

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

VERLANE GONÇALVES SANTOS

**EFEITOS DA SUBFRAÇÃO CMS2, DERIVADA DO LÁTEX DE
Vasconcellea cundinamarcensis, SOBRE PARÂMETROS DE DIFERENCIAÇÃO
EM LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA MURINO B16F10**

**Belo Horizonte
2018**

VERLANE GONÇALVES SANTOS

**EFEITOS DA SUBFRAÇÃO CMS2, DERIVADA DO LÁTEX DE
Vasconcellea cundinamarcensis, SOBRE PARÂMETROS DE DIFERENCIAÇÃO
EM LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA MURINO B16F10**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Teresa P. Lopes

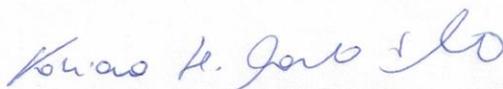
Belo Horizonte

2018

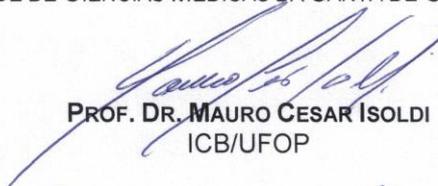
**"EFEITOS DA SUBFRAÇÃO CMS2, DERIVADA DO LÁTEX DE
VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS, SOBRE
PARÂMETROS DE DIFERENCIAÇÃO EM LINHAGEM CELULAR
DE MELANOMA MURINO B16F10"**

VERLANE GONÇALVES SANTOS

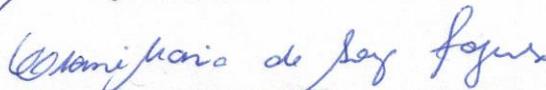
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **28 de agosto de 2018**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DR^a. FABIANA HENRIQUES MACHADO DE MELO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA SANTA DE CASA DE SP/SP



PROF. DR. MAURO CESAR ISOLDI
ICB/UFOP



PROFA. DR^a. ELAINE MARIA DE SOUZA FAGUNDES
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ENIO FERREIRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. MIRIAM TERESA PAZ LOPES
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Belo Horizonte, 28 de agosto de 2018.

Trabalho realizado nos Laboratórios de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia e de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

*Aos meus queridos pais, Antônio e Rosa, e
ao meu esposo, Alano.*

AGRADECIMENTOS

Sou muito grata a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, mas de forma especial agradeço, à:

Deus, pela vida, proteção diária e por me permitir chegar até aqui.

Profa. Dra. Miriam Lopes pela orientação, confiança e exemplo de dedicação e compromisso com a ciência. Agradeço por todos estes anos de convivência e por ter me permitido fazer parte da família LSAT.

Ao prof. Dr. Carlos Salas pela confiança, colaboração e ensinamentos.

Ao meu pai Antônio, que do céu intercede por mim. À minha mãe Rosa, que nunca mediu esforços para investir nos meus estudos, tudo que sou devo a ela. Aos meus irmãos, Marcos, Pablo, Paulo e Jéssica, que sempre me apoiaram, incentivaram e torceram pelos meus objetivos.

Ao meu marido Alano, as palavras são até insignificantes para expressar a minha gratidão pelo seu amor e companheirismo, mesmo quando distantes, nunca estivemos sozinhos. Obrigada por sonhar junto comigo!

Aos Lsatianos e aos agregados: Ariadne, Ana Cândida, Celso, Cinthia, Dalton, Fernanda Duarte, Fernanda Lemos, Gabriela, Heveline, Imaculada, Isabela, Kátia, Lívia, Madaline, Sandra, Sandy e Rone, minha família em BH. Obrigada pela acolhida, pelos ensinamentos e discussões sempre produtivas, e acima de tudo, pelas partilhas de vida. Levarei vocês sempre comigo!

Luciana pelo apoio técnico no LSAT, o qual foi imprescindível para realização deste trabalho. Agradeço também pela amizade e pelo auxílio em todos os momentos. Serei sempre grata!

Jamil, técnico do laboratório de Enzimologia e Físico-química de proteínas, pela atenção e por sempre disponibilizar o seu conhecimento para ajudar a todos ao seu redor. Muito obrigada por todo o auxílio prestado.

Profa. Dra. Janetti Francischi, ao Prof. Dr. André Klein e aos amigos do laboratório de Inflamação e Dor, principalmente, Natália, Ayslan, Isis e Aline pela amizade e parceria de sempre.

Profa. Dra. Mariana Torquato Quezado e à Adriana, técnica do Laboratório de Multiusuários de Proteômica, pelo apoio e contribuição prestados.

Prof. Dr. Claudio Luis Donnici e Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando do Departamento de Química da UFMG pela atenção e auxílio.

Profa. Dra. Maria de Fátima Leite, Profa. Dra. Jacqueline Alvarez e aos seus alunos pela amizade e colaboração sempre que necessário.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais, especialmente ao Fábio Lucas, pela amizade e consultorias sobre PCR.

Ao prof. Dr. Enio Ferreira e ao seu aluno Émerson pela ajuda nas análises imunohistoquímicas.

Ao prof. Dr. Geovane Casassali e aos colegas do laboratório de Patologia Comparada.

Ao prof. Dr. Luciano Capetini e as suas alunas, Geane e Juliana, pela atenção e auxílio sempre que foi necessário.

Ao prof. Dr. Ricardo Fujwara e ao o prof. Dr. Evanguedes por disponibilizarem os seus laboratórios e equipamentos.

Rinaldo, responsável técnico do biotério de camundongos do Departamento de Farmacologia pelo cuidado com os animais. Aos secretários da Pós-graduação FisFar, principalmente a Cintya pelo apoio. Aos técnicos do Departamento de Farmacologia Jorge e Webster, pela disponibilidade e auxílio em vários momentos.

Às minhas companheiras de república: Jéssica, Renata, Semíramis e Thaís, pela paciência e amizade durante a minha jornada em BH.

Todos os meus familiares e amigos, que mesmo à distância sempre torceram e oraram por mim!

Capes, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

CMS2 é uma subfração proteolítica derivada do látex de *Vasconcellea cundinamarzensis*, que mostra atividade antimetastática sobre modelos murinos de carcinoma de mama, cólon e melanoma. Estudos prévios, *in vitro*, mostraram um aumento da fragmentação do DNA, diminuição da adesão e da invasividade de células tumorais expostas à fração. O objetivo deste estudo foi investigar mecanismos celulares e moleculares envolvidos a atividade antitumoral e antimetastática da subfração CMS2, utilizando a linhagem celular de melanoma B16F10. Para isso, determinou-se a concentração citotóxica da subfração, que corresponde a 10 ug/mL. Posteriormente, as células B16F10 foram expostas à CMS2 (1-10 ug/mL) por 2 a 8 dias e, em seguida, foram retiradas da presença da subfração. Primeiramente, a análise da viabilidade celular mostrou uma redução máxima de 14% nas células previamente expostas à CMS2. Sabendo-se que a melanogênese pode influenciar o comportamento de células de melanoma, avaliou-se a síntese de melanina e observou-se um aumento no conteúdo de melanina, que foi maior no período de 6 dias (73 e 96%, respectivamente). Isso foi acompanhado pelo estímulo da atividade de tirosinase. Uma vez observado que o efeito máximo de CMS2 sobre a viabilidade celular e a melanogênese ocorreu, após 6 dias de exposição e, principalmente, nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, estes parâmetros foram utilizados para o seguimento deste estudo. No próximo passo, constatou-se uma menor expressão protéica do Fator de Transcrição associado a Microftalmia (MITF) nas células tratadas, além disso, os níveis de expressão do mRNA para as enzimas Tirosinase, TYRP-1 e -2 não foram alterados. Embora MITF seja associado a melanogênese, é descrito um papel dual para este fator, que em níveis elevados favorece a proliferação e sobrevivência celular, o que pode justificar a sua menor expressão neste estudo. Ao avaliar a influência de CMS2 sobre a morfologia de B1610, observou-se que a subfração induziu a formação de dendritos celulares, que condiz com o estímulo da melanogênese nestas células. É sabido que a melanogênese pode inibir a proliferação celular, por isso, realizou-se a análise do ciclo celular, que mostrou a parada das células expostas à CMS2 na fase G1, sem induzir aumento no conteúdo de DNA subdiplóide. Contudo, não foram observadas diferenças na atividade de β-galactosidase e na expressão de p53, enquanto a expressão de p21 foi reduzida em 92% nas células tratadas, mostrando que as células não estão senescentes. Ao investigar eventos do desenvolvimento tumoral, constatou-se que CMS2 reduziu a migração e invasão celular, além de inibir a formação de colônias *in vitro*. Estes efeitos são relacionados a menor ativação das vias de sinalização das MAPKs (ERK1/2 e p38) e da AKT, também observada nestas células. Além disso, a subfração inibiu a expressão da molécula de adesão N-caderina. Por fim, em modelo *in vivo*, as células pré-expostas à CMS2 apresentaram menor capacidade de colonização pulmonar. Portanto, estes dados em conjunto, mostram que CMS2 interfere no desenvolvimento tumoral, induzindo um fenótipo menos agressivo nas células B16F10. Isso pode explicar a atividade antimetastática já descrita para a subfração e contribuir para a fundamentação da sua potencial utilização no tratamento do câncer.

Palavras-chave: *Vasconcellea cundinamarzensis*, fração proteolítica CMS2, melanoma, antitumoral/antimetastático

ABSTRACT

CMS2 is a proteolytic subfraction from the latex of *Vasconcellea cundinamarzensis*, which shows antimetastatic activity on murine models of colon carcinoma and melanoma. Previous *in vitro* studies showed increased DNA fragmentation, decreased adhesion and cellular invasiveness of tumor cells exposed to the fraction. The aim of this study was to investigate cellular and molecular mechanisms involved in the antitumor and antimetastatic activity of the CMS2 subfraction, using the B16F10 melanoma cell line. For this, the cytotoxic concentration of the subfraction, which corresponds to 10 µg/mL, was determined. Subsequently, B16F10 cells were exposed to CMS2 (1-10 µg/mL) for 2 to 8 days and then removed from the presence of the subfraction. First, the cell viability analysis showed a maximum reduction of 14% in cells previously exposed to CMS2. The melanogenesis may influence the behavior of melanoma cells, therefore melanin synthesis by cells exposed to subfraction has been evaluated. It was observed that CMS2 5 or 10 µg / mL promoted an increase in melanin content, which was higher in the 6-day period (73 and 96%, respectively) and was accompanied by the stimulation of tyrosinase activity. Thus, it was observed that the maximum effect of CMS2 on cell viability and melanogenesis occurred after 6 days of exposure and, mainly, at concentrations of 5 and 10 µg / mL, therefore, these parameters were used for the sequence of this study. In the next step, we observe a lower protein expression of the Transcription Factor associated with Microphthalmia (MITF) in the treated cells, in addition, the levels of mRNA expression for the enzymes Tyrosinase, TYRP-1 and -2 were not altered. Although MITF is associated with melanogenesis, a dual role is described for this factor, which at high levels favors cell proliferation and survival, which may justify its lower expression. When assessing the influence of CMS2 on the morphology of B1610, we observed that subfraction induced the formation of cellular dendrites, which agrees with the stimulation of melanogenesis in these cells. The melanogenesis may inhibit cell proliferation, therefore, cell cycle analysis was performed. We observed the induction of cell cycle arrest in the G1 phase by CMS2, without inducing increase in the content of subdiploid DNA. However, no differences in β-galactosidase activity and p53 expression were observed, while p21 expression was reduced by 92% in the treated cells, showing that the cells are not senescent. When investigating events of the tumor development, it was verified that CMS2 reduced the migration and cellular invasion, besides inhibiting the formation of colonies *in vitro*. These effects are related to less activation of the signaling pathways of MAPKs (ERK1 / 2 and p38) and AKT. In addition, subfraction inhibited the expression of the N-cadherin adhesion molecule. Finally, in the *in vivo* model, the cells exposed to CMS2 presented lower capacity of lung colonization in relation to the control cells. In conclusion, we observed that CMS2 interferes in tumor development, inducing a less aggressive phenotype in B16F10 cells. This may explain the antimetastatic activity already described for subfraction and contribute to justify its potential use in the treatment of cancer.

Keywords: *Vasconcellea cundinamarzensis*, proteolytic fraction CMS2, melanoma, antitumor/antimetastatic

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AKT ou PKB	Proteína quinase B, do inglês <i>Kinase protein B</i>
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATCC	Coleção Americana de Tipos Celulares, do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BAPNA	Benzoil-arginil-p-nitro-anilida
B-RAF	Homólogo B do oncogene viral de sarcoma murino v- raf
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	DNA complementar
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta de AMPc
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNTP	Deoxinucleotídeo trifosfatado
D.O.	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal, do inglês <i>epidermal growth fator</i>
EMT	Transição Epitélio Mesenquimal, do inglês <i>epithelial mesenchymal transition</i>
ERK1/2	Quinases 1/2 reguladas por sinal extracelular, do inglês 1/2 Extracellular signal-regulated kinases
et al.	e outros, do latim <i>et alii</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
<i>g</i>	força gravitacional (9,81m. s ⁻²)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSK3β	Glicogênio sintase quinase 3- β
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazino-N'-etanossulfônico
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>i.v.</i>	intravenosa
KDa	kilodalton (10 ³ Da)
M	concentração molar (moles/L)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC1R	Receptor de Melanocortina 1 do inglês, <i>melanocortin 1 receptor</i>
MEC	Matriz extracelular, do inglês Extracellular matrix
MDM2	Murine double minute 2
MEK	ERK quinase estimulada por mitógenos, do inglês Mitogen-stimulated ERK kinase
MITF	Fator de transcrição associado a microftalmia do inglês, <i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i>
MMP	Metaloproteinase de matriz, do inglês <i>Matrix metalloproteinase</i>
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Proteína inibida por rampamicina
N-RAS	Homólogo do oncogene viral do neuroblastoma humano
PAGE	Gel de poliacrilamida, do inglês <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
p-AKT	Forma fosforilada de AKT
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>
pERK	Forma fosforilada de ERK
PI	Iodeto de propídeo, do inglês, <i>propidium iodide</i>
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase, do inglês <i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>
PIP2	Fosfoinosítideo-(4,5)-difosfato, do inglês

	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate		
PIP3	Fosfoinosítideo-(3,4,5)-trifosfato,	do	inglês
	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate		
PKA	Proteína quinase A		
pRB	Proteína do retinoblastoma		
PTEN	Fosfatase Homóloga a Tensina		
<i>RAF</i>	Família de quinases serina/treonina, acrônimo de <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>		
<i>RAS</i>	Homólogo do vírus Ras (rat sarcoma vírus)		
RPMI 1640	Meio do Instituto e Memorial Roswell Park 1640, do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i>		
SAPK/JNK	Proteínas quinases ativadas por estresse, do inglês <i>Stress-Activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Kinase</i>		
s.c.	subcutâneo		
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>		
SFB	Soro Fetal Bovino		
TAE	Tris-acetato-EDTA		
TBS	Salina tamponada-Tris, do inglês, <i>Tris-buffered saline</i>		
TTBS	Tampão de transferência Towbin com Tween, do inglês, <i>Tween Towbin transfer buffer</i>		
TEMED	N',N',N',N'-tetrametil-etileno-diamina		
TGF- β	Fator transformador do crescimento- β , do inglês <i>Transforming Growth Factor-β</i>		
TYRP1	Proteína 1 relacionada à tirosinase		
TYRP2	Proteína 2 relacionada à tirosinase		
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais		
UV	Ultravioleta		
μ g	microgramas (10^{-6} g)		
μ L	microlitros (10^{-6} L)		

As demais abreviaturas e siglas serão explicadas quando forem citadas pela primeira vez no texto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Ilustração 1: <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	18
Ilustração 2: Desenvolvimento do melanoma.....	29
Figura 1: Perfil cromatográfico e caracterização de subfrações do látex de <i>V. cundinamarcensis</i>	62
Figura 2: Viabilidade de células B16F10, após exposição à CMS2.....	63
Figura 3: Conteúdo de melanina em células B16F10 expostas à CMS2.....	64
Figura 4: Atividade de tirosinase em células B16F10 expostas à CMS2.....	65
Figura 5: Efeito de CMS2 sobre a expressão de MITF em células B16F10.....	66
Figura 6: Expressão do mRNA para Tirosinase, TYRP-1 e TYRP-2 em células B16F10 expostas à CMS2.....	67
Figura 7: Morfologia de células B16F10 expostas à CMS2.....	68
Figura 8: Análise do ciclo celular em células B16F10 expostas à CMS2.....	69
Figura 9: Expressão de p53 e p21 em células B16F10 expostas à CMS2.....	71
Figura 10: Atividade de β -galactosidade em células B16F10 expostas à CMS2.....	72
Figura 11: Efeito inibitório de CMS2 sobre a migração de células B16F10.....	74
Figura 12: Avaliação da expressão da proteína p16-ARC.....	75
Figura 13: Efeito inibitório de CMS2 sobre a invasão de células B16F10.....	76

Figura 14: Atividade das MMP-2 e -9 em células B16F10 expostas à CMS2.....	77
Figura 15: Expressão de E- e N-caderina em células B16F10 expostas à CMS2.....	79
Figura 16: Formação de colônias pelas células B16F10 expostas à CMS2.....	80
Figura 17: Ativação de ERK1/2, SAPK/JNK, p38 e AKT em células B16F10 expostas à CMS2.....	82
Figura 18: Colonização pulmonar pelas células B16F10 expostas à CMS2.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas PCRs para amplificação dos seguimentos genômicos específicos para Tirosinase, TYRP-1, TYRP-2 e GAPDH.....119

Tabela 2: Condições térmicas para a realização da PCR para os genes Tirosinase, TYRP-1, TYRP-2 e GAPDH.....119

Tabela 3: Diluições dos anticorpos utilizados no Western Blotting.....120

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 A espécie <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	18
1.1.1 Caracterização bioquímica de proteases do látex de <i>V. cundinamarcensis</i>	19
1.1.2 Atividade antitumoral e antimetastática de proteases de <i>V. cundinamarcensis</i>	20
1.2 Aspectos celulares e moleculares do melanoma	22
1.2.1 A biologia dos melanócitos e a biossíntese da melanina	23
1.2.2 Desenvolvimento do melanoma	25
1.3 Tratamentos para o melanoma	30
1.4 Modelo de melanoma metastático B16F10	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Material.....	37
4.1.1 Biológico.....	37
4.1.2 Principais reagentes e solventes.....	37
4.1.3 Principais soluções.....	39
4.1.3.1 Obtenção e caracterização da fração CMS2.....	39
4.1.3.2 Cultura celular	39
4.1.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	40
4.1.3.4 Zimografia	42
4.1.3.5 Coloração de colônias	43
4.1.3.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	43
4.1.3.7 Soluções para gel de agarose.....	43
4.1.3.8 Western Blotting	44
4.1.3.9 Ensaio <i>in vivo</i>	45
4.1.4 Anticorpos e Kits	45
4.1.5 Principais Equipamentos	46
4.1.6 Diversos	48
4.1.7 Programas computacionais	49

4.2 Métodos.....	49
4.2.1 Obtenção da fração CMS2 do látex de <i>V. cundinamarcensis</i>	49
4.2.1.1 Coleta, secagem e armazenamento do látex	49
4.2.1.2 Preparação do látex para cromatografia de gel filtração	50
4.2.1.3 Purificação em resina CM Sephadex C-25.....	50
4.2.1.4 Determinação da concentração protéica	51
4.2.1.5 Determinação da atividade amidásica.....	51
4.2.2 Ensaio biológico <i>in vitro</i>	51
4.2.2.1 Cultivo celular	51
4.2.2.2 Exposição das células B16F10 à CMS2.....	52
4.2.2.3 Determinação da viabilidade celular.....	52
4.2.2.4 Avaliação do conteúdo de melanina.....	53
4.2.2.5 Determinação da atividade da enzima tirosinase	53
4.2.2.6 Morfologia celular	54
4.2.2.7 Ciclo celular	54
4.2.2.8 Senescência celular	54
4.2.2.9 Avaliação de eventos relacionados ao desenvolvimento tumoral	55
4.2.2.9.1 Migração celular	55
4.2.2.9.2 Invasão celular	56
4.2.2.9.3 Atividade de metaloproteinases de matriz extracelular	56
4.2.2.9.4 Formação de colônias	57
4.2.2.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	57
4.2.2.10.1 Extração de RNA total	57
4.2.2.10.2 Transcrição reversa.....	57
4.2.2.10.3 Amplificação de fragmentos de DNA por PCR convencional	58
4.2.2.11 Western Blotting	59
4.2.3 Ensaio biológico <i>in vivo</i>	60
4.2.3.1 Avaliação da colonização pulmonar	60
4.2.4 Análise Estatística	60
5 RESULTADOS	61
5.1 Obtenção e caracterização da subfração CMS2	61
5.2 Efeito de CMS2 sobre a viabilidade celular	62
5.3 Efeito de CMS2 sobre a melanogênese	63

5.4 Efeito de CMS2 sobre a expressão de proteínas e genes envolvidos na melanogênese.....	65
5.5 Efeito de CMS2 sobre a morfologia celular	67
5.6 Efeito de CMS2 sobre o ciclo celular.....	68
5.7 Avaliação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular	69
5.8 Efeito de CMS2 sobre a atividade da β -galactosidase	70
5.9 Efeito de CMS2 sobre etapas do desenvolvimento tumoral.....	73
5.9.1 Efeito de CMS2 sobre a migração.....	73
5.9.1.1 Efeito de CMS2 sobre a capacidade migratória celular.....	73
5.9.1.2 Efeito de CMS2 sobre a expressão de p16-ARC	73
5.9.2 Efeito de CMS2 sobre a invasão celular.....	75
5.9.2.1 Efeito de CMS2 sobre a capacidade invasora celular	75
5.9.2.2 Efeito de CMS2 sobre a atividade de metaloproteinases extracelulares (MMPs).....	76
5.9.3 Participação de proteínas relacionadas a transição epitélio mesenquimal (EMT).....	78
5.9.4 Efeito de CMS2 sobre a formação de colônias <i>in vitro</i>	80
5.10 Participação das vias das MAPK e da PI3K/AKT nos efeitos de CMS2 sobre as células B16F10.....	81
5.11 Efeito de CMS2 sobre a colonização pulmonar.....	83
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÃO.....	99
8 REFERÊNCIAS.....	100
APÊNDICE A - Obtenção das proteases do látex de <i>V. cundinamarzensis</i>	118
APÊNDICE B – Dados sobre a realização da PCR.....	119
APÊNDICE C - Diluições dos anticorpos utilizados no Wertern Blotting	120
APÊNDICE D - Concentração citotóxica de CMS2	121
APÊNDICE E – Viabilidade de células B16F10 na presença da subfração CMS2 ..	122
APÊNDICE F – Curva-padrão de melanina sintética	123
APÊNDICE G - Atividade amidásica nos sobrenadantes das células B16F10.....	124
APÊNDICE H - Expressão de E-caderina nas células HACAT e A431.....	125
ANEXO A - Protocolo de aprovação para o uso experimental de animais.....	126

1 INTRODUÇÃO

1.1 A espécie *Vasconcellea cundinamarcensis*

A espécie *Vasconcellea cundinamarcensis*, sinônimo *Carica candamarcensis*, é um membro da família *Caricaceae*. Trata-se de uma planta nativa da América do Sul (ilustração 1), encontrada principalmente na região Andina, a qual se estende do Panamá até o Chile. Seu habitat é predominantemente em altitudes superiores a 1000 metros, sendo popularmente conhecida como “mamão da montanha” (Walraevens et al., 1999).

A planta apresenta um tronco grosso geralmente ramificado (ilustração 1 A), medindo até 10 m de altura e contém uma coroa compacta de folhas na sua parte terminal ou nas extremidades das ramificações. Seu fruto é elipsóide, de coloração amarelada, quando maduro (ilustração 1 C), possui cinco depressões largas e longitudinais, mede de 5 a 15 cm de comprimento e contém uma polpa delgada, aquosa e aromática, que somente pode ser consumida após o cozimento (Leon, 1987).



Ilustração 1: *Vasconcellea cundinamarcensis*. A- Inflorescências; B- Frutos imaturos e maduros; C- Fruto maduro. Fonte: Ecocrop.fao.org e fruitipedia.com. Acesso: 30/05/18.

As proteases que compõem o látex de *V. cundinamarzensis* têm sido objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa sob diferentes aspectos, que se sobrepõem, em diferentes etapas desse estudo. A seguir serão descritos os achados de maior interesse para o presente trabalho.

1.1.1 Caracterização bioquímica de proteases do látex de *V. cundinamarzensis*

A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, pode ser obtido o látex, que é rico em carboidratos, vitaminas e peptídeos de baixo peso molecular, além de enzimas do grupo das cisteíno proteases. Essas proteases possuem uma cisteína no sítio ativo e seu mecanismo de catálise envolve a participação de um grupamento tiólico. A família de cisteíno proteases C1 é a mais numerosa família destas proteases e compreende as enzimas semelhantes estruturalmente à papaína, obtida de *C. papaya*. (Baeza et al., 1990).

Pela separação cromatográfica do látex de *V. cundinamarzensis* em coluna Sephadex G10, são obtidos dos picos bem definidos, denominados P1G10 e P2G10 (Apêndice A). A primeira fração é rica em cisteíno-proteases com atividade proteolítica, cerca de seis vezes superior as proteases de *Carica papaya*, enquanto P2G10 apresenta níveis insignificantes desta atividade (Bravo et al., 1994; Silva et al., 2003).

Em um passo subsequente, a fração P1G10 quando submetida à purificação em coluna de troca iônica CM-Sephadex C-25, origina três picos denominados CMS1 a CMS3 (Apêndice A). A subfração CMS1 apresenta característica mais básica e atividade proteolítica maior, seguida por CMS2 que é mais ácida com moderada atividade proteolítica. Na maioria dos processos cromatográficos realizados, o pico da subfração CMS3 aparece como um “ombro” do pico de CMS2. As subfrações CMS1 e CMS2 ao serem submetidas a purificação em coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose, origina 3 (CMS1MS1-3) e 5 proteases (CMS2MS1-5), respectivamente (Apêndice A) (Teixeira et al., 2008).

1.1.2 Atividade antitumoral e antimetastática de proteases de *V. cundinamarcensis*

Há algum tempo, enzimas proteolíticas como as serino-proteases, tripsina e quimiotripsina, as cisteíno-proteases, como bromelina, fastuosaina e papaína, vem sendo utilizadas em estudos pré-clínicos e clínicos e comprovados a sua importância como supressores tumorigênicos, reduzindo a disseminação metastática e aumentando o tempo de sobrevivência (Gerard, 1972; Leipner & Saller, 2000; Guimarães-Ferreira et al., 2007; Muller et al., 2016). Reconhecendo a importância da pesquisa dos potenciais terapêuticos de proteases, nosso grupo de pesquisa, também, vem estudando as atividades antitumoral e antimetastática das cisteíno proteases do látex de *V. cundinamarcensis*, que serão detalhadas a seguir.

A fração P1G10 mostrou efeito antitumoral e antimetastático em diferentes modelos murinos. Em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com P1G10 na dose de 5 mg/kg, observou-se a diminuição da celularidade tumoral presente no líquido ascítico, assim como uma redução dos níveis de TNF- α , sugerindo uma ação anti-inflamatória para a fração, sendo essa hipótese reforçada pelo aumento da fração ativa do TGF- β (Viana, 2010). Já foi descrita, também, a atividade antitumoral de P1G10 sobre o modelo de carcinoma de mama 4T1. Nesse modelo a atividade antitumoral de P1G10 (5 mg/kg) foi atribuída à redução do número de leucócitos aderidos a vasos tumorais e dos níveis intratumorais de citocinas pró-inflamatórias e angiogênicas. Além disso, a exposição de macrófagos a P1G10 promoveu a ativação e o aumento da citotoxicidade desses sobre células tumorais 4T1 (Braga, 2013). Em outro modelo tumoral de melanoma B16F1 foi observada a redução da massa do tumor e dos níveis de VEGF, na mesma dose anteriormente utilizada nos outros modelos animais, sugerindo uma ação antiangiogênica de P1G10. Além disso, verificou-se o aumento da sobrevivência dos animais tratados em relação aos controles (Dittz et al., 2015).

As subfrações obtidas da purificação de P1G10, CMS1 e CMS2, também, foram avaliadas quanto à sua atividade antitumoral e antimetastática frente a modelos murinos. No modelo de carcinoma mamário 4T1, apenas CMS2 (0,3 - 3,0 mg/kg) reduziu o peso dos tumores e o número de metástases pulmonares e este efeito foi atribuído, principalmente, à modulação por CMS2 da atividade de

macrófagos associados a tumores (Braga, 2017). Em animais portadores de melanoma metastático B16F10 e de carcinoma de cólon CT26.WT a fração CMS2 (5 mg/kg) promoveu a redução do número e ocorrência de metástases pulmonares e hepáticas, respectivamente, da mesma forma que o observado para P1G10 (Dittz, 2011).

Estudos *in vitro* realizados com células tumorais e metastáticas mostraram que a atividade de inibição do desenvolvimento tumoral das frações P1G10 e CMS2, (100µg/mL), pode estar relacionada à uma ação direta sobre as células, promovendo um aumento da fragmentação de DNA, sendo o mecanismo de morte por uma via dependente de caspases. Foi mostrado, também, que P1G10 promove uma diminuição da adesão e da invasividade celular (Dittz, 2011; Dittz et al., 2015). Outro estudo mostrou por meio de análise proteômica de lisados celulares de B16F10 e da linhagem de melanócitos murinos, Melan-a, que o tratamento com CMS2 (10 µg/mL, por 24h) reverteu a expressão das proteínas Nucleofosmina 1; Proteína de choque térmico 65, Proteína ligante a calciclina e Fator de iniciação da tradução eucariótica 4H, em B16F10, para níveis próximos aos da linhagem Melan-a. Estas proteínas participam da proliferação, sobrevivência, invasão e da migração celular, o que está de acordo aos efeitos celulares já mostrados para CMS2 (Lemos et al., 2018).

As cinco proteases obtidas da purificação da fração CMS2 (CMS2MS1-5), já foram avaliadas, quanto aos seus efeitos sobre a adesão e morte de células B16F10. Dentre essas, CMS2MS3 apresentou o melhor efeito citotóxico e capacidade de reduzir a adesão, mediada pelas subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ de integrinas (Dittz, 2015).

Em vista dessas propriedades farmacológicas das frações proteolíticas de *V. cundinamarcensis* e, também, da sua atividade reparadora tecidual foram realizados estudos farmacocinéticos e toxicológicos de P1G10. Para a avaliação farmacocinética a fração foi marcada com o isótopo radioativo ^{99m}Tc e em camundongos Swiss tratados com a fração (1 mg/kg) por via endovenosa (e.v.) ou subcutânea (s.c.), observou-se maior acúmulo de P1G10 em órgãos relacionados a metabolização e excreção de fármacos, como o fígado, rim e bexiga. Assim, por via s.c. a biodisponibilidade foi de aproximadamente 100%. Já quando a fração foi administrada por via oral apresentou baixa biodisponibilidade (8,3%), com maior

retenção de P1G10 nos órgãos do trato gastrointestinal, o que se correlaciona com a natureza protéica da fração (Lemos, et al., 2016).

Estudos pré-clínicos de toxicologia aguda de P1G10 foram realizados em camundongos e mostraram que para as vias intravenosa (*i.v.*) e *s.c.*, doses ≤ 20 mg/kg e para a via oral (*p.o.*) doses ≤ 300 mg/kg, não são letais, após administração de dose única da fração (Lemos et al., 2016). Já em estudos toxicológicos subcrônicos realizados durante 90 dias em ratos, utilizando administração oral de P1G10 (0-300 mg/kg/dia) só se observou o aparecimento de sinais tóxicos para a dose de 300 mg/kg (Salas et al., 2010). Isso demonstra a baixa toxicidade de P1G10 por via sistêmica, sugerindo que estudos pré-clínicos e clínicos possam ser realizados com segurança.

Diante dos resultados promissores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando células de melanoma e, também, devido a necessidade de serem avaliados outros aspectos da atividade antitumoral e antimetastática das proteases de *V. cundinamarçensis*, neste estudo, decidimos utilizar o modelo de melanoma B16F10.

1.2 Aspectos celulares e moleculares do melanoma

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças, que se desenvolvem a partir de várias etapas, tendo em comum o crescimento anormal de clones celulares que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se pelo corpo, originando as metástases (Cooper, 2000). No mundo, o câncer de pele é o mais comum, apesar do melanoma ser o tipo de câncer de pele menos prevalente é responsável por 80% das mortes relacionadas a estes cânceres, devido à sua agressividade e resistência às terapias disponíveis (Park et al., 2014; INCA, 2018). O desenvolvimento do melanoma está associado a vários fatores de risco ambientais e/ou genéticos, que levam a gradual transformação dos melanócitos (Chin, 2003). Por isso, para o melhor entendimento sobre o desenvolvimento deste câncer, se faz necessário o conhecimento sobre a biologia das células parentais do melanoma, os melanócitos.

1.2.1 A biologia dos melanócitos e a biossíntese da melanina

Os melanócitos são células especializadas encontradas em humanos na epiderme, folículos pilosos e nos olhos, enquanto, em murinos são encontrados apenas nos folículos pilosos e são responsáveis pela síntese da melanina (Tsatmali et al., 2002). Essa linhagem deriva de células precursoras indiferenciadas, denominadas melanoblastos, que se originam de uma população de células embrionárias da crista neural (Bertolotto, 2013). Na pele, os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme e tem a sua homeostase regulada pelos queratinócitos, que em resposta a radiação ultravioleta (UV) secretam fatores que regulam a sobrevivência, diferenciação, proliferação e motilidade dos melanócitos, além de estimular a produção de melanina (Gray-Schopfer et al., 2007).

A biossíntese da melanina pelos melanócitos ocorre dentro de organelas semelhantes aos lisossomos, denominadas como melanossomos (Lai et al., 2017). Os melanócitos formam prolongamentos dendríticos, que se ramificam entre os queratinócitos adjacentes, sendo utilizados para a transferência dos melanossomos (Tsatmali et al., 2002). Assim, o melanócito transfere a melanina para os queratinócitos, onde o pigmento determina a cor da pele e têm um papel fundamental na proteção contra os efeitos nocivos da radiação UV e na prevenção do câncer de pele (Gray-Schopfer et al., 2007).

Existem dois tipos quimicamente distintos de melanina: eumelanina e feomelanina (Kondo & Hearing, 2011). A etapa inicial da síntese da melanina é comum nas vias eu- e feomelanogênicas, sendo dependente da atividade da tirosinase (Lin & Fisher, 2007). Primeiramente, ocorre a hidroxilação da L-tirosina para L-DOPA (L-diidroxifenilalanina), que será oxidada à dopaquinona (Slominski et al., 2004). A tirosinase também pode ter a L-DOPA como substrato, gerando o mesmo produto, dopaquinona (Tolleson, 2005). Essa é a etapa principal durante a síntese da melanina, sendo que o restante das reações pode ocorrer espontaneamente em pH fisiológico (Pillaiyar et al., 2015).

Após a formação da dopaquinona a via de síntese da melanina, divide-se na formação da eu- e da feomelanina (Gillbro & Olsson, 2011). Para a síntese da eumelanina, a dopaquinona passa por uma reação intramolecular, com a adição do grupo amino ao seu grupo aromático, gerando o leucodopacromo. O

leucodopacromo reage com a dopaquinona, originando, então, o dopacromo. Esse produto se decompõe gradualmente, para gerar DHI (di-hidroxiindole) e, em níveis menores, pela ação da enzima TYRP2 (Proteína Relacionada a Tirosinase-2), se forma o DHICA (ácido di-hidroxiindole-2-carboxílico) (Pillaiyar et al., 2015). Por último, o DHICA sofre oxidação pela TYRP-1 (Proteína Relacionada a Tirosinase-1) em murinos ou pela tirosinase em humanos (Lai et al., 2017). Após a polimerização dos produtos, obtém-se a eumelanina, que apresenta coloração marrom a preta (Slominski et al., 2004). Por outro lado, a formação da feomelanina é dependente da presença de grupos tióis, como glutatona e cisteína (Lin & Fisher, 2007). Nessa via, a dopaquinona é conjugada aos tióis para produzir 2-S-cisteinildopa, 5-S-cisteinildopa que é o produto principal, e a glutatiónildopa (Slominski et al., 2004; Pillaiyar et al., 2015). Esses produtos sofrem oxidação e geram intermediários benzotiazinas, que após polimerização originam a feomelanina (Pillaiyar et al., 2015), que exibe uma coloração vermelha ou amarela (Slominski et al., 2004). O tipo de melanina a ser produzida depende da função das enzimas melanogênicas e da disponibilidade de substratos (Yamaguchi et al., 2007).

A biossíntese da melanina é regulada através de uma série de vias de sinalização intracelulares associadas às enzimas Tirosinase, TYRP-1 e TYRP-2. As vias mais comumente envolvidas nesta regulação envolvem o Fator de Transcrição associado a Microftalmia (MITF) (Pillaiyar et al., 2015).

Na via de sinalização dependente de AMPc, o hormônio estimulador de melanócito α (α -MSH) regula a melanogênese ao se ligar ao Receptor de Melanocortina 1 (MC1R). Desse modo, promove a ativação da adenilato ciclase, que aumenta os níveis intracelulares de cAMP e ativa a PKA, a qual promove a fosforilação de CREB que então, ativa a expressão gênica de MITF. Esse fator de transcrição faz a regulação de genes codificadores das proteínas relacionadas à melanogênese (Lin & Fisher, 2007). Outra cascata de sinalização que também direciona a expressão gênica de MITF envolve a glicoproteína Wnt. Nessa via, a WNT, liga-se ao receptor Frizzled (Fz) e leva à inativação da enzima glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β), seguido pelo acúmulo de β -catenina citoplasmática e sua translocação para o núcleo, onde promove o aumento da expressão gênica de MITF (Pillaiyar et al., 2015; D'Mello et al., 2016). A via de sinalização da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) também regula a melanogênese. Uma vez que

a ativação de ERK fosforila MITF no resíduo de serina 73, com isso, ocorre a ubiquitinação e degradação desse fator (Chang et al., 2012).

1.2.2 Desenvolvimento do melanoma

As características do melanoma, assim como, de outros tumores sólidos malignos, são a proliferação descontrolada, distúrbios de diferenciação e da morfologia celular, invasão e disseminação metastática para órgãos distantes (Haass et al., 2005; Ciarletta et al., 2011). Assim, em melanomas, a transformação celular resulta de alterações genéticas ou epigenéticas herdadas ou induzidas por agentes carcinógenos, que se constituem em ativação de proto-oncogenes e inativação ou silenciamento de genes supressores tumorais ou de reparo do DNA (Bertolotto, 2013; Jin & Robertson, 2013).

Estudos realizados por Clark et al., (1984), sugeriram um modelo geral de desenvolvimento do melanoma, no qual a primeira etapa é representada pelo agrupamento dos melanócitos, levando à formação de um nevo benigno. O desenvolvimento de atipia citológica nestes nevos, resultaria na formação de nevos displásicos.

A iniciação do processo tumorigênico está relacionada as mutações ativadoras dos oncogenes homólogo B do oncogene viral de sarcoma murino (*BRAF*) e do homólogo do oncogene viral do neuroblastoma humano (*NRAS*), que são encontradas em quase 50% e 20% dos melanomas, respectivamente (Vredeveld et al., 2012; Liu et al 2014;). Mutações em *NRAS* resultam na ativação constitutiva da proteína (N-Ras), que se torna capaz de ativar de forma contínua a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Homet & Ribas, 2014). A mutação mais comum no gene *BRAF* causa a substituição do aminoácido valina (V) pelo ácido glutâmico (E) na posição 600 do gene B-Raf (V600E), resultando em uma proteína quinase (B-Raf) constitutivamente ativa, que promove a melanomagênese, também, pela ativação das MAPKs (Ali et al., 2013).

Nesse contexto, a ativação das MAPKs resulta em proliferação celular descontrolada, sendo um passo importante para a transformação dos melanócitos (Testa et al., 2017). A sinalização das MAPKs é iniciada pela ligação de fatores de crescimento a receptores de tirosina quinases, levando à sua ativação, o que

estimula a conversão de N-RAS para o seu estado ativado (ligado ao GTP) (McCain, 2013). A proteína N-RAS ativa pode, então, fosforilar B-RAF, levando à sua ativação, assim, B-RAF pode fosforilar e ativar MEK1/2, que, por sua vez, ativa ERK1/2, resultando na translocação e regulação de vários fatores de transcrição no núcleo (Burotto et al., 2014).

Outros subgrupos de MAPKs, incluem a JNK/SAPK (quinase c-Jun N-terminal/quinase ativada por estresse) e a quinase p38, que também regulam a sobrevivência de células de melanoma e podem ser alvos potenciais para o tratamento desse câncer (Uzdensky et al., 2013). Em resposta a fatores externos como estresse, citocinas, fatores de crescimento ou hormônios, a JNK fosforila c-Jun, um componente do fator de transcrição AP-1 (Alexaki et al., 2008). AP-1 é homo ou heterodímero, que consiste em duas subunidades das famílias Jun (c-Jun, JunB e JunD) e Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2). No melanoma, JNK é frequentemente ativado constitutivamente, porém o seu papel é muitas vezes ambíguo, pois pode atuar como oncogene ou supressor de tumor. Essa contradição, depende das vias ativadas acima e abaixo dessa quinase e da presença de várias isoformas de Jun e Fos em uma determinada célula (Uzdensky et al., 2013). Enquanto a quinase p38 está relacionada ao destino celular, por estimular a apoptose, através da ativação das proteínas pró-apoptóticas NOXA e PUMA. A proteína p38 também pode ativar os fatores de transcrição CREB e MITF, por meio da ativação da Proteína quinase 2 Ativada por Proteína quinase Ativada por Mitógeno (MAPKAPK2) e do Ativador de Fator de Transcrição 2 (ATF2), levando à sobrevivência e proliferação celular (Uzdensky et al., 2013).

A quinase AKT, também, exerce influência sobre a proliferação celular e sobrevivência no melanoma. Isso porque, atua sobre substratos que são importantes reguladores desses eventos, como o BAD, p21, p27, caspase 9 e MDM2 (Davies, 2012). AKT faz parte da via de sinalização da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) (Platz et al., 2008). Nessa via, a PI3K fosforila o PIP2 para gerar PIP3, um segundo mensageiro que induz a fosforilação e ativação da AKT (Dannemann et al., 2010). A AKT é uma serina-treonina quinase, assim, é fosforilada em 2 resíduos, Thr308 e Ser473, podendo causar um efeito anti-apoptótico e promover a progressão do câncer (Paluncic et al., 2016).

Sabe-se que a ativação de proto-oncogenes, por si só, não é suficiente para causar o melanoma (Paluncic et al., 2016), uma vez que a progressão pelo ciclo celular depende da passagem por pontos de controle desse ciclo celular (Rayess et al., 2012). Dessa forma, mesmo com a ativação de oncogenes, estes mecanismos de controle estando em pleno funcionamento, a célula entra num processo conhecido como senescência induzida por oncogene (Leclerc et al., 2017).

As alterações genéticas e epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento do melanoma, incluem a inativação do gene do inibidor de quinase dependente de ciclina 2 A (CDKN2A) que pode ocorrer por deleção, mutação ou metilação do promotor (Jonsson et al., 2010). Isso ocorre para promover o escape da senescência e, conseqüentemente, proporcionar a imortalização celular (Gray-Schopfer et al., 2006). Em melanócitos o locus do CDKN2A, codifica dois efetores da senescência celular, as proteínas supressoras tumorais p16^{INK4A} e p14^{ARF} (Ross et al., 2012). A p16^{INK4A} é um inibidor das quinases dependentes de ciclina (CDKs), CDK4 e CDK6, que ao suprimir a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), reprime a atividade transcricional de E2F e, assim, impede que a célula avance da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Vernell et al., 2003). Por outro lado, a proteína p14^{ARF} atua ativando p53, através da inibição de MDM2 (Shtivelman et al., 2014), uma ubiquitina ligase que atua como o principal antagonista celular de p53 (Moll & Petrenko, 2003). A p53, por sua vez, estimula a expressão da proteína p21, que é ativa no processo de reparo do DNA (Garner & Raj, 2008). A p21 medeia suas atividades biológicas pela inibição da atividade das CDKs, CDK2 e CDK1, levando à parada do ciclo celular (Abbas & Dutta 2009). Nesse sentido, uma vez que as células tumorais perdem o controle da divisão celular, vão se multiplicando, se estabelecem e formam uma massa tumoral (Chin, 2003). Desse modo, um nevo displásico pode evoluir para um melanoma na fase de crescimento radial, na qual as lesões precursoras progridem para o melanoma *in situ*, neste caso, os melanócitos proliferam descontroladamente, mas permanecem confinados a epiderme (Shain & Bastian, 2016).

Com a progressão do tumor, as células mudam de um fenótipo não móvel epitelial para um fenótipo migratório mesenquimal e ganham a capacidade para invadir outros tecidos (Bedogni & Powell, 2009). Assim, nessa etapa de crescimento vertical, as células proliferam ativamente, invadem a camada inferior da epiderme e

penetram no interior da derme subjacente, através da membrana basal (Larue & Beermann, 2007). Isso se deve, à perda de expressão de moléculas de adesão célula-célula, como as proteínas juncionais, E-caderina, claudina e ZO-1 (Jiang et al., 2015). Assim, as células redirecionam a sua expressão gênica para promover mudanças na arquitetura do citoesqueleto, promover adesão às células mesenquimais e alterar a interação com a matriz extracelular (MEC) (Yilmaz & Christofori, 2009; Craene & Berx, 2013). Essa mudança de fenótipo, inclui a expressão aumentada de N-caderina, vimentina, fibronectina e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Lamouille et al., 2014). Isso está associado à aquisição de propriedades mesenquimais, em um processo de transição epitélio mesenquimal (EMT) (Park et al., 2014). A EMT é importante para a capacidade de invasão e de formação de metástases de tumores epiteliais, bem como, no melanoma (Alonso et al., 2007). Nesse processo as células adquirem propriedades de células-tronco, passando de um estado de maior para menor diferenciação (Bertolotto, 2013).

Como visto, para propiciar a invasão, as células tumorais devem secretar enzimas proteolíticas que possam digerir a MEC. Essa matriz é formada por uma rede complexa de macromoléculas, tais como colágeno, proteoglicanos, fibronectina, laminina e outras glicoproteínas, que atuam como uma barreira à propagação de células tumorais a locais distantes, restringindo o crescimento e a invasão tumoral (Egeblad & Werb, 2002). As MMPs são proteinases, que contém Zn^{2+} no seu domínio catalítico e são capazes de degradar os componentes da MEC. São subdivididas em quatro grupos: colagenases, gelatinases, estromelinas e matrilisinas. Além disso, podem ser produzidas por diferentes células, incluindo leucócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células tumorais (Alizadeh et al., 2014). A maioria das MMPs é secretada como enzimas inativas e ativadas fora da célula por outras MMPs ou serino proteinases, pela clivagem de seus domínios amino-terminais (Pucci-Minafra et al., 2001; Alizadeh et al., 2014). Entre as MMPs, principalmente, as gelatinases MMP -2 (72 kDa) e -9 (92 kDa), estão envolvidas na progressão tumoral, devido a capacidade para degradar o colágeno tipo IV, um dos principais componentes da membrana basal, facilitando assim a invasão celular (Redondo et al., 2005). A atividade proteolítica das MMPs é altamente regulada de maneira precisa e coordenada através de diferentes processos (Lambert et al., 2004). A transcrição gênica das MMPs é influenciada por fatores como citocinas,

fatores de crescimento e modificações no microambiente celular (Polette et al., 2004). Em nível protéico, a atividade biológica das MMPs é determinada por seu estado de ativação (Polette et al., 2004). A atividade das MMPs também é modulada por inibidores comuns de endopeptidases, como as α 2-macroglobulinas, que estão presentes no plasma e fluído dos tecidos (Overall & López-Otín, 2002) e, mais especificamente, pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Brew & Nagase, 2010).

No entanto, salienta-se que nem sempre a doença progride através de cada uma dessas etapas individuais, sendo que os melanomas nas fases de crescimento radial e/ou vertical podem se desenvolver, diretamente, a partir de melanócitos ou nevos transformados (Testa et al., 2017). O passo final no desenvolvimento do melanoma, como mostrado na ilustração 2, é representado pela formação de metástases. Para formar as metástases as células tumorais devem penetrar nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos (intravasamento) e, então, sobreviver à falta de adesão e à resposta imune, para serem transportadas para locais distantes (Bedogni & Powell, 2009). Ao deixarem a vasculatura (extravasamento), as células tumorais invadem o órgão alvo, originando um tumor metastático (Alizadeh et al., 2014).

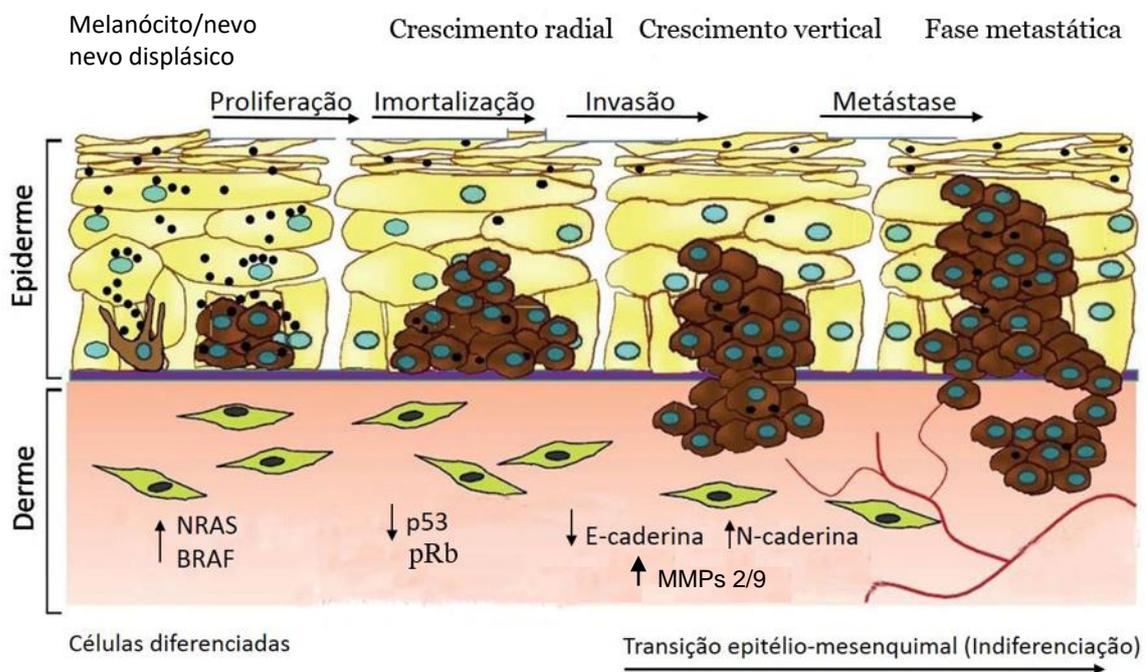


Ilustração 2: Desenvolvimento do melanoma. Adaptada de Bertolotto, 2013.

O resultado do processo metastático depende de interações complexas das células metastáticas com os mecanismos homeostáticos do indivíduo (Langley & Fidler, 2007). As células que concluem esse processo são consideradas como tendo um potencial metastático elevado. Fatores como a vigilância imunológica, parada do ciclo celular e estímulos proliferativos do microambiente determinarão se essas células irão morrer, permanecer quiescentes ou formar uma massa de tumor clinicamente aparente. Além disso, fatores intrínsecos à célula tumoral, incluindo, receptores de fatores de crescimento, proteínas de matriz extracelular, proteases, citocinas e moléculas de adesão celular, também, influenciam a progressão tumoral e metastática (MCGary et al., 2002; Alizadeh et al., 2014).

1.3 Tratamentos para o melanoma

A abordagem terapêutica do melanoma depende de vários fatores prognósticos, incluindo a classificação histológica e a extensão da doença, demonstrados pelos critérios de estadiamento (Ingraffea, 2013). Melanomas em estágio inicial são, frequentemente, tratados com o procedimento cirúrgico (Rastrelli et al., 2014). A cirurgia é a base no controle do melanoma, seja para fins diagnósticos, terapêuticos ou paliativos (Farma et al., 2015). Contudo, o melanoma tem uma grande propensão à disseminação, após a retirada do tumor primário, cerca de 30% dos pacientes desenvolvem metástases em vários órgãos (Sandru et al., 2014), incluindo cérebro, pulmões, fígado e ossos, o que limita o uso de intervenções cirúrgicas (Obenauf & Massagué, 2015). Além disso, o melanoma metastático é notoriamente resistente a terapias convencionais, como radiação e quimioterapia (Lin et al., 2010; Abildgaard & Guldberg, 2015).

A radioterapia utiliza radiação ionizante para destruir as células tumorais. A resposta dos tecidos às radiações depende de diversos fatores, tais como a sensibilidade do tumor à radiação, sua localização e oxigenação, assim como a qualidade e a quantidade da radiação e o tempo total em que é administrada (INCA, 2018). A radioterapia é bastante utilizada no tratamento de neoplasias malignas, com até 60% dos pacientes recebendo radioterapia como parte de seu regime de tratamento. No entanto, esta terapia causa uma amplos efeitos adversos que podem ser graves e causar danos permanentes ao paciente (Hall et al., 2016). Estes efeitos

incluem fadiga, xerostomia, dermatite, pneumonite, mucosites, infertilidade e teratogenicidade (Berkey, 2010). Outro tratamento adjuvante, a quimioterapia, utiliza agentes citotóxicos, que atuam sobre o tumor primário ou sobre as metástases já estabelecidas, principalmente sobre células em proliferação, induzindo dano ao DNA, seguido por apoptose celular (Bhatia et al., 2009; Wu & Singh, 2011). Os efeitos desses fármacos não são seletivos, levando a destruição tanto das células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento (Almeida et al., 2005). Isto explica os seus efeitos colaterais, como perda de cabelo e supressão da medula óssea (Luke & Schwartz, 2013). Por muito tempo, a dacarbazina, agente alquilante, foi o fármaco mais comumente utilizado, resultando em respostas positivas em aproximadamente 10% dos casos e com um impacto discutível na sobrevida global. Outros fármacos, como a vimblastina (alcalóide da vinca), cisplatina/carboplatina (alquilantes) e taxanos, usados em combinações ou em monoterapia, mostraram apenas benefícios de curta duração (Hepner et al., 2017).

Outra modalidade terapêutica é a utilização da imunoterapia, que visa estimular a resposta imunológica do indivíduo, para alcançar a estabilização da doença e a sobrevivência a longo prazo (Davey et al., 2016). Essa abordagem inclui o uso de citocinas como interferon alfa (INF- α) e interleucina-2 (IL-2) (Luke & Schwartz, 2013), vacinas, além de anticorpos direcionados a moléculas imunes, exemplificadas pelo antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e pela proteína de morte celular programada 1 (PD1) e seu ligante (PD-L1) (Ingraffea, 2013; Davey et al., 2016). Contudo, a imunoterapia ainda é um tratamento adjuvante em pacientes com alto risco de recidiva da doença e como tratamento em estágios avançados (irressecáveis ou metastáticos) (Sanlorenzo et al., 2014).

O conhecimento acerca das alterações genômicas envolvidas na gênese do melanoma viabilizaram as terapias mais direcionadas, como o desenvolvimento de inibidores da via das MAPKs (Li & Melton, 2012). Cerca de 45% dos pacientes com melanoma cutâneo têm uma mutação ativadora de *BRAF*^{V600E}, para a qual foram desenvolvidos inibidores altamente seletivos (Garbe et al., 2016). Assim, a utilização de fármacos que inibem a sinalização *BRAF*^{V600E} e/ou MEK pode induzir a regressão da doença e prolongar a sobrevida de pacientes com estas mutações (Flaherty et al., 2012). No entanto, nem todos os indivíduos são responsivos como mostra o

estudo de caso relatado por Simon et al., (2017), de um paciente com melanoma metastático com várias mutações em BRAF e que não respondeu a terapia direcionada com inibidores de BRAF e MEK. Além disso, podem ocorrer recaídas, após alguns meses do tratamento, devido ao desenvolvimento de resistência (Wagle et al., 2011). Um estudo realizado com 132 pacientes com melanoma metastático *BRAF*^{V600E} mutante mostrou que cerca de 50% dos pacientes tratados com inibidor de *BRAF*, vemurafenib (PLX4032), apresentaram progressão da doença, após 6 a 7 meses do início do tratamento (Sosman et al., 2012). Portanto, estas respostas insuficientes destacam a necessidade de novas opções terapêuticas para o melanoma (Li & Melton, 2012), principalmente, fármacos que possam impedir o estabelecimento metastático.

1.4 Modelo de melanoma metastático B16F10

O estudo do melanoma pode ser realizado *in vitro*, utilizando-se de culturas celulares e, *in vivo*, em modelos com vertebrados (Larue & Beermann, 2007). As propriedades mais importantes de células tumorais malignas, incluem, a sua capacidade de invadir tecidos e, posteriormente, estabelecerem-se em um novo local formando os tumorais secundários (Damsky Jr. et al., 2011). As células capazes de gerar tais tumorais secundários são consideradas de alto potencial metastático (Alizadeh et al., 2014).

Um modelo de melanoma amplamente utilizado em trabalhos científicos é do melanoma murino B16. Outros modelos foram obtidos a partir das células B16, selecionadas, após passagens alternadas *in vivo* e *in vitro*, avaliando a sua propensão para formar nódulos tumorais pulmonares. Para isso, as células de melanoma B16 foram inoculadas por via *i.v.* em camundongos isogênicos C57BL/6 e, após 3 semanas, os tumores foram coletados e as células tumorais foram cultivadas *in vitro*. Quando as culturas celulares se tornaram confluentes foram, então, novamente injetadas por via *i.v.* em outros camundongos C57BL/6 e este processo foi repetido por dez vezes. As linhagens obtidas foram denominadas como B16F1 (linhagem da primeira passagem) e, então, numeradas consecutivamente, até a linhagem B16F10, células altamente metastáticas estabelecidas, após 10 ciclos de seleções sucessivas de pontos de metástase pulmonar (Fidler, 1973).

Conforme afirma Fidler (1975), o desenvolvimento das linhagens tumorais derivadas das células B16, é útil para estudar as propriedades celulares, que tornam uma linhagem altamente metastática, em relação a outras.

As células de melanoma B16, também, foram utilizadas como um modelo para estudar os efeitos de tumores nas respostas exsudativas de células inflamatórias *in vivo*. Como esperado, a inoculação *i.v.*, em camundongos, das células B16F10 originou, significativamente, mais tumores pulmonares em relação ao inóculo de B16F1. Apesar dessa diferença na carga tumoral do pulmão, as células inflamatórias em camundongos inoculados com B16F1 ou B16F10 se comportaram de maneira semelhante. Assim, não houve efeito sobre a exsudação de granulócitos ou macrófagos ou nos níveis de monócitos e leucócitos no sangue. Contudo, na presença de B16F1 ou B16F10 os níveis de macrófagos residentes e induzidos foram reduzidos em camundongos com esses tumores (D'Arrigo et al., 1985).

As linhagens celulares com baixa e alta capacidade metastática, B16F1 e B16F10, respectivamente, foram comparadas quanto às suas características invasivas, *in vitro*, em membrana amniótica e, quanto à capacidade para formar colônias pulmonares. Os resultados mostraram que não houve diferenças na capacidade invasora das células, mas a formação de colônias por B16F10 foi, significativamente, maior em relação às células B16F1 (Gehlsen & Hendrix, 1986). Já Kim et al., (2009) mostraram que comparada à linhagem B16, as células B16F10 tem níveis mais elevados de expressão da fosfatase associada à metástase na regeneração do fígado-3 (PRL-3). Os autores mostraram que as células B16 transfectadas com cDNA de PRL-3 tiveram capacidade metastática comparável à de B16F10.

Outra linhagem de melanoma, denominada como B16-BL6 foi originada, a partir da linhagem B16F10, através de um método baseado na seleção, *in vitro* e *in vivo*, de células de melanoma com capacidade de invadir o tecido e veias da bexiga urinária (Poste et al., 1980). A comparação da formação de colônias pulmonares por diferentes linhagens de melanoma, inclusive por B16-BL6, mostrou que os níveis de colonização pulmonar obedeceram a seguinte ordem: B16F0, B16F1 e B16F10, esta última apresentou uma colonização semelhante a apresentada pelas células B16-BL6 (Nakamura et al., 2002).

Para a pesquisa de novos agentes antimetastáticos, dois tipos de modelos animais são utilizados. Um modelo metastático denominado como modelo metastático experimental, que é produzido pelo inóculo de células tumorais em camundongos isogênicos por via *i.v.*, sendo a injeção realizada pela veia caudal e um modelo de metástases espontâneas, no qual realiza-se o inóculo de células tumorais em camundongos isogênicos por via *s.c.* (Poste et al., 1980).

Fidler (1978) desenvolveu um modelo de metástases espontâneas, no qual as células tumorais são inoculadas por via *s.c.* na orelha externa de camundongos C57BL/6. Depois de três a quatro semanas, quando os tumores estão estabelecidos, a orelha e o tumor são retirados e animais são mantidos em condições de sobrevivência. Após seis a oito semanas, os camundongos são eutanasiados e examinados quanto à presença de metástases linfonodais ou viscerais. Outro modelo de metástases espontâneas, é realizado com o inóculo das células B16F10 por via *s.c.* no flanco de camundongos C57BL/6 e, após cerca de 12 dias os tumores são removidos. No décimo segundo dia, após a cirurgia os camundongos são eutanasiados e retirados os pulmões e o fígado para contagem das metástases (Lobos-González et al., 2016).

Conforme afirmam Nakamura et al., (2002), o modelo de metástases espontâneas é superior ao modelo experimental, devido à sua semelhança com as metástases obtidas clinicamente. Por outro lado, o modelo metastático experimental é mais reprodutível e menos tempo é necessário para avaliação do efeito antimetastático. Diante disso, vários autores têm utilizado este modelo para avaliar a atividade antimetastática de diferentes compostos (Mummert et al., 2003; Zhao et al. 2014; Zhang et al., 2015), inclusive a atividade de cisteíno proteases (Guimarães-Ferreira et al., 2007). Além disso, Lobos-González et al., (2016) realizaram estes dois modelos, a fim de verificarem a capacidade do oligonucleotídeo antisense específico para RNAs mitocondriais não codificantes de impedir o crescimento tumoral. Nos dois modelos os autores observaram a inibição das metástases, porém ao contrário do modelo de metástases espontâneas, no modelo experimental os animais tratados apresentaram nódulos pulmonares isso, provavelmente, se deve ao maior número de células circulantes, ao contrário das células provenientes do tumor primário.

2 JUSTIFICATIVA

A busca por fármacos que interfiram sobre a formação de metástases é o grande desafio contra o câncer, uma vez que as opções terapêuticas disponíveis agem sobre o tumor primário ou sobre as metástases já instituídas, não sendo eficazes em impedir o estabelecimento deste processo. Além disso, sabe-se que melanomas são altamente resistentes à maioria das formas de tratamento quimioterápicos disponíveis, o que justifica a busca por novos fármacos direcionados a esta doença. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa se empenha a estudar as atividades antitumoral e antimetastática das proteases de *V. cundinamarcensis*, que são relacionadas a diferentes mecanismos, que incluem a atividade citotóxica, a redução da adesão celular, além da diminuição de processos como a inflamação e a angiogênese tumoral. Desse modo, a proposta deste trabalho é compreender melhor o efeito da fração CMS2 sobre melanomas modificando seu comportamento invasivo e metastático. Ao caracterizar as respostas das células tumorais frente a CMS2 e elucidar vias de sinalização, que participam do seu efeito antimetastático, este estudo irá contribuir para a fundamentação da sua potencial utilização no tratamento do câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da subfração CMS2 do látex do fruto de *Vasconcellea cundinamarcensis* sobre parâmetros de diferenciação celular na linhagem de melanoma metastático B16F10, bem como determinar mecanismos moleculares envolvidos neste efeito.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Obter a subfração CMS2, a partir da fração P1G10 do látex de *V. cundinamarcensis*;

3.2.2. Em ensaios *in vitro* avaliar os efeitos da subfração CMS2, sobre a (s):

- Viabilidade celular;
 - Melanogênese (produção de melanina, atividade de tirosinase, expressão gênica de enzimas envolvidas e da proteína MITF);
 - Morfologia celular;
 - Ciclo celular;
 - Senescência celular (atividade de β -galactosidase, expressão de p21 e p53);
 - Etapas do desenvolvimento tumoral:
 - Migração celular (capacidade migratória e expressão de p16-ARC);
 - Invasão celular (capacidade invasora e atividade das MMPs);
 - Formação de colônias;
 - Expressão de proteínas de vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento do melanoma (MAPKs, PI3K/AKT, E- e N-caderina);
- 3.2.3. Em ensaio *in vivo* avaliar a colonização pulmonar das células B16F10 pré-expostas à CMS2.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Biológico

Amostra em estudo

Látex exsudado de frutos imaturos de *Vasconcellea cundinamarcensis*, originário do Chile (exsicata nº 15063 depositada na Universidad de La Serena, Chile) e fornecido pelo Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG.

Animais

Camundongos C57BL6 machos adquiridos do Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (Cebio/ICB/UFMG), com idade entre 6 e 8 semanas, pesando cerca de 20 a 22 g. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em ciclo de claro/escuro de 12/12h, recebendo água e ração *ad libitum*. O protocolo experimental desenvolvido foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 229/2013 - Anexo A).

Linhagem Celular

B16F10, células de melanoma de alto potencial de colonização pulmonar, cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo – SP, Brasil.

4.1.2 Principais reagentes e solventes

Ácido acético glacial P.A., ácido etilenodiaminotetra-acético - sal dissódico (EDTA), ácido clorídrico (HCl), álcool etílico absoluto, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico e dibásico de sódio, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio - **Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, São Paulo, Brasil.**

Acrilamida – **Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA**

Agarose padrão baixa eletroendoosmose – Agargen® - **Laboratórios Espanagar, Madri, Espanha.**

Álcool Metílico – **Dinâmica Química Contemporânea Ltda, São Paulo, Brasil.**

Ampicilina sódica, anfotericina B, albumina sérica bovina (BSA), ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperazino-N'-etaneusulfônico (HEPES), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio ou sal de tetrazólio (MTT), , 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanosulfonato hidrato (CHAPS), dimetilsulfóxido (DMSO), deoxicolato de sódio, estreptomicina, , hidroxíúreia, iodeto de propídeo (PI), 4-nonilfenil-polietilenoglicol (NP-40), padrão de peso molecular - Color Burst Electrophoresis Marker, persulfato de Amônio (APS), reagente de Bradford, tris base (Tris hidroximetil aminometano), N',N',N',N'-tetrametil-etileno-diamina (TEMED), Triton-X 100, Tween 20 – **Sigma- Aldrich, St Louis, EUA.**

Cloreto de cálcio, fosfato dibásico de sódio – **Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.**

Glicerol – **Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil.**

Glicina, Sódio Dodecil Sulfato (SDS) - **Vetec Química fina Ltda, Duque de Caxias, Brasil, RJ, Brasil.**

Ketamina (Dopalen R), e Xilasina (Anasedan R) - **Ceva Saúde Animal Ltda. Paulínia, SP, Brasil.**

Meio de cultura RPMI 1640 desidratado, solução aquosa de tripsina (ATV) - **Cultilab Mat.Cult. Cel. Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil.**

Nitrogênio líquido- **White Martins do Brasil S/A, Contagem, Minas Gerais, Brasil.**

Substrato quimioluminescente para peroxidase – Luminata R Forte Western HRP substrate e ReBlot plus strong antibody stripping solution, 10x - **EMD**

Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, EUA.

Soro fetal bovino (SFB) - **Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland, EUA.**

4.1.3 Principais soluções

4.1.3.1 Obtenção e caracterização da fração CMS2

Tampão de ativação

L-Cisteína.....	606,00 mg
EDTA 500 mM.....	4,00 mL
DTT.....	160,00 mg
Tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) q.s.p.....	200,00 ml

Tampão acetato de sódio 2,0 M pH 5

Acetato de sódio.....	272,16 g
Água destilada q.s.p.	1 L

O pH foi ajustado para 5. A partir da diluição desta solução foram obtidas as soluções de tampão acetato de sódio a 1,5 M, 1,0 M e 0,1 M pH 5.

Solução de BAPNA 100 mM

BAPNA.....	90,00 mg
DMSO.....	2,00 mL

Esta solução foi mantida a -20 C até o momento de uso.

Solução de EDTA 500 mM

EDTA.....	37,22 g
Água destilada q.s.p.	200,00 mL

O EDTA foi completamente dissolvido em 180 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 1,0 M e o volume completado para 200 mL.

Tampão de incubação para atividade amidásica

Cisteína 200 mM	0,75 mL
EDTA 500 mM	0,12 mL
BAPNA 100 mM	90,00 µL
Tampão fosfato 25 mM pH 8,0 q.s.p.	30,00 mL

4.1.3.2 Cultura celular

Tampão PBS pH 7,4

Fosfato dibásico de sódio.....	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio.....	0,25 g
Cloreto de sódio.....	8,20 g
Cloreto de potássio.....	0,20 g

Água ...destilada q.s.p.....1 L
 O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C, 2 ATMs durante 20 min.

Tampão PBS/EDTA pH 7,4

Fosfato dibásico de sódio P.A.1,15 g
 Fosfato monobásico de potássio P.A.0,25 g
 Cloreto de sódio.....8,20 g
 Cloreto de potássio.....0,20 g
 EDTA.....1,37 g
 Água destilada q.s.p.1 L
 O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e o tampão foi esterilizado por autoclavação à 120°C durante 20 min.

Meio RPMI-1640

Meio RPMI-1640 desidratado.....10,43 g
 Bicarbonato de sódio1,20 g
 Hepes2,38 g
 Ampicilina sódica.....0,10 g
 Estreptomicina0,10 g
 Anfotericina B.....5,00 mg
 Água deionizada q.s.p.1 L
 Os reagentes foram completamente dissolvidos em 800 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,9 ou 7,4 com NaOH 1,0 M e o volume completado para 1 L. O meio foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade absoluta de 0,22 µm.

Solução corante de azul de Tripano

Azul de Tripano0,12 g
 Solução NaCl 0,9% q.s.p30,00 mL

4.1.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Solução aquosa de APS 10% (p/v)

APS1,00 g
 Água deionizada q.s.p.10,00 mL

Solução aquosa de SDS 10% (p/v)

SDS1,00 g
 Água deionizada q.s.p.10,00 mL

Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tris base.....18,21 g
 Água deionizada q.s.p.100,00 mL
 O pH foi ajustado para 8,8 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

Tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8

Tris base.....	12,14 g
Água deionizada q.s.p.	100,00 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

Solução para o gel separador desnaturante 10% acrilamida

Solução aquosa de Acrilamida 30%	2,00 mL
Tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8.....	1,50 mL
Água deionizada.....	2,28 mL
SDS 10% (p/v)	120,00 µL
Solução de APS 10% (p/v)	30,00 µL
TEMED	12,00 µL

Solução para o gel separador desnaturante 12% acrilamida

Solução aquosa de Acrilamida 30%	2,80 mL
Tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8.....	2,45 mL
Água deionizada	2,28 mL
SDS 10% (p/v)	140,00 µL
Solução de APS 10% (p/v)	35,00 µL
TEMED	8,00 µL

Solução para o gel separador desnaturante 8% acrilamida

Solução aquosa de Acrilamida 30%	1,30 mL
Tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8.....	1,30 mL
Água deionizada	2,30 mL
SDS 10% (p/v)	50,00 µL
Solução de APS 10% (p/v)	50,00 µL
TEMED	3,00 µL

Solução para o gel concentrador desnaturante 4% acrilamida

Solução aquosa de Acrilamida 30%	0,267 mL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8.....	0,5 mL
Água deionizada	1,19 mL
SDS 10% (p/v)	20,00 µL
Solução de APS 10% (p/v)	10,00 µL
TEMED	4,00 µL

Solução corante de géis

Corante azul-brilhante de Coomassie G-250.....	125,00 mg
Ácido acético glacial P.A.....	10,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Solução descorante de géis

Metanol P.A.....	4,00 mL
Ácido acético glacial P.A.....	8,00 mL
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Tampão de amostra eletroforese desnaturante 6X (sem agente redutor)	
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v).....	700,00 µL
Glicerol.....	300,00 µL
SDS.....	100,00 mg
Azul de bromofenol.....	120,00 mg

Tampão de amostra eletroforese desnaturante 6X (com agente redutor)	
Tris-SDS 4X.....	4,00 mL
Glicerol.....	3,00 mL
SDS.....	1,00 g
2-mercaptoetanol.....	0,600 mL
Azul de bromofenol.....	1,200 mg
Água deionizada qsp.....	10 mL

Tampão de corrida eletroforese desnaturante 5X (solução estoque)	
Tris base.....	15,10 g
Glicina.....	94,00 g
SDS.....	5,00 g
Água destilada q.s.p.....	1 L
A solução de uso foi preparada no momento do uso por diluição 1:5 em água Milli Q.	

4.1.3.4 Zimografia

Gel Concentrador (4%)	
Solução de Acrilamida 30%.....	0,325 mL
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.....	0,625 mL
Água deionizada.....	1,525 mL
SDS 10%.....	25,00 µL
APS 10%.....	12,50 µL
TEMED.....	4,00 µL

Gel Separador (8%)	
Solução de Acrilamida 30%.....	2,00 mL
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8.....	1,87 mL
Água deionizada.....	2,72 mL
Solução de gelatina (15mg/mL).....	0,75 mL
SDS 10%.....	75,00 µL
APS 10%.....	75,00 µL
TEMED.....	7,50 µL

Tampão Tris-HCl 1M pH 7,4	
Tris base.....	121,14 g
Água deionizada q.s.p.	1 L
O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.	

Tampão de lavagem	
Tris-HCl 1M pH 7,4	25,00 mL
Triton X-100.....	12,50 mL
Água deionizada q.s.p.	500,00 mL

Tampão de desenvolvimento	
Tris-HCl 1M pH 7,4.....	10,00 mL
CaCl ₂ 1M.....	2,00 mL
NaCl 5M.....	8,00 mL
Chaps 0,02% p/v.....	40,00 mg
Água destilada q.s.p.....	200,00 mL

4.1.3.5 Coloração de colônias

Solução de cristal violeta 0,5% p/v	
Cristal Violeta	0,5 g
Etanol 70% v/v.....	100 mL

4.1.3.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Solução fluorocrômica hipotônica de Iodeto de Propídio (HFS)	
Iodeto de propídio.....	5 mg
Citrato de sódio	100 mg
Triton X 100	0,5 mL
Água destilada q.s.p.	100 mL

4.1.3.7 Soluções para gel de agarose

TAE 50 X	
Tris base.....	242,00 g
Ácido Acético Glacial.....	57,10 mL
EDTA 0,5M pH 8,0.....	100,00 mL
Água deionizada q.s.p.....	1000,00 mL
Gel de agarose (1% p/v)	
Agarose.....	0,70 g
Água destilada.....	70,00 mL
TAE 50X.....	0,70 mL

Tampão de corrida	
TAE 50X.....	14,00 mL
Água destilada q.s.p.....	700,00 mL

Solução de Brometo de Etídio	
Brometo de etídio.....	100,00 mg

Água deionizada q.s.p.....	10,00 mL
Tampão de amostra de DNA 6 X	
Azul de bromofenol 0,05% (p/v).....	5,0 mg
Xileno cyanol FF 0,05% (p/v).....	5,0 mg
Tris-HCl 10 mM pH 7, 5.....	0,1 mL
EDTA 60 mM.....	1,2 mL
Glicerol 60% (v/v).....	6,0 mL
Água deionizada q.s.p.....	10,00 mL

4.1.3.8 Western Blotting

Tampão de lise	
Tris-HCl 1 M pH 7,4.....	25,00 µL
Cloreto de sódio 5 M.....	15,00 µL
Triton X-100.....	30,00 µL
Ortovanadato de sódio 0,4mM.....	0,40 mg
Coquetel de inibidor (S8820 – sigma).....	1,603 mg
Água deionizada q.s.p.	1,00 mL

Tampão Tris-Glicina 10x	
Tris-base.....	30,0 g
Glicina.....	149,0 g
Água deionizada qsp.....	1 L

Tampão TBS 10X	
Tris-Base.....	24,2 g
NaCl.....	80,0 g
Água deionizada qsp.....	1 L
O pH foi ajustado para 7,6 com HCl 10 M e a solução foi armazenada a 4°C.	
<i>Tris-Buffered Saline plus Tween 20 (TTBS)</i>	
TBS 10x.....	100,0 ml
Tween 20.....	1,0 ml
Água deionizada q.s.p.	1 L

Solução de bloqueio com albumina sérica bovina (BSA)	
BSA	2,50 g
TTBS q.s.p.	50,00 mL

Solução de bloqueio com leite desnatado	
Leite em pó desnatado	2,50 g
TTBS q.s.p.	50,00 mL

Tampão de transferência	
Tris-Glicina 10x.....	100 ml
Metanol.....	200 ml
Água deionizada qsp.....	1 L

4.1.3.9 Ensaio *in vivo*

Solução anestésica	
Cetamina 10%.....	10,0 mL
Xilasina 2%.....	7,5 mL

4.1.4 Anticorpos e Kits

❖ Anticorpos primários monoclonais produzidos em coelhos:

-anti-Akt total e anti-fosfo-Akt (Ser473), anti-E-caderina, anti-Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, EUA.

❖ Anticorpos primários policlonais produzidos em coelhos:

-anti-p38 MAPK Total, anti-SAPK/JNK total e anti-fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), anti-N-caderina, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, EUA.

-anti-p21, anti-p53, Abcam, Cambridge, Reino Unido

❖ Anticorpos primários monoclonais produzidos em camundongos:

-anti- β Tubulin, anti-p16-ARC (C-3), anti-MITF, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA.

❖ Anticorpos primários policlonais produzidos em camundongos:

-anti- Fosfo- p38 (Thr180/Tyr182), Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, EUA

❖ Anticorpos secundários Horseradish Peroxidase (HRP) - conjugados:

-Anti- rabbit e Anti- mouse, Sigma- Aldrich, St Louis, EUA.

❖ Coquetel de inibidores para proteases

-SIGMAFAST® Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Sigma- Aldrich, St Louis, EUA.

Componentes do kit e suas propriedades inibitórias específicas:

- AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) inibe serino proteases;
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) inibe metaloproteases;
- Bestatin inibe as aminopeptidases e alanil aminopeptidases;
- E-64 (N- (trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida) inibe as cisteíno proteases;

- Leupeptina inibe as serino e cisteíno proteases;
 - Aprotinina inibe a tripsina e a elastase de leucócitos humanos.
-
- ❖ **Kit para extração de RNA** (PureLink® RNA Mini Kit) – Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA.
 - ❖ **Kit para a síntese de cDNA** (High Capacity cDna Reverse Transcription Kits, 200 reactions) – Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA.
 - ❖ **Kit para PCR** (Platinum® TAQ DNA Polymerase) – Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA.
 - ❖ **Kit Senescence β -galactosidase Staining** - Cell Signaling Technology Inc., Boston, MA, EUA.

4.1.5 Principais Equipamentos

Agitador Magnético modelo 252 - Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratório, São Paulo, Brasil.

Balança analítica Toledo – Gehaka Eletro-EletrônicaLtda, São Paulo, Brasil.

Banho Maria calibrado a 37°C; Bomba de Vácuo Diapump - Fanem, São Paulo, SP, Brasil.

Bomba Aspirante modelo “H” - Nevoni Equipamentos Médicos e Odontológicos, Lapa, SP, Brasil.

Capela com fluxo laminar de ar ultra-filtrado - Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, Campinas, SP, Brasil.

Câmera fotográfica para microscópio Moticam 2500 - Motic Incorporation Ltd., Hong Kong, China.

Câmera digital Canon modelo PC1428 para digitalização de imagens de géis - Canon Inc., Tóquio, Japão.

Centrífuga refrigerada, Sorvall ST 16R, equipada com rotor para placas modelo M-20; Leitor de microplacas, Multiskan GO - ThermoScientific, San Jose, Califórnia, EUA.

Citômetro de Fluxo – FACscalibur Cytometer - Becton & Dickinson, San Diego Califórnia, USA.

Estufa incubadora 37 °C, atmosfera controlada e contendo 5,0% CO₂ (v/v) – Nuair Equipaments, Pymouth, Massachusetts, USA.

Fotodocumentador, ImageQuant™ LAS 4000 Biomolecular Imager – GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido.

Freezer a temperatura de -80 °C e Ultra-sonicador modelo FS-28H – Thermo Scientific, San Jose, California, EUA.

Hemocitômetro (câmara de Neubauer) 0,0025 m² x 0,100 mm de profundidade FORTUNA®, Berlim, Alemanha.

Medidor de pH modelo NT-PH2 - Novatécnica Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil, equipado com eletrodo modelo V-620 C – Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Microscópios ópticos OLYMPUS BX451, OLYMPUS CX4IRE, OLYMPUS BX41, OLYMPUS CX41. Metrimpex, Hungria.

Nanodrop NanoVue Plus Spectrophotometer - GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido. Refrigerador ajustado à temperatura de +4°C; freezer à temperatura de – 20°C Consul-Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, Brasil.

Termociclador MiniCycler PTC-150 Thermal Cycler – MJ Research, Waltham, EUA.

Sistema de eletroforese, de transferência semi-seca e fonte de energia, Protein Electrophoresis and Blotting – Bio Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA.

4.1.6 Diversos

Agulhas e seringas descartáveis - INJEX Indústrias Cirúrgicas, LTDA., Ourinhos, Brasil.

Botijão de CO₂ e de nitrogênio de 25 kg de gás acoplado ao sistema de ultrafiltração - Air Liquide Ltda, São Paulo, SP, Brasil

Garrafas (25 e 75 cm²) e placas (6, 12, 24 e 96 poços) de poliestireno para cultura celular - KASVI, Curitiba, Brasil.

Lâminas e lamínulas - INVICTA, São Paulo, Brasil

Material cirúrgico (Pinças, tesouras e bisturis) - Procure – Cirúrgica, Belo Horizonte, MG.

Membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno), Immobilon®-P Membrane poro de 0,45µm - EMD Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, EUA.

Membranas filtrantes de nitrato de celulose, com 0,45 µm e 0,22 µm de diâmetro de poro - Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA.

Microtubos tipo eppendorf de 0,6; 1,5 e 2,0 mL – Axygen Scientific, Califórnia, EUA.

Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000 µL – FisherBrand, ThermoFisher Scientific, San Jose, California, EUA.

Tubos de polipropileno, com fundo cônico, de 15 e 50 mL de capacidade e dotados de tampa rosqueável - Quimex Corning Incorporated, New York, NY, EUA

Vidrarias (Béqueres, Ehrlenmeyers, Funis, Pipetas graduadas, Provetas, Quitassatos, Balões volumétricos e Tubos de ensaio com 14 X 1 cm de dimensões) - Vidrolabor-Thermex Astra Brasil Ind. Vidros, F. Vasconcelos, SP, Brasil.

4.1.7 Programas computacionais

FlowJo versão 7.6.5 para análise dos dados de citometria de fluxo – TreeStar Inc., Ashland, EUA.

GraphPadPrism versão 5.0 – para análise de resultados em forma gráfica e testes estatísticos. GraphPad *Software*. La Jolla, California, EUA.

ImageJ versão 1.46 – para análise densitométrica de bandas e contagem do número de células em imagens. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA.

Motic Image Plus 2.0 – *software* utilizado para aquisição de imagens em culturas celulares. Motic, Xiamen, China.

TScratch – CSE Lab, Zurique, Suíça.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção da fração CMS2 do látex de *V. cundinamarzensis*

4.2.1.1 Coleta, secagem e armazenamento do látex

A partir de incisões com cerca de 0,2 cm de profundidade feitas no epicarpo de frutos imaturos da espécie *Vasconcellea cundinamarzensis*, foi realizada a coleta do látex exudado em tubos de polipropileno, sendo armazenado a -20°C. Posteriormente, o látex foi liofilizado e armazenado novamente nessa mesma temperatura até seu processamento (Baeza et al., 1990).

4.2.1.2 Preparação do látex para cromatografia de gel filtração

Para a separação cromatográfica do látex liofilizado foram dissolvidos 15,0 g em 75,0 mL de solução tampão de ativação (item 4.1.3.1). A mistura foi, então, agitada durante 30 min e centrifugada (9.000 x g) durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado sendo repetido este procedimento com o resíduo, utilizando-se 25,0 mL do tampão de ativação. O filtrado foi aplicado em uma coluna contendo resina Sephadex G-10, após ter sido equilibrada com tampão acetato de sódio 1,0 M pH 5,0 (item 4.1.3.1) (Teixeira et al., 2008).

As frações coletadas foram submetidas a determinação da absorbância a 280 nm. De acordo com o perfil protéico obtido, as frações que compunham o primeiro pico foram reunidas, originando a amostra P1G10, e as correspondentes ao segundo pico, P2G10. A amostra P1G10 foi concentrada e, então, determinado a concentração protéica total e a atividade amidásica específica.

4.2.1.3 Purificação em resina CM Sephadex C-25

Para purificação cromatográfica da fração P1G10, os grupos tiólicos das proteases que a compõe foram bloqueados reversivelmente com para-hidroximercuribenzóico ácido (pOHMB) na proporção de 1 M da fração para 10 M do inibidor. Foram utilizados como parâmetros para cálculo da molaridade a concentração total de proteínas e um valor médio do peso molecular das proteases de 23 KDa. Após incubação por 30 min, a solução foi submetida a diálise durante 48 h contra tampão acetato 0,1 M pH 5,0 (item 4.1.3.1). A solução resultante foi, então, aplicada a uma coluna contendo a resina CM Sephadex C-25, previamente equilibrada com 0,1 M de acetato de sódio. As proteínas foram eluídas, com um fluxo constante de 0,5 mL/min, contra gradiente linear, entre 0,1 e 1,2 M de acetato de sódio, e as frações obtidas foram agrupadas conforme o perfil protéico, medido em 280 nm, e a atividade amidásica (item 4.2.1.5) correspondendo aos três picos cromatográficos denominados de CMS-1, CMS-2 e CMS-3 (Teixeira et al., 2008). Os eluatos correspondentes a CMS2 foram reunidos e submetidos à determinação da concentração protéica e da atividade amidásica.

4.2.1.4 Determinação da concentração protéica

A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para isso, utilizou-se volumes entre 1,0 e 10,0 μL das amostras que foram completados para 10,0 μL com água deionizada. Em seguida foram adicionados 190 μL da solução de Bradford, permanecendo em incubação por 15 min até a leitura da densidade ótica em 595 nm. Para os cálculos das concentrações protéicas foi realizada uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações entre 0,5 e 10,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.2.1.5 Determinação da atividade amidásica

A atividade amidásica das frações foi determinada com o substrato sintético BAPNA (Baeza et al., 1990). Na determinação da atividade amidásica específica, 5 μg das frações foram incubados a 37°C com 1,0 mL do tampão de incubação para atividade amidásica (item 4.1.3.1). Após surgimento de uma cor amarela, a reação foi paralisada com 60 μL de solução de ácido acético 60% (v/v). A determinação da concentração molar de para-nitro-anilida liberada (produto da reação) foi feita através da leitura em 405 nm e sua relação com o coeficiente de extinção molar desta substância, que é 8800 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A atividade amidásica específica foi expressa em concentração molar de produto formado por unidade de massa da enzima em um determinado tempo, mais especificamente, $\text{nM produto} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ enzima.

4.2.2 Ensaio biológicos *in vitro*

4.2.2.1 Cultivo celular

As células B16F10, melanoma murino metastático, cujo registro no *American Type Culture Collection* (ATCC) é CRL-6475, foram cultivadas em meio RPMI 1640, pH 7,4 contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), sendo mantidas em frascos de cultivo em estufa de cultura a 37°C com atmosfera úmida e 5% (v/v) de CO_2 . Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, foram realizados subcultivos para os ensaios biológicos.

Para isso, o meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas com 2,0 mL de solução PBS/EDTA pH 7,4 (item 4.1.3.2), aspirando-a logo em seguida. Colocou-se 0,5 mL de solução ATV (solução de tripsina 0,2% e versene 0,02%), que foi inativada após completo desprendimento das células com 1,5 mL do meio RPMI 1640 a 10 % (v/v) de SFB. Obteve-se, então, uma suspensão celular que, após contagem, foi ajustada à densidade celular apropriada para a realização dos experimentos. A viabilidade celular foi determinada pela exclusão de células coradas com solução de azul de tripano (item 4.1.3.2).

O estoque das células viáveis foi realizado pelo congelamento de alíquotas de 1mL da linhagem celular (em 25% SFB e 10% DMSO) acondicionadas em criotubos, que foram mantidos em nitrogênio líquido.

4.2.2.2 Exposição das células B16F10 à CMS2

As células foram semeadas em frascos de cultivo de 75 cm², 1x10⁵ células/mL ou 1x10⁴ células/mL, para serem expostas à subfração CMS2 durante 2 dias ou 6 e 8 dias, respectivamente. Após 24h de adesão nos frascos, as células foram expostas à CMS2 (1, 5 ou 10 µg/ml) diluída em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de SFB. As células controles permaneceram sem tratamento, sendo mantidas em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de SFB. Em todos os grupos celulares foram realizadas trocas do meio de cultivo a cada 72h.

Após cada período de tratamento as células controles e tratadas com CMS2 1 µg/ml permaneceram aderidas a superfície do frasco de cultivo, então, foram lavadas com PBS/EDTA pH 7,4 (item 4.1.3.2) e suspensas em uma solução de tripsina, que foi inativada com RPMI 1640/SFB 5%. Por outro lado, após os diferentes períodos as células tratadas com CMS2 5 ou 10 µg/ml estavam em suspensão, por isso, foram centrifugadas a 1000 rpm durante 1 minuto para retirar as células da presença das proteases. Por fim, todas as células foram distribuídas, conforme os diferentes protocolos experimentais descritos a seguir.

4.2.2.3 Determinação da viabilidade celular

As células B16F10 foram semeadas em placas de 96 cavidades (3×10^3 células/cavidade). Após adesão das células foi adicionado ao meio 10 μ L de uma solução de resazurina (10 mg/ml) e, depois de 4 h de incubação, foi realizada a leitura espectrofotométrica à 570 e 600 nm (Rampersad et al., 2012). A diferença entre os valores de densidades óticas (D.O.) foi realizada para o cálculo da viabilidade celular. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis, considerando o controle (RPMI/FBS 5%) como 100% de viabilidade.

4.2.2.4 Avaliação do conteúdo de melanina

Para a quantificação de melanina as células foram semeadas em placas de 6 cavidades (4×10^5 células/cavidade) em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de SFB e deixadas em condições de adesão por 20h. Logo após, foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 e depois, lisadas com 170 μ L de NaOH 1M. Os lisados foram incubados a 80°C por 2h e submetidos a sonicação por 15 min. A absorbância foi determinada a 405 nm e o conteúdo de melanina determinado utilizando uma curva-padrão de melanina sintética (SIGMA) (Lehraiki et al., 2014). Os resultados foram expressos como % de melanina em relação ao controle (100%), após normalização pela concentração protéica.

4.2.2.5 Determinação da atividade da enzima tirosinase

As células foram semeadas em placas de 6 cavidades (4×10^5 células/cavidade) em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de SFB e deixadas em condições de adesão por 20h. Após isso, foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 e depois lisadas com 170 μ L de PBS pH 7,4 com 0,1% de Triton X-100. O lisado foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min a 4°C e 70 μ L do sobrenadante foi misturado com 100 μ L da solução contendo o substrato Di-hidroxi-fenilalanina (L-dopa - 2 mg/ml em PBS pH 7,4). A reação enzimática foi realizada durante 2h a 37°C e a leitura da absorbância foi medida a 490 nm (Guo et al., 2012). Os resultados foram expressos como % de atividade de tirosinase em relação ao controle (100%), após normalização pela concentração protéica.

4.2.2.6 Morfologia celular

As células foram semeadas em placas de 24 cavidades (2×10^4 células/cavidade), contendo lamínulas de vidro circulares. Após adesão das células, as lamínulas foram lavadas com PBS pH 7,4, secas à temperatura ambiente e coradas por May-Grüwald e Giemsa, conforme protocolo de rotina do Laboratório de Inflamação e Dor, Departamento de Farmacologia, ICB.

Para isso, as lamínulas foram cobertas com 20 gotas May-Grünwald por três minutos, e então, acrescentou-se vinte gotas de água destilada. Após um minuto, a mistura foi descartada e vinte gotas do corante Giemsa foram adicionadas, e deixadas por quinze minutos. Ao final, descartou-se o corante e as lamínulas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Após a secagem as lamínulas foram montadas em lâminas para microscopia e as células foram observadas em microscópio óptico, aumento total de 100x. O número de células contendo ou não prolongamentos dendríticos foi determinado, pela contagem total de trezentas células em cinco campos distintos da mesma lamínula, sendo feitas três lamínulas por grupo (Wang et al., 2015).

4.2.2.7 Ciclo celular

As células B16F10 foram semeadas em placas de 24 cavidades (8×10^4 células/cavidade) em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de SFB. Após adesão foram suspensas em um total de 300 μ L de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS item 4.1.3.6). Após 30 min de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a fluorescência dos núcleos foi mensurada por citometria de fluxo (FACScan, BD) (Riccardi & Nicoletti, 2006). Todos os dados foram analisados no *software* FlowJo 7.6.5.

4.2.2.8 Senescência celular

A senescência celular foi avaliada pela determinação da atividade de β -Galactosidase por método colorimétrico, utilizando o *kit Senescence β -Galactosidase Staining (Cell Signaling)*. Para isso, as células foram semeadas em

placas de 6 cavidades (2×10^5 células/cavidade) em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de SFB e incubadas em condições de adesão. Como controle positivo de atividade de β - Galactosidase foi utilizado H_2O_2 10 μM , sendo as células expostas a esta solução por 1h. Em seguida, todas as células foram lavadas com PBS pH 7,4, fixadas com solução fornecida pelo fabricante durante 15 min à temperatura ambiente e, novamente, lavadas duas vezes com PBS. Depois disso, acrescentou-se às placas a solução de coloração da β - Galactosidase pH 6,0, que foram incubadas *overnight* a 37°C , na ausência de CO_2 . Após esse período, as células foram observadas no microscópio, sendo a atividade de β - Galactosidase caracterizada pelo desenvolvimento de coloração azul no interior da célula (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Por fim, as células foram contadas em três campos distintos de cada poço, em aumento total de 200x. Os resultados foram expressos como a média do número total de células positivas por campo.

4.2.2.9 Avaliação de eventos relacionados ao desenvolvimento tumoral

4.2.2.9.1 Migração celular

As células B16F10, previamente tratadas, foram semeadas em placas de cultivo de 24 cavidades (1×10^5 células/cavidade) em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de SFB e incubadas até atingirem a confluência. Posteriormente, foi realizada uma ranhura em linha reta na monocamada celular, com auxílio de uma ponteira de pipeta P2, a fim de se mimetizar uma lesão. Após isso, a monocamada foi lavada duas vezes com meio de cultivo RPMI e, então, as células foram incubadas com meio RPMI/SFB 5% durante 48h. Para acompanhar o fechamento da fenda, imagens foram adquiridas por uma câmera acoplada a um microscópio invertido nos tempos 0, 6, 24 e 48 h, após realização da ranhura (Kovacs et al., 2016). Com intuito de eliminar o efeito da proliferação celular no fechamento da lesão, Hidroxiúreia (500 μM), um inibidor de ribonucleotídeo redutase (Crona et al., 2016), foi adicionado ao meio de cultura. As imagens obtidas foram analisadas pelo programa TScratch e os resultados expressos como porcentagem de fechamento da lesão em relação a medida no tempo T0.

4.2.2.9.2 Invasão celular

A invasão celular foi investigada em um modelo de *Transwell* (Kit Milipore). As células (1×10^6) foram suspensas em meio livre de SFB e 250 μ L dessa suspensão celular foram transferidos para o compartimento superior de câmaras, cujas superfícies são de membranas com poros de 8 μ m, revestidas com colágeno. Em cada cavidade foram acrescentados 500 μ L de meio RPMI 1640 a 10 % (v/v) de SFB e o poço *transwell* colocado em contato com esse meio, criando um gradiente de concentração favorável à migração de células. As placas foram incubadas em estufa 5 % (v/v) de CO₂ e 37 °C, por 40 h. Ao final, o meio de cultivo foi removido e as células presentes foram coradas com uma solução de cristal violeta 0,5% p/v. Após a extração do corante com 200 μ l de solução fornecida pelo fabricante foi feita a leitura espectrofotométrica a 560 nm (Labelle-Côté et al., 2011).

4.2.2.9.3 Atividade de metaloproteinases de matriz extracelular

A atividade das metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) foi analisada no sobrenadante das culturas celulares, por meio da técnica de zimografia. Para isso, primeiramente foi determinada a concentração protéica como no item 4.2.1.4. Posteriormente, 10 μ g de proteína de cada amostra, acompanhadas de padrão de peso molecular, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%, contendo 1 mg/mL de gelatina. A eletroforese foi desenvolvida a 90 V durante 90 min, em seguida, o gel foi incubado por 40 min em tampão de lavagem (item 4.1.3.4) para remoção do SDS. Posteriormente, o gel foi incubado com tampão de desenvolvimento (item 4.1.3.4) por 18 h e depois disso, foi corado em solução de Azul de Coomassie 0,5% p/v, por 15 min. 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® 1.46 (Hu & Beeton, 2010). Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade total de MMPs, em relação ao controle (RPMI/SFB 5%).

4.2.2.9.4 Formação de colônias

As células foram semeadas em placas de 6 cavidades (200 células/cavidade). Após 10 dias, o meio de cultura foi removido e as cavidades foram lavadas duas vezes com solução de PBS pH 7,4 e coradas com solução de cristal violeta 0,5% p/v em etanol 70% (item 4.1.3.5) durante 1 h. Posteriormente, os poços foram lavados com água destilada para retirar o excesso de corante e deixados secar à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a contagem das colônias (com mais de 50 células) e obtidas imagens por uma câmera acoplada a um microscópio invertido (Franken et al., 2006).

4.2.2.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.2.2.10.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o kit PureLink® RNA, Life Technologies. As amostras foram lisadas e homogeneizadas na presença de isotiocianato de guanidina, um sal caotrópico capaz de proteger o RNA de RNases endógenas. Após a homogeneização, adicionou-se etanol à amostra. Posteriormente, a amostra foi colocada em um cartucho contendo uma membrana à base de sílica, a qual o RNA é ligado. O RNA purificado foi eluído em água isenta de RNase e armazenado no freezer -80°C.

4.2.2.10.2 Transcrição reversa

O RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*, Applied Biosystems®. Para isso, a quantidade de RNA presente em cada amostra foi determinada com o auxílio do aparelho NanoDrop e o volume referente a 5 µg foi colocado no tubo de reação. A reação foi realizada num volume final de 10 µL utilizando-se 5 µg de RNA total; 2 µL de tampão *Reverse Transcription* (RT) 10X; 0,8 µL de dNTP mix (100 mM); Primers aleatórios 10X 2 µL; Transcriptase reversa 1 µL (50 U/µL); água livre de nucleases 4,2 µL. O cDNA foi sintetizado em termociclador e a reação realizada a

uma temperatura de 25°C por 10 minutos, seguidos de 120 minutos a 37°C, finalizando com 85°C por 5 minutos. Os cDNAs foram, então, estocados a - 20°C.

4.2.2.10.3 Amplificação de fragmentos de DNA por PCR convencional

As amplificações de cDNAs foram realizadas utilizando o kit Platinum Taq DNA Polimerase, dNTPs mix (Life Technologies) e oligo primers específicos sintetizados para amplificar cDNAs de primers específicos para os genes Tirosinase, TYRP-1 e TYRP-2. A expressão gênica desses primers foi normalizada pela expressão do GAPDH, gene expresso constitutivamente. As sequências dos oligonucleotídeos específicos para cada gene estão descritas na Tabela 1 (apêndice B).

A mistura da reação de PCR foi composta de: 2 µL tampão 10 X; 1,0 µL MgCl₂ (50 mM); 0,5 µL da solução de dNTP (10 mM); 0,5 µL primer (Óligo senso); 0,5 µL primer (Óligo antisenso); 0,5 µL cDNA; 0,1 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) para volume final de 20 µL em H₂O livre de nucleases. Além disso, em todas as PCRs foram incluídos como controle negativo, reações sem a adição de cDNA, para garantir que os reagentes utilizados estavam livres de contaminação. As condições térmicas utilizadas na PCR se encontram na Tabela 2 (apêndice B).

Após o término das reações, a quantificação da expressão gênica foi realizada ao submeter os produtos da PCR (10 µL) à técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) (Sambrook & Russell, 2001). Os géis foram preparados na presença de solução TAE 1X (item 4.1.3.7) e as amostras foram diluídas em tampão de amostra de DNA 6 X (item 4.1.3.7). As eletroforeses foram realizadas horizontalmente, sob voltagem constante de 85 V durante 1 h. Após a corrida, o gel foi colocado em solução de brometo de etídio (item 4.1.3.7) por 10 minutos, possibilitando a sua ligação ao DNA. As bandas foram então visualizadas em transiluminador sob luz ultravioleta (UV) e a imagem capturada por um sistema automático *Kodak*. Posteriormente, foi realizada a análise quantitativa dos géis com auxílio do *software* ImageJ[®]. Os resultados foram normalizados, através da razão dos valores obtidos na amplificação dos genes para Tirosinase, TYRP-1 e -2 pelos valores da amplificação do GAPDH.

4.2.2.11 Western Blotting

Células B16F10 cultivadas e obtidas conforme os itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2 foram lavadas com PBS pH 7,4 e submetidas a extração de proteínas totais com tampão de lise celular (item 4.1.3.8). As amostras foram incubadas por 30 min, sob agitação em gelo e depois foram submetidas à centrifugação a 14.000 x *g* à 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a -80°C até serem utilizados para Western Blotting.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 10% a 100 V por 90 minutos, usando 70 µg (para avaliar E- ou N-caderina) ou 30 µg (para avaliar demais proteínas) de proteínas totais do lisado celular. Após a eletroforese, o gel foi incubado à temperatura ambiente durante 10 min com o tampão de transferência (item 4.1.3.8). Concomitantemente, uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), de mesma dimensão do gel, foi ativada em metanol absoluto por 20 seg e depois incubada, juntamente com 2 papéis de filtro de iguais dimensões, nas mesmas condições descritas para o gel.

Para possibilitar a transferência das proteínas do gel para a membrana o “*sandwich*” foi montado com o gel e a membrana envoltos pelos papéis de filtro. A transferência foi executada durante 30 min, em 25 V de tensão usando a célula de transferência semi-seca. Em seguida, para bloqueio dos sítios inespecíficos, a membrana foi incubada na solução de bloqueio (item 4.1.3.8) por 1 h à 4°C. Depois, lavou-se a membrana por três vezes de 5 min em TTBS (item 4.1.3.8), seguindo-se a incubação à 4°C *overnight* com os anticorpos primários, cujas diluições estão apresentadas na tabela 3 (apêndice C).

Posteriormente, as membranas foram lavadas por três vezes de 5 min em TTBS (item 4.1.3.8) e incubadas por 2 h, à temperatura ambiente, na presença do anticorpo secundário anti-IgG específico peroxidase-conjugado. Em seguida, lavou-se novamente a membrana por 3 vezes de 5 min em TTBS, e procedeu-se a revelação por quimioluminescência utilizando o Luminata Forte (Millipore®) como substrato. Após adição do reagente, as membranas foram digitalizadas em fotodocumentador (ImageQuant™ LAS 4000) e a densidade das bandas analisadas com auxílio do *software* ImageJ 1.46.

4.2.3 Ensaio biológico *in vivo*

4.2.3.1 Avaliação da colonização pulmonar

As células B16F10 foram previamente expostas à CMS2 por 6 dias, conforme o item 4.2.2.2 e, posteriormente, foram inoculadas (5×10^5 células viáveis /100 μ L de PBS) na veia caudal de camundongos C57BL6 (n= 10 animais/grupo). Quinze dias após o inóculo foi feita a eutanasia dos animais com sobredose de solução anestésica (Cetamina 10%/xilazina 2% item 4.1.3.9) e realizada a contagem visual do número de colônias pulmonares (Liu et al., 2018).

4.2.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. e considerados significativos, quando valores de p foram menores que 0,05. Os resultados foram analisados no programa GraphPrism 5.0, usando a análise de variância One-way ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Excepcionalmente, as comparações com o grupo controle, na avaliação do ciclo celular, foram realizadas pela análise de variância Two-way-ANOVA, seguida do teste de Bonferroni.

5 RESULTADOS

Neste trabalho, primeiramente, com intuito de avaliar a influência da subfração proteolítica CMS2 sobre a viabilidade das células B16F10 foi determinada a metabolização pelas células do sal de resazurina. Posteriormente, foi avaliado o efeito de CMS2 sobre a melanogênese em B16F10 determinando o conteúdo de melanina, a atividade de tirosinase e a expressão de proteínas e genes envolvidos neste processo. Em seguida, foi analisado o efeito de CMS2 sobre a morfologia e a progressão do ciclo celular em B16F10. Para melhor caracterizar o efeito de CMS2 sobre o ciclo celular, avaliou-se a expressão de proteínas reguladoras desse ciclo. Por ter sido observado a parada do ciclo celular em G1, avaliou-se a ocorrência de senescência, determinando a atividade da β -galactosidase. Em seguida, foi avaliado o comportamento das células B16F10 em eventos relacionados ao desenvolvimento tumoral como a migração e invasão celular. Visto a inibição de CMS2 sobre estes eventos, foi avaliada a participação das proteínas E- e N-caderinas neste efeito da subfração. Diante da menor capacidade migratória e invasora, avaliou-se o estabelecimento de colônias *in vitro* pelas células B16F10. A fim de investigar prováveis mecanismos de ação da subfração, foi determinada a ativação das vias de sinalização das MAPKs e da PI3K/AKT. Por fim, por ter sido observada a inibição de CMS2 sobre várias etapas da tumorigênese, *in vitro*, avaliou-se a capacidade das células B16F10 pré-expostas à subfração em colonizarem os pulmões de camundongos C57BL/6.

5.1 Obtenção e caracterização da subfração CMS2

A purificação cromatográfica de P1G10 em coluna contendo resina de troca catiônica CM-Sephadex resulta na separação de quatro picos (CMS-0 a CMS-3) (figura 1 A) de acordo com o perfil protéico (absorbância 280 nm), sendo CMS-1 e CMS-2 os que concentram a maior quantidade de proteínas. As bandas protéicas dessas subfrações foram evidenciadas em gel de poliacrilamida, representado na figura 1 B, que mostrou a presença mais abundante de proteínas com massa relativa ao redor de 23 a 27k Da. A atividade amidásica obtida para CMS1 foi de 304

nM.min⁻¹. µg⁻¹ e para CMS2 de 132 nM.min⁻¹.µg⁻¹, sendo as concentrações protéicas de 55 e de 44 mg/mL, respectivamente.

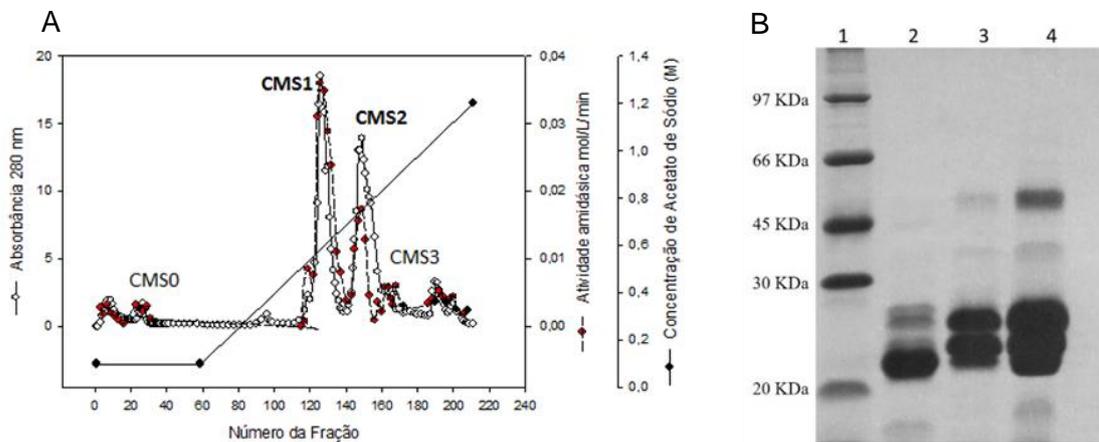


Figura 1: Perfil cromatográfico e caracterização de subfrações do látex de *V. cundinamarcensis*. Uma solução de P1G10 contendo 5 g de proteínas foi aplicada em coluna de troca iônica, CM-Sephadex e eluída em gradiente de acetato de sódio 0,1 M, com fluxo de 0,5 mL/min. A- Frações de 5 mL foram coletadas para determinação do perfil protéico (absorbância a 280 nm) e atividade amidásica total, conforme descrito na metodologia (item 4.1). B- Perfil eletroforético das subfrações CMS1-3 em gel SDS/PAGE 12% em condições desnaturantes. Trinta microgramos de cada amostra foram aplicados. Canaletas 1: padrão de peso molecular, 2: CMS-1, 3: CMS-2, 4: CMS3.

5.2 Efeito de CMS2 sobre a viabilidade celular

Inicialmente as células B16F10 foram cultivadas e expostas à 1, 5 ou 10 µg/mL da subfração CMS2, por 2, 6 ou 8 dias, conforme os itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2. As concentrações da amostra foram definidas com base na concentração citotóxica de CMS2, para 50% da população celular, que é igual a 10 µg/ml (Apêndice D), já o período de exposição foi baseado em dados de Alcazar et al. (2012). Após esta exposição as células foram retiradas da presença da subfração e colocadas em condições de adesão em placas de cultivo para realização dos ensaios.

Primeiramente, foi determinada a viabilidade celular pela metabolização do sal de rezasurina. A figura 2 mostra que apesar de CMS2 alterar significativamente a viabilidade ($p < 0,0001$), a redução não foi maior que 14% em relação as células controle, consideradas como 100% viáveis (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

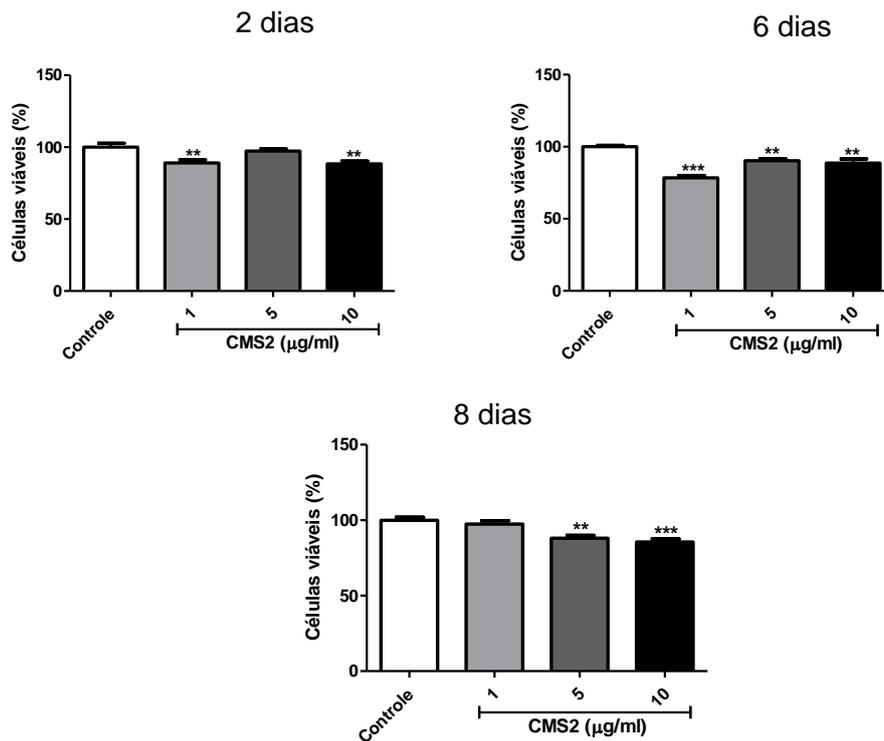


Figura 2: Viabilidade de células B16F10, após exposição à CMS2. As células B16F10 foram expostas à CMS2 por 2 a 8 dias em frascos de cultivo conforme o item 4.2.2.2. Após cada período foram semeadas (1×10^3 células/poço) em placas de 96 cavidades e, depois de aderidas, a viabilidade celular foi avaliada, por meio da metabolização do sal de resazurina e leitura espectrofotométrica a 570/600 nm. Cada coluna representa a porcentagem média \pm e.p.m de viabilidade celular em cada grupo. Resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle - ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.3 Efeito de CMS2 sobre a melanogênese

Uma vez sabido que a melanogênese pode alterar o comportamento das células de melanoma, realizou-se a determinação do conteúdo de melanina nas células B16F10, após 2 a 8 dias de exposição à subfração CMS2 (1 a 10 $\mu\text{g/mL}$). Para essa determinação uma curva-padrão de melanina sintética foi estabelecida conforme mostra o Apêndice F.

Na figura 3 é possível observar um aumento significativo no conteúdo de melanina nas células tratadas em relação ao controle. Esse estímulo ocorreu nas concentrações de 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de CMS2 e foi maior no período de 6 dias, no qual houve um aumento de 73% ($173 \pm 17,6\%$, $p < 0,001$) e 96% ($196 \pm 16,5\%$, $p < 0,001$), respectivamente (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

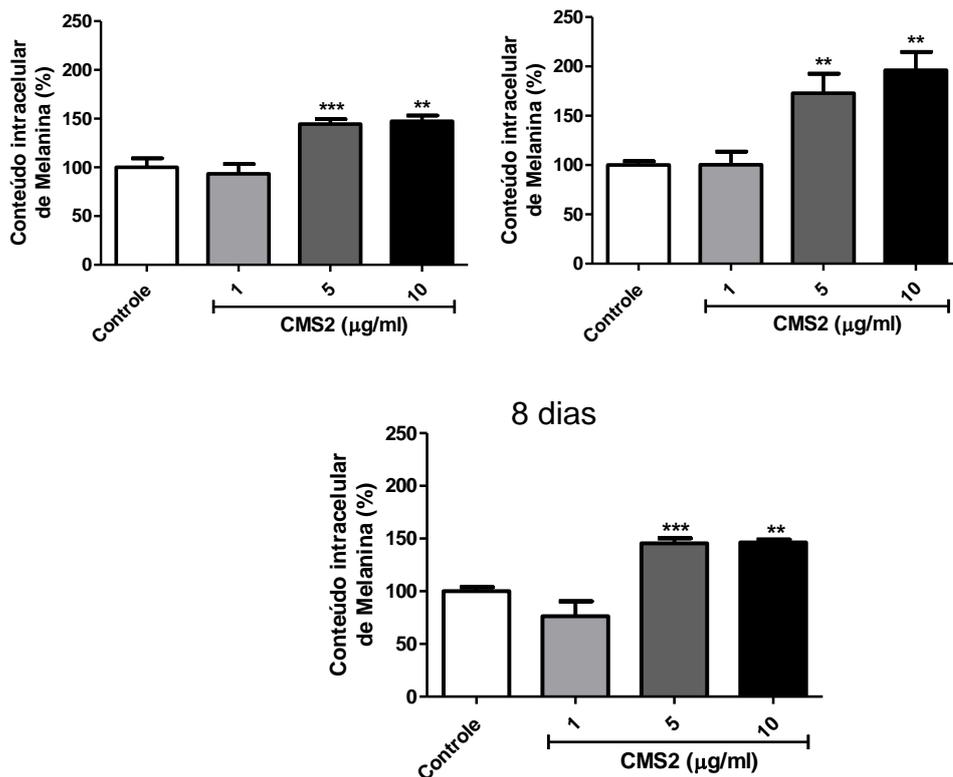


Figura 3: Conteúdo de melanina em células B16F10 expostas à CMS2. As células B16F10, previamente tratadas com CMS2 por 2, 6 e 8 dias foram semeadas em placas de 6 poços (4×10^5 células/poço). Após adesão foi realizada a lise celular com NaOH 1M, incubação do lisado durante 2h a 80° C e sonicação por 15 min. Em seguida, foi feita a leitura espectrofotométrica a 405 nm. Cada coluna representa a porcentagem média do conteúdo de melanina \pm e.p.m em cada grupo. Resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle - ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

Aliado ao aumento do conteúdo de melanina a figura 4 mostra o estímulo da atividade de tirosinase observado, após a exposição das células B16F10 a CMS2, 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$. Ainda é possível observar que a maior atividade dessa enzima também ocorreu no período de 6 dias, após expor as células a CMS2 10 $\mu\text{g/mL}$ ($164 \pm 1,9$), em comparação a atividade enzimática mostrada pelas células controles ($100 \pm 1,0$ %, $p < 0,0001$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Também se observou que, após 6 dias de tratamento a menor concentração de CMS2, 1 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de estimular a atividade de tirosinase em 19% ($119 \pm 17,6\%$).

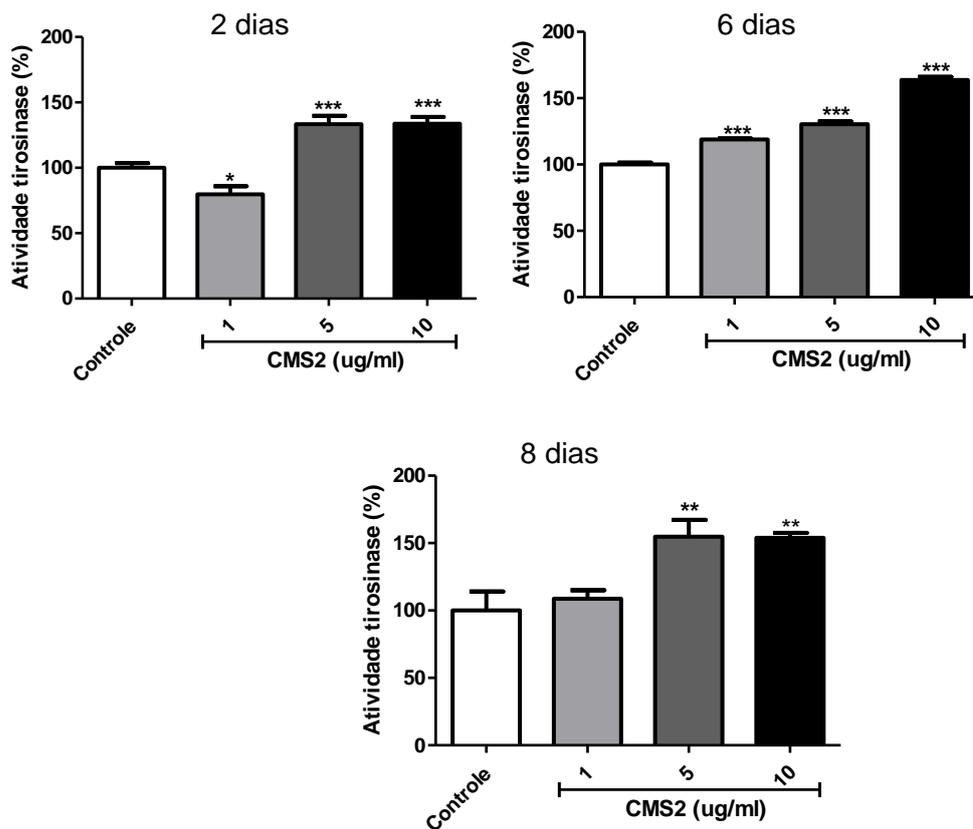


Figura 4: Atividade de tirosinase em células B16F10 expostas à CMS2. As células B16F10, foram previamente expostas à CMS2 por 2, 6 e 8 dias conforme o item 4.2.2.2. Os lisados celulares foram incubados com solução de L-DOPA (2mg/ml) por 2h a 37° C, e, em seguida, foi feita a leitura espectrofotométrica a 490 nm. Cada coluna representa a porcentagem média da atividade de tirosinase \pm e.p.m em cada grupo. Resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle - * p < 0,05; ** p < 0,001 e ***p < 0,0001 (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

Uma vez que o efeito máximo de CMS2 sobre a viabilidade celular e a melanogênese ocorreu, a partir do sexto dia de exposição à subfração e, principalmente, nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, estes parâmetros foram utilizados no seguimento deste estudo.

5.4 Efeito de CMS2 sobre a expressão de proteínas e genes envolvidos na melanogênese

O próximo passo foi avaliar a expressão protéica do Fator de Transcrição associado a Microftalmia (MITF). Para isso as células B16F10 foram expostas à subfração durante 6 dias (item 4.2.2.2) e submetidas a lise celular (item 4.2.2.11).

Após a realização do Western Blotting, foi possível observar que as células previamente expostas à CMS2 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ tiveram uma redução de 66 ($0,3 \pm 0,0$ $p < 0,05$) e 60% ($0,4 \pm 0,0$ $p < 0,05$), respectivamente, na expressão de MITF ambos relativos ao controle ($1,0 \pm 0,2$ - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls) (figura 5).

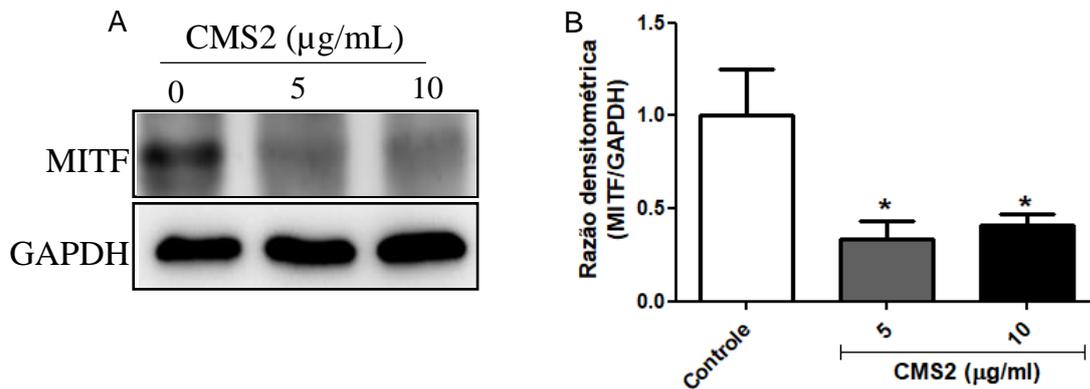


Figura 5: Efeito de CMS2 sobre a expressão de MITF em células B16F10. Células B16F10 foram expostas à CMS2 (5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) ou permaneceram sem tratamento (células controles) durante 6 dias. Após esse período, foi realizada a lise celular com tampão de extração de proteínas totais. Para realização da eletroforese em SDS-PAGE foram aplicados 30 μg do lisado celular em todas as canaletas e, posteriormente, realizado o Western Blotting, conforme o item 4.2.2.11. As quantificações densitométricas para as proteínas MITF e GAPDH (controle interno), foram realizadas com auxílio do programa ImageJ. A- Imagem representativa das bandas para as proteínas analisadas em cada grupo. B- Cada coluna representa a média \pm e.p.m da expressão protéica em cada grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

Para dar seguimento ao estudo sobre a influência de CMS2 sobre a melanogênese em B16F10, analisou-se o envolvimento da expressão gênica de Tirosinase, Proteínas -1 e -2 Relacionadas à Tirosinase (TYRP-1 e -2). Nesse sentido, as células foram expostas à subfração (item 4.2.2.2) e o RNA das mesmas utilizado para transcrição reversa e desenvolvimento da PCR (item 4.2.2.10).

A quantificação da intensidade das bandas é representada pela razão da expressão de Tirosinase (figura 6 A), TYRP-1 (figura 6 B) e -2 (figura 6 C) pela expressão do GAPDH (controle interno). Como observado na figura 6 a expressão de mRNA para os genes pesquisados não foi alterado por CMS2 ($p > 0,05$ - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

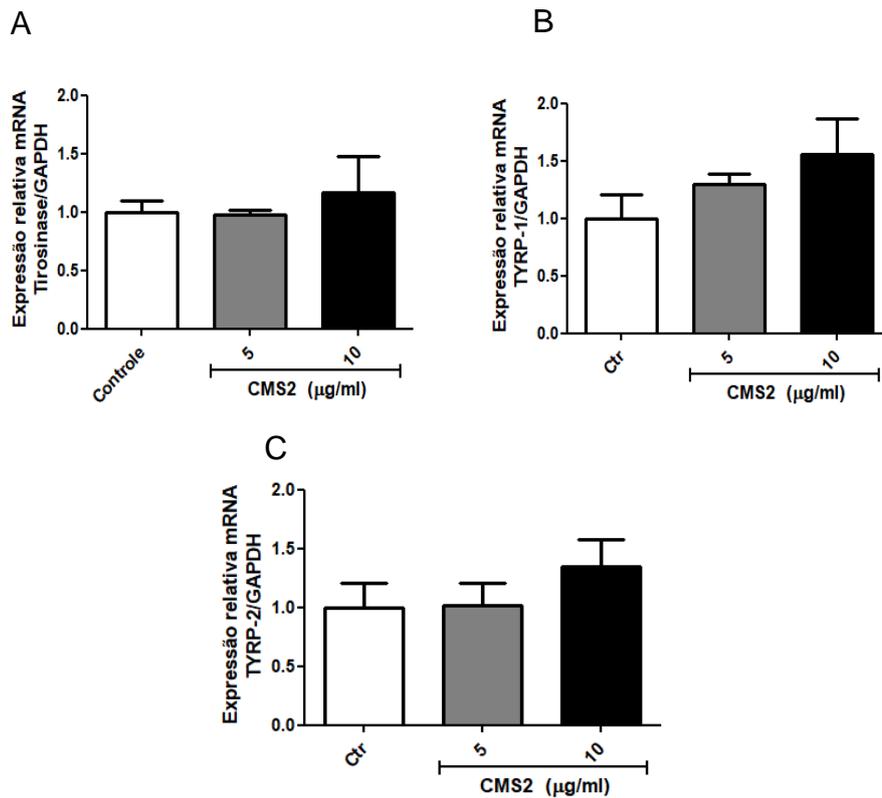


Figura 6: Expressão do mRNA para Tirosinase, TYRP-1 e TYRP-2 em células B16F10 expostas à CMS2. Células B16F10 foram expostas a CMS2 (5 ou 10 µg/mL) ou permaneceram sem tratamento (células controles) durante 6 dias. Após esse período, foi realizada a extração do RNA e a reação de PCR conforme o item 4.2.2.10, com *primers* específicos para os genes citados. Expressão do mRNA para Tirosinase (A), TYRP-1 (B) e - 2 (C), obtida pela razão da expressão do gene analisado pela expressão do GAPDH. Resultados não estatisticamente diferentes em relação ao controle ($p > 0,05$ - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.5 Efeito de CMS2 sobre a morfologia celular

Com base no estímulo de CMS2 sobre a melanogênese, neste estudo analisou-se a influência dessa subfração sobre a morfologia das células B16F10. Uma quantidade significativamente maior de células com prolongamentos dendríticos foi observada nos grupos que foram expostos à CMS2. Como mostrado na figura 7 os números das células dendríticas nos grupos CMS2 5 (237 ± 16 , $p < 0,001$) ou 10 µg/mL (267 ± 14 , $p < 0,001$), foram superiores ao encontrado para o grupo controle (72 ± 11 células, - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

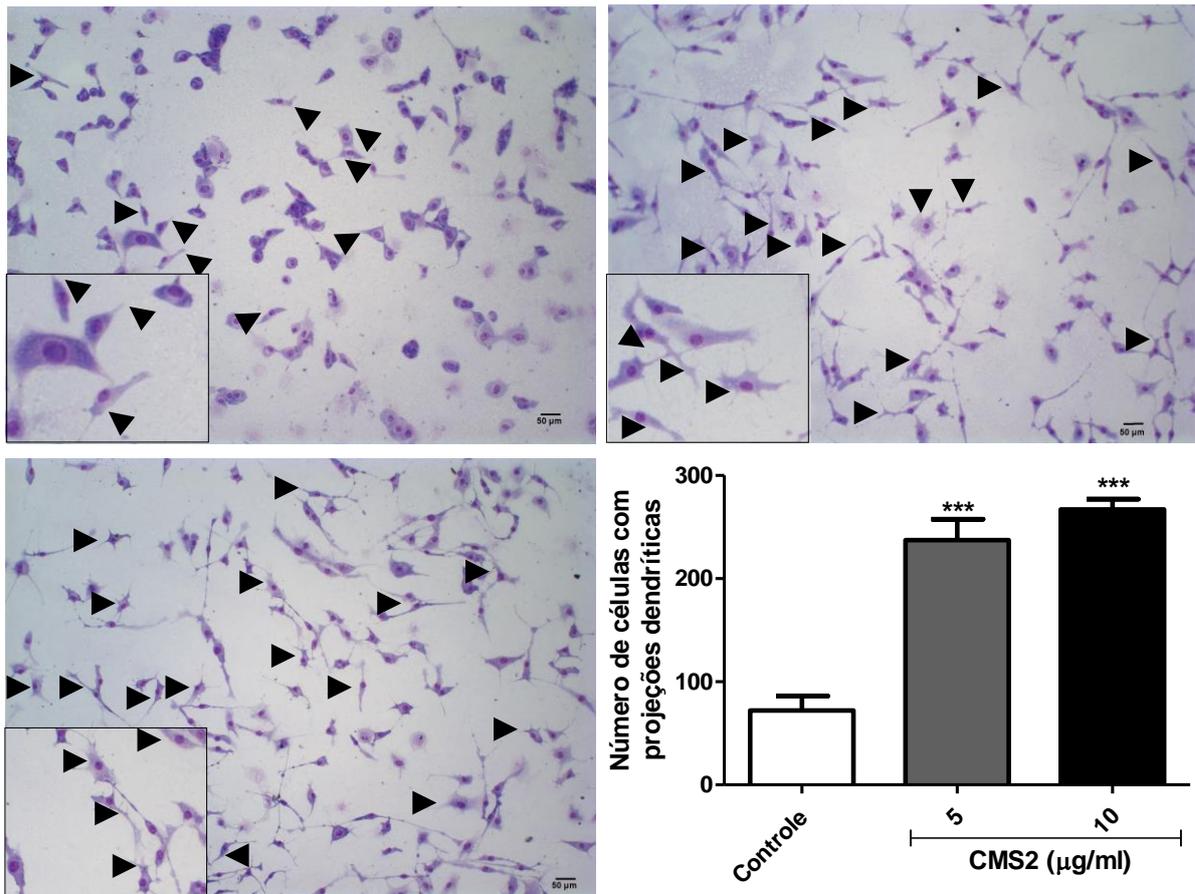


Figura 7: Morfologia de células B16F10 expostas à CMS2. As células B16F10, previamente expostas à CMS2 por 6 dias foram semeadas em lamínulas e, após adesão, foram coradas por May-Gruwald e Giemsa. O número de células contendo ou não projeções dendríticas foi determinado, pela contagem total de 300 células em cinco campos distintos. As imagens são representativas da morfologia celular em todos os grupos. Aumento de 100x. Setas: células com prolongamentos dendríticos. barra: 50 µm. Em cada grupo as células dendríticas são enfatizadas. No gráfico cada coluna representa a média ± e.p.m do número de células com dendritos (***) $p < 0,001$, ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

5.6 Efeito de CMS2 sobre o ciclo celular

Sabendo-se que a melanogênese pode induzir a paralisação da proliferação celular, avaliou-se a distribuição das células nas fases do ciclo celular (figura 8). Foi observado um aumento das células na fase G1, após o tratamento com CM2 5 ou 10 µg/mL, de 25% (81 ± 1) e 29% (84 ± 2), respectivamente, em relação as células controle (65 ± 1 células, $p < 0,001$). Assim, houve uma redução das células expostas à CM2 5 ou 10 µg/mL, na fase S, de 24 ($7 \pm 0,5$) e 28% ($8 \pm 0,7$), respectivamente, em relação aos controles ($29 \pm 0,7$ células, $p < 0,0001$). Foi observado, também, uma redução das células expostas à CM2 5 ou 10 µg/mL na fase G2/M de 53 ($8 \pm 0,5$) e

73% ($11 \pm 0,5$), respectivamente, em relação aos controles ($15 \pm 0,9$ células, $p < 0,0001$ - *Two-way-ANOVA*, seguido do teste de Bonferroni). Além disso, ressaltasse que o conteúdo de DNA subdiploide não foi diferente nas células expostas à CMS2 5 ($0,8 \pm 0,06$ $p > 0,05$) ou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($1,0 \pm 0,07$ $p > 0,05$) em relação ao controle ($0,4 \pm 0,07$ - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

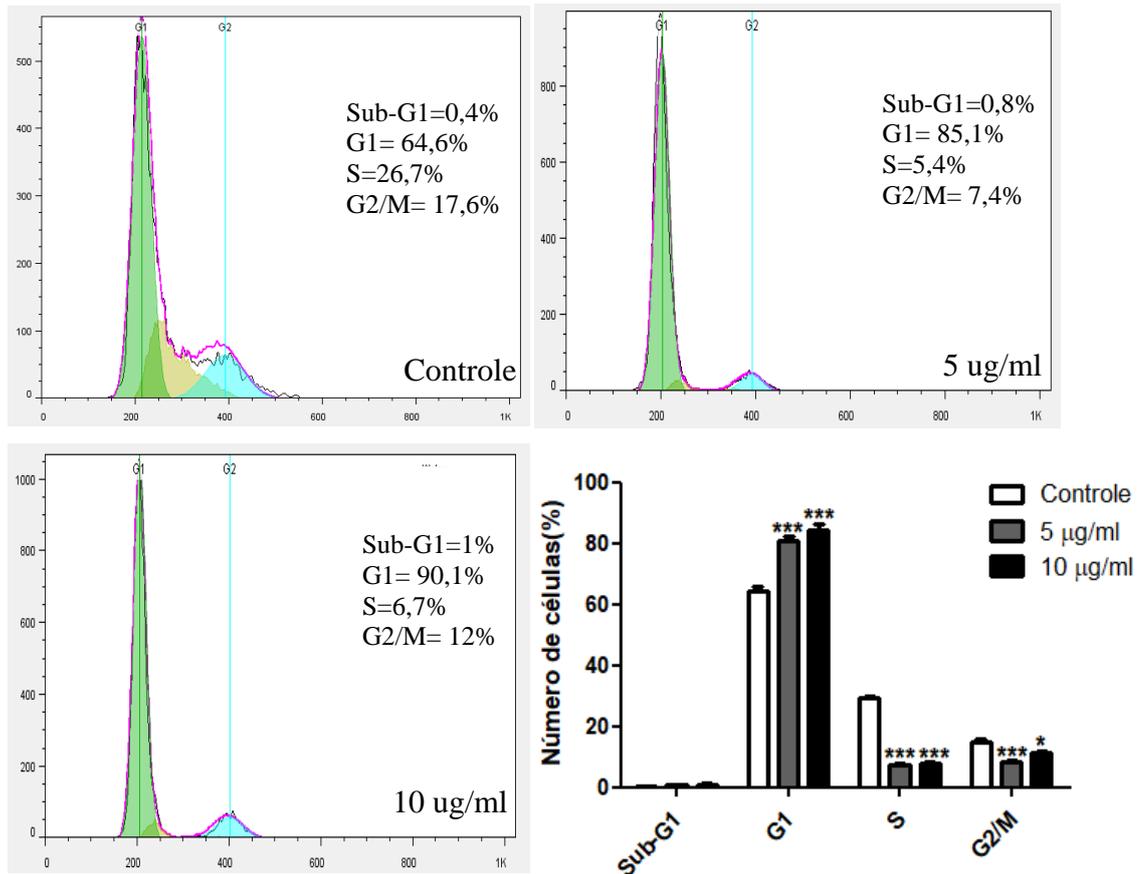


Figura 8: Análise do ciclo celular em células B16F10 expostas à CMS2. As células B16F10, previamente expostas à CMS2 por 6 dias foram semeadas em placas de 24 poços (8×10^4 células/poço) e após adesão, foram marcadas com iodeto de propídeo e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Cada coluna representa a porcentagem média \pm e.p.m do número de células em cada fase do ciclo celular. Resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle - * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$, *Two-way-ANOVA*, seguida do teste de Bonferroni.

5.7 Avaliação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular

Para compreender melhor o efeito promovido por CMS2 sobre o ciclo celular foi determinada a expressão das proteínas p53 e p21, envolvidas com a regulação do ciclo celular. As quantificações densitométricas das bandas obtidas no Western

Blotting foram realizadas e normalizadas pela expressão do GAPDH ou Tubulina e apresentadas como razão relativa às células controle.

A figura 9 A mostra a quantificação da expressão de p53 nas células B16F10 e que não há diferenças nesta expressão entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). Já a quantificação de p21 (figura 9 B) mostra que as células pré-expostas à CMS2 apresentam uma menor expressão desta proteína. Em termos quantitativos, CMS2 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ promoveu uma redução de 88 ($0,11 \pm 0,0$, $p < 0,001$) e 92% ($0,08 \pm 0,0$, $p < 0,001$), respectivamente, na expressão de p21, em relação às células controles ($1,00 \pm 0,0$, ANOVA, seguido do pós-teste Student Newman Keuls).

5.8 Efeito de CMS2 sobre a atividade da β -galactosidase

Uma vez sabido que a parada do ciclo celular em G1 também é uma característica da senescência celular, neste estudo, avaliou-se a atividade da enzima β -galactosidase, utilizada como um marcador de senescência celular. A figura 10 A mostra que nas células positivas para β -galactosidase, há formação de um composto azul no citoplasma celular. Na figura 10 B é possível observar que o número de células positivas para β -galactosidase não é diferente entre os grupos tratados com CM2 5 ($6,0 \pm 2,6$) ou 10 $\mu\text{g/mL}$ ($7 \pm 1,0$), quando comparadas às células controles ($17,0 \pm 4,0$). Enquanto que as células tratadas com H_2O_2 10 μM , utilizado como controle positivo, apresentaram uma maior atividade dessa enzima ($39 \pm 3,0$ $p < 0,001$ - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

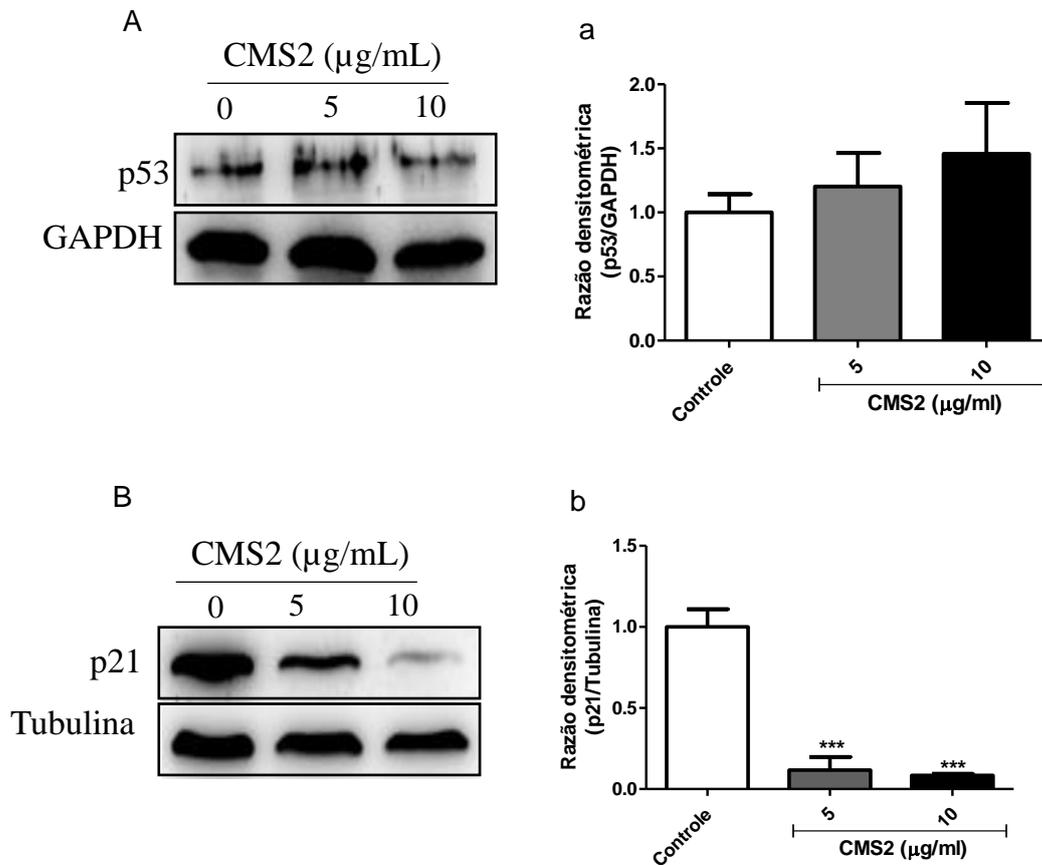


Figura 9: Expressão de p53 e p21 em células B16F10 expostas à CMS2. Células B16F10 foram expostas à CMS2 (5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) ou permaneceram sem tratamento (células controles) durante 6 dias. Após esse período, foi realizada a lise celular com tampão de extração de proteínas totais. Para realização da eletroforese em SDS-PAGE foram aplicados 30 μg do lisado celular em todas as canaletas e, posteriormente, realizado o Western Blotting, conforme o item 4.2.2.11. As quantificações densitométricas para as proteínas p53 e p21 e os normalizadores GAPDH ou Tubulina foram realizadas com auxílio do programa ImageJ. A e B- Imagens representativas das bandas para as diferentes proteínas analisadas. a e b- Cada coluna representa a média \pm e.p.m da expressão protéica em cada grupo. (***) $p < 0,001$, ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

A

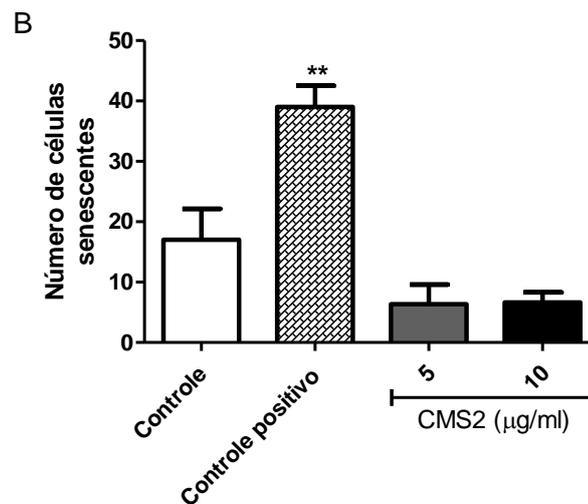
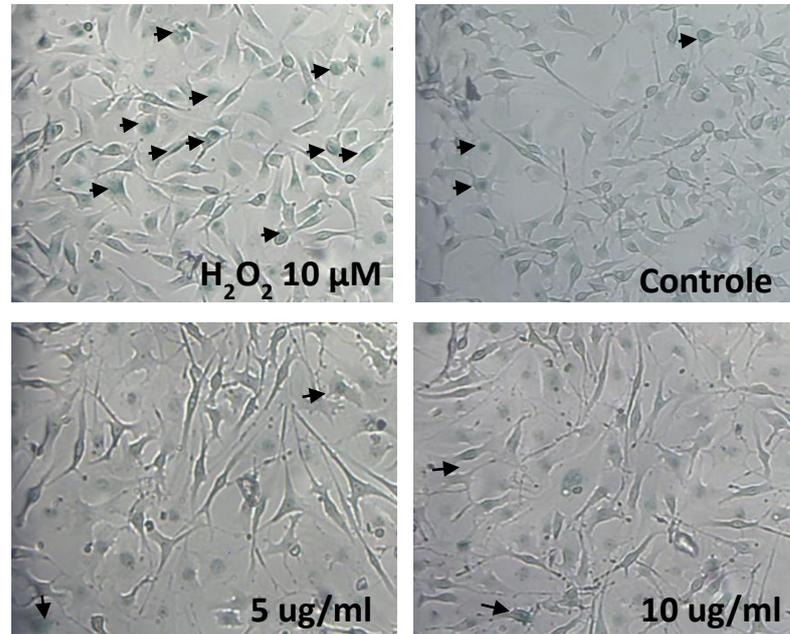


Figura 10: Atividade de β -galactosidase em células B16F10 expostas à CMS2. As células B16F10 foram semeadas em placas de 6 cavidades (2×10^5 células/cavidade) e, após adesão, procedeu-se a marcação colorimétrica da β -galactosidase. Foram consideradas células positivas as que desenvolveram coloração azul. Como controle positivo foi utilizado H_2O_2 10 μ M. A- Imagens representativas da atividade da β -galactosidase em todos os grupos. Aumento de 200x. Setas: células positivas para β -galactosidase. B- Cada coluna representa a média \pm e.p.m do número total de células senescentes em três campos distintos. ** $p < 0,001$ (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.9 Efeito de CMS2 sobre etapas do desenvolvimento tumoral

Para dar continuidade ao estudo sobre o comportamento das células B16F10 frente à CMS2, avaliou-se etapas do desenvolvimento tumoral, *in vitro*, como a migração, invasão celular e formação de colônias.

5.9.1 Efeito de CMS2 sobre a migração

5.9.1.1 Efeito de CMS2 sobre a capacidade migratória celular

A capacidade migratória das células B16F10, previamente expostas à subfração CMS2 foi avaliada pelo método *in vitro Scratch Assay*. Como pode ser observado na figura 11, CMS2 impediu a migração de células B16F10, após os tempos T24 e T48 h.

Apenas a concentração de 10 µg/mL da subfração foi eficaz em inibir a migração celular apresentando em 24 h 14% ($14,2 \pm 0,7\%$) de fechamento da lesão, enquanto as células controles tinham 25% ($25,3 \pm 2,0\%$, $p < 0,0001$). Já em 48h a porcentagem de fechamento da lesão pelas células tratadas foi de 23% ($23,3 \pm 1,5\%$), enquanto as células controles atingiram 34% ($33,6 \pm 2,5\%$, $p < 0,01$, - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

5.9.1.2 Efeito de CMS2 sobre a expressão de p16-ARC

Para corroborar o dado obtido sobre a capacidade de migração celular, foi avaliada a expressão da proteína p16-ARC. A figura 12 mostra que a expressão da proteína p16-ARC está alterada nas células que foram expostas à CMS2 5 e 10 µg/mL. Observou-se uma diminuição dos níveis de expressão dessa proteína em 80 ($0,20 \pm 0,0$, $p < 0,01$) e 69% ($0,30 \pm 0,1$, $p < 0,01$), respectivamente, quando comparados as células sem tratamento ($1,00 \pm 0,1$, ANOVA, seguido do pós-teste Student Newman Keuls).

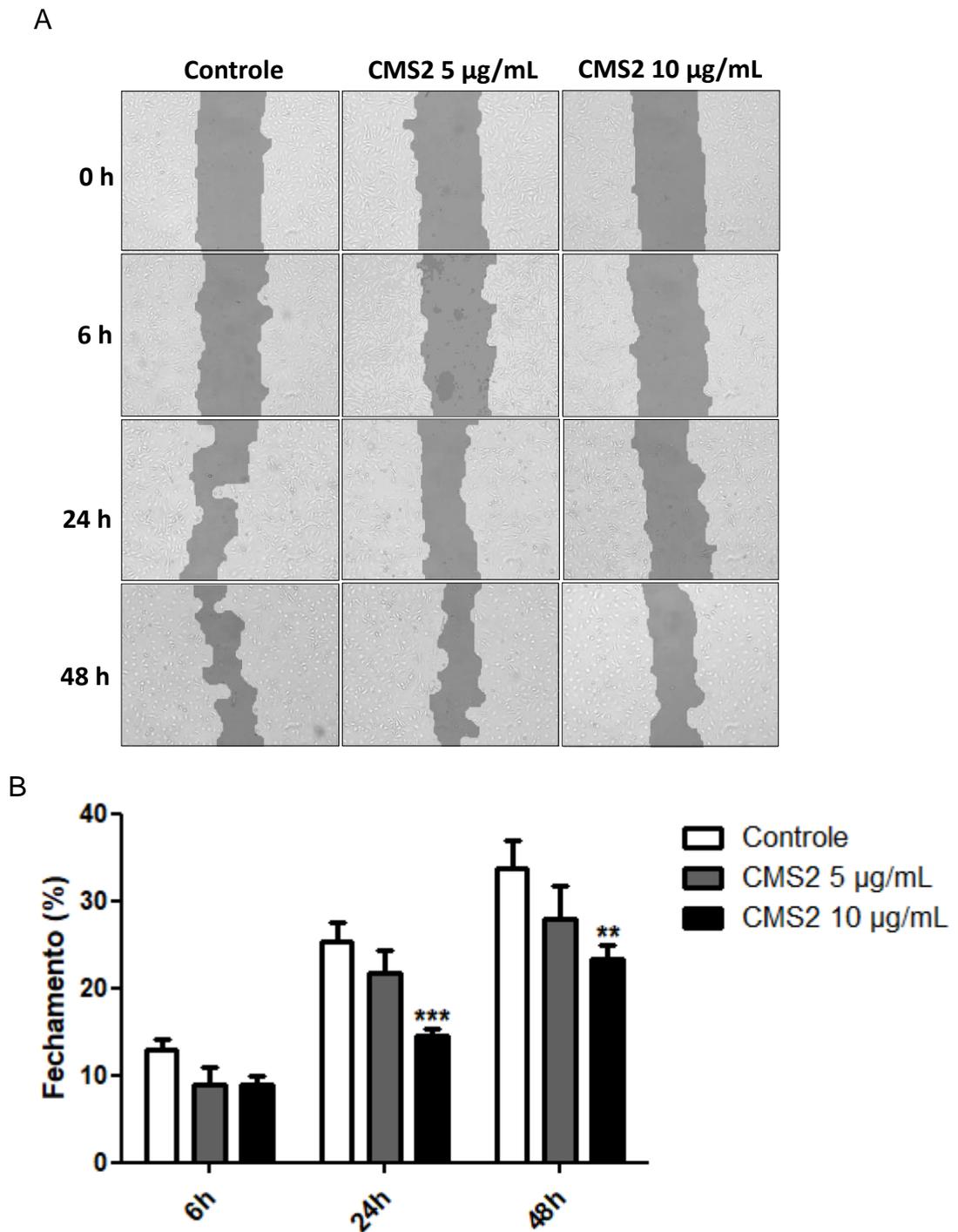


Figura 11: Efeito inibitório de CMS2 sobre a migração de células B16F10. Células B16F10 foram expostas à CMS2 (5 ou 10 µg/mL) ou permaneceram sem tratamento (células controles) durante 6 dias. Após esse período, foi avaliada a migração celular conforme o item 4.2.2.9.1). A área da lesão foi medida em diferentes tempos utilizando o programa TScratch. A- Imagens representativas da fenda nos tempos 0 h e 48 h. B- Os resultados são apresentados como porcentagem de fechamento da lesão. Cada coluna representa a média \pm e.p.m do fechamento em cada grupo. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

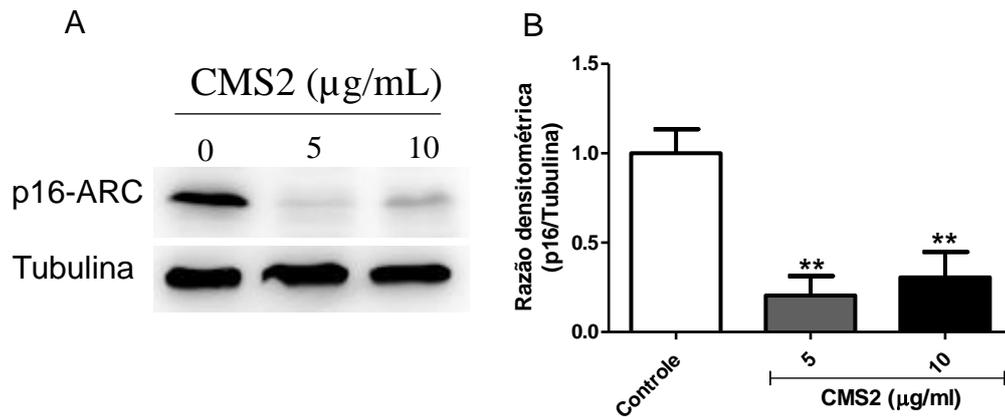


Figura 12: Avaliação da expressão da proteína p16-ARC. Células B16F10 foram expostas a CMS2 (5 ou 10 µg/mL) ou permaneceram sem tratamento (células controles) durante 6 dias. Após esse período, foi realizada a lise celular com tampão de extração de proteínas totais. Para realização da eletroforese em SDS-PAGE foram aplicados 30 µg do lisado celular em todas as canaletas e, posteriormente, realizado o Western Blotting, conforme o item 4.2.2.11. A quantificação densitométrica da expressão da proteína p16-ARC e do normalizador (Tubulina) foi realizada com auxílio do programa ImageJ. A- Imagens representativas das bandas para as diferentes proteínas. B- Cada coluna representa a média ± e.p.m da expressão protéica em cada grupo. (** $p < 0,01$, ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

5.9.2 Efeito de CMS2 sobre a invasão celular

5.9.2.1 Efeito de CMS2 sobre a capacidade invasora celular

Visto a inibição sobre a migração celular a influência de CMS2 sobre a capacidade invasora de B16F10 foi avaliada, *in vitro*, em modelo de invasão de membrana de colágeno, que mimetiza a membrana basal. Foi averiguado que as células dos grupos expostos à CMS2 nas concentrações 5 e 10 µg/mL apresentaram uma capacidade de invasão inibida em 55 e 61%, respectivamente ($p < 0,0001$), relativo as células controle (figura 13).

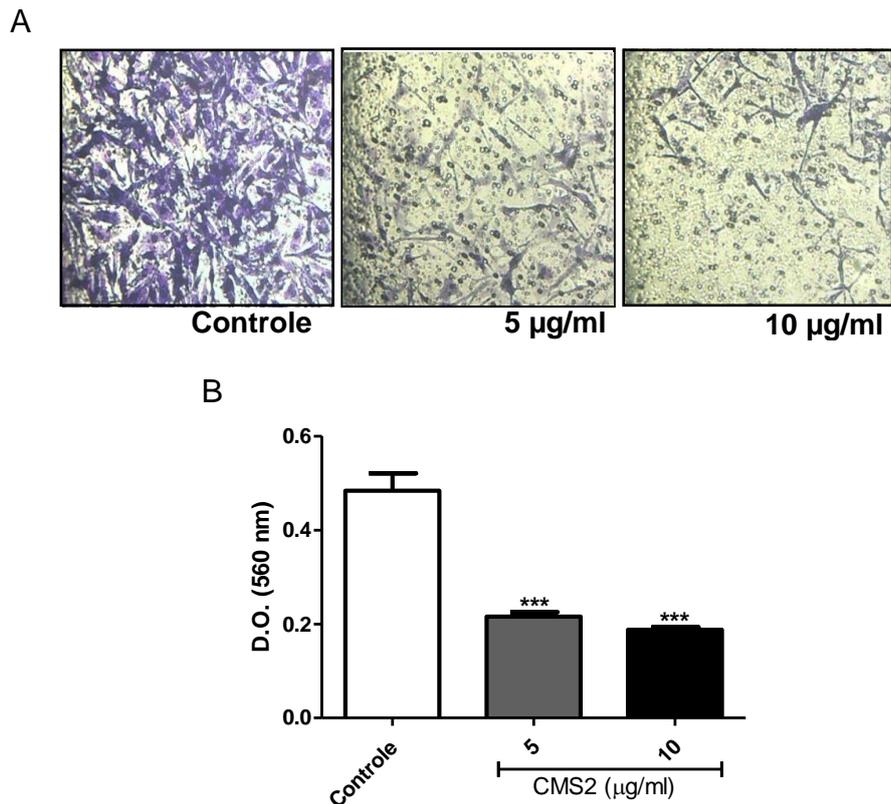


Figura 13: Efeito inibitório de CMS2 sobre a invasão de células B16F10. As células expostas à CMS2 por 6 dias e semeadas em poços (1×10^6 células), cujas superfícies são de membranas com poros de $8 \mu\text{m}$, revestidas com colágeno. Os poços foram incubados em contato com meio RPMI com SFB 10% v/v por 40 h a 37°C . Após esse período, os poços foram lavados com PBS, corados com cristal violeta e realizada a leitura espectrofotométrica à 560 nm. A- Imagens são representativas da invasão celular em cada grupo avaliado. Aumento de 40x. B- Cada coluna representa a média \pm e.p.m da invasão celular em cada grupo. Resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle - *** $p < 0,0001$ (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.9.2.2 Efeito de CMS2 sobre a atividade de metaloproteinases extracelulares (MMPs)

Para verificar a influência da atividade das MMPs sobre a inibição da invasão celular investigou-se a atividade dessas enzimas pelo método de zimografia, utilizando a gelatina como substrato (item 4.2.2.9.3). Após a corrida eletroforética, as análises densitométricas das bandas, mostraram que nos sobrenadantes das células que receberam a exposição prévia à CMS2 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ há uma redução de 97% ($2,60 \pm 0,7$, $p < 0,0001$) e 99% ($1,50 \pm 0,6$, $p < 0,0001$) na atividade da MMP-2,

quando comparado aos sobrenadantes controles ($100,00 \pm 3,1$ - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls) (figura 14 A).

Como se pode verificar na figura 14 B, a atividade gelatinolítica da metaloproteinase MMP-9, também, está reduzida nos sobrenadantes das células tratadas. A análise densitométrica mostrou uma redução de 100% ($p < 0,0001$) na atividade dessa metaloprotease nos sobrenadantes dos grupos CMS2 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$, comparadas a atividade observada nos sobrenadantes controles ($100,00 \pm 4,3$ - ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

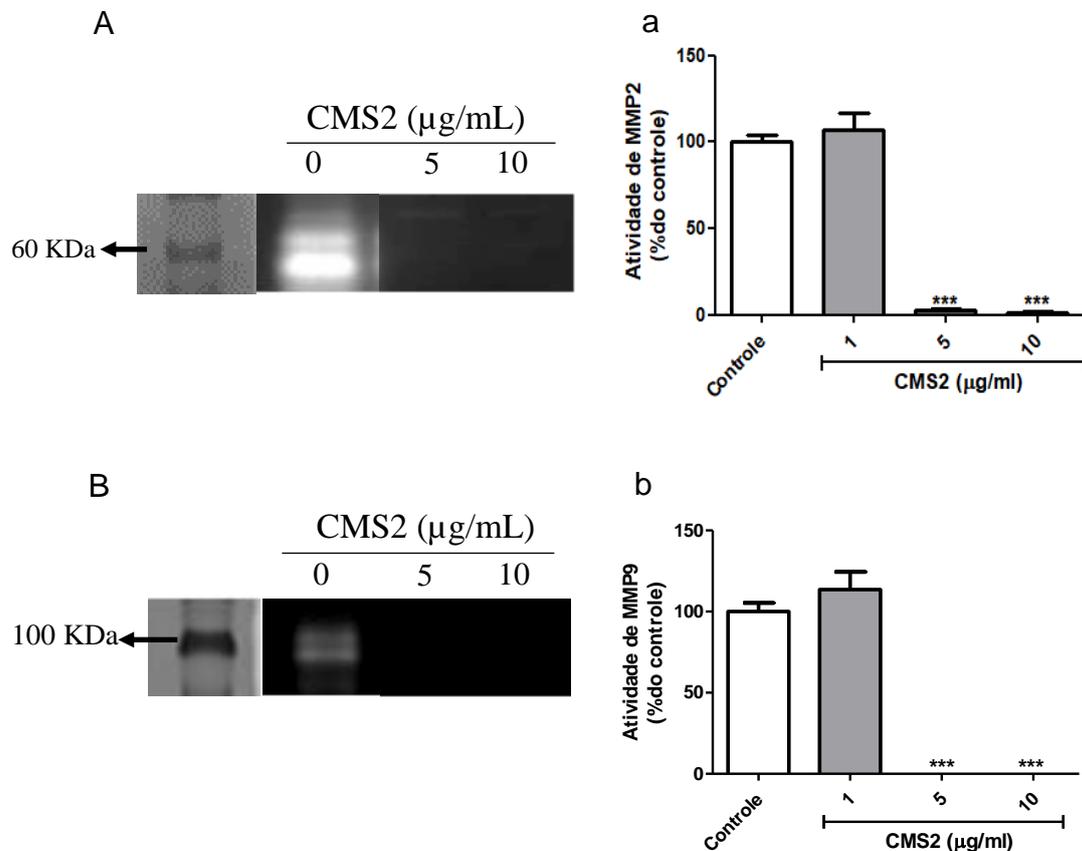


Figura 14: Atividade das MMP-2 e -9 em células B16F10 expostas à CMS2. O sobrenadante da cultura de células B16F10, previamente expostas à CMS2 durante 6 dias (conforme item 4.2.2.3), foi recolhido para avaliar a atividade de MMPs. Para isso, 10 μg de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com 1% de gelatina e corados com azul de Comassie 0,5% p/v. A análise densitométrica dos géis foi realizada no programa ImageJ® (item 4.2.2.9.3). A e B- Imagens representativas dos zimogramas mostram os halos de atividade de MMP-2 e MMP-9, respectivamente. a e b- Cada coluna representa a porcentagem média \pm e.p.m da atividade de MMP-2 e MMP-9 em cada grupo, respectivamente. (***) $p < 0,001$, ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls.

5.9.3 Participação de proteínas relacionadas a transição epitélio mesenquimal (EMT)

Sabe-se que a perda de marcadores epiteliais e o aumento simultâneo da expressão de proteínas mesenquimais promove o carácter migratório e invasivo em células de melanoma. Desse modo, o próximo passo foi avaliar a participação de proteínas envolvidas no processo de transição epitélio-mesenquimal nos efeitos inibitórios de CMS2 sobre a migração e invasão celular. Para isso, foi analisada a expressão protéica das moléculas de adesão E- e N-caderina nas células expostas à subfração.

Na figura 15 B é possível observar que CMS2 não altera os níveis de expressão de E-caderina. Por outro lado, ao avaliar a expressão de N-caderina, observou-se que tanto CMS2 5 quanto 10 µg/mL inibem a expressão de N-caderina (figura 15 C). Em termos quantitativos, normalizado em relação ao GAPDH, a expressão de N-caderina foi reduzida em 44% ($0,56 \pm 0,0$, $p < 0,05$) e 65% ($0,34 \pm 0,1$, $p < 0,05$), respectivamente, relativo a expressão das células controles ($1,00 \pm 0,15$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

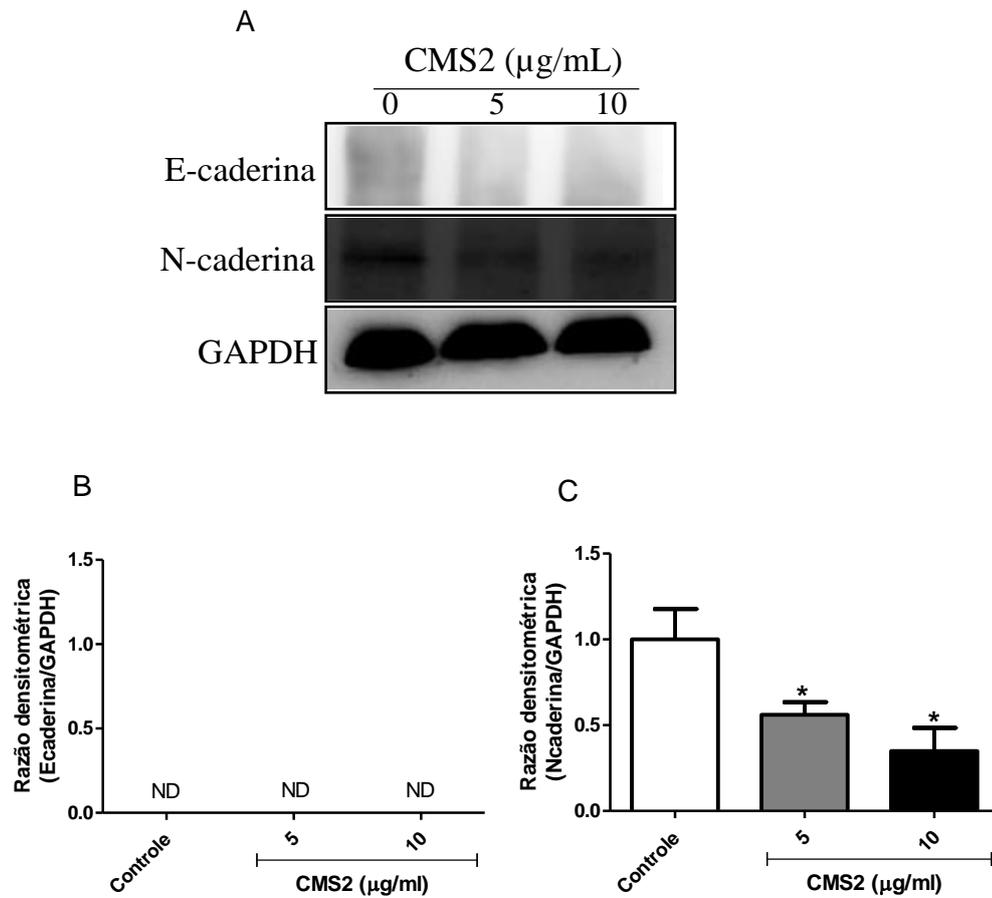


Figura 15: Expressão de E- e N-caderina em células B16F10 expostas à CMS2. Células B16F10 foram expostas à CMS2 (5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) ou permaneceram sem tratamento (células controles) durante 6 dias. Após esse período, foi realizada a lise celular com tampão de extração de proteínas totais. Para realização da eletroforese em SDS-PAGE foram aplicados 70 μg do lisado celular em todas as canaletas e, posteriormente, realizado o Western Blotting, conforme o item 4.2.2.11. As quantificações densitométricas das proteínas E-caderina, N-caderina e GAPDH foram realizadas com auxílio do programa ImageJ. A- Imagens representativas das bandas para as proteínas analisadas. B e C- Os resultados para a expressão de E- e N-caderina foram normalizados pela expressão do GAPDH e apresentados como razão relativa às células controles. Cada coluna representa a média \pm e.p.m da expressão protéica em cada grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

5.9.4 Efeito de CMS2 sobre a formação de colônias *in vitro*

Visto a menor capacidade migratória e invasora das células B16F10 expostas à CMS2, o passo seguinte foi avaliar uma etapa mais tardia do desenvolvimento tumoral, que é a capacidade das células formarem colônias. Para isso, as células B16F10 foram semeadas em placas de 6 poços (200 células/poço) e incubadas durante 10 dias. A figura 16 mostra que o número de colônias formadas pelas células que receberam o tratamento prévio com CMS2 5 ou 10 µg/mL foi reduzida em 59% ($38,3 \pm 3,0$ p<0, 0001) e 62% ($35,5 \pm 3,0$ p<0, 0001), quando comparado as células controle ($94,0 \pm 5,8$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

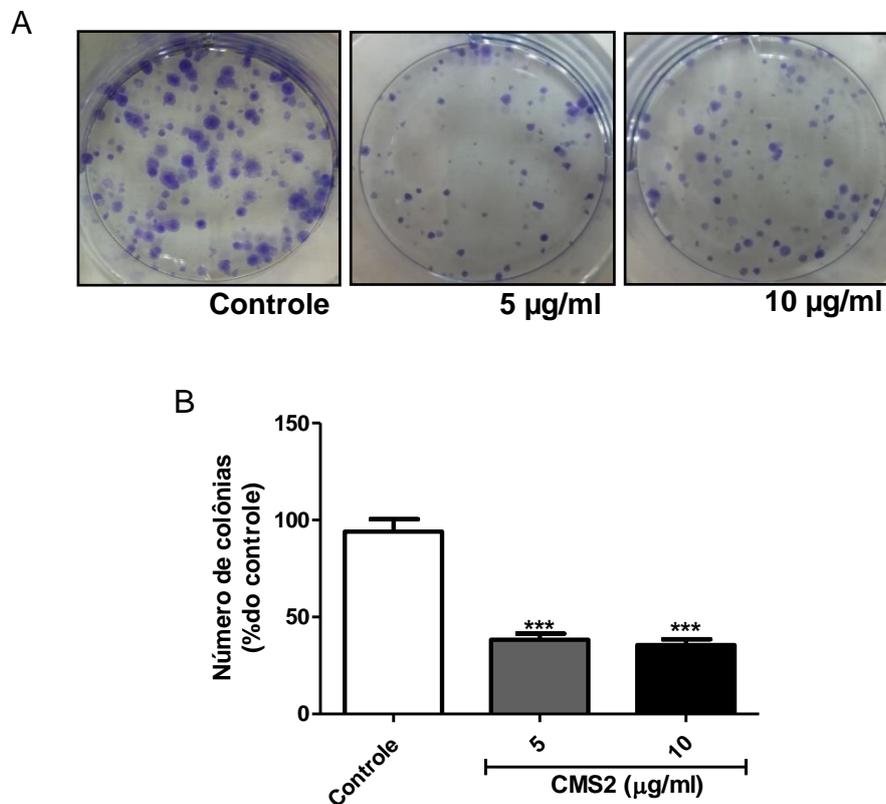


Figura 16: Formação de colônias pelas células B16F10 expostas à CMS2. As células B16F10 foram tratadas com CMS2 por 6 dias e semeadas em placas de 6 poços (200 células/poço) e incubadas durante 10 dias. Após esse período, as colônias foram lavadas com PBS, coradas com cristal violeta 0,5% p/v e contadas (colônias contendo mais do que 50 células individuais). A- Imagens representativas da formação de colônias em cada grupo avaliado. B- Cada coluna representa a porcentagem média do número de colônias ± e.p.m em cada grupo. Resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle - ***p<0,0001 (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.10 Participação das vias das MAPK e da PI3K/AKT nos efeitos de CMS2 sobre as células B16F10

Para investigar a participação das vias das MAPKs e da PI3K/AKT na atividade antitumoral/antimetastática de CMS2 foi determinada a ativação das MAPKs: ERK1/2, p38 e SAPK/JNK e a ativação de AKT.

A fim de avaliar tais mecanismos, as células B16F10 foram expostas à 5 ou 10 µg/ml da subfração e submetidas ao protocolo de Western Blotting (item 4.2.2.11). A quantificação da fosforilação de ERK1/2, p38 e SAPK/JNK foi realizada e normalizada pela expressão do GAPDH ou da Tubulina e apresentada como razão relativa às células controle. Como se observa na figura 17 A, apenas a concentração de 10 µg/ml inibiu significativamente a fosforilação de ERK1/2 e essa inibição foi em torno de 67% ($0,33 \pm 0,0$ $p < 0,05$). Contudo, como mostra a figura 17 B nenhuma das concentrações de CMS2 alterou os níveis de fosforilação de SAPK/JNK nas células B16F10 ($p > 0,05$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Por outro lado, tanto CMS2 5 quanto 10 µg/ml promoveu uma diminuição na quantidade de p38 fosforilada nas células B16F10 ($0,22 \pm 0,14$ $p < 0,05$) e ($0,15 \pm 0,26$ $p < 0,05$), respectivamente, em relação a expressão apresentada pelas células controles ($1,00 \pm 0,18$) (figura 17 C).

Já sobre a influência de CMS2 sobre a via PI3K/AKT, é possível notar na figura 17 D que CMS2 10 µg/ml reduziu a ativação de AKT em 52% ($0,52 \pm 0,0$) quando comparada a expressão apresentada pelas células controles ($1,00 \pm 0,0$ $p < 0,05$, ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

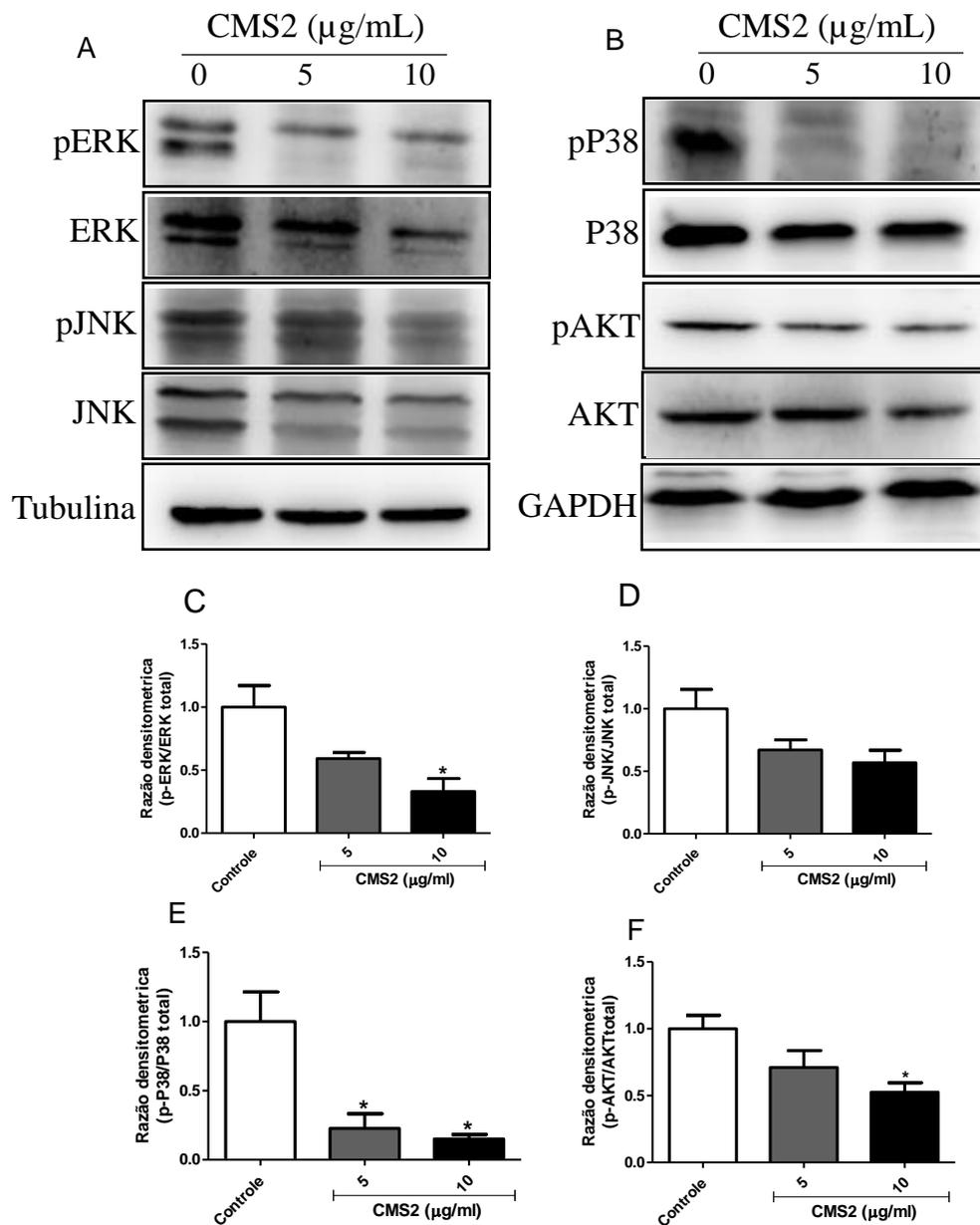


Figura 17: Ativação de ERK1/2, SAPK/JNK, p38 e AKT em células B16F10 expostas à CMS2. Células B16F10 foram expostas à CMS2 (5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) ou permaneceram sem tratamento (células controles) durante 6 dias. Após esse período, foi realizada a lise celular com tampão de extração de proteínas totais. Para realização da eletroforese em SDS-PAGE foram aplicados 30 μg do lisado celular em todas as canaletas e, posteriormente, realizado o Western Blotting, conforme o item 4.2.2.11. A análise densitométrica das bandas foi realizada com auxílio do *software* ImageJ. A e B - Imagens ilustrativas das bandas de pERK/ERK, p-JNK/JNK e de p-p38/p38, AKT/AKT, respectivamente e dos normalizadores Tubulina ou GAPDH. C a F- Os resultados para a expressão de pERK (C), p-JNK (D), p-p38 (E) e p-Akt (F) foram normalizados pela expressão das respectivas proteínas totais e apresentados todos como razão relativa às células controles. Cada coluna representa a média \pm e.p.m da expressão protéica em cada grupo. (* $p < 0,05$, ANOVA, pós-teste Student Newman Keuls).

5.11 Efeito de CMS2 sobre a colonização pulmonar

Por fim, objetivou-se avaliar o potencial das células B16F10 em formarem colônias pulmonares. Para isso, as células foram previamente expostas à CMS2 e inoculadas intravenosamente em camundongos C57BL6. Os resultados obtidos mostram que os animais que receberam o inóculo de células tratadas com CMS2 apresentaram uma colonização pulmonar menor em relação aqueles que receberam as células controle (figura 18). Essa redução foi de 72 ($11 \pm 2,8$ $p < 0,0001$) e 91% ($3 \pm 1,0$, $p < 0,0001$) nos animais que receberam CMS2 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, em relação a colonização constatada nos pulmões de animais controles ($38 \pm 7,7$ ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

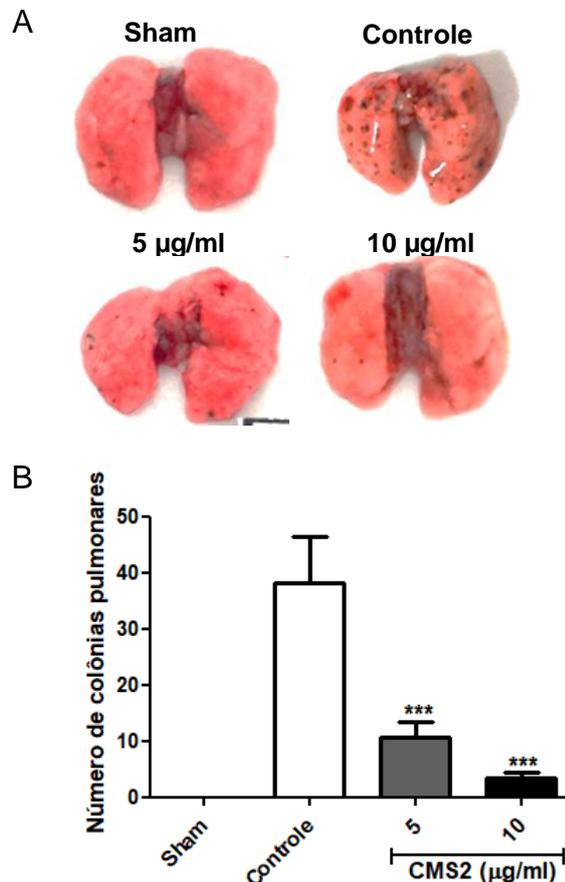


Figura 18: Colonização pulmonar pelas células B16F10 expostas à CMS2. As células foram expostas à CMS2 5 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ por 6 dias. Depois, 5×10^5 células viáveis/100 μL PBS tratadas ou não foram inoculadas na veia caudal de camundongos C57BL6. Após quinze dias, foi realizada a eutanásia e a contagem do número de colônias pulmonares. A- Imagens representativas das colônias pulmonares. B- Cada coluna representa a média do número de colônias pulmonares \pm e.p.m em cada grupo. *** $p < 0,0001$ (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

6 DISCUSSÃO

A proposta deste estudo foi avaliar os mecanismos celulares e moleculares que participam da atividade antitumoral/antimetastática de CMS2, utilizando a linhagem de melanoma metastático B16F10. Assim, foi analisada a influência de CMS2 sobre eventos relacionados a tumorigênese no melanoma e o comportamento das células B16F10 em etapas do desenvolvimento tumoral, também, foram avaliadas vias de sinalização intracelulares ativadas pela subfração.

Como já descrito, a fração P1G10 é obtida na primeira etapa de separação cromatográfica do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis* e apresenta atividade antitumoral e antimetastática em modelos murinos de carcinoma de mama, cólon e melanoma (Braga, 2013; Dittz, 2011; Dittz et al., 2015). Ao ser submetida à purificação cromatográfica em coluna CM Sephadex C-25, P1G10 dá origem, principalmente, a duas subfrações (CMS1 e CMS2) contendo 3 e 5 cisteíno proteases, respectivamente, que são peculiares quanto à natureza catalítica e atividade biológica (Teixeira et al., 2008). Estudos *in vivo*, mostraram que apenas CMS2, mantém a atividade antitumoral e antimetastática apresentada por P1G10 (Dittz, 2011; Braga, 2017).

Sabe-se que o melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e, na maioria das vezes, a rapidez do aparecimento das metástases compromete a eficácia da cirurgia (Kim et al., 2012). Outras limitações para o seu tratamento são a resistência adquirida à radioterapia e aos quimioterápicos (Bandarchi et al., 2010; Liu et al., 2014), além da toxicidade que esses fármacos causam ao indivíduo, mesmo em doses terapêuticas (Bhatia et al., 2009; Wu & Singh, 2011).

Neste trabalho, as células B16F10 foram tratadas com a subfração CMS2 1-10 ug/mL, estas concentrações foram definidas com base na concentração citotóxica de CMS2, para 50% da população celular, que é igual a 10 ug/ml (apêndice D). Já o tempo de exposição à subfração (2 a 8 dias) foi estipulado com base nos dados de Alcazar et al., (2012), que mostram a regulação da diferenciação promovida pelo inibidor de DNA metiltransferase-1 (Decitabina) em células de melanoma B16F10. Primeiramente, foi realizada a análise da viabilidade celular, após a exposição à subfração. A figura 2 mostra que mesmo após 8 dias de exposição, a redução da viabilidade não foi maior que 14%. Além disso, a análise dos níveis de DNA

subdiplóide, uma medida indireta da morte celular, mostra que apesar de serem maiores nas células expostas à CMS2 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$, comparados as células controle, não são índices expressivos, pois atingem apenas 1% (figura 8). Esses dados corroboram os obtidos por Dittz et al., (2015), que mostrou que, apenas, o tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ de P1G10 por mais de 4h induziu um aumento da porcentagem de DNA sub-diplóide em células B16F1.

A incidência de alguns tipos de melanoma é menor em indivíduos com maior teor de melanina na pele (Lazova & Pawelek, 2009; Solano, 2014). No entanto, a melanogênese pode afetar o comportamento das células do melanoma ou do seu microambiente (Slominski et al., 2009). Diante disso, neste trabalho, foi avaliado o perfil melanogênico nas células B16F10 expostas à CMS2. Constatou-se que as células expostas à subfração (5 ou 10 $\mu\text{g/ml}$) tiveram um aumento da produção de melanina e da atividade de tirosinase (figuras 3 e 4). Isso causou uma indagação sobre o efeito que o aumento da melanina poderia causar nas células de melanoma. Contudo, CMS2 também promove um estímulo sobre a melanogênese em linhagem de melanócitos normais (Melan-a) (Lemos et al., 2018). Desse modo, esse não é um efeito exclusivo sobre as células de melanoma.

Outro fator a ser considerado a esse respeito, é que os melanócitos produzem dois tipos quimicamente distintos de melanina: eumelanina, preta a castanha, e feomelanina, amarela a avermelhada. Ambas derivam do precursor comum dopaquinona, que é produzido, a partir da tirosina, sob ação da tirosinase (Ito et al., 2011). De acordo com Kovacs et al., (2012) a eumelanina serve como um filtro contra a radiação UV e possui propriedades de eliminação eficiente para espécies de radicais livres fotogerados, enquanto a feomelanina, além de ser menos eficaz nessa função, também, atua como fotossensibilizadora. Solano (2014) afirma que a feomelanina é bastante fotoinstável, quando exposta à luz solar, sendo envolvida na alta produção de superóxido.

Nesse sentido, indivíduos de pele clara com alta quantidade de feomelanina, tem um risco maior de câncer cutâneo, devido a dois fatores. Primeiro por causa das propriedades fotossensibilizadoras da feomelanina, após a incidência de radiação solar e, também devido a fatores independentes da radiação UV (Rouzaud et al., 2005; Solano, 2014).

Como prova disso, Mitra et al., (2012) introduziram em camundongos portadores de uma mutação inativadora no gene *Mc1r* (que exibem um fenótipo análogo aos humanos de cabelo vermelho/pele clara), um alelo condicional do oncogene *BRAFV600E*, que é mais comumente mutado em melanomas. Os autores observaram uma alta incidência de melanomas invasivos, sem fornecer aberrações gênicas adicionais ou permitir a exposição à radiação ultravioleta. Para investigar o mecanismo da carcinogênese independente de UV, introduziram um alelo albino, que remove toda a produção de pigmento (*Mc1r e/e*). Então, observaram que a ausência seletiva de síntese de feomelanina foi protetora contra o desenvolvimento do melanoma.

Desse modo, mesmo não tendo sido determinado neste estudo, o tipo de melanina que está sendo estimulado por CMS2 em B16F10, os resultados já apresentados sobre os efeitos celulares promovidos pela subfração, sugerem que a eumelanina seja predominante.

Além disso, um estudo realizado por Sarna et al., (2014) mostrou que os grânulos de melanina modificam as propriedades elásticas de células da linhagem de melanoma humano SKMEL-188. Os autores demonstraram que as células contendo mais grânulos de melanina são menos propensas a transmigrar, através dos poros da membrana de aparatos *transwell*, em comparação com as células sem melanossomos. Esses dados mostram que os grânulos de melanina exibem um efeito inibidor, de natureza mecânica, sobre as capacidades de transmigração de células de melanoma humano.

Por outro lado, um estudo realizado por Brozyna et al., (2013) mostrou que pacientes com melanoma metastático e melanótico apresentaram sobrevida livre de doença e sobrevida global, significativamente, menores do que aqueles com lesões amelanóticas. Conforme afirmam Brozyna et al., (2016) os níveis de melanina foram significativamente maiores nas células de melanoma que invadiram a derme reticular em comparação com a derme papilar.

O fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), o homólogo humano do produto gênico de microftalmia de camundongo, regula a transcrição específica no melanócito do gene da tirosinase (Fuse et al., 1996). Neste trabalho, foi investigada a expressão da proteína MITF nas células B16F10, após a exposição à

CMS2. Ao observar a figura 5, nota-se que há uma menor expressão de MITF nas células expostas à 5 ou 10 µg/mL da subfração.

Sabe-se que três enzimas estão envolvidas na biossíntese da melanina: a tirosinase, cuja atividade é considerada limitante para a melanogênese (Lai et al., 2017), a proteína 1 relacionada à tirosinase (TYRP1) e a proteína 2 relacionada à tirosinase (TYRP2), também denominada como dopacromo tautomerase (DCT) (Nasti & Timares, 2015). Entretanto, neste estudo, ao investigar a expressão de mRNA para os genes codificadores das proteínas envolvidas na melanogênese, não foram evidenciadas alterações nos níveis de expressão para Tirosinase, TYRP1 e TYRP2 em qualquer dos grupos avaliados (figura 6).

A ativação da Tirosinase ocorre por meio da fosforilação nos resíduos ser505 e ser509 no domínio C-terminal da enzima, assim a L-tirosina pode se ligar à enzima e a reação prossegue no pH melanosomal de 6,8, iniciando a melanogênese. Esses resíduos de serina (ser) podem ser fosforilados pela PKC β citosólica levando a uma ativação da enzima de 2,5 vezes (Schallreuter et al., 2008). Dessa forma, o mecanismo de ativação da Tirosinase por fosforilação pode, pelo menos em parte, justificar a ausência de diferença na sua expressão gênica, entre os grupos avaliados, mesmo tendo sido mostrado na figura 4 uma maior atividade enzimática, após exposição à CMS2.

É sabido que o MITF é o principal regulador dos melanócitos, desempenhando um papel fundamental no seu desenvolvimento, diferenciação, função e sobrevivência (Roider & Fisher, 2014). Contudo, para executar essas múltiplas funções de maneira apropriada, o MITF precisa ser estritamente regulado e esta regulação ocorre de forma transcricional e pós-traducional, em resposta à sinalização extracelular (Hsiao & Fisher, 2014).

Os principais fatores de transcrição implicados na regulação do promotor, controlando a expressão do mRNA de MITF, incluem Pax3, CREB e SOX10 (Wellbrock & Arozarena, 2015). Além dessa regulação a nível transcricional, MITF também é regulado pós-traducionalmente por várias modificações, sendo a melhor caracterizada a fosforilação da serina (S73 e S409) pela sinalização das MAPK, na qual as ERKs ativadas promovem esta fosforilação (Hartman & Czyz, 2015). A fosforilação de MITF, apenas na serina 73 ou em conjunto com a serina 409, é seguida por ubiquitinação de MITF e degradação mediada por proteassoma

(Arnheiter et al., 2006; Chang et al., 2012). Por outro lado, a sinalização pela quinase p38 está envolvida na ativação de MITF, porque leva à fosforilação em S307 e, concomitantemente, a um aumento na atividade transcricional de MITF (Arnheiter et al., 2006).

Mesmo com a via de sinalização da ERK1/2 inibida nas células B16F10 expostas à CMS2 (figura 17 C), isso não resultou em aumento da expressão de MITF nestas células. No entanto, foi evidenciada a redução da ativação de p38 (figura 17 E), que é responsável por aumentar a atividade de MITF. Desse modo, nestas células, a ativação de MITF e p38 podem estar relacionadas, uma vez observado a redução da expressão das duas proteínas. Como esta via de sinalização envolvida na ativação de MITF está inibida, após o tratamento de B16F10 com CMS2, pode-se justificar a redução da expressão de MITF, mesmo tendo sido mostrado um aumento na melanogênese nestas células.

Embora a expressão de muitos marcadores melanocíticos possa ser perdida no melanoma, a expressão de MITF é mantida, na maioria, se não em todos esses tumores (Widlund & Fisher, 2003). Esse dado é sustentado por estudos de Garraway et al., (2005), que mostram o MITF como um oncogene de sobrevivência, que é amplificado de forma mais prevalente no melanoma metastático. Esse fator é capaz de controlar as propriedades proliferativas, invasivas e metastáticas das células do melanoma, correlacionando-se com a diminuição da sobrevida geral dos pacientes. Por outro lado, Carreira et al., (2006) mostraram que o aumento da expressão de MITF em células de melanoma inibiu a capacidade invasora destas células e que a depleção deste fator de transcrição levou ao aumento da invasão celular. Contudo, Hartman & Czyz, (2015) relatou que o MITF promove a sobrevivência das células do melanoma, uma vez que vários genes que codificam proteínas anti-apoptóticas são alvos diretos deste fator de transcrição. Dessa forma, propõe-se que a menor expressão de MITF encontrada nas células B16F10, expostas à CMS2, esteja relacionada a menor capacidade invasora (figura 13) e de colonização *in vitro* (figura 16) e *in vivo* (figura 18) destas células. Além disso, é descrito que a redução da atividade do MITF sensibiliza as células do melanoma a agentes quimioterápicos (Garraway et al., 2005), colocando este fator de transcrição como um potencial alvo terapêutico (Aida et al., 2017).

Após a síntese da melanina, os melanossomos são transferidos para os queratinócitos circundantes. Para isso, a dendricidade de melanócitos é uma característica morfológica crucial, pois permite a transferência da melanina para os queratinócitos (Busca` & Ballotti, 2000). Além disso, a dendricidade relaciona-se a menor proliferação, pois para proliferarem os melanócitos precisam se desacoplar da membrana basal e dos queratinócitos, retrair os seus dendritos, dividirem-se, para então, migrar ao longo da membrana basal (Haass & Herlyn, 2005). Como mostra a figura 7, diferente das células controle, as expostas à CMS2 apresentam uma quantidade significativamente maior de células com prolongamentos dendríticos. Da mesma forma, estudo realizado por Naliwaiko et al., (2008), mostraram uma maior formação de prolongamentos dendríticos em células de melanoma B16F10, que apresentaram uma diminuição do seu potencial migratório. Wang et al., (2015), também mostraram uma maior formação dendrítica nas células B16F10, que tiveram menor capacidade proliferativa e de colonização *in vitro*.

Estudos anteriores realizados em melanócitos humanos relataram que a melanogênese pode induzir a paralisação da proliferação celular (Bandyopadhyay & Medrano, 2000). Por isso, avaliou-se a distribuição das células nas fases do ciclo celular. Ao observar a figura 8, constata-se que houve um aumento das células na fase G1 do ciclo celular, após exposição à CM2 5 ou 10 µg/mL. Com isso, houve uma redução do número de células nas fases S e G2, mostrando que CMS2 promoveu a retenção das células B16F10 na fase G1, sugerindo um efeito inibitório sobre a proliferação celular.

Para promover e apoiar a parada do ciclo celular, há uma ativação da proteína p16^{INK4A} (CDKN2A), acompanhada por p53 e p21 (CDKN1A), que inibe quinases dependentes de ciclina (CDKs), prevenindo assim a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb) e, conseqüentemente, suprimindo a expressão de genes associados à proliferação (Yosef et al., 2017). Nesse contexto, foi determinada a expressão das proteínas p53 e p21 nas células B16F10 expostas à CMS2. Como observado na figura 9 A não foram verificadas diferenças na expressão de p53 nas células B6F10, expostas ou não a subfração CMS2, por outro lado, a subfração reduziu os níveis de p21 nas células expostas à CMS2 5 ou 10 µg/mL (figura 9 B).

Considerando que a parada do ciclo celular em G1, foi relatada como uma característica da senescência celular em Giuliano et al. (2010), decidiu-se avaliar a ocorrência deste evento, após exposição das células B16F10 à CMS2. A senescência celular é uma forma permanente de parada do ciclo celular, a proliferação é interrompida em resposta a vários fatores de estresse, incluindo encurtamento dos telômeros, ativação de oncogene e dano ao DNA. As células senescentes apresentam atividade elevada de β -galactosidase associada a senescência e uma resposta persistente de dano ao DNA, que as diferencia de outras populações de células não proliferativas (Yosef et al., 2017).

Nesse sentido, o método clássico para identificar a senescência celular, baseia-se na detecção dos níveis de atividade da enzima β -galactosidase (também denominada, β -galactosidase associada à senescência ou SA β G), por ensaio colorimétrico (Cerella et al., 2016). Dimri et al., (1995) identificaram a β -galactosidase como um marcador de células senescentes em meio com pH 6,0, ao observarem a sua expressão em fibroblastos ou queratinócitos senescentes e a ausência dessa expressão em fibroblastos e queratinócitos pré-senescentes, quiescentes ou terminalmente diferenciados.

Neste trabalho, como mostrado na figura 10, o número de células positivas para β -galactosidase não é diferente entre os grupos controle e expostos à CM2 nas concentrações de 5 ou 10 μ g/mL. Assim, aliado aos resultados sobre a expressão de p53 e p21 nas células expostas à CMS2 a ausência de atividade de β -galactosidase está em concordância com a ausência de senescência celular, indicando este não é o mecanismo responsável por interromper o ciclo nestas células. De fato, existem outros trabalhos, como o realizado por Cunha et al., (2012), mostrando que a estimulação da melanogênese em células B16F10 não resultou em indução da senescência nestas células.

Após estes achados, o próximo passo, foi avaliar o comportamento das células B16F10 em algumas etapas do desenvolvimento tumoral, *in vitro*, como a migração, invasão celular e formação de colônias. A dissociação das células do tumor primário e a invasão para o estroma circundante, são eventos iniciais da migração dessas células, que culmina na colonização de órgãos distantes, formando as metástases (Bozzuto et al., 2010). Assim, a primeira etapa analisada foi a capacidade de migração celular, com intuito de eliminar a influência da proliferação

celular, o ensaio foi realizado na presença de hidroxiuréia, um inibidor de proliferação. Os resultados mostraram que apenas as células expostas à CMS2 10 µg/mL apresentaram uma capacidade migratória reduzida (figura 11).

A migração de células invasivas demanda a formação de várias estruturas protrusivas, que requerem a polimerização de actina, que é regulada por fatores especializados de nucleação de actina, tais como forminas, o complexo proteína relacionada à actina 2/3 (Arp2/3) e fatores promotores de nucleação (Nurnberg et al., 2011). O complexo Arp2/3 consiste em sete subunidades, todas proteínas estritamente envolvidas com a polimerização da actina (Tang et al., 2013), a subunidade 5 deste complexo é a ARPC5, também conhecida como p16-ARC (Millard et al., 2003). Em concordância com a menor capacidade migratória, as células expostas à CMS2 5 e 10 µg/mL também apresentaram uma menor expressão de p16-ARC (figura 12). As proteínas do complexo Arp2/3 e proteínas da família WASP são necessárias para a atividade protrusora celular associada à migração e invasão celular (Alblazi & Siar, 2015). Além disso, a expressão dessas proteínas, tem sido associada a fenótipos malignos de células tumorais, indicando a importância das mesmas na migração e invasão celular (Yamaguchi & Condeelis, 2007).

A invasão de células tumorais no tecido circundante é um pré-requisito e um passo inicial na metástase (Nurnberg et al., 2011). Nesse sentido, após observada a menor migração das células B16F10 expostas à subfração, decidiu-se analisar o efeito de CMS2 sobre a invasão celular. Para isso, a capacidade invasora das células foi avaliada, *in vitro*, em modelo que mimetiza a membrana basal. Assim, foi verificado que as células expostas à CMS2 nas concentrações 5 e 10 µg/mL apresentaram uma inibição da invasão em relação as células controles (figura 13).

Durante o desenvolvimento tumoral e metastático as metaloproteinases de matriz (MMPs) desempenham um papel central, por realizarem a degradação e remodelação da matriz extracelular (MEC), propiciando a invasão tumoral (Kessenbrock et al., 2010). Dentre as MMPs as gelatinases, que também são denominadas como colagenases do tipo IV, MMP-2 e MMP-9, desempenham um papel essencial na degradação do colágeno tipo IV e da gelatina (Roomi et al., 2010). A MMP-2 é amplamente expressa em tecidos normais e tumorais. Enquanto a MMP-9 é induzida, sob condições que requerem remodelação tecidual, como

desenvolvimento tecidual, cicatrização de feridas e invasão tumoral (Polette et al., 2004). As MMPs modificam diretamente as integrinas e outras moléculas de adesão das células tumorais e ativam proteoliticamente citocinas, como o TGF- β , promovendo invasão tumoral e angiogênese (Yao et al., 2001) e levando à indução da transição epitelial-mesenquimal (Mehner et al., 2014). Outros estudos já mostraram que células malignas se tornam menos agressivas, quando a expressão ou a atividade de MMPs é reduzida (Egeblad & Werb, 2002; Roomi et al., 2010). Nesse sentido, pesquisas realizadas com diferentes tumores sólidos, tem sido direcionadas ao desenvolvimento de inibidores de MMPs como potenciais agentes terapêuticos (Zucker et al., 2001; Devy & Dransfield, 2011; Webb et al., 2017).

Sabendo disso, o efeito da subfração CMS2 sobre a atividade das MMPs secretadas foi investigado, pelo ensaio de zimografia, utilizando a gelatina como substrato. Como mostra a figura 14, nos sobrenadantes das células que receberam a exposição prévia à CMS2 (5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) foram abolidas as atividades das MMPs-2 e 9 em relação aos sobrenadantes controles. Diante dessa amplitude de inibição sobre a atividade das MMPs, procedeu-se a determinação da atividade amidásica nos sobrenadantes das culturas celulares. Contudo, como mostra a figura do apêndice G, não há atividade amidásica significativa nos sobrenadantes de células expostas à CMS2, bem como nos controles. Assim, esse resultado descarta a hipótese de que a fração proteolítica CMS2 esteja promovendo a degradação direta das MMPs. Do mesmo modo, CMS2 também apresentou uma ampla inibição sobre a atividade digestora das gelatinases em melanócitos (Melan-a) transformados (dados não mostrados).

A expressão de MMPs pode estar estimulada em células tumorais, que expressam o oncogene *RAS* e a proteína quinase SRC, sugerindo que as vias de sinalização controladas por estas oncoproteínas possam regular a atividade das metaloproteinases (Yao et al., 2001; Zhao et al., 2014). É descrito que os níveis de ativação das MAPKs (quinases ativadas por mitógenos) e da via PI3K/AKT desempenham um papel crítico na regulação das MMPs -2 e -9 (Park et al., 2001; Adya et al., 2008; Akter et al., 2015). A inibição da ativação de ERK1/2 e da via PI3K/AKT reduziu a atividade de MMP-9 e atenuou a invasividade de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (O-Charoenrat et al., 2004). Em células B16F10 a redução da capacidade invasora esteve relacionada a inibição da

atividade de MMP-2, sendo mostrada, também, a redução da ativação de ERK 1/2 e de AKT (Zhao et al., 2014). Além disso, Kumar et al., (2010) mostraram que a inibição de p38 reduziu a atividade das MMPs -2 e -9, juntamente com a capacidade invasiva de células HTB9, linhagem de câncer de bexiga. Kim et al., (2001) mostraram que em células de fibrosarcoma humano com aumento da capacidade migratória, invasora e da atividade de MMP-9, foi constatada maior atividade de AKT. Dessa maneira, a menor atividade de MMP-2 e -9 apresentada pelas células B16F10 expostas à CMS2, está de acordo com a menor ativação das MAPKs (ERK1/2 e p38) e de AKT ativas encontrada nestas células (figura 17).

Esses dados estão de acordo com a literatura, que mostra que a cisteíno protease bromelina promove a inibição da invasividade de células tumorais, suprimindo a expressão da MMP-9, através da inibição das vias de sinalização da proteína ativadora 1 (AP-1) e NF- κ B (Rathnavelu et al., 2016). Outro estudo realizado por Muller et al., (2016) mostrou que a bromelina e a papaína levaram a uma diminuição na proliferação, invasão e migração de células de colangiocarcinoma, com redução da expressão de MMP-9 promovida pelas proteases.

Um dos fatores mais significativos associados à invasão tumoral e à metástase é a alteração da adesão célula-célula, que determina a polaridade celular e está envolvida na diferenciação celular. Durante a carcinogênese, essa adesão é perturbada por alterações genéticas e epigenéticas, resultando em alterações na sinalização, perda de inibição de contato, migração celular alterada e interações estromais (Duan et al., 2013).

Nesse contexto, um dos passos iniciais para a invasão tumoral é o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT), durante o qual as células tumorais perdem marcadores epiteliais e adquirem características mesenquimais (Quail & Joyce, 2013). Este processo permite que uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com a membrana basal, através de sua superfície basal, adquira um fenótipo mesenquimal, que inclui maior capacidade migratória, invasividade, resistência à apoptose e aumento da produção de componentes da matriz extracelular (Kalluri & Weinberg, 2009). Desse modo, uma das características importantes da EMT, inclui a regulação negativa de moléculas de adesão celular como a E-caderina (Murtas et al., 2017). A repressão da E-caderina é mediada,

principalmente, por fatores de transcrição, que incluem, o Snail, Slug, ZEB1, SIP1, E12/47 e Twist (Wels et al., 2011). Na EMT alterações na sinalização celular induzem as células a perderem o seu carácter epitelial, interrompendo a expressão ou a função das proteínas de adesão celular (Pearlman et al., 2017). Durante a progressão do melanoma, a transição da fase de crescimento radial para a de crescimento vertical é caracterizada pela redução da expressão de E-caderina, que resulta na perda do controle dos queratinócitos sobre a proliferação e migração dos melanócitos (Liang et al., 2015).

Embora a perda de marcadores epiteliais seja um passo crítico na EMT, a expressão de proteínas mesenquimais, principalmente N-caderina, também, é importante em direção ao aumento da migração e da invasão celular (Lamouille et al., 2014; Pearlman et al., 2017). Os melanócitos transformados expressam a N-caderina para formar contatos com fibroblastos e células endoteliais vasculares durante a migração e invasão do estroma, derme, vasos linfáticos e sanguíneos (Kuphal & Bosserhoff, 2012). A adesão celular mediada pela N-caderina ativa a via antiapoptótica da AKT que, por sua vez, inativa a proteína pró-apoptótica associada à Bcl-2 (BAD) e estabiliza a proteína antiapoptótica β -catenina, promovendo, assim, a sobrevivência celular no melanoma (Murtas et al., 2017).

Conforme afirmam Ciolczyk-Wierzbicka & Laidler, (2012) a E-caderina funciona como um supressor de invasão e é regulada negativamente na maioria dos casos de câncer, enquanto a N-caderina é frequentemente regulada positivamente. A expressão de outras caderinas, como a H-caderina (Kuphal et al., 2009) e a P-caderina (Jacobs et al., 2011), assim como a E-caderina, podem reduzir o crescimento e a invasão de células do melanoma, mas sua expressão diminui ou desaparece no melanoma (Ciolczyk-Wierzbicka & Laidler, 2012).

Hsu et al., (2000) mostraram que a indução da expressão de E-caderina em diferentes linhagens celulares de melanoma humano, resultou em inibição do crescimento celular *in vitro* e *in vivo*. Contudo, neste trabalho, após expor as células B16F10 à CMS2 não foram evidenciadas alterações nos níveis de E-caderina, que permaneceram indetectáveis (figura 15 B). Neste trabalho, também, foi avaliada a expressão da E-caderina em células com características epiteliais, que naturalmente expressam a E-caderina. Foram avaliadas as células HACAT, linhagem celular de queratinócitos humanos (Hung et al., 2006) e A431, linhagem celular de carcinoma

epidermóide (Solis et al., 2012). Como pode ser visto na figura do Apêndice H, a expressão de E-caderina nestas células foi detectada pelo mesmo método em questão, excluindo a ocorrência de problemas técnicos. É sabido que a diminuição da expressão de E-caderina ocorre durante o desenvolvimento tumoral, inclusive do melanoma (Mescher et al., 2017). Desse modo, sugere-se que a expressão da E-caderina esteja reduzida nas células B16F10, em níveis que não puderam ser detectados.

Conforme afirmam Lobos-González et al., (2013), as células B16F10 tem baixos níveis endógenos de E-Caderina e os autores tinham como objetivo avaliarem o papel da coexpressão de caveolina-1 (CAV1) e E-caderina sobre o crescimento tumoral e metastático em camundongos C57BL/6. Então, as células B16F10 foram transfectadas com um plasmídeo para induzir a expressão das duas moléculas. Os autores observaram que a superexpressão de CAV1 em células B16F10 reduziu a formação de tumor subcutâneo, mas aumentou a formação de metástase em relação às células controle. Já a indução da expressão de E-caderina reduziu a formação de tumor subcutâneo e, também, de metástase *in vivo*. De forma interessante, a co-expressão de CAV1 e de E-caderina em células B16F10 reduziu a formação de tumores e de metástases pulmonares.

Por outro lado, a avaliação da expressão da N-caderina nas células B16F10, mostra que a exposição à CMS2 5 ou 10 µg/mL foi capaz de diminuir, significativamente a sua expressão, quando comparada as células controle (figura 15 C). Murtas et al., (2017) realizaram a avaliação imunohistoquímica de tumores primários humanos e, também, de metástases linfonodais e observaram células positivas para N-caderina difusamente distribuídas no tumor. Conforme afirmam Lamouille et al., (2014) durante a EMT as células reorganizam seu citoesqueleto de actina cortical permitindo o alongamento dinâmico celular e a motilidade direcional. Desse modo, ocorre um aumento da contratilidade celular e formação de fibras de estresse de actina. Nesse contexto, a menor expressão de N-caderina, de p16-ARC, aliado a menor atividade de MMPs -2 e -9, também, mostrada em B16F10 estão de acordo com a menor capacidade migratória e invasora destas células, quando expostas à CMS2. Isso corrobora o efeito de CMS2 em reverter a expressão das proteínas, Nucleofosmina 1; Proteína de choque térmico 65, Proteína ligante a calciclina e Fator de iniciação da tradução eucariótica 4H, que participam da

proliferação, sobrevivência, invasão e da migração celular, em B16F10, a níveis comparáveis a expressão em linhagem normal melanocítica (Melan-a) (Lemos et al., 2018).

A inibição da capacidade invasiva e migratória de células tumorais possibilita uma nova abordagem para o tratamento de neoplasias malignas. Sabe-se que a formação de metástases é a principal causa de morte por câncer, assim, a prevenção da disseminação de células tumorais e da formação de tumores secundários deve ser um dos objetivos principais da terapia do câncer. (Zijl et al., 2011).

As células tumorais que conseguem invadir o tecido circundante, precisam sobreviver fora do seu ambiente original e, posteriormente, estabelecer-se em um novo local para originarem tumores metastáticos (Chaffer & Weinberg, 2011). Assim, a formação de colônias é outra etapa importante no processo da tumorigênese. Por isso, foi avaliada a capacidade das células B16F10 formarem colônias *in vitro*. Nesse ensaio, é semeada uma suspensão de células e avaliada a capacidade individual de sobrevivência das mesmas e de, posteriormente, formarem uma progênie (Franken et al., 2006). Na figura 16, é possível observar que o número de colônias formadas pelas células que foram previamente expostas à CMS2 nas concentrações de 5 ou 10 µg/mL foi reduzida em 60%, quando comparado as células controle.

A progressão do tumor é um processo de várias etapas que envolve alterações em várias vias de sinalização, que resultam em uma vantagem de sobrevivência para as células transformadas. A compreensão dos mecanismos de sinalização subjacentes à cascata metastática é crucial para caracterizar as opções de tratamento antineoplásico (Nurnberg et al., 2011). Por isso, neste trabalho, dedicou-se a investigar as vias de sinalização ativadas por CMS2, como forma de conhecer os mecanismos intracelulares envolvidos no seu efeito antitumoral/antimetastático.

No melanoma as vias de sinalizações das MAPKs e PI3K/AKT, duas principais vias de proliferação e sobrevivência, são constitutivamente ativas, através de mutações ativadoras de NRAS ou BRAF e perda da Fosfatase Homóloga a Tensina (PTEN), que é um regulador negativo da sinalização induzida pela PI3K (Wu & Singh, 2011).

Neste estudo, realizou-se a exposição das células de melanoma B16F10 à CMS2 e determinou-se as alterações promovidas pela subfração nas vias das MAPKs, aqui avaliadas pela fosforilação de ERK1/2, SAPK/JNK e de p38. Observou-se que CMS2 10 µg/mL inibiu a ativação de ERK1/2 em relação as células controles (figura 17 C). Contudo, em relação a ativação de SAPK/JNK não foram obtidas diferenças significativas entre as células expostas à fração e as controle (figura 17 D). A atividade de p38 também foi reduzida pelo tratamento com CMS2. Nesse caso, a menor concentração de CMS2, 5 µg/mL, também se mostrou eficaz para tal efeito (figura 17 E). Assim, os resultados aqui obtidos, estão de acordo ao descrito na literatura sobre a ativação de MAPKs e o desenvolvimento do melanoma. Como já discutido anteriormente, CMS2 foi capaz de alterar o comportamento celular em eventos importantes, desfavorecendo a progressão tumoral e, assim, reduzindo a colonização *in vitro*.

Os resultados apresentados sobre a inibição de ERK1/2 nas células de melanoma sugere uma ação dual para as cisteíno proteases contidas em CMS2. Gomes et al., (2009) mostraram que o estímulo de proliferação celular promovido por uma protease contida em CMS2, CMS2MS2 (10 ng/mL), sobre fibroblastos é dependente da ativação de ERK1/2. Desse modo, observa-se que dependendo das concentrações utilizadas e, também, do tipo celular as proteases contidas em CMS2 podem atuar sobre eventos relacionados à mitogênese, diferenciação e morte celular. Esse tipo de efeito já foi mostrado por Zhang et al., (2012) para o fator de crescimento epidérmico (EGF), que em baixas concentrações estimula a proliferação celular, ativando uma via de sinalização mitogênica (MAPK/ERK), enquanto em altas concentrações, inibe tal evento.

Como visto, a cascata envolvendo PI3K/AKT também é importante para a tumorigênese, uma vez que ativa a sobrevivência celular, proliferação, migração, invasão e a sinalização antiapoptótica (Yajima et al., 2012). A AKT ativa tem o potencial de fosforilar até 100 proteínas alvo, por isso, pode modular diferentes funções celulares (Carracedo & Pandolfi, 2008). Um desses substratos é a quinase glicogênio sintase 3- β (GSK3β), nesse caso, a AKT geralmente, inibe a GSK3β pela fosforilação da serina-9/21 (Beurel et al., 2015). Como resultado dessa inibição de GSK3β, a β-catenina livre é capaz de se acumular e translocar para o núcleo, onde pode ativar a expressão de oncogenes, como c-MYC e ciclina D1 (Ashihara et al.,

2015). Vários substratos de AKT são importantes para o seu efeito antiapoptótico, incluindo BAD, caspase 9, MDM2 e IKK α (Davies, 2012). A AKT, também, ativa a proliferação celular por inativação de p27 (Carracedo & Pandolfi, 2008). Além disso, a mTOR, que é ativada pela fosforilação inibitória do supressor de tumor, TSC2, do complexo de esclerose tuberosa (TSC), pela AKT é um importante regulador do metabolismo, crescimento e sobrevivência celular, sendo ativada aberrantemente na maioria dos tumores humanos, tornando-se capaz de influenciar as alterações metabólicas comuns às células tumorais (Yecies & Manning, 2011). Neste estudo, a exposição das células B16F10 à CMS2 10 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir a ativação de AKT, determinada pela fosforilação no resíduo 473 de serina (figura 17 F). Desse modo, o perfil de inibição de p-AKT encontrado nas células B16F10 expostas à subfração, condiz com o menor potencial tumorigênico destas células. Portanto, os resultados aqui obtidos mostram que CMS2 induz um fenótipo menos agressivo nas células B16F10, que adquirem menor capacidade invasiva e metastática.

Por fim, visto os efeitos de CMS2 em inibir algumas etapas do desenvolvimento tumoral, *in vitro*, avaliou-se o potencial das células B16F10 formarem colônias pulmonares. Para isso, as células foram previamente expostas, *in vitro*, à CMS2 e inoculadas intravenosamente em camundongos C57BL6. Apesar desse modelo, não proporcionar todas as etapas do desenvolvimento tumoral vários trabalhos o utilizam, com o propósito de avaliar a capacidade metastática de células transformadas (Lima et al., 2009; Ricca et al., 2009) ou atividade antimetastática de diferentes compostos (Gautam et al., 2002; Shi et al., 2013; Zhao et al., 2014;). Os resultados aqui obtidos, mostram que os animais que receberam o inóculo de células expostas à CMS2 apresentaram uma colonização pulmonar, significativamente, menor em relação aqueles que receberam as células controles, sem tratamento (figura 18). Desse modo, a redução da colonização *in vivo* promovida por CMS2, corrobora a inibição observada *in vitro* (figura 16). Contudo, o percentual de inibição da colonização pulmonar (até 91%) foi maior do que a obtida *in vitro* (até 62%), mostrando a eficácia da fração em impedir o estabelecimento tumoral.

7 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que CMS2 interfere no desenvolvimento tumoral, alterando parâmetros que induzem um fenótipo menos agressivo nas células B16F10. Os efeitos celulares observados estão acompanhados de alterações moleculares, que se relacionam à inibição do processo tumoral. Assim, com a parada do ciclo celular em G1, observou-se a inativação da via das MAPKs (ERK e p38). A redução das capacidades migratória, invasora e de colonização *in vitro* e *in vivo* podem estar relacionadas à inibição da via PI3K/AKT, da atividade das MMPs -2 e -9 e da expressão das proteínas p16-ARC e da N-caderina.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v.9, n.6, p. 400–414, 2009.

ABILDGAARD, C.; GULDBERG, P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. **Trends in Molecular Medicine**, v.21, n.3, p. 164-71, 2015.

ADYA, R. Tan, B. K.; PUNN, A. et al. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: Novel insights into visfatin-induced angiogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 78, n. 2, p. 356–365, 2008.

AIDA, S.; SONOBE, Y.; TANIMURA, H. et al. MITF suppression improves the sensitivity of melanoma cells to a BRAF inhibitor. **Cancer Letters**, v. 409, p. 116–124, 2017.

AKTER, H.; PARK, M.; KWON, O. et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by neurotensin promotes cell invasion and migration through ERK pathway in gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 36, n. 8, p. 6053–6062, 2015.

ALBLAZI, K. M. O.; SIAR, C. H. Cellular Protrusions - Lamellipodia, Filopodia, Invadopodia and Podosomes - and their Roles in Progression of Orofacial Tumours: Current Understanding. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.16, n. 6, p. 2187-91, 2015.

ALCAZAR, O.; ACHBERGER, S.; ALDRICH, W. et al. Epigenetic regulation by decitabine of melanoma differentiation *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Cancer**. v. 131, n. 1, p. 18-29, 2012.

ALEXAKI, V.-I.; JAVELAUD, D.; MAUVIEL, A. JNK supports survival in melanoma cells by controlling cell cycle arrest and apoptosis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 4, p. 429–438, 2008.

ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **European Journal of Cancer**, v. 11, n. 2, p. 81–91, 2013.

ALIZADEH, A. M.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor Biology**, v. 35, p. 8483–8523, 2014.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B. et al. Câncer E Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos E Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com O Dna: Uma Introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.118–129, 2005.

ALONSO, S. R.; TRACEY, L.; ORTIZ, P. et al. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3450–3460, 2007.

ARNHEITER H.; HOU, L.; NGUYEN, M. T. et al. MITF: A Matter of Life and Death for Developing Melanocytes. In: HEARING, V. J., LEONG, S. P. L. From Melanocytes to Melanoma: **The Progression to Malignancy**. 1. ed. Estados Unidos: Totowa, N.J.: Humana Press, p. 27-49, 2006.

ASHIHARA, E.; TAKADA, T.; MAEKAWA, T. Targeting the canonical Wnt/ β -catenin pathway in hematological malignancies. **Cancer Science**, v. 106, n. 6, p. 665–671, 2015.

BAEZA, G.; COREA, D.; SALAS, C.E. Proteolytic enzymes in *Carica candarmacensis*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 51, p.1-9, 1990.

BANDARCHI, B.; MA, L.; NAVAB, R. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatology Research and Practice**, v. 2010: 583748, 2010.

BANDYOPADHYAY D.; MEDRANO E. E. Melanin accumulation accelerates melanocyte senescence by a mechanism involving p16INK4a/CDK4/pRB and E2F1. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.908, p. 71-84, 2000.

BEDOGNI, B.; POWELL, M. B. Hypoxia, melanocytes and melanoma – survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 22, n. 2, p. 166–174, 2009.

BERKEY, F. J. Managing the adverse effects of radiation therapy. **American Family Physician**, v.82, n. 4, p. 381–388 8, 2010.

BERTOLOTTO, C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. **Scientifica (Cairo)**, v. 2013, p. 1-22, 2013.

BEUREL, E.; GRIECO, S; F.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 148, p. 114–131, 2015.

BHATIA, Shailender; TYKODI, Scott S.; THOMPSON John A. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. **Oncology**, v. 23, n. 6, p. 488–496, 2009.

BOZZUTO, G.; RUGGIERI, P.; MOLINARI, A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. **Ann Ist Super Sanità**, v. 46, n. 1, p. 66–80, 2010.

BRAGA, A. D. **Efeito da fração proteolítica do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, P1G10, sobre o processo inflamatório tumoral**. 2013. 133f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Braga, Ariadne D. **Modulação do fenótipo de macrófagos associados a tumores como mecanismo de ação da atividade antitumoral/antimetastática de proteases obtidas do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis***. 2017 125f.

(Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

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.

BRAVO, L. M.; HERMOSILLA, J.; SALAS, C. A biochemical comparison between latex from *C. candamarcensis* and *C. papaya*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 2831-2862, 1994.

BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, n. 1, p. 55–71, 2010.

BROŻYNA, A. A.; JÓŻWICKI, W.; CARLSON, J. A. et al. Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma. **Human Pathology**, v. 44, n. 10, p. 2071–2074, 2013.

BROZYNA, A. A.; JÓŻWICKI, W.; ROSZKOWSKI, K. et al. Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 14, p. 1–10, 2016.

BUROTTA, M.; CHIOU, V. L.; LEE, J. et al. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. **Cancer**, v. 120, n. 22, p. 3446–3456, 2014.

BUSCÀ, R.; BALLOTTI, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. **Pigment Cell Research**, v.13, n.2, p. 60-69, 2000.

CARRACEDO, A.; PANDOLFI, P. P. The PTEN-PI3K pathway: Of feedbacks and cross-talks. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5527–5541, 2008.

CARREIRA, S.; GOODALL, J.; DENAT, L. et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. **Genes & Development**, v. 20, p. 3426–3439, 2006.

CERELLA, C. et al. Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 4, p. 405–415, 2016.

CHAFFER, C.; WEINBERG, R. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science**, v. 331, p. 1559–1565, 2011.

CHANG, T. S. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. **Materials**. v.5, n. 9, p.1661-1685, 2012.

CHIN, L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. **Nature reviews Cancer**, v. 3, n. 8, p. 559-70, 2003.

CIARLETTA, P.; FORET, L.; BEN AMAR, M. The radial growth phase of malignant melanoma: multi-phase modelling, numerical simulations and linear stability analysis. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 8, n. 56, p. 345-68, 2011.

CIOLCZYK-WIERZBICKA, D.; GIL, D.; LAIDLER, P. The inhibition of cell proliferation using silencing of N-cadherin gene by siRNA process in human melanoma cell lines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 145–151, 2012.

CLARK, W. H. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology**, v. 15, n. 12, 1984.

COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 223–233, 2007.

COOPER, GEOFFREY M. The Development and Causes of Cancer. **The Cell: A Molecular Approach**. 2 ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.

CRAENE, B. DE; BERX, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 2, p. 97–110, 2013.

CRONA, M.; CODÓ, P.; JONNA, V. R. et al. A ribonucleotide reductase inhibitor with deoxyribonucleoside-reversible cytotoxicity. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 9, p. 1375–1386, 2016.

CUNHA, E. S.; KAWAHARAA, R.; KADOWAKI, M. K. et al. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 15, p. 1913–1925, 2012.

D'ARRIGO, W. L.; ELVIN, P.; EVANS, C. W. The effects of the B16 malignant melanoma on induced inflammatory responses in host mice: Inhibition of macrophage exudation. **Cancer Letters**, v. 28, n. 1, p. 47–54, 1985.

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

DANNEMANNA, N.; HART, J. R.; UENO, L. et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-specific AKT1 is oncogenic. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 1, p. 239–244, 2010.

DAVEY, R. J.; WESTHUIZEN, A. VAN DER; BOWDEN, N. A. Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 242–253, 2016.

DAVIES, M. A. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. **Cancer Journal**, v. 18, n. 2, p. 142–147, 2012.

DEBACQ-CHAINIAUX, Florence; ERUSALIMSKY, Jorge D; CAMPISI, Judith; TOUSSAINT, Olivier. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase

(SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nature Protocols**, v. 4, n. 12, 2009.

DEVY, L.; DRANSFIELD, D. T. New strategies for the next generation of matrix-metalloproteinase inhibitors: Selectively targeting membrane-anchored MMPs with therapeutic antibodies. **Biochemistry Research International**, v. 2011, 2011.

DIMRI, G. P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 20, p. 9363–9367, 1995.

DITZ, D. **Efeito antimetastático e mecanismos de ação de proteases do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis* (*Carica candamarcensis*)**. 2011. 109f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

DITZ, D. Jr. **Participação da proteinase CMS2MS3 na atividade antimetastática de fração do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*: efeitos sobre a adesão e morte celular**. 2015 (Tese de doutorado em Farmacologia e Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

DITZ, D.; FIGUEIREDO, C.; LEMOS, F. O. et al. Antiangiogenesis, Loss of Cell Adhesion and Apoptosis are Involved in the Antitumoral Activity of Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) in Murine Melanoma B16F1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 7027-7044, 2015.

D'MELLO, S. A. N.; FINLAY, G. J.; BAGULEY, BRUCE C. et al. Signaling pathways in melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1–18, 2016.

DUAN, X. S.; LU, J.; GE, Z. et al. Effects of T-cadherin expression on B16F10 melanoma cells. **Oncology Letters**, v. 5, n. 4, p. 1205–1210, 2013.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Rev Cancer**, v. 2, p. 163-175, 2002.

FARMA, J. M.; KULKARNI, N.; HSU, C. Surgical management of primary and recurrent melanoma. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 239–247, 2015.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, n. 118, p. 148–149, 1973.

FIDLER, I. J. Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in vivo. **Cancer Research**, v. 35, p. 218-224, 1975.

FIDLER, I. J. Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. **Cancer research**, v. 38, p. 2651–2660, 1978.

FLAHERTY, K. T.; INFANTE, J. R.; DAUD, A. et al. Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 18, p. 1694–1703, 2012.

FUSE, N. et al. Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 219, n. 3, p. 702–707, 1996.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M; STAP, JAN. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline e Update 2016. **European Journal of Cancer**, v.63, p. 201-217, 2016.

GARRAWAY, L. A.; WIDLUND, H. R.; RUBIN, M. A. et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 117–122, 2005.

GARNER, E.; RAJ, K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. **Cell Cycle**, v. 7, n. 3, p. 277–282, 2008.

GAUTAM, A et al. Growth inhibition of established B16-F10 lung metastases by sequential aerosol delivery of p53 gene and 9-nitrocamptothecin. **Gene therapy**. v. 9, n.5, p. 353-357, 2002.

GEHLEN, K. R.; HENDRIX, M. J. C. In vitro assay demonstrates similar invasion profiles for B16F1 and B16F10 murine melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 30, n. 2, p. 207–212, 1986.

GERARD, G. Anticancer treatment and bromelain. **Agressologie**, v. 4, p. 261-274,1972.

GILLBRO, J. M.; OLSSON, M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - Existing and new approaches. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 3, p. 210–221, 2011.

GIULIANO, S. et al. Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. **Cancer Research**, v.70, n.9, p. 3813-3822, 2010.

GIULIANO, Sandy; OHANNA, Mickae; BALLOTTI, Robert et al. Advances in melanoma senescence and potential clinical application. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v.24, p. 295-308, 2011.

GOMES M. T.; TURCHETTI, A. P.; LOPES, M. T.; SALAS, C. E. et al. Stimulation of fibroblast proliferation by the plant cysteine protease CMS2MS2 is independent of its proteolytic activity and requires ERK activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 390, n. 12, p. 1285-1291, 2009.

GUIMARÃES-FERREIRA, Carla A.; RODRIGUES, Elaine G.; MORTARA, Renato A. Antitumor Effects In Vitro and In Vivo and Mechanisms of Protection against Melanoma B16F10-Nex2 Cells By Fastuosain, a Cysteine Proteinase from Bromelia fastuosa. **Neoplasia**, v. 9, n. 9, p. 723-733, 2007.

GRAY-SCHOPFER, V. C. et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: A role for p16? **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 4, p. 496–505, 2006.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n.7130, p. 851-857, 2007.

GUO, H.; YANG, K.; DENG, F.; XING, Y. et al. Wnt3a inhibits proliferation but promotes melanogenesis of melan-a cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n.3, p. 636-642, 2012.

HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. The journal of investigative dermatology. **Symposium proceedings**, v. 10, n. 2, p. 153–163, 2005.

HALL, S.; Rudrawar, S.; Zunk, M. et al. Protection against Radiotherapy-Induced Toxicity. **Antioxidants**, v. 5, n. 3, p. 22, 2016.

HARTMAN, M. L.; CZYZ, M. MITF in melanoma: Mechanisms behind its expression and activity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 7, p. 1249–1260, 2015.

HEPNER, A.; SALGUES, A.; ANJOS, C. A. et al. Treatment of advanced melanoma - A changing landscape. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 63(9): 814–823, 2017.

HOMET, B.; RIBAS, A. New drug targets in metastatic melanoma. **The Journal of Pathology**, v. 232, n. 2, p. 134–141, 2014.

HSIAO, J. J.; FISHER, D. E. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 563, n.1, p. 28–34, 2014.

HSU, M.; MEIER, F. E.; NESBIT, M., et al. E-Cadherin Expression in Melanoma Cells Restores Keratinocyte-Mediated Growth Control and Down-Regulates Expression of Invasion-Related Adhesion Receptors. **American Journal of Pathology**. v. 156, n. 5, p. 1515–1525, 2000.

HU, X.; BEETON, C. Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. **Journal of Visualized Experiments**, v. 8, n. 45, p. 2445-2448, 2010.

HUNG C. F.; CHIANG H. S.; LO H. M. et al. E-cadherin and its downstream catenins are proteolytically cleaved in human HaCaT keratinocytes exposed to UVB. **Experimental Dermatology**, v.15, n. 4, p. 315-21, 2006.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 23 mai. 2018.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Tratamento do câncer. Radioterapia**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>> Acesso em: 25/06/18.

INGRAFFEA, A. Melanoma. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 33–42, 2013.

ITO, S.; NAKANISHI, Y.; VALENZUELA, R.K. et al. Usefulness of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin in various tissue samples: Application to chemical analysis of human hair melanins. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 24, n. 4, p. 605–613, 2011.

JACOBS, K.; FEYS, L.; VANHOECK, B. et al. P-cadherin expression reduces melanoma growth, invasion, and responsiveness to growth factors in nude mice. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 3, p. 207–216, 2011.

JIANG, W. G.; SANDERS, A.J.; KATOH, M. et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. **Seminars in Cancer Biology**, 35: S244–S275, 2015.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KESSENBRÖCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.

KIM, D.; KIM, S.; KOH, H. et al. Akt / PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. **FASEB Journal**, v. 15, n. 11, p. 1953–1962, 2001.

KIM, S. H.; Kim, Y.; Kim, M. et al. Comparative proteomic analysis of mouse melanoma cell line B16, a metastatic descendant B16F10, and B16 overexpressing the metastasis-associated tyrosine phosphatase PRL-3. **Oncology Research**, v. 17, n. 11–12, p. 601–12, 2009.

KIM, J. E. et al. Comparison of growth factor signalling pathway utilisation in cultured normal melanocytes and melanoma cell lines. **BMC Câncer**. v.12, n. 1, p.141-151, 2012.

KONDO, T.; HEARING, V. J. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. **Expert Review of Dermatology**, 1; 6(1): 97–108, 2011.

KOVACS, D. FLORI, E.; MARESCA, V. et al. The eumelanin intermediate 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid is a messenger in the cross-talk among epidermal cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 4, p. 1196–1205, 2012.

KOVACS, D.; MIGLIANO, E.; MUSCARDIN, L. et al. The role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in melanoma epithelial-to-mesenchymal-like switching: evidences from patients-derived cell lines. **Oncotarget**, v. 7, n. 28, p. 43295–43314, 2016.

KUMAR, B. et al. p38 Mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 832–841, 2010.

KUPHAL, S.; MARTYN, A. C.; PEDLEY, J. et al. H-Cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 22, n. 3, p. 296–306, 2009.

KUPHAL, S.; BOSSERHOFF, A. K. E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 524, n. 1, p. 43–47, 2012.

LABELLE-CÔTÉ, M.; DUSSEAULT, J.; ISMAÏL, S. et al. Nck2 promotes human melanoma cell proliferation, migration and invasion in vitro and primary melanoma-derived tumor growth in vivo. **BMC Cancer**, v. 11, p. 443, 2011.

LAI, X.; WICHERS, H.J.; SOLER-LOPEZ, M. et al. Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 Reveals a Binuclear Zinc Active Site Important for Melanogenesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 33, p. 9812–9815, 2017.

LAMBERT, E.; DASSÉ, E.; HAYE, B. et al. TIMPs as multifacial proteins. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, p. 187–198, 2004.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **National Review Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 178–196, 2014.

LANGLEY, R. R.; FIDLER, I. J. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 3, p. 297–321, 2007.

LARUE, L.; BEERMANN, F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. **Pigment Cell Research**, v. 20, n. 6, p. 485–497, 2007.

LAZOVA, R.; PAWELEK, J. M. Why do melanomas get so dark? **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 11, p. 934–938, 2009.

LECLERC, J.; BALLOTTI, R.; BERTOLOTTI, C. Pathways from senescence to melanoma: Focus on MITF sumoylation. **Oncogene**, v. 36, n. 48, p. 6659–6667, 2017.

LEHRAIKI, Abdelali; ABBE, Patricia; CEREZO, Michael et al. Inhibition of Melanogenesis by the Antidiabetic Metformin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, p. 2589-2597, 2014.

LEMOS, F. O.; VILLALBA, M. I. C.; TAGLIATI, C. A. et al. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity of a *Vasconcellea cundinamarcensis* proteinase fraction with pharmacological activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 1, p. 94–101, 2016.

LEMOS, F. O.; DITZ, D.; SANTOS, V.G. et al. Cysteine Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) inhibit melanoma metastasis and modulate expression of proteins related to proliferation, migration and differentiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n.10, p. 2846-2865, 2018.

LEON, J. **Botánica de Los Cultivos Tropicales**. San Jose: IICA, 445, 1987.

LEIPNER, J, SALLER, R. Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. **Drugs**, v. 59, n. 4, p. 769-780, 2000.

LI, W.; MELTON, D. W. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 31, p. 2412–2422, 2012.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843–850, 2007.

LIN, K.; BARITAKI, S.; MILITELLO, L. et al. The role of B-RAF mutations in melanoma and the induction of EMT via dysregulation of the NF- κ B/snail/RKIP/PTEN circuit. **Genes and Cancer**, v. 1, n. 5, p. 409–420, 2010.

LIANG, G.; DING, M.; LU, H. et al. Metformin upregulates E-cadherin and inhibits B16F10 cell motility, invasion and migration. **Oncology Letters**, v. 10, n. 3, p. 1527–1532, 2015.

LIMA, Luize G.; CHAMMAS, Roger; MONTEIRO, Robson Q. Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. **Cancer Letters**. v. 283, p. 168-175, 2009.

LIU, J.; FUKUNAGA-KALABIS, M.; LI, L. et al. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 563, p. 13–21, 2014.

LOBOS-GONZÁLEZ, L.; AGUILAR, L.; DIAZ, J. et al. E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n.4, p. 555–570, 2013.

LOBOS-GONZÁLEZ, L.; SILVA, V.; ARAYA, M. et al. Targeting antisense mitochondrial ncRNAs inhibits murine melanoma tumor growth and metastasis through reduction in survival and invasion factors. **Oncotarget**, v. 7, n. 36, 2016.

LUKE, J. J.; SCHWARTZ, G. K. Chemotherapy in the Management of Advanced Cutaneous Malignant Melanoma. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 290–297, 2013.

MATAMÁ, T.; GOMES, A. C.; CAVACO-PAULO, A. Hair coloration by gene regulation: fact or fiction? **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 707–711, 2015.

MCCAIN, J. The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. **Physical Therapy**, v. 38, n. 2, p. 96–108, 2013.

MCGARY, E. C.; LEV, D. C.; BAR-ELI, M. Cellular Adhesion Pathways and Metastatic Potential of Human Melanoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 1, n. 5, p. 459–465, 2002.

MEHNER, C.; HOCKLA, A.; MILLER, E. et al. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2736–2749, 2014.

MESCHER, M.; JEONG, P.; KNAPP, S. K. et al. The epidermal polarity protein Par3 is a non-cell autonomous suppressor of malignant melanoma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 2, p. 339–358, 2017.

MILLARD, T.; BEHRENDT, B.; LAUNAY, S. et al. Identification and characterisation of a novel human isoform of Arp2/3 complex subunit p16-ARC/ARPC5. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 54, n. 1, p. 81-90, 2003.

MITRA, D. et al. A UV-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the redhair-fairskin background. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 449–453, 2012.

MOLL, U. M.; PETRENKO, O. The MDM2-p53 interaction. **Molecular Cancer Research**, 1(14): 1001–8, 2003.

MÜLLER, A.; BARAT, S.; CHEN, X. et al. Comparative study of antitumor effects of bromelain and papain in human cholangiocarcinoma cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 5, p. 2025–2034, 2016.

MUMMERT, E.; MUMMERT, D. I.; ELLINGER, L. et al. Functional roles of hyaluronan in B16-F10 melanoma growth and experimental metastasis in mice. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 2, p. 295–300, 2003.

MURTAS, D.; MAXIA, C.; DIANA, A. et al. Role of epithelial–mesenchymal transition involved molecules in the progression of cutaneous melanoma. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 148, n. 6, p. 639–649, 2017.

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, Y. 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.

NALIWAIKO, K.; LUVIZON, A. C.; DONATTI, L.; Chammas, R. et al. Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC–ERK 1/2 pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v.173, p.122-128, 2008.

NARDELLA, C.; CLOHESSY, J. G.; ALIMONTI, A. et al. Pro-senescence therapy for cancer treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 7, p. 503–511, 2011.

NASTI, T. H.; TIMARES, L. Invited Review MC1R, Eumelanin and Pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. **Photochemistry and Photobiology**, v. 1, n.1, p.188–200, 2015.

NÜRNBERG, A.; KITZING, T.; GROSSE, R. Nucleating actin for invasion. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 3, p. 117–187, 2011.

OBENAUF, A. C.; MASSAGUÉ, J. Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis. **Trends in Cancer**, v. 1, n.1, p. 76–91, 2015.

O-CHAROENRAT, P.; WONGKAJORN SILP, A.; RHYS-EVANS, P. H. et al. Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head-and-neck squamous carcinoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 111, n. 2, p. 174–183, 2004.

OVERALL, C. M.; LÓPEZ-OTÍN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 9, p. 657–672, 2002.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a mouse model for human melanoma. **Current Protocols in Immunology**, Chapter 20:Unit 20.1, 2001.

PALUNCIC, J.; KOVACEVIC, Z.; JANSSON, P. J. et al. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 4, p. 770–784, 2016.

PARK, B. K.; ZENG, X.; GLAZER, R. I. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. **Cancer research**, v. 61, n. 20, p. 7647–53, 2001.

PARK, S.Y.; SONG, H.; SUNG, M. et al. Carnosic Acid Inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition in B16F10 Melanoma Cells: A Possible Mechanism for the Inhibition of Cell Migration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12698–12713, 2014.

PEARLMAN, R. L.; OCA, M. K. M.; PAL, H. C. Potential therapeutic targets of epithelial–mesenchymal transition in melanoma. **Cancer Letters**, v. 391, p. 125–140, 2017.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; JUNG, S.-H. Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009 - 2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 25, n. 7, p. 775–88, 2015.

PLATZ, A.; EGYHAZI, S., RINGBORG, U. et al. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. **Molecular Oncology**, v. 1, n. 4, p. 395–405, 2008.

POLETTE, M.; NAWROCKI-RABY, B.; GILLES, C. et al. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, n. 3, p. 179–186, 2004.

POSTE, G.; DOLL, J.; HART, I. R. et al. In vitro selection of Murine B16 Melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. **Cancer Research**, v. 40, n. 5, p. 1636–1644, 1980.

PUCCI-MINAFRA, I.; MINAFRA, S.; ROCCA, G. L. et al. Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis. **Matrix Biology**, v. 20, n. 7, p. 419–427, 2001.

QUAIL, D.; JOYCE, J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

RASTRELLI, M.; TROPEA, S.; ROSSI, C. R. et al. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. **In Vivo**, v. 28, n. 6, p. 1005-11, 2014.

RATHNAVELU, V.; ALITHEEN, N. B.; SOHILA, S. et al. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. **Biomedical Reports**. v.5, n.3, p.283–288, 2016.

RAYESS, H.; WANG, M. B.; SRITVATSAN, E. S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 8, p. 1715–1725, 2012.

REDONDO, P.; LLORET, P.; IDOATE, M.; INOGES, S. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 30, p. 541-545, 2005.

RICCA, T. I.; LIANG, G.; SUENAGA, A. P. et al. Metalloproteinase Expression Associated with Gene Demethylation Confers Anoikis Resistance in Early Phases of Melanocyte Malignant Transformation. **Translational Oncology**, v. 2, n. 4, p. 329–340, 2009.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v.1, n.3, p- 1458-1461, 2006.

ROOMI, M. W.; MONTERREY, J.C.; KALINOVSKY, T. et al. Inhibition of invasion and MMPs by a nutrient mixture in human cancer cell lines: a correlation study. **Experimental oncology**, v.32, n. 4, p. 243-8, 2010.

ROIDER, E. M.; FISHER, D. E. The impact of MITF on melanoma development: News from bench and bedside. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 1, p. 16–17, 2014.

ROSS, A. D. M.; COOK, M. G.; CHONG H. et al. Senescence evasion in melanoma progression: uncoupling of DNA-damage signaling from p53 activation and p21 expression. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, p. 226–235, 2012.

ROUZAUD, F.; KADEKAROB, A.E.; ABDEL-MALEKB, Z.A. et al. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. **Mutation Research**, v. 571, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 133–152, 2005.

SAIKI, I.; IIDA, J.; MURATA, J.; OGAWA, R. et al. Inhibition of the Metastasis of Murine Malignant Melanoma by Synthetic Polymeric Peptides Containing Core Sequences of Cell-adhesive Molecules. **Cancer Research**, 49(14): 3815–3822, 1989.

SALAS, C. E.; VILLALBA, M. I. C; MELLO, V. et al. Oral subchronic toxicity evaluation of a latex proteolytic fraction from *Carica candamarcensis*. **Toxicology Letters**, v. 196:S258, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDRU, A.; VOINEA, S.; PANAITESCU, E. et al. Survival rates of patients with malignant melanoma. **Journal of Medicine and Life**, v. 7, n. 4, p. 572–576, 2014.

SANLORENZO, M.; VUJIC, I.; POSCH, C. et al. Melanoma immunotherapy. **Cancer Biology and Therapy**, v. 15, n. 6, p. 665–674, 2014.

SARNA, M. et al. Cell elasticity is an important indicator of the metastatic phenotype of melanoma cells. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 11, p. 813–818, 2014.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Regulation of melanogenesis-controversies and new concepts. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 395–404, 2008.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

SHI, H.; YANG, Li-ping; WEI, Wei; SU, Xiao-qing et al. Systemically administered liposome-encapsulated Ad-PEDF potentiates the anti-cancer effects in mouse lung metastasis melanoma. **Journal of translational medicine**, v.11, p. 86-99, 2013.

SHTIVELMAN, E.; DAVIES, M. A.; HWU, P. et al. Pathways and therapeutic targets in melanoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 7, p. 1701–1752, 2014.

SILVA, C. A., MELLO, V. J., LOPES, M. T. P. et al. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Med**, v. 69, p. 926-932, 2003.

SIMON, A.; KOURIE, H. R.; KERGER, J. Is there still a role for cytotoxic chemotherapy after targeted therapy and immunotherapy in metastatic melanoma? A case report and literature review. **Chinese Journal of Cancer**, v. 36, n. 1, p. 1–5, 2017.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S. et al. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1155–1228, 2004.

SLOMINSKI, A.; ZBYTEK, B.; SLOMINSKI, R. Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1470–1477, 2009.

SOLANO, F. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1–28, 2014.

SOLIS, G. P.; SCHROCK, Y.; HÜLSBUSCH N. Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. **Molecular Biology of the Cell**. v.23, n. 10, p. 1812–1825, 2012.

SOSMAN, J. A.; KIM, K. B.; SCHUCHTER, L. et al. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 8, p. 707–714, 2012.

TANG, H.; LI, A.; BI, J. et al. Loss of scar/WAVE complex promotes N-WASP- and FAK-dependent invasion. **Current Biology**, v. 23, n. 2, p. 107–117, 2013.

TEIXEIRA, R. D.; RIBEIRO, H. A. L.; GOMES, M. T. R. et al. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 956-961, 2008.

TESTA, U.; CASTELLI, G.; PELOSI, E. Melanoma: Genetic abnormalities, tumor progression, clonal evolution and tumor initiating cells. **Medical Sciences**, v. 5, n. 4, pii: E28, 2017.

TOLLESON, W. H. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, v. 23, n. 2, p. 105–161, 2005.

TSATMALI, M.; ANCANS, J.; THODY, A. J. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 50, n. 2, p. 125–133, 2002.

UZDENSKY, A.; DEMYANENKO, S.; BIBOV, M. Signal Transduction in Human Cutaneous Melanoma and Target Drugs. *Current Cancer Drug Targets*, v. 13, n. 8, p. 843–866, 2013.

VERNELL, R.; HELIN, K.; MÜLLER, H. Identification of Target Genes of the p16INK4A-pRB-E2F Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 46, p. 46124–46137, 2003.

VIANA, C. T. R. **Avaliação da atividade antitumoral e imunomodulatória de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* Hook 1835 em modelo de carcinoma de Ehrlich.** 2010. 104 f. (Dissertação de mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

VREDEVELD, L. C.W.; POSSIK, P. A.; SMIT, M. A. et al. Abrogation of BRAF^{V600E}-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes & Development*, v. 26, p. 1055–1069, 2012.

WALRAEVENS, V.; VANDERMEERS-PIRET, M. C.; VANDERMEERS, A. et al. Isolation and primary structure of the CCl papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* hook. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 380, n. 4, p. 485-488, 1999.

WAGLE, N.; EMERY, C.; BERGER, M. F. et al. Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 22, p. 3085 – 3096, 2011.

WANG, Y.; ZHOU, B. P. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chinese Journal of Cancer*, v. 30, n. 9, p. 603-11, 2011.

WANG, Caixia; ZHANG, Bo; CHEN, Na. Alteronol Induces Differentiation of Melanoma B16-F0 Cells. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, v.10, p.116-127, 2015.

WEBB, A. H. et al. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma. *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2017.

WELLBROCK, C.; AROZARENA, I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 28, n. 4, p. 390–406, 2015.

WELS, C.; JOSHI, S.; KOEFINGER, P. et al. Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the emt like phenotype in melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 9, p. 1877–1885, 2011.

WIDLUND, H. R.; FISHER, D. E. Microphthalmia-associated transcription factor: A critical regulator of pigment cell development and survival. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3035–3041, 2003.

WU, S.; SINGH, R. K. Resistance to Chemotherapy and Molecularly Targeted Therapies: Rationale for Combination Therapy in Malignant Melanoma. **Current Molecular Medicine**, v. 11, n. 7, p. 553–563, 2011.

YAJIMA, I.; KUMASAKA, M. Y.; THANG, N. D et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma progression and therapy. **Dermatology Research and Practice**, v. 2012, n. 1, p. 10–14, 2012.

YAMAGUCHI, Y.; BRENNER, M.; HEARING, V. J. The regulation of skin pigmentation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 38, p. 27557–27561, 2007.

YAMAGUCHIA, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1773, n. 5, p. 642–652, 2007.

YAO, J. et al. Multiple signaling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin- β 1 in human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 20, n. 56, p. 8066–8074, 2001.

YECIES, J. L.; MANNING, B. D. MTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, n. 3, p. 221–228, 2011.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1–2, p. 15–33, 2009.

YOSEF, R.; PILPEL N.; PAPISMADOV, N. et al. p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 15, p. 2280–2295, 2017.

ZHANG, X. T.; MENG, J.; WANG, Z. Y. A switch role of Src in the biphasic EGF signaling of ER-negative breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–8, 2012.

Zhang, L.; TAO, L.; SHI, T. et al. Paeonol inhibits B16F10 melanoma metastasis in vitro and in vivo via disrupting proinflammatory cytokines-mediated NF- κ B and STAT3 pathways. **IUBMB Life**, v. 67, n. 10, p. 778-88, 2015.

ZHAO, K.; WEI, Libin; HUI, Hui et al. Wogonin suppresses melanoma cell B16-F10 invasion and migration by inhibiting ras-mediated pathways. **Plos One**. v. 9, n. 9, p.1-12, 2014.

ZIJL, F. V.; KRUPITZA, G.; MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. **Mutation Research**, v. 728, n. 1–2, p. 23–34, 2011.

ZUCKER, S.; HYMOWITZ, M.; ROLLO, E. E. et al. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 6, p. 1921–1928, 2001.

APÊNDICE A - Obtenção das proteases do látex de *V. cundinamarcensis*

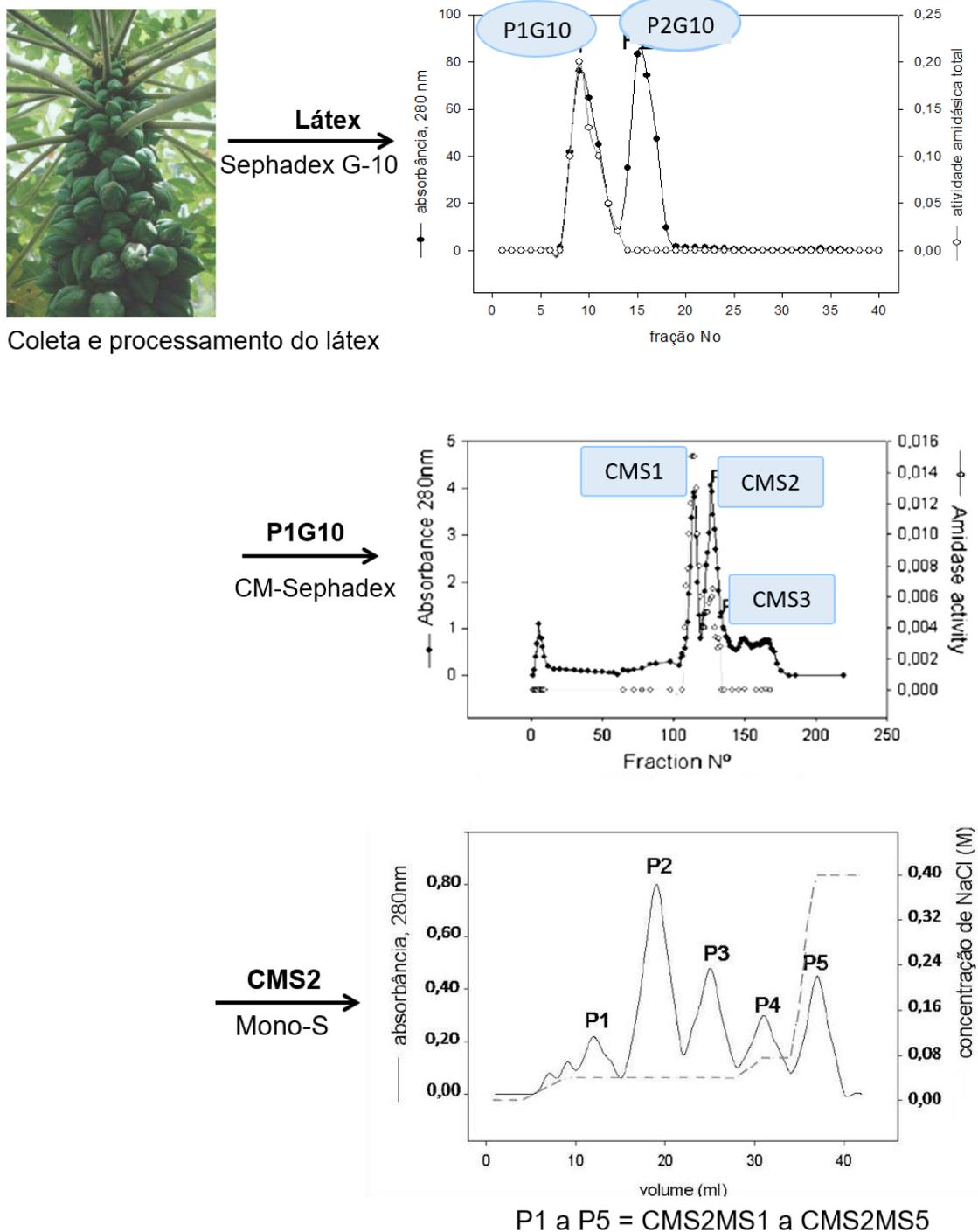


Figura 1: Purificação das proteases do látex de *V. cundinamarcensis*. Após o processamento do látex (item 4.2.1.2) o mesmo é aplicado em coluna contendo resina Sephadex G10, obtendo-se as frações P1 e P2G10. Em um segundo passo cromatográfico, a fração P1G10 é aplicada em coluna CM-Sephadex, obtendo-se três picos principais (CMS1-CMS3). Ao submeter CMS2 à purificação em coluna Mono-S Sepharose, obtêm-se cinco picos denominados como CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5.

APÊNDICE B – Dados sobre a realização da PCR

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas PCRs para amplificação dos seguimentos genômicos específicos para Tirosinase, TYRP-1, TYRP-2 e GAPDH.

Primer	Óligo senso	Óligo antisense
Tirosinase	GGCCAGCTTTCAGGCAGAGGT	TGGTGCTTCATGGGCAAATC
TYRP-1	GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC	AAGACGCTGCACTGCTGGTCT
TYRP-2	ACCCATTGGTCACAACCGAA	AGAGCAAGACGAAAGCTCCC
GAPDH	ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA	CGCCCAAATCCGTTACACCGA

Tabela 2 – Condições térmicas para a realização da PCR para os genes Tirosinase, TYRP-1, TYRP-2 e GAPDH.

	Tirosinase	TYRP-1	TYRP-2	GAPDH
Desnaturação Prévia	94° - 5 min	94° - 5 min	94° - 5 min	94° - 5 min
Desnaturação	94° - 30 seg	94° - 30 seg	94° - 30 seg	94° - 30 seg
Anelamento	56,5° - 1min e 30 seg	53,5° - 1min e 30 seg	54° - 1min e 30 seg	66,3° - 1min e 30 seg
Extensão	72° - 30 seg	72° - 30 seg	72° - 30 seg	72° - 30 seg
Número de ciclos	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos
Extensão final	72° - 5 min	72° - 5 min	72° - 5 min	72° - 5 min

APÊNDICE C - Diluições dos anticorpos utilizados no Wertern Blotting

Tabela 3 – Diluições dos anticorpos primários e secundários

Anticorpo/Fabricante	Diluição
Anti-p-AKT/ Cell Signaling: #4060	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-AKT/ Cell Signaling: #4691	1:2000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-pERK 1/2/ Cell Signaling: #43705	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-ERK 1/2/ Cell Signaling: #91025	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-pp38/ Cell Signaling: #9216	1:2000 em leite desnatado 5%/ TTBS
Anti-p38/Cell Signaling: #8690	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-pJNK/Cell Signaling: #9251	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-JNK/Cell Signaling: #9252	1:2000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-MITF/Santa Cruz Biotechnology: sc-56725	1:100 em BSA 5%/ TTBS
Anti-p16/Santa Cruz Biotechnology: sc-166760	1:100 em BSA 5%/ TTBS
Anti-p21/Abcam: ab7960	1:200 em BSA 5%/ TTBS
Anti-p53/Abcam: ab131442	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-E-caderina/Cell Signaling: #3195	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-N-caderina/Cell Signaling: #4061	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-GAPDH/Cell Signaling: #2118	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti- β -tubulina/Santa Cruz Biotechnology: sc-101527	1:1000 em BSA 5%/ TTBS
Anti-rabbit HRP-conjugado/Sigma: RABHRP1	1:10.000 em TTBS
Anti-mouse HRP-conjugado/Sigma: RABHRP2	1:10.000 em TTBS

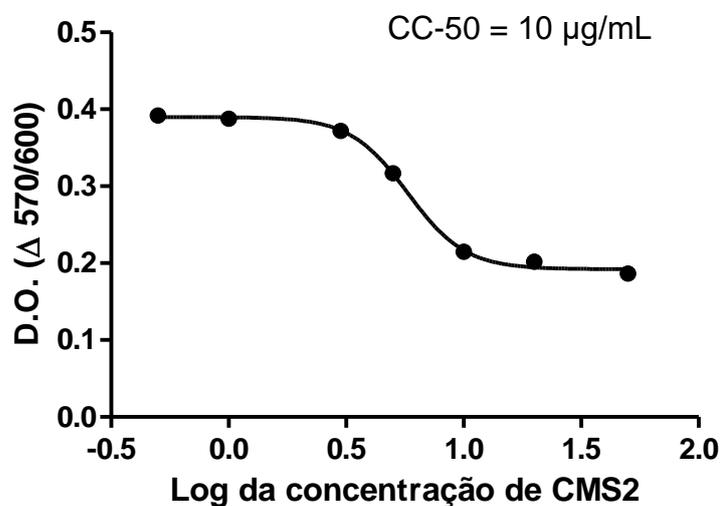
APÊNDICE D - Concentração citotóxica de CMS2

Figura 1: Concentração citotóxica para 50% da população celular (CC-50) de CMS2 sobre B16F10. Células B16F10 foram semeadas em placas de 96 cavidades (1×10^3 células/poço) e após adesão foram expostas à CMS2 (0,5-50µg/mL) ou controle (RPMI 1640 a 5% SFB) por 72 h. A viabilidade celular foi avaliada, pela metabolização do sal de Resazurina e leitura espectrofotométrica a 570 e 600 nm. A CC-50 foi calculada pela regressão não-linear usando o *software Graph Prism 5.0*, sendo de 10 µg/mL.

APÊNDICE E – Viabilidade de células B16F10 na presença da subfração CMS2

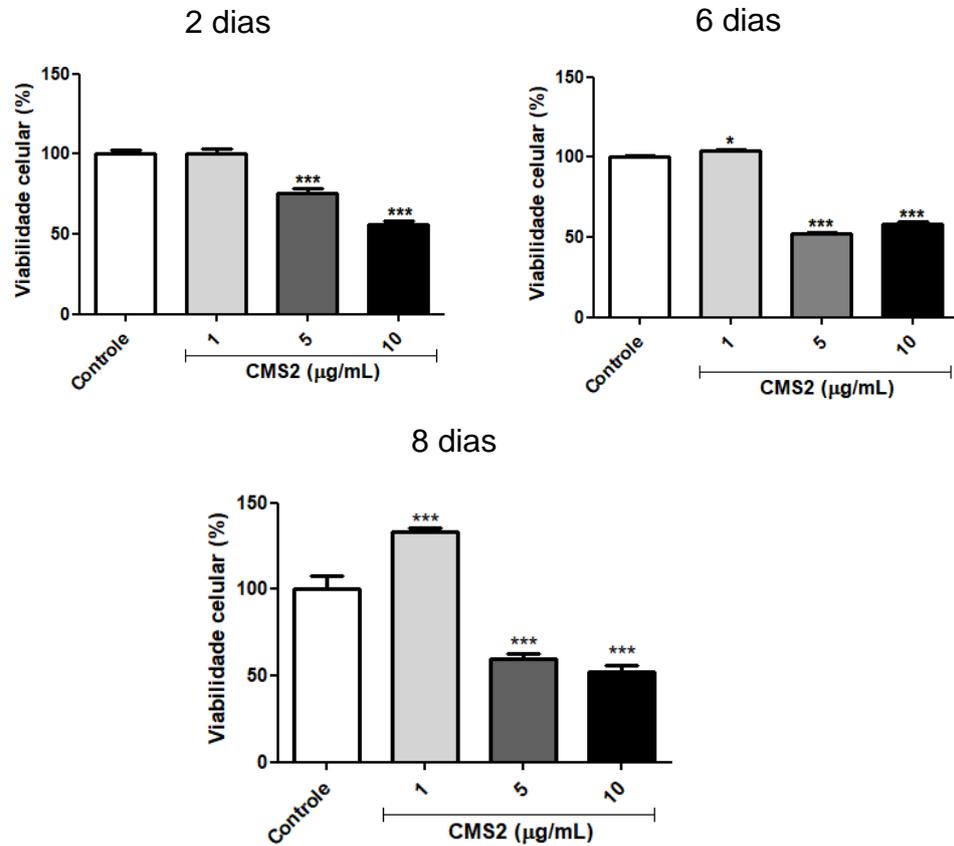


Figura 1: Viabilidade de células B16F10 expostas à CMS2. As células B16F10 foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços (1x10³ células/poço) e expostas à CMS2 (1-10 µg/mL), durante 2-8 dias. Após cada período de exposição, a viabilidade celular foi avaliada, por meio da metabolização do sal de resazurina e leitura espectrofotométrica a 570 e 600 nm. Cada coluna representa a porcentagem média ± e.p.m de viabilidade celular em cada grupo. Resultados estatisticamente diferentes em relação ao controle - * p < 0,05; ***p < 0,0001 (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

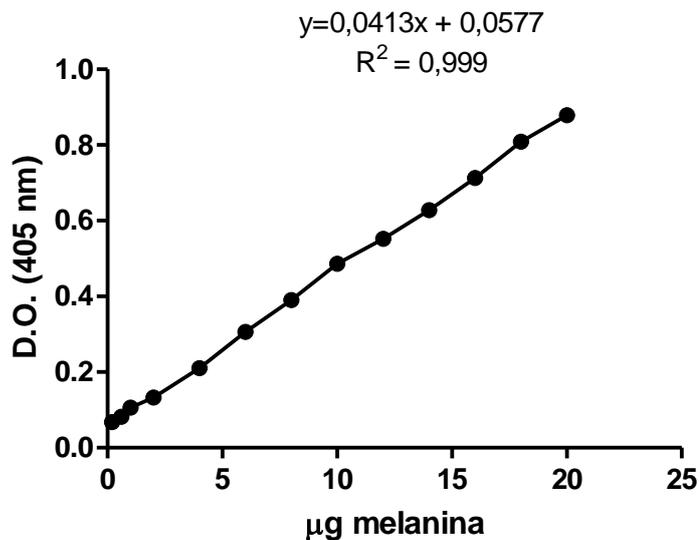
APÊNDICE F – Curva-padrão de melanina sintética

Figura 1: Curva-padrão de concentração de melanina. Foi realizada uma curva-padrão de melanina sintética (Sigma -M8631) com quantidades variando entre 0,2–20 μg e realizada leitura espectrofotométrica a 405 nm. Desse modo, a curva foi utilizada para determinar o conteúdo de melanina em microgramas.

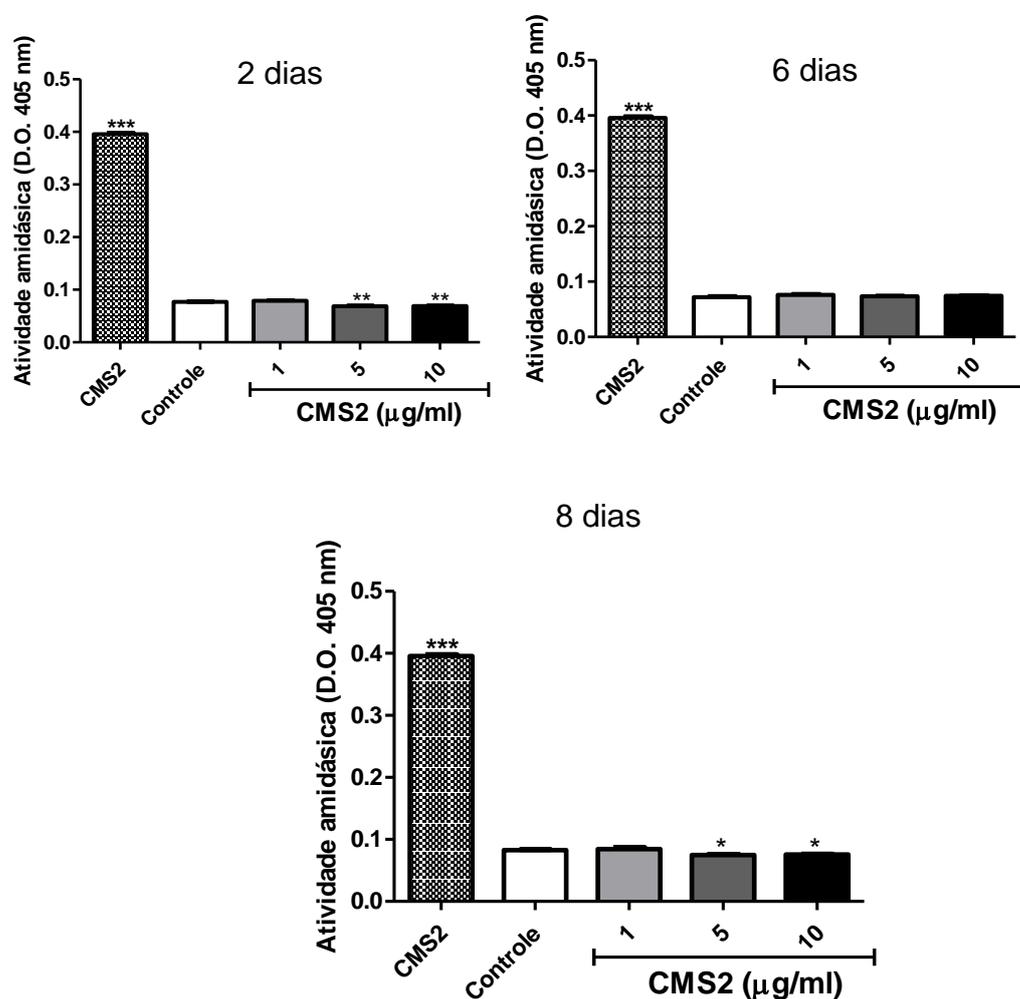
APÊNDICE G - Atividade amidásica nos sobrenadantes das células B16F10

Figura 1: Atividade amidásica nos sobrenadantes das células B16F10. Células B16F10 foram expostas à CMS2 (1 a 10 µg/mL) ou permaneceram sem tratamento (células controle) durante 2 a 8 dias (item 4.2.2.3). Após esse período, as células foram semeadas em placas de cultivo e, após adesão, os sobrenadantes foram recolhidos e submetidos a dosagem de proteínas, pelo método de Bradford (item 4.2.1.4). Posteriormente, 5 µg de proteínas totais foram incubadas para a determinação da atividade amidásica (item 4.2.1.5). Como controle positivo foi utilizado 5 µg da fração CMS2.

APÊNDICE H - Expressão de E-caderina nas células HACAT e A431

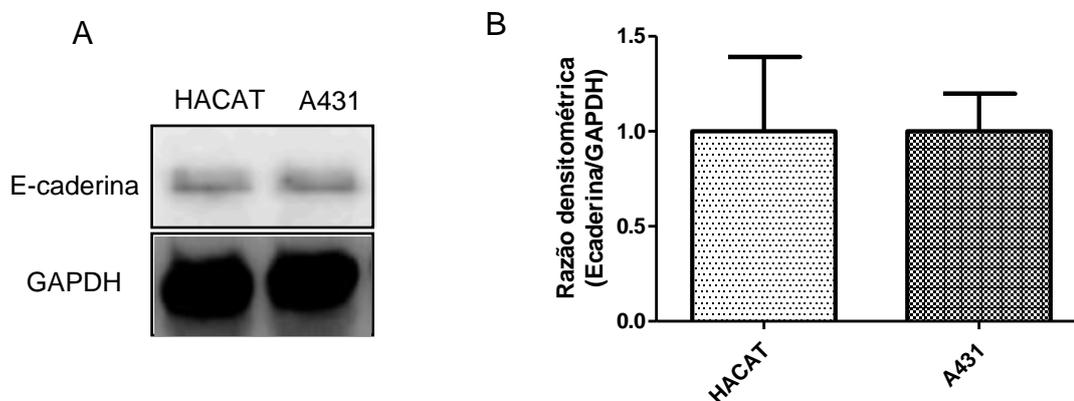


Figura 1: Expressão de E-caderina nas linhagens celulares HACAT e A431. Células HACAT (linhagem celular de queratinócitos humanos) e A431 (linhagem celular de carcinoma epidermóide) foram cultivadas em frascos de cultivo em estufa de cultura a 37°C com atmosfera úmida e 5% (v/v) de CO₂. Após atingirem a confluência, as células foram desprendidas dos frascos com auxílio da solução de ATV (solução de tripsina 0,2% e versene 0,02%). Após inativação da tripsina com meio de cultivo as células foram lavadas com PBS pH 7,4 e submetidas a lise celular (item 4.2.2.8). O extrato obtido foi quantificado em relação ao conteúdo de proteínas e utilizado (70 µg) para realização da eletroforese em SDS-PAGE e, posteriormente, desenvolvido o Western Blotting, conforme o item 4.2.2.8. As quantificações densitométricas para a proteína E-caderina e para o GAPDH, foram realizadas com auxílio do programa ImageJ. A- Imagens representativas da expressão de E-caderina e do GAPDH nas células HACAT e A431. B- Cada coluna representa a média ± e.p.m da expressão de E-caderina, normalizada pela expressão do GAPDH em cada grupo.

ANEXO A - Protocolo de aprovação para o uso experimental de animais**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Senhor(a) Professor(a) Miriam Teresa Paz Lopes,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA DE FRACOES DO LATEX DE VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS SOBRE MODELO MURINO DE MELANOMA B16F10, submetido a esta comissão pelo protocolo 229 / 2013, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 17/08/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 18/08/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br