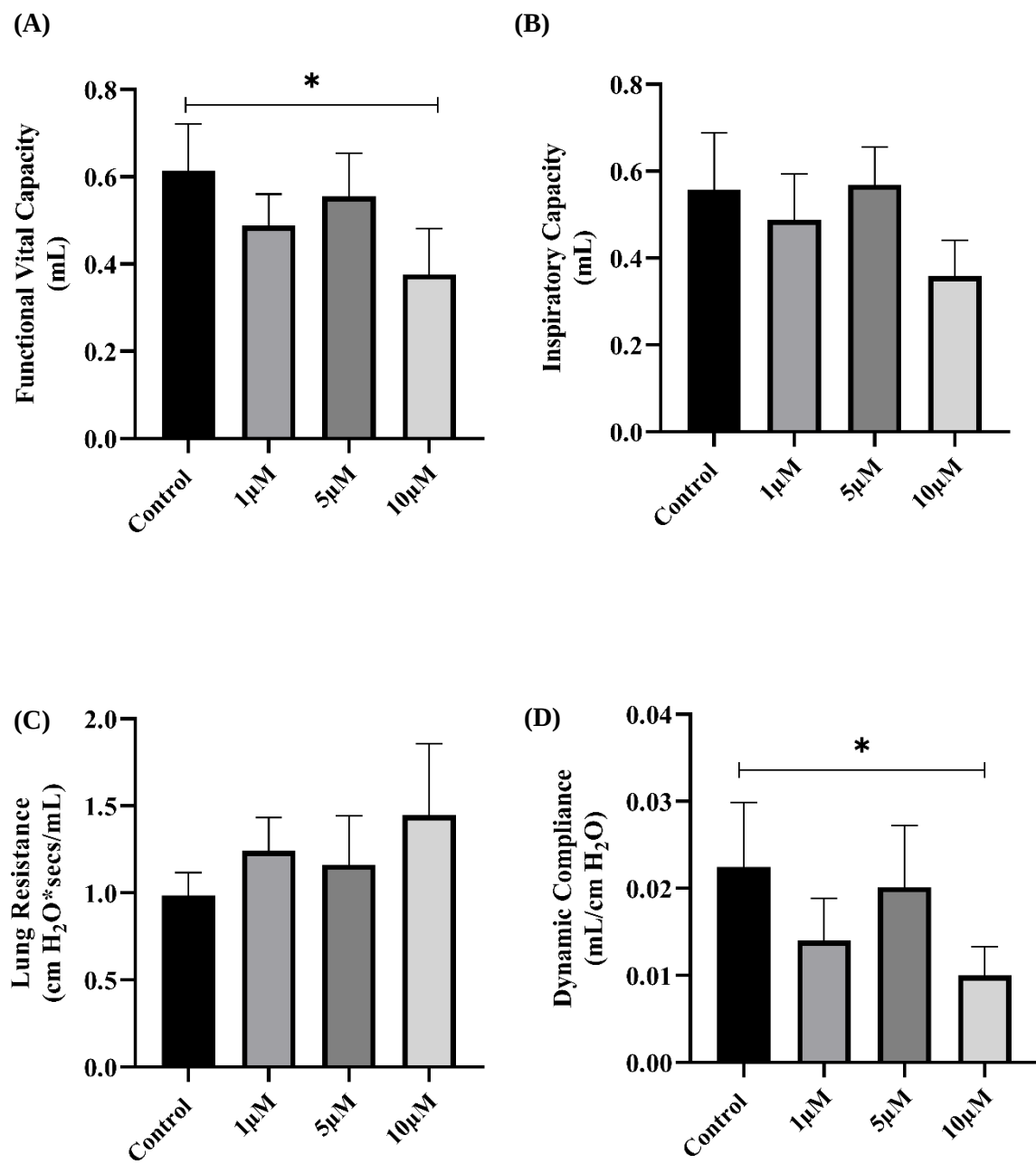


Fig. 4



(E)

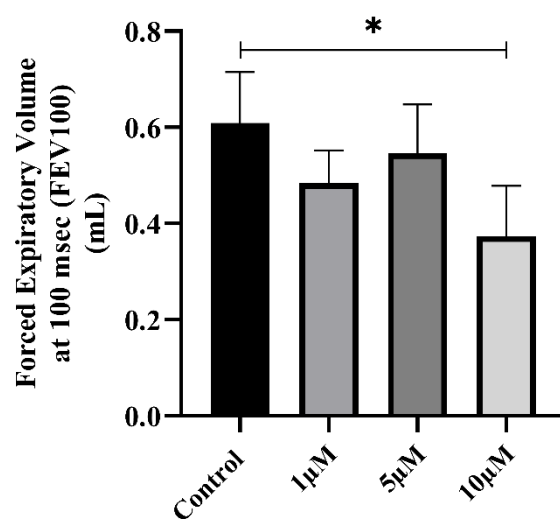
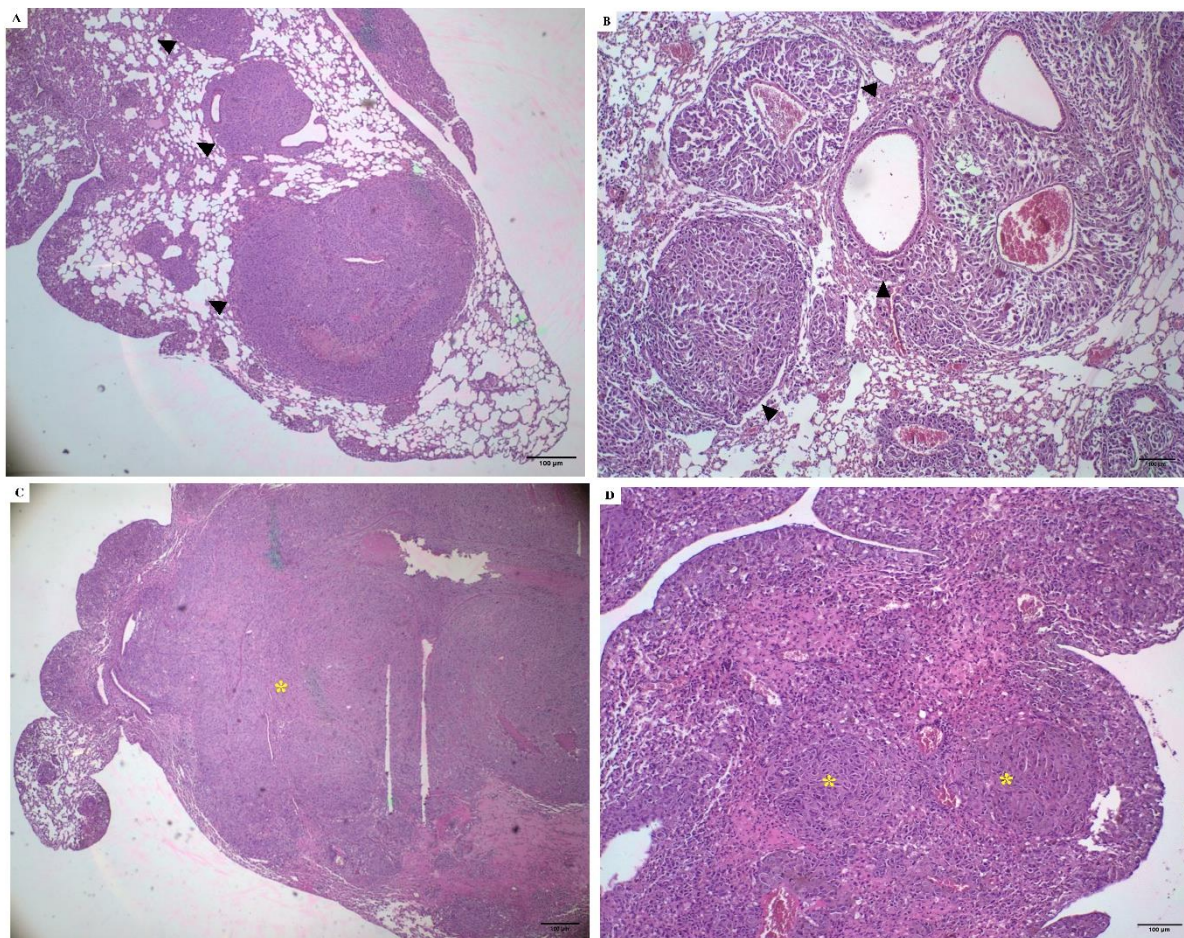


Fig 5.



(E)

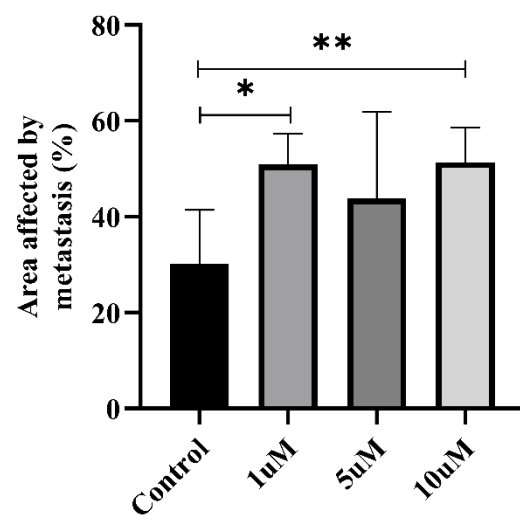
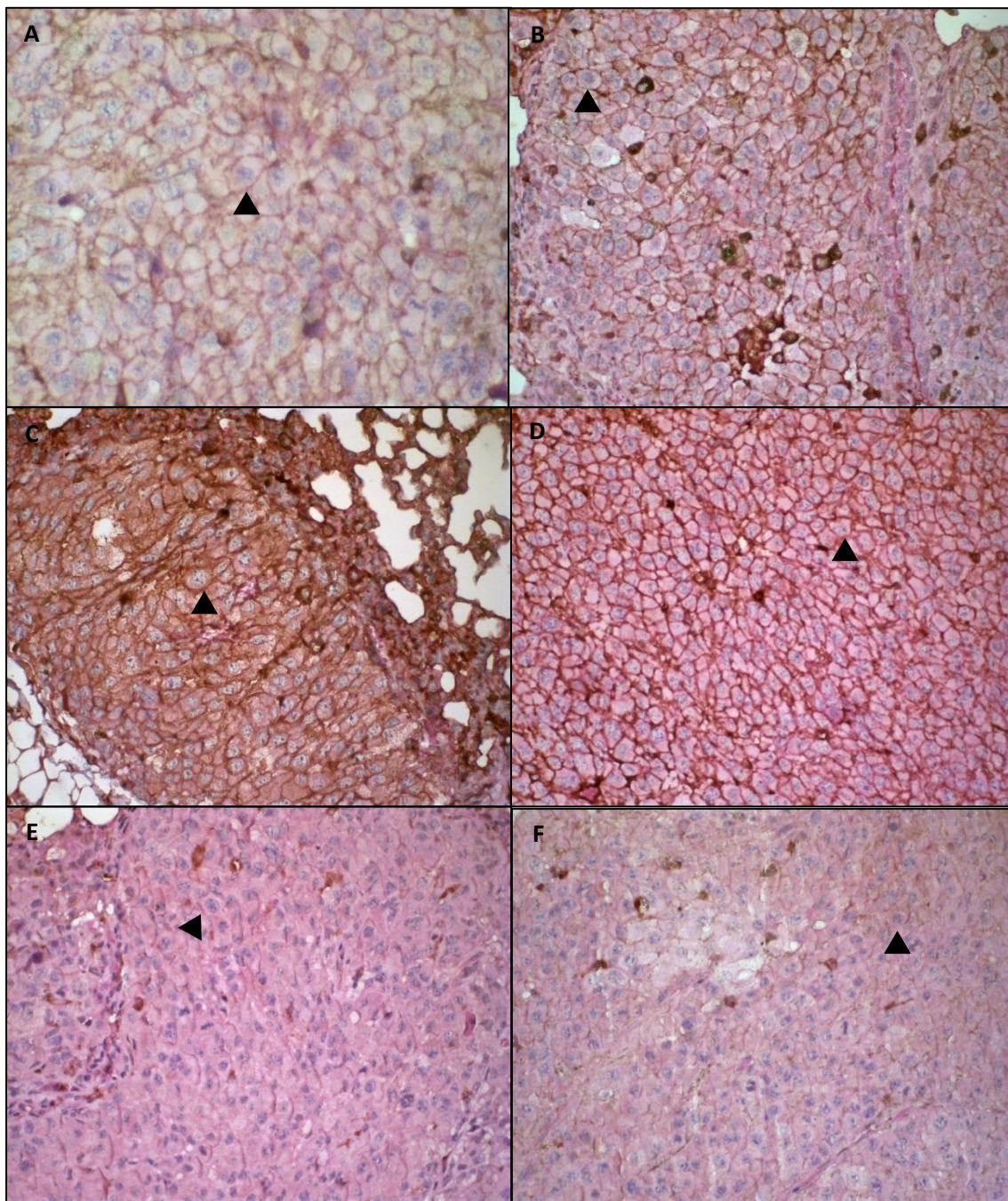
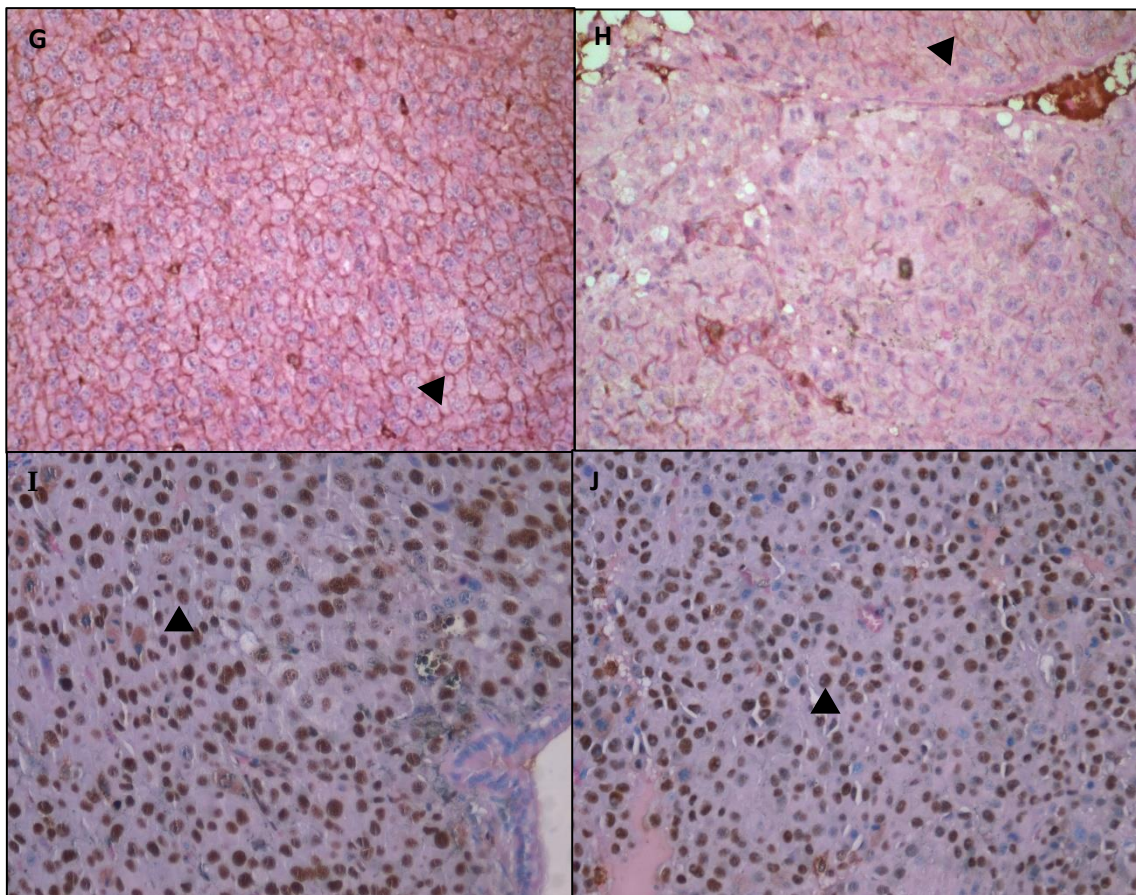


Fig 6.





Supplemental Digital Content 1. Table

List of antibodies with respective manufacturers, clones, dilution, time, and incubation temperature of the primary antibody for immunohistochemistry.

Antibody	Manufacturer	Clone	Dilution	Incubation time	Antigen retrieval
MMP-9	Abcam	EP1254	1:150	16h	Citrate + Pascal ®
MMP-14	Abcam	Polyclonal	1:100	16h	Citrate + Pascal ®
CD44	Santa Cruz Biotechnology	Polyclonal	1:200	16h	Citrate + Pascal ®
CD44-ICD	Cosmo Bio	Polyclonal	1:200	16h	Citrate + Pascal ®
CDC 47	Neomarks	47CD141	1:300	16h	Citrate + Water bath

Supplemental Digital Content 2. Table

Frequencies of immunohistochemical analyses of tumor samples included in the study for CD44, CD44-ICD, MMP-9 and MMP-14.

All cases (N=29)				
	N=7	N=6	N=8	N=8
	Control	1 μ M	5 μ M	10 μ M
CD44				
Negative	0	0	0	0
2 - 3	0	2 (33,33%)	2 (25%)	3 (37,5%)
4 - 5	6 (85,71%)	2 (33,34%)	4 (50%)	4 (50%)
6 - 7	1 (14,29%)	2 (33,33%)	2 (25%)	1 (12,5%)
CD44-ICD				
Negative	0	0	0	0
2 - 3	0	0	1 (12,5%)	0
4 - 5	0	4 (66,67%)	3 (37,5%)	8 (100%)
6 - 7	7 (100%)	2 (33,33%)	4 (50%)	0
MMP-9				
Negative	4 (57,14%)	0	3 (37,5%)	0
2 - 3	3 (42,86%)	6 (100%)	5 (62,5%)	8 (100%)
4 - 5	0	0	0	0
6 - 7	0	0	0	0
MMP-14				
Negative	1 (14,28%)	0	1 (12,5%)	0

2 - 3	1 (14,28%)	4 (66,67%)	2 (25%)	1 (12,5%)
4 - 5	1 (14,29%)	2 (33,33%)	4 (50%)	7 (87,5%)
6 - 7	4 (57,15%)	0	1 (12,5%)	0

The expression of MMP-9, MMP-14, CD44, and CD44-ICD was categorized based on the percentage of positive cells: 0 (0-5% cells), 1 (6-25% cells), 2 (26–50% cells), 3 (51–75% cells), and 4 (>75% cells); and staining intensity: 0 (negative), 1 (weak), 2 (moderate), 3 (strong). Scores were summed to generate a quantitative score: negative (<2 or slightly positive (2-3), positive (moderately positive (4-5), and strongly positive (6-7) (Adapted from [20, 21]).

