

ANDRESSA ANTUNES PRADO DE FRANÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UM
DERIVADO DE DIBENZOILMETANO DE USO TÓPICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F814a
2013 França, Andressa Antunes Prado de, 1982-
Avaliação da atividade antimelanoma *in vitro* e *in vivo* de
um derivado de dibenzoilmetano de uso tópico / Andressa
Antunes Prado de França. – Viçosa, MG, 2013.
x,106f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.82-103.

1. Dibenzoilmetano. 2. Melanoma. 3. Rato como animal de
laboratório. 4. Tumores. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 547.61

ANDRESSA ANTUNES PRADO DE FRANÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UM
DERIVADO DE DIBENZOILMETANO DE USO TÓPICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2013.

Sérgio Luís Pinto da Matta

Gustavo Costa Bressan

Gaspar Diaz Muñoz

Abelardo Silva Junior

Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola pela oportunidade de cursar o doutorado e ter ensino público de qualidade.

À professora Marisa, que me recebeu em sua equipe com carinho no momento de crise e garantiu “meu lugar ao sol”. Depositou em mim sua confiança e me tornou uma pesquisadora melhor e mais digna. Agradeço a oportunidade de ter sido sua orientada!

Ao professor Abelardo, que me recebeu em seu laboratório e possibilitou a execução de todo o experimento, além de estar sempre disposto a ajudar. Sua contribuição foi imprescindível!

Ao professor Sérgio da Matta, pelas contribuições para este trabalho, por sempre me receber com alegria e me inspirar com todo seu ânimo. Espero poder lhe retribuir algum dia!

Ao professor Gaspar, por sua boa vontade, disponibilidade e serenidade para contribuir com este trabalho.

Ao professor Gustavo Bressan, pela participação na banca, e pelas contribuições ao trabalho.

À professora Virgínia, pelas idéias, questionamentos e direcionamentos, e pelas contribuições na banca de qualificação.

À professora Tânia, por me permitir utilizar sua estrutura, e me receber tão bem, e pelas contribuições na banca de qualificação.

Ao meu marido, João, por ser quem é, como é, e por me fazer querer ser melhor, e chegar mais longe. Sem você, sabemos que eu não teria chegado até o final.

À minha família. Meus pais queridos, Aurea e Paulo, que sempre me ensinaram a lutar, e não abaixar a cabeça diante das intempéries, e que

acreditaram tanto em mim. E ao meu irmão, Renan, por ser uma pessoa tão doce, e alegrar minha vida só pela sua existência.

Aos meus companheiros de trabalho, da Universidade do Estado de Minas Gerais, que estiveram ao meu lado durante todo este trajeto, e tanto me apoiaram, do início ao fim.

Aos colegas da Bioquímica e da Veterinária, e aos técnicos da Veterinária, obrigada pelos momentos e conhecimentos compartilhados, e por toda a ajuda. Ao Vitor, em especial, pela contribuição na síntese do composto. E ao Mateus, pela ajuda com as análises.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado todos esses anos de muito trabalho, e sempre me empurraram pra frente!

A todos que contribuíram de alguma forma para a execução e contribuição deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	3
1. OBJETIVO GERAL	3
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
III. REVISÃO DE LITERATURA	4
1. PELE.....	4
1.1 Epiderme	5
1.2 Lâmina basal	8
1.3 Derme.....	9
1.4 Melanócitos e melanogênese.....	10
2. CÂNCER	15
2.1 Câncer de pele	16
2.1.1 Melanoma.....	17
2.1.1.1 Vias de sinalização celular e melanoma.....	20
3. ANGIOGÊNESE E O MELANOMA	24
3.1 VEGF e seus receptores	25
3.2 Regulação da expressão de VEGF	31
4. ABSORÇÃO TRANSDÉRMICA DE MEDICAMENTOS	34
4.1 Vias de penetração cutânea de medicamentos.....	38
4.2 Fatores que afetam a penetração de drogas na pele	38
5. DERIVADOS DE DIBENZOILMETANO	40
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
1. SÍNTESE DO COMPOSTO 1,3-DIFENIL-2-BENZIL-1,3-PROPANODIONA.....	45
1.1 Procedimento geral de Alquilação	45
1.2 Ressonância Magnética Nuclear	45
2. PREPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O COMPOSTO	46
2.1 Gel transdérmico	46
3. CULTURA DE CÉLULAS	48
3.1 Tripsinização	48
3.2 Contagem do número de células viáveis.....	49

3.3 Criopreservação	49
3.4 Descongelamento	50
4. ATIVIDADE CITOTÓXICA MEDIDA PELO ENSAIO DO MTT	50
5. MODELO DE MELANOMA MURINO.....	53
6. TRATAMENTO	54
7. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE TECIDO COLETADAS.....	55
7.1 Avaliação de parâmetro sanguíneo.....	55
7.2 Avaliação histológica do tumor.....	55
7.3 Análise das amostras de fígado e rim	56
7.4 Análise das amostras de pulmão	56
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
VI. CONCLUSÕES.....	80
VII. PERSPECTIVAS	81
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS	104

RESUMO

FRANÇA, Andressa Antunes Prado de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Avaliação da atividade antimelanoma *in vitro* e *in vivo* de um derivado de dibenzoilmetano de uso tópico.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz.

O câncer, atualmente, é a segunda causa de morte por doenças no Brasil, e o câncer de pele do tipo melanoma é a principal causa de morte dentre as afecções da pele. Neste sentido, considerando-se o impacto social e relevância da doença, buscaram-se novas opções de terapias que sejam mais eficazes contra esses agravos. Os dibenzoilmetanos constituem uma classe de compostos que vem sendo amplamente investigada, devido às suas já conhecidas propriedades fotoprotetoras, anti-inflamatórias e antitumorais. Assim, o presente estudo teve como objetivo a avaliação das propriedades antimelanoma de um derivado de dibenzoilmetano com finalidade de aplicação tópica. O composto 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona foi sintetizado a partir de 1,3-difenil-1,3-propanodiona (dibenzoilmetano). Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade com MTT foram realizados com 3×10^3 células plaqueadas por poço em placas de 96 poços, e o composto nas concentrações 0,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL, com tratamento das células por 48h. O composto apresentou IC₅₀ de 53,05 µg/mL para as células da linhagem B16F10, derivadas de melanoma murino, e 225,5 µg/mL para as células da linhagem melan-A, derivadas de melanoblastos normais murino, com índice de seletividade de 4,25. Isto significa que o composto é 4,25 vezes mais seletivo para as células de melanoma do que para os melanócitos, o que indica potencial terapêutico para testes *in vivo*. O teste *in vivo* foi realizado com base em um modelo de melanoma murino, utilizando-se camundongos da linhagem C56Bl/6, com inoculação subcutânea de 1×10^5 células B16F10 na região cervical, e tratamento tópico no mesmo sítio onde foi induzido o tumor. O tratamento foi realizado utilizando-se um gel transdérmico, contendo o composto nas concentrações de 1 mg/mL e 3 mg/mL, e 2% de Aristoflex® como agente gelificante, 5% de propilenoglicol como umectante, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) como promotor de absorção e álcool 70% como

inibidor microbiano (q.s.p). O tratamento foi iniciado 24 horas após a indução do tumor, e durou 21 dias. Terminado este período, os animais foram eutanasiados, e foram coletados o tumor, fígado, rim e pulmões dos animais para análises histológicas, além do sangue, para análise do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) do soro. A avaliação do volume tumoral indicou diferenças significativas entre os animais não tratados e os animais tratados, com os animais tratados apresentando menores tumores. Além disso, o VEGF também se apresentou aumentado nos animais não tratados, o que pode representar um possível mecanismo pelo qual o composto esteja agindo sobre as células tumorais. A avaliação histológica das amostras de tumor mostraram amplas áreas necróticas no material coletado a partir dos animais tratados, e indicativos de morte celular por apoptose. Ademais, o fígado se apresentou mais preservado nos animais tratados do que nos animais doentes sem tratamento, ou tratados com a formulação sem o composto ativo (branco). Nas amostras de rim não foram encontradas alterações histológicas, e nas amostras de pulmão, não foi identificado nenhum foco de metástase. A partir destes resultados, pode-se concluir que o composto apresentou significativo papel terapêutico contra o melanoma, com base na rota de distribuição transdérmica da droga.

ABSTRACT

FRANÇA, Andressa Antunes Prado de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. ***In vitro* and *in vivo* antimelanoma activity evaluation of a dibenzoylmethane derivative of topical use.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Currently, cancer is the second main cause of death by disease in Brazil, and melanoma type skin cancer is the main cause of death among skin conditions. This way, considering the social impact and relevance of this disease, new options of more effective therapy against such aggravation are sought. Dibenzoylmethanes constitute a class of compounds which has been broadly studied due to their already known photoprotective, antiinflammatory and antitumoral properties. Thus, the present study aimed to evaluate antimelanoma properties of a dibenzoylmethane derivative with the purpose of topic application. The compound 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione was synthesized from 1,3-diphenyl-1,3-propanedione (dibenzoylmethane). The *in vitro* cytotoxicity assay with MTT was performed with 3×10^3 cells plated per well in 96-well plates, and the compound in 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ concentrations, with cells being treated for 48 hours. The compound show IC_{50} of 53.05 $\mu\text{g/mL}$ for B16F10 cell line, derived from murine melanoma, and 225.5 $\mu\text{g/mL}$ for melan-A cell line, derived from murine normal melanoblastos, with a selectivity index of 4.25. This indicates the compound is 4.25-fold more selective to melanoma cells in comparison to melanocytes, which indicates its therapeutic potential for *in vivo* assays. The *in vivo* assay was based on a murine melanoma model, using C57Bl/6 strain mice, with subcutaneous inoculation of 1×10^5 B16F10 cells in cervical region, and topical treatment at the same site the tumor was induced. Treatment was performed by using a transdermal gel, containing the compound at 1 mg/mL and 3 mg/mL concentrations, and 2% of Aristoflex® as gelifying agent, 5% of propylene glycol as humectant, 10% of dimetyl sulfoxide (DMSO) as absorption promoter and alcohol 70% as microbial inhibitor (q.s.p.). Treatment was initiated 24 hours after tumor cells were inoculated, and lasted 21 days. After such period, animals were euthanized and tumor, liver, lung and kidney samples were

harvested for histological analyses, besides blood for vascular endothelial growth factor (VEGF) serum analysis. Tumor volume evaluation indicated significant differences between treated and untreated animals, with treated animals presenting smaller tumors. Moreover, serum VEGF was also higher in untreated animals, what can represent a possible mechanism by which compound acts on tumor cells. Tumor samples histological evaluation showed large necrotic areas in the material collected from treated animals, as well as indications of cell death by apoptosis. Besides, liver was better preserved in treated animals than in sick animals without treatment, or treated with formulation without the active compound (white). In kidney samples, no significant histological alterations were found, and in lung samples, no metastasis sites were identified. From these results, we can conclude the compound presented a significant therapeutic role against melanoma, based on transdermal route of drug distribution.

I. INTRODUÇÃO

O câncer, ou a neoplasia maligna (também conhecido como *tumor maligno*) pode ser conceituado como uma massa de tecido cujo crescimento excessivo ocorre fora da coordenação tecidual normal, e que persiste mesmo após a cessação do estímulo que o desencadeou. Trata-se de um crescimento autônomo, afinalístico e que compete com o organismo hospedeiro pelo seu suprimento nutricional e energético (COTRAN et al., 2004; MCGEE et al., 1992; WILLIS, 1952).

Desde 2003, o câncer revela-se no Brasil como a segunda causa de mortalidade na população, correspondendo a 17% dos óbitos por doença. Considerando-se separadamente as regiões, somente na região nordeste o câncer representa a terceira causa de morte por doença. Nas demais regiões, segue-se às doenças cardiovasculares como causa de morte, com incidência maior na região sul. Os principais motivos que levam ao grande número de casos são o aumento da expectativa de vida da população em geral, associada à maior exposição a fatores de risco (INCA, 2010).

Os tipos mais comuns de câncer são os de pele, mama feminina, próstata, pulmão e estômago, sendo que o primeiro apresenta a maior incidência no Brasil, apesar de seu menor índice de letalidade, com exceção do melanoma (SIMPLÍCIO et al., 2002).

Assim, o câncer é hoje um dos grandes inimigos da humanidade, tornando-se necessário encontrar novas formas de terapia e também novos processos de diagnóstico que identifiquem os tumores com maior rapidez e eficiência (VILELA, 1998).

O melanoma é um tipo de câncer de pele de origem neuroectodérmica de baixa incidência e alta mortalidade associada, constituindo a primeira causa de morte por doenças de pele. Em associação à elevada mortalidade, sua incidência tem apresentado aumento contínuo nas últimas décadas em países industrializados. No Brasil, estima-se que, aproximadamente, 4.000 novos casos sejam diagnosticados todos os anos (CARVALHO, 2004). Ademais, o melanoma chama atenção por sua agressividade, devido a seu grande potencial de produzir metástases (LEBSA-WEBER, 2007).

Segundo Brasileiro Filho (2006), o melanoma pode se formar a partir de pele saudável ou a partir de lesões pré-existentes, como os nevos pigmentados (“pintas”), iniciando-se como uma lesão que aumenta de tamanho (extensão e/ou profundidade), sendo conhecidos diversos fatores de risco para seu aparecimento, como pele clara, exposição excessiva à luz do sol, exposição à luz ultravioleta (como em sessões de bronzeamento artificial), além de histórico familiar e a presença de lesões pré-existentes (LOPES, 2005).

Na constante busca por novas terapias eficazes para o tratamento do melanoma, os dibenzoilmetanos (DBM) (1,3-difenilpropano-1,3-diona) se tornaram foco de estudos devido à suas propriedades fotoprotetoras e antitumorais (KHOR et al., 2009; NAKANO et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2003; SINGLETARY et al., 1998). Os DBMs são pequenas β -dicetonas raramente encontrados na natureza, podendo ser isolados de algumas espécies de *Lonchocarpus*, constituindo uma subclasse de flavonóides (MAGALHÃES; NOGUEIRA, 1997; NOGUEIRA et al., 2003).

Considerando as prerrogativas acima, com o objetivo de contribuir para as pesquisas na área do câncer de pele, o presente estudo visou explorar as propriedades antimelanoma de um derivado de dibenzoilmetano sob uso tópico.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O presente projeto visou avaliar a atividade antimelanoma de um derivado de dibenzoilmetano de uso tópico, *in vitro* e *in vivo*.

2. Objetivos específicos

- Realizar testes *in vitro* que indiquem o papel antiproliferativo do composto utilizado sobre células derivadas de melanoblastos murinos, bem como sobre células singênicas, derivadas de melanoma murino;
- Determinar o índice de seletividade do composto a partir dos dados obtidos previamente, como indicativo para a adequação de testes *in vivo* com o composto;
- Realizar testes *in vivo*, utilizando camundongos C57BL/6 para avaliar a atividade antimelanoma do composto, sendo aplicado de forma tópica, próximo ao sítio de indução do tumor;
- Avaliar o efeito do tratamento sobre o volume tumoral;
- Avaliar o efeito do tratamento sobre os níveis de VEGF, em comparação a animais sem o tratamento com o composto ativo, e relacionar o papel deste fator de crescimento aos mecanismos de melanomagenese.

III. REVISÃO DE LITERATURA

1. Pele

É imprescindível ressaltar que a pele constitui o foco principal do presente trabalho, uma vez que tratamos de um agravo que tem origem a partir de um tipo celular específico da epiderme, e nossa proposta terapêutica também se baseia na própria pele como rota de distribuição da droga estudada.

A pele humana, o maior órgão do corpo (CEVC; VIERL, 2010), atingindo até 16% de seu peso, constitui seu revestimento externo, e consiste basicamente de uma camada de epiderme celular estratificada de origem ectodérmica e uma derme subjacente de tecido conjuntivo de origem mesodérmica. Em algumas regiões do corpo, como na palma das mãos e na planta dos pés, apresenta-se espessada. A maior parte do corpo, entretanto, é protegida por pele fina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MCGRATH; EADY; POPE, 2010).

Abaixo da pele, em continuidade com a derme, encontra-se uma camada de tecido conjuntivo frouxo que pode conter muitas células adiposas, conhecido como hipoderme, ou tecido celular subcutâneo. Esse tecido, apesar de não fazer parte da pele, exerce a função de lhe unir com os tecidos subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Além de sua função como revestimento externo, a pele também protege o organismo contra a perda de água e contra o atrito, recebe informações relacionadas ao ambiente externo e as transmite ao sistema nervoso central, por meio dos variados tipos de receptores sensoriais presentes em sua estrutura, e colabora na termorregulação do corpo, através de vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e pêlos presentes em sua constituição.

A melanina, pigmento produzido e acumulado na pele, determinando sua cor, também tem função fotoprotetora. Ademais, é na pele que se forma a vitamina D₃, através da ação da radiação ultravioleta sobre 7-deidrocolesterol, um precursor sintetizado pelo próprio organismo e presente no tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

1.1 Epiderme

A epiderme (Figura 1), camada mais superficial da pele, é formada por tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado, contendo quatro tipos celulares principais, que serão descritos mais adiante. O tipo celular mais abundante, constituindo até 90% das células epidérmicas, são os queratinócitos, que se movem progressivamente a partir da camada basal da epiderme em direção a sua superfície, formando várias camadas bem definidas durante esse processo, e possuem capacidade de sintetizar queratina (DOWNING, 1992). A queratina é uma proteína fibrosa dura que têm importância na proteção da pele e dos tecidos subjacentes contra agentes externos, como calor, microorganismos e diversas substâncias químicas. Além dos queratinócitos, são encontrados também melanócitos (responsáveis pela produção da melanina), células de Langerhans, e células de Merckel (MCGRATH; EADY; POPE, 2010; TORTORA; DERRICKSON, 2010).

Na epiderme, se identificam duas regiões funcionais distintas: a epiderme viável, formada por uma camada viva hidrofílica (70% de água) e o estrato córneo, uma camada hidrofóbica (13% de água) constituída de queratinócitos mortos (BOLZINGER et al., 2012). A epiderme pode ser estruturalmente dividida em camadas, com base na morfologia celular dos queratinócitos em seus diferentes estágios de desenvolvimento, a saber: camada basal (ou germinativa), camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida (onde presente), e camada córnea (BAROLI, 2009; ODLAND, 1991).

A camada basal ou germinativa, mais profunda, é normalmente da espessura de uma única camada contínua de células, contendo queratinócitos de morfologia colunar ou cúbica, células-tronco formadoras de novos queratinócitos, além de melanócitos, que produzem a melanina que dá cor à pele, e células de Merckel mecanorreceptoras (MCGRATH; EADY; POPE, 2010). As células basais apresentam núcleo volumoso, citoplasma denso, rico em ribossomos, são basófilas, e seu citoesqueleto contém muitos filamentos intermediários de queratina que se fixam aos desmossomos que fazem a

interação entre as células desse estrato, e aos hemidesmossomos que interagem com a membrana basal posicionada entre a epiderme e a derme, fazendo sua ancoragem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; TORTORA; DERRICKSON, 2010).

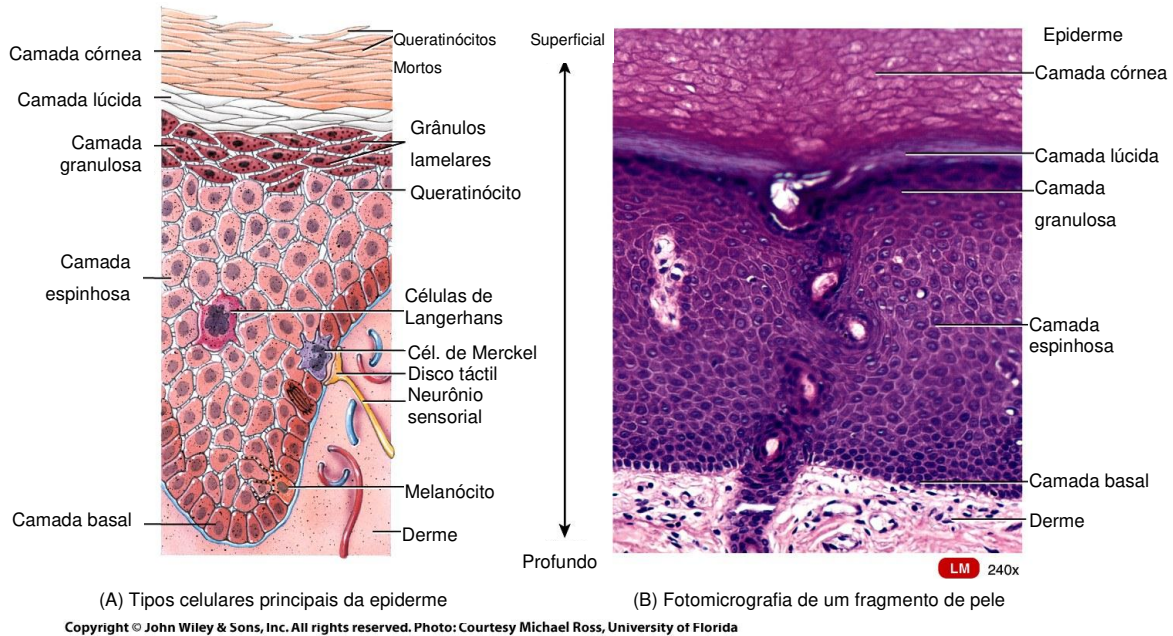


Figura 1 - A - esquema das camadas que constituem a epiderme; B – fotomicrografia de secção histológica da epiderme (Fonte: Tortora; Derrickson, 2010).

A camada espinhosa é constituída por 8 a 10 fileiras de queratinócitos cubóides ou ligeiramente achatados. Estas células apresentam citoplasma com curtas expansões contendo feixes de queratina, que também fazem a ancoragem entre células vizinhas por meio de interações com os desmossomos, auxiliando a manutenção da coesão tecidual, e conferindo-lhe resistência ao atrito exercido sobre a pele (TORTORA; DERRICKSON, 2010). Essa camada apresenta, também, as células de Langerhans, que são originadas a partir da medula óssea e têm capacidade de apresentação de antígeno, estimulando os linfócitos T do sistema imunológico, e possuindo, assim, importante papel nas reações imunitárias cutâneas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Mais superficial à camada espinhosa pode-se identificar a camada granulosa, formada por 3 a 5 fileiras de queratinócitos mais achatados que se apresentam em intenso processo de apoptose. Nesse estágio, o núcleo se

torna apoptótico, outras organelas começam a se degenerar, e os tonofilamentos de queratina se tornam mais aparentes (TORTORA; DERRICKSON, 2010). Essas células apresentam, também, estruturas conhecidas como grânulos lamelares, importantes no processo de impermeabilização da pele. Ademais, o citoplasma dessas células apresenta grânulos basófilos contendo uma proteína chamada querato-hialina, rica em histidina fosforilada (MCGRATH; EADY; POPE, 2010). Durante esse processo de queratinização (ou cornificação) que sofrem os queratinócitos enquanto migram da camada basal para as camadas superiores da epiderme, a querato-hialina parece formar a matriz entre os filamentos de queratina, e pode contribuir para sua agregação (DOWNING, 1992).

A camada lúcida encontra-se mais evidente na pele espessa de regiões como as pontas dos dedos, palma das mãos e planta dos pés. Suas células eosinófilas e translúcidas apresentam membrana plasmática espessa, com desmossomos bastante evidentes, e ausência de núcleo e organelas citoplasmáticas, já digeridos por enzimas lisossomais. O citoplasma é rico em filamentos de queratina compactados e envolvidos por material elétron-denso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; TORTORA; DERRICKSON, 2010).

O estrato mais superficial da pele, em contato direto com o ambiente externo, é a camada córnea, que consiste de células praticamente planas e inertes, denominadas corneócitos, com 0,3 a 0,5 μm de espessura e que se apresentam verticalmente dispostos em colunas penta a heptagonais. Cada coluna contém entre 15 e 22 camadas celulares embebidas em uma matriz extracelular bem especializada (CEVC; VIERL, 2010). Essas células anucleadas contêm citoplasma composto essencialmente de filamentos de queratina alinhados em macrofibras por pontes de dissulfeto, sob a influência de filagrina, a proteína que compõe o grânulo de querato-hialina (MCGRATH; EADY; POPE, 2010). Essa camada apresenta, ainda, duas regiões distinguíveis com base na integridade de seus corneodesmossomos: a região compacta, e a região disjunta, mais externa (BAROLI, 2009). A matriz extracelular apresenta-se repleta de lipídios oriundos dos grânulos lamelares (MCGRATH; EADY; POPE, 2010).

Os lipídios intercelulares dessa camada podem ser compreendidos em quatro categorias: colesterol e seus derivados, ceramidas, ácidos graxos livres, e triglicérides. A maior parte desses lipídios são anfifílicos, e a hidrofobicidade de suas cabeças se deve à presença de grupamentos hidroxila, os quais podem formar interações de hidrogênio com os lipídios adjacentes ou com a água (MCGRATH; EADY; POPE, 2010).

1.2 Lâmina basal

Na região de transição entre a epiderme e derme, fazendo junção entre as duas camadas, pode-se identificar uma estrutura visível por meio do microscópio eletrônico denominada lâmina basal. Essa estrutura aparece como uma camada elétron-densa de 20 a 100 nm de espessura, sendo constituída por delgadas fibrilas (lâmina densa), que podem ser intercaladas por camadas elétron-lucentes em um ou em ambos os lados, denominadas lâminas lúcidas. Os principais componentes da lâmina basal incluem colágeno tipo IV, laminina, entactina (duas glicoproteínas) e proteoglicanos, como o perlecan, por exemplo. A composição molecular desses componentes pode variar entre diferentes tecidos e até mesmo dentro de diferentes regiões do mesmo tecido. A ancoragem da lâmina basal ao tecido conjuntivo subjacente se faz por meio de fibrilas de ancoragem constituídas por colágeno tipo VII (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A estrutura descrita nesta seção não é encontrada somente em tecidos epiteliais, aparecendo também na região de contato entre outros tipos celulares e tecido conjuntivo, ao redor de células musculares, células adiposas, células de Schwann, e entre camadas epiteliais adjacentes, ou muito próximas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Além de seu papel estrutural, as lâminas basais participam em processos de reparo, proliferação, diferenciação e migração celular. Ademais, são capazes de manter a polaridade e diferenciação das células da pele, e também servem como barreira para a metastatização de células tumorais (OLIVEIRA et al., 2002) e para regulação da transferência de materiais (BRIGGAMAN; WHEELER, 1975).

1.3 Derme

A derme, camada subjacente à epiderme, e que faz sua união ao tecido celular subcutâneo (hipoderme), é constituída por tecido conjuntivo resistente, apresentando estrutura complexa formada por fibras elásticas e colágenas, além de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas de adesão, como fibronectina, laminina e integrinas (SAMPAIO; RIVITTI, 1988). Apresenta espessura variável, podendo chegar a 3 mm em regiões de pele espessa, como na planta do pé (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Essa camada da pele apresenta extensas redes vasculares, além de sensíveis terminações nervosas capazes de identificar sensações de dor, temperatura e pressão. Podem ser encontrados, também, elementos anexos que derivam da epiderme, como unhas e pêlos, e glândulas sebáceas, sudoríparas e ceruminosas (TORTORA; DERRICKSON, 2010; CUCÉ; FESTA NETO, 2001).

Sua superfície se apresenta irregular, com saliências acompanhando as reentrâncias formadas na epiderme. Essas saliências são as papilas dérmicas, que servem para aumentar a superfície de contato entre derme e epiderme e reforçar sua união. Quanto maior for o atrito e a pressão aos quais a pele é submetida, maior é o número de papilas dérmicas encontradas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Na derme, pode-se identificar duas regiões distintas, porém de limites pouco definidos, as regiões papilar e reticular. A região papilar é a mais superficial, representando aproximadamente um quinto da espessura total da camada, sendo composta de tecido conjuntivo frouxo com fibras elásticas finas e colágenas estreitas. Ademais, as papilas dérmicas alojam capilares, corpúsculos táteis e terminações nervosas livres.

A região reticular, por sua vez, compreende a maior parte da derme, sendo composta de tecido conjuntivo denso não modelado, com feixes de fibras colágenas e algumas fibras elásticas espessas. Nessa região, entre as fibras, são encontrados algumas células adiposas, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, e nervos (TORTORA; DERRICKSON, 2010).

1.4 Melanócitos e melanogênese

Melanócitos são as células presentes na epiderme responsáveis pela pigmentação da pele, pêlos e íris dos olhos, uma vez que produzem uma classe de polímeros policíclicos conhecidos como melanina, que dá cor aos elementos supracitados. Essas células, que representam somente 5% das células da pele, derivam da crista neural como precursores não pigmentados denominados melanoblastos, que expressam marcadores típicos da linhagem melanocítica, especificamente o receptor tirosina-quinase Kit e o fator de transcrição MITF (*Microphthalmia associated transcription factor*), essenciais para a sobrevivência do melanoblasto durante seu desenvolvimento (CHARTERS, 2007; GODING, 2007).

O papel dos melanócitos na pigmentação se apresenta conservado entre diferentes espécies (LIN; FISHER, 2007). O aparecimento de fenótipos pigmentares óbvios decorrentes de mutações que afetem a função dos melanócitos acaba servindo como ferramenta facilitadora para as pesquisas relacionadas à função deste tipo celular, que tem sido cada vez mais utilizado como modelo de estudo para uma ampla variedade de processos, desde transporte celular até a fisiologia de doenças (GODING, 2007). Tais fenótipos mutantes podem ser caracterizados como hipo ou hiperpigmentações, com ou sem o aumento do número de melanócitos (LIN; FISHER, 2007).

Melanócitos se localizam na epiderme, na camada basal ou germinativa, entre os queratinócitos, apresentando uma face de contato com a derme. São células dendríticas relativamente grandes, com ausência de tonofilamentos e desmossomos, e que se distinguem pela presença de organelas densas e arredondadas próximas à membrana celular e abundantes no citoplasma, onde interagem com a rede de microtúbulos que se estendem pelos prolongamentos dendríticos da célula. Essas organelas são os melanosomos, e são responsáveis pela síntese da melanina. Além disso, através de seus prolongamentos dendríticos, os melanócitos interagem com cerca de 36 queratinócitos adjacentes, tanto na camada basal como na camada espinhosa, de modo a maximizar a distribuição de melanina (CHARTERS, 2007).

O processo de melanogênese (Figura 2) é desencadeado, principalmente, a partir da detecção de danos ao DNA nos queratinócitos, causados principalmente pela radiação ultravioleta, o que leva à síntese acentuada de hormônios estimuladores de melanócitos (MSH) a partir do gene *POMC* (proopiomelanocortina) (LAW et al., 2012). Os raios ultravioleta causam danos ao DNA de forma direta (radiação ultravioleta B) ou indireta (radiação ultravioleta A). A radiação UVB (comprimentos de onda entre 290 a 320 nm) causa quebras nas bases timidinas do DNA, pela absorção de fótons, resultando em subprodutos como dímeros de pirimidina ciclobutano (LIN; FISHER, 2007; PANICH, 2011). Já a radiação UVA, de maior comprimento de onda (320 a 400 nm), atinge a derme, e os fótons UVA são absorvidos por cromóforos (grupos funcionais que absorvem radiação eletromagnética), podendo induzir à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas, por sua vez, têm a capacidade de induzir danos ao DNA pela formação de produtos mutagênicos reativos de ácido desoxirribonucleico, como 8-hidroxidesoxiguanosina, quebras de fita única no DNA e ligações cruzadas entre DNA e proteína (PANICH, 2011).

Os peptídeos derivados da proopiomelanocortina (hormônios estimuladores de melanócitos, ou MSH), cuja síntese a partir do gene *POMC* é acentuada pelos danos causados no DNA pela radiação UV (SCHAUER et al., 1994), atuam como estimuladores parácrinos do processo de melanogênese. Tais peptídeos exercem seu efeitos sobre a melanogênese por meio de sua ligação a uma classe de receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrana, denominados receptores de melanocortina 1 (MC1R). Quando ligado ao seu agonista, este receptor induz a produção de cAMP (adenosina monofosfato cíclico), pela ativação de adenililciclase, levando à fosforilação de fatores de transcrição da família CREB (elementos responsivos à cAMP). Esta família de fatores de transcrição ativa genes variados, dentre eles o que codifica o fator de transcrição associado a microftalmia (MITF), que regula a expressão de genes relacionados à melanogênese, além de genes envolvidos no controle do ciclo celular (LAW et al., 2012; LIN; FISHER, 2007). Dentre os genes supramencionados, incluem-se os genes *OCA2* (albinismo oculocutâneo tipo 2) e *SLC45A2* (carreador de soluto da família 45, membro 2), necessários

para o adequado empacotamento de enzimas envolvidas na síntese da melanina nos melanossomos, como a tirosinase (TYR) e a proteína 1 relacionada a tirosinase (TYRP1 ou TRP-1) (LAW et al., 2012).

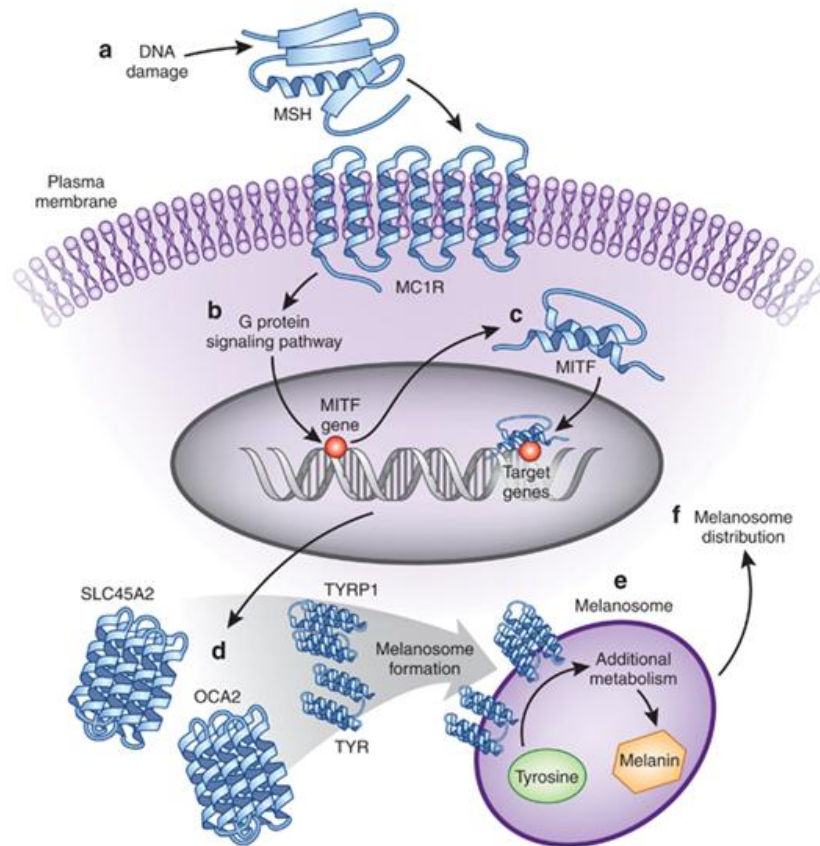


Figura 2 – Via de sinalização estimulatória da melanogênese. Em **a**, os danos ao DNA desencadeiam a liberação de hormônios estimuladores de melanócitos (MSH), que ativam receptores acoplados a proteína G (**b**), os receptores de melanocortina 1 (MC1R), e conseqüentemente, a expressão (**c**) do fator de transcrição associado a microftalmia (MITF). O MITF regula a expressão de genes associados à melanogênese (**d**), regulando a síntese e empacotamento da melanina nos melanossomos (**e**) e sua distribuição (**f**) (Fonte: LAW et al., 2012).

Os melanossomos, organelas características dos melanócitos e similares a lisossomos, produzem duas classes distintas de melanina, o pigmento escuro ou amarronzado chamado eumelanina, derivado de indóis, e o pigmento avermelhado ou amarelado denominado feomelanina, derivado de alanilhidroxibenzotiazina (AHB) (CHARTERS, 2007; LIN; FISHER, 2007). Existem algumas variações estruturais entre os melanossomos que produzem

cada classe de melanina, sendo que os que produzem a eumelanina são ovoides e apresentam matriz lamelar, diferindo, assim, dos melanossomos produtores de feomelanina, que são mais arredondados e não possuem matriz lamelar. Ambos os tipos podem ser encontrados na mesma célula, e podem ser interconversíveis (CHARTERS, 2007).

Essas organelas apresentam características estruturais e de sua formação muito semelhantes às dos lisossomos, sendo ligados à membrana em um ambiente ácido, além de conter proteínas de membrana associadas a lisossomo (LAMPs). A formação dos melanossomos também tem relação com a rede trans-Golgi, se formando como vesícula transportadora de proteínas de matriz (CHARTERS, 2007).

A síntese de ambos os tipos de melanina (Figura 3) tem origem em uma via comum, dependente de tirosinase (TYR), com o mesmo precursor, a tirosina, sendo a cisteína também necessária para a síntese das feomelaninas (LIN; FISHER, 2007). A tirosinase é uma glicoproteína localizada na membrana do melanossomo que apresenta um domínio interno ao melanossomo com atividade catalítica, seguido de um curto domínio transmembrana e um domínio citoplasmático de aproximadamente 30 aminoácidos. O domínio catalítico (interno) ao melanossomo apresenta resíduos de histidina que se ligam a íons cobre, necessários para a atividade da tirosinase (GILLBRO; OLSSON, 2011).

A atividade sintética tem início a partir de uma etapa obrigatória, a hidroxilação da L-tirosina a 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) catalisada pela tirosinase. DOPA, então, tem seu *o*-difenoil oxidado a DOPAquinona, reação que também é catalisada pela enzima tirosinase na espécie humana. Essas reações são limitantes para a síntese em geral, o que estabelece a tirosinase como um importante alvo regulatório (CHARTERS, 2007; GILLBRO; OLSSON, 2011).

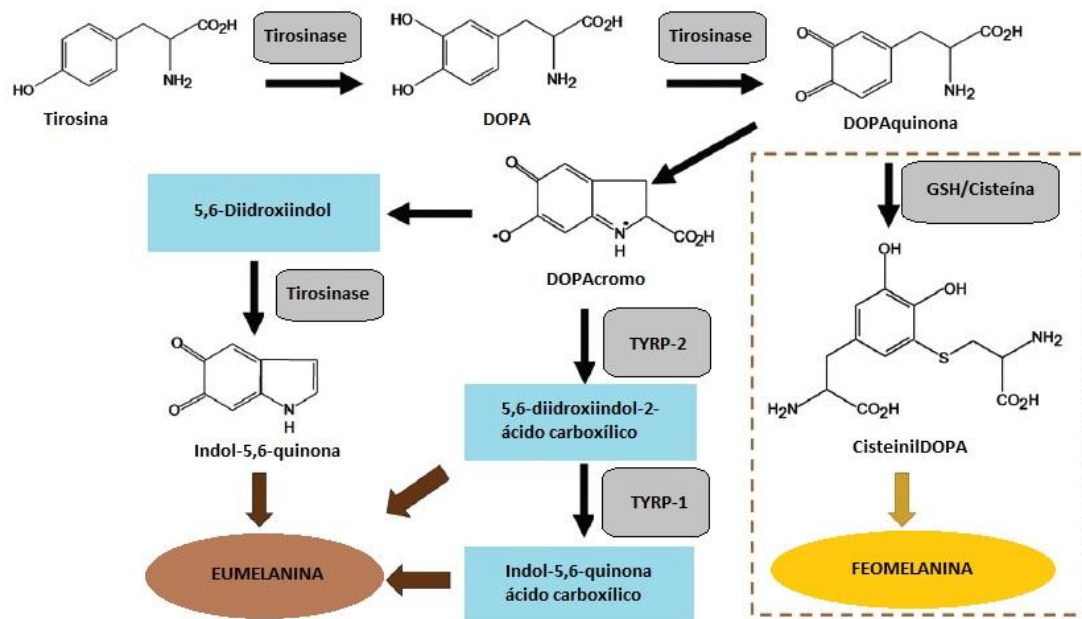


Figura 3 – Melanogênese (Fonte: PANICH, 2011).

Após a formação da DOPAquinona, a melanogênese pode se direcionar a duas vias diferentes, que darão origem a feomelanina ou à eumelanina. Na presença de cisteína, ou glutatona, a DOPAquinona é rapidamente reduzida a cisteinilDOPA. Esta, por sua vez, é convertida a alanina-hidroxi diidrobenzotazina, e é polimerizada a feomelanina. A feomelanina é mais fotolábil e pode dar origem, em seus subprodutos, a radicais livres responsáveis por estresse oxidativo, que pode causar danos ao DNA da célula (GILLBRO; OLSSON, 2011). Assim, a presença de cisteína ou outro tiol redutível, como a glutatona, é determinante para a classe de melanina que será produzida pela célula (CHARTERS, 2007).

Na ausência de cisteína, DOPAquinona sofrerá um fechamento espontâneo do anel, formando DOPAcromo (CHARTERS, 2007), que pode ser lenta e espontaneamente descarboxilado, sendo convertido a 5,6-diidroxiindol (DHI), ou por atividade enzimática, a ácido 5,6-diidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), pela ação da DOPAcromo tautomerase (DCT), também conhecida como proteína relacionada a tirosinase 2 (TYRP-2) (GILLBRO; OLSSON, 2011). Na presença da DCT, ácido 5,6-diidroxi-indol-2-carboxílico é o produto predominante (CHARTERS, 2007).

Há duas classes de proteínas relacionadas à tirosinase: a TRP-1 (ou TYRP-1) e a TRP-2 (ou TYRP-2), que apresentam 40-50% de homologia com a tirosinase (LIN; FISHER, 2007). Estudos indicam que a TRP-1 aumenta a proporção de eumelanina em relação a feomelanina, além das indicações de que ambas as TRPs aumentam a estabilidade da tirosina, também estando presentes na membrana do melanossomo (GILLBRO; OLSSON, 2011).

A oxidação dos indóis forma 5,6-indolquinona (IQ) e 5,6-indolquinona-2-ácido carboxílico (IQCA), que polimerizam, dando origem a eumelanina. Esta etapa pode ocorrer de forma espontânea, ou por influência de proteínas do melanossomo ou ainda pelo pH da própria organela (CHARTERS, 2007).

Melanócitos podem sintetizar tanto eumelanina quanto a feomelanina, sendo esta proporção determinada por variáveis como a disponibilidade da tirosinase e agentes redutores contendo sulfidril na célula. Após a síntese, a melanina é transportada dentro do melanossomos para os queratinócitos adjacentes, através dos prolongamentos dendríticos do melanócito (LIN; FISHER, 2007).

A melanina apresenta papel importante na homeostase da pele, além de constituir uma barreira física contra radiação ultravioleta (UV), sendo que a eumelanina apresenta capacidade de capturar e remover radicais livres, como ânions superóxido, oxigênio simpleto, e peróxido de hidrogênio. A feomelanina não possui a mesma capacidade, podendo até mesmo liberar radicais livres por ação da radiação UV. Esta classe de polímero, graças a suas cargas negativas, apresenta, ainda, habilidade para se ligar a amins e metais pesados (GILLBRO; OLSSON, 2011).

2. Câncer

As neoplasias ou tumores malignos, comumente agrupados na classe de doenças conhecidas como “câncer”, consistem em massas de tecido cujo crescimento excessivo ocorre fora da coordenação dos tecidos normais, e que persiste mesmo após a cessação do estímulo que o desencadeou. É um crescimento autônomo, afinalístico e que compete com o organismo hospedeiro pelo seu suprimento nutricional e energético (WILLIS, 1952;

MCGEE et al., 1992; COTRAN et al., 2004). Esta denominação é dada, atualmente, a um grupo de mais de 100 doenças com características relacionadas, tais como a capacidade de invadir tecidos adjacentes e também de formar metástases, que são tumores secundários, em sítios não relacionados ao tumor primário (INCA, 2011).

A carcinogênese, que consiste no processo de formação de um tumor, compreende múltiplos estágios que ocorrem por alterações genéticas acumuladas ao longo das gerações celulares e culminam na formação de tumores (NERY, 2004). Em geral, estas células apresentam vantagens em relação à proliferação e resistência aos mecanismos responsáveis pela morte celular, o que resulta na manutenção e desenvolvimento das células cancerosas no tecido de origem. Com o tempo, as células geneticamente alteradas podem adquirir a capacidade de invadir áreas adjacentes, promovendo alterações no microambiente tecidual, como por exemplo, o aumento da atividade de enzimas proteolíticas, e a formação de novos vasos (angiogênese) e de focos de metástase. O processo de formação de metástases consiste no comprometimento de outros locais do organismo sem relação com o tumor primário via corrente sanguínea ou linfática, sendo esta característica responsável pela morte de duas em cada três pessoas com câncer (CHAMMAS et al., 2003).

2.1 Câncer de pele

O câncer de pele, o mais incidente dentre a população brasileira, pode ser de dois tipos principais: melanoma e o não melanoma, sendo o último encontrado em dois subtipos, o carcinoma basocelular e o carcinoma epidermóide ou espinocelular. O tipo não melanoma, apesar de ser o de maior incidência, possui um nível alto de cura, por ser fácil de diagnosticar no início do seu desenvolvimento (INCA, 2011).

As pessoas que estão mais propensas ao desenvolvimento ao câncer de pele são aquelas portadoras do xeroderma pigmentoso, deficiência genética que vai impedir a reparação dos danos provocados pela exposição dos raios ultravioleta. Pessoas mulatas ou negras raramente desenvolvem este tipo de

câncer, e quando ocorre o tumor, este se desenvolve em locais com ausência de pigmentação como a palma da mão e a planta do pé. Pessoas albinas, que não produzem melanina, de maneira geral, acabam desenvolvendo o câncer de pele (SOUZA, 2004).

O carcinoma basocelular tem a sua origem a partir de células basais da epiderme e folículo piloso, sendo um tumor de baixa malignidade e seu potencial de formar metástases é restrito. Por ser de fácil diagnóstico, a taxa de óbitos é baixa (MANTESE et al, 2006). Geralmente aparece na face, como ferida isolada, sendo observado com maior frequência em pessoas adultas que possuem a pele com pouca pigmentação, ou ainda devido a outros fatores como a radiação e o papiloma vírus (HPV) que aumentam a chance de desenvolvimento desse tipo de carcinoma (RIBEIRO, 2007).

Já o carcinoma epidermóide se forma a partir de células da camada espinhosa, e representa 90% dos casos de carcinoma bucal, estando o seu desenvolvimento principalmente associado a fatores agressores externos, como o hábito de fumar e ingerir bebidas alcólicas (ABDO et al., 2002).

O câncer de pele do tipo melanoma, derivado dos melanócitos da pele, possui menor incidência do que os carcinomas basocelular e epidermóide, mas, apesar disso, leva a um maior número de óbitos, sendo a principal causa de morte por doenças de pele, representando 79% dos óbitos por câncer de pele (DIMATOS et al., 2009; INCA, 2007).

2.1.1 Melanoma

Atualmente, são registrados cerca de 132.000 casos de melanoma por ano, e sua incidência global continua crescendo ao longo das últimas décadas. Modelos epidemiológicos estimam que uma em cada setenta e cinco pessoas estão predispostas a desenvolver melanoma ao longo da vida (VEREEKEN, 2013). No Brasil, para 2012, foram estimados 6.230 novos casos de melanoma (INCA, 2011). Os dados referentes a 2013 ainda não estão disponíveis.

O Ministério da Saúde do Brasil publicou a Portaria nº 357, de 8 de abril de 2013 (BRASIL, 2013), aprovando as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas (DTT) do Melanoma Maligno Cutâneo, com o objetivo de estabelecer diretrizes

e parâmetros nacionais para diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos portadores da doença. As Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas puderam ser elaboradas a partir de um consenso técnico-científico após consulta pública em agosto de 2012, e devem ser utilizadas pelas secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos municípios na regulação do acesso assistencial, autorização, registro e ressarcimento dos procedimentos correspondentes (INCA, 2013).

Nos países desenvolvidos, a média da expectativa de vida ao melanoma em cinco anos é de 73%, enquanto nos países em desenvolvimento, a expectativa média de vida ao melanoma no mesmo período é de 56%, sendo que a média mundial é 69% (INCA, 2011). Em média, o tempo de sobrevivência de um paciente com melanoma metastático varia de 7 a 9 meses. Menos de 15% desses pacientes conseguem sobreviver por 3 anos (SANTOS, 2005; NIKOLAOU et al., 2012).

O melanoma surge a partir dos melanócitos, células de origem neuroectodérmica produtoras de melanina, substância responsável por dar pigmentação à pele (INCA, 2011). Existem algumas características gerais morfológicas do melanoma, que são usadas para o seu diagnóstico como: tamanho, ulceração, necrose, simetria, delimitação lateral, melanização (VERONESE et al., 2004). Seu crescimento ocorre em duas fases: a primeira é a fase radial, em que o melanoma cresce no interior da epiderme e derme superficial; a segunda é a etapa de crescimento vertical, em que o melanoma se expande em direção às camadas mais internas da derme (KUMAR et al., 2005), e a transição da primeira para a segunda etapa é considerada o evento mais crítico da progressão deste tipo de tumor, pois envolve o escape do controle de crescimento realizado pelos queratinócitos (TARAPORE, 2013).

Apesar de agrupamentos de casos de melanoma sucederem em uma família devido a padrões comuns de exposição solar, até o presente já foram identificados, também, alguns fatores genéticos associados. Estima-se que, em média, 10% dos melanomas sejam causados por mutações germinativas em genes de suscetibilidade, sendo hereditárias. Até o momento os dois principais genes de suscetibilidade associados ao melanoma familiar são *CDKN2A* e *CDK4* (CARVALHO et al., 2004; LAW et al., 2012). As mutações no primeiro

gene são encontradas em 10% das famílias que apresentam dois casos de melanoma e em até 40% das famílias com três ou mais casos. As mutações no gene *CDK4* são raras e menos significativas (LAW et al., 2012). As alterações moleculares associados ao melanoma serão discutidas em maiores detalhes adiante.

Existem quatro tipos diferentes de melanoma. O melanoma expansivo superficial ocorre no tronco e nos membros inferiores, e pode apresentar colorações variadas, como rósea, castanho, preto entre outras. Este tipo se desenvolve depois de anos, podendo aparecer nódulos elevados e sangramento na fase mais avançada do crescimento vertical. O melanoma nodular ocorre de forma elevada, apresentando lesão papulosa de cores castanha, azulada ou preta, geralmente acompanhado de sangramentos ou ulcerações. O melanoma lentiginoso acral representa de 35% a 60% dos casos e ocorre em maior frequência em pessoas não brancas, sendo encontrado nas regiões palmoplantares, extremidades digitais mucosas e semimucosas. O melanoma lentigo maligno aparece em regiões de fotoexposição crônica, possuindo limites nítidos e formas não regulares, sendo encontrado principalmente na face, mãos e membros inferiores, podendo ocorrer ulcerações e sangramentos (FERNANDES et al., 2005; DIMATOS et al., 2009).

O diagnóstico do melanoma pode ser feito pela observação da coloração da pele, que varia de cor castanho-claro até cor negra, podendo ainda ter uma região sem pigmentação. A neoplasia, após seu crescimento superficial se infiltra na epiderme, atingindo ou não a derme papilar. Seu crescimento vertical é rápido através da espessura da pele formando nódulos palpáveis e visíveis (INCA, 2007). Para auxiliar no diagnóstico observa-se a assimetria da lesão, bordas irregulares e mal definidas, mudança de cor e diâmetro maior de 6 milímetros (DIMATOS et al., 2009). No estadiamento clínico, é realizada uma análise cautelosa da lesão primária, pele adjacente, cadeias linfonodais e órgãos que em maior frequência apresentam metástases (pulmão, cérebro, fígado e ossos) (WAINSTEN; BELFORT, 2004). A biópsia pode ser realizada de duas maneiras: retirando-se completamente a lesão para diagnóstico (biópsia excisional); ou removendo-se apenas parte da lesão (biópsia incisional), que só deve ser feita, quando a lesão for muito grande, estiver

distante e não for possível removê-la por meio da biópsia excisional. Estudos vem sugerindo que o raio x do tórax e dosagem sérica de desidrogenase láctica (LDH) auxiliariam na descobertas das metástases (DIMATOS et al, 2009). O valor de LDH como marcador tumoral para melanoma maligno vem sendo utilizado principalmente como indicador de metástase no fígado, com sensibilidade e especificidade 95% e 83% respectivamente em pacientes de melanoma estágio II, e 87% e 57% em pacientes estágio III. Ademais, pacientes com níveis anormais de LDH apresentam sobrevida significativamente reduzida (GOGAS, 2009).

A radiação ultravioleta é uma pequena parcela do espectro das radiações eletromagnéticas e pode ser produzida a partir de fontes artificiais. Estudos propõem que a exposição aos raios ultravioleta seja responsável pela maior parte dos cânceres cutâneo do tipo não-melanoma e possivelmente dos melanomas (BAKOS, 2006). Além da exposição em excesso a radiação solar, a utilização de fontes artificiais de radiação aumentaram ainda mais o risco de desenvolvimento do melanoma, como no bronzamento artificial utilizando as câmaras de bronzamento. Argumentava-se que essa seria uma opção segura, pois as lâmpadas que são utilizadas só emitem os raios ultravioleta A, que são os de comprimento longo, contudo, recentes estudos mostram que os raios ultravioleta A são os principais causadores do melanoma, agindo de forma indireta e simultânea com os raios ultravioleta B. O bronzamento artificial tem aumentado nos últimos 20 anos, sendo utilizado com frequência entre adolescentes e adultos de pele mais clara, tendo sido demonstrando, nos últimos 15 anos, maior risco do desenvolvimento do melanoma pelas pessoas que utilizam a cama de bronzamento, havendo evidências que esse risco aumenta ainda mais quando o uso se inicia antes dos 30 anos de idade (BAKOS, 2006; VEIERØD et al., 2003; WHO, 2010).

2.1.1.1 Vias de sinalização celular e melanoma

Os principais genes de susceptibilidade associados ao melanoma descritos até o momento são *CDKN2A* e *CDK4*, cujas mutações germinativas são transmitidas hereditariamente. O gene *CDK2N2A* está localizado no

cromossomo 9p21, e codifica duas proteínas supressoras de tumor não relacionadas, envolvidas na regulação do ciclo celular, p16^{INK4a} e p14^{ARF}. O papel de p16^{INK4a} parece estar relacionado a inibição da fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb) mediada pela cinase dependente de ciclina (CDK) da fase G1, denominada cdk4/cdkb, resultando no arraste da progressão do ciclo celular entre as fases G1 e S. Já p14^{ARF} favorece a apoptose e bloqueia transformações oncogênicas através da estabilização dos níveis de p53 por meio da inibição de ubiquitinação de p53 mediada por Mdm2. Assim, a perda de p16 promove inativação da proteína pRb por sua hiperfosforilação, e as perdas de p14 inativam o p53, ambas levando a progressão celular irrestrita. O outro gene de susceptibilidade, CDK4, localiza-se no cromossomo 12q14 e suas mutações impedem a ligação da cdk4 ao p16, também favorecendo a inativação da pRb (TARAPORE, 2013).

Sabe-se atualmente que até 70% dos melanomas e neoplasmas melanocíticos benignos apresentam mutações ativadoras em um dos dois genes principais da via da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) Erk, *NRAS* ou *BRAF* (FLAHERTY et al., 2012; HOCKER et al., 2008). Esta via regula processos celulares essenciais, como crescimento, sobrevivência, diferenciação e senescência (HUANG; MARAIS, 2009).

Em resumo, o que se observa é a perda de função de genes supressores de tumor acompanhando oncogenes mutados (Tabela 1) (NIKOLAOU et al., 2007).

Tabela 1 – Resumo das principais alterações gênicas relacionadas ao melanoma (Adaptado de: TARAPORE, 2013).

GENE CANDIDATO	PROTEÍNA	LOCALIZAÇÃO	
		NO CROMOSSOMO	ESTÁGIO DO MELANOMA
<i>Perdas gênicas</i>			
PTEN	Pten	10q	Primário e metastático
CDKN2A	p16Ink4a/p14Arf	9p	Primário e metastático
ITGB3BP	Beta-3-endonexin	1p31	Uveal
<i>Amplificação gênica</i>			
BRAF	Braf	7q21.3	Cutâneo
CCND1	cyclinD1	11q13	Acral
CDK4	cdk4	12q14	Acral e mucosal
CDH2	N-cadherin	18q	Uveal e metastático
c-MYC	c-myc	8q23	Ocular, primário e metastático
MITF	Mitf	3p14	Cutâneo, metastático

2.1.1.1.1 Via Ras-Raf-Mek-Erk

A proteína Ras é uma GTPase monomérica, que possui um grupamento lipídico que ancora a proteína covalentemente à face intracelular da membrana, onde ela atua. Essa proteína auxilia na transmissão de sinais a partir da superfície celular até o núcleo da célula, por meio de sua ativação por receptores tirosino-quinases (RTKs), que são ativados, principalmente, por ligação à fatores de crescimento. Os RTKs são da classe de receptores associados a enzimas, constituídos de uma proteína transmembrana unipasso, cujo sítio de interação com o ligante é extracelular, e o sítio catalítico, ou de ligação à enzima localiza-se na face interna da membrana. A sinalização por Ras afeta funções celulares variadas, como proliferação, apoptose, migração e diferenciação. A proteína se apresenta ativada, quando ligada a GTP, e inativada quando ligada a GDP (ALBERTS, 2004).

Quando é ativada, Ras interage com uma proteína efetora *downstream*, a Raf, uma quinase específica para serina-treonina que ativa MEK, que, por sua vez, ativa Erk, que é uma MAPK. A quinase Erk é, então, translocada para o núcleo da célula, onde exerce papel crucial na proliferação celular, através do controle da transição entre as fases G1 e S, pela regulação negativa da

inibição de p27 e regulação positiva da atividade de c-myc. Além disso, Erk ativada também estimula a proliferação celular acentuando a transcrição e estabilidade de c-Jun, mediadas por CREB (proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc) e Gsk-3 β (glicogênio sintase quinase 3 beta), respectivamente (TARAPORE, 2013).

No melanoma, a quinase Erk se apresenta hiperativada em até 90% dos casos, podendo ser por fatores de crescimento autócrinos ligantes dos RTKs, ou, mais raramente, por mutação no próprio receptor. Um mecanismo mais comum de ativação da Erk, no entanto, ocorre por meio de mutações de NRAS, um dos três genes Ras presentes na espécie humana, com ganho de função (GRAY-SCHOPFER et al., 2007). A proteína NRAS aparece mutada em 15 a 30% dos melanomas (FLAHERTY et al., 2012), sendo o mais comum a substituição de uma leucina por uma glutamina na posição 61. Substituições nesse códon impedem a hidrólise de GTP, de modo que NRAS é mantida constitutivamente ativada (DAHL; GULDBERG, 2007).

Nesta via, no entanto, o componente que aparece mais comumente mutado, chegando essas mutações a acometerem entre 50 a 70% dos casos, é BRAF, um dos três genes Raf humanos. A mutação mais comum é uma substituição de ácido glutâmico por valina na posição 600, causando um ganho de função que leva à ativação das proteínas quinases *downstream*, e consequente aumento da proliferação celular (NIKOLAOU et al., 2007). Além disso, a mutação em BRAF também estimula a secreção autócrina de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), favorecendo a vascularização tumoral. As mutações ativadoras de BRAF são normalmente associadas a alterações funcionais de proteínas e fatores de transcrição *downstream*, como a inativação da via da proteína de retinoblastoma 1 (Rb1), por exemplo, por meio da inativação de INK4a ou por mutações no gene CDK4, que impedem a inibição da CDK4 por p16^{INK4a}, prevenindo a senescência (GODING, 2007; NIKOLAOU et al., 2012), ou ainda a amplificação do gene do fator de transcrição MITF (fator de transcrição associado à microftalmia), ou variações nas funções de enzimas metaloproteinases de matriz extracelular (GRAY-SCHOPFER et al., 2007).

2.1.1.1.2 Via PI3K-Akt

Embora sejam menos comuns, melanomas que não apresentam mutações em um dos dois genes NRAS e BRAF, podem apresentar algum tipo de alteração genética em outros componentes *downstream* da via MAPK. Ademais, também podem ocorrer alterações na via PI3K em até 60% dos melanomas (HOCKER et al., 2008). Quando Ras é ativado, há a indução da translocação da membrana e ativação de PI3K. PI3K fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, e este, por sua vez, leva à ativação de Akt, o principal efetor desta via de sinalização, que promove a proliferação, sobrevivência e invasão (SHARMA et al., 2005).

3. Angiogênese e o melanoma

A angiogênese, como é conhecida a formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes, constitui um processo essencial no desenvolvimento de todo e qualquer tipo de tecido, e se concretiza através de um balanço positivo entre fatores pró e anti-angiogênicos (WEISS; CHERESH, 2011).

Considerando este pressuposto, a angiogênese também é fundamental para o desenvolvimento dos tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011), e desde que Folkman postulou que o crescimento tumoral e a metastatização orientados pela angiogênese podem ser suprimidos a partir do bloqueio da angiogênese (FOLKMAN, 1971), iniciou-se uma busca por ferramentas eficazes para utilização desse mecanismo como terapia para o câncer, inclusive para o melanoma (DEWING et al., 2012).

As células do melanoma produzem uma série de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, em inglês), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (DEWING et al., 2012), e o papel desses mediadores no processo de angiogênese e metastatização do melanoma já foi demonstrado experimentalmente por modelos de xenotransplante de tumor (ROFSTAD; HALSOR, 2000).

Para que ocorra a angiogênese, em qualquer tecido, é necessária a ativação do fenótipo das células endoteliais, causando seu desprendimento das células vizinhas pela ruptura ou desorganização das junções de adesão formadas principalmente por caderinas e claudinas, com seu “brotamento” (*sprouting*, termo usado em inglês) em direção ao gradiente de fatores pró-angiogênicos e proliferação, para dar origem a tubos primitivos que serão estabilizados, maturados e remodelados através do recrutamento de células perivasculares, formando redes vasculares funcionais (WEIS; CHERESH, 2011).

Dos fatores supramencionados, o VEGF exerce papel central na angiogênese (DEWING et al., 2012), bem como na linfangiogênese (formação de vasos linfáticos) e na vasculogênese (formação de vasos sanguíneos na fase embrionária, a partir de células precursoras, os angioblastos) (ROSKOSKI, 2007; WEISS; CHERESH, 2011). Ademais, considerando-se que os níveis de VEGF aumentam em pacientes com melanoma de acordo com o estágio clínico, que altos níveis de VEGF são normalmente associados a um pior prognóstico (UGUREL et al., 2001), e ainda o papel do VEGF na indução da permeabilidade vascular, fator crucial para dispersão de células tumorais (OLSSON et al., 2006), torna-se indispensável a compreensão detalhada de sua relação com o melanoma, seu desenvolvimento e sua acentuada capacidade de formar metástases.

3.1 VEGF e seus receptores

A terminologia VEGF se refere a uma família de glicoproteínas diméricas secretadas, ligantes de heparina, de aproximadamente 40 kDa, com ação autócrina, intrácrina e parácrina (DEWING et al., 2012; PERROT-APPLANAT; BENEDETTO, 2012; SAMUEL et al., 2011), que nos mamíferos, é formada por cinco membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (fator de crescimento da placenta) (OLSSON et al., 2006). O VEGF se apresenta na forma de um homodímero ligado por pontes de dissulfeto (ROSKOSKI, 2007).

Cada uma dessas proteínas contém um sequência sinal que é clivada durante a biossíntese, e o *splicing* alternativo de seus respectivos pré-mRNAs

dá origem a diferentes isoformas de VEGF-A, VEGF-B e PlGF. No VEGF-A (ou VEGF), forma mais comum, o éxon 7 codifica um motivo estrutural que medeia a ligação com a heparina, e esta proteína pode se apresentar, ainda, em pelo menos 4 isoformas diferentes, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆, contendo, respectivamente, 121, 165, 189 e 206 aminoácidos após a clivagem da sequência sinal, dentre as quais as isoformas 121 e 165 são as mais comuns (DEWING et al., 2012; FERRARA et al., 2003). Como na isoforma 121 os éxons 6 e 7 são excluídos, esta se apresenta livremente difusível, enquanto as isoformas 189 e 206 contêm extensões dos resíduos básicos que possibilitam sua retenção na matriz extracelular (PARK et al., 1993). A estrutura cristalográfica do VEGF-A mostra dois monômeros organizados antiparalelamente, dando origem a um dímero com dois sítios de interação com o receptor, um em cada polo do dímero (MULLER et al., 1997).

São conhecidos, ainda, três receptores tirosina quinase para VEGF: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. Cada um desses receptores apresenta entre 1.338 a 1.356 resíduos de aminoácidos, formando um componente extracelular de sete domínios similares a imunoglobulina, um componente transmembrana único constituído por uma alfa hélice de cerca de 20 resíduos de aminoácidos, um segmento justamembrana flexível, um domínio intracelular tirosina-quinase com 70 a 100 aminoácidos e uma cauda carboxiterminal (OLSSON et al., 2006). Além destes receptores, há, ainda, dois receptores não enzimáticos, neuropilin-1 e 2 (ROSKOSKI, 2007), e algumas moléculas que atuam como co-receptores para algumas proteínas VEGF: proteoglicanos heparan-sulfatados, caderinas, integrina $\alpha\beta 3$. Em geral, VEGFR1 e 2 são expressados em células endoteliais, enquanto o VEGFR3 é expressado em vasos linfáticos (MATSUMOTO; CLAEISSON-WELSH, 2001).

Os receptores VEGFR são ativados a partir da formação de dímeros induzida por sua interação dos domínios 1, 2 e 3 do tipo imunoglobulina com o ligante, uma vez que tal ligação nos domínios extracelulares promove a interação entre os monômeros do receptor através do domínio 7 tipo imunoglobulina, possibilitando a comunicação do ligante com o domínio tirosina quinase do receptor, promovendo, assim, sua ativação, e o desencadeamento da sinalização celular (RUCH et al., 2007). Os receptores do dímero realizam

autofosforilação de forma *trans*, de modo que uma quinase do dímero catalisa a fosforilação da outra quinase (ROSKOSKI, 2007). Os substratos para atividade quinase incluem várias moléculas de transdução de sinal citoplasmáticas e o próprio receptor (MATSUMOTO; CLAEISSON-WELSH, 2001), sendo que em VEGFR-2 os sítios de autofosforilação mais conhecidos são Tyr⁹⁵¹, Tyr⁹⁹⁶, Tyr¹⁰⁵⁴, Tyr¹⁰⁵⁹, Tyr¹¹⁷⁵, e Tyr¹²¹⁴ (TAKAHASHI et al., 2001), localizados fora do sítio catalítico do receptor (SCHLESSINGER, 2000). Tyr¹⁰⁵⁴ e Tyr¹⁰⁵⁹ se encontram na alça de ativação do sítio catalítico e sua fosforilação é necessária para o melhor desempenho da função enzimática de VEGFR-2 (DOUGHER; TERMAN, 1999). O trabalho de Takahashi et al. (2001) demonstraram, entretanto, que Tyr¹¹⁷⁵ e Tyr¹²¹⁴ são os principais sítios de ativação do VEGFR2. Roskoski (2007) postula, ainda, que o sítio de fosforilação é determinante entre o favorecimento da atividade catalítica do receptor ou a geração de sítios para ancoragem de proteínas que reconhecem resíduos de tirosina especificamente fosforilados.

O VEGF-A, B e o PLGF são capazes de se ligar ao receptor tipo 1, VEGF-A e E se ligam ao receptor tipo 2, e VEGF-C e D se ligam ao receptor tipo 3. Através de processamento proteolítico, as proteínas C e D também conseguem se ligar ao VEGFR2, mas essa interação acontece com menor afinidade do que pelo receptor tipo 3 (CHATTERJEE et al., 2013; OLSSON et al., 2006). O receptor VEGFR1 tem maior afinidade pelo VEGF do que o receptor tipo 2, entretanto, a atividade tirosina quinase de fosforilação de VEGFR1 em resposta à estimulação por VEGF é menor que a de VEGFR2. Além disso, a ativação de VEGFR1 não possui efeito direto sobre a proliferação ou sobre o citoesqueleto (WALTENBERGER et al., 1994). No VEGF-A, os resíduos de aminoácidos Arg⁸², Lys⁸⁴, e His⁸⁵ são indispensáveis para sua ligação ao VEGFR2, enquanto Asp⁶³, Glu⁶⁴, e Glu⁶⁷ são necessários para a interação com o receptor VEGFR1 (KEYT et al., 1996).

Além de sua conhecida atividade parácrina sobre as células endoteliais circunvizinhas, estimulando a proliferação, sobrevivência e motilidade celulares (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009) e a permeabilidade vascular (PAUL et al., 2001), o VEGF sintetizado e secretado por células tumorais pode exercer funções autócrinas (ADAMCIC et al., 2012; PERROT-APPLANAT;

BENEDETTO, 2012; SHER et al., 2009) e intrácrinas (SAMUEL et al., 2011; ADAMCIC et al., 2012) sobre as células.

Quando um vaso é estimulado por fatores angiogênicos – como o VEGF, secretado por células tumorais, por exemplo –, a primeira etapa para a constituição de uma ramificação é a liberação dos pericitos da membrana basal comum às células endoteliais, pela ação de metaloproteinases que degradam a matriz extracelular, uma vez que os pericitos suprimem a proliferação das células endoteliais. Uma matriz extracelular provisória se forma a partir de extravazamento de proteínas do plasma, permitindo a ancoragem as células endoteliais e sua migração. Esse extravazamento é possibilitado pelo aumento da permeabilidade vascular desencadeada pela ação do VEGF sobre as células endoteliais. Integrinas envolvidas neste processo sinalizam e direcionam essa etapa de migração celular (CARMELIET; JAIN, 2011; RIBATTI; CRIVELLATO, 2012).

Para que ocorra a formação de ramificação vascular de maneira organizada, sem migração de massas de células endoteliais, uma célula endotelial específica é selecionada para liderar a ponta do novo broto vascular em direção ao gradiente angiogênico, e para tanto, é necessária a degradação da membrana basal, desprendimento dos pericitos, e afrouxamento das junções celulares. As células endoteliais expressam VEGFR2, através do qual o VEGF estimula a formação e extensão de filópodes na célula da ponta, além da expressão da proteína DLL4, que permitem a formação de conexões com células da ponta de ramificações vizinhas (BENTLEY et al., 2009).

A célula da ponta migra através de interações moleculares entre a matriz extracelular e suas integrinas, e as células endoteliais que a seguem, que expressam predominantemente VEGFR1, se proliferam, alongando o broto e formando o lúmen, além de atrair pericitos e depositar membrana basal para sua estabilização. Ramificações próximas se fundem, e com a formação do lúmen, os novos vasos podem perfundir o tecido, com posterior retomada por parte das células endoteliais de seu fenótipo quiescente, com reestabelecimento de junções intercelulares, deposição da membrana basal, maturação dos pericitos e restauração dos sinais de manutenção vascular (CARMELIET; JAIN, 2011).

Apesar de seus efeitos sobre as células endoteliais se apresentarem amplamente descritos na literatura, conforme descrito acima, os efeitos diretos do VEGF sobre as células tumorais ainda demandam novas pesquisas mais aprofundadas e novas perspectivas. Sabe-se que em modelos utilizando camundongos, e também em testes clínicos em humanos, inibidores dos receptores de VEGF apresentam potente atividade antiangiogênica e antitumoral, em diferentes tipos de tumor (PATYNA et al., 2006). Ademais, a superexpressão da isoforma 165 de VEGF-A em tumores xenotransplantados favorece o crescimento tumoral, a angiogênese e a formação de metástases, e em células que também expressam receptores para VEGF, a superexpressão do VEGF induz crescimento e mecanismos de sobrevivência celular, pela via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), de forma dependente da quinase MEK 1/2, e também pela via da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) (GRAELLS et al., 2004).

Em seu trabalho, Lacal et al. (2005) reforçaram a hipótese de estimulação autócrina de células de melanoma pelo VEGF através da demonstração de que células de melanoma expressando simultaneamente VEGF-A e seu receptor apresentam maior potencial de invasão da matriz extracelular do que células de melanoma que não apresentavam uma das duas proteínas. Ademais, quando células de melanoma expressando o VEGFRs foram expostas a VEGF-A exógeno, sua capacidade de invadir a matriz extracelular foi acentuada. E a inibição da atividade tirosina quinase do VEGFR bloqueou tal capacidade de invasividade das células de melanoma. Adamcic et al. (2012) também associaram a expressão de VEGF e VEGFR-2 ao fenótipo mais agressivo de células de melanoma com maior capacidade de formar metástases, e também que a utilização de anticorpo monoclonal anti-VEGF secretado não bloqueia, nas células de melanoma, a atividade mitogênica desencadeada pelo VEGF.

3.2 Transdução do sinal de VEGF- VEGFR-2

Após a dimerização do VEGFR-2 dependente de ligante, e conseqüente autofosforilação dos resíduos intracelulares de tirosina necessários à ativação

da função do receptor, são desencadeados sinais pró-sobrevivência, quimiotáticos e mitogênicos nas células alvo (FERRARA et al., 2003). As outras proteínas que são fosforiladas pelo domínio tirosina-quinase do receptor normalmente apresentam motivos que permitem interações entre proteínas, tais como domínios SH2 (*Src homology 2*) e PTB (ligação à fosfotirosina), que realizam a interação entre os sítios de autofosforilação do receptor e tais proteínas-alvo. Esse mecanismo permite o recrutamento de complexos de sinalização pelos receptores tirosina-quinase ativados (SCHLESSINGER, 2000).

Entre as proteínas alvo do receptor de VEGF estão a fosfolipase C- γ (PLC- γ), fosfoinosítideo-3-quinase (PI3K), proteína ativadora da GTPase Ras (GUO et al., 1995) e a família Src (ELICEIRI et al., 1999). O papel mitogênico do VEGFR-2 é desencadeado pela ativação da via Raf-Mek-Erk, de forma dependente de Ras ou não (via proteínas quinase C) (TAKAHASHI et al., 1999). VEGFR-2 exerce, ainda, papel antiapoptótico em células endoteliais da veia umbilical humana através da via da quinase PI-3 e Akt. VEGF também induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (GERBER et al., 1998).

A proteína PLC- γ se liga ao resíduo Tyr¹¹⁷⁵ fosforilado do receptor e medeia a ativação da cascata de sinalização MAPK/Erk-1/2 regulada por sinal extracelular, induzido a proliferação das células. A PLC- γ catalisa hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), produzindo inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), que estimula a liberação de Ca²⁺ a partir de compartimentos intracelulares, e diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína quinase C (PKC). A PKC, por sua vez, estimula a proliferação celular, ativando a via Raf-Mek-Erk (MATSUMOTO; CLAESSION-WELSH, 2001; FERRARA et al., 2003).

O VEGFR-2 ativa, ainda, o heterodímero fosfoinosítideo-3-quinase (PI3K), por meio da fosforilação de sua subunidade regulatória p85. Como o receptor não apresenta o motivo específico de ligação reconhecido pelo domínio SH2 da PI3K, a literatura indica que esta interação seja mediada por uma proteína adaptadora (MATSUMOTO; CLAESSION-WELSH, 2001), ou ainda por um complexo formado por VE-caderina, β -catenina, e PI3K (CARMELIET et al., 1999). Quando o domínio citoplasmático da VE-caderina

foi bloqueado ou removido, Carmeliet et al. (1999) detectaram aumento de apoptose em células endoteliais, devido à redução da ativação da via Akt/PKB e, conseqüentemente, do gene Bcl-2. A fosforilação de algumas das proteínas efetoras downstream de Akt/PKB, como BAD e caspase-9 inibe a apoptose (CARDONE et al., 1998). Além disso, a ativação de PI3K também favorece a migração celular (MATSUMOTO; CLAESSION-WELSH, 2001).

Já a ativação da proteína Ras e, por conseguinte, da via Raf-Mek-Erk envolve uma proteínas adaptadora e um fator de troca de nucleotídeo de guanina, que estimularia, então, a atividade GTPase de Ras, e dá início à cascata de sinalização (MATSUMOTO; CLAESSION-WELSH, 2001).

3.2 Regulação da expressão de VEGF

A concentração celular de oxigênio exerce papel fundamental na regulação de genes variados, como de enzimas da via glicolítica, de transportadores de glicose, e do próprio VEGF (HIROTA; SEMENZA, 2006; MANALO et al., 2005). A expressão aumentada de VEGF promove angiogênese, que leva à maior aporte de células sanguíneas e, conseqüentemente, de oxigênio ao tecido (ROSKOSKI, 2007). A hipóxia afeta, principalmente, a quantidade de VEGF-A, devido à presença de elementos regulados por hipóxia nas extremidades 5' e 3' do gene VEGF-A (LADOUX; FRELIN, 1993).

O fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF) coordena a resposta adaptativa à condição de hipóxia. O HIF é um heterodímero composto por duas subunidades, 1 α e 1 β , sendo que a expressão e atividade de somente uma delas é responsiva à baixa concentração de oxigênio, de HIF-1 α . Cada subunidade apresenta dois domínios hidrofóbicos de cerca de 70 aminoácidos que medeiam a formação do heterodímero, e a subunidade 1 α apresenta, ainda, dois domínios de transativação (TAD), um C-terminal e um mais próximo do N-terminal, separados por um domínio inibitório (ID), que faz a repressão da atividade de transativação em condições de normóxia. Ademais, em sobreposição ao domínio N-TAD, na subunidade 1 α , há um domínio de

degradação dependente de oxigênio (ODD), que irá auxiliar no processo de regulação de HIF dependente de oxigênio (HIROTA; SEMENZA, 2006).

Em condições de normóxia, uma família de três prolil-hidroxilases promove a hidroxilação da prolina 564 ou 402 no domínio ODD de HIF-1 α , possibilitando seu reconhecimento por um dos componentes de um complexo de ubiquitina-ligase, que direciona HIF-1 α para degradação proteossomal (MAXWELL et al., 1999; SAFRAN; KAELIN, 2003). Como o oxigênio constitui substrato para essas enzimas, a hipóxia reduz essa prolil-hidroxilação e, conseqüentemente, reduz a degradação de HIF-1 α , promovendo seu acúmulo na célula. Um processo semelhante acontece na asparagina do domínio C-TAD de HIF-1 α , cuja hidroxilação impede a interação do domínio de transativação com co-ativadores em situações de normóxia (ROSKOSKI, 2007).

Assim, em resposta à hipóxia, as subunidades HIF-1 α e HIF-1 β formam um heterodímero que, após interagir com seus co-ativadores, inicia a transcrição de seus genes alvo, dentre eles, o do VEGF. O VEGF apresenta um promotor de resposta à hipóxia localizado nas posições dos nucleotídeos – 975 e –968, que medeia seu reconhecimento por HIF (ROSKOSKI, 2007).

Além da hipóxia, variados estudos, discutidos a seguir, relacionam a expressão de VEGF a fatores de crescimento, como fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), hormônios, genes supressores de tumor e oncogenes.

Goldman et al. (1993) demonstraram a presença de VEGF e do receptor para fator de crescimento epidérmico (EGFR) em diferentes linhagens celulares derivadas de glioma humano e também em fragmentos de glioma excisados em cirurgia, por imunoperoxidase e imunofluorescência, e estabeleceram uma relação consistente entre a ativação do EGFR e a produção de VEGF, com a estimulação das células de glioma por EGF resultado em um aumento de 25 a 125% na secreção de VEGF bioativo. Já Finkenzeller e colaboradores (1992) demonstraram o aumento da expressão do VEGF mRNA em resposta ao tratamento com PDGF, e relacionaram o aumento da expressão do fator angiogênico à proteína quinase C.

Murakami et al. (2011) relacionaram a função de VEGF à sinalização pelo fator de crescimento fibroblástico (FGF) em células endoteliais, e

identificaram que FGF medeia a expressão do VEGFR2 através da ativação da quinase Erk1/2. Camundongos com sinalização por FGF defeituosa apresentaram, ainda, perda de integridade vascular e morfogênese vascular reduzida.

A insulina também foi relacionado ao controle da expressão de VEGF por Bermont et al. (2001), que demonstraram que a quantidade de VEGF se apresentava aumentada no sobrenadante de células de carcinoma endometrial, em cultura, tratadas com insulina. Além disso, demonstraram, também, que a insulina aumenta a taxa de transcrição do VEGF de forma bifásica, com um aumento inicial sutil após 4h de tratamento, e uma segunda fase de aumento tardio, porém acentuado, após 24 horas de tratamento, além de prolongar a meia-vida do VEGF mRNA. O efeito tardio foi relacionado a mecanismos de regulação transcricional e pós-transcricional.

Recentemente, foi demonstrado um duplo papel do gene supressor de tumor p53 na regulação de VEGF durante a hipóxia (GHAHRAMANI et al.; 2013). O p53 se liga, via HIF-1 α , a um sítio de ligação funcional e conservado da região promotora do gene VEGF, induzindo sua expressão durante a hipóxia. Essa resposta é rápida, e notou-se que durante a hipóxia sustentada, o p53 diminui indiretamente a expressão de VEGF pela via de sinalização celular da proteína Rb (retinoblastoma), dependente da p21, de forma distinta do seu papel na regulação do ciclo celular. Além disso, foi demonstrado que em células com deficiência na via p21/pRb, a ativação do p53 leva ao aumento sustentado da expressão de VEGF, promovendo angiogênese em modelos xenográficos de retinoblastoma.

Yang et al. (2012) identificaram que a mutação de NRAS associada à coexpressão da proteína scaffold GAB2, em melanoma, além de promover a tumorigênese por meio de crescimento celular independente de ancoragem, acentuando a expressão de fatores antiapoptóticos da família Bcl-2, também proporciona aumento na densidade de vasos sanguíneos, com acentuação da atividade de VEGF via HIF-1 α . Esse conjunto confere um fenótipo mais agressivo às células de melanoma. O grupo comprovou, ainda, que a atividade do NRAS mutante era independente da proteína GAB2. Grugel et al. (1995), por sua vez, transfectaram células da linhagem NIH3T3 com v-H-ras e

identificaram níveis aumentados de expressão de VEGF mRNA e VEGF em comparação à células não transformadas.

Estudos sugerem que a ativação de Ras modula a expressão de VEGF por meio das cascatas de sinalização da quinase Erk e da PI3K, de forma independente. HIF-1 α é diretamente fosforilado pela Erk, resultando em potencial de transativação acentuado e estimulação do promotor de VEGF (LEE et al., 2002; MILANI et al., 1998; SOHDI et al., 2001).

Experimentos usando linhagens celulares de melanoma murino demonstraram que os níveis de expressão de VEGF têm relação com a agressividade do tipo de tumor, sendo que o maior nível de VEGF é encontrado nos tumores mais agressivos. Este fato foi comprovado pela transfecção de linhagens celulares não agressivas para superexpressar VEGF, o que converteu seu fenótipo a um tipo agressivo, dando origem a grandes tumores vascularizados não-necróticos em camundongos. Para reverter este efeito, foi realizada transfecção com VEGF *antisense*, resultando em tumores pobremente vascularizados (DEWING et al., 2012).

Além disso, a isoforma de VEGF que está sendo superexpressada em uma linhagem celular também afeta a tumorigenicidade dessas células. As isoformas 121 e 165 promovem crescimento tumoral agressivo, ao contrário da isoforma VEGF189, que gera crescimento tumoral deficiente (YU et al., 2002).

4. Absorção transdérmica de medicamentos

Quando se trata de câncer, a busca incessante por novas vias mais eficientes de distribuição de medicamentos para os sítios tumorais constitui um dos desafios encontrados pelas pesquisas da área.

Atualmente, a pele tem sido alvo de estudos e análises cada vez mais detalhadas, em busca de alternativas à utilização de drogas sistêmicas injetáveis (BAROLI, 2009; CEVC; VIERL, 2010; LADEMANN et al., 2011; SEVERINO et al., 2013).

A pele atua como barreira física primária frente à penetração de agentes externos químicos e biológicos e, também, à perda de água pelo organismo, graças à composição de seu estrato córneo, descrita previamente neste

trabalho. Ademais, a pele atua, ainda, minimizando os efeitos da radiação ultravioleta e infravermelha (BAROLI, 2009; SEVERINO, 2013). Entretanto, a função da pele que será abordada nesta seção relaciona-se à sua capacidade de atuar como rota de distribuição para substâncias específicas, em especial, drogas antitumorais.

As vantagens da aplicação local (tópica) ou transdérmica de medicamentos sobre os métodos tradicionais orais ou intravenosos permeiam a prevenção do metabolismo de primeira passagem e minimização de dor até a possível liberação prolongada e controlada da droga, além do importante fato de constituir uma via de terapia mais aceitável para o paciente e amenizar ampla gama de efeitos colaterais das demais vias de administração medicamentosa (BOLZINGER et al., 2012). Contudo, as drogas que conseguem sobrepujar a barreira do estrato córneo ainda precisarão debelar adicionais barreiras celulares e moleculares, que consistem, principalmente, do sistema imunológico e dos sistemas enzimáticos metabólicos (SEVERINO, 2013).

A penetração de medicamentos através da pele encontra uma série de barreiras que dificultam ou até impedem esse processo. A estrutura organizacional do estrato córneo da pele é a primeira e principal delas, e será discutida nesta seção. A rede microvascular cutânea representa a segunda barreira (CEVC; VIERL, 2010).

O arranjo do estrato córneo é descrito na literatura segundo um modelo de “tijolos e argamassa”, em que os corneócitos representam os tijolos e a matriz lipídica extracelular representa a argamassa (PRAUSNITZ et al., 2012). Assim, o efeito da barreira primária resulta de interações e da ação conjunta de micro e macroestruturas pertencentes ao estrato córneo, com base no arranjo supramolecular de sua matriz lipídica bi e tridimensional, e de sua estrutura global (BAROLI, 2009).

Em relação à sua macroestrutura, entende-se que a organização dos corneócitos é determinante na disponibilidade de rotas de penetração de medicamentos, delimitando uma via irregular preenchida por matriz lipídica extracelular que ainda sofre obstrução por corneodesmossomos degradados e também intactos (ELIAS, 2005; LEE et al., 2006). A degradação dos

corneodesmosomas resulta, ainda, em domínios lacunares descontínuos, que representam uma via de “poros” aquosos. Essas lacunas podem aumentar e se estender, formando um rede contínua porém desmontável sob condições como oclusão e hidratação prolongada (PRAUSNITZ et al., 2012).

O arranjo hexagonal dos queratinócitos permite a formação de agrupamentos de até doze células, separados entre si por pequenas áreas de baixa resistência à penetração, delimitando uma via de permeabilidade (CEVC, 2004), e é o alinhamento desses grupos de queratinócitos que constitui o primeiro fator delimitante da permeação cutânea de medicamentos (BAROLI, 2009).

Observações por meio de microscopia eletrônica revelaram que o espaço extracelular da camada mais externa da pele encontra-se preenchido por uma matriz lipídica cristalina multilamelar com distâncias repetidas de ~ 5,5 nm, formada a partir de lipídios precursores dos corpos lamelares secretados pelos queratinócitos, dando origem a um padrão de bandas eletrôntranslúcidas (BOLZINGER et al., 2012; CEVC; VIERL, 2010). Os lipídios intercelulares podem ser englobados em quatro categorias: ceramidas, colesterol e derivados, triglicerídeos e ácidos graxos livres. Vale ressaltar que cerca de 80% de tais lipídios são apolares, e a presença de grupos hidroxil determina a hidrofobicidade de suas cabeças, capazes de estabelecer interações de hidrogênio com lipídios adjacentes e moléculas de água (BAROLI, 2009), permitindo que essas moléculas se agrupem fortemente, formando domínios lipídicos em fase de gel altamente ordenados. Ademais, sua composição rica em ceramidas resulta em um meio lipídico menos fluido do que em membranas biológicas (BOLZINGER et al., 2012). Além do papel de delimitar a distribuição transdérmica de drogas hidrofílicas, a matriz lipídica extracelular compreende, ainda, um “reservatório”, no qual drogas lipossolúveis, como os corticosteroides, podem se acumular e ser liberadas lentamente (PRAUSNITZ et al., 2012).

A influência da supramencionada microestrutura do estrato córneo sobre a absorção de drogas pela via cutânea, assim, se deve à organização dos lipídios em bicamadas na matriz extracelular, determinando regiões hidrofílicas e hidrofóbicas cujos tipos e quantidade de lipídios envolvidos causam uma

organização espacial diferenciada. Tais constatações puderam ser averiguadas a partir da análise da composição lipídica de biópsias da pele obtidas de doadores saudáveis e não saudáveis (BOWUSTRA; PONEC, 2006).

Os lipídios, além do conspícuo papel estrutural na formação das lamelas intercelulares, apresentam variadas funções de sinalização celular necessárias para a proliferação celular e para a morte celular programada (MENON et al., 2012).

Além das características descritas acima, o pH ácido da pele, variando entre 4,2 a 5,6, fornece proteção adicional, sendo influenciado pela produção de suor e sebo, sexo, sítio anatômico e também pela hidratação (PROW et al., 2011). Tal acidez parece derivar de mecanismos extraepidérmicos, incluindo a deposição de produtos derivados de glândulas e de substâncias resultantes do metabolismo microbiano, processos catabólicos endógenos, como a hidrólise de fosfolipídios a ácidos graxos, e da geração local de prótons na região mais profunda do estrato córneo, por bombas de sódio (PRAUSNITZ et al., 2012).

A partir da superfície do estrato córneo, em direção à camada granulosa, o pH se apresenta sob forma de um acentuado gradiente, atingindo pH próximo de neutro no início da camada viável da pele (estrato granuloso) (PROW et al., 2011), característica identificada por Hanson e colaboradores (2002) através de experimentos usando imagens de fluorescência com base em um fluoróforo dependente de pH aplicado ao estrato córneo de camundongos sem pelo.

Essa acidez preserva a integridade e a coesão dos corneócitos, pela regulação de enzimas proteolíticas sensíveis a pH, aumenta a defesa da pele contra microorganismos, mantém a barreira de permeabilidade através de seus efeitos sobre o arranjo e processamento lipídicos da matriz extracelular, e restringe processos inflamatórios (PROW et al., 2011). Já foi estabelecida a relação entre o pH elevado da pele e doenças cutâneas, como dermatites atópicas, pela identificação de diferenças significativas de pH entre a pele de indivíduos saudáveis e de pacientes afetados (SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2006; SEIDENARI; GIUSTI, 1995).

4.1 Vias de penetração cutânea de medicamentos

A permeabilidade da pele se baseia na difusão passiva de moléculas direcionadas por gradiente de concentração e as principais rotas de permeação da pele são intracelulares, intercelulares ou foliculares (BENSON, 2005; BOLZINGER, 2012; CEVC; VIÉRL, 2010).

A via intercelular, através da matriz lipídica extracelular se sobressai à via intracelular na permeação de drogas hidrofóbicas, e o contrário é verdadeiro para a transposição do estrato córneo por drogas hidrofílicas. No entanto, a penetração de drogas hidrofílicas depende, ainda, parcialmente, da matriz extracelular, que precisa ser atravessada para a substância seja transportada de um corneócito a outro, o que pode ser um fator determinante da velocidade da movimentação do medicamento (BARRY, 2002).

A contribuição da via folicular vinha sendo considerada desprezível, considerando-se que a porção da pele coberta por pelos representa somente 0,1% de toda sua superfície (BOLZINGER, 2012). Contudo, estudos recentes têm demonstrado que para aplicações médicas, sistemas carreadores baseados em partículas conseguem distribuir drogas eficientemente através da pele, e os folículos pilosos representam importantes reservatórios para tais sistemas de partículas carreadoras. Além disso, são circundados por extensas redes capilares, essenciais para a distribuição sistêmica de drogas (LADEMANN et al., 2011).

4.2 Fatores que afetam a penetração de drogas na pele

Além das características descritas acima, que constituem os principais fatores que conferem ao estrato córneo a propriedade de barreira primária da pele, outros itens devem ser considerados e avaliados, uma vez que interferem diretamente na permeabilidade e capacidade absorptiva do sítio de aplicação de drogas tópicas.

Dentre tais fatores, devem ser consideradas as variações de condições de integridade da pele nos sítios de aplicação, bem como as variações regionais existentes na pele, como sua espessura e constituição lipídica, além

de características relacionadas aos folículos pilosos, como seu diâmetro, densidade de folículos pilosos por área de pele, diâmetro dos fios de cabelo e volume do infundíbulo piloso (BAROLI, 2009). Ademais, idade, tipo de pele, e hormônios influenciam a permeabilidade da pele, devido a pequenas diferenças na constituição química e estrutural que ocasionam no estrato córneo. Sabe-se, por exemplo, que a permeabilidade da pele diminui com a progressão da idade (DASTON et al., 2004).

Por conseguinte, a permeação da pele pela rota intracelular pode ser favorecida ou desfavorecida, em relação à intercelular, dependendo dos fatores e características acima relacionados.

A presença de condições patológicas, alterações dermatológicas ou ainda a exposição prolongada a condições adversas podem comprometer a integridade e as condições do revestimento cutâneo, chegando a afetar até mesmo o metabolismo da pele, e ainda assim, amplo número de formulações destinadas ao tratamento da pele portadora de afecções variadas é testado na pele intacta, desconsiderando as variações químicas e estruturais existentes entre o revestimento cutâneo saudável e o não saudável, bem como as diferenças existentes entre espécies (BAROLI, 2009).

As condições ambientais, como a temperatura, também devem ser consideradas, uma vez que afetam diretamente parâmetros cruciais para absorção de drogas de forma transcutânea, como a vascularização e a fluidização das cadeias de lipídios intercorneócitos, alterando, conseqüentemente, a permeabilidade da pele (ELIAS; CHOI, 2005).

Características fisicoquímicas intrínsecas do composto avaliado também afetam os resultados dos estudos de permeação cutânea, e não podem ser subestimadas. Devem ser consideradas a solubilidade da molécula penetrante, bem como sua quantidade dissolvida no veículo, uma vez que a penetração no estrato córneo é direcionada termodinamicamente. O pH do veículo utilizado e o pKa do composto ativo devem ser criteriosamente selecionados, uma vez que somente a fração não ionizada do composto será transportada até a camada mais profunda da epiderme (BAROLI, 2009; MOSER et al., 2001).

O coeficiente de partição óleo/água da molécula penetrante também é fator determinante na penetração da molécula. Assim, moléculas hidrofílicas

apresentam baixa penetração no estrato córneo, em relação às lipofílicas (MOSS et al., 2002). Além disso, o peso molecular acima de 600 Da é considerado inadequado para permeação na pele (BARRY, 2004), e outras características como coeficiente de difusão e polaridade da molécula, e as características do veículo também devem ser consideradas (BAROLI, 2009).

5. Derivados de Dibenzoilmetano

Os dibenzoilmetanos (DBM) (1,3-difenilpropano-1,3-diona), cuja estrutura geral se encontra representada na Figura 4, são pequenas β -dicetonas cujas atividades antitumorais e fotoprotetoras vem sendo exploradas em diversos estudos (KHOR et al., 2009; NAKANO et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2003; SINGLETARY et al., 1998). As β -dicetonas se apresentam, principalmente, na forma enólica e como quelatos de metais, na presença de íons como Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , sendo que tais propriedades quelantes podem representar papel importante nas suas atividades antitumorais (NAKANO et al., 2004).

Na natureza, os dibenzoilmetanos são raramente encontrados, podendo serem isolados de algumas espécies de *Lonchocarpus*, constituindo uma subclasse de flavonóides (MAGALHÃES; NOGUEIRA, 1997; NOGUEIRA et al., 2003), como foi apresentado no estudo de Magalhães et al. (2007), em uma pesquisa em que analisaram extratos obtidos a partir de raiz de *Lonchocarpus montanus*, e identificaram vinte e três flavonóides, e dentre estes, um derivado de DBM, que estava sendo isolado pela primeira vez.

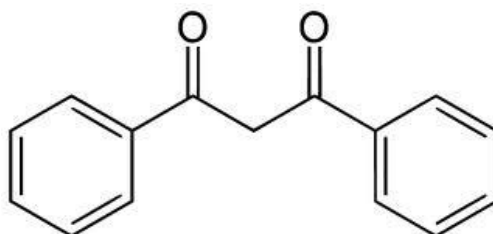


Figura 4 – Estrutura do dibenzoilmetano.

Derivados de dibenzoilmetano que apresentam atividade fotoprotetora, como Eusolex® 8020 e Parsol® 1789, têm sido utilizados em filtros solares,

sendo, em sua maioria, mais eficientes contra radiação ultravioleta A (UVA), prevenindo sua penetração nas células e bloqueando a produção de radicais livres (NOGUEIRA et al., 2003). Wetz e colaboradores (2004), por exemplo, apresentaram um derivado do 4-tert-butil-49-metoxidibenzoilmetano (BM-DBM), o 1-(4-tert-butilfenil)-2-decanil-3-(49-metoxifenil)-propano-1,3-diona (C10-DBM), e compararam sua eficiência de absorção em soluções orgânicas com os resultados obtidos a partir de soluções idênticas contendo o BM-DBM com ou sem a irradiação por lâmpada de xenônio, e identificaram que sua absorbância de UV-A foi acentuada sob irradiação, e sua fotoestabilidade, sob irradiação, foi maior do que a das soluções contendo o BM-DBM.

É importante ressaltar que o BM-DBM é o derivado de DBM mais utilizado em formulações fotoprotetoras, sendo o seu uso aprovado pelas autoridades fiscalizadoras da Europa, Estados Unidos, Japão e Austrália. Esta classe de derivados de DBM apresenta alta absorção em torno de 360 nm (HUBAUD et al., 2008).

O estudo publicado por Hubaud et al. (2008) descreveu a síntese de dezoito derivados de 1,3-dibenzoilmetano e relacionou as variações no espectro de absorção à natureza dos grupos substituintes doadores ou receptores. A presença de dois ou três grupos metoxi no mesmo anel aromático pareceu ser a característica mais importante para o uso cosmético dos compostos testados.

A atividade fotoprotetora de uma série de derivados de dibenzoilmetano foi explorada por Nogueira et al. (2003), em um estudo que descreveu a síntese de dezenove compostos derivados de dibenzoilmetanos comerciais, e avaliou a atividade citotóxica de tais compostos, em quatro linhagens celulares derivadas de diferentes tipos de câncer humano. Dentre os compostos obtidos e testados, oito apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens celulares utilizadas. Tais compostos tiveram, ainda, sua fotoestabilidade avaliada após exposição à luz ultravioleta por nove horas, e um deles, apresentou-se altamente estável. Ademais, o mesmo composto apresentou IC₅₀ (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular) menor que o da doxorrubicina (agente quimioterápico de ampla utilização) para melanoma,

reunindo, assim, características desejáveis para sua aplicação em formulações químico e fotoprotetoras.

Além disso, as propriedades antitumorais dessa classe de compostos vêm atraindo interesse de diferentes grupos de pesquisadores. Nakano et al. (2004), relacionaram β -dicetonas, inclusive o dibenzoilmetano, à inibição de tumores por meio da indução de mecanismos apoptóticos, como a ativação de caspases. Neste estudo, foi analisada a atividade citotóxica de uma série de β -dicetonas, pelo método que usa o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) como corante indicativo da viabilidade celular. Após este teste, foi calculado o índice de seletividade de cada um dos compostos (índice que relaciona o efeito citotóxico do composto sobre linhagens celulares derivadas de células normais e de linhagens derivadas de células tumorais). Por fim, os pesquisadores avaliaram a atividade de caspases após o tratamento das células com os compostos, e identificaram a ativação de caspases 3, 8 e 9 por alguns dos compostos que apresentaram atividade citotóxica.

KHOR et al. (2009) avaliaram, *in vivo*, o efeito de DBM na dieta em relação a neoplasia de próstata usando modelo de camundongos TRAMP (transgênicos para câncer de próstata), além de analisar os efeitos do tratamento de linhagens celulares de câncer de próstata com o composto. Os animais foram submetidos a uma dieta suplementada com DBM a partir de 12 semanas de vida, até a 24^a semana. Os animais controle receberam somente a dieta, sem suplementação. Após os períodos de tratamento estabelecidos, os animais foram eutanasiados e submetidos à autópsia simples, sem identificação de alterações significativas, e tiveram o aparelho genitourinário (vesícula seminal, próstata e bexiga) excisados e suas amostras foram submetidas à análise histológica detalhada, além de *Western blotting*, para quantificação de proteínas relacionadas ao ciclo celular, também analisadas nas linhagens celulares usadas no teste *in vitro*, e quantificação do DBM em amostras de plasma e também dos tecidos. As células tratadas foram submetidas à citometria de fluxo para estabelecimento da fase do ciclo celular em que se encontravam, e também tiveram amostras direcionadas para *Western blotting*, que identificou que o DBM pode atuar pela inibição da progressão do ciclo celular, suprimindo proteínas relacionadas ao ciclo celular,

como pS6, c-myc, pRb, ciclina D1, ciclina A, Akt fosforilada, PDK-1 fosforilada e S6 fosforilada.

Outro estudo que relacionou suplementação de DBM na dieta à sua atividade antineoplásica foi realizado por Lin et al. (2001), que demonstraram o papel de uma dieta de 1% de DBM na inibição de tumor mamário em ratas Sencar induzido por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DBMA).

Estudos mais recentes têm relacionado a atividade do DBM a mecanismos celulares variados, além da supressão da progressão do ciclo celular, como o trabalho supramencionado. Os mecanismos listados vão desde a inibição de fatores inflamatórios (ANAND et al., 2011), passando por atividade oxidante (HEGEDÜS et al., 2013), até a indução de apoptose (WANG et al., 2011).

Anand et al. (2011) investigaram o potencial de DBM e outros compostos relacionados, em relação à curcumina, outra β -dicetona, de suprimir o NF- κ B induzido por TNF (fator de necrose tumoral), produtos gênicos regulados pelo NF- κ B (COX-2, que é um marcador antiinflamatório), além de sua capacidade de suprimir a progressão do ciclo celular (ciclina D1, um marcador do ciclo celular) e a angiogênese (VEGF, fator de crescimento endotelial vascular, que é o principal agente de formação de novos vasos sanguíneos), e o resultado sinalizou a atividade dos compostos avaliados, incluindo o DBM, por meio das vias de sinalização celular relacionadas, induzidas pelo TNF.

Já Hegedüs et al. (2013) realizaram um *screening* entre os compostos de uma biblioteca própria, e identificaram vinte e nove compostos com atividade antioxidante, com base em testes de viabilidade variados, como o ensaio de resazurina, em que as células são tratadas com o composto-teste e posteriormente expostas à peróxido de hidrogênio, e o ensaio com MTT (3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazolium bromido), que identifica a viabilidade celular indireta pela medida da absorbância, além de testes específicos para avaliação de enzimas e proteínas relacionadas à morte celular. Dos 29 compostos obtidos, quatro eram derivados de dibenzoilmetano, que apresentaram atividade antinecrótica no experimento realizado, sem, entretanto, ativar caspases. Foi identificado que tais compostos atuam inibindo

a kinase ERK 1/2, e ainda, que esta inibição não foi específica a um tipo celular específico.

O terceiro experimento supramencionado, realizado por Wang et al. (2011), avaliou os efeitos de um derivado de dibenzoilmetano, o hidroxibenzoilmetano, sobre a via da ornitina descarboxilase (ODC). A ODC é uma enzima envolvida na biossíntese de poliaminas (putrescina, espermetina, espermina) que atuam em funções biológicas variadas, como embriogênese, ciclo celular e proliferação celular, e que cuja expressão e atividade aparecem aumentadas em células tumorais. Inibidores de ODC podem induzir apoptose em modelos *in vitro* e *in vivo*. Após o tratamento das células utilizadas no estudo citado com hidroxidibenzoilmetano (HDB), foi identificada uma redução na atividade e expressão da enzima ODC de acordo com a dose do tratamento recebido, com indução de apoptose nas células tratadas. Ademais, a superexpressão da enzima ODC reduziu a apoptose induzida pelo tratamento com hidroxidibenzoilmetano, prevenindo a liberação de citocromo c e consequente ativação da via das caspases. Observou-se, ainda, que o tratamento com HDB aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), e a superexpressão da enzima ODC conseguiu diminuir esses níveis, concluindo-se que o HDB possui propriedade apoptótica nas células por meio do aumento dos níveis de ROS.

Considerando todas as informações mencionadas, o presente estudo teve como relevância dar continuidade à avaliação das propriedades de um dos derivados de DBM obtido por Nogueira et al. (2003), e relacionar seus potenciais efeitos antitumorais, explorando uma via diferenciada de distribuição da droga.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Síntese do composto 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona

O composto $C_{22}H_{18}O_2$ (Figura 5) utilizado neste trabalho, um derivado de dibenzoilmetano, foi sintetizado segundo Nogueira et al. (2003), e está patenteado sob número de registro PI65838, depositado em 22/12/2000 (MARSAIOLI, 2000). O composto foi caracterizado pela análise dos espectros obtidos por ressonância magnética nuclear de 1H e ^{13}C (Anexos A e B, respectivamente).

1.1 Procedimento geral de Alquilação

Em um balão de duas bocas de fundo redondo (100 mL), acoplado a um funil de adição contendo 1,3-difenil-1,3-propanodiona (Sigma-Aldrich®) a ser alquilada (1,34 mmol) adicionou-se K_2CO_3 (4,02 mmol) e acetona (20 mL), deixou-se sob agitação por ca. 30 min. Após este tempo, adicionou-se lentamente uma solução do brometo de benzila (1,34 mmol), em acetona (10 mL). A mistura reacional foi agitada vigorosamente por 24 h e então filtrada para remoção dos sólidos em suspensão. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em camada preparativa (CCP, hexano/AcOEt 80:20 v/v) levando à obtenção do produto alquilado desejado, com rendimento de 80%.

1.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN 1H e ^{13}C (Anexos A e B) foram obtidos em espectrômetro Mercury 300. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) usando-se como referência interna tetrametilsilano (TMS) para espectros de RMN 1H . Os resultados das atribuições de carbono e hidrogênio estão descritos abaixo para o derivado de dibenzoilmetano (Figura 5).

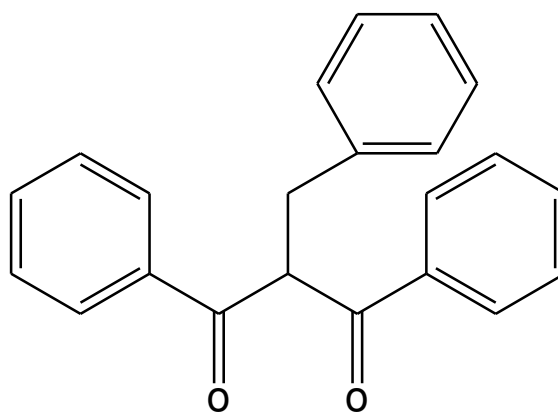


Figura 5 - 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona

(Sólido amorfo, com ponto de fusão entre 58,3 e 58,7 °C).

RMN ¹H: δH (300 MHz; CDCl₃; TMS) 3.45 (2H, d, *J* 6.7, CH₂ Bz), 5.52 (1H, t, *J* 6.7, H-2), 7.16 (1H, tt, 6.6 and 2.0, H-4''), 7.24 (4H, m, H-2'', H-3'', H-5'' and H-6''), 7.40 (4H, tt, *J* 7.9 and 1.3, H-3 and H-5'), 7.53 (2H, tt, 7.5 and 1.3, H- 4'), 7.89 (4H, dd, *J* 8.5 and 1.3, H-2' and H-6').

RMN ¹³C: δC (77 MHz; CDCl₃; TMS) 35.21 (CH₂Bz), 58.99 (CH, C-2), 126.63 (CH, C-4''), 128.60 (4CH, C-3' and C-5'), 128.84 (4CH, C-2'', C-3'', C-5'' and C-6''), 128.98 (4CH, C-2' and C-6'), 133.51 (Co, C-1''), 135.98 (2CH, C-4'), 139.05 (2Co, C-1'), 195.58 (2Co, C-1 and C-3).

2. Preparação da composição farmacêutica contendo o composto

2.1 Gel transdérmico

Foi utilizado um gel transdérmico (Tabela 2) contendo o composto ativo em duas concentrações a serem testadas: 1 mg/ml e 3 mg/ml. As concentrações utilizadas neste trabalho foram pré-determinadas com base e em comparação aos protocolos utilizados em outros trabalhos (KAKUMANU et al., 2011; PREETHI et al., 2010; TAGNE et al., 2008; TAYLOR et al., 2006).

Tabela 2 – Concentrações das substâncias utilizadas na composição farmacêutica do gel transdérmico.

SUBSTÂNCIAS	CONCENTRAÇÕES
Dibenzoilmetanos	1 e 3%
DMSO	10%
Aristoflex®	2%
Propilenoglicol	5%
Álcool 70 %	qsp

Inicialmente, 1 e 3 mg do composto foram, separadamente, dissolvidos em 2,5 mL DMSO. Os demais procedimentos foram realizados separadamente, para obtenção de duas formulações contendo o composto nas diferentes concentrações (1 mg/mL e 3 mg/mL).

Foram pesados 500 mg de Aristoflex® e medidos 1,25 mL de propilenoglicol. O Aristoflex® e o propilenoglicol foram vertidos em um gral de massa e misturados com auxílio de uma espátula, e logo em seguida foi adicionado o composto dissolvido em DMSO, para preparo das duas concentrações. Estes foram novamente misturados com auxílio de uma espátula e o volume foi completado com auxílio de álcool 70 % até 25 mL. Após esta etapa, a formulação foi deixada em repouso para completa hidratação do gel na presença da solução hidroalcoólica. Os frascos contendo as concentrações desejadas do composto foram armazenados hermeticamente fechados até o momento do uso.

Este tipo de composição farmacêutica foi escolhido a partir de testes prévios, pois apresentou melhor espalhamento e absorção pela pele com maior resistência à água, suor e secreção sebácea. A preparação foi feita em farmácia de manipulação, a fim de que os padrões farmacotécnicos e sanitários fossem mantidos. O Aristoflex® foi usado como agente gelificante, o propilenoglicol como umectante, o DMSO como promotor de absorção e o álcool 70% como coadjuvante antimicrobiano.

3. Cultura de células

No presente estudo, utilizou-se células das linhagens melan-A, estabelecida a partir de melanoblastos normais (BENNETT et al., 1987) e B16F10, estabelecida a partir de células de melanoma murino (FIDLER, 1973). As células da linhagem B16F10 são altamente metastáticas, tendo sido consideradas mais resistentes a drogas e mais instáveis geneticamente do que outras linhagens das células B16 (CILLO et al., 1987). Já as células melan-A são singências às células de melanoma do tipo B16, constituindo um excelente parâmetro não-tumorigênico para estudos celulares e moleculares relacionados à malignidade do melanoma (BENNETT et al., 1987).

As células foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura completo ("Roswell Park Memorial Institute" - RPMI - suplementado com 10 % de soro fetal bovino e glutamina 2 mM/mL) em frascos de cultura de 25 ou 75 cm², de poliestireno, em incubadora à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Quando as culturas atingiam a semiconfluência, as células eram tripsinizadas, replaqueadas e mantidas nas condições acima descritas. As culturas foram periodicamente observadas em microscópio de luz invertido, e alíquotas, congeladas e descongeladas de acordo com a necessidade do experimento.

3.1 Tripsinização

Culturas de células subconfluentes, após o descarte do meio de cultura, eram lavadas três vezes com PBS e incubadas à 37°C com solução de tripsina a 0,25% e 0,05% de EDTA até que, sob observação microscópica, fosse detectada a dissociação das células entre si, e delas com o substrato. A reação de tripsinização era interrompida pela adição de 5,0 mL de meio completo. A suspensão celular era coletada em tubo de centrifuga e centrifugada a 1500 g, por 5 minutos, à temperatura ambiente. O meio sobrenadante era cuidadosamente descartado e as células ressuspendidas em meio completo livre de tripsina. Após efetuar a contagem celular, com teste de viabilidade, volumes da suspensão celular foram subcultivados contendo o número desejado de células.

3.2 Contagem do número de células viáveis

As contagens das células viáveis foram efetuadas em hemocitômetro de Neubauer após o carregamento de ambas as câmaras com a suspensão celular, obtida por meio da tripsinização da cultura celular desejada. Para a determinação do número de células viáveis foi utilizado o teste de exclusão de corante, que consiste na incubação de uma alíquota de células com solução de Azul de Tripán 0,1 % (diluição 1:1), por dez minutos a 37°C. Células híginas excluem o corante. Para o cálculo da percentagem de células viáveis utiliza-se a fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

Para determinação da quantidade de células viáveis por cm³ ou mililitro, deve-se calcular a média aritmética entre o número de células vivas das duas câmaras. O número encontrado deve ser multiplicado por 10⁴ e pelo valor de diluição (se houver). São contadas somente as células que se encontram ao menos parcialmente na parte central da câmara de Neubauer.

3.3 Criopreservação

Quando necessário, alíquotas de células foram congeladas após tripsinização rotineira de culturas semiconfluentes. A interrupção da reação de tripsinização foi realizada com adição de meio completo e lavagem das células por centrifugação a 1500 g. As células foram, então, ressuspendidas em meio completo contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), e as suspensões celulares acondicionadas em criotubos de até 1,8 mL, que permaneceram durante a noite à - 80°C e foram posteriormente transferidos para o nitrogênio líquido (-196°C), onde foram armazenados até que seja necessário seu descongelamento.

3.4 Descongelamento

Para o descongelamento, criotubos com células da linhagem celular de interesse foram mantidos a 37°C, durante 5 minutos. A suspensão celular é então lavada com 10 mL de meio completo por centrifugação a 1500 g durante 3 minutos, à temperatura ambiente, para a remoção do DMSO utilizado no congelamento. As células foram ressuspensas em meio completo, após descarte do sobrenadante, e subcultivadas em frasco de cultura de 25 cm².

4. Atividade citotóxica medida pelo ensaio do MTT

Para o desenvolvimento de pesquisa clínica, realizada em seres humanos, com o objetivo de descobrir ou verificar os efeitos farmacodinâmicos, farmacológicos, clínicos e/ou outros efeitos de um novo medicamento, ou ainda para identificar reações adversas ao produto em investigação, e averiguar sua segurança e eficácia, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) estabelece que testes *in vitro*, seguidos de testes com animais, devem ser realizados previamente. Na fase pré-clínica, que deve, então, constituir a primeira fase de uma pesquisa clínica, a nova molécula cujo potencial terapêutico deve ter sido identificada previamente através de testes *in vitro*, com células, deverá ser aplicada a animais, para averiguação de suas propriedades. Nesta fase, ainda segundo a ANVISA (2013), mais de 90% das substâncias testadas são eliminadas, por não se apresentarem seguras. Com o objetivo de familiarizar a equipe à sequência estabelecida, então, pela ANVISA, no presente trabalho, foram realizados, primeiramente, testes de citotoxicidade utilizando as linhagens celulares descritas anteriormente.

O ensaio de citotoxicidade aqui proposto, com base em sais de tetrazólio, consiste numa análise colorimétrica para quantificação de metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória de células em resposta ao tratamento com o composto químico em análise. Os sais de tetrazólio podem ser usados para medir a atividade metabólica de células viáveis, uma vez que são reduzidos a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima ativa somente em células com metabolismo e cadeia

respiratória intactos. O formazan é quantificado fotometricamente e é relacionado com o número de células viáveis.

De acordo com experimentos pilotos realizados previamente, as células em crescimento exponencial foram tripsinizadas e plaqueadas em microplacas de 96 poços, na densidade de 3×10^3 células por poço. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio de cultura adicionado do composto ativo, em diferentes concentrações (250 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 0,25 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 6), sendo as células incubadas por outras 48 e 72 horas em uma atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C. Foram utilizados, como controles, poços contendo o mesmo número de células plaqueadas e meio de cultura, e também poços contendo as células em meio de cultura mais 1% de DMSO, concentração máxima utilizada do solvente para a solubilização do composto.

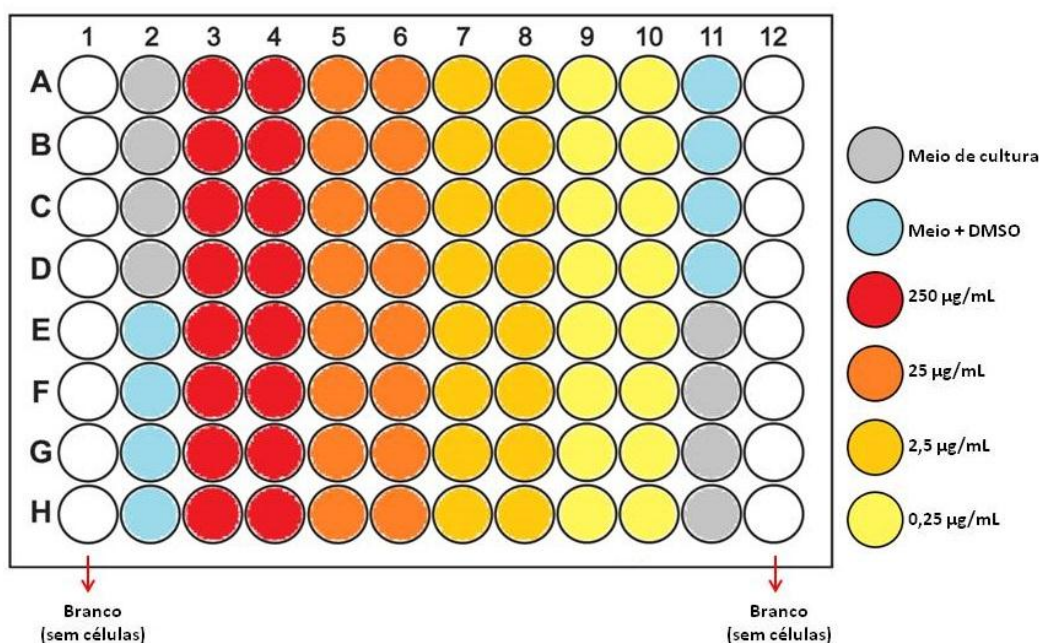


Figura 6 – Esquema da organização da placa de 96 poços utilizada para os ensaios com o MTT.

Quatro horas antes do término de cada período teste (48 e 72 horas), o meio contendo o tratamento foi removido, as células foram lavadas com PBS, e 100 μL de meio de cultura contendo 10 μL de sal de tetrazólio (MTT, 3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólio bromido: 5 mg/mL) foram adicionados às células em cultura, que foram incubadas por 4 h, protegidas da luz. Após esse período de exposição das células ao MTT, o meio de cultura foi removido, e foram adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço, e as placas

incubadas por mais 30 minutos. Sob essas condições, o MTT é reduzido pelo NADH e NADPH em um produto insolúvel azul, o formazam, determinando assim, a viabilidade celular. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm e a concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) foi calculada. Todo este procedimento encontra-se ilustrado na Figura 7, e os testes foram realizados, em triplicata, nos diferentes tempos. O IC_{50} de cada linhagem serviu para o cálculo do índice de seletividade (IS) do composto.

O IS indica a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, e o potencial uso terapêutico deste composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da IC_{50} do composto sobre a linhagem de células normais melan-A e o valor da IC_{50} do composto sobre a linhagem de células neoplásicas B16F10:

$$IS = IC_{50} \text{ melan-A} / IC_{50} \text{ B16F10.}$$

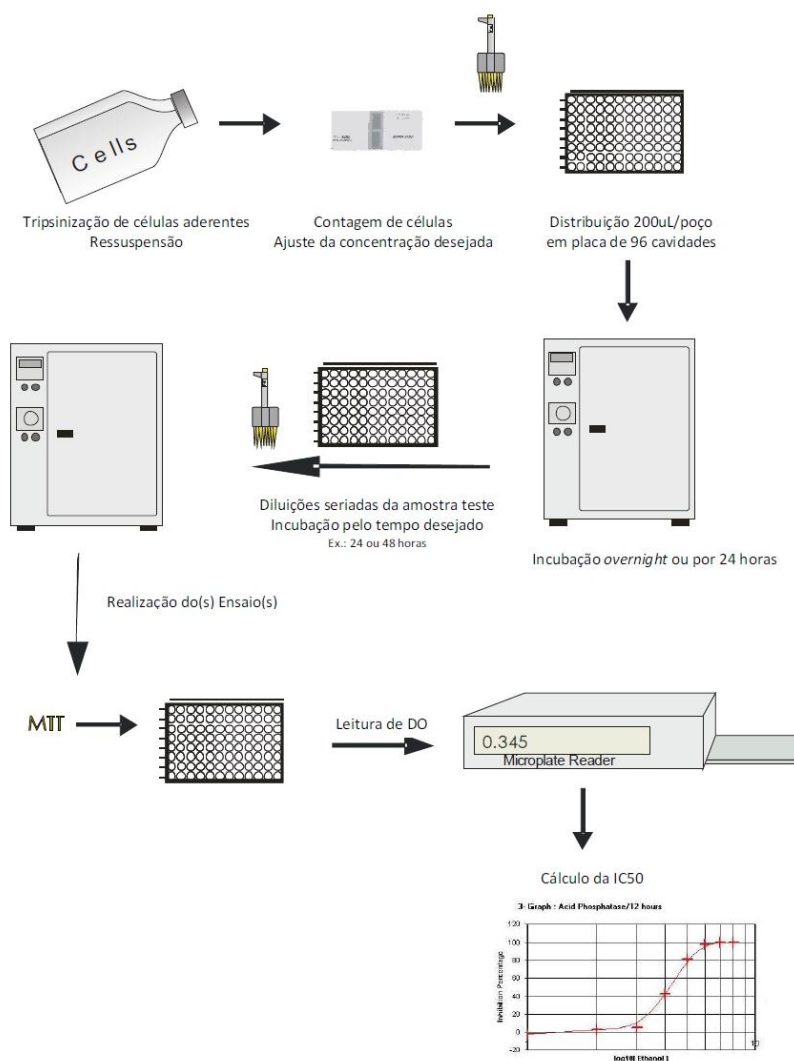


Figura 7 – Esquema do teste de citotoxicidade utilizando MTT.

5. Modelo de melanoma murino

A partir dos resultados obtidos nos testes *in vitro*, com base no índice de seletividade favorável obtido para o composto em avaliação, foram realizados testes pré-clínico, conforme descrito nesta seção.

Camundongos machos da linhagem C57BL/6, de 7-8 semanas de idade pesando 20 ± 5 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa, foram mantidos em biotério ventilado do laboratório de Biofármacos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, também na UFV. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico translúcido, de 24 x 37 x 19 cm, forrada com maravalha, em ambiente com condições controladas (22 ± 2 °C, $60 \pm 5\%$ umidade), com ciclo claro/escuro de 12h, separados por grupos. Receberam dieta padrão e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV, e foram aprovados pelo referido órgão (processo nº 11/2013).

Os animais foram contidos e tricotomizados na região da nuca, para facilitar a inoculação das células, e para a aplicação do tratamento tópico no local (Figura 8). Para a indução do tumor, 1×10^5 células da linhagem B16F10 foram inoculadas subcutaneamente no flanco dos camundongos C57Bl/6 machos (HAMANO et al., 2003; ZEISBERG et al., 2007). Após 24 horas, os animais começaram a receber o tratamento tópico, realizado durante o período de 21 dias. O número de dias de tratamento foi pré-estabelecido por meio de testes prévios.

Após o período do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, com posterior incisão dorsal, para excisão do tumor e análise da presença e medição de possíveis focos de metástase, e incisão ventral, na linha média, para excisão das amostras de fígado, pulmão e rim, além da retirada das amostras de sangue por punção cardíaca.

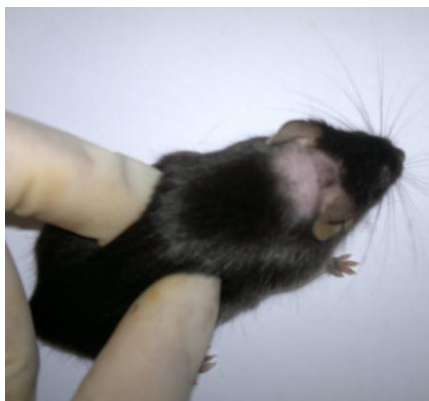


Figura 8 – Detalhe da tricotomia na região dorsal, onde foram injetadas as células para indução do melanoma e aplicado o tratamento ao longo dos 21 dias.

Os dejetos produzidos durante o experimento foram rotineiramente acondicionados em sacos plásticos, devidamente etiquetados e identificados com o conteúdo do dejetos, e encaminhados, sob agendamento, para a Diretoria de Logística, Segurança e Gestão de Resíduos e Rejeitos. As gaiolas onde os animais foram acondicionados tiveram a maravalha renovada rotineiramente conforme a necessidade, e eram lavadas com detergente neutro e limpas com álcool 70%, para a manutenção das condições higiênicas adequadas ao longo do experimento.

6. Tratamento

O experimento *in vivo* foi realizado utilizando como veículo para o composto ativo um gel transdérmico, para fins de otimização da penetração na pele (KAKUMANU et al., 2011; TAGNE et al., 2008). Foram utilizados 5 grupos no total, conforme descrição abaixo (n = número de animais por grupo), totalizando 27 animais. Os animais receberam o tratamento tópico por 21 dias, começando 24 horas após a indução do tumor, de acordo com os grupos listados abaixo.

- Grupo 0: Controle – animais saudáveis (n = 3)
- Grupo 1: Controle – animais doentes sem tratamento (n = 6)
- Grupo 2: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 3 mg/mL (n = 6)
- Grupo 3: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1 mg/mL (n = 6)
- Grupo 4: Controle – gel transdérmico sem composto (branco) (n = 6)

O tratamento foi aplicado de forma tópica, na pele dos animais, no mesmo local onde foi induzido o tumor (região tricotomizada).

7. Análise das amostras de tecido coletadas

As amostras de tecido (tumor, pulmões, fígado e rins) coletadas foram fixadas por 24 horas em formol 10%, e processadas no Laboratório de Histopatologia, do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa. As lâminas utilizadas para análise histológica foram coradas em hematoxilina-eosina.

As amostras de sangue foram acondicionadas em eppendorfs devidamente identificados, e após a separação do soro (descrita a seguir), foram congeladas a -20°C , para posterior realização do ensaio de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para quantificação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

7.1 Avaliação de parâmetro sanguíneo

Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2400 g por 10 minutos para separação do soro, e o soro, congelado em eppendorfs a -20°C , conforme orientações do fabricante do kit utilizado para realização do ELISA do tipo sanduíche. As amostras de soro foram avaliadas para presença de VEGF-A, com kit Invitrogen™ KMG0111, seguindo as instruções do manual que acompanha o kit.

7.2 Avaliação histológica do tumor

Após a excisão do tumor, foram registradas três medidas para estimativa do volume tumoral pela fórmula (comprimento x largura x altura) x 0,52 (HAMANO et al., 2003; ZEISBERG et al., 2007), para fins de comparação entre controles e tratamentos (KAKUMANU et al., 2011).

Foram feitas lâminas histológicas dos tumores, sendo avaliados, histologicamente, o estado geral do tecido, a presença de vasos sanguíneos,

atipias celulares e teciduais e indicativos de morte celular, usando-se o software Image-Pro Plus, comparando-se os grupos tratados ao grupo controle. As lâminas foram avaliadas qualitativamente.

7.3 Análise das amostras de fígado e rim

Nas amostras de fígado e rim, foi avaliada a presença de alterações histológicas indicativas de citotoxicidade do tratamento sobre o tecido em questão. Assim, buscou-se, principalmente, alterações da arquitetura normal do tecido, e indicativos de morte celular, como núcleos picnóticos, usando o software Image-Pro Plus.

7.4 Análise das amostras de pulmão

Nas amostras de pulmão, buscou-se possíveis focos de metástase, usando o software Image Pro Plus.

8. Análise estatística

Os dados referentes ao volume tumoral e à quantificação de VEGF estão apresentados sob forma de média \pm desvio padrão e foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, foi aplicado o teste de Bonferroni, para a verificação da existência de diferenças estatísticas entre as médias dos tratamentos em relação aos controles utilizados, com nível de significância mínimo de 0,05 para os valores analisados. Para a análise dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism®.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi realizado previamente teste *in vitro*, utilizando células de melanoma murino, para avaliar o potencial terapêutico do composto.

Após o teste de citotoxicidade realizado com MTT, a concentração inibitória de 50% das células pelo composto foi calculada, utilizando-se os resultados das leituras de absorbância obtidas. Os resultados foram analisados no programa GraphPad Prism®. Com base nas duas linhagens celulares testadas, os valores de IC₅₀ obtidos foram de 225,5 µg/mL para as células da linhagem melan-A (Gráfico 1) e 53,05 µg/mL para as células da linhagem B16F10 (Gráfico 2).

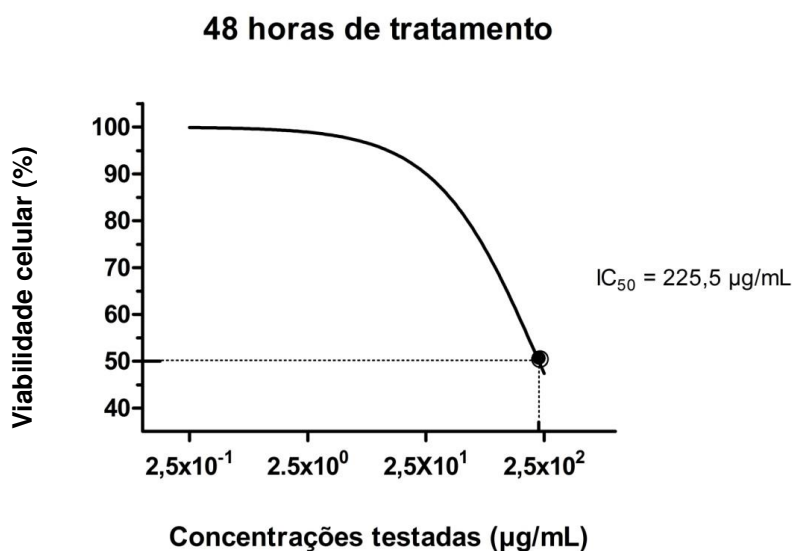


Gráfico 1 – Análise do ensaio de MTT realizado com as células da linhagem melan-A, indicando o valor de IC₅₀ obtido (225,5 µg/mL), obtida a partir do programa GraphPad Prism.

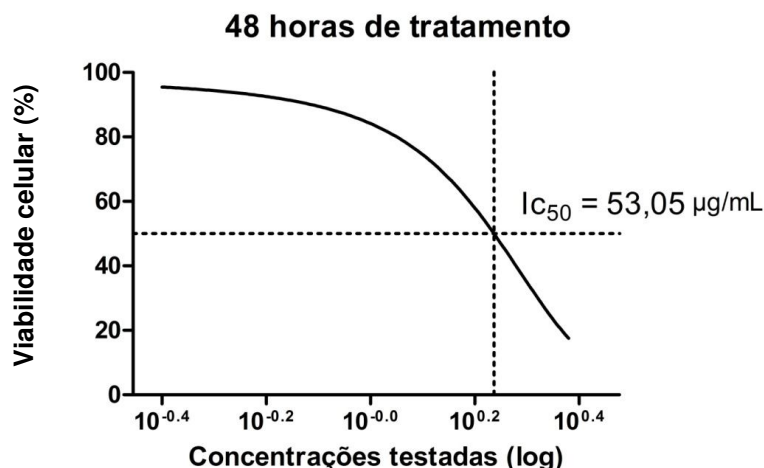


Gráfico 2 - Análise do ensaio de MTT realizado com as células da linhagem B16F10, indicando o valor de IC_{50} obtido (53,05 $\mu\text{g/mL}$), obtida a partir do programa GraphPad Prism.

A partir dos valores de IC_{50} supramencionados, foi calculado o índice de seletividade (IS) do composto, que é um dos possíveis parâmetros utilizados como indicativo do potencial terapêutico de medicamentos. Valores de IS acima de 2,0 ou 3,0 têm sido considerados significativos (BADISA et al., 2009; BÉZIVIN *et al.*, 2003 SUFFNESS; PEZZUTO, 1991), ou seja, este valor indica que o composto é duas ou três vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais, o que tornaria um composto adequado para testes clínicos.

No presente estudo, obteve-se o valor de 4,25 (Tabela 3) como índice de seletividade, o que indica que o composto é 4,25 vezes seletivo para as células do melanoma em relação às células derivadas de melanócitos normais, apresentando potencial terapêutico para ser testado *in vivo*.

Tabela 3 - Valores de IC_{50} obtidos para as duas linhagens celulares utilizadas, e o índice de seletividade obtido.

Linhagem celular	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$	IS
Melan-A	225,5	4,250707
B16F10	53,05	

Pode-se calcular, ainda, a porcentagem de proliferação celular em relação aos controles negativos utilizando meio de cultura (Tabela 4), e a inibição de crescimento das células sob os tratamentos utilizados, e identificou-

se que a concentração mais alta (250 µg/mL) promoveu inibição de crescimento de 53,81% nas células melan-A e de 80,95% nas células B16F10.

Tabela 4 – Proliferação celular das células tratadas com o composto ativo, em relação aos controles negativos.

TRATAMENTO	VIABILIDADE MÉDIA (%)	
	melan-A	B16F10
250 µg/mL	46,19	19,05
25 µg/mL	105,32	83,01
2,5 µg/mL	104,36	99,8
0,25 µg/mL	95,52	86,2

As imagens obtidas a partir das células utilizadas no ensaio de citotoxicidade (Figura 9 e Figura 11) indicam que a maior concentração testada, 250 µg/mL, inibiu significativamente o crescimento celular, em comparação aos controles utilizados, com meio de cultura e meio de cultura acrescido de 1% de DMSO, que foi a concentração máxima de DMSO utilizada nas células que receberam tratamento com o composto ativo, derivado de dibenzoilmetano.

É interessante observar que, juntamente com a redução do número de células em relação aos controles, a morfologia das células B16F10 tratadas a concentração de 250 µg/mL (Figura 10) mudou significativamente, passando a um formato mais alongado (fusiforme), e aparentando menor adesividade entre as células e também com a placa, características consistentes com a transição epitelial-mesenquimal (EMT), em que células tumorais podem adquirir fenótipo mesenquimal, apresentando maior capacidade migratória e infiltrativa (CHIDGEY; DAWSON, 2007; KALLURI; WEINBERG, 2009; ZEISBERG; NEILSON, 2009). Deve-se ressaltar, no entanto, que esta alteração somente foi observada nas células B16F10 tratadas com a maior concentração utilizada do composto, 250 µg/mL. Esta observação coincide com o relato de Mitrus et al. (2012), que avaliou diferentes parâmetros de células da linhagem B16F10 sob condições de estresse, e relatou a ocorrência de EMT sob privação de oxigênio. Considerando-se que células mais internas de massas tumorais constantemente precisam se adaptar a situações adversas e extremas, como de depleção de nutrientes e hipóxia, é esperado que células derivadas de linhagens tumorais, em cultura, sob situações adversas, também exibam

plasticidade (MITRUS et al., 2012). Além disso, células de melanoma, *in vivo*, também passam por um processo semelhante a uma EMT durante a mudança de sua fase de crescimento horizontal, para a fase de crescimento vertical infiltrativo (HSU et al., 2000).

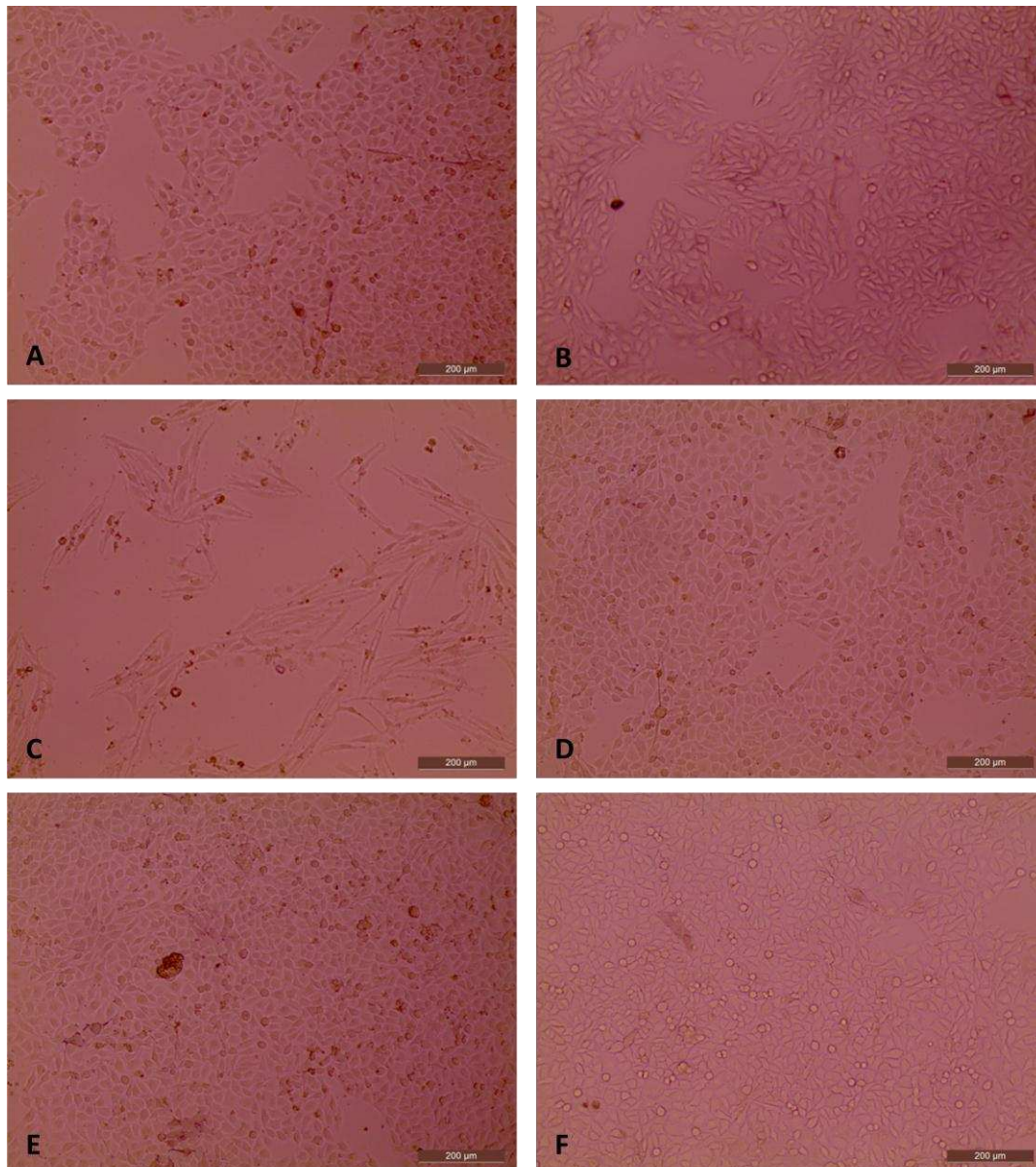


Figura 9 – Ensaio de citotoxicidade realizado com as células da linhagem B16F10, derivadas de melanoma murino. A – controle com meio de cultura; B – controle com meio de cultura e 1% de DMSO; C – tratamento com 250 µg/mL do composto ativo; D – tratamento com 25 µg/mL do composto ativo; E – tratamento com 2,5 µg/mL do composto ativo; F – tratamento com 0,25 µg/mL do composto ativo.

Este tipo de transição fenotípica ocorre fisiologicamente durante a embriogênese humana. Após a formação da linha primitiva, durante a

gastrulação, células do epiblasto, que tipicamente apresentam polaridade e expressão E-caderina, sofrem redução de adesividade, mudanças morfológicas e adquirem fenótipo tipicamente mesenquimal, desprendendo-se do epiblasto, e dando origem ao mesoderma e ao endoderma e, posteriormente, um processo semelhante também dá origem às células da crista neural, durante a formação do tubo neural (KALLURI; WEINBERG, 2009; FENOUILLE et al., 2012).

Considerando-se, ainda, que as células B16F10 utilizadas no presente estudo, apesar de especializadas e diferenciadas, são de origem neuroectodérmica, seriam necessárias análises moleculares detalhadas para se estabelecer de forma precisa quais as características da alteração apresentada. É possível que o quadro caracterize um tipo de transdiferenciação, ou metaplasia, em que um tipo celular diferenciado se converte em outro (ZEISBER; NEILSON, 2009), ou uma perda de diferenciação, com redução de adesividade e aumento de capacidade migratória (DUAN et al., 2013; PAULIS et al., 2010). As análises moleculares rotineiramente utilizadas para avaliar tais tipos de transições envolvem, primariamente, proteínas de adesão celular da família das caderinas (CHRISTOFORI; SEMB, 1999; DUAN et al., 2013).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade de células de melanoma de adquirirem fenótipo de menor adesividade e maior capacidade migratória (ALONSO et al., 2007; DISSANAYAKE et al., 2007; FENOUILLE et al., 2012). O trabalho de Dissanayake et al. (2007) relaciona a expressão de uma proteína sinalizadora da família Wnt, que atua via receptor acoplado a proteína G sobre o controle de genes do crescimento e da proliferação celular, à indução de transição epitelial-mesenquimal em células de melanoma humano através de mudanças no processamento de β -catenina e E-caderina. A indução da EMT avaliada pelo grupo parece ocorrer via proteína quinase C (PKC).

Já Fenouille et al. (2012) relataram a ocorrência de transição fenotípica semelhante a EMT em células de melanoma humano sob a regulação de uma proteína de matriz extracelular, SPARC (também conhecida como osteonectina), via proteína PI3K/Akt, aumentando a expressão SLUG, um fator de transcrição que reprime a expressão do gene da E-caderina, e promove,

assim, menor adesão entre as células. PI3K/Akt são envolvidas na regulação de diversos processos celulares básicos, como o ciclo celular, sobrevivência e metabolismo, e sua relação com a EMT e o câncer vem sendo amplamente estudada e revisada (LARUE; BELLACOSA, 2005). Foi observado, ainda, que não houve relação entre a inibição de BRAF e os efeitos promovidos via SLUG (FENOUILLE et al., 2012). Ademais, SLUG pode favorecer a sobrevivência celular, e antagonizar a apoptose induzida por p53 (VANNINI et al., 2007; WU et al., 2005).

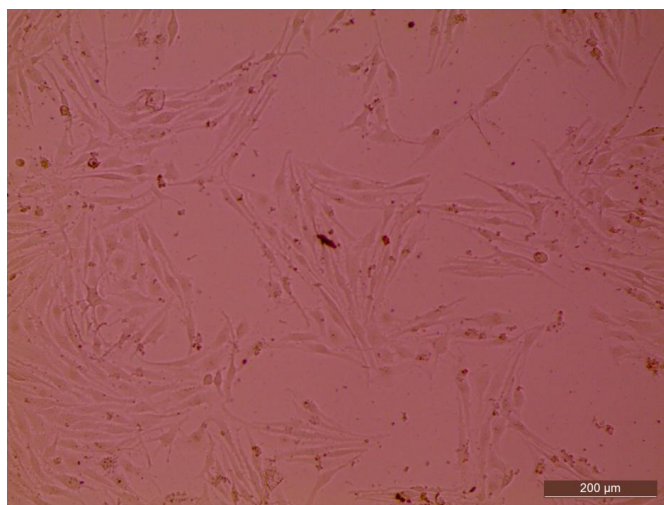


Figura 10 – Destaque das células B16F10 que receberam tratamento com 250 µg/ml do composto, e sua morfologia fibroblástica, típica de células de origem mesenquimal, após o tratamento.

Em relação ao ensaio realizado com as células da linhagem melan-A (Figura 11), derivadas de melanócitos murinos normais, pode-se observar uma redução significativa do número de células também na concentração mais alta, entretanto, a morfologia das células não se apresentou alterada sob nenhum dos tratamentos aqui utilizados. Este resultado coincide com os dados publicados por Nogueira et al. (2003), que indicaram atividade citotóxica de diferentes derivados de DBM *in vitro*, utilizando diferentes linhagens celulares.

Nakano e colaboradores (2004) também avaliaram a atividade citotóxica de diferentes β -dicetonas sobre linhagens derivadas de diferentes tipos de fibroblastos e células epiteliais normais e tumorais da cavidade oral humana e, para DBM, encontraram concentrações citotóxicas para 50% das células tumorais (CC_{50}) variando entre 9,5 e 51,4 µg/mL, e entre 55,6 e 4.309 µg/mL para as linhagens de células normais testadas. Assim, o resultado encontrado

para IC₅₀ (mesmo conceito básico de CC₅₀) no presente estudo para as células B16F10 (53,05 µg/mL) ficou pouco acima dos valores obtidos por Nakano et al. (2004) nas linhagens de células tumorais, e dentro da mesma faixa, nas linhagens de células normais (225,5 µg/mL para as células melan-A, nesta pesquisa). Vale ressaltar que no estudo de Nakano et al. (2004), somente a CC₅₀ relativa a uma das linhagens testadas (HPLF, fibroblastos do ligamento periodontal humana) destoou muito dos demais resultados obtidos, ficando em 4.309 µg/mL. Além disso, Nakano et al. (2004) encontraram índice de seletividade no valor de 3,7 para o DBM, e no presente trabalho, obteve-se 4,25, de modo que ambos os resultados corroboram o potencial terapêutico dos compostos avaliados.

Dibenzoilmetano também apresentou atividade citotóxica sobre células de carcinoma de próstata humana (JACKSON et al., 2002), com relação direta frente a concentração aplicada nos tratamentos, com valores de IC₅₀ entre 25 e 100 µM para as linhagens celulares testadas. Os autores relataram, ainda, o atraso do ciclo celular entre G₁ e S nas linhagens testadas, em resposta ao tratamento com DBM, e que esta alteração não apresentou relação com o gene p53, cuja expressão avaliada por *western-blotting* não se demonstrou alterada.

A partir dos relatos acima, pode-se observar que os compostos da família do DBM, composta de β-dicetonas, têm demonstrado consideráveis efeitos sobre a proliferação celular, por diferentes vias. Entretanto, há de se dar destaque a relação estabelecida por Nakano et al. (2004) entre a atividade de diferentes análogos de DBM e a ativação das caspases 3, 8 e 9, envolvidas na regulação da apoptose, estimulando, assim, a morte celular programada, e também, o trabalho de Pan et al. (2003), cujos resultados indicaram que o hidroxidibenzoilmetano promove apoptose pela liberação de citocromo c no citoplasma, ativação da via das caspases e pela promoção da entrada, no núcleo, de desoxirribonuclease ativada por caspases, e esta, por sua vez, degrada o DNA. Esta ressalva é feita tendo em consideração observações realizadas na presente pesquisa, após o experimento *in vivo*, que serão discutidas mais adiante, que levam a crer que este pode representar um dos mecanismos ativado pelo 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona avaliado neste experimento.

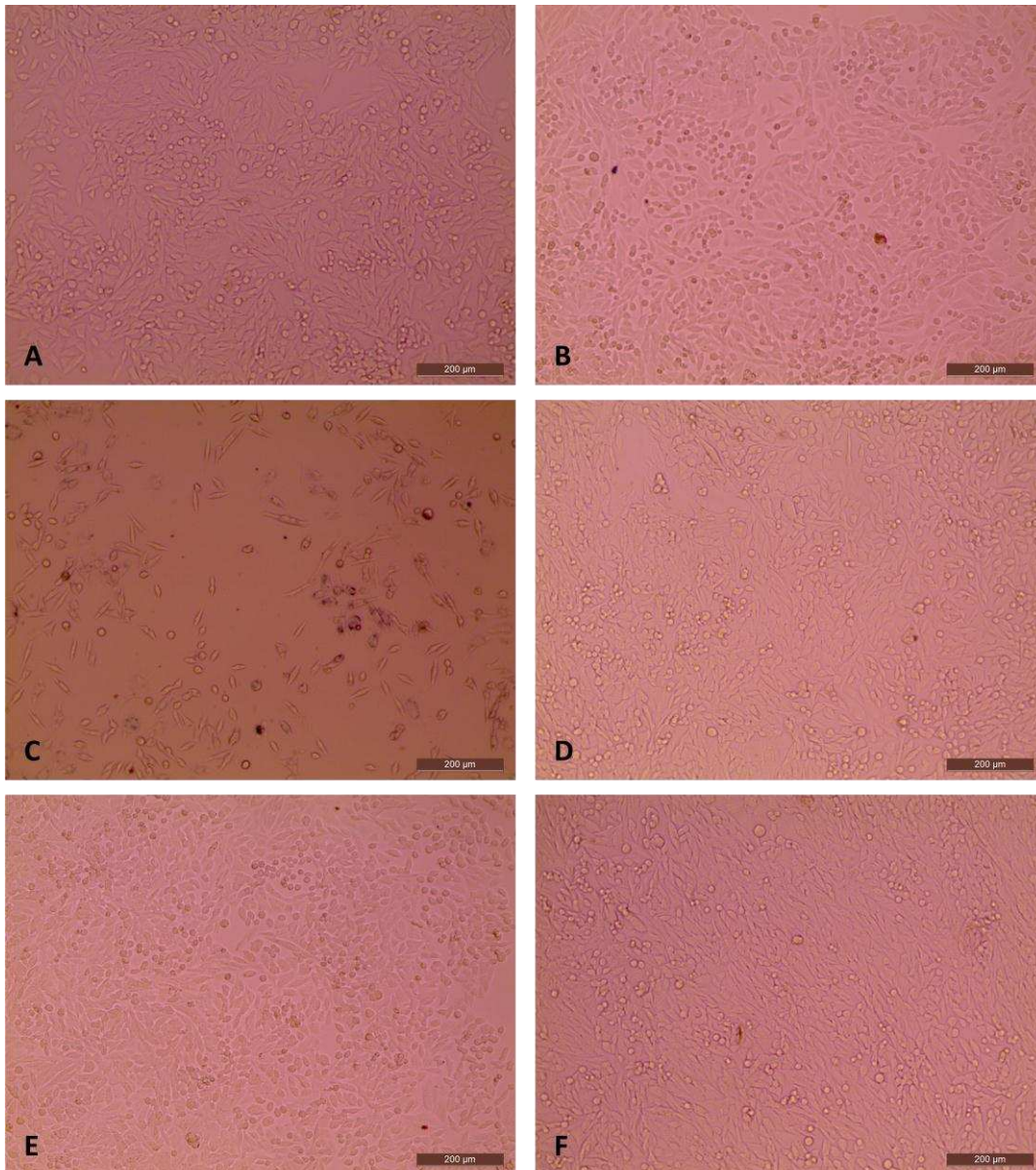


Figura 11 – Ensaio de citotoxicidade realizado com as células da linhagem melan-A, derivadas de melanoblastos murinos. A – controle com meio de cultura; B – controle com meio de cultura e 1% de DMSO; C – tratamento com 250 µg/mL do composto ativo; D – tratamento com 25 µg/mL do composto ativo; E– tratamento com 2,5 µg/mL do composto ativo; e F – tratamento com 0,25 µg/mL do composto ativo.

No experimento *in vivo*, cerca de 7 a 10 dias após a inoculação das células na região dorso-cervical dos animais, os tumores se tornaram palpáveis. Ao final do período experimental de 21 dias, o sítio de localização do tumor em alguns animais chegou a apresentar ulceração (Figura 12).



Figura 12 – Imagem representativa da ulceração (seta) que ocorreu na pele de alguns animais que fizeram parte deste estudo, após a indução do melanoma.

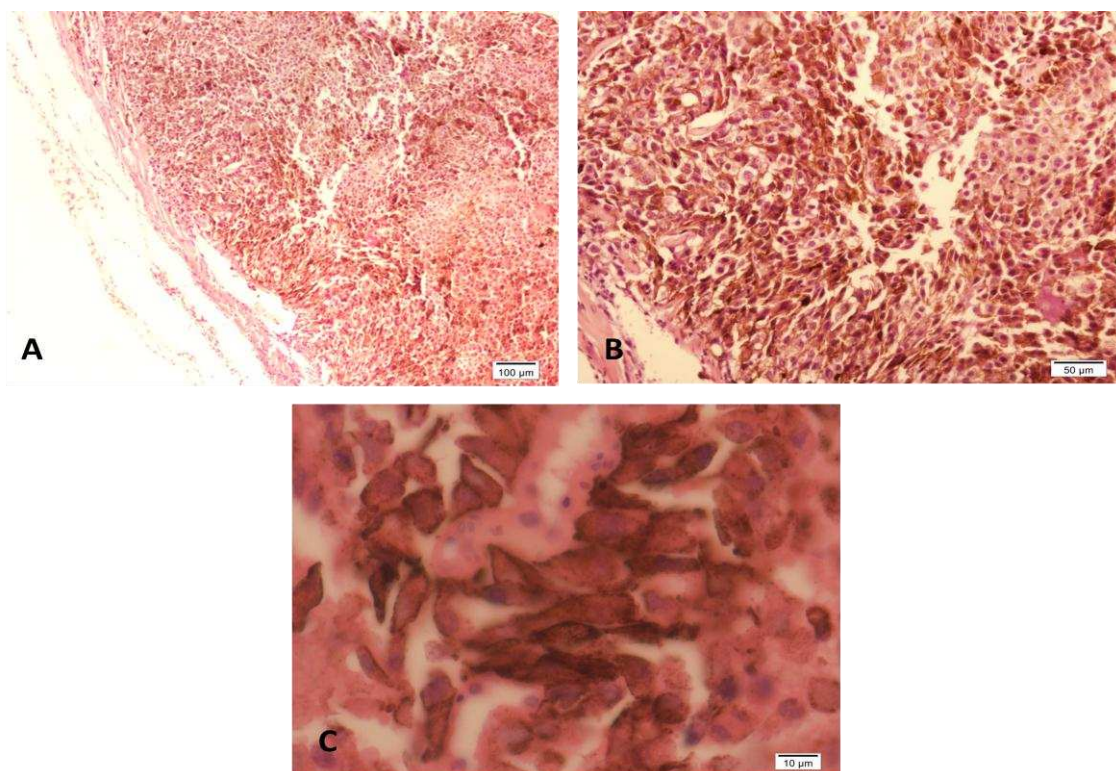


Figura 13 – A: Corte histológico de melanoma (Aumento: 200x); B: detalhe central da figura A (Aumento 400x); C: melanócitos (Aumento: 800x).

Após o período de tratamento dos camundongos, os animais foram eutanasiados e as amostras de fígado, rim, pulmão e o tumor foram removidos. A análise histológica dos tumores excisados (Figura 13) demonstrou figuras típicas de melanócitos, com presença de pigmento escurecido, característico de melanina, e presença de vascularização, caracterizando o desenvolvimento

de tumor do tipo melanoma, além do aspecto macroscópico enegrecido fornecido pelo pigmento presente.

Os resultados da avaliação do volume tumoral dos animais tratados e dos animais não tratados indicam um significativo papel quimiopreventivo ou quimioterápico do composto utilizado na supressão da progressão tumoral, como pode ser visto no Gráfico 3.

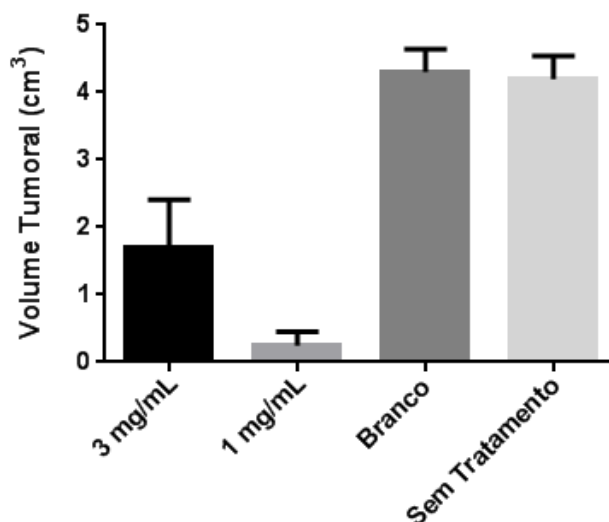


Gráfico 3 – Efeito do tratamento com dibenzoilmetano sobre o volume tumoral (cm³), nos diferentes grupos experimentais. O grupo controle (branco) recebeu um placebo como tratamento.

As análises do volume tumoral dos animais que receberam tratamento tópico com 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona nas concentrações de 3 mg/mL e 1 mg/mL, em comparação aos grupos controles (o primeiro, que não recebeu tratamento, e o segundo, tratado com uma formulação-placebo), indicaram diferenças significativas em relação aos controles, com volume tumoral menor nos grupos de tratamento. Assim, pode-se identificar que ambas as concentrações do composto utilizadas no ensaio *in vivo* (3 mg/mL e 1 mg/mL) se mostraram eficazes como agentes quimioterápicos ou quimiopreventivos, com volume do tumor do tipo melanoma induzido no flanco dos camundongos cerca de 55% menor nos grupos tratados do que nos grupos não tratados com o composto, que apresenta, portanto, potencial terapêutico para utilização em formulação tópica.

Estes dados são coerentes com os resultados de Khor et al. (2009), que indicaram que DBM possui significativa atividade quimiopreventiva, tendo suprimido a progressão de adenocarcinoma de próstata em camundongos C57BL TRAMP (transgênicos para adenocarcinoma de próstata) tratados com este agente. No referido trabalho, os animais receberam dieta suplementada com 1 % de DBM (~ 30 mg de DBM por dia por camundongo) a partir de 8 e 12 semanas de vida, e o grupo que começou a receber a dieta suplementada com DBM com 8 semanas de vida chegou a apresentar supressão total do adenocarcinoma. Além disso, para investigar os mecanismos envolvidos na atividade quimiopreventiva do DBM, foram analisados vários marcadores moleculares de regulação do ciclo celular e da via de transdução de sinal Akt. A expressão das seguintes proteínas se apresentou gradualmente aumentada, em concomitância com a progressão tumoral, sugerindo que estes sejam eficientes marcadores para a tumorigênese de próstata em camundongos TRAMP: p-PDK-1, pAkt (Ser473), proteína ribossômica pS6 (Ser235/236), c-myc, pRb, ciclina A, e ciclina D1. Com o tratamento, observou-se a supressão desses marcadores principalmente no grupo 1, que começou a receber a dieta suplementada com DBM ainda com 8 semanas de idade.

Outros estudos também relacionaram o efeito do DBM na redução ou supressão da incidência de tumor mamário (LIN et al., 2001), linfomas (HUANG et al., 1998) e adenoma intestinal (SHEN et al., 2007).

Hong et al. (2004) relacionaram a atividade anticarcinogênica do DBM ao seu efeito sobre os níveis protéicos e atividade enzimática de componentes do metabolismo do ácido araquidônico, envolvido no processo de carcinogênese. O ácido araquidônico é formado principalmente a partir de fosfolípidios de membrana hidrolisados pela fosfolipase A2, cujo produto é posteriormente metabolizado por três tipos diferentes de oxigenases: ciclooxigenase (COX), lipooxigenase (LOX) e citocromo P450. Assim, considera-se que a modulação do metabolismo do ácido araquidônico pela inibição da atividade das referidas enzimas constitui um mecanismo de quimioprevenção efetiva.

Lin et al. (2011) avaliaram a atividade anti-inflamatória do DBM e de seu derivado 1,3-bis-(2-fenil-substituído)-propano-1,3-diona na promoção tumoral

induzida por 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), e também no edema de orelha induzido por TPA e por ácido araquidônico, em camundongos CD-1. A pesquisa foi desenvolvida tendo como base as similaridades estruturais entre o DBM e os agentes anti-inflamatórios aspirina e curcumina. Os autores induziram os tumores pela aplicação tópica de TPA 5 nmol duas vezes por semana, por 20 semanas, com tratamento prévio de uma semana com 7,12-dimetilbenz[α]antraceno 200 nmol em 200 μ L de acetona. Três grupos foram utilizados: um grupo que recebeu só o TPA, outro que recebeu TPA e 3 μ mol de DBM, e o terceiro, que recebeu TPA e 10 μ mol de DBM. Nos grupos que receberam tratamento com 3 e 10 μ mol, o número de tumores por animal diminuiu 65 e 98%, respectivamente, e o número de animais com tumor também foi reduzido em 29 e 50%, respectivamente, de modo que os resultados ainda apontam para um efeito dose-dependente, o que não coincide com o resultado observado na presente pesquisa, em que a concentração utilizada de 1 mg/mL apresentou os melhores resultados. Entretanto, há de se ressaltar o efeito antitumoral obtido por tratamento tópico em ambos os estudos.

Durante a avaliação histológica das amostras de tumor, pode-se observar que o aspecto do tecido coletado a partir dos animais tratados diferiu do material dos grupos controle. Nos animais controle (tratados com formulação placebo e sem tratamento), o material apresentou uma arquitetura mais compacta, mais próxima de um tecido organizado do que nos animais tratados, com o tecido mostrando células viáveis preservadas e de aspecto mais homogêneo e vascularizado (Figura 14A), apesar da presença de pleomorfismo nuclear, com atipias grosseiras, figuras de mitoses atípicas (Figura 14C) e diversas áreas de necrose tecidual, concentradas, principalmente, na região mais central do tumor.

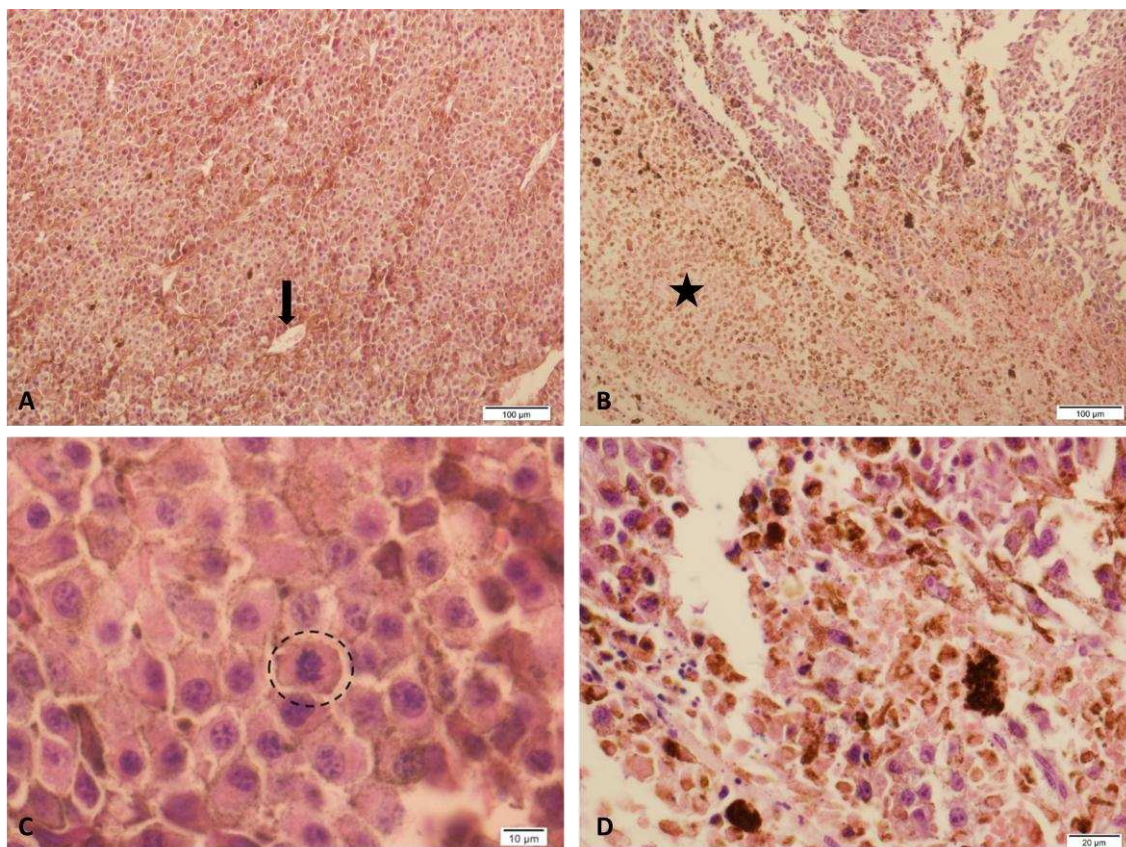


Figura 14 – Secções histológicas de amostras do tumor. A – Grupo tratado com o branco (composição farmacêutica sem o composto ativo; Aumento: 125x); B – Grupo tratado com composto ativo na concentração 3 mg/ml (Aumento: 125x); C – Célula em mitose (Aumento: 800x) no grupo tratado com branco; D; Acúmulo de melanina no grupo tratado com 1 mg/mL do composto (Aumento: 500x). Seta: estrutura vascular; estrela: área necrótica.

O material coletado dos animais tratados com 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona apresentou menor conservação tecidual, com tecido pouco organizado, atipias celulares (com morfologias variadas), extensas áreas de necrose desde a periferia do tumor (Figura 14B), e pigmento escurecido (melanina) aparentemente mais abundante (Figura 14D). A melanogênese acentuada foi identificada por Pinon e colaboradores (2011) como um mecanismo de resistência à apoptose induzida por ácido ursólico, acompanhado pelo aumento de enzimas envolvidas na síntese de melanina, como a tirosinase. A inibição da tirosinase causou aumento da apoptose, reforçando essa relação. Os autores sugerem que a melanina, nas condições experimentais utilizadas, estivesse agindo como agente removedor de radicais livres, uma vez que espécies reativas de oxigênio desempenham papel regulador na apoptose.

Na observação histológica do material tumoral de todos os grupos foi identificada a organização de células tumorais em formato de ninhos (*nests*) confluentes, ao redor de estruturas vasculares (CHEN et al., 2009; PAULIS et al., 2010), formando um padrão pseudo-glandular, o que constitui um dos critérios para diagnóstico histológico do melanoma cutâneo, juntamente com a presença de necrose e atipias celulares, também relatados nas presentes observações (SIDDARAJU, 2011). Um detalhe que chamou atenção foi a ausência de células endoteliais delimitando a parede de alguns locais dessa rede vascular tumoral, apesar da presença de hemácias no lúmen, o que constitui indício de mimetismo vascular ou formação de vasos mosaico, discutidos a seguir (CARMELIET; JAIN, 2011; HENDRIX et al., 2002; PAULIS et al., 2010).

Em relação à vascularização de tumores, acredita-se que mecanismos variados são utilizados pelas células e tecidos tumorais para o estabelecimento de rede vascular (HENDRIX et al., 2003; MIHIC-PROBST et al., 2012; NGUYEN, 2004; PAULIS et al., 2010; ZHANG et al., 2008). A angiogênese tradicional, conforme descrito na revisão bibliográfica deste trabalho, constitui o principal destes mecanismos.

Outra explicação seria a ocorrência de mimetismo vascular, em que células tumorais adquirem fenótipo similar ao de células endoteliais, com expressão de marcadores tipicamente endoteliais, e passam a constituir estruturas similares a vasos, contribuindo para a perfusão do tumor (PAULIS et al., 2010). Esta característica está relacionada, principalmente, a tumores altamente invasivos e metastáticos, e foi inicialmente descrita no melanoma (MANIOTIS et al., 1999; PAULIS et al., 2010). Maniotis et al. (1999) ainda relacionaram a capacidade invasiva das células que apresentam mimetismo vascular a reversões genéticas que conferem um genótipo similar ao de células embrionárias pluripotentes. A formação de vasos em mosaico, por sua vez, ocorre pela alternância entre células endoteliais e tumorais delimitando vasos da rede vascular tumoral (MIHIC-PROBST et al., 2012).

Mihic-Probst e seus colaboradores (2012) usaram modelos xenográficos de melanoma, com diferentes marcadores vasculares e fluorescência para avaliar como as células tumorais contribuem para a neovascularização, e

também avaliaram as amostras de 40 melanomas primários e 175 metástases de melanoma, usando imunomarcagem para vasos sanguíneos e linfáticos. Os autores sugerem que a condição de hipóxia no tecido tumoral contribui para uma mudança no fenótipo de algumas células tumorais, favorecendo sua contribuição para a formação de vasos sanguíneos, e postulam, ainda, que as células tumorais que apresentam mimetismo vascular apresentam maior invasividade *in vivo*. Além disso, o grupo de pesquisadores identificou numerosas fenestrações endoteliais, aberturas transcelulares, junções intercelulares ampliadas e membrana basal ausente ou descontínua, e concluiu que tais alterações podem facilitar a formação de metástases.

Assim, podemos concluir que a plasticidade das células tumorais envolvidas em mimetismo vascular e também na formação de mosaicos vasculares pode facilitar a metastatização tumoral, tanto pela perda de diferenciação celular, quanto pela constituição de vasos defeituosos.

Nas amostras dos tumores de animais tratados, além das áreas necróticas mais extensas, foi identificada a presença de núcleos picnóticos e corpos apoptóticos, indicativos de morte celular, além da presença de edema celular (ou alteração vacuolar) e inclusões nucleares eosinofílicas (Figura 15).

A alteração vacuolar normalmente ocorre em células que perdem a capacidade de manter a homeostasia iônica e hídrica e resulta da perda da função de bombas de íons presentes na membrana plasmática cujo funcionamento depende de ATP, e constitui um dos sinais de morte celular (KUMAR et al., 2005).

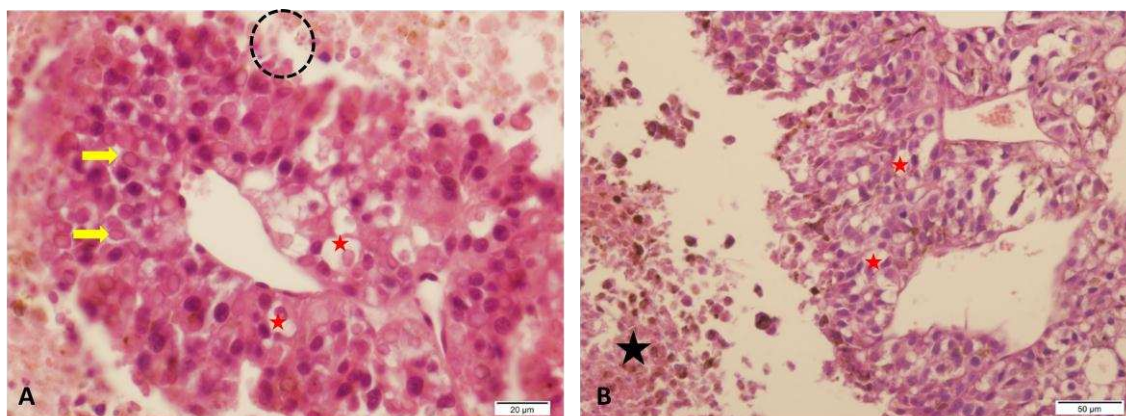


Figura 15 – Representações do arranjo pseudo-glandular observado nas amostras de melanoma (A: Grupo tratado com 3 mg/mL do composto, aumento de 500x; B: Grupo tratado com 1 mg/mL do composto, aumento de 250x). Alguns destaques: círculo pontilhado – estruturas coincidentes com corpos apoptóticos; setas – inclusões nucleares; estrelas vermelhas – alteração vacuolar; estrela preta – necrose.

As inclusões nucleares podem ser, basicamente, de dois tipos: inclusões nucleares, e pseudoinclusões nucleares, além de artefatos causados por fixação mal realizada (neste caso, o núcleo parece estar vazio) (ARORA; DEY, 2011). As inclusões nucleares, acúmulos de substâncias que normalmente não são encontradas no núcleo, apresentam naturezas variadas, podendo ser decorrentes de infecções virais, como citomegalovírus, herpes vírus 6, adenovírus, parvovírus, dentre outros; podem resultar da translocação anormal de substâncias para o núcleo, como a presença de surfactante no núcleo de células de adenocarcinoma pulmonar, ou de glicogênio no núcleo de hepatócitos (IP et al., 2010). As pseudoinclusões nucleares, por sua vez, também conhecidas como inclusões citoplasmáticas nucleares (ARORA; DEY, 2011), representam herniações citoplasmáticas dentro do núcleo, sendo que o sítio da herniação normalmente é difícil de ser visualizado. Não foram identificados trabalhos que descrevam o mecanismo fisiopatológico das pseudoinclusões, mas são frequentemente identificadas em diferentes tipos de melanoma e utilizadas como um dos parâmetros para seu diagnóstico histológico (SIDDARAJU, 2011).

Na avaliação histológica do fígado, pode-se comparar a arquitetura normal do tecido, a partir das amostras do grupo saudável (sem tumor), com os

demais grupos, e também os grupos controle (doentes sem tratamento, e tratados com branco) em relação aos grupos tratados (1 e 3 mg/mL) (Figura 16). As alterações teciduais visualizadas nos grupos controle (espaços sinusóide aumentados, e vacuolização citoplasmática nos hepatócitos) (Figura 17) e o infiltrado inflamatório foram atenuados com o tratamento, principalmente na concentração de 3 mg/mL, caracterizando efeito hepatoprotetor do composto. Considerando-se os trabalhos de Garcea et al. (2004) e Hoele et al. (2006), que indicam que o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de β -dicetonas da família dos curcuminóides, os resultados deste estudo são condizentes. Maiti et al. (2007) relacionaram o efeito hepatoprotetor de um complexo curcumina-fosfolípido à recuperação dos níveis enzimáticos do sistema glutathiona hepático, da superóxido dismutase, e catalase. Ainda, Lin et al. (2005) demonstraram o efeito hepatoprotetor do DBM e derivados pela inibição da citocromo P450 redutase, com base no sistema de microsomas – fração hepática correspondente a fragmentos do retículo endoplasmático obtidos por centrifugação, segundo Oshima-Franco e Franco (2003) –, e postulam que este efeito ocorra devido a uma possível interferência no suprimento de elétron para a hemoproteína, com os elétrons sendo aceitos diretamente pelo DBM.

Para uma discussão mais detalhada dos mecanismos relacionados aos danos hepáticos desencadeados pela instalação do melanoma nos animais utilizados neste experimento, seriam necessárias análises posteriores relacionadas, inicialmente, às enzimas envolvidas na fisiologia e metabolismo hepáticos. A partir dessas informações, seria possível postular-se acerca de tais efeitos hepáticos, bem como dos próprios efeitos do composto avaliado.

Com base na avaliação histológica das amostras de pulmão (Figura 18), não foram encontrados sinais de metástase em nenhum dos grupos experimentais. Entretanto, o modelo utilizado não permitia o prolongamento do experimento, uma vez que o tumor é muito agressivo, e leva os animais à morte após poucas semanas.

Em relação às amostras de rim (Figura 19), as únicas leves alterações detectadas configuraram artefatos no processamento do material histológico,

visto que não condiziam com a arquitetura perfeita do tecido, mas estavam presentes nas lâminas de todos os grupos experimentais.

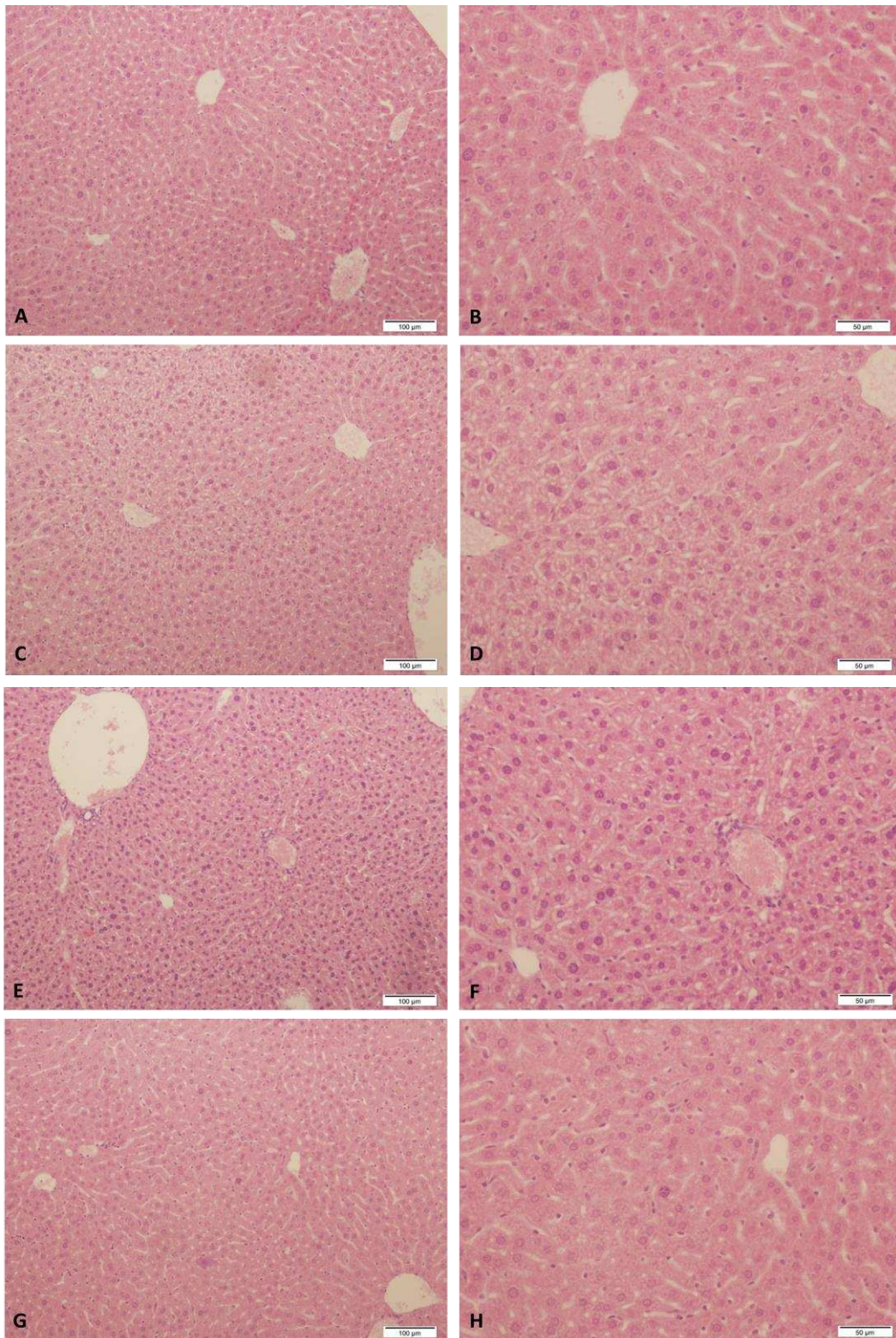


Figura 16 – Secções histológicas de fígado, no grupo saudável (A e B), no grupo doente tratado com o branco (C e D), e nos grupos tratados com 1 mg/mL do composto (E e F) e 3 mg/mL (G e H). A, C, E e G com aumento de 125x. B, D, F e H com aumento de 250x.

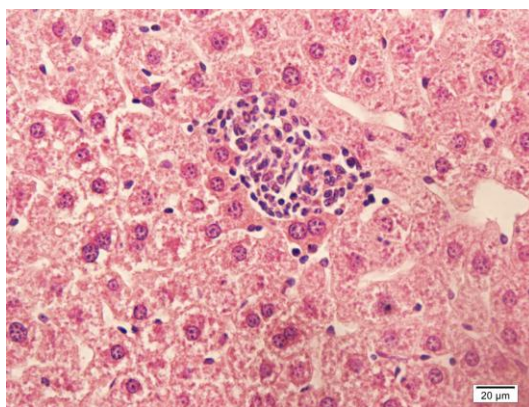


Figura 17 – Detalhe de uma secção histológica referente ao grupo de animais doentes não-tratados (Aumento: 400x).

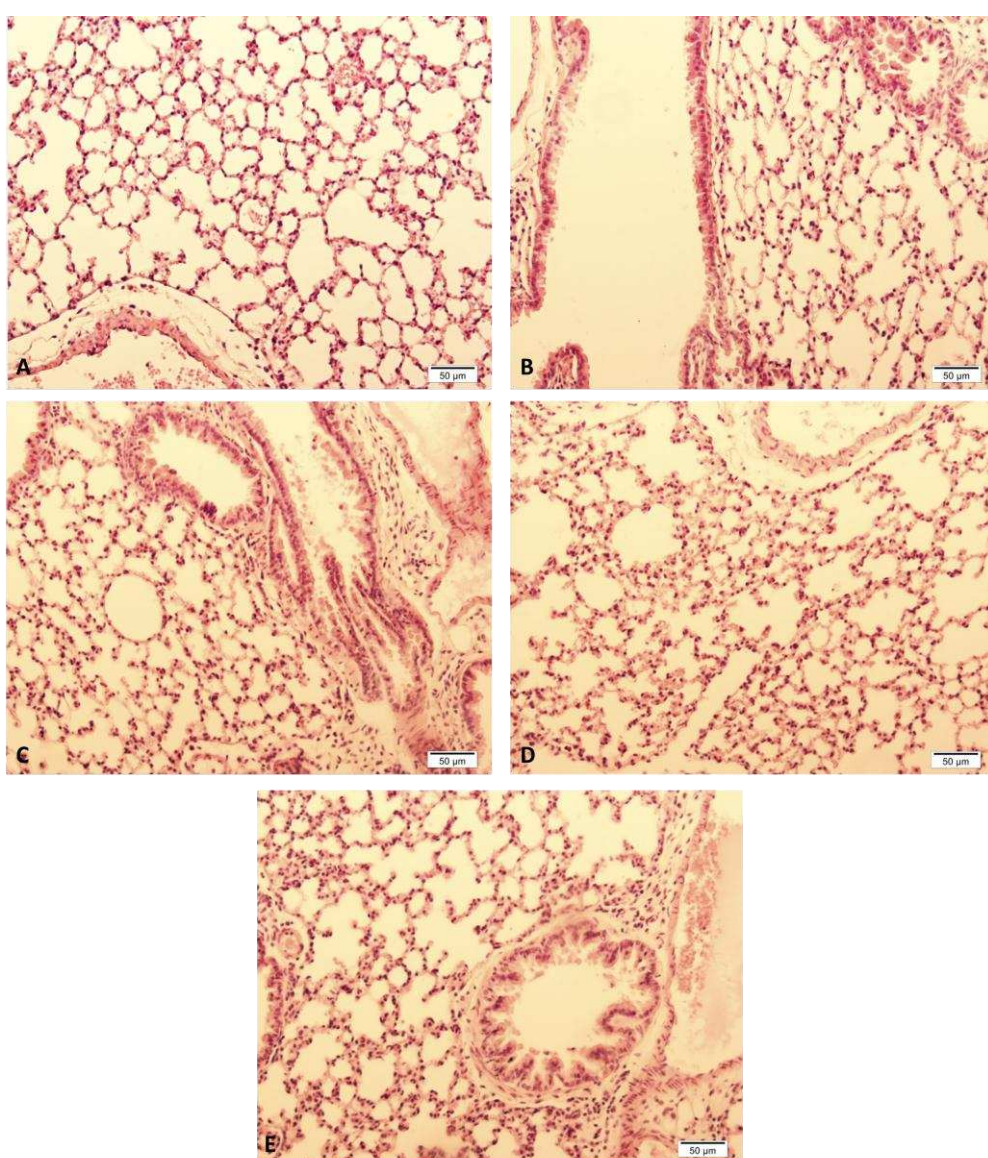


Figura 18 – Cortes histológicos de pulmão, representativos de cada grupo (Aumento: 200x). A – animais saudáveis; B – animais doentes sem tratamento; C; animais doentes tratados com 3 mg/mL; D – animais doentes tratado com 1 mg/mL; E – animais tratados com placebo.

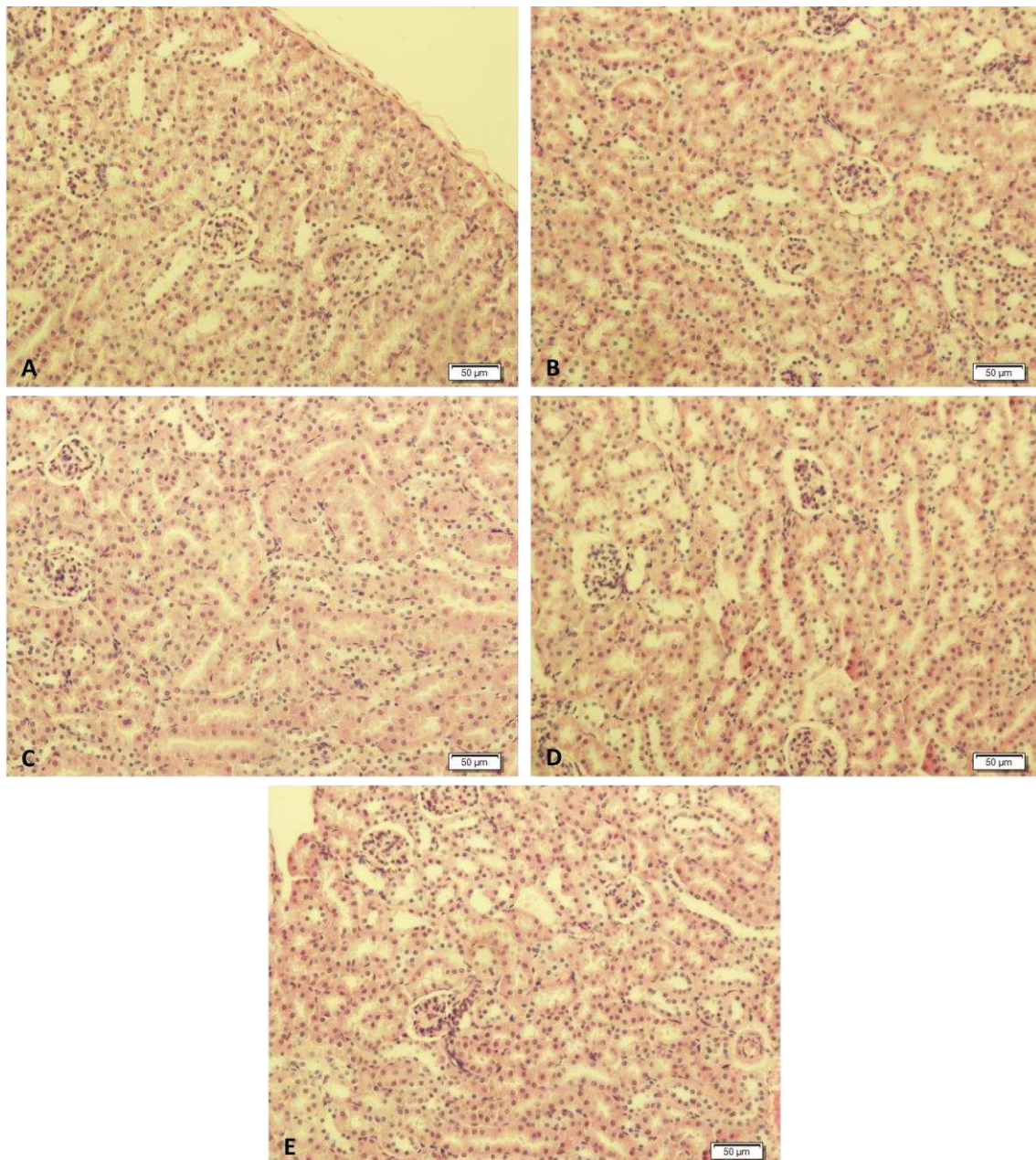


Figura 19 – Cortes histológicos de rim, representativos de cada grupo (Aumento: 200x). A – animais saudáveis; B – animais doentes sem tratamento; C; animais doentes tratados com 3 mg/mL; D – animais doentes tratado com 1 mg/mL; E – animais tratados com placebo.

A análise quantitativa realizada para VEGF no soro obtido do sangue dos camundongos (Gráfico 4) mostrou uma redução significativa, em picogramas de VEGF por mL de sangue, dos animais tratados em comparação aos animais controle. A quantidade média de VEGF dos animais tratados com 1 mg/mL do composto não diferiu do valor obtido para os animais saudáveis, ao passo que o grupo tratado com 3 mg/mL diferiu dos animais saudáveis, e também dos animais controle (tratados com placebo e doentes sem

tratamento). A quantidade de VEGF de ambos os grupos tratados diferiu significativamente dos grupos controle, caracterizando o efeito do composto. Estes dados corroboram os números obtidos para volume tumoral, identificando uma possível relação entre a redução do volume tumoral e a redução de VEGF nos animais tratados em relação aos controles.

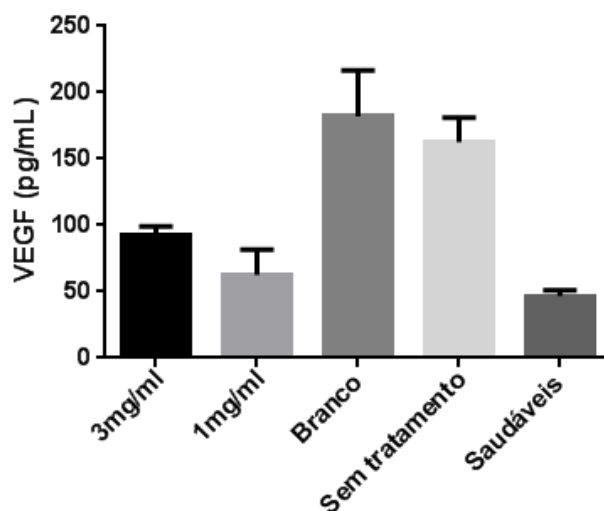


Gráfico 4 – Quantificação de VEGF a partir das amostras de soro coletadas dos camundongos tratados e não tratados (pg/mL).

Além de favorecer a proliferação e migração de células endoteliais, alguns estudos recentes têm indicado que o VEGF desempenha importante papel autócrino e intrínscino sobre células tumorais que expressam o receptor para VEGF (VEGFR) (CALVANI et al., 2008; SAMUEL et al., 2011). Xu et al. (2013), por exemplo, relacionaram a proliferação de células-tronco formadoras de glioblastoma multiforme, isoladas a partir de espécimes cirúrgicas de glioblastoma, à estimulação por VEGF exógeno, via VEGFR2, e não via VEGFR1. Esse efeito demonstrou ser, ainda, dose-dependente. Perrot-Applanat e Benedetto (2012) revisaram os efeitos do VEGF sobre a proliferação, sobrevivência, adesão, migração e invasão em células de tumor de mama, dando destaque à importância desta área de pesquisa emergente.

Tendo como objetivo a busca por um mecanismo que relacione os efeitos do DBM e seus derivados sobre a expressão de VEGF e a morte celular, podemos considerar os resultados obtidos por Anand e seus colaboradores (2011), que analisaram os efeitos do dibenzoilmetano e outros

compostos análogos, como a curcumina, sobre a ativação do fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B) pelo fator de necrose tumoral (TNF), e também sobre produtos gênicos regulados pelo NF- κ B e a proliferação celular. A importância do fator de transcrição NF- κ B se deve a seu papel na regulação de mais de 500 genes relacionados à inflamação, sobrevivência e proliferação celular, invasão, angiogênese e metástase (SUNG et al., 2012). DBM e seus derivados suprimiram a expressão de COX-2, ciclina D1, e VEGF, (produtos gênicos regulados pelo NF- κ B induzidos por TNF), afetando, assim, vias de sinalização celular da inflamação, proliferação celular, e angiogênese, respectivamente (ANAND et al., 2011). O trabalho de SUNG et al. (2012) revisou as vias de sinalização celular que normalmente são alvo de nutracêuticos relacionados a condimentos, incluindo o DBM, e também deram ênfase a seu papel sobre o NF- κ B.

Samuel et al. (2011), identificaram que a inibição da expressão de VEGF em linhagens celulares de câncer colorretal (CRC) humano levou à redução de crescimento celular (arraste do ciclo celular) e a aumento da morte celular por apoptose, e demonstraram os efeitos intrácrinos pró-sobrevivência do VEGF sobre as células pelo uso de anticorpos monoclonais específicos para o VEGF secretado (extracelular). A atividade do VEGF sobre as células não era bloqueada pelo uso do anticorpo monoclonal, de modo que o fator de crescimento parece atuar de forma intracelular. Utilizando, ainda, um inibidor intracelular da função tirosina quinase do VEGFR, puderam verificar que a atividade de VEGF sobre as células CRC independe da fração tirosina quinase do receptor. Além disso, os resultados relacionados à inibição de crescimento celular e aumento de apoptose foram mediados pelo aumento de mediadores pró-apoptóticos (caspase 3, PARP clivado e Bax), e redução da survivina, um fator pró-sobrevivência.

A apoptose em células tumorais causadas pelo bloqueio da expressão de VEGF também foi demonstrada por Lee et al. (2007), em células de tumor de mama dependentes de estrógeno e não-dependentes de estrógeno. A inibição de expressão de VEGFR1 também reduziu, significativamente, a sobrevivência celular, através da inibição da quinase Akt. Como a utilização de de um ligante específico para VEGFR1 não reverteu a apoptose induzida, os

autores analisaram a localização do VEGFR1, e identificaram sua presença no envelope nuclear, constatada por imunofluorescência, tanto em linhagens celulares já estabelecidas de mama humano, quanto em culturas primárias de células de tumor de mama e de células normais da mama.

Com base nos trabalhos supramencionados e nos resultados apresentados até aqui, conclui-se que é possível que o composto derivado de DBM utilizado no presente estudo tenha inibido a expressão de VEGF, através do inibição de NF- κ B, favorecendo, conseqüentemente, a morte das células tumorais, seja ela por necrose ou por apoptose, visto que ambas são relacionadas a cascatas de sinalização (PI3K/Akt ou PLC- γ) reguladas por VEGF e seus receptores tirosina quinase.

Em relação ao modelo *in vivo* utilizado, o modelo se mostrou eficiente, uma vez que foram obtidos resultados significativos utilizando-se a via transdérmica de distribuição da droga, e não houve reações adversas observadas. Deve-se considerar, ainda, que esta via de distribuição apresenta vantagens em relação às demais rotas normalmente utilizadas. Além de ser menos dolorosa e onerosa, não-invasiva e poder ser aplicada pelo próprio paciente, pode promover a liberação da droga por períodos prolongados e não produz lixo contaminado, como a aplicação intravenosa (PRAUSNITZ; LANGER, 2009; PRAUSNITZ et al., 2012).

VI. CONCLUSÕES

O composto derivado de dibenzoilmetano confirmou sua atividade antimelanoma *in vitro*, com destaque para seus efeitos sobre a provável transição epitelial-mesenquimal sofrida pelas células da linhagem B16F10, e para sua seletividade para as células tumorais, em relação à linhagem derivada de células normais.

In vivo, os testes realizados, neste estudo, reforçam o papel antiproliferativo do composto sobre as células de melanoma, com significativa diferença do volume tumoral de camundongos tratados em relação aos camundongos não tratados. Como a redução do volume tumoral foi associada à redução dos níveis de VEGF sorológicos, este fator de crescimento parece representar umas das peças relacionadas ao mecanismo pelo qual o composto agiu sobre o tumor.

Além disso, há de se considerar o efeito hepatoprotetor exercido pelo composto, em especial, na concentração de 3 mg/mL, e também o fato de que os demais tecidos avaliados não apresentaram alterações. E também, o fato de que não foram localizadas metástases pulmonares, principal sítio de metastatização desse tipo de tumor.

Assim, os indicativos são de uma opção terapêutica inovadora, com perspectivas de comercialização.

VII. PERSPECTIVAS

A partir dos dados obtidos, seria interessante a busca por métodos para otimizar a absorção cutânea do composto, de modo a se reduzir a concentração necessária para a obtenção de resultados positivos e também de possíveis efeitos colaterais, além de análises moleculares detalhadas, como do NF- κ B e das quinases envolvidas na sinalização celular por VEGF, ou do próprio VEGFR, para se determinar os mecanismos através dos quais o composto agiu, e como, exatamente, inibiu os efeitos proliferativos e pró-sobrevivência do VEGF sobre as células tumorais.

A utilização de modelos de xenotransplante, usando melanoma humano em camundongos, também representaria uma nova etapa no desvendamento dos efeitos e mecanismos envolvidos na inibição de melanoma pelos compostos da família do dibenzoilmetano. Análises histológicas quantitativas poderão facilitar, ainda, a mensuração desses efeitos, e detalhar melhor os efeitos biológicos do composto sobre o organismo.

Após as próximas etapas de avaliação do composto que a equipe pretende realizar em futuro próximo, o planejamento será voltado para sua comercialização.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, E. N.; GARROCHO, A. A.; AGUIAR, M. C. F. Perfil do paciente portador de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, em tratamento no Hospital Mário Penna em Belo Horizonte. **Rev. Bras. Cancerol.**, 48(3):357-362, 2002.

ADAMCIC, U. et al. The Effect of Bevacizumab on Human Malignant Melanoma Cells with Functional VEGF / VEGFR2 Autocrine and. **Neopl.**, 14(7): 612–623, 2012.

ALONSO, S. R. et al. A High-Throughput Study in Melanoma Identifies Epithelial-Mesenchymal Transition as a Major Determinant of Metastasis. **Cancer Res.**, 67:3450–3460, 2007.

ANAND, P. et al. Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone. **Biochem. Pharmacol.**, 82(12):1901-1909, 2011.

BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Antic. Res.**, 29:2993-2996, 2009.

BAERISWYL, V.; CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, 19(5):329–337, 2009.

BAKOS, L. Tratamento cirúrgico de metástase a distância. **Grupo brasileiro de melanoma**. Boletim Informativo do GBM - Ano IX - N° 32. Janeiro, Fevereiro e Março, 2006. Disponível em: <http://www.gbm.org.br/boletim/2006/infor32.asp>. Acesso em: 16 jan. 2012.

BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? **J. Pharm. Sci.**, 99(1):21-50, 2010.

BARRY, B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 54:31–40, 2002.

BARRY, B. W. Breaching the skin's barrier to drugs. **Nat. Biotechnol.**, 2:165–167, 2004.

BENNETT, D. C., COOPER, P. J.; HART, I. R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **Int. J. Cancer**, 39: 414–418, 1987.

BENTLEY, K. et al. Tipping the balance: robustness of tip cell selection, migration and fusion in angiogenesis. **PloS Comput. Biol.**, 5(10), e1000549, 2009.

BERMONT, L. et al. Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 86:363–8, 2001.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomed.**, 10: 499-503, 2003.

BOLZINGER, M.A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Curr. Op. Col. Interf. Sci**, 17(3): 156-165, 2012.

BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochim. Biophys. Acta**, 1758:2080–2095, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 357, de 08 de abril de 2013. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 abr. 2013. Seção 1, p. 41.

BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia Geral**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, Cap. 8 e 31.

BRIGGAMAN, R.; WHEELER, C.E. The epidermal-dermal junction. **J. Invest. Dermatol.**, 54(1):71-84, 1975.

CALVANI, M. et al. Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells. **Cancer Res.**, 68:285–291, 2008.

CARDONE, M. H. et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, 282:1318-1321, 1998.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, 473(7347):298–307, 2011.

CARMELIET, P. et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. **Cell**, 98:147-157, 1999.

CARVALHO, C. A. et al. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **An. Bras. Dermat.**, 79(1):53-60, 2004.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 56:657–711, 2004.

CEVC, G., VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **J. Control Release**, 141(3):277-99, 2010.

CHAMMAS, R. et al. **Imunologia clínica das neoplasias**. Universidade de São Paulo, 2003.

CHARTERS, G. A. **Human Metastatic Melanoma In Vitro**. 2007. 432f. Tese (Ph.D) – University of Auckland, Nova Zelândia.

CHATTERJEE, S. et al. Tumor VEGF : VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. **J. Clin. Invest.**, 123(4):1732–1740, 2013.

CHEN, X. et al. Histopathology of normal skin and melanomas after nanosecond pulsed electric field treatment. **Melan. Res.**, 19(6):361–371, 2009.

CHRISTOFORI, G.; SEMB, H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. **Trends Biochem. Sci.**, 24(2):73–76, 1999.

CILLO, C. et al. Generation of Drug-resistant Variants in Metastatic B16 Mouse Melanoma Cell Lines1. **Cancer Res.**, 47:2604-2608, 1987.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: **Robbins- Pathologic Basis of Disease** Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2004.

CUCÉ, L.C.; FESTA NETO, C. **Dermatology in general medicine**. 2^a Ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p1-11.

CUKIERMAN, E.; KHAN, D.R. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. **Biochem. Pharmacol.** 80(5):762-70. 2010.

DAHL, C.; GULDBERG, P. The genome and epigenome of malignant melanoma. **APMIS**, 115:1161–76, 2007.

DASTON, G. et al. A framework for assessing risks to children from exposure to environmental agents. **Environ. Health Perspect.**, 112:238–256, 2004.

DEWING, D.; EMMETT, M.; JONES, R. P. The Roles of Angiogenesis in Malignant Melanoma: Trends in Basic Science Research over the Last 100 Years. **ISRN Oncology**, v. 2012, 2012.

DIMATOS, D.C. et al. Melanoma Cutâneo no Brasil. **Arq. Catar. Med.**, 38:14-19, 2009.

DISSANAYAKE, S. K. et al. The Wnt5A / Protein Kinase C Pathway Mediates Motility in Melanoma Cells via the Inhibition of Metastasis Suppressors and Initiation of an Epithelial to Mesenchymal Transition. **J. Biol. Chem.**, 282(23):17259–17271, 2007.

DOUGHER, M.; TERMAN, B. I. Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. **Oncogene**, 18:1619-1627, 1999.

DOUGHER-VERMAZEN, M. et al. Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 205: 728-738, 1994.

DOWNING, D.T. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. **J. Lipid Res.**, 33:301-313, 1992.

DUAN, X. I. N. S. U. O. et al. Effects of T - cadherin expression on B16F10 melanoma cells. **Oncol. Let.**, 5:1205–1210, 2013.

EBERTING, C. L. et al. Histologic progression of B16 F10 metastatic melanoma in C57BL/6 mice over a six week time period: distant metastases before local growth . **J. Dermat.**, 31(4): 299-304, 2004.

ELIAS, P. M. Stratum corneum defensive functions: An integrated view. **J. Invest. Dermatol.**, 125:183–200, 2005.

ELIAS, P.M., CHOI, E.H. Interactions among stratum corneum defensive functions. **Exp. Dermatol.**, 14:719–726, 2005.

ELICEIRI, B.P. et al. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. **Mol. Cell**, 4: 915–924, 1999.

FENOUILLE, N. et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Regulatory Factor SLUG (SNAI2) Is a Downstream Target of SPARC and AKT in Promoting Melanoma Cell Invasion. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40378, 2012.

FERNANDES, N.C. et al. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. **An. Bras. Dermat.**, 80(1): 25-34, 2005.

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med.**, 9(6):669–76, 2003.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature**, 242:148-149, 1973.

FINKENZELLER, G. et al. Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. **Cancer Res.**, 52:4821–3, 1992.

FLAHERTY, K. T.; HODI, F. S.; FISHER, D. E. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. **Nat. Rev. Cancer**, 12(5):349-61, 2012.

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. **New Engl. J. Med.**, 285(21):1182-1186, 1971.

OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L. M. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde Rev.**, 5(9):69–76, 2003.

GARCEA, G. et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. **Br. J. Cancer**, 90(5), 1011–5, 2004.

GERBER, H. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway. Requirements for Flk-1/Krd Activation. **J. Biol. Chem.**, 273(46): 30336–30343, 1998.

GHAHREMANI, M. F. et al. p53 promotes VEGF expression and angiogenesis in the absence of an intact p21-Rb pathway. **Cell Death Diff.**, 20(7):888–897, 2013.

GILLBRO, J. M.; OLSSON, M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents – existing and new approaches. **Int. J. Cosm. Sci.**, 33:210–221, 2011.

GODING, C. R. Melanocytes: the new Black. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 39(2): 275-279, 2007.

GOGAS, H. et al. Biomarkers in melanoma. **An. Oncol.**, 20(6): vi8-vi13, 2009.

GOLDMAN, C. K. et al. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. **Mol. Biol. Cell**, 4(1):121–33, 1993.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, 445(22): 851-857, 2007.

GRUGEL, S. et al. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. **J. Biol. Chem.**, 270:25915–9, 1995.

GUO, D. et al. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. **J. Biol. Chem.**, 270:6729–6733, 1995.

HAMANO, Y. et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. **Cancer Cell**, 3(6):589–601, 2003.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144:646–74, 2011.

HANSON, K. M.; BEHNE, M. J.; BARRY, N. P.; MAURO, T. M.; GRATTON, E.; CLEGG, R. M. Two- photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient. **Biophys. J.**, 83:1682–1690, 2002.

HENDRIX, M. J. C. et al. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. **Nat. Rev. Cancer**, 3(6):411–21, 2003.

HEO, D.S. et al.. Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. **Cancer Res.** 50: 3681-3690, 1990.

HIROTA, K.; SEMENZA, G.L. Regulation of angiogenesis by hypoxia inducible factor 1. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, 59:15–26, 2006.

HOCKER, T. L.; SINGH, M. K.; TSAO, H. Melanoma Genetics and Therapeutic Approaches in the 21st Century : Moving from the Benchside to the Bedside. **J. Invest. Dermat.**, 128:2575–2595, 2008.

HOEHLE, S. I.; PFEIFFER, E.; SOLYOM, A. M.; METZLER, M. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. **J. Agric. Food Chem.**, 54(3):756–64, 2006.

HONG, J. et al. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related b-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. **Carcinog.**, 25(9):1671-1679, 2004.

HSU, M.Y. et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. **Am. J. Pathol.**, 156:1515–1525, 2000.

HUANG, M. T. et al. Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice. **Carcinog.**, 19(9):1697-700, 1998.

HUANG, P. H.; MARAIS, R. Melanoma troops massed. **Nature**, 459: 336-337, 2009.

HUBAUD, J. et al. Synthesis and spectroscopic examination of various substituted 1,3-dibenzoylmethane, active agents for UVA/UVB photoprotection. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 92:103-109, 2008.

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial. MARSAIOLI, A. J. ; Diaz, M. A. N.; PESSINE, F. B. T. **Obtenção de novos derivados de Dibenzoilmetano que apresentam atividade antineoplásica e de aplicação potencial como filtro solar.** Número do registro: PI65838; 22 dez 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2010: **Incidência de câncer no Brasil.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>. Acesso em: 10 fev., 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.** Rio de Janeiro: INCA; 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. 2013. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/aprovadas_diretrizes_para_tratamento_do_melanoma. Acesso em: 11 fev., 2013.

JACKSON, K. M. et al. Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. **Cancer Let.**, v. 178, p. 161–165, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2004. Cap. 18.

KAKUMANU, S. et al. A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension. **Nanomed.**, 7(3):277-83, 2011.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J. Clin. Invest.**, 119(6):1420–1428, 2009.

KEYT, B.A. et al. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, 271:5638-5646, 1996.

KHOR, T. O. et al. Dietary feeding of dibenzoylmethane inhibits prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. **Cancer Res.**, 69(17):7096-102, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K. FAUSTO, N. Robbins e Cotran – **Bases Patológicas das Doenças**. 7ª edição. Elsevier, 2005. cap. 1. p.3-48.

LADEMANN, J. et al. Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. **Eur. J. Pharm. Bioph.**, 77(3):465-468, 2011.

LACAL, P. M. et al. An autocrine loop directed by the vascular endothelial growth factor promotes invasiveness of human melanoma cells. **Int. J. Oncol.**, 27:1625–1632, 2005.

LADOUX, A.; FRELIN, C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 195:1005-1010, 1993.

LAW, M. H.; MACGREGOR, S.; HAYWARD, N. K. Melanoma genetics: recent findings take us beyond well-traveled pathways. **J. Invest. Dermat.**, 132(7):1763-74, 2012.

LEBSA-WEBER, A. et al. Comparação dos casos de melanoma cutâneo diagnosticados por diferentes especialistas. **An. Bras. Dermat.**, 82(4): 311-5, 2007.

LEE, E. et al. Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1alpha regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. **Mol. Cells**, 14:9 –15, 2002.

LEE, S. H.; JEONG, S. K.; AHN, S. K. An update of the defensive barrier function of skin. **Yonsei Med. J.**, 47:293–306, 2006.

LEE, T. et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. **PLoS Med.**, 4(6):1101–1116, 2007.

LIN, C. et al. Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation , formation of DMBA ± DNA adducts in mammary glands , and mammary tumorigenesis in Sencar mice. **Cancer Let.**, 168: 125-132, 2001.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, 445:843-850, 2007.

LOPES, A.; ALMEIDA, E.; IYAYASU, H.; LOPES, L.F; **Oncologia para graduação**, Ribeirão Preto, SP, Tecmed, 2005, Cap. 1, 6, 36.

MAITI, K. et al. Curcumin–phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **Int. J. Pharm.**, 330 (1–2), 155–63, 2007.

MAGALHÃES, A., NOGUEIRA, M. A. Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus* species. **Phytoch.**, 46: 1029-1033, 1997.

MAGALHÃES, A. F. et al. Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. **An. Acad. Bras. Ciência**, 79(3):351-367, 2007.

MANALO, D.J. et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. **Blood**, 105: 659–69, 2005.

MANIOTIS, A. J. et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. **Am. J. Pathol.**, 155(3):739–52, 1999.

MANTESE, S. A. O. *et al.* Carcinoma basocelular - Análise de 300 casos observados em Uberlândia - MG. **An. Brasil. Dermat.** 81(2): 136-142, 2006.

MARTINI, E. et al. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Quím. Nova**, 30(4): 930-934. 2007.

MATSUMOTO, T.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF Receptor Signal Transduction. **Sci. STKE**, 112, 2001.

MAXWELL, P.H. et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature**, 399:271–5, 1999.

MCCARTHY, M. U.S. states file lawsuit against Bristol-Myers Squibb. **The Lancet**, 359: 2092, 2002.

MCGEE, J.O.D.; ISAACSON, P.G. WRIGHT, N.A. Neoplasia. In: **Oxford Textbook of Pathology, Oxford**, Oxford University Press. Cap. 9, 569-718,1992.

MCGRATH, J. A.; EADY, R.A.J.; POPE, F.M. Anatomy and Organization of Human Skin. In: MCGRATH, J.A.; UITTO, J. **Rook's Textbook of Dermatology**, Oxford: Wiley-Blackwell. 2010. Cap. 3, p.1-15.

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **Internat. J. Pharmac.**, 435(1):3-9, 2012.

MIHIC-PROBST, D. et al. Tumor cell plasticity and angiogenesis in human melanomas. **PloS one**, 7(3):e33571, 2012.

MILANI, J. et al. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, 273: 18165-18172, 1998.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S.K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug. Discov. Today**. 15(19-20):842-50. 2010.

MITRUS, I. et al. Properties of B16-F10 murine melanoma cells subjected to metabolic stress conditions. **Acta Bioch. Pol.**, 59(3):363–366, 2012.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacol Rev.**, 53:283–318, 2001.

MOSER, K. et al. Supersaturation: Enhancement of skin penetration and permeation of a lipophilic drug. **Pharm. Res.**, 18:1006–1011, 2001.

MOSS, G. P. et al. Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. **Toxicol. In Vitro**, 16:299–317, 2002.

MULLER, Y. A et al. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. **Proc. Nat. Acad. Scien. USA**, v. 94, p. 7192–7, 1997.

MURAKAMI, M. et al. FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. **J. Clin. Invest.**, 121(7):2668–2678, 2011.

NAKANO, K. et al. Induction of apoptosis by β -diketones in human tumor cells. **Antic. Res.**, 24: 711–718, 2004.

NASIR, A. Nanotechnology and dermatology: part I--potential of nanotechnology. **Clin. Dermatol.** 28(4):458-66. 2010.

NATIONAL CANCER INSTITUTE, Clinical Trials Search. Disponível em <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/results?protocolsearchid=6564608>. Acesso em: 18 de Fevereiro de 2013.

NERY, L. H. R.. **Eficácia da dexametasona e da doxorrubicinano tumor de Erlich transplantado em camundongos BALB/c**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M.. Natural products as source of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.**, 66: 1022–1037, 2003.

NGUYEN, T. R. I. H. Mechanisms of Metastasis. **Clin. Dermat.**, 22: 209-216, 2004.

NIKOLAOU, V. et al. Melanoma: new insights and new therapies. **J. Invest. Dermat.**, 132(3):854-63, 2012.

NOGUEIRA; M.A.; MARSALOLI, A.J. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **II Farmaco** 58:1163-1169, 2003.

ODLAND, G.F. Structure of the skin. In: GOLDSMITH, L.A. **Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin**. Nova York: Oxford University Press, 1991: 3–62.

OLIVEIRA, M.D.C. et al. Estudo imunohistoquímico de componentes da membrana basal em cistos odontogênicos. **Pesq. Odontol. Bras.**, v16, n.2, 2002.

OLSSON, A. et al. VEGF receptor signalling — in control of vascular function. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 7:359-371, 2006.

PANICH, U. Antioxidant Defense and UV-Induced Melanogenesis: Implications for Melanoma Prevention. In: CAO, M. Y. **Current Management of Malignant Melanoma**. Rijeka: InTech Open, 2011. Cap. 12, p. 227-252.

PARK, J. E.; KELLER, G. A.; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. **Mol. Biol. Cell**, 4:1317-1326, 1993.

PATYNA, S. et al. SU14813: a novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity. **Mol. Cancer Ther.**, 5(7), 1774–1782, 2006.

PAUL, R. et al. Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral protection following stroke. **Nat. Med.**, 7:222-227, 2001.

PAULIS, Y. W. J. et al. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. **Bioch. Bioph. Acta**, 1806(1):18–28, 2010.

PERROT-APPLANAT, M.; BENEDETTO, M. DI. Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells - Adhesion , survival , migration and invasion. **Cell Adhe.**, 6(6):547–553, 2012.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nat. Biotech.**, 6(11):1261–1268, 2009.

PRAUSNITZ, M. R. et al. Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery. In: BOLOGNIA, J.; JORIZZO, J.; SCHAFFER, J. (Eds.). **Dermatology**. 3a. ed. Elsevier Health Sciences, 2012.

PREETHI, K. C. et al. Inhibition of metastasis of B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice by an extract of *Calendula officinalis* L flowers. **As. Pac. J. Cancer Prev. : APJCP**, 11(6):1773-1779, 2010.

RAJABI, P. et al. The role of VEGF in melanoma progression. **J. Res. Med. Sci.**, 17(6), p. 534–539, 2012.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. “Sprouting angiogenesis”, a reappraisal. **Develop. Biol.**, 372:157–165, 2012.

RIBEIRO, R.Y.M.A. **Metaloproteinases 2 e 9: expressão, inibidores teciduais e inibição por extratos naturais no carcinoma de células basais e carcinoma espinocelular**. Tese (Doutorado em Patologia), Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ROFSTAD, E.K., HALSOR, E.F. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. **Cancer Res.** 60:4932–8, 2000.

ROSKOSKI, R. J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. **Crit. Rev. Oncol./Hemat.**, 62:179-213, 2007.

RUCH, C. et al. Structure of a VEGF–VEGF receptor complex determined by electron microscopy. **Nat. Struct. Molec. Biol.**, 14:249–250, 2007.

SAFRAN, M.; KAELIN, W.J. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. **J. Clin. Invest.**, 111, 779–783, 2003.

SAMPAIO, S. P.; RIVITTI, E. A. Pele normal: anatomia e fisiologia. In: **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 1988. p.4-35.

SAMUEL, S. et al. Intracrine Vascular Endothelial Growth Factor Signaling in Survival and Chemoresistance of Human Colorectal Cancer Cells. **Oncogene**, 30(10): 1205-1212, 2011.

SANTOS, I. Melanoma cutâneo. In: Forones NM. **Guia de oncologia (Guias de medicina ambulatorial e hospitalar)**. São Paulo: Manole; 2005. p.191-205.

SCHAUER, E. et al. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. **J. Clin. Invest.** 93(5):2258-62, 1994.

SCHLESSINGER, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. **Cell**, v. 103, p. 211–225, 2000.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacol. Physiol.**, 19:296–302, 2006.

SEIDENARI, S.; GIUSTI, G. Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in

eczematous and clinically uninvolved skin. **Acta Derm. Venereol.**, 75:429–433, 1995.

SEVERINO, P. et al. Nanoemulsions and nanoparticles for non-melanoma skin cancer: effects of lipid materials. **Clinical & translational oncology**, n. Janeiro, 24 jan. 2013. Disponível em <http://rd.springer.com/article/10.1007%2Fs12094-012-0982-0>. Acesso em 23/04/2013.

SHARMA, A. et al. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. **Cancer Res**, 65:2412–21, 2005.

SHEN, G. et al. Chemoprevention of familial adenomatous polyposis by natural dietary compounds sulforaphane and dibenzoylmethane alone and in combination in ApcMin/+ mouse. **Cancer Res**. 67:9937–44, 2007.

SHER, I. et al. Autocrine VEGF-A/KDRloop protects epithelial ovarian carcinoma cells from anoikis. **Int. J. Cancer**, 124: 553–561, 2009.

SIDDARAJU, N. Clinical cytology in the diagnosis and management of melanoma. In: CAO, M. Y. (Ed.). **Current management of malignant melanoma**. Rijeka: InTech, 2011. p. 1-28.

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes do desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, 25(5):801-807, 2002.

SINGLETARY, K. et al. Effect of the β -diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. **Carcinog.**, 19(6):1039-1043, 1998.

SOHDI, A. et al. MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 287:292– 300, 2001.

SOLDI, R. et al. Role of $\alpha v\beta 3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. **EMBO J.**, 18:882-892, 1999.

SOUZA, S.R.P.; FISHER, F.M.; SOUZA, J.M.P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. **Rev. Saúde Pública.** 38(4):588-98. 2004.

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry**, Academic Press: 1991, p. 71-134.

SUNG, B. et al. Cancer Cell Signaling Pathways Targeted by Spice-Derived Nutraceuticals. **Nut. Cancer**, 64(2):173–197, 2012.

TAGNE, J.; KAKUMANU, S.; NICOLOSI, R. J. Nanoemulsion Preparations of the Anticancer Drug Dacarbazine Significantly Increase Its Efficacy in a Xenograft Mouse Melanoma Model. **Mol. Pharmac.**, 5(6):1055-1063, 2008.

TAKAHASHI, T.; UENO, H.; SHIBUYA, M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. **Oncog.**, 18:2221–2230, 1999.

TAKAHASHI, T. et al. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. **EMBO J.**, 20:2768-2778, 2001.

TARAPORE, R.S. An Overview of Important Genetic Aspects in Melanoma. In VEREECKEN, P. **Highlights in skin cancer**. 1a. ed. Rijeka, Croácia: InTech, 2013. p.43-66.

TAVEIRA, S. F.; LOPEZ, R. F. V. Topical Administration of Anticancer Drugs for Skin Cancer Treatment. In: LA PORTA, C. (Ed.). **Skin Cancers - Risk Factors, Prevention and Therapy**. Rijeka: InTech, 2011. p.247-272. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/skin-cancers-risk-factors-prevention-and->

therapy/topical-administration-of-anticancer-drugs-for-skin-cancer-treatment.

Acesso em: 05 ago. 2013.

TAYLOR, P. et al. Ajoene inhibits both primary tumor growth and metastasis of B16 / BL6 melanoma cells in C57BL / 6 mice. **Cancer Letters**, 239:298-304, 2006.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. Tegumento comum. In: **Princípios de anatomia e fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2010. Cap. 5.

UGUREL, B. S. et al. Increased Serum Concentration of Angiogenic Factors in Malignant Melanoma Patients Correlates With Tumor Progression and Survival. **J. Clin. Oncol.**, 19(2):577–583, 2001.

VERECKEN, P. **Highlights in skin cancer**. 1^a Ed. Rijeka: InTech, 2013. Prefácio.

VERONESE, L. A.; MARQUES, M. E. A. Critérios anatomopatológicos para melanoma maligno cutâneo: análise qualitativa de sua eficácia e revisão da literatura. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 40(2):99-112. 2004.

VILELA, M.J; MARTINS, M.L.; BRAGA, J.L. Câncer: biologia, fractais e inteligência artificial. **Ciência Hoje**, 24(141):16-25, 1998.

WAINSTEIN, A.J.A.; BELFORT, F.A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Rev Col Bras Cir**. 31(3):204-14. 2004.

WALTENBERGER, J. et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **J. Biol. Chem.**, 269:88–95, 1994.

WANG, M.; LIAO, Y. Hydroxydibenzoylmethane induces apoptosis through repressing ornithine decarboxylase in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Exp. Mol. Med.**, 43(4):189–196, 2011.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis : molecular pathways and therapeutic targets. **Nat. Med.**, 17(11):1359-1370, 2011.

WETZ, F. et al. Photochemical Behavior of a New Long-chain UV Absorber Derived from 4-tert- Butyl-49-Methoxydibenzoylmethane. **Photochem. Photobiol.**, 80(2):316-321, 2004.

WILLIS, R. A. **The spread of tumors in the human body.** Butterworth & Co. Londres, 1952.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Sunbeds, tanning and UV exposure. 2009. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs287/en/>>. Acesso em: 29 jun 2013.

XU, C.; WU, X.; ZHU, J. VEGF Promotes Proliferation of Human Glioblastoma Multiforme Stem-Like Cells through VEGF Receptor 2. **Scient. Wor. J.**, 417413, 2013.

YANG, Y. et al. GAB2 induces tumor angiogenesis in NRAS-driven melanoma. **Oncogene**, 1–11, 2012.

YU, J.L. et al. Vascular endothelial growth factor isoform expression as a determinant of blood vessel patterning in human melanoma xenografts. **Cancer Res.**, 62(6), 1838–1846, 2002.

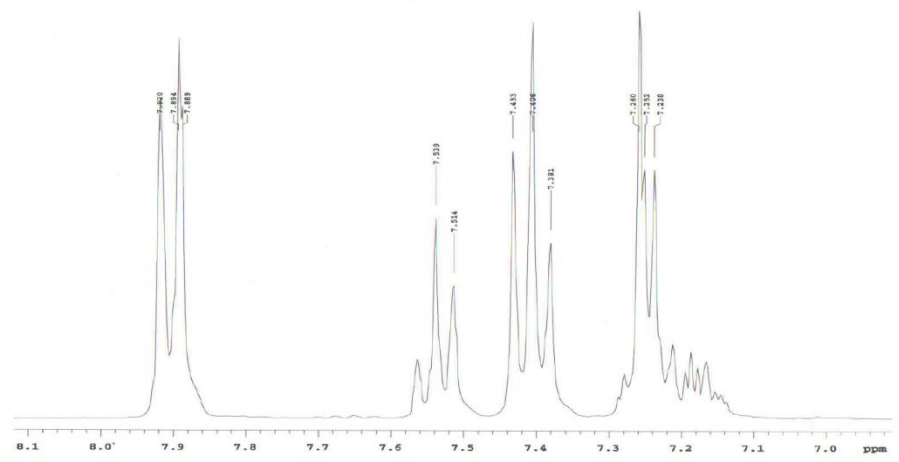
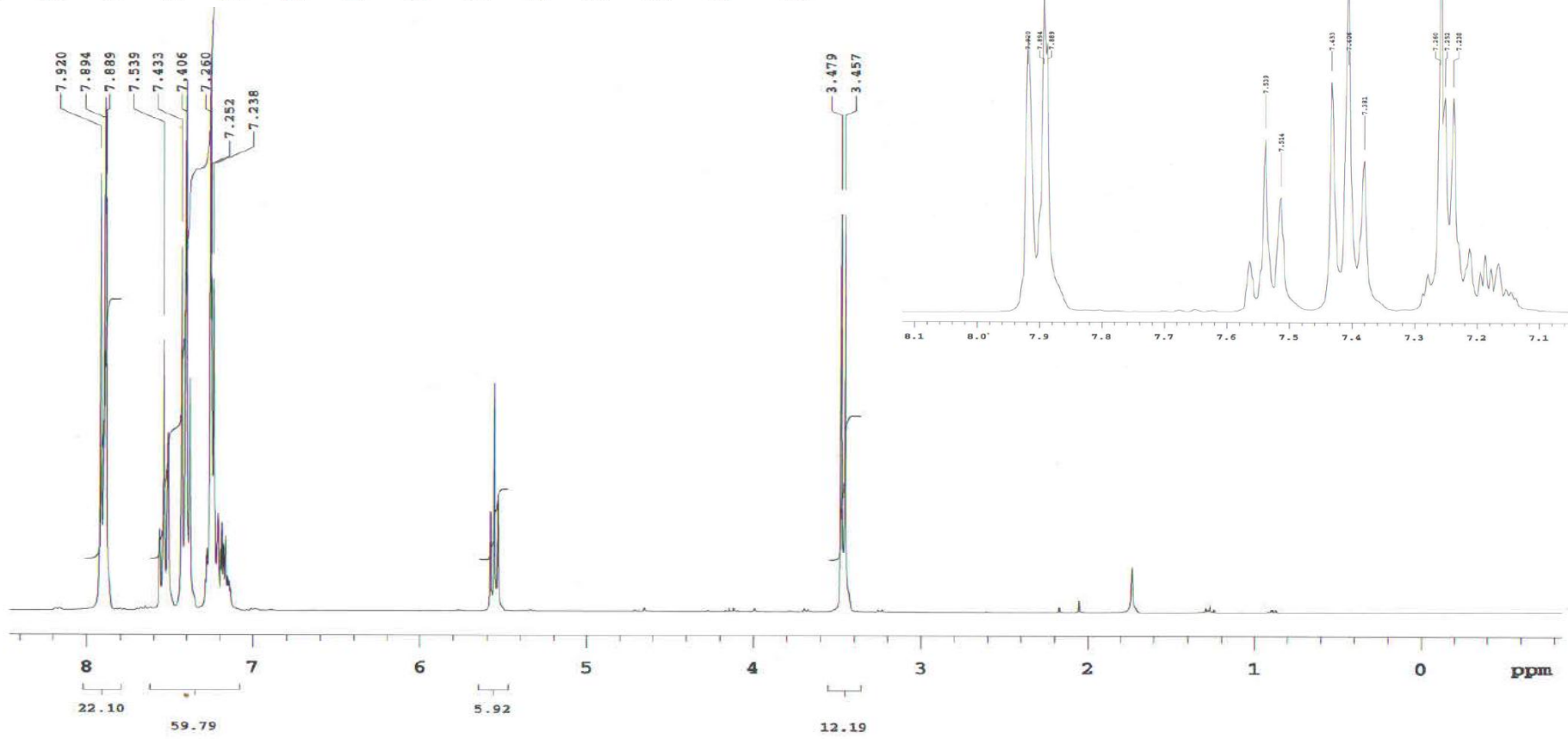
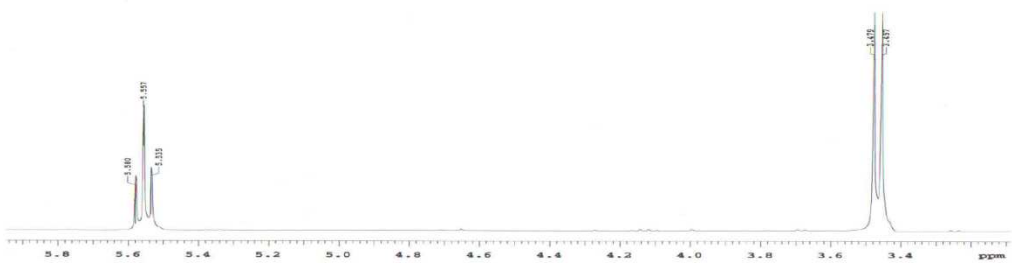
ZEISBERG, E. M. et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. **Cancer Res.**, 67(21):10123–10128, 2007.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **J. Clin. Invest.**, 119(6):1429–1437, 2009.

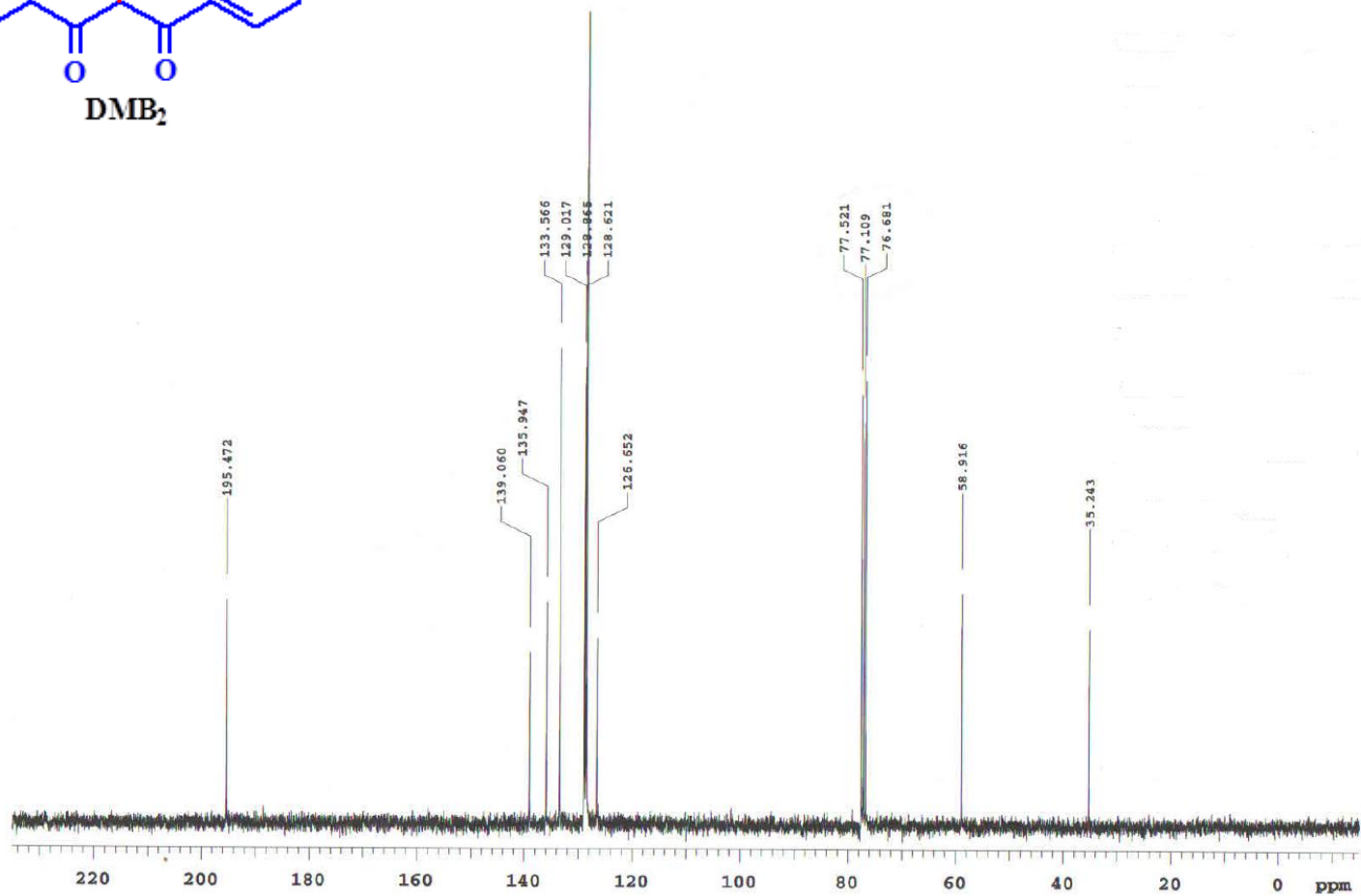
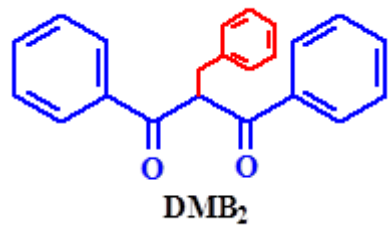
ZHENG, D. et al. Topical delivery of siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation. **PNAS**, p. 1-6, 2012.

ZHOU, X., ZHU, H., LIU, L. et al. A review: recent advances and future prospects of taxol producing endophytic fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 86:1707–1717, 2010.

ANEXOS



1
ANEXO A – Espectro de ¹H do derivado de dibenzoilmetano oxidado.



ANEXO B – Espectro de carbono ¹³C do derivado de dibenzoilmetano oxidado.