

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Terapias alvo: estratégias para tratamento e reversão de resistência a inibidores de BRAF em melanoma portador de mutação BRAF V600E

Stéphanie Caruccio Björknesjö

STÉPHANIE CARUCCIO BJÖRKNESJÖ

Terapias alvo: estratégias para tratamento e reversão de resistência a inibidores de BRAF em melanoma portador de mutação BRAF V600E

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: PhD. Suzanne Egyházi.
Orientador Acadêmico: Prof. Dra. Fabiana Seixas.

Pelotas, 2012.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B626t Björknesjö, Stéphanie Caruccio

Terapias alvo: estratégias para tratamento e reversão de resistência a inibidores de BRAF em melanoma portador de mutação BRAFV600E / Stéphanie Caruccio Björknesjö. – 60f. : il. color. – Monografia (Conclusão de curso) Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2012. – Orientador Fabiana Kömmling Seixas ; co-orientador Suzanne Egyhazi Brage.

1.Biotecnologia. 2.Melanoma. 3.Mutação BRAF V600E. 4.Terapias alvo. I.Seixas, Fabiana Kömmling. II.Brage, Suzanne Egyhazi. III.Título.

CDD:616.994

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dra. Priscila Marques Moura de Leon, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dra. Fabiana Kömmling Seixas, Universidade Federal de Pelotas (orientadora)

Dedicatória

À minha mãe, minha estrela-guia, meu maior exemplo, meu grande amor.

Ao meu pai, meu confidente, meu melhor amigo. Quem me ensinou a correr atrás dos meus sonhos. Quem embarcou comigo nesta jornada.

Ao meu avô, meu querido cúmplice. Com quem partilhei os melhores momentos, as melhores lembranças.

A todos os acometidos pelo câncer. Que o meu esforço possa vir a servir de alguma forma à amenização de seus sofrimentos.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e a todos os professores da Biotecnologia, pelo empenho em estabelecer um curso de grande qualidade e pela dedicação em capacitar seus estudantes da melhor forma possível.

Ao CNPq e à FAPERGS, pelas bolsas e oportunidades de estudos recebidas.

À professora Fabiana e ao professor Tiago, pela possibilidade de estágio, por todos os ensinamentos de vida, pela motivação constante.

À Priscila, pela paciência, pelo carinho, pelas primeiras instruções; aos colegas do GPO, pelos ótimos momentos vividos; ao Ruan, pelo companheirismo inigualável.

Ao professor João Carlos Deschamps e à Fernanda Svedman, pela boa vontade, pelo bom coração. Por me abrirem as portas à pesquisa internacional.

Ao grupo Johan Hansson e ao Instituto Karolinska, pelo acolhimento e pela oportunidade de realização de meu estágio final.

À minha orientadora de estágio, Suzanne Egyházi, e ao meu instrutor de bancada, Alireza Azimi, pela extrema competência com a pesquisa acadêmica e por toda disponibilidade e atenção direcionadas a mim.

Ao amigo Luís Ricardo, pelos esforços permanentes, pela amizade sincera. A quem deixo o meu carinho e a minha eterna consideração.

À Daniela Villas Boas, pelos estímulos recebidos à conquista da minha independência e pelas ótimas aulas de inglês.

À minha tia Rita, por todo o amor sem medidas. Poucas palavras resumem tudo.

À Vera e ao César, pelo amparo nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus avós Ésio, Tana, Cecília, Zola e ao meu irmão Roberth, por me amarem imensamente e nunca medirem esforços para me confortar.

À minha amiga Luana Amaral, pela amizade verdadeira e eterna; por toda a fidelidade. Por ter me introduzido à biotecnologia.

Aos meus pais, Sandra e Cleve, pelo amor infinito, por toda a dedicação incondicional e pela preocupação severa com a minha educação.

À Maria, Nossa Senhora, a quem eu confiei e confio a minha vida. Agradeço por sempre ter passado à minha frente. Por nunca ter me abandonado.

Deixo o meu agradecimento final a Deus, quem permitiu que eu chegasse até aqui. Que nunca me falte motivação!

Muito Obrigada!

*"Se as coisas são inatingíveis... ora! Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora a presença distante das estrelas!"*

(Mario Quintana)

Resumo

BJÖRKNESJÖ, Stéphanie Caruccio. **Terapias alvo: estratégias para tratamento e reversão de resistência a inibidores de BRAF em melanoma portador de mutação BRAF V600E** 2012. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A carta de aceite recebida pelo grupo de pesquisas em melanoma Johan Hansson, e a contemplação da bolsa de graduação sanduíche, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), permitiram a realização de meu estágio final no Centro de Câncer do Instituto Karolinska, em Solna – Estocolmo, Suécia. Assim, a monografia estabelecida neste período objetivou estudar novas estratégias específicas capazes de inibir vias de sinalizações associadas à malignidade e à resistência do câncer melanoma aos inibidores da proteína BRAF mutada. Deste modo, foram testados os fármacos crizotinibe (inibidor de MET), GSK1120212 (inibidor de MEK) e erlotinibe (inibidor de EGFR) sobre células de melanoma parental (A375) e sobre células com resistência induzida por inibidores de BRAF (A375R, R3 e R4). O fármaco crizotinibe, mostrou-se bastante promissor ao ser capaz de estabelecer inibições celulares superiores a 50% em todas as linhagens de melanoma analisadas, através de concentrações semelhantes. Ações proeminentes de GSK1120212 foram apresentadas nas concentrações posteriores a 2nM em A375 e 30µM em A375R4, por promoverem uma redução de mais de metade da proliferação celular. A expressão de proteínas também identificou um acentuado declínio quantitativo na via das MAP quinases, em ambas as concentrações de GSK1120212 testadas. Entretanto, o fármaco erlotinibe não foi eficiente à redução proliferativa de 50% em nenhuma das células, fato este possivelmente correlacionado com supostos índices de expressão nuclear de EGFR propostos. Desta forma, após seis meses de intercâmbio e estudos intensos, concluo que a realização deste trabalho foi de extrema valia ao meu amadurecimento pessoal e profissional.

Palavras-chave: Biotecnologia. Melanoma. Mutação BRAFV600E. Terapias alvo.

Abstract

BJÖRKNESJÖ, Stéphanie Caruccio. **Targeted therapies: strategies for treatment and reversal of resistance to BRAF inhibitors in melanoma with BRAF V600E mutation**. 2012. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The acceptance letter from Johan Hansson's research group in melanoma and also the contemplation of an undergraduate exchange scholarship from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), have led me to perform my final stage at Cancer Center of Karolinska Institutet in Solna - Stockholm, Sweden. Thus, the monography performed in this period aimed to study new strategies capable of inhibiting specific signaling pathways associated with cancer malignancy and melanoma resistance to BRAF inhibitors of mutated protein. Therefore, the drugs crizotinib (MET inhibitor), GSK1120212 (MEK inhibitor) and erlotinib (EGFR inhibitor) were tested on parental melanoma cells (A375) and on cells which resistance had been induced previously by BRAF inhibitors (A375R, R3, and R4). The drug crizotinib showed to be promising after had been able to establish inhibition of proliferation in more than 50% of all melanoma cell lines analysed, at similar concentrations. Decreased prominent actions in more than half of viability were established by GSK1120212 at superior concentrations of 2nM on A375 and 30µM on A375R4. Protein expressions also identified a quantitative decline in the MAP kinases pathway in both concentrations of GSK1120212 tested. However, the drug erlotinib was not effective at reducing more than 50% of proliferation in any cell line, which was probably correlated with the nuclear expression levels of EGFR proposed. Thus, after six months of exchange and intense studies, I conclude that this work was extremely valuable to my professional and personal growth.

Keywords: Biotechnology. Melanoma. BRAFV600E mutation. Targeted therapies.

Lista de Figuras

Figura 1: Cascata de sinalização RAS-ERK.....	26
Figura 2: Sensibilidade celular ao fármaco GSK1120212.....	39
Figura 3: Sensibilidade celular ao fármaco crizotinibe.....	40
Figura 4: Sensibilidade celular ao fármaco erlotinibe.	41
Figura 5: Painel de análise proteica das células tratadas..... por 24 horas com 2nM de GSK1120212.	42
Figura 6: Painel de análise proteica das células resistentes..... tratadas por 24 horas com 30µM de GSK1120212.	44
Figura 7: Análise proteica da forma fosforilada de ERK em todas..... as linhagens tratadas com 4uM de crizotinibe por 24 horas.	44
Figura 8: Análise proteica de todas as linhagens tratadas..... com 5uM de erlotinibe por 24 horas.	45
Figura 9: Imunocitoquímica para EGFR.....	46
Figura 10: Análise de apoptose por citometria de fluxo em A375 e R4.....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores de IC ₅₀ dos fármacos sobre as células.....	41
Tabela 2: Resultados das análises por citometria de fluxo.....	47

Lista de Abreviaturas e Siglas

α : Alfa.

© : Nome comercial.

® : Marca registrada.

% : Valor em porcentagem.

[] : Concentração.

μ L: Microlitro.

μ M: Micromolar.

nm: Nanômetros

nM: Nanomolar.

A375: Linhagem celular de melanoma parental.

A375R (R): Linhagem de melanoma resistente ao inibidor de BRAF PLX4720.

A375R3, A375R4 (R3, R4): Linhagens de melanoma resistentes ao inibidor de BRAF PLX4032 (vemurafenibe).

AMP cíclico: Monofosfato cíclico de adenosina.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

ATP: Trifosfato de adenosina.

BRAF: Serina / treonina-quinase B-Raf.

CCND1: Gene codificador à proteína Ciclina D1.

CDK4 / CDK6: Ciclina dependente de quinase 4 e 6, respectivamente.

c-Kit: Gene codificador ao receptor tirosina quinase tipo III.

CO₂: Dióxido de carbono.

CRAF: Isoforma da proteína quinase RAF.

EARL: Sal presente em meio de cultura.

EGFR: Receptor de crescimento epidermal.

ERK: Quinase regulada por sinal extracelular e ativada pela proteína MEK.

GDP: Guanosina difosfato.

GTP: Guanosina trifosfato.

HGF: Fator de crescimento hepatocitário.

IC₅₀: Concentração máxima capaz de inibir metade da proliferação celular.

KDa: Quilodalton.

MEK: Quinase ativada por proteínas RAF.

MEM: Meio mínimo essencial.

MET: Receptor ao fator de crescimento hepatocitário.

mitf: Gene melanocítico específico.

NRAS: Oncogene viral RAS homólogo de neuroblastoma.

°C: Grau Celsius.

pERK: Forma fosforilada da proteína quinase ERK.

pMEK: Forma fosforilada da proteína quinase MEK.

pRb: Proteína de Retinoblastoma.

RAF: Serina / treonina quinase ativada pela proteína quinase RAS.

RAS: GTPase precursora da via das MAP quinases.

slug: Gene relacionado à Snail e à família de proteínas ligantes de DNA.

UV: Radiação ultravioleta.

V: Volts.

Via MAPK (MAP quinase): Via quinase ativada por proteína mitógeno.

x: Vezes.

SUMÁRIO

Resumo	08
Abstract	09
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	11
Lista de Abreviaturas e Siglas	12
1. <u>Introdução Geral</u>	16
2. <u>Revisão Bibliográfica</u>	17
2.1 Introdução Específica	17
2.2 Melanoma cutâneo	17
2.3 Estimativas da doença	17
2.3.1 No mundo.....	18
2.3.2 No Brasil.....	19
2.4 Fatores associados ao desenvolvimento de melanoma	20
2.4.1 Malignidade dos melanócitos.....	20
2.4.2 Vias de sinalização à malignidade.....	21
2.4.3 Cascata de sinalização MAP quinase (MAPK).....	22
2.4.4 Mutações em BRAF.....	24
2.4.5 Ciclina D1 e a via das MAP quinases.....	25
2.5 Terapias alvo para melanoma com mutação BRAF V600E	27
2.5.1 Inibidor de BRAF V600E – Vemurafenibe (PLX4032 / Zelboraf ©).....	27
2.6 Novas perspectivas de tratamentos	28
2.6.1 Inibidor de MEK – GSK1120212 (Trametinib©).....	29
2.6.2 Inibidor de MET – Crizotinibe (Xalkori©).....	30
2.6.3 Inibidor de EGFR – Erlotinibe (Tarceva©).....	31
3. <u>Objetivos do trabalho</u>	32
3.1 Objetivo geral	32

3.2 Objetivos específicos.....	32
4. <u>Metodologia</u>	33
4.1 Cultivo de células.....	33
4.2 Estabelecimento dos tratamentos.....	33
4.3 Viabilidade celular e análises estatísticas.....	34
4.4 Extração proteica, realização de SDS-Page e Western Blot.....	35
4.5 Ensaio de Imunocitoquímica.....	37
4.6 Citometria de fluxo.....	37
5. <u>Resultados</u>	39
5.1 Tratamentos singulares.....	39
5.2 Análises proteicas.....	42
5.3 Imunocitoquímica para EGFR.....	45
5.4 Citometria de fluxo.....	46
6. <u>Discussão</u>	48
7. <u>Conclusões e Perspectivas</u>	52
8. <u>Considerações Finais</u>	53
9. <u>Bibliografia</u>	54

1. Introdução Geral

Devido à carta de aceite recebida pelo grupo de pesquisas em melanoma Johan Hansson, e à contemplação da bolsa de graduação sanduíche, concebida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), tive a oportunidade de realizar o meu estágio final no Centro de Câncer do Instituto Karolinska, em Solna – Estocolmo, Suécia. Durante este período, tive aprendizados valiosos, bem como oportunidades de contato direto com os pesquisadores mais renomados do mundo na área de oncologia. Pude fazer parte, também, de eventos e grupos de estudos direcionados aos estudantes de PhD. Fato este que contribuiu muito à minha formação crítica científica e gerou bases à realização de minha monografia.

Nesse sentido, o projeto de pesquisa com o qual participei e realizei o meu trabalho de conclusão de curso, representou parte do programa CHEMORES. Este equivale a uma colaboração de pesquisa, financiada pela União Europeia, que tem como objetivo a melhora do tratamento do câncer através da obtenção de um maior conhecimento sobre os mecanismos de resistência à quimioterapia e às novas estratégias terapêuticas. Desta forma, a monografia apresentada neste trabalho visou identificar e avaliar a ação de novos fármacos comerciais, capazes de bloquear vias de sinalizações específicas, sobre a efetividade de tratamento em melanoma resistente aos fármacos inibidores da proteína BRAF mutada. Assim, para a realização de meu estudo final, fui treinada pelo grupo sueco em questão à realização de diversas técnicas laboratoriais essenciais relacionadas à análise de expressão gênica e proteica em cultivo de células neoplásicas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Introdução específica

O melanoma cutâneo corresponde a uma neoplasia de pele que apresenta alta capacidade de invasão tecidual e disseminação de metástases (MORENO *et al.*, 2012). Estudos genômicos levaram à identificação de uma alteração na serina/treonina quinase BRAF, nomeada de V600E, em mais de 50% dos casos de melanomas analisados (KUDCHADKAR *et al.*, 2012). Tal evento passou a ser utilizado como marcador de agressividade para a doença, visto que a devida mutação foi identificada por promover o deslocamento do equilíbrio proteico à forma ativa da proteína BRAF, gerando uma alta susceptibilidade de ativação da via das MAP quinases e um aumento da proliferação celular (WAN *et al.*, 2004).

Nesse contexto, vemurafenibe (Zelboraf®; Plexxikon/Roche©), um inibidor específico à mutação BRAF, foi aprovado para tratamento de melanoma metastático em agosto de 2011 nos Estados Unidos e em fevereiro de 2012 na União Européia. Fato este que ganhou grande destaque mundial ao serem relatadas efetivas taxas de regressão tumoral em pacientes com quadros avançados da doença (McARTHUR *et al.*, 2012a). Entretanto, relatos posteriores evidenciaram a existência de um efeito inesperado de resistência e de aparecimentos de carcinomas de células escamosas, como consequências colaterais do fármaco (KUDCHADKAR *et al.*, 2012).

O presente trabalho então visou aprimorar as pesquisas atuais ao promover tratamentos de novos inibidores comerciais sobre células de melanoma parental (A375), bem como sobre mais três linhagens resistentes. O mesmo estudo também estimou avaliar a ação dos fármacos crizotinibe, inibidor da proteína MET, e erlotinibe, inibidor de EGFR, até então não direcionados ao tratamento de melanoma, nas linhagens celulares citadas. Isso com o intuito de estabelecer novas estratégias terapêuticas eficientes à reversão de resistência e à inibição do efeito inesperado gerado pelos inibidores de BRAF.

2.2 Melanoma cutâneo

O melanoma cutâneo corresponde a uma neoplasia de pele cuja origem provém de alterações dos melanócitos, células responsáveis pela produção de pigmentos com ênfase à melanina (UONG *et al.*, 2010). Embora possua as menores taxas de diagnóstico entre os cânceres de pele, a doença lidera o pior prognóstico, graças à sua alta capacidade de invasão tecidual e disseminação de metástases (MORENO *et al.*, 2012). Este tipo de anormalidade equivale a uma das doenças malignas humanas mais agressivas (KO *et al.*, 2010), com altas taxas de mortalidade entre os acometidos em estado avançado (MORENO *et al.*, 2012).

Entretanto, ao ser detectada em estágios iniciais a devida disfunção apresenta altas taxas de cura (MORENO *et al.*, 2012), podendo ser eliminada com baixos índices de recorrência (UONG *et al.*, 2010). Porém, uma vez que os linfonodos são atingidos e o quadro de metástase estabelecido, a gravidade passa a se tornar elevada. Fato este relacionado à alta resistência que o melanoma cutâneo avançado apresenta à radioterapia e quimioterapia (UONG *et al.*, 2010).

2.3 Estimativas da doença

2.3.1 No mundo

O câncer de pele do tipo melanoma corresponde a 4% dos diagnósticos de câncer a nível mundial (SCHMERLING *et al.*, 2011). Entretanto, o mesmo é responsável por 75% das mortes relacionadas às neoplasias cutâneas (SCHMERLING *et al.*, 2011), com índices aumentados nos últimos 50 anos, principalmente em populações de pele clara (BULLIARD *et al.*, 2000; TRYGGVADÓTTIR *et al.*, 2010; ERDMANN *et al.*, 2013). As devidas observações foram ressaltadas em países como Estados Unidos, países do norte europeu e em países da Oceania, como Nova Zelândia e Austrália, sendo este último o líder mundial do maior número de casos (ERDMANN *et al.*, 2013).

Embora muito tenha sido alcançado com relação à sobrevida dos pacientes, as taxas de incidência da doença, principalmente em indivíduos de idade avançada, seguem a subir em diversos países da Europa (MACKIE *et al.*, 2007; GIBLIN & THOMAS, 2007). Isto, porém, contrasta às estatísticas positivas relacionadas à diminuição ou controle do número de casos de melanoma evidenciados nos Estados Unidos, na Austrália, na Escandinávia e no Reino Unido (ERDMANN *et al.*, 2013). A possível explicação está no fato de parte desses países, paralelamente relacionados com altos índices da doença, terem estabelecido atividades preventivas primárias e secundárias em seus sistemas públicos de saúde a fim de diminuir e controlar o número de acometidos, bem como o número de mortes (DE HAAS *et al.*, 2010).

2.3.2 No Brasil

De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de pele corresponde à neoplasia maligna mais frequente no Brasil, estando, portanto, relacionado a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Entretanto, o melanoma cutâneo corresponde a apenas 4% das neoplasias de pele evidenciadas, embora seja considerada a mais agressiva graças à sua capacidade metastática (http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma).

A estimativa para o ano de 2012 foi de cerca de 6.230 novos casos da doença no país, sendo a população masculina a maior acometida, com 3.170 indivíduos, quando comparado à feminina com 3.060 casos. Dados de 2009 revelaram que o número de mortes também se manteve mais elevado entre os homens. Dentre os 1.392 casos, 827 corresponderam a homens e 565 às mulheres (http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma).

As maiores taxas de câncer de pele estimadas em território brasileiro foram relacionadas à Região Sul do país (MORENO *et al.*, 2012). Hipóteses correlacionam esse fato às características fenotípicas da população e aos altos índices de radiação UV. A localização do estado no sul do país, equivalente às latitudes de países da

Oceania, previamente identificados com altos índices de melanoma, também fortalece a devida presunção (MORENO *et al.*, 2012).

2.4 Fatores associados ao desenvolvimento de melanoma

Diversas são as variáveis que podem influenciar ao desenvolvimento de melanoma. Dentre as mesmas, destaca-se a ancestralidade europeia, fenótipos louro e ruivo, pele e olhos claros, presença de sardas e / ou nevos melanocíticos e história familiar de melanoma maligno (VEIERØD *et al.*, 2003; SCHMERLING *et al.*, 2011). Outro fator bastante evidenciado corresponde à frequência de exposição ao sol (BAKOS *et al.*, 2002) e ao histórico de queimaduras solares ao longo da vida (VEIERØD *et al.*, 2003). Entretanto, uma série de relatos sobre o aparecimento de melanoma em áreas do corpo expostas e não expostas à luz UV e a correlação do variado número de casos vinculados à idade (WHITEMAN *et al.*, 2007), fortalecem a teoria de que o melanoma se desenvolva por intermédio de diferentes cascatas de sinalização com influência genética (KO *et al.*, 2010).

Desta forma, uma maior exposição à luz UV é requerida ao desenvolvimento de melanoma em indivíduos que apresentem baixa susceptibilidade à transformação maligna das células melanocíticas, sendo as áreas corporais de maior exposição solar as mais acometidas (WHITEMAN *et al.*, 2003; KO *et al.*, 2010). Por outro lado, pessoas com tendência genética à proliferação dos melanócitos necessitam de baixa exposição à luz ultravioleta para o desencadeamento da doença, sendo esta muito evidenciada em áreas do corpo com baixa exposição solar (WHITEMAN *et al.*, 2003; KO *et al.*, 2010).

2.4.1 Malignidade dos melanócitos

O clássico modelo estabelecido à progressão de melanoma acentua o processo de malignização dos melanócitos à formação de nevos, ao

desenvolvimento de displasia com posterior ocorrência de hiperplasia, incursão tecidual, liberação celular e estabelecimento de metástases pelo corpo (MILLER & MIHM, 2006). Entretanto, esse linear estabelecido nem sempre é seguido visto que muitos dos casos de melanoma nem sempre necessitam promover a formação de nevos para estabelecer a doença (BEVONA *et al.*, 2003).

Assim, estudos afirmam que a neoplasia maligna em questão pode perfeitamente se desenvolver a partir de regiões cutâneas aparentemente normais (BEVONA *et al.*, 2003; KO *et al.*, 2010). Desta forma, rotas alternativas que não se baseiam na utilização do nevo como intermediário vêm sendo propostas, evidenciando ao fato de que a malignidade possa ser derivada de melanócitos maduros dediferenciados ou de células-tronco melanocíticas transformadas (RASHEED *et al.*, 2005; KO *et al.*, 2010).

A transformação maligna das células melanocíticas implica, muitas vezes, na ativação dos mesmos genes relacionados ao processo de embriogênese celular dos melanócitos. Assim, genes como *mitf* (gene melanocítico específico), *c-Kit* (gene codificador do receptor tirosina quinase tipo III) e *slug* (gene relacionado à Snail e à família de proteínas ligantes de DNA), são identificados por sua importância ao desenvolvimento dos melanócitos, mas também pela contribuição ao estabelecimento de melanoma (UONG *et al.*, 2010).

2.4.2 Vias de sinalização à malignidade

A biologia melanocítica, através do hormônio estimulante α -melanocítico e peptídeos derivados de proopiomelanocortina, pode explicar de certa forma às altas frequências de mutação encontradas em melanoma. Assim, a ligação do hormônio estimulante α -melanocítico e de peptídeos derivados de proopiomelanocortina a receptores de melanocortina tipo I, é estabelecida em resposta à radiação UV. Uma vez promovida essa conexão, a célula passa a sinalizar ao aumento de AMP cíclico, o que acarreta em melanogênese e proliferação celular (DAVIES *et al.*, 2002).

Altos índices de AMP cíclico promovem a ativação da cascata relacionada à BRAF, principal via da sinalização relacionada aos melanócitos e responsável pelo desencadeamento da proliferação e diferenciação celular (BUSCÀ *et al.*, 2000). Elevados índices de mutações são encontrados em BRAF nos mais variados tipos de neoplasias, porém, o câncer melanoma foi identificado como o portador das maiores taxas (DAVIES *et al.*, 2002). Entretanto, mutações BRAF não são consideradas assinaturas de alterações ocasionadas por radiação UV, mesmo que as mesmas tenham tendência a aparecer em sítios da pele expostos à luz UV (KUDCHADKAR *et al.*, 2012).

Nesse âmbito, a identificação de *driver mutations* em melanoma, ou mutações capazes de promover a estabilização do quadro maligno, vem ganhando bastante enfoque principalmente ao estabelecimento de novos fármacos específicos (MEHNERT & KLUGER, 2012). Assim, mutações em BRAF, que ocasionam influência à via das MAP quinases, já foram detectadas em mais da metade dos melanomas estudados (DAVIES *et al.*, 2002). Outra alteração, evidenciada em 15-30% das mutações da devida neoplasia, foi relacionada à NRAS. A mesma também acarreta na ativação da cascata MAP quinase de modo independente à BRAF (CARAMUTA *et al.*, 2010). É muito pouco evidenciado, porém, a presença de ambas mutações em um mesmo quadro, sugerindo efeitos biológicos semelhantes (OMHOLT *et al.*, 2003; CARAMUTA *et al.*, 2010).

2.4.3 Cascata de sinalização MAP quinase (MAPK)

O melanoma maligno cutâneo geralmente apresenta a sinalização via ativação da cascata RAS–RAF–MEK–ERK como base à sua elevada proliferação celular (JONSSON & TUOMINEN, 2010) e ao grande aumento de transcrição gênica, evidenciado principalmente em genes responsáveis pela entrada em ciclo celular (KUDCHADKAR *et al.*, 2012). Todo esse acionamento ocorre por intermédio da ativação de receptores de crescimento celular com seus ligantes, fato que

promove o crescimento e a sobrevivência das células (SULLIVAN & FLAHERTY, 2011).

A família RAS corresponde à GTPases mediadoras de transações de sinais que desempenham importantes papéis na homeostase, renovação e sobrevivência celular (SULLIVAN & FLAHERTY, 2011). Entretanto, como citado anteriormente, muitos membros da família RAS foram descritos como portadores de mutações em várias malignidades humanas e com fenótipos progressivos da doença (KUDCHADKAR *et al.*, 2012). Assim, a ativação da via das MAP quinases por intermédio de RAS, previamente ativado, com proteínas como BRAF ou CRAF, representa o passo inicial à continuidade da cascata de sinalização (SULLIVAN & FLAHERTY, 2011).

As proteínas RAF então interagem com outras proteínas quinases, identificadas como MEK, promovendo a fosforilação das mesmas. Uma vez fosforiladas, as proteínas MEK promovem a ativação, também via fosforilação, das proteínas quinases ativadoras de mitógeno, nomeadas ERK (BEERAM *et al.*, 2005). A ativação de ERK leva ao crescimento celular e a oposição de apoptose, fato este identificado como crítico ao estabelecimento da malignidade (SULLIVAN & FLAHERTY, 2011). Isso pode ser explicado pelo fato de ERK, ao ser fosforilada, migrar para o núcleo e promover mudanças na expressão gênica (BOLLAG *et al.*, 2012).

Fatores de crescimento geralmente se ligam aos receptores tirosina quinase (Figura 1). Essa ligação promove autofosforilação dos devidos receptores levando ao desencadeamento da via das MAP quinases por ativação de RAS, RAF, MEK e ERK. RAS corresponde a uma proteína cujos sítios de ligação migram do estado basal relacionado à GDP ao estado ativo ligado à GTP, podendo estabelecer interações com vários outros efetores (SCHUBBERT, SHANNON & BOLLAG, 2007). Dessa forma, o complexo RAS-GTP é capaz de promover o deslocamento de RAF à

membrana a fim de estabelecer o seu efeito quinase efetor (LEEVERS, PATERSON & MARSHALL, 1994; BOLLAG *et al.*,2012).

A sinalização RAF/MEK/ERK em células de melanoma, leva ao aumento da expressão de Ciclina D1 (KUDCHADKAR *et al.*, 2012), importante proteína relacionada à passagem da fase G1 à fase S (VÍZKELETI *et al.*, 2012). A ativação da devida cascata também leva à fosforilação e degradação proteossômica de BIM, uma proteína próapoptótica responsável pela indução de morte celular programada ao se ligar e antagonizar proteínas prósobrevivência, como Bcl-2 e Mcl-1 (KUDCHADKAR *et al.*,2012). A ativação constitutiva da via das MAP quinases em melanoma também leva ao comportamento invasivo ao promover reorganização do citoesqueleto celular, ativação da maquinaria migratória e superexpressão de metaloproteinases (WOODS *et al.*, 2001; KUDCHADKAR *et al.*,2012).

2.4.4 Mutações em BRAF

No ano de 2002, um estudo genômico da via das MAP quinases relatou que 80% de 66% das mutações BRAF encontradas em melanoma apresentavam uma substituição na serina/treonina quinase, identificada inicialmente como V599E (DAVIES *et al.*, 2002). Os mesmos autores identificaram também, que melanomas com a devida mutação citada apresentaram a perda da necessidade de uma ativação superior por RAS, sendo capazes então de ativar a via das MAP quinases de forma independente e assim estimular a proliferação e sobrevivência das células neoplásicas (DAVIES *et al.*, 2002; MEHNERT & KLUGER, 2012).

Posteriormente, novos estudos foram então conduzidos e a devida substituição foi corrigida para RAF V600E (MEHNERT & KLUGER, 2012). Assim, melanoma BRAF V600E mutante positivo foi caracterizado por apresentar a substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico, fato responsável por gerar a desestabilização da proteína e posterior deslocamento de seu equilíbrio à forma ativa (WAN *et al.*, 2004). Este tipo de melanoma passou então, a ser identificado

como agressivo devido ao fato de a mutação portada apresentar grandes chances de promover magnificação das células melanocíticas (KUDCHADKAR *et al.*, 2012).

Em BRAF mutantes, a equivalente posição da tirosina passa a ser substituída por um resíduo de ácido aspartâmico (D488), que atua como um fosfomimetizador. Assim também, a serina S445 passa a sofrer fosforilações constitutivas. Estes fatores corroboram com o fato de BRAF necessitar de poucas modificações pós-translacionais para atingir sua atividade quinase máxima, quando comparado a outras proteínas RAF, e assim possibilitar um desencadeamento oncogênico hostil (DAVIES *et al.*, 2002). Dessa forma, mutações BRAF são encontradas também em outros tipos de câncer como carcinoma colorretal, de ovário e tireóide papilar (KUDCHADKAR *et al.*, 2012). Entretanto, o maior número dessas alterações genéticas ainda é liderado por melanomas (DAVIES *et al.*, 2002).

Nesse contexto, também se salienta a identificação de outras mutações em BRAF, sendo V600K ocasionada em 16% dos casos de melanoma e V600D/R em 3% destes (KUDCHADKAR *et al.*, 2012). A alteração da base nitrogenada timina para adenina, no nucleotídeo 1796, acomete 92% das mutações BRAF em melanoma, diferenciando-se das alterações de citosina para timina associadas com a formação de dímeros, frequentemente relacionadas à luz UV (DAVIES *et al.*, 2002). Assim, mutações BRAF não são consideradas modelos de luz ultravioleta, mesmo que sejam bastante frequentes em tecidos expostos à devida radiação (KUDCHADKAR *et al.*, 2012).

2.4.5 Ciclina D1 e a via das MAP quinases

A proteína Ciclina D1 (CCND1), também conhecida por seu importante papel na entrada em síntese celular, atua através de sua ligação à ciclinas dependentes de quinases, como CDK4 e CDK6, bem como pela fosforilação e inativação da proteína de retinoblastoma (pRb) (VÍZKELETI *et al.*, 2012). A via das MAP quinases, uma vez ativada, promove a indução da transcrição e aumento de expressão de

CCND1(SAUTER *et al.*, 2002) (figura 1). Assim como também, outros agentes relacionados à ativação da cascata PI3K, citocinas e alguns fatores de transcrição podem vir a levar ao aumento dos níveis da devida proteína (VÍZKELETI *et al.*, 2012). Entretanto, a Ciclina D1, quando amplificada, torna-se capaz de influenciar ao quadro de malignidade, mas não desencadeá-lo sozinha (KIM *et al.*, 2009). Porém, uma simples alteração nessas variáveis pode contribuir à perda do controle do ciclo celular (VÍZKELETI *et al.*, 2012).

Níveis aumentados de Ciclina D1 foram reportados em diversos estudos com melanoma (SAUTER *et al.*, 2002; CURTIN *et al.*, 2005). Amplificações do gene CCND1 foram evidenciadas como causa; porém, uma possível correlação dos altos índices da devida proteína em tumores mutantes para BRAF ou NRAS também foi estabelecida (SAUTER *et al.*, 2002; VÍZKELETI *et al.*, 2012). Nesse contexto, relatos sobre os altos índices de Ciclina D1, em conjunto com níveis de ERK fosforilado e c-KIT, demonstraram um aprimoramento da diferenciação de nevos melanocíticos em melanoma (VÍZKELETI *et al.*, 2012).

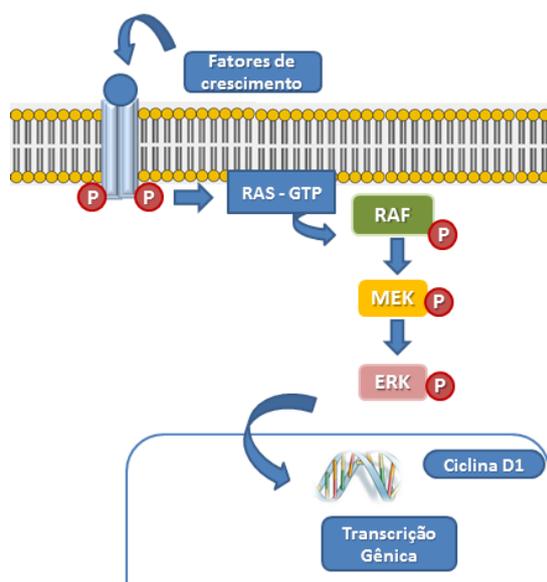


Figura 1: Cascata de sinalização RAS-ERK. A ligação de fatores de crescimento a receptores tirosina quinase de membrana promovem a ligação da proteína RAS a GTP. Uma vez estabelecida essa interação, RAS passa a fosforilar RAF, que por sua vez fosforila e ativa a proteína quinase MEK, que

fosforila a proteína ERK. Esta, ao ser ativada, migra para o núcleo onde promove transcrição gênica de genes relacionados à proliferação e ciclo celular, como o gene codificador à ciclina D1.

2.5 Terapias alvo para melanoma com mutação BRAF V600E

Painel de estudos moleculares e a identificação de *driver mutations* possibilitaram o estabelecimento de marcadores moleculares específicos a diversas neoplasias. Fato este que impulsionou o surgimento de novas estratégias terapêuticas por intermédio de moléculas alvo capazes de bloquear vias de sinalizações diretamente associadas ao estabelecimento da malignidade.

2.5.1 Inibidor de BRAF V600E – Vemurafenibe (PLX4032 / Zelboraf ©)

Dentro do contexto de terapias alvo, o primeiro fármaco com possibilidades de inibição da cascata MAP quinase foi estabelecido. Assim, sorafenib (Nexavar©; Bayer/Onyx®), inicialmente relacionado à inibição de CRAF, foi aprovado ao tratamento de carcinomas renal e hepatocelular (BOLLAG *et al.*, 2012). Entretanto, diversos estudos utilizando o devido composto para tratamento de melanoma demonstraram uma ineficiência terapêutica dessa molécula quando empregada na clínica médica (KUDCHADKAR *et al.*, 2012). Desta forma, a busca por novos fármacos específicos permaneceu constante.

Primeiramente sintetizado em 2005, vemurafenibe ou PLX4032 (Zelboraf©; Plexxikon/Roche®) foi aprovado ao tratamento de melanoma metastático portador da mutação BRAF V600E em agosto de 2011 nos Estados Unidos e em fevereiro de 2012 na União Européia (BOLLAG *et al.*, 2012). As análises do fármaco lançado demonstraram que o mesmo era seletivo à mutantes BRAF V600E e V600K (KUDCHADKAR *et al.*, 2012), porém não ao genótipo selvagem (CHAPMAN *et al.*, 2011). O mesmo padrão também foi evidenciado em seu análogo, PLX4720 (BOLLAG *et al.*, 2012), e em outro fármaco com fundamento semelhante, GSK2118436 (KUDCHADKAR *et al.*, 2012).

A possível explicação para tal seletividade foi que o composto em questão seria capaz de se ligar ao sítio ativo da enzima mutada, previamente estabilizado por E600, denominado de *DFG-in* (BOLLAG *et al.*, 2010). Essa ligação então promoveria a competição por ATP, gerando a inibição da molécula-alvo (KUDCHADKAR *et al.*, 2012) e diminuição das formas intratumorais fosforiladas de ERK (BOLLAG *et al.*, 2010).

Nesse contexto, este ganhou grande evidência mundial ao serem relatadas efetivas taxas de regressão tumoral em pacientes com melanoma metastático avançado em poucas semanas de tratamento (Mc ARTHUR *et al.*, 2012a). Estudos clínicos de fase II demonstraram uma resposta em 81% dos pacientes tratados com o devido fármaco, onde dois casos tiveram resposta completa (SULLIVAN & FLAHERTY, 2011). Demais estudos demonstraram também, que vemurafenibe foi associado a um relativo declínio no risco de morte (63%) e no risco de progressão tumoral (74%) em pacientes com melanoma em estágio IIIc ou IV, quando comparado ao tratamento com dacarbazine (CHAPMAN *et al.*, 2011).

Entretanto, relatos posteriores evidenciaram a existência de um efeito paradoxal de resistência ocasionado pelo tratamento com inibidores BRAF V600E, bem como, com o aparecimento de carcinoma de células escamosas (KUDCHADKAR *et al.*, 2012). Assim, estudos indicaram que a cascata das MAP quinases voltou a ser ativada em células portadoras do genótipo selvagem para BRAF, quando tratadas com PLX4032 e PLX4720, sendo relatados altos níveis de proliferação celular associados a aumentos na expressão de MEK e ERK (SULLIVAN & FLAHERTY, 2011).

2.6 Novas perspectivas de tratamentos

O grande foco atual das pesquisas relacionadas a melanoma BRAF V600E mutante positivo, está na compreensão dos mecanismos responsáveis pela promoção de resistência e nas vias relacionadas ao processo de reativação da

cascata MAP quinase. Assim sendo, uma série de fármacos alvo específicos vem surgindo no mercado com promissoras estratégias ao bloqueio de rotas exclusivas associadas ao estabelecimento da malignidade em tumores. Nesse âmbito, destacam-se os inibidores de MEK, MET e EGFR com promissoras perspectivas à clínica oncológica.

2.6.1 Inibidor de MEK – GSK1120212 (Trametinib®)

Estudos prévios com melanomas mutados para BRAF e NRAS demonstraram a necessidade de atividade da proteína quinase MEK como mediador de sinalização à ERK e ao estabelecimento do quadro de malignidade (Mc ARTHUR *et al.*, 2012b). Dessa forma, novas estratégias terapêuticas focaram-se na produção de fármacos inibidores de MEK, como PD0325901, AZD6244 e CI-1040, ao tratamento de melanoma mutado (KUDCHADKAR *et al.*, 2012). A grande diferença proposta entre os inibidores de MEK e BRAFV600E foi que os primeiros seriam capazes de evitar a fosforilação de ERK independente do genótipo enquanto que o segundo estabeleceria a mesma resposta, porém, apenas em células mutadas para BRAF V600E (BOLLAG *et al.*, 2012).

Os devidos inibidores de MEK, entretanto, falharam com relação à eficiência terapêutica (KUDCHADKAR *et al.*, 2012) bem como com a toxicidade, ao promoverem efeitos colaterais que variaram desde erupções cutâneas acneiformes até diarreia e distúrbios oculares, como retinopatia serosa central (Mc ARTHUR *et al.*, 2012b). Assim, um novo inibidor alostérico de MEK, identificado como GSK1120212 (Trametinib®; GlaxoSmithKline®) foi produzido com promessas de aprimoramento à farmacodinâmica e maior sustentabilidade na inibição de MEK (Mc ARTHUR *et al.*, 2012b). Estudos de fase III com o devido fármaco demonstraram uma média de sobrevida de 4,8 meses aos pacientes tratados com o devido inibidor de MEK e uma média de 1,5 meses aos pacientes que utilizaram a quimioterapia convencional com dacarbazine (FLAHERTY *et al.*, 2012).

Nesse contexto, ainda deve ser levado em consideração o paradoxo indesejado referente à fosforilação de ERK em células com genótipo BRAF selvagem expostas ao tratamento vemurafenibe (BOLLAG *et al.*, 2012). Fato este que ressalta a necessidade do estabelecimento de uma associação terapêutica deste inibidor com outros que possivelmente possam bloquear esse efeito. Dessa forma, estudos clínicos de fase I/II em pacientes com melanoma V600E que receberam terapias combinadas de GSK2118436 (outro inibidor de BRAFV600E) com GSK1120212 (inibidor de MEK), demonstraram taxas de resposta de 77% e uma diminuição significativa de carcinoma de células escamosas, previamente relatos como um dos efeitos colaterais de inibidores de BRAF V600E (KUDCHADKAR *et al.*, 2012).

2.6.2 Inibidor de MET – Crizotinibe (Xalkori®)

Crizotinibe (Xalkori®; Pfizer®) corresponde a um inibidor multiquinase, aprovado em agosto de 2011 pela *U.S. Food and Drug Administration*, para tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas. O mesmo corresponde a um inibidor competitivo de ATP contra o fenótipo selvagem e mutado de MET (principalmente às mutações V1092I, H1094R, V1092I, H1094R, R988C, T1010) (OU *et al.*, 2012). Assim, testes com o novo fármaco evidenciaram inibições na proliferação, invasão e migração de células tumorais humanas (ZOU *et al.*, 2007). Nesse contexto, crizotinibe é capaz de inibir outras proteínas quinases como ALK e ROS1, também relacionadas à malignidade de tumores (OU *et al.*, 2012)

c-Met corresponde à uma tirosina quinase de membrana, autofosforilada após contato com seu ligante HGF (Fator de crescimento hepatocitário) (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2012). A cascata c-MET/HGF é evidenciada por estimular crescimento celular e disseminação de metástases (TO *et al.*, 1998). Estudos com animais transgênicos, que superexpressavam HGF, identificaram a formação de melanomas com um agressivo potencial invasivo e metastático

(CHATTOPADHYAY *et al.*, 2012). Dessa forma, crizotinibe aparece com uma nova estratégia a ser testada e avaliada como tratamento à neoplasia cutânea maligna.

2.6.3 Inibidor de EGFR – Erlotinibe (Tarcerva®)

Estudos vêm demonstrando uma intensa associação entre o receptor de crescimento epidermal (EGFR) e mutações BRAFV600E. Assim, a inibição tanto *in vitro* como *in vivo* de EGFR em tumores de cólon, tireóide e melanoma foram acompanhados de uma curiosa inibição sinérgica de BRAFV600E. Nesse contexto, a imposição da inativação de BRAFV600E resultou na ativação de EGFR, fato este que sugeriu à associação de EGFR ao processo de resistência tumoral com a terapia vemurafenibe (PRAHALLAD *et al.*, 2012).

Erlotinibe (Tarceva®;Roche®), uma pequena molécula desenvolvida à inibição de EGFR, se mostrou eficiente no aumento da sobrevivência de pacientes com câncer de pulmão previamente diagnosticados como portadores de mutações ativadas em EGFR (ROSELL *et al.*, 2012). Mesmo apresentando baixos índices de EGFR, o câncer melanoma foi considerado afetado pelo *feed back* deste receptor com BRAF V600E, sendo susceptível à resistência a vemurafenibe por esta via (PRAHALLAD *et al.*, 2012). Desta forma então, a combinação de vemurafenibe com inibidores de EGFR vem a ser proposta como alvo terapêutico interessante para tratamentos de neoplasias com mutação BRAFV600E (BOLLAG *et al.*, 2012).

3. Objetivos do trabalho

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho buscou estabelecer tratamentos de novos inibidores comerciais sobre células de melanoma parental (A375), bem como sobre mais três linhagens resistentes, induzidas por tratamento prévio com vemurafenibe e seu análogo. Isso, com o intuito estabelecer estudos e estratégias terapêuticas eficientes à reversão de resistência e à inibição do efeito inesperado gerado pelos inibidores de BRAF.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer e avaliar tratamentos singulares de GSK1120212, crizotinibe e erlotinibe sobre a linhagem de melanoma parental (A375) bem como sobre mais três linhagens derivadas desta, previamente induzidas à resistência por PLX4032 (vemurafenibe) e seu análogo PLX4720.
- Executar técnicas de Western Blot à identificação de proteínas relacionadas a via das MAP quinases, e citometria de fluxo, para uma melhor compreensão dos resultados, nas linhagens expostas aos tratamentos individuais.
- Estipular a localização celular de EGFR através de ensaios de imunocitoquímica.

4. Metodologia

4.1 Cultivo de células

As células de melanoma A375, homozigotas para a mutação BRAF V600E, foram obtidas da associação global ATCC (*American Type Culture Collection*); EUA. Outras três linhagens de células resistentes, derivadas de A375, foram previamente induzidas e estabelecidas pelo grupo Johan Hansson presente no Centro de Câncer do Instituto Karolinska (AZIMI *et al.*, 2012). Assim, A375R foi derivada de tratamentos com PLX4072, análogo de vemurafenibe, e A375R3 e A375R4 de tratamentos com vemurafenibe (PLX4032). As mesmas foram mantidas em meio MEM + EARL, - Glutamina, modificado (Cat.no. 21090, LifeTechnologies, Gibco, Paisley, UK), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de piruvato de sódio 100Mm, aminoácidos não essenciais e penicilina/estreptomicina (LifeTechnologies, Gibco, Paisley, UK). As células foram incubadas em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ até atingirem estágio de subconfluência (~80%).

4.2 Estabelecimento dos tratamentos

Para análises de proliferação celular, a suspensão de células foi preparada a uma densidade de 6×10^3 e distribuída em cada poço de placas de cultura de 96 poços. As mesmas foram incubadas a 37°C, com 95% de umidade e 5% de CO₂ por 24 h. Os fármacos GSK1120212 (No.S2673), erlotinibe (No.S10238), crizotinibe (No.S1068) e vemurafenibe (No.S1267) foram obtidos Selleck Chemicals, Houston, TX, EUA. Para os tratamentos, foram aplicadas diferentes concentrações dos devidos compostos a fim de estabelecer a curva de IC₅₀ e determinar a máxima concentração inibitória de 50% das células parentais e resistentes. Assim, para GSK1120212 foram aplicadas concentrações que variaram entre 0,5nM – 100nM para A375 e 0,5nM - 40µM para A375R, R3 e R4. Para crizotinibe, as concentrações

variaram de 1 μ M - 10 μ M para todas as células. Já no caso de erlotinibe, diluições de 10nM - 200 μ M foram estabelecidas. Controles com DMSO e meio foram propostos e cada concentração foi realizada em quadruplicata. Cada experimento também foi repetido 5 vezes como intuito de atingir 3 valores semelhantes e coerentes entre si. Todos os tratamentos foram estabelecidos por 72 horas.

4.3 Viabilidade Celular e análises estatísticas

A viabilidade celular foi determinada pela mensuração da redução do MTS, (Promega, Madison, WI, EUA), [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3-carboximetoxifenil) -2 - (4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno], a produtos formazan pelas células viáveis após 2 horas de exposição a 20 μ L do devido composto. A quantificação das alterações colorimétricas foi estabelecida pelo software SoftMaxPro (Molecular Devices, LLC, CA, EUA), com leituras de 490nm e 690nm (*background*). Os valores gerados pela leitura a 690nm foram subtraídos dos valores de 490nm, proporcionando um valor preciso para cada concentração. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada utilizando a fórmula: $X_{(\text{média das 4 repetições})} \times 100 / Y_{(\text{média das 4 repetições do controle por DMSO})}$.

A seleção dos resultados de cada concentração, previamente estabelecida em quadruplicata e repetida cinco vezes, foi estabelecida através do critério Chauvenet, utilizando a fórmula $\Delta R = (x_i - \bar{x}) / \sigma$. Onde ΔR corresponde à razão entre o valor da média de todas as repetições (\bar{x}) subtraído do valor individual de cada resultado (x_i) sobre o desvio padrão de todas as amostras (σ). O valor medido foi rejeitado quando $\Delta R > \Delta R_0$, sendo ΔR_0 o valor de referência previamente tabelado de acordo com o número de repetições. Os valores de ΔR_0 utilizados como parâmetro comparativos foram de 1,65 para 5 repetições e 1,54 para 4 repetições, de acordo a tabela de Chauvenet. Os cálculos, tabelas e gráficos foram realizados através de Microsoft Office Excel, Microsoft, EUA.

4.4 Extração proteica, realização de SDS-Page e Western Blot

Para extração proteica, a densidade celular de 6×10^5 foi utilizada em placas de 10cm de diâmetro. As mesmas foram incubadas a 37°C , com 95% de umidade e 5% de CO_2 por 24 h. Todas as células foram tratadas individualmente por um período de 24 horas com as concentrações de 2nM de GSK1120212, $5\mu\text{M}$ de erlotinibe e $4\mu\text{M}$ de crizotinibe. As células resistentes (A375R, R3 e R4) foram também expostas à concentração de $30\mu\text{M}$ de GSK1120212. Tratamentos respectivos com DMSO também foram executados como controle e todo o experimento foi repetido 2 vezes para confirmação dos resultados. As células utilizadas para análise proteica foram então tripsinizadas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos a 4°C . As mesmas foram ressuspensas em solução salina tamponada com Tris-Tween-20 (TBST) e centrifugadas a 2.000 rpm novamente por 5 minutos a 4°C . O supernadante foi descartado e o *pellet* congelado. Para a extração proteica, foi utilizado o tampão de lise para radioimunoprecipitação contendo 1% de fluoreto de α -fenilmetilsulfonila (PMSF) 200mM, 2% de inibidor de proteases, 2% de inibidor de fosfatases e 1% de ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) 10mM. Os devidos componentes foram obtidos de Santa Cruz Biotechnology (CA, EUA). Posteriormente foi realizada centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C . Os *pellets* foram descartados e o supernadante conservado. A padronização proteica foi executada por ensaio de BCA através de Micro BCA™ *Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, EUA), de acordo com instruções do fabricante.

Para realização de SDS-PAGE, foi estabelecida a associação das proteínas com LDS (NuPAGE; Invitrogen, Paisley, UK), 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e água mili-Q. As amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos. Em seguida, foi estabelecida eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (NuPAGE 12% BIS-Tris Gel, Novex; Life Technologies, CA, EUA) por 60 minutos a 150 Volts. A membrana de PVDF (Thermo Scientific, EUA) foi então ativada com metanol (Sigma

Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a transferência foi executada a uma voltagem de 30V por 65 minutos. A revelação das proteínas na membrana foi estabelecida por metanol e amido black (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A mesma foi bloqueada por 1 hora com TBST contendo 2,5% de leite em pó.

Os anticorpos primários para MEK (4694S – *Mouse*), ERK (9102 – *Rabbit*), bem como as formas fosforiladas de MEK (2338S - *Rabbit*) e ERK (9106S - *Mouse*) foram derivados de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). Já os anticorpos para EGFR (5117 – *Rabbit*) e β actina (030m4788 - *Mouse*) foram obtidos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e o anticorpo para Ciclina D1 (ab24249 - *Rabbit*) da empresa ABcam (Cambridge, UK). Os mesmos foram então diluídos em TBST contendo 2,5% de leite em pó e aplicados individualmente nas membranas de forma *overnight*. Os anticorpos secundários *anti-rabbit* (333879; ECL™, GE Healthcare, UK) e *anti-mouse* (62-6520; Invitrogen, Paisley, UK) em conjunto com *anti-biotin* (7075P5; Cell Signaling Technology; MA, EUA) foram adicionados por 2 horas às membranas, previamente lavadas com TBST. Os resultados foram estabelecidos em revelador Image Quant™ LAS 400, através das soluções reveladoras Pierce (Thermo Scientific, EUA) e Western Lightning Ultra (Perkin Elmer, Netherlands).

A quantificação proteica foi realizada através de *software* Image J (De Novo Software, EUA). Os resultados em porcentagem, da comparação entre as amostras tratadas com os fármacos ao grupo controle por DMSO, foi estabelecida por Microsoft Office Excel através das fórmulas: $(Ba-A)*100/(Bc-C) = X_1$; $X_{1(d)} - X_{2(t)} = Y$; $(Y*100/X_1) = R$. Onde Ba: equivale ao valor em pixels do *background* da membrana; A: valor em pixels da amostra proteica analisada; Bc: valor em pixels do *background* da membrana do controle por B actina; C: valor em pixels do controle por B actina; X_1 : valor de quantificação em porcentagem ajustado aos valores do controle por B actina; $X_{1(d)}$: Valor de X_1 dos tratamentos por DMSO; $X_{2(t)}$: Valor de X_1 dos tratamentos com os fármacos; Y: diferença da quantificação entre as células tratadas com DMSO e fármacos; R: resultado do cálculo, o qual demonstra valores

em porcentagem de decréscimo ou diminuição proteica das células tratadas com os fármacos, quando comparada aos tratamentos controle por DMSO.

4.5 Ensaios de imunocitoquímica

Slides de todas as linhagens de melanoma, previamente preparados e congelados pelo grupo Johan Hansson, foram utilizados para ensaio de imunocitoquímica de EGFR. Os slides foram então embebidos em Reveal (Biocare, UK) e autoclavados por 45 minutos. Os mesmos foram enxaguados 20 vezes em Hot Rinse (Biocare, UK). Posteriormente, foi utilizado VECTASTAIN® *Universal Quick Kit* (Vector Laboratories, EUA), de acordo com instruções do fabricante. A diluição 1:250 em TBS do anticorpo anti-EGFR (5117; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi aplicada sobre os slides e incubada a 4°C de forma *overnight*. A revelação foi estabelecida através do Kit DAB (Vector Laboratories, EUA). Adição de hematoxilina com posterior enxague em água destilada, seguida de enxague em diferentes % de etanol e por fim em xileno, estabeleceram-se como etapas cruciais prévias à montagem da lâmina. As imagens foram capturadas em microscópio Olympus BH2 no aumento de 20x.

4.6 Citometria de fluxo

Para a realização de citometria de fluxo, 2×10^5 células foram dispostas por poço em placas de 6 poços e tratadas. A linhagem parental (A375) foi tratada com as concentrações de 0,5µM para vemurafenibe, 2nM para GSK1120212 e 4µM para crizotinibe. Já a linhagem A375R4 foi exposta a 5µM de vemurafenibe, 100nM de GSK1120212 e 4µM de crizotinibe. Controles por DMSO também foram estabelecidos em ambas às linhagens. As células utilizadas para citometria de fluxo foram então tripsinizadas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos a 4°C. As mesmas foram ressuspensas em TBST e centrifugadas novamente por 1.500 rpm

por 5 minutos a 4°C. Posteriormente uma solução contendo quantidades semelhantes de iodeto de propídeo e Annexin-V-Fluos (Roche Molecular Biochemicals, IN, EUA) foi adicionada aos pellets por 10 minutos, de acordo com instruções do fabricante. As análises foram estabelecidas em FACSCalibur (Becton Dickinson, NJ, EUA) através de software FACSComp™ (Bioscience, EUA). Todo o experimento foi executado em duplicata e repetido duas vezes. O objetivo das análises foi estabelecer, após 72 horas de tratamento, o número em porcentagem de células vivas, de células em apoptose inicial (morte celular programada relacionada a efeitos prolongados dos fármacos), de células em apoptose tardia (morte celular programada relacionada aos efeitos imediatos de fármacos) e necrose (morte sem programação celular). Isso com o intuito de compreender a forma pela qual os fármacos do estudo promovem suas atuações sobre a proliferação celular das linhagens de melanoma parental e resistente.

5. Resultados

5.1 Tratamentos singulares

Os resultados obtidos através de análises de viabilidade dos tratamentos singulares, através de ensaios de MTS, permitiram o estabelecimento de curvas de IC₅₀. As mesmas foram propostas à determinação da máxima concentração capaz de inibir metade da viabilidade celular, sendo esta o padrão de referência de efetividade, para os fármacos GSK1120212, crizotinibe e erlotinibe, tanto nas células de melanoma parental como nas células resistentes (tabela 1). Assim, como pode ser visualizado na figura 2, o inibidor de MEK GSK1120212 apresentou inibições celulares de mais 50% sobre a linhagem A375, a partir da concentração de 2nM. Entretanto, as linhagens resistentes só foram apresentar uma redução da proliferação superior a 25%, quando a concentração do fármaco foi aumentada para 30µM. Dados esses evidenciados principalmente por A375R4, cuja resistência foi revertida com reduções de proliferação de mais da metade das células expostas a concentrações superiores de 30µM. Já A375R e R3, não apresentaram reduções de 50%, o que indica que concentrações maiores que 40µM sejam necessárias para tanto.

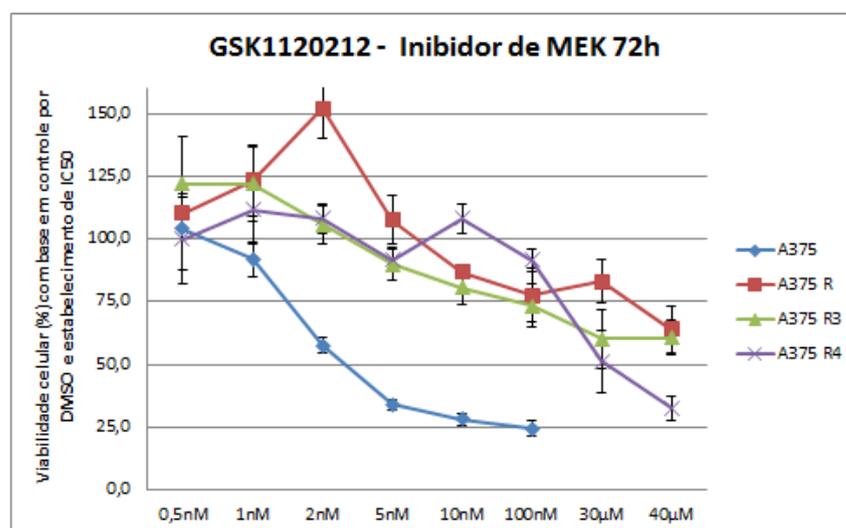


Figura 2: Sensibilidade celular ao fármaco GSK1120212. Gráfico representativo da ação do fármaco

inibidor de MEK sobre a viabilidade das células de melanoma A375, R, R3 e R4. De acordo com os dados, concentrações superiores a 2nM foram capazes de inibir mais de 50% da proliferação celular sobre a célula de melanoma parental, mas o mesmo não ocorreu com as células resistentes. Deste modo, concentrações de GSK1120212 foram elevadas para 30 μ M e 40 μ M sobre todas as células resistentes. Assim, os resultados para A375R e R3, demonstraram taxas de redução celular superiores a 25%, porém inferiores a 50%, quando expostas à dosagem mais alta do inibidor de MEK. Já A375R4 demonstrou decréscimo de mais de metade de suas células a partir de 30 μ M, sendo esta então, considerada a linhagem resistente mais sensível ao fármaco em questão.

Em contraposto, os resultados das análises de viabilidade para crizotinibe demonstraram resultados bastante promissores em todas as linhagens de melanoma. Assim, a concentração de 6 μ M do inibidor de MET foi capaz de promover inibição da viabilidade celular, de em torno de 50%, para A375, sendo esta continuamente reprimida também por dosagens maiores. Do mesmo modo, as células A375R3 e R4 demonstraram responsivas taxas de inibição de 50% da proliferação, quando expostas a concentrações maiores que 6 μ M e inferiores que 8 μ M para crizotinibe. Já a linhagem A375R, apresentou uma linearidade de resistência inicial, porém, teve uma alta queda de viabilidade (superior a 50%) após o tratamento com dosagens acima de 8 μ M (figura 3).

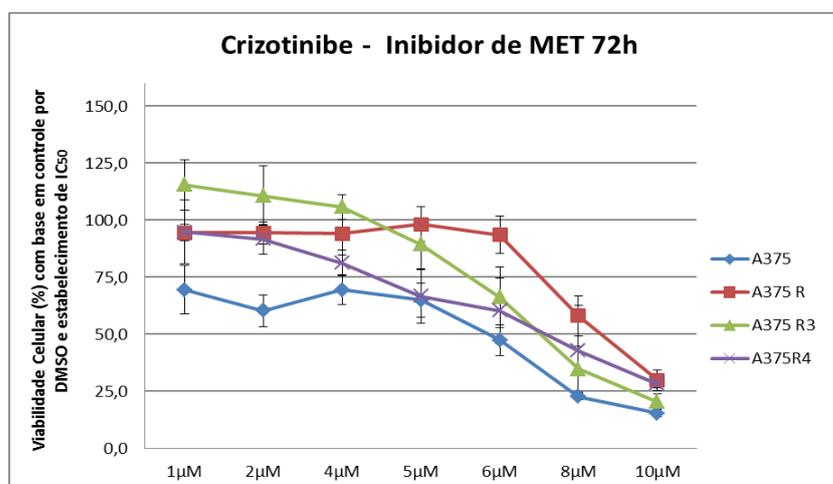


Figura 3: Sensibilidade celular ao fármaco crizotinibe. Gráfico representativo da ação do fármaco inibidor de MET sobre a viabilidade das células de melanoma A375, R, R3 e R4. A linhagem parental

A375 demonstrou valores de redução superiores a 50% da proliferação a partir da concentração de 6 μ M. Já, a linhagem A375R demonstrou valores efetivos de inibição de mais da metade das células quando exposta a concentrações maiores que 8 μ M. Nesse contexto, A375R3 e R4 apresentaram reduções celulares de mais de 50%, a partir de concentrações aproximadas à 7 μ M.

As análises de citotoxicidade para o fármaco erlotinibe, visualizadas na figura 4, demonstraram uma ineficiência de redução da proliferação sobre todas as linhagens, visto que nenhuma das concentrações foi capaz de inibir 50% da viabilidade celular. Altas concentrações do devido fármaco foram também testadas com o intuito de promover ações efetivas que não foram encontradas.

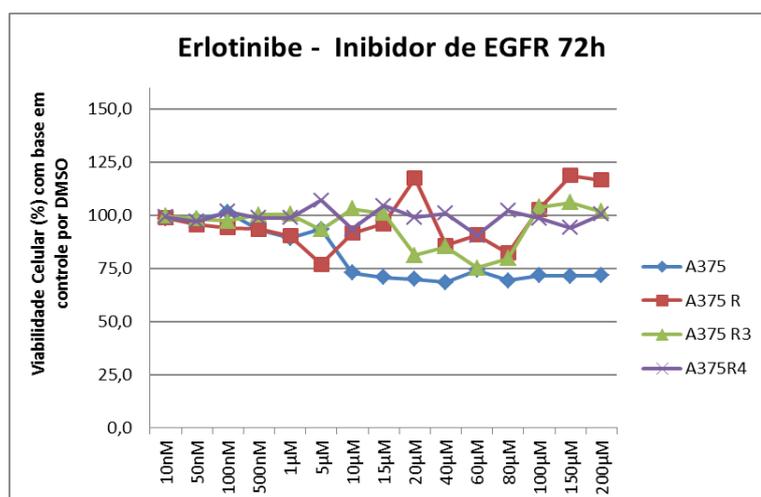


Figura 4: Sensibilidade celular ao fármaco erlotinibe. Gráfico representativo da ação do fármaco inibidor de EGFR sobre as células de melanoma A375, R, R3 e R4. Nenhuma das linhagens apresentou redução de 50% da proliferação celular, quando expostas ao fármaco inibidor de EGFR, sendo este então considerado ineficiente.

Tabela 1: Valores de IC₅₀ dos fármacos sobre as células.

Tratamentos		Linhagens de melanoma			
[] IC ₅₀	GSK1120212	A375	A375R	A375R3	A375R4
Valores aproximados	Crizotinibe	2nM	+ 40µM	+ 40µM	30µM
	Erlotinibe	6µM	8 µM	7µM	7µM
		-	-	-	-

5.2 Análises proteicas

Para uma melhor compreensão dos resultados, análises de expressão de proteínas relacionadas com os devidos inibidores alostéricos, bem como com a via das MAP quinases, foram estabelecidas. Nesse sentido, a proteína MEK em sua forma integral não apresentou mudanças aparentes entre as linhagens (figura 5). Entretanto, foram identificadas diminuições aparentes e quantitativas na forma fosforilada de MEK em todas as células tratadas, quando comparadas aos respectivos controles por DMSO (figura 5). Assim, as linhagens A375, R, R3 e R4, demonstraram as reduções respectivas de 82%, 53,7%, 59,7% e 27,6% de expressão da proteína fosforilada de MEK.

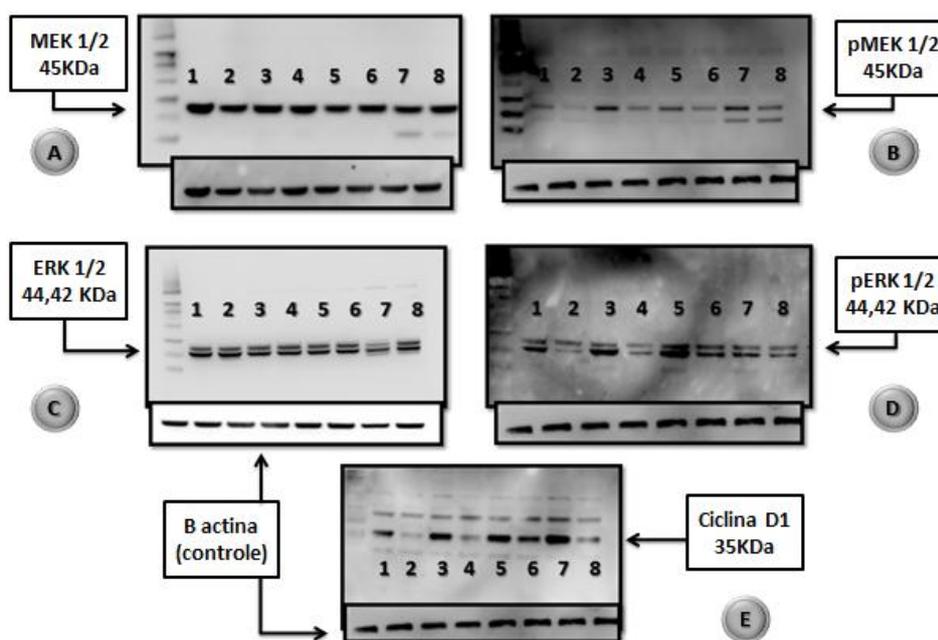


Figura 5: Painel de análise proteica das células tratadas por 24 horas com 2nM de GSK1120212. Os números correspondem às linhagens e ao tipo tratamento: (1) A375 DMSO; (2) A375 2nM GSK1120212; (3) A375R DMSO; (4) A375R 2nM GSK1120212; (5) A375R3 DMSO; (6) A375R3 2nM GSK1120212; (7) A375R4 DMSO; (8) A375R4 2nM GSK1120212. As letras correspondem às proteínas analisadas: (A) MEK padrão; (B) MEK fosforilada; (C) ERK padrão; (D) ERK fosforilada; (E) Ciclina D1. O peso molecular das proteínas bem como o controle por B actina estabelecido por membrana são identificados.

Os resultados da proteína padrão ERK não apresentaram alterações aparentes. Entretanto, foi identificada uma diminuição aparente e quantitativa dos níveis da proteína ERK fosforilada em todas as linhagens previamente tratadas com inibidor de MEK, quando comparadas aos respectivos controles por DMSO (figura 5). Desta forma, a quantificação das células A375, R, R3 e R4 tratadas com o fármaco, demonstraram as reduções respectivas de 44,3%, 70,0%, 45,8% e 29,1% de expressão da proteína fosforilada de ERK. Os resultados para Ciclina D1 revelaram uma diminuição quantitativa de expressão desta, mesmo que modesta como no caso de R3, entre todas as linhagens tratadas com o devido fármaco quando comparadas às tratadas por DMSO (figura 5). Assim, a quantificação das células A375, R, R3 e R4, tratadas com 2nM de GSK1120212, demonstraram as reduções respectivas de 54,1%, 31,1%, 1,0% e 61,7% na expressão da proteína Ciclina D1.

As linhagens resistentes também foram expostas à concentração de 30 μ M de GSK1120212, previamente determinada por ser capaz de inibir a proliferação de A375R4, para análise proteica (figura 6). As proteínas padrão MEK e ERK não apresentaram diferenças aparentes entre o grupo tratado e controle. Já uma diminuição quantitativa de 67,4 % na expressão da forma fosforilada de MEK, foi identificada na linhagem A375R tratada com 30 μ M de GSK1120212, quando comparada ao respectivo controle por DMSO. Por outro lado, percebeu-se um aumento quantitativo respectivo de 5,9% e 199,2%, na expressão da forma fosforilada de MEK, nas células R3 e R4 tratadas quando comparadas ao controle por DMSO. Já as análises de ERK fosforilada demonstraram quantitativas taxas de diminuição em todas as três células resistentes tratadas, quando comparadas aos controles por DMSO. Assim, os valores de diminuição respectivos para pERK foram de 69,3%, 60%, 23,4% para A375R, R3 e R4. As análises de Ciclina D1 demonstraram uma diminuição quantitativa de 88,0%, 81,1% e 18,5% das linhagens A375R, R3 e R4 tratadas, quando comparadas ao controle por DMSO.

Aplicações de 4 μ M crizotinibe também foram promovidas sobre todas as linhagens com o objetivo de identificar as taxas de expressão da proteína fosforilada

de ERK, isso como intuito de compreender se a via das MAP quinases estava sendo de fato suprimida nos tratamentos (figura 7). Os resultados revelaram uma diminuição quantitativa de 18,54%, 26,32% e 12,36% na expressão da forma fosforilada de ERK, nas linhagens resistentes A375R, R3 e R4, respectivamente. Por outro lado, a linhagem parental, A375, teve um aumento quantitativo de 16,18% na expressão de ERK fosforilado, quando comparado ao controle por DMSO e ajustado à quantificação do controle por B actina.

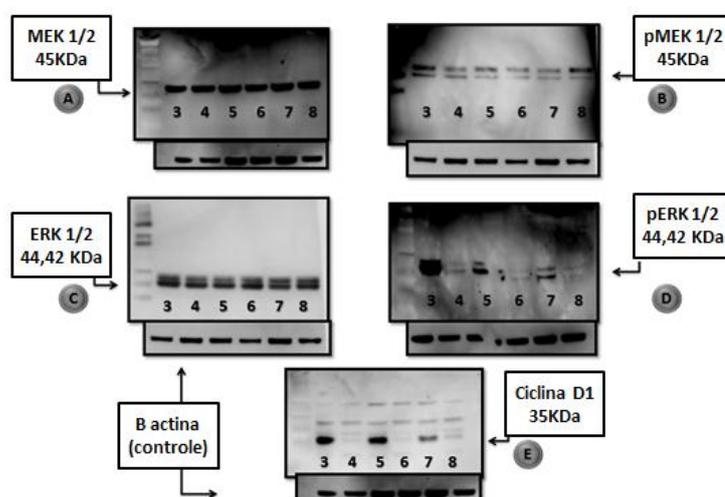


Figura 6: Painel de análise proteica das células resistentes tratadas por 24 horas com 30 μ M de GSK1120212. Os números correspondem às linhagens e ao tipo tratamento: (3) A375R DMSO; (4) A375R 30 μ M GSK1120212; (5) A375R3 DMSO; (6) A375R3 30 μ M GSK1120212; (7) A375R4 DMSO; (8) A375R4 30 μ M GSK1120212. As letras correspondem às proteínas analisadas: (A) MEK padrão; (B) MEK fosforilada; (C) ERK padrão; (D) ERK fosforilada; (E) ciclina D1. O peso molecular das proteínas bem como o controle por B actina estabelecido por membrana são identificados.

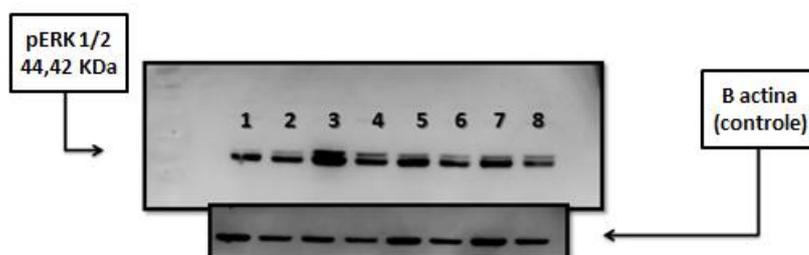


Figura 7: Análise proteica da forma fosforilada de ERK em todas as linhagens tratadas com 4 μ M de crizotinibe por 24 horas. Os números correspondem às linhagens e ao tipo tratamento: (1) A375

DMSO; (2) A375 4 μ M crizotinibe; (3) A375R DMSO; (4) A375R 4 μ M crizotinibe; (5) A375R3 DMSO; (6) A375R3 4 μ M crizotinibe; (7) A375R4 DMSO; (8) A375R4 4 μ M crizotinibe. As letras correspondem às proteínas analisadas: (C) ERK padrão; (D) ERK fosforilada. O peso molecular das proteínas bem como o controle por B actina estabelecido por membrana são identificados.

Por fim, objetivou-se analisar os índices de EGFR em todas as linhagens tratadas com 5 μ M de erlotinibe (figura 8). Os resultados demonstraram uma carência de bandas em torno de 175 KDa, como estimado para EGFR, associada ao aparecimento de bandas fortes de 50 KDa.

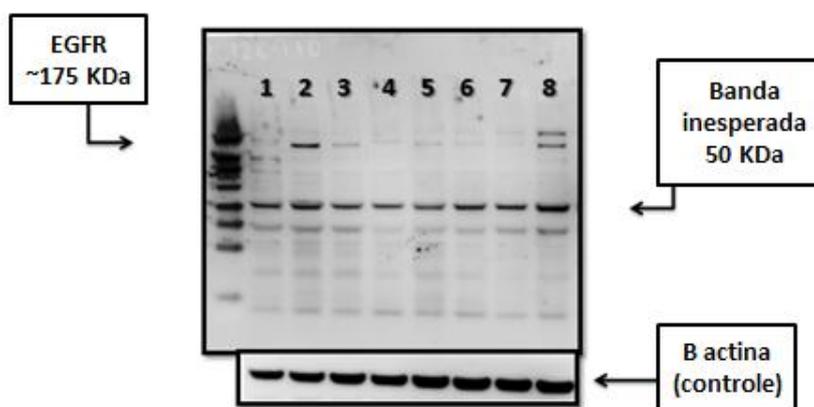


Figura 8: Análise proteica de todas as linhagens tratadas com 5 μ M de erlotinibe por 24 horas. Os números correspondem às linhagens e ao tipo tratamento: (1) A375 DMSO; (2) A375 5 μ M erlotinibe; (3) A375R DMSO; (4) A375R 5 μ M erlotinibe; (5) A375R3 DMSO; (6) A375R3 5 μ M erlotinibe; (7) A375R4 DMSO; (8) A375R4 5 μ M erlotinibe. O peso molecular das proteínas bem como o controle por B actina estabelecido por membrana são identificados na figura acima.

5.3 Imunocitoquímica para EGFR

Visando compreender o motivo do aparecimento de bandas de em torno de 50 KDa encontradas para EGFR, buscou-se executar a técnica de imunocitoquímica à identificação dos sítios celulares de atuação do receptor em questão. As linhagens A375, R, R3 e R4, utilizadas no método em questão, foram expostas e não expostas ao anticorpo para EGFR. Esta última estratégia foi desenvolvida como controle da

técnica. Os resultados demonstraram, aparentemente, uma coloração mais acentuada na região nuclear de todas as células positivas para o anticorpo EGFR, quando comparadas aos respectivos controles negativos. Fato este que sugere uma presença maior de EGFR no núcleo de todas as devidas células de melanoma.

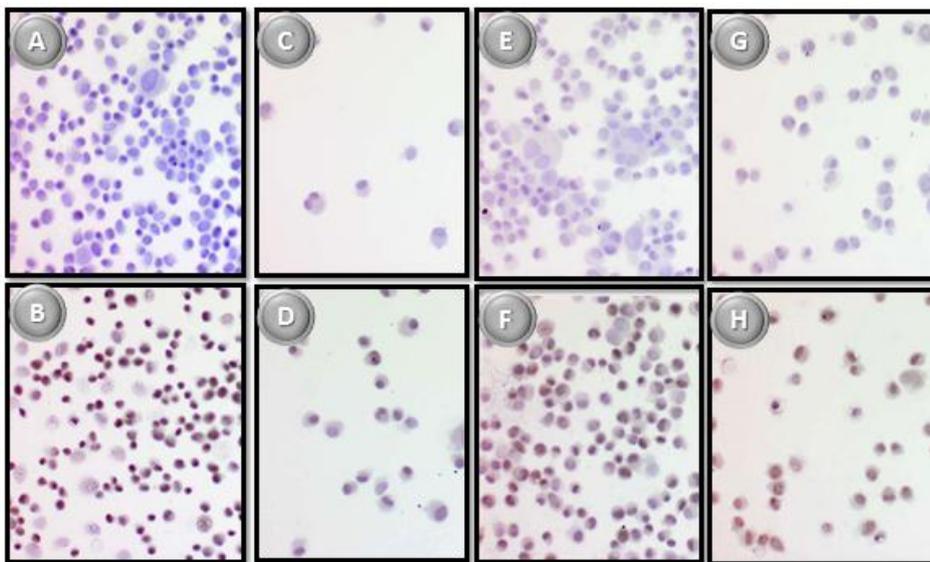


Figura 9: Imunocitoquímica para EGFR. A técnica foi realizada com o objetivo de identificar a localização celular de EGFR nas linhagens de melanoma. Assim, as letras A, C, E, G correspondem respectivamente às linhagens A375, R, R3 e R4 expostas ao método em questão, porém, sem a presença do anticorpo para EGFR. De outro modo, as demais letras B, D, F e H equivalem, na mesma ordem, às devidas células expostas à técnica com a presença do anticorpo EGFR. Os resultados demonstram, aparentemente, uma coloração mais acentuada na região nuclear de todas as células positivas para o anticorpo em questão, quando comparadas aos respectivos controles negativos.

5.4 Citometria de fluxo

De acordo com dados da tabela 2, todos os tratamentos resultaram em um grande número de células viáveis, fato este que indica que os mesmos fármacos devam atuar impedindo a proliferação ao promoverem parada das células em diferentes fases do ciclo celular. Testes foram realizados também em vemurafenibe para parâmetros comparativos. Números mais elevados de células em apoptose

tardia sugerem que a ação dos compostos sobre as mesmas deva ocorrer no primeiro período do tratamento de 72 horas.

A devida hipótese pode ser observada nos três fármacos expostos à A375 e R4, sendo a ação de PLX4032 a considerada mais precoce em A375 bem como crizotinibe em R4. Índices de apoptose inicial também foram relatados, em menor escala, especialmente ao tratamento com vemurafenibe (PLX4032) em A375 e GSK1120212 em R4. Os resultados são também confirmados na figura 10.

Tabela 2: Resultados das análises por citometria de fluxo.

Linhasgens	Tratamentos	% Cél.Vivas	% Apopt. Inic.	% Apopt. Tard.	% Necros.
A375	DMSO 4 μ M	91,7	2,4	2,2	3,7
	PLX 0,5 μ M	79,6	7,5	11,2	1,8
	GSK 2nM	89,3	2,5	6,1	2,1
	Crizot 4 μ M	88,3	2,6	8,4	0,7
A375 R4	DMSO 5 μ M	95,6	1,9	2,2	0,2
	PLX 5 μ M	88,7	6,6	4,4	0,3
	GSK 100nM	83,2	9,8	6,6	0,4
	Crizot 4 μ M	82,1	6	10,4	1,4

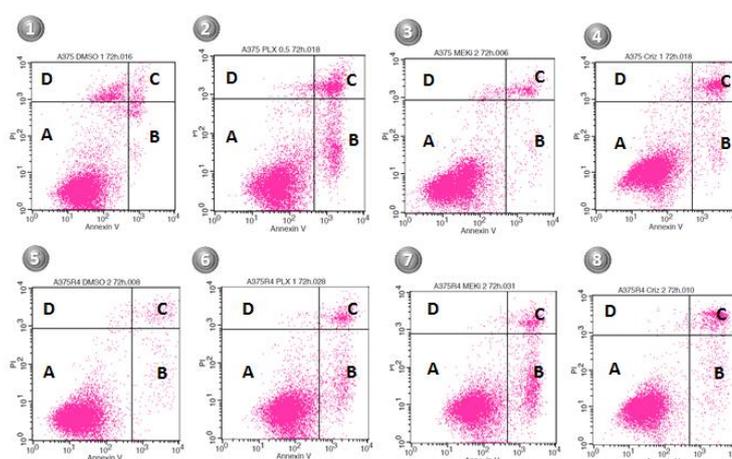


Figura 10: Análise de apoptose por citometria de fluxo em A375 e R4. A imagens superiores correspondem à linhagem A375 e as inferiores à A375R4. Os números correspondem ao tipo de tratamento realizado: (1) A375 - 4 μ M de DMSO; (2) A375 - 0,5 μ M de PLX4032 (3) A375 - 2nM de GSK1120212 ; (4) A375 - 4 μ M de crizotinibe; (5) A375R4 - 5 μ M de DMSO; (6) A375R4 - 5 μ M de

PLX4032; (7) A375R4 - 100nM de GSK1120212; (8) A375R4 - 4uM de crizotinibe. As letras A,B,C,D correspondem, respectivamente, aos eventos de células vivas, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Como corante marcador, foi utilizado iodeto de propídeo e Annexin-V-Fluos (Roche Molecular Biochemicals, IN, EUA). Os gráficos foram estabelecidos através do software FACSComp™(Bioscience, EUA).

6. Discussão

O presente trabalho utilizou células de melanoma parentais e resistentes à mimetização do devido quadro inesperado adquirido por pacientes com melanoma cutâneo em estágio avançado, previamente tratados com inibidores de BRAF, para assim poder compreender os mecanismos de resistência envolvidos diretamente com a mutação V600E. Isso com o intuito de estabelecer estudos específicos a alvos terapêuticos estratégicos capazes de inibir sinalizações relacionadas com a ativação da proteína ERK, na via das MAP quinases. As análises foram desenvolvidas propositalmente na célula de melanoma A375 pelo fato de a mesma apresentar fenótipo homozigoto à mutação BRAF V600E (Baudy *et al.*, 2012).

As linhagens A375R, R3 e R4, derivadas de A375, foram estabelecidas e confirmadas como células resistentes pelo grupo Johan Hansson do Instituto Karolinska (AZIMI *et al.*, 2012). A metodologia utilizada para tal indução de resistência foi baseada em tratamentos prolongados de A375 com vemurafenibe, o que gerou as linhagens A375R3 e R4, bem como com seu análogo PLX4720, que gerou a linhagem denominada de A375R. As células identificadas por A375R4 foram derivadas de uma contínua exposição de R3 ao fármaco relatado, sendo portando as células mais vigorosas a este (AZIMI *et al.*, 2012).

Os resultados das análises de viabilidade para o fármaco inibidor de MEK GSK1120212, demonstraram uma redução de mais metade da proliferação das células parentais com concentrações superiores a 2nM. Entretanto, no caso das células resistentes, R4 teve inibição de 50% da proliferação apenas quando exposta a concentrações de 30µM do fármaco. Já A375R e R3, embora apresentando mais

de 25% de redução da viabilidade celular na concentração de 40 μ M, não obtiveram inibição de 50% de proliferação, sendo consideradas então também resistentes as mais altas concentrações de GSK1120212 testadas.

Fato este que corrobora com o que fora descrito por KUDCHADKAR *et al.*, 2012, em que pacientes, previamente tratados com quimioterapia ou imunoterapia, apresentaram taxas de 33% de resposta e escala de controle da doença de 81% quando expostos ao inibidor de MEK em questão. Entretanto, mínimas foram as respostas de efetividade do fármaco GSK1120212 em pacientes que haviam sido tratados anteriormente com inibidores de BRAF mutante (KUDCHADKAR *et al.*, 2012).

Análises proteicas, estabelecidas por Western Blot, para os tratamentos das células com 2nM do inibidor de MEK, demonstraram taxas de redução de expressão da forma fosforilada ativa de MEK (pMek) em todas as linhagens tratadas com a devida concentração, demonstrando uma efetividade do inibidor de MEK. Entretanto, quando 30 μ M do mesmo fármaco foi exposto às células resistentes, o resultado de expressão de MEK fosforilado se manteve o mesmo para A375R, porém aumentado para R3 e R4. O que foi contrário aos resultados dos ensaios de proliferação, visto que, R4 foi identificada como a célula resistente mais sensível à concentração de 30 μ M. Uma possível explicação para tal evento possa estar relacionada a um aumento de sinalização da via das MAP quinases, bem como de outras vias relacionadas, perante a inibição de MEK, para sustentação do fenótipo de proliferação celular da malignidade ou como um *feed back* positivo a baixos índices da proteína fosforilada ERK.

Nesse contexto, ensaios quantitativos da forma fosforilada de ERK demonstraram que todas as linhagens, tratadas com 2nM GSK1120212, foram capazes de inibir a expressão da devida proteína quando comparadas ao controle por DMSO. Fato este que demonstrou uma efetividade na redução da cascata MAP quinase de acordo com relatos literários prévios (SULLIVAN & FLAHERTY, 2011).

Dessa forma, quando aplicada à concentração de 30 μ M, todas as células resistentes apresentaram também uma redução da forma fosforilada de ERK. Assim, a linhagem R4 apresentou uma redução de mais de 20% da devida proteína, fato este que coincidiu com a sensibilidade desta célula à 30 μ M e corroborou com o que fora descrito anteriormente.

A proteína Ciclina D1, também conhecida por seu importante papel à entrada em síntese celular (VÍZKELETI *et al.*, 2012), apresentou diminuições em ambas as concentrações do fármaco inibidor de MEK, quando comparadas ao controle por DMSO. Desta forma, baixos níveis de Ciclina D1 representam ótimos resultados de atuação do fármaco, visto que expressões aumentadas da mesma proteína foram reportadas em diversos estudos com melanoma avançado (SAUTER *et al.*, 2002; CURTIN *et al.*, 2005).

As análises de citotoxicidade para o inibidor de MET, crizotinibe, demonstraram resultados bastante promissores ao indicarem respostas efetivas em todas as linhagens de melanoma expostas à concentrações iguais ou superiores a 6 μ M. Fato este que demonstra uma possível interação da cascata HGF / c-MET com estabilidade da malignidade tumoral, corroborando o que fora relatado por CHATTOPADHYAY *et al.*, 2012, de que um aumento no índices de HGF em camundongos levava à formação de melanomas com um agressivo potencial invasivo e metastático (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2012). Deste modo, os resultados da análise proteica de todas as células resistentes tratadas com 4 μ M de crizotinibe demonstraram reduções quantitativas na expressão da proteína ERK fosforilada. Resultado este que vai de encontro aos relatos literários sobre a interação de ambas as cascatas de sinalização MAP quinase e MET sobre o fenótipo de resistência.

Os testes estabelecidos para erlotinibe, inibidor de EGFR, por outro lado, demonstraram uma baixa efetividade sobre todas as linhagens estudadas. Fato este que contrasta aos trabalhos de PRAHALLAD *et al.*, 2012, de que o câncer

melanoma mesmo apresentando baixas expressões de EGFR seria afetado pelo *feed back* deste receptor com BRAF V600E, o qual atuaria como suporte à ativação da cascata MAP quinase na inibição de BRAF (PRAHALLAD *et al.*, 2012). Nesse contexto, a análise proteica do devido receptor de EGFR demonstrou uma carência de bandas de 175 KDa estimadas, mas identificou de forma clara um padrão de bandas de 50 KDa, o que levou à hipóteses sobre uma possível clivagem proteica e alteração de função do mesmo em células de melanoma.

Assim, ensaio de imunocitoquímica foi estabelecido sobre todas as linhagens de melanoma do estudo a fim de verificar a localização celular de EGFR nas devidas células. Surpreendentemente, foi relatado, aparentemente, que as maiores taxas de expressão do anticorpo para EGFR foram observadas no núcleo. Fato que contrasta às expectativas iniciais de que as mesmas seriam visualizadas na margem citoplasmática, visto que se tratava de um receptor de membrana plasmática. Porém, estudos de HAN & LO, 2012, enfatizaram que em muitos casos de câncer, a devida molécula passa a ser transportada para o núcleo como resposta a diversos estímulos, onde então começa a exercer funções de reguladores transcricionais, funções de tirosina quinase e funções de medição a outros processos biológicos diferentes dos que ocasionalmente eram estabelecidos (HAN & LO, 2012).

Nesse âmbito, análises de citometria de fluxo foram estabelecidas para uma melhor compreensão da forma de atuação dos fármacos. Testes foram realizados também em vemurafenibe para parâmetros comparativos. Assim, todos os tratamentos resultaram em um grande número de células viáveis, fato este que indica que os mesmos compostos devam atuar impedindo a proliferação ao promoverem parada das células em diferentes fases de ciclo celular. Números moderados de células em apoptose tardia foram observados nos três fármacos expostos às linhagens, sugerindo uma ação precoce dos mesmos.

Deste modo, estudos moleculares capazes de estabelecer marcadores de diferenciação entre as linhagens, correspondem a estratégias promissoras para

compreensão das diferenças de sensibilidade das quatro células sobre os fármacos analisados. Nesse contexto também, concentrações do fármaco crizotinibe devem ser associadas à vemurafenibe bem como à GSK1120212, para uma possível identificação de efeitos aditivos sobre todas as linhagens, especialmente sobre as resistentes.

7. Conclusões e perspectivas

O fármaco inibidor de MET, identificado como crizotinibe, foi evidenciado como uma estratégia promissora ao tratamento e reversão de resistência da neoplasia cutânea portadora de mutação BRAF V600E. Isto, devido ao fato dos tratamentos demonstrarem altas taxas de eficiência inibitória, tanto sobre as células de melanoma parental como sobre as células resistentes. As concentrações efetivas do devido fármaco, semelhantes em todas as linhagens, facilitaria sua possível aplicação futura na clínica.

Por outro lado, o inibidor de EGFR, erlotinibe, não foi capaz de apresentar mínimas taxas de redução celular nem sobre a célula parental A375, nas mais elevadas dosagens. Análises proteicas em conjunto com ensaios de imunocitoquímica, evidenciaram a uma alta expressão nuclear deste sobre todas as linhagens de melanoma, indicando uma possível mudança de função de EGFR nessas células e uma correlação com a resistência terapêutica.

Nesse contexto, o inibidor de MEK, GSK1120212, também foi apontado por promover uma diminuição da proliferação celular sobre as células parentais em tratamentos singulares. Altas concentrações, porém, foram requeridas para manifestar efeito sobre as células resistentes. Deste modo, estudos moleculares capazes de estabelecer marcadores de diferenciação entre as linhagens seriam interessantes à compreensão das diferenças de sensibilidade das quatro células sobre os fármacos analisados. Nesse contexto, também, testes com diferentes concentrações de crizotinibe e vemurafenibe, poderão contribuir a resultados mais satisfatórios.

8. Considerações Finais

A responsabilidade de execução desta pesquisa contribuiu muito ao meu amadurecimento pessoal e profissional. Para atingir o objetivo final e concluir o trabalho, tive que dispensar tempos demasiados de estudos a fim de adquirir bases ao aprimoramento de uma visão crítica científica para interpretação dos dados obtidos ao longo deste período. Para tanto, tive também que desenvolver uma característica autodidata, com o intuito de encontrar soluções e protocolos à análise dos resultados que me surgiam e à aplicação de minha criatividade.

Desta forma, acredito que jamais esquecerei esse semestre vivenciado, pois ganhei muitos ensinamentos valiosos. Ressalto que fui muito privilegiada ao fazer parte do grupo Johan Hansson, o qual proporcionou não só o desenvolvimento de minha monografia, mas também me deu liberdade para aplicar novas ideias e realizar diferentes metodologias. Do mesmo modo, pude perceber e valorizar a qualidade dos professores de meu curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, os grandes responsáveis por minha capacitação à pesquisa internacional.

9. Bibliografia

AZIMI A, HERTZMAN J, PERNEMALM M, TUOMINEN R, LEHTIÖ J, HANSSON J, EGYHAZI S. Characterization of resistance mechanisms to the braf inhibitor vemurafenib (PLX4032). **WIN 2012 Symposium**, Paris, 2012.

BAKOS L, WAGNER M, BAKOS RM, LIETE CS, SPERHACKE CL, DZEKANIAK KS, EA AL. Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. **International Journal of Dermatology**. v.41, n.9, p. 557–62, 2002.

BAUDY AR, DOGAN T, FLORES-MERCADO JE, HOEFLICH KP, SU F, VAN BRUGGEN N, WILLIAMS SP. FDG-PET is a good biomarker of both early response and acquired resistance in BRAFV600 mutant melanomas treated with vemurafenib and the MEK inhibitor GDC-0973. **EJNMMI Research**. v.2, n.1, p.22, 2012 .

BEERAM M, PATNAIK A, ROWINSKY EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v.23, n.27, p.6771-90, 2005.

BEVONA C, GOGGINS W, QUINN T, FULLERTON J, TSAO H. Cutaneous melanomas associated with nevi. **Archives of Dermatology**. v.139, n.12, p.1620-4, 2003.

BOLLAG G, HIRTH P, TSAI J, ZHANG J, IBRAHIM PN, CHO H, SPEVAK W, ZHANG C, ZHANG Y, *et al.* Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. **Nature**. v.467, n.7315, p.596-9, 2010.

BOLLAG G, TSAI J, ZHANG J, ZHANG C, IBRAHIM P, NOLOP K, Hirth. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. **Nature Reviews Drug Discovery** v.11, n.11, p. 873-86, 2012.

BULLIA RD J-L, COX B. Cutaneous malignant melanoma in New Zealand: trends by anatomical site, 1969–1993. **International Journal of Epidemiology**. v.29, p. 416–23, 2000.

BUSCÀ, R. et al. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. **The EMBO Journal**. v.19, p. 2900–2910, 2000.

CANO A, PEREZ-MORENO MA, RODRIGO I, LOCASIO A, BLANCOMJ, DEL BARRIO MG, PORTILLO F, NIETO MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. **Nature Cell Biology**. v.2, p.76–83, 2000.

CARAMUTA S, EGYHÁZI S, RODOLFO M, WITTEN D, HANSSON J, LARSSON C, LUI WO. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**. v.130, n.8, p. 2062–70, 2010.

CHAPMAN PB, HAUSCHILD A, ROBERT C, HAANEN JB, ASCIERTO P, LARKIN J, DUMMER R *et al.* BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **The New England Journal of Medicine**. v.364, n.26, p.2507-16, 2011.

CURTIN JA, FRIDLAND J, KAGESHITA T, *et al.* Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **The New England Journal of Medicine**. v.353, p.2135–47, 2005.

DAVIES H, BIGNELL GR, COX C, STEPHENS P, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**. v.417, n.6892, p. 949-54, 2002.

DE HAAS E, NIJSTEN T, DE VRIES E. Population education in preventing skin cancer: from childhood to adulthood. **Journal of Drugs in Dermatology**. v.2, p. 112–6, 2010.

ERDMANN F, LORTET-TIEULENT J, SCHÜZ J, ZEEB H, GREINERT R, BREITBART EW, BRAY F. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at higher or lower risk? **International Journal of Cancer**. v.132, n.2 , p. 385-400, 2013.

FLAHERTY KT, ROBERT C, HERSEY P, NATHAN P, GARBE C, MILHEM M, DEMIDOV LV, *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. **The Lancet Oncology** v.13, n.3, p. 239-46, 2012.

GIBLIN AV, THOMAS JM. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**. v.60, p. 32–40, 2007.

JOHANNESSEN CM, BOEHM JS, KIM SY, THOMAS SR, WARDWELL L, JOHNSON LA, EMERY CM, STRANSKY N, COGDILL AP, BARRETINA J, *et al.* COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. **Nature**. v.468, n.7326, p.968-72, 2010.

HAN W, LO HW. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. **Cancer Letters**. v.318, n.2, p.124-34, 2012.

INCA. Câncer Melanoma - Instituto Nacional do Câncer. Capturado em 20 de novembro de 2012. **Online**. Disponível na Internet: <http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>

JONSSON A, TUOMINEN R, GRAFSTRÖM E, HANSSON J, EGYHAZI S. High frequency of p16(INK4A) promoter methylation in NRAS-mutated cutaneous melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**. v.130, n.12, p. 2809-17, 2010.

KAMB A, GRUIS NA, WEAVER-FELDHAUS J, *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. **Science**. v.264, p.436-40, 1994.

KIM JK, DIEHL JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. **Journal of Cellular Physiology**. v.220, n.2, p.292-6, 2009.

KO JM, VELEZ NF, Tsao H. Pathways to melanoma. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery** Inc. v.29, n.4, p.210-7, 2010.

KUDCHADKAR R, PARAISO KH, SMALLEY KS. Targeting mutant BRAF in melanoma: current status and future development of combination therapy strategies. **The Cancer Journal**. v.18, n.2, p.124-31, 2012.

LEEVERS SJ, PATERSON HF, MARSHALL CJ. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. **Nature**. v.369, n.6479, p.411-4, 1994.

LIN J, YANG Q, WILDER PT, CARRIER F, WEBER DJ. LIN. The calcium-binding protein S100B down-regulates p53 and apoptosis in malignant melanoma. **The Journal of Biological Chemistry**. v.285, n.35, p.27487-98, 2010.

LOPES P. Estatística aplicada à análise de resultados de ensaios de proficiência na avaliação de laboratórios. **Caderno de atividades Anvisa**. 2003.

MACKIE RM, BRAY C, VESTEY J, DOHERTY V, EVANS A, THOMSON D, NICOLSON M. Melanoma incidence and mortality in Scotland 1979-2003. **British Journal of Cancer**. v. 96, n.11, p.1772-7, 2007.

MCARTHUR GA, PUZANOV I, AMARAVADI R, RIBAS A, CHAPMAN P, KIM KB, SOSMAN JA, LEE RJ, NOLOP K, FLAHERTY KT, CALLAHAN J, HICKS RJ. Marked, homogeneous, and early [18F]fluorodeoxyglucose-positron emission tomography responses to vemurafenib in BRAF-mutant advanced melanoma. **Journal of Clinical Oncology**. v.30, n.14, p.1628-34, 2012 a.

MCARTHUR GA. The coming of age of MEK. **The Lancet Oncology**. v.13, n.8, p.744-5, 2012 b.

MCGILL GG, HORSTMANN M, WIDLUND HR, DU J, MOTYCKOVA G, *et al.* Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. **Cell**. v.109, p.707–718, 2002.

MEHNERT JM, KLUGER HM. Driver mutations in melanoma: lessons learned from bench-to-bedside studies. **Current Oncology Reports**. v.14, n.5, p. 449-57, 2012.

MILLER AJ, MIHM MC JR. Melanoma. **The New England Journal of Medicine**. v.355, n.1, p. 51-65, 2006.

MORENO M, SCHMITT RL, LANG MG, GHENO V. J. Epidemiological profile of patients with cutaneous melanoma in a region of southern Brazil. **Journal of Skin Cancer**. v.2012, p.917346, 2012.

NIKOLAEV SI, RIMOLDI D, ISELI C, *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. **Nature Genetics**. v.44, n.2, p.133-9, 2012.

OMHOLT K, PLATZ A, KANTER L, RINGBORG U, HANSSON J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. **Clinical Cancer Research**. v.9, n.17, p.6483-8, 2003.

PALMIERI G, CAPONE M, ASCIERTO ML, GENTILCORE G, STRONCEK DF, CASULA M, SINI MC, PALLA M, MOZZILLO N, ASCIERTO PA. Main roads to melanoma. **Journal of Translational Medicine**. v.14, n.7, p.86, 2009.

RASHEED S, MAO Z, CHAN JM, CHAN LS. Is Melanoma a stem cell tumor? Identification of neurogenic proteins in trans-differentiated cells. **Journal of Translational Medicine**. v.3, n.1, p.14, 2005.

SAUTER ER, YEO UC, VON STEMM A, *ET AL.* Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. **Cancer Research**. v.62, p.3200–6, 2002.

SCHMERLING RA, LORIA D, CINAT G, RAMOS WE, CARDONA AF, SÁNCHEZ JL, MARTINEZ-SAID H, BUZAID AC. Cutaneous melanoma in Latin America: the need for more data. **Revista Panamericana de Salud Pública**. v.30, n.5, p. 431-8, 2011.

SCHUBBERT S, SHANNON K, BOLLAG G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nature Reviews Cancer**. v.7, n.4, p. 295-308, 2007.

STAHL JM, CHEUNG M, SHARMA A, TRIVEDI NR, SHANMUGAM S, ROBERTSON GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. **Cancer Research**. v.63, p. 288190, 2003.

STARK MS, WOODS SL, GARTSIDE MG, et al. Frequent somatic mutations in MAP3K5 and MAP3K9 in metastatic melanoma identified by exome sequencing. **Nature Genetics**. v.44, p.1659, 2012.

SULLIVAN RJ, FLAHERTY KT. BRAF in Melanoma: Pathogenesis, Diagnosis, Inhibition, and Resistance. **Journal of Skin Cancer**. p.423-239, 2011.

TRYGGVADÓTTIR L, GISLUM M, HAKULINEN T, KLINT A, ENGHOLM G, STORM HH, BRAY F. Trends in the survival of patients diagnosed with malignant melanoma of the skin in the Nordic countries 1964–2003 followed up to the end of 2006. **Acta Oncologica**. v.49, p.665–72, 2010.

UONG A, ZON LI. Melanocytes in Development and Cancer. **Journal of Cellular Physiology**. v.222, n.1, p. 38-41, 2010.

VEIERØD MB, WEIDERPASS E, THÖRN M, HANSSON J, LUND E, ARMSTRONG B, ADAMI HO. A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. **Journal of the national cancer institute**. v.95, n.20, p. 1530–8, 2003.

VÍZKELETI L, ECSEDI S, RÁKOSY Z, OROSZ A, LÁZÁR V, EMRI G, KOROKNAI V, KISS T, ADÁNY R, BALÁZS M. The role of CCND1 alterations during the

progression of cutaneous malignant melanoma. **Tumor Biology**. v.33, n.6, p.2189-99, 2012.

WAN PT, GARNETT MJ, ROE SM, LEE S, NICULESCU-DUVAZ D, GOOD VM, JONES CM, MARSHALL CJ, SPRINGER CJ, BARFORD D, MARAIS R. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. **Cell**. v.116, n.6, p.855-67, 2004.

WHITEMAN DC, BRAY CA, SISKIND V, ET AL: A comparison of the anatomic distribution of cutaneous melanoma in two populations with different levels of sunlight: the west of Scotland and Queensland, Australia 1982-2001. **Cancer Causes Control**. v.18, p. 485-491, 2007.

WHITEMAN DC, WATT P, PURDIE DM, et al. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. **Journal of the national cancer institute**. v.95, p.806-812, 2003.

WIMAN KG. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. **Oncogene**. v.29, n.30, p.4245-52, 2010.

WOODS D, CHERWINSKI H, VENETSANAKOS E, BHAT A, GYSIN S, HUMBERT M, BRAY PF, SAYLOR VL, MCMAHON M. Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. **Molecular and Cellular Biology**. v.21, n.9, p.3192-205, 2001.

ZHOU XP, GIMM O, HAMPEL H, NIEMANN T, WALKER MJ, ENG C. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. **American Journal of Pathology**. v.157, p.11238, 2000.