

JULIANA ALVES DO VALE

**EFEITO DA INIBIÇÃO DE *SERINE ARGININE PROTEIN KINASES* (SRPKs) EM  
MODELO DE MELANOMA MURINO SUBCUTÂNEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

V149e  
2017 Vale, Juliana Alves do, 1992-  
Efeito da inibição de *Serine Arginine Protein Kinases*  
(SRPKs) em modelo de melanoma murino subcutâneo / Juliana  
Alves do Vale. – Viçosa, MG, 2017.  
xvi, 70f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Melanoma. 2. Histopatologia. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de  
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 616.994

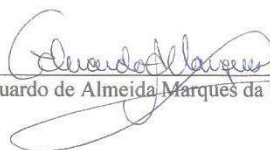
JULIANA ALVES DO VALE

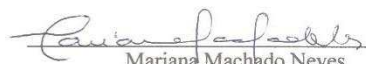
**EFEITO DA INIBIÇÃO DE *SERINE ARGININE PROTEIN KINASES* (SRPKs)  
EM MODELO DE MELANOMA MURINO SUBCUTÂNEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2017.

  
Sirlene Souza Rodrigues Sartori

  
Eduardo de Almeida Marques da Silva

  
Mariana Machado Neves  
(Orientadora)

*“(...) Permita- me ainda nunca me  
contentar com o caminho até aqui  
percorrido”.*

*Trecho retirado da oração do grupo Jovens Seguidores de Cristo JSC).*

## AGRADECIMENTOS

Durante esse percurso, a presença de algumas pessoas foi de suma importância e, por isso, não posso deixar de mencioná-las.

O primeiro agradecimento vai para Aquele que, antes de todos, sonhou comigo. Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me permitir alçar voos cada vez maiores.

Aos meus pais, Lenice e Adailton, pelo imenso incentivo, força, amor, cuidado e por acreditarem que sempre posso ir além.

Ao meu noivo Jairo por ser presença constante, pelo cuidado nos momentos tristes e alegres, pela paciência nos fins de semana de estudo e pelo apoio incondicional.

Aos meus avós já falecidos, em especial a querida vovó Geni (Nega), e a toda família que sonhou juntamente comigo.

Aos amigos do JSC, pela presença nos momentos difíceis e de alegrias, obrigada pelo carinho e apoio nos fins de semana.

Ao Senhor Cônego José Geraldo Vidigal de Carvalho, pelas sábias palavras, pelo incentivo e por mostrar que o estudo também é uma forma de agradecer a Deus.

À querida orientadora e amiga Mariana Machado Neves, por me ensinar que é possível orientar e ser amiga e por acreditar no meu crescimento. Obrigada Mari, por ser uma mãezona, que me acolheu tão bem em seu grupo de estudos.

Aos amigos da pós-graduação, em especial a Franciele Martins, Graziela Domingues e Marcela Sertorio que, mais que companheiras de trabalho, foram sustento nos dias difíceis, alegria nos dias tranquilos e confidentes as quais tenho um grande apreço.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural, principalmente aqueles que me ajudaram no experimento, seja fornecendo mão de obra, seja pelas inúmeras conversas de incentivo. Nara, Victor, Gabriela, Alice, obrigada pela amizade!

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos, pelas horas de aprendizado, experimentos, pelos fins de semana de trabalho e por todo companheirismo.

Ao meu coorientador Gustavo Costa Bressan, pelo apoio, orientação, ensinamentos e horas de crescimento.

Ao Prof. Róbson R. Teixeira e ao seu grupo de pesquisa, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pelo fornecimento do composto, pelo grande incentivo na pesquisa e por ser uma pessoa inspiradora.

Ao professor Gustavo Martins e ao pós-doutor Kenner Moraes, pelo suporte nos experimentos de imunofluorescência e por cederem espaço no laboratório de Biologia Molecular de Insetos.

À professora Sirlene Rodrigues e aos técnicos do laboratório de Morfofisiologia, pela disponibilização de equipamentos e pela disposição em ajudar.

Ao professor Jorge Abdala Dergam dos Santos, do laboratório de Sistemática molecular Beagle, e a professora Renata, do laboratório de Anatomia Vegetal, pela disponibilização dos equipamentos necessários para fotografar as lâminas.

À professora Reggiani Vilela, pela ajuda com as lâminas histológicas de melanoma.

À técnica Solange Bigonha e ao laboratório de Análises Clínicas, do departamento de Nutrição e Saúde, pela ajuda com as análises sorológicas.

Ao professor Leandro Licursi, pelos ensinamentos em imunologia.

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, Sérgio, Izabel, Clóvis, Adilson e Juliana, aos colegas e ao técnico Matheus Rangel pela colaboração e ensinamentos.

Aos professores do departamento de Biologia Geral e a secretaria do mesmo departamento, pelo grande auxílio e conhecimento gerado. Beth, obrigada por tudo!

Aos professores Sirlene e Eduardo por aceitarem participar da banca examinadora, pelo tempo disponibilizado na correção desse trabalho e pelas considerações feitas.

Aos funcionários do Biotério Central da UFV, Adão e Juliano, pelo fornecimento dos animais e pela alegria de sempre.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro do projeto.

À UFV, pela enorme oportunidade de crescimento.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Complexidade do genoma eucarioto e o processo de <i>Splicing</i> .....	3
2.2. Proteínas SR .....	5
2.3. As cinases SRPKs .....	6
2.4. SRPKs e câncer .....	7
2.4.1. Melanoma .....	8
2.4.2. Melanoma e metástase .....	10
2.5. Inibidores de SRPKs e estratégia terapêutica .....	11
3. OBJETIVOS .....	13
4. REFERÊNCIAS.....	13
ARTIGO I.....	21
PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO SUBCUTÂNEO .....	21
RESUMO .....	21
1. INTRODUÇÃO .....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
2.1. Linhagem celular e cultura .....	24
2.2. Animais e comitê de ética .....	24
2.3. Grupos experimentais.....	25
2.4. Medição tumoral e pesagem dos animais.....	25
2.5. Eutanásia e análises anátomo-patológicas.....	25
2.6. Análises histopatológicas .....	26
2.7. Volume de líquido no fígado e no baço .....	26
2.8. Análise estatística.....	26
3. RESULTADOS .....	27
3.1. Volume tumoral e sobrevivência.....	27
3.2. Massa corporal e massa absoluta e relativa dos órgãos e volume de líquido em fígado e baço .....	28
3.3. Análises anátomo e histopatológicas.....	28
4. DISCUSSÃO .....	29

5.	CONCLUSÕES .....	32
6.	REFERÊNCIAS.....	33
	ARTIGO II .....	36
	EFEITO DA INIBIÇÃO DE <i>SERINE ARGININE PROTEIN KINASES</i> (SRPKs) EM MODELO DE MELANOMA MURINO SUBCUTÂNEO .....	36
	RESUMO .....	36
1.	INTRODUÇÃO .....	38
2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	40
2.1	Composto .....	40
2.2	Pomada.....	40
2.3	Animais e comitê de ética .....	41
2.4	Grupos experimentais.....	41
2.5	Pesagem e medição tumoral.....	41
2.6	Eutanásia e análises anatomopatológicas .....	42
2.7	Análises sorológicas.....	42
2.8	Análises histopatológicas .....	42
2.8.1	Fígado .....	42
2.8.2	Tumor e pele .....	43
2.9	Volume de líquido no tumor .....	43
2.10	Coloração <i>acridine orange</i> para apoptose.....	43
2.11	Imunofluorescência do tumor.....	44
2.12	Imunofluorescência <i>in vitro</i> .....	44
2.13	Análise estatística .....	45
3.	RESULTADOS .....	45
3.1	Análises biométricas .....	45
3.2	Análises sorológicas.....	46
3.3	Análise histológica do fígado .....	47
3.4	Volume tumoral.....	48
3.5	Análises histológicas do tumor e da pele .....	49
3.5.1	Tumor.....	49
3.5.2	Pele.....	50
3.6	Coloração <i>acridine orange</i> para apoptose.....	52
3.7	Imunofluorescência do tumor.....	53
	O controle negativo da técnica pode ser visto na figura 11. ....	53
3.7.1	Apoptose (caspase-3).....	53
3.7.2	Estresse oxidativo (peroxidase) .....	53
3.8	Imunofluorescência <i>in vitro</i> .....	54

3.8.1	Apoptose (caspase-3).....	54
3.8.2	Estresse oxidativo (peroxidase) .....	54
4.	DISCUSSÃO .....	58
5.	CONCLUSÕES .....	65
6.	REFERÊNCIAS.....	65
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	70

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de literatura

Figura 1 – Formação do complexo spliceossomo e liberação do RNAm maduro.....	04
Figura 2 - Estrutura das proteínas SR.....	05
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura primária da proteína cinase SRPK1.....	06

### Artigo I

Figura 1 – Volume tumoral, massa tumoral e porcentagem de sobrevivência dos animais inoculados com diferentes concentrações celulares.....	27
Figura 2 – Fotomicrografias representativas da histologia de fígado, pulmão e baço de animais controle e animais inoculados com $1 \times 10^5$ , $2 \times 10^5$ e $4 \times 10^5$ células tumorais.....	29

### Artigo II

Figura 1 – Estrutura do SRPIN340.....	40
Figura 2 – Estrutura do SRVIC30, análogo do SRPIN340.....	40
Figura 3 – Concentração de AST no soro de animais controles e tratados com o SRVIC30, por via tópica e peritumoral.....	47
Figura 4 – Concentração de ALT no soro de animais controles e tratados com o SRVIC30, por via tópica e peritumoral.....	47
Figura 5 – Fotomicrografias dos lóbulos hepáticos dos animais controles e tratados com o SRVIC30 por via tópica e por via peritumoral.....	48
Figura 6 – Volume tumoral dos animais dos grupos controle e tratado, utilizando a via tópica.....	49
Figura 7 – Volume tumoral dos grupos controle e tratado, utilizando a via peritumoral.....	49
Figura 8 – Fotomicrografias representativas do tumor dos animais controle e tratados com o SRVIC30, pela via tópica e peritumoral.....	51
Figura 9 – Fotomicrografias representativas da pele dos animais controles e tratados com SRVIC30 pelas vias tópica e peritumoral.....	52
Figura 10 – Fotomicrografias representativas do tumor dos animais controles e tratados com SRVIC30, pelas vias tópica e peritumoral, utilizando <i>acridine orange</i> .....	53
Figura 11 – Fotomicrografias representativas do controle negativo do tumor dos animais tratados com SRVIC30, mostrando ausência de marcações inespecíficas.....	54
Figura 12 – Fotomicrografias representativas do tumor dos grupos controles e tratados	

pelas vias tópica e peritumoral, evidenciando as células imunomarcadas para caspase-3....	55
Figura 13 – Fotomicrografias representativas do tumor dos grupos controles e tratados pelas vias tópica e peritumoral, evidenciando as células imunomarcadas para peroxidase..	56
Figura 14 – Fotomicrografias representativas do controle negativo das células B16-F10 tratadas comSRPIN340 ou SRVIC30, mostrando ausência de marcações inespecíficas.....	57
Figura 15 - Fotomicrografias representativas de células B16-F10 tratadas com os inibidores SRPIN340 ou SRVIC30, e não tratadas, evidenciando que os inibidores induziram apoptose nestas células.....	57
Figura 16 - Fotomicrografias representativas de células B16-F10 tratadas com os inibidores SRPIN340 ou SRVIC30, e não tratadas (apenas células ou células com DMSO), evidenciando que os inibidores induziram aumento de peroxidase nestas células.	58

## LISTA DE TABELAS

### Artigo I

Tabela 1 - Massa corporal (MC) inicial, MC final e peso absoluto e relativo dos órgãos e do tumor de camundongos Black C57BL/6 inoculados com diferentes quantidades de células B16-F10.....	28
--	----

### Artigo II

Tabela 1 - Massa corporal (MC) inicial, MC final, massa absoluta e relativa dos órgãos e do tumor e volume de líquido no tumor de camundongos Black C57BL/6 tratados com SRVIC30, após inoculação de células B16-F10.....	46
Tabela 2 - Proporção volumétrica dos constituintes do tumor de camundongos tratados com SRVIC30, por via tópica e peritumoral, após inoculação de células B16-F10 (P>0,05).....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína cinase B (ou PKB)
ANOVA	Análise de variância
Bax	<i>BCL2 associated x protein</i>
Bcl	Linfoma de célula B2 ( <i>B cell lymphoma 2</i> )
C57BL/6	Linhagem isogênica de camundongo com pelagem escura
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLKs	<i>Cdc-2-like kinase</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGF	Fator de Crescimento Epidermal ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
ERK	Cinase regulada por sinais externos ( <i>External signal-Regulated Kinase</i> )
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
ESE	<i>Exonic Splicing Enhancers</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> )
MEK	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i>
mRNA	RNA mensageiro
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
PBS	Salina em Tampão Fosfato
PI3K	Fosfoinosítídeo-3-cinase
PRP4K	<i>pre-mRNA splicing factor 4 kinase</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>

RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutase
SRPK	<i>SR-specific Protein Kinase</i>
SRSF	<i>Serine/arginine-rich splicing factors</i>
SR	Proteína rica em Serina e Arginina
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## RESUMO

VALE, Juliana Alves do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Efeito da inibição de *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs) em modelo de melanoma murino subcutâneo.** Orientadora: Mariana Machado Neves. Coorientador: Gustavo Costa Bressan.

Melanoma é um câncer altamente agressivo e letal. Os tratamentos convencionais para esse câncer ainda são ineficazes e geram inúmeros efeitos colaterais. Portanto, tratamentos novos e mais específicos são necessários. As *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs), que fazem parte da maquinaria de *splicing* da célula, têm expressão aumentada no melanoma, o que é associado à agressividade desse tumor. SRPKs são interessantes alvos moleculares para compostos antitumorais. O composto SRVIC30 é um inibidor de SRPKs e já foram relatadas suas características antitumorais *in vitro* e em modelo de metástase pulmonar *in vivo*. Diante disso, o presente estudo avaliou o efeito da inibição de SRPKs em modelo de melanoma murino subcutâneo. O primeiro experimento buscou padronizar a concentração de células de melanoma murino B16-F10 a serem inoculadas pela via subcutânea em camundongos C57BL/6, a fim de utilizar esse modelo animal padronizado nos próximos experimentos. Células B16-F10 nas concentrações de  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  células foram inoculadas no dorso de camundongos, além de um grupo controle sem células inoculadas (n=13/grupo). Ensaio de sobrevivência animal e análise do volume tumoral, bem como análises biométricas e histológicas, permitiram concluir que a concentração de  $2 \times 10^5$  células formou o tumor mais adequado para experimentos com compostos antitumorais. Posteriormente, estudos com a inibição de SRPKs foram prosseguidos. Vinte camundongos machos C57BL/6 foram inoculados com  $2 \times 10^5$  células B16-F10. Após o estabelecimento do tumor, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=5/grupo). Os dois primeiros grupos foram tratados pela via tópica, onde o grupo controle recebeu 40 mg da pomada sem o SRVIC30, e o grupo tratado recebeu 40 mg da pomada acrescida do SRVIC30. Os dois últimos grupos foram tratados por via peritumoral, sendo o grupo controle o que recebeu 150  $\mu$ l de DMSO 1% e o grupo tratado o que recebeu 150  $\mu$ l de SRVIC30 diluído em DMSO 1%. O tratamento foi administrado cinco vezes por semana, no decorrer de 14 dias. Análises histológicas de tumor e fígado, assim como análises sorológicas, biométricas e imunomarcações foram feitas. Os resultados mostraram que, embora o SRVIC30 não tenha sido efetivo em reduzir o volume tumoral, houve aumento das áreas de morte celular nos tumores tratados com o SRVIC30, por ambas as vias de administração. Imunomarcações para peroxidase também foram feitas e animais tratados com SRVIC30, por via tópica, tiveram mais marcações para peroxidase que

os animais do grupo controle. Além disso, houve presença de infiltrado inflamatório na pele dos animais tratados, indicando o possível recrutamento de células do sistema imune para combater o tumor localmente. Por fim, o composto não foi tóxico, na concentração e tempo testados. Assim, é possível concluir que a inibição farmacológica de SRPKs é capaz de influenciar processos cruciais da inibição tumoral como apoptose e recrutamento de células do sistema imune.

## ABSTRACT

VALE, Juliana Alves do, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Effect of Serine Arginine Protein Kinases (SRPKs) inhibition in murine subcutaneous melanoma model.** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-adviser: Gustavo Costa Bressan.

Melanoma is a highly aggressive and lethal cancer. Conventional treatments for this cancer are still ineffective and generate numerous side effects. Therefore, new and more specific treatments are needed. Serine Arginine Protein Kinases (SRPKs) that are part of the cell splicing machinery have increased expression in melanoma, which is associated with the aggressiveness of this tumor. SRPKs are interesting molecular targets for antitumor compounds. SRVIC30 is an inhibitor of SRPKs and its antitumor characteristics *in vitro* and in lung metastasis model *in vivo* have been reported. Therefore, the present study evaluated the effect of SRPKs inhibition in murine subcutaneous melanoma model. The first experiment sought to standardize a concentration of B16-F10 murine melanoma cells to be inoculated subcutaneously in C57BL/6 mice, in order to use this standardized animal model in the next experiments. B16-F10 cells at concentrations of  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  and  $4 \times 10^5$  cells were inoculated on the back of the mice, in addition to a control group without inoculated cells (n=13/group). Animal survival assays and tumor volume analysis, as well as biometric and histological analysis, led to the conclusion that a concentration of  $2 \times 10^5$  cells formed the most suitable tumor for experiments with antitumor compounds. Subsequently, studies with the inhibition of SRPKs were pursued. Twenty male C57BL/6 mice were inoculated with  $2 \times 10^5$  B16-F10 cells. After tumor establishment, the animals were divided into four experimental groups (n=5/group). The first two groups were treated topically, where the control group received 40 mg of the ointment without SRVIC30 and the treated group received 40 mg of ointment with SRVIC30. The last two groups were treated by peritumoral route, being the control group the one that received 150  $\mu$ l of DMSO 1% and the treated group the one that received 150  $\mu$ l of SRVIC30 diluted in DMSO 1%. The treatment was administered five times a week, during 14 days. Histological analysis of tumor and liver, as well as serological, biometric and immunostaining analyses were performed. The results showed that although SRVIC30 was not effective reducing the tumor volume, there was an increase in cell death areas in animals treated with SRVIC30, by both routes of administration. Immunostaining for peroxidase was also made and animals treated with SRVIC30, by topical route, had more labelling for peroxidase than animals in control group. In addition, inflammatory infiltrate was present on

the skin of treated animals, indicating the possible recruitment of immune system cells to fight the tumor locally. Finally, the compound was non-toxic at the concentration and time tested. Thus, it can be concluded that the pharmacological inhibition of SRPKs is able to influence the crucial processes of tumor inhibition such as apoptosis and recruitment of immune system cells.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é o crescimento celular descontrolado e suas causas podem ser as mais variadas. O aumento da expectativa de vida faz com que o organismo humano seja ainda mais susceptível a vários fatores carcinogênicos, uma vez que com o avançar da idade mais mutações são passíveis de se acumularem nas células. Essa doença é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. O número de mortes por câncer nas Américas está projetado para aumentar de 1,3 a 2,1 milhões entre 2012 e 2030 (PAHO, 2012). Nos Estados Unidos, mais de 1.600.000 novos casos de câncer são esperados para 2017 (Cancer Facts & Figures, 2017). No Brasil, as estimativas de novos casos de câncer segundo um documento publicado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) são de 596 mil novos casos para o biênio 2016/2017, sendo 80.850 novos casos de câncer de pele não melanoma e 3.000 novos casos de câncer de pele melanoma (INCA, 2016a). O melanoma é uma forma potencialmente letal do câncer de pele e, apesar de compreender apenas 3 a 5% de todos os cânceres de pele, este é responsável por aproximadamente 75% de todas as mortes por câncer de pele no mundo (Shenenberger, 2012).

Os principais tratamentos para o melanoma incluem excisão cirúrgica quando a doença é detectada precocemente e radioterapia, quimioterapia e imunoterapia quando o tumor está em estágios mais avançados. Porém, esses tratamentos apresentam algumas falhas. Por exemplo, os tratamentos atuais não garantem a retirada de todas as células cancerosas, podendo estas retornarem e tornar o câncer ainda mais agressivo. Além disso, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia apresentam inúmeros efeitos colaterais (American Cancer Society, 2017a,b; Garbe et al., 2008). Uma alternativa para o tratamento do melanoma em seu estágio inicial é o uso de pomadas e cremes. Embora as pomadas e cremes atuais possam até amenizar o tumor, não atingem as células cancerosas mais profundas e, geralmente, são indicadas apenas para lesões pré-cancerosas. Outra terapia alternativa viável para o tumor em seu estágio inicial é a aplicação do composto próximo à área tumoral, pela via chamada peritumoral, de modo a aumentar a concentração do composto localmente. Gammons et al. (2014) comprovaram a eficácia dessa via em reduzir tumores subcutâneos de melanoma metastático em animais do tipo nude inoculados com células de melanoma humano.

As pomadas e cremes utilizados atualmente no tratamento de melanoma não possuem seu mecanismo de ação completamente elucidado, como é o caso do Imiquimode, um composto modulador da resposta imune e que causa inúmeras reações adversas locais como

eritema, sensações de queimação, angioedema e ulceração, além de reações sistêmicas como dor de cabeça, febre, artralgia e mialgia (Barton, 2004; Kalampalakis et al., 2014; Mosher e Lio, 2012). Portanto, estudos sobre tratamentos mais efetivos para o melanoma se fazem necessários. Para tal, os modelos experimentais animais são largamente utilizados em estudos pré-clínicos, de modo a testar a ação, segurança e eficácia de fármacos. Um modelo bem descrito e amplamente utilizado para o estudo do melanoma e de possíveis compostos antitumorais é o da inoculação de células B16-F10 no dorso de camundongos C57BL/6 (Kuzu et al., 2015). Porém, diferentes concentrações celulares são utilizadas para a formação do tumor subcutâneo (Silva et al., 2013; Azevedo et al., 2015; Teiti et al., 2015; Mustapha et al., 2016). Portanto, novos estudos são imprescindíveis com a finalidade de padronizar a concentração celular ótima a ser utilizada em experimentos futuros com fármacos.

Estudos que envolvam pomadas e sua ação terapêutica *in vivo* sobre alvos moleculares do melanoma são escassos. Dentre os diversos alvos moleculares existentes, as *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs) têm se mostrado fortes candidatas à inibição farmacológica, uma vez que foram encontradas super expressas em diferentes tipos de tumores, inclusive no melanoma, favorecendo o surgimento de fenótipos tumorais (Hayes et al., 2007; Gout et al., 2012; Gammons et al., 2014). Essas proteínas são importantes na regulação de eventos de *splicing* alternativo ao fosforilarem proteínas SR, as quais auxiliam na montagem do spliceossomo. Diversas doenças estão relacionadas à desregulação dessa maquinaria, como é o caso do câncer. Baseado em estudos e nos achados de nossa equipe há indícios de que a inibição farmacológica de SRPKs pode ser utilizada como estratégia antitumoral e antimetastática.

O SRPIN340 (N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl)Isonicotinamide) tem sido relatado como uma estratégia terapêutica promissora, vez que essa droga inibe as proteínas cinases SRPKs. Análogos desse composto já mostraram atividade antimetastática *in vitro* ao reduzir a adesão e a invasão celular, e *in vivo* ao reduzir a quantidade de nódulos tumorais no pulmão após o tratamento com o composto (Moreira, 2016). Não se encontra na literatura relato de pomadas ou cremes à base de SRPIN340 e nem a base de análogos desse composto. Baseado no presente exposto, este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito da inibição farmacológica de SRPKs em modelo de melanoma murino subcutâneo por meio do inibidor químico SRVIC30, análogo do SRPIN340, a fim de tratar o tumor topicamente, evitando a cirurgia e visando um tratamento com menos efeitos colaterais. Além disso, testou-

se o uso do composto pela via peritumoral, com a finalidade de se comparar com o efeito do composto utilizando a via tópica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Complexidade do genoma eucarioto e o processo de *Splicing*

O fluxo da informação gênica foi postulado em 1958 por Francis Crick, quando o mesmo cunhou o termo Dogma Central (Crick, 1970). Esse dogma estabelece que a informação gênica parte do DNA para o RNA e do RNA para a proteína e esse percurso está presente em todos os organismos vivos. Se tratando de organismos eucariotos, após a transcrição do DNA haverá a formação de um pré-RNA, o qual passará por modificações que incluem a adição de um quepe na extremidade 5', de uma cauda poli-A na extremidade 3' e a remoção de regiões não-codificantes, os íntrons, com consequente união de regiões codificantes, os éxons. Tais modificações diferem o RNA maduro de um organismo eucarioto daquele RNA maduro de um procarioto pois, nesse último, essas modificações não acontecem e não existe uma compartimentalização celular dos processos. Em organismos eucariotos, após o processamento do RNA, o RNA maduro vai do núcleo para o citoplasma, onde ocorrerá a tradução do mesmo e a formação de uma proteína (Alberts et al., 2014).

Os eucariotos são organismos complexos e essa complexidade não está diretamente relacionada com o número de genes que cada genoma codifica (Zhou e Fu, 2013), mas sim com um processo de retirada de íntrons e união dos éxons, processo esse chamado de *splicing*. O *splicing* tem uma importância biológica crucial, uma vez que possibilita uma enorme diversidade proteica devido à união de éxons diferentes, aumentando a complexidade celular entre as espécies e a plasticidade, visto que a própria célula poderá alterar seu conteúdo proteico em resposta ao ambiente (Corkery et al., 2015). A esse tipo de *splicing* dá-se o nome de *splicing* alternativo, pois um mesmo gene poderá ser transcrito em variantes de RNA e essas poderão ser traduzidas em distintas proteínas, a depender do estado fisiológico da célula, do tipo celular e do momento de desenvolvimento do organismo (Anczukow et al., 2012; Naro e Sette, 2013).

O *splicing* de RNA é comandado por um grande complexo chamado de spliceossomo, o qual é formado por pequenos RNAs nucleares, os snRNAs, complexados a proteínas. A esse

complexo de RNA-proteína é dado o nome de snRNPs ou pequenas ribonucleoproteínas nucleares. Existem diferentes classes de snRNPs: U1, U2, U5 e U4/U6, cada uma apresentando uma molécula de RNA e várias proteínas. Além desses fatores nucleares, existem os fatores de *splicing* não nucleares, chamados de não-snRNPs, os quais compreendem as hnRNP (heterogeneous nuclear RNPs), fatores de *splicing* que pertencem a outras famílias da ribonucleoproteínas e proteínas com domínios ricos em serina e arginina conhecidas como proteínas SR, as quais são responsáveis pela demarcação do sítio de *splicing*, pelo recrutamento dos fatores de *splicing* nucleares (snRNPs) e pela montagem do spliceossomo (Alberts et al., 2014; Naro e Sette, 2013). Inicialmente, ocorre a seleção do sítio de *splicing* pelo reconhecimento da extremidade 5' do íntron por U1 e da extremidade 3' por U2. Tal processo é mediado pelo domínio C terminal da RNA polimerase II. A fosforilação do domínio RS (rico em serina e arginina) das proteínas SR por cinases, como a SRPK (descrita mais à frente), faz com que o mesmo vá ao núcleo e medeia a ligação de U1 snRNP à extremidade 5'. Após a formação desse pré-spliceossomo, as snRNP U4, U5 e U6 são recrutadas para a montagem do complexo spliceossomo. Posteriormente, ocorre uma série de rearranjos no complexo que promoverá o *splicing*, levando à liberação de U1 e U4, à formação do pós-spliceossomo e culminará com a liberação de U2, U5 e U6 snRNP, como mostrado na figura 1 (Corkery et al., 2015; Wood et al., 2010).

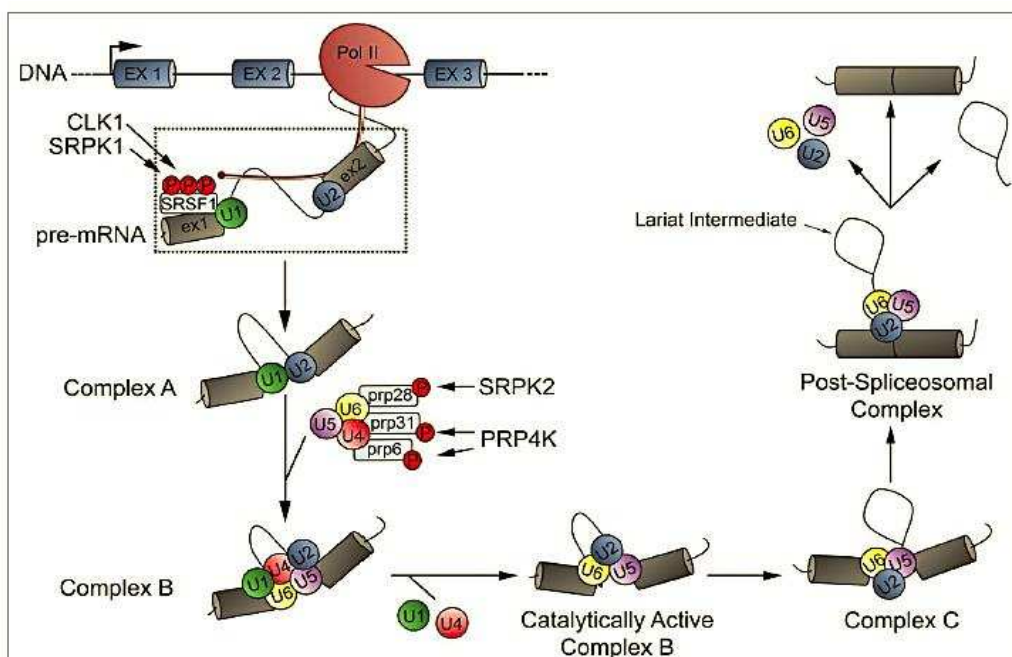


Figura 1 – Formação do complexo spliceossomo e liberação do RNAm maduro. Diferentes proteínas cinases participam da montagem do spliceossomo e, conseqüentemente, do *splicing* do RNA. (Corkery et al., 2015).



A ação de duas proteínas cinases alteram a atividade das proteínas SR. Essas cinases alteram a atividade e a localização das proteínas SR por fosforilarem seu domínio RS. São elas: as proteínas cinases específicas-SR (SRPKs), as quais fosforilam as proteínas SR, permitindo a sua entrada no núcleo, e as cinases *Cdc2-like* (CLKs), as quais medeiam a hiperfosforilação das proteínas SR, induzindo sua liberação dos *Speckles*, os quais são estruturas subnucleares que armazenam os fatores de *splicing*, e o seu recrutamento aos locais de transcrição (Ghosh et al., 2011). Em humanos, três classes de proteínas cinases de *splicing* já foram descritas. Além das SRPK1/2/3 e das CLK1/2/3/4 existe o fator cinase 4 de processamento do pré-RNA (PRP4K), todas apresentam diferentes papéis na regulação do *splicing*, o que pode ser evidenciado pelas distintas localizações celulares de cada classe (Corkery et al., 2015).

### 2.3. As cinases SRPKs

As proteínas cinases ricas em Serina e Arginina (SRPKs) compreendem uma família conservada de cinases serina/treonina composta por mais de 50 membros (Giannakouros et al., 2011), sendo a proteína cinase SRPK1 uma das primeiras descritas (Gui et al., 1994a,b). Essas proteínas regulam não somente as proteínas SR, mas também fatores de *splicing* da classe dos snRNPs. Em células de mamíferos, quatro tipos de SRPKs já foram descritas: SRPK1, SRPK1a, SRPK2 e SRPK3, cada uma apresentando uma localização predominante em diferentes órgãos (Wang et al., 1998; Nikolakaki et al., 2001; Nakagawa et al., 2005). Todos os membros dessa família possuem uma estrutura básica em comum: um domínio acessório e estruturalmente desordenado, também chamado de sequência espaçadora, o qual divide os domínios conservados das cinases em dois lóbulos, N-terminal e C-terminal (Figura 3) (Zhou et al., 2012; Ding et al., 2006; Naro e Sette, 2013).

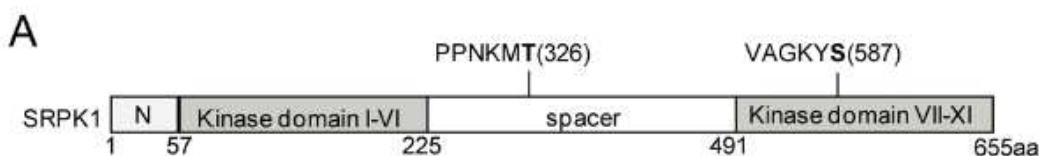


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura primária da proteína cinase SRPK1. As proteínas SRPKs apresentam uma estrutura básica composta por dois domínios cinases, a região N-terminal e C-terminal separadas pela região espaçadora (Zhou et al., 2012).

As SRPKs localizam-se principalmente no citoplasma, mas podem alterar sua localização entre o citoplasma e o núcleo a depender de certos fatores de crescimento, de estresse osmótico ou da fase do ciclo celular (fase G2/M). Uma das vias desencadeadoras da translocação núcleo-citoplasma das SRPKs é a AKT-SRPK-SR, principal eixo pelo qual o fator de crescimento epidermal (EGF) é transduzido, permitindo com que EGF regule o *splicing* alternativo no núcleo (Zhou et al., 2012; Zhong et al., 2009; Gui et al., 1994a). As SRPKs são mantidas no citoplasma devido às suas regiões espaçadoras e à interação com chaperonas. Na presença de EGF, AKT é ativada e liga-se a SRPK1 induzindo sua autofosforilação e a consequente liberação da SRPK1 de chaperonas, especificamente da Hsp70. Assim, a SRPK1 estará apta a deslocar-se para o núcleo e as chaperonas Hsp 90 auxiliam nessa translocação (Zhou e Fu, 2013).

O *splicing* é de suma importância para a homeostase celular e o descontrole desse processo pode resultar em doenças severas. Mutações que afetam tanto os elementos cis-reguladores quanto as que afetam as atividades dos fatores que agem em trans podem ser o resultado de uma desregulação do *splicing* tanto constitutivo quanto alternativo (Ward et al., 2010). Modificações na expressão das SRPKs já foram relatadas em diversas doenças. Essas proteínas estão envolvidas com a replicação viral e a montagem de proteínas do nucleocapsídeo de muitos vírus como o vírus da hepatite B, o vírus da hepatite C e o vírus da imunodeficiência humana (Zheng et al, 2005; Karakama et al, 2010; Fukuhara et al, 2006). As SRPKs também estão relacionadas a algumas doenças neurodegenerativas como Alzheimer: Hong et al. (2012) mostraram que a depleção de SRPK2 melhorou o comportamento cognitivo em camundongos, revelando a relação da SRPK2 com um pior comportamento cognitivo característico da doença de Alzheimer.

Como alterações nos níveis de expressão de SRPKs estão diretamente relacionadas a modificações no processo de *splicing*, podendo favorecer isoformas diferentes das normais para a célula, é de se esperar que tais modificações contribuam para a formação do câncer. Estudos já relataram a superexpressão das SRPKs favorecendo a expressão de isoformas tumorais, uma vez que ocorreram alterações da atividade das proteínas SR sobre o transcrito primário (Hayes et al., 2007; Gout et al., 2012; Gammons et al., 2014).

## **2.4. SRPKs e câncer**

A desregulação da atividade dos fatores de *splicing* devido a alterações na expressão das SRPKs está correlacionada com os processos de gênese de câncer, como a evasão da apoptose e da senescência, aumento da sobrevivência celular, crescimento e proliferação celular, geração de sítios metastáticos e angiogênese sustentada (Da silva et al., 2015; Grosso et al., 2008). Siqueira et al. (2015) mostraram que a inibição de SRPKs em células leucêmicas pela ação de fármacos gerou eventos relacionados à apoptose precoce e tardia. Outro estudo encontrou que SRPK2 estava relacionada com a promoção da leucemia, uma vez que essa cinase aumentou a fosforilação de *Acinus* potencializando a transcrição da ciclina A1, a progressão do ciclo celular e, logo, a proliferação dessas células leucêmicas (Jang et al., 2008).

A superexpressão das cinases SRPKs já foi relatada em diversos tipos de cânceres. No carcinoma pulmonar de células não pequenas, as cinases SRPK1 e SRPK2 e os fatores de transcrição SRSF (*Serine/arginine-rich splicing factors*) 1 e 2 estão anormalmente expressos. Os níveis de SRPK1 estão superexpressos em 92% e os de SRPK2 em 94% dos casos de adenocarcinoma pulmonar e em 72% e 68% nos casos de carcinoma pulmonar de célula escamosa, respectivamente. Os níveis de SRSF1 e SRSF2 também estão alterados nesses cânceres (Gout et al., 2012). Carcinoma pancreático, câncer de mama e de cólon também apresentaram superexpressão de SRPK1 e a sua relação com o desequilíbrio da via das MAPK (*Mitogen-activated protein Kinase*). Esses estudos mostraram que a redução da expressão das SRPK1 reduziu a fosforilação de MAPK3, MAPK1 e AKT levando à diminuição da proliferação celular e ao aumento da apoptose (Hayes et al., 2007). Wu e sua equipe (2013) estudaram glioma, o tipo mais comum de tumor intracraniano, e demonstraram que a redução da expressão de SRPK1 inibiu os eventos relacionados com a formação do câncer tais como crescimento celular, invasão e migração, evidenciando a relação entre a superexpressão dessa cinase com a progressão tumoral. A superexpressão de SRPK1 também foi encontrada no melanoma (Gammons et al., 2014). Nesse estudo, SRPK1 foi encontrada superexpressa em linhagens de melanoma cutâneo e uveal e quando sua expressão foi reduzida por um inibidor farmacológico ou por *knockdown* houve diminuição da expressão da isoforma pró-angiogênica de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), uma citocina reguladora da angiogênese, reduzindo o crescimento do melanoma.

#### **2.4.1. Melanoma**

O melanoma é um tipo de câncer de pele originário dos melanócitos. O melanoma cutâneo resulta da transformação maligna dos melanócitos influenciada, por exemplo, por modificações no ciclo celular e alteração na expressão de proteínas. As principais causas que levam à transformação maligna de melanócitos são multifatoriais e incluem os danos da radiação ultravioleta e a susceptibilidade genética. Apesar de compreender apenas 3 a 5% de todos os cânceres de pele, o melanoma é potencialmente letal, sendo responsável por aproximadamente 75% de todas as mortes por câncer de pele no mundo (Shenenberger, 2012; Cancer facts & figures, 2013).

Mutações em genes, principalmente naqueles supressores de tumor, levam à ativação e às alterações das vias mais comprometidas com o desenvolvimento de tumores sólidos, como o melanoma: a via da MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK) e a via da AKT (PI3K/PTEN/AKT), vias críticas que controlam a proliferação celular, invasão, migração e metástase. Tais mutações podem levar à progressão do ciclo celular e a prevenção da apoptose ao ativar a via das MAPK, como ocorre com mutações no gene BRAF presente em 50% a 70% dos melanomas (Pappalardo et al., 2016; Jokinen e Koivunen, 2015; Davies et al., 2002). Ainda, alterações nesse gene estimulam a secreção de VEGF, uma citocina que contribui para a neovascularização, e controlam muitos genes que funcionam a *downstream* de BRAF mutado, como o gene da metaloproteinase-1. Essa enzima é uma proteinase da matriz extracelular e está relacionada à manutenção do tumor por destruir componentes da matriz extracelular e permitir a metástase (Gray-Schopfer et al., 2007). Ativação de AKT ou MAPK também pode regular a apoptose por meio da via p53/bax/Bcl2, e os processos relacionados à adesão e migração por meio da via FAK/Scr/Paxilin (Turner, 2000; Gray-Schopfer et al., 2007).

Espécies Reativas de Oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) também podem contribuir para a geração de câncer, uma vez que podem causar o mau funcionamento do sistema de reparo do DNA (Sosa et al., 2013). A pele, atuando como barreira protetora por se situar na interface entre o corpo e o meio-ambiente, está sujeita a inúmeros fatores geradores de estresse oxidativo como a radiação ultravioleta (Klaunig e Kamendulis, 2004). Autores já demonstraram que os níveis de espécies reativas de oxigênio estão elevados no melanoma (Yamaura et al., 2009; Liu-Smith et al., 2014). Em condições normais, o sistema de defesa antioxidante contribui para a neutralização dessas espécies reativas. Esse sistema é composto por peroxidases como a glutatona e a catalase (CAT) e pela superóxido dismutase (SOD). Em condições patológicas como no melanoma, o nível de glutatona e da atividade de CAT e SOD estão reduzidos, o que agrava os danos causados pelo estresse oxidativo à célula, uma

vez que as espécies reativas serão raramente eliminadas devido aos baixos níveis dessas enzimas antioxidantes (Picardo et al., 1999).

O prognóstico de pacientes com melanoma cutâneo pode ser considerado bom, caso seja detectado nos estádios iniciais. Nos últimos anos, houve grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor (INCA, 2017b). Porém, caso seja detectado tardiamente, tende a se espalhar para outras partes do corpo, iniciando sua disseminação por meio do crescimento vertical. O melanoma cutâneo é considerado um câncer extremamente agressivo e com alto potencial metastático (Gray-Schopfer et al., 2007).

#### **2.4.2. Melanoma e metástase**

O melanoma é um tipo de tumor sólido considerado agressivo e altamente metastático (Braeuer et al., 2013). O processo de metástase, ou seja, a invasão de tecidos adjacentes pelas células tumorais e sua consequente disseminação para órgãos distantes ocorre por meio de uma série de etapas progressivas as quais incluem o desprendimento da matriz extracelular, a migração, a invasão de vasos sanguíneos e linfáticos, a adesão e a capacidade de sobrevivência em outros órgãos (Gomes et al., 2012).

Para a formação de um fenótipo com características de células migratórias, as células do tumor primário passam por modificações chamadas de transição epitélio-mesenquimal. Nesse processo, as células epiteliais alteram seu fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal, ou seja, perdem a polaridade e a adesão celular e se tornam mais alongadas, adquirindo habilidade para invadir e colonizar outros órgãos. Tais modificações ocorrem devido a uma reprogramação do *splicing* alternativo (Thiery et al., 2009; Lim e Thiery, 2012). Se tratando de SRPKs, Mello (2014) identificou a interação de SRPK2 com uma proteína localizada fora do núcleo importante para a migração celular, Swiprosina-1. Essa proteína regula a acessibilidade de F-actina à cofilina, modulando a formação de protusões e lamelipódios em células de melanoma B16F10 (Huh et al., 2013). Sabendo da interação dessas proteínas, estudos posteriores poderão confirmar se a fosforilação de Swiprosina-1 está diretamente relacionada com SRPK2, uma vez que as vias de ambas as proteínas apresentam componentes em comum como o eixo PI3K/AKT (Zhou et al., 2012).

O melanoma, por ser altamente metastático, pode gerar metástase em diversos órgãos como pulmão, fígado, cérebro, osso e nódulos linfáticos (Braeuer et al., 2013). Estudos com

pacientes diagnosticados com melanoma principalmente na fase avançada da doença relataram que 50% dos pacientes apresentaram metástase no cérebro (Deeken et al., 2007; Thorsen et al., 2013). Em outro estudo 15 a 20% dos pacientes com melanoma metastático cutâneo apresentaram metástases no fígado (Barth, 1995). Os sítios mais frequentes de disseminação metastática do melanoma cutâneo são, além da pele e do tecido subcutâneo, os linfonodos e o pulmão, sendo este último com 18 a 36% de frequência (Meyers e Balch, 1998). Além disso, as disfunções hepáticas resultantes do melanoma metastático, embora não sejam graves, podem causar elevação moderada de enzimas hepáticas, entre elas a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Tanaka et al., 2015).

Um dos modelos mais utilizados para avaliar a atividade antimetastática de compostos e estudar esse processo é a linhagem de células do melanoma murino B16-F10 quando inoculadas por via subcutânea em camundongos C57BL/6 (Fidler, 1973). Essa linhagem de melanócito transformada é isolada dessa espécie animal, tornando esse um excelente modelo para se estudar tumores subcutâneos originados de B16-F10 e a formação de metástases. É necessário, porém, padronizar a quantidade de células a serem inoculadas no modelo de tumor subcutâneo, uma vez que esse tumor não poderá ser muito agressivo, pois deverá chegar a um tamanho ótimo de forma a permitir o tratamento durante o tempo de experimento. Tal modelo também propiciará a avaliação da formação de metástases a partir do melanoma de forma natural, diferentemente de quando se induz pela veia caudal, pois dessa forma já é esperada a formação de metástase no pulmão, pois o leito capilar pulmonar é o primeiro leito que essas células atingem após injeção (Khanna e Hunter, 2005; Wang, 2014).

Pacientes com melanoma metastático apresentam sobrevida média inferior a um ano, uma vez que ainda não existem tratamentos eficientes no combate dessa doença (Korn et al., 2008). Entender a complexidade da cascata metastática poderá auxiliar na escolha de um tratamento mais adequado e efetivo para o paciente (Braeuer et al., 2013).

## **2.5. Inibidores de SRPKS e estratégia terapêutica**

A cirurgia é o tratamento mais indicado para o tratamento do melanoma. Radioterapia e quimioterapia também podem ser utilizadas dependendo do estágio do câncer. Porém, quando há metástase o melanoma é incurável, na maioria dos casos. Portanto, a estratégia de tratamento para a doença avançada deve ter como objetivos abrandar os sintomas e

aperfeiçoar a qualidade de vida do paciente (INCA, 2017c). Os resultados insatisfatórios obtidos com as atuais modalidades de tratamento do melanoma cutâneo têm estimulado a realização de estudos experimentais com novos métodos. Os efeitos colaterais ainda são inúmeros como febre, ulcerações, eritema e angioedema, os quais contribuem para a piora na qualidade de vida dos pacientes e, ao invés de melhorarem os sintomas da doença, agravam os mesmos (Barton, 2004; Kalampalikis et al., 2014; Mosher e Lio, 2012). Portanto, a busca por drogas alternativas ou complementares para o tratamento do melanoma, principalmente nos estágios avançados, tem ocasionado um grande número de pesquisas na área. Com base nisso, a utilização de uma pomada ou a aplicação local de um composto com maior potencial terapêutico, com menos efeitos colaterais e que, ao mesmo tempo, impeça a formação de metástases e erradique o tumor seria uma alternativa aos ineficientes tratamentos atuais.

Os tratamentos convencionais agem de forma inespecífica no combate ao tumor, já as novas drogas anticâncer agem de forma específica, tornando-as mais promissoras no tratamento contra o câncer e contribuindo para melhores respostas dos pacientes (Grosso et al., 2008). Embora nem todos os inibidores da maquinaria de *splicing* tenham sido analisados *in vivo*, o que limita a percepção de seus reais potenciais terapêuticos, a modulação da maquinaria de *splicing* no câncer propiciará um tratamento mais específico, tornando-o mais eficaz (Da Silva et al., 2015). Nesse contexto, o composto N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide, uma pequena molécula conhecida como SRPIN340, tem se destacado ao inibir quimicamente as SRPKs, especificamente as SRPK1 e SRPK2. O SRPIN340 age como inibidor específico das SRPK1 e SRPK2, competindo pelo sítio de ligação ao ATP dessas cinases (Fukuhara et al., 2006; Hagiwara et al., 2009). Inicialmente o SRPIN340 era utilizado apenas como antiviral. Esse composto inibiu as SRPKs e modulou o estado de fosforilação dos fatores de *splicing* SR, impedindo a expressão de certas proteínas virais (Fukuhara et al., 2006; Karakama et al., 2010). Posteriormente, o SRPIN340 foi relacionado ao bloqueio da angiogênese e à prevenção do crescimento tumoral em camundongos, ao inibir a função das SRPKs (Nowak et al., 2010; Amin et al., 2011), além de apresentar efeito antitumoral contra o melanoma *in vitro* e *in vivo* (Gammons et al., 2014).

Na busca por drogas mais eficazes e específicas ou pela otimização dos compostos já existentes, com o objetivo de se obter um composto mais ativo ou diminuir os efeitos colaterais, vários trabalhos tem se destacado (Xie et al., 2017; Faião-Flores et al., 2015; Penthala et al., 2015). Nesse contexto, a criação de análogos a partir de uma única estrutura química possibilita explorar melhor o potencial de fármacos. O SRPIN340 permite a criação

de diversos análogos os quais têm se mostrado com atividades semelhantes ou até melhores que o mesmo (Moreira, 2016). No presente estudo, após a análise prévia da atividade citotóxica e antimetastática *in vitro* de compostos análogos ao SRPIN340, foi selecionado o composto SRVIC30 para prosseguir com os estudos *in vivo*.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo geral:

- Avaliar o efeito da inibição farmacológica de SRPKs em modelo de melanoma murino subcutâneo por meio do inibidor químico SRVIC30, análogo do SRPIN340.

#### Objetivos específicos:

- Padronizar o modelo experimental;
- Avaliar o efeito do composto na redução do tumor e inibição do processo metastático *in vivo*;
- Mensurar as massas absoluta e relativa de órgãos-alvo de metástase de células B16-F10 e volume de líquido no tumor;
- Determinar os níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro dos animais;
- Avaliar a macroscopia do fígado, pulmão, rim e baço com o intuito de verificar se houve alterações anatomopatológicas;
- Avaliar a histologia e histomorfometria do tumor e a histologia da pele e do fígado;
- Avaliar apoptose no tumor, por meio de *acridine orange*;
- Avaliar a morte celular por apoptose e estresse oxidativo por imunofluorescência *in vitro* e *in vivo*.

### 4. REFERÊNCIAS

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. **Molecular Biology of the Cell**. 6 ed. New York: Garland Science, 2014.

American Cancer Society. **Cancer facts & figures 2013**. Atlanta: American Cancer Society; 2013.

\_\_\_\_\_. **Cancer facts & figures 2017**. Atlanta: American Cancer Society; 2017.

\_\_\_\_\_. **Treatment of Melanoma Skin Cancer, by Stage**. Disponível em <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/by-stage.html>>. Acesso em: 20 de jun. 2017a.

\_\_\_\_\_. **Treatments and side effects**. Disponível em <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects.html>>. Acesso em: 20 de jun. 2017b.

Amin, E. M.; Amin, S.; Oltean, J.; Hua, J.; Gammons, M. V. R.; Hamdollah-Zadeh, M.; Welsh, G. I.; Cheung, M.; Ni, L.; Kase, S.; Rennel, E. S.; Symonds, K. E.; Nowak, D. G.; Pokora-Royer, B.; Saleem, M. A.; Hagiwara, M.; Schumacher, V. A.; Harper, S. J.; Hinton, D. R.; Bates, D. O.; Ladomery, M. R. **WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing**. *Cancer Cell*. 2011; 20(6): 768–780.

Anczukow, O.; Rosenberg, A. Z.; Akerman, M.; Das, S.; Zhan, L.; Karni, R.; Muthuswamy, S. K.; Krainer, A. R. **The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation**. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2012; 19(2): 220-8.

Azevedo, R. A.; Figueiredo, C. R.; Ferreira, A. K.; Matsuo, A. L.; Massaoka, M. H.; Girola, N.; Auada, A. V. V.; Farias, C. F.; Pasqualoto, K. F. M.; Rodrigues, C. P.; Barbuto, J. A.; Levy, D.; Bydlowski, S. P.; Sá-Junior, P. L.; Travassos, L. R.; Lebrun, I. **Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor activity *in vivo***. *Peptides*. 2015; 68:113–119.

Barth, A.; Wanek, L. A.; Morton, D. L. **Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases**. *Journal of the American College Surgeons*. 1995; 181:193–201.

Barton, J. C. **Angioedema associated with imiquimod**. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 51:477–478.

Blanco, F. J.; Bernabéu, C. **The splicing factor SRSF1 as a marker for endothelial senescence**. *Front Physiol*. 2012; 3(54): 1-6.

Brauer, R. R.; Watson, I. R.; Wu, C.; Mobley, A. K.; Kamiya, T.; Shoshan, E.; Bar, M. **Why is melanoma so metastatic?** *Pigment Cell & Melanoma*. 2013; 27(1):19–36.

Corkery, D. P.; Holly, A. C.; Lahsae, S.; Dellaire, G. **Connecting the speckles: Splicing kinases and their role in tumorigenesis and treatment response**. *Nucleus*. 2016; 6(4): 279-288.

Crick, F. **Central Dogma of Molecular Biology**. *Nature*. 1970; 227: 561-563.

Da Silva, M.R.; Moreira, G. A.; Silva, R. A. G.; Barbosa, E. A. A.; Siqueira, R. P.; Teixeira, R. R.; Almeida, M. R.; Silva, A.; Fietto, J. L. R.; Bressan, G. C. **Splicing Regulators and their roles in cancer biology and therapy**. BioMed Research International. 2015; 12 p.

Davies, H.; Bignelli, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt1, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B. A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J. W. C.; Leung, S. Y.; Yuen, S. T.; Weber, B. L.; Seigler, H. F.; Darrow, T. L.; Paterson, H.; Marais, R.; Marshall, C. J.; Wooster, R.; Stratton, M. R.; Futreal, P. A. **Mutations of the BRAF gene in human cancer**. Nature. 2002; 417.

Deeken, J. F.; Losher, W. **The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses**. Clinical Cancer Research. 2007; 13(6).

Ding, J.; Zhong, Z.; Hagopian, J. C.; Cruz, M. M.; Ghosh, G.; Feramisco, J.; Adams, J. A.; Fu, X. **Regulated Cellular Partitioning of SR Protein-specific Kinases in Mammalian Cells**. Molecular Biology of the Cell. 2006; 17:876–885.

Faião-Flores, F.; Suarez, J. A. Q.; Fruet, A. C.; Maria-Engler, S. S.; Pardi, P. C.; Maria, D. A. **Curcumin Analog DM-1 in Monotherapy or Combinatory Treatment with Dacarbazine as a Strategy to Inhibit *In Vivo* Melanoma Progression**. PLoS ONE. 2015; 10(3):e0118702.

Fidler, I. J. **Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis**. Nature New Biology. 1973; 242:148-149.

Fukuhara, T.; Hosoya, T.; Shimizu, S.; Sumi, K.; Oshiro, T.; Yoshinaka, Y.; Suzuki, M.; Yamamoto, N.; Herzenberg, L. A.; Hagiwara, M. **Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006; 103(30): 11329-33.

Gammons, M. V.; Lucas, R.; Dean, R.; Coupland, S. E.; Oltean, S.; Bates, D. O. **Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma**. British Journal of Cancer. 2014; 111: 477–485.

Garbe, C.; Terheyden, P.; Keilholz, U.; Kölbl, O.; Hauschild, A. **Treatment of Melanoma**. Dtsch Arztebl Int. 2008; 105(49): 845–51.

Ghosh, G.; Adams, J. A. **Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases**. FEBS Journal. 2011. 278: 587–597.

Giannakouros, T; Nikolakaki, E.; Mylonis, I.; Georgatsou, E. **Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence**. FEBS Journal. 2011. 278(4): 570-86.

Gomes, C. A.; Junior, C. S.; Valle, J. A.; Lopes, C. T.; Barra, A.; Gomes, C. C.; Carmo, T. H. L.; Gomes, F. C. **CancerMetastasis**. Cell & Developmental Biology. 2012; 1(5).

Gout, S.; Brambilla, E.; Boudria, A.; Drissi, R.; Lantuejoul, S.; Gazzeri, S., Eymin, B. **Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma**. PLoS One. 2012; 7: e46539.

Gray-Shopfer, V.; Wellbrock, C.; Marais, R. **Melanoma biology and new targeted therapy**. Nature. 2007; 445.

Grosso, A. R.; Martins, S.; Carmo-Fonseca, M. **The emerging role of splicing factors in cancer**. European Molecular Biology Organization. EMBO reports. 2008; 9: 1087-1093.

Gui, J. F.; Lane, W. S.; Fu, X. D. **A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle**. Nature. 1994a; 369:678-82.

Gui, J. F.; Tronchere, H.; Chandler, S. D.; Fu, X. D. **Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors**. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1994b; 91:10824-8.

Hagiwara, M.; Fukuhara, T.; Suzuki, M.; Hosoya, T. **Method for Controlling Protein Phosphorylation, and Antiviral Agents Whose Active Ingredients Comprise Agents that Control SR Protein Activity**. United States Patent, v. US7569536 B2, 2009.

Hayes, G. M.; Carrigan, P. E.; Miller, L. J. **Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas**. Cancer Research. 2007; 67: 2072–2080.

Hong, Y.; Chan, C. B.; Kwon, I.; Li, X.; Song, M.; Lee, H.; Liu, X.; Sompol, P.; Jin, P.; Lee, H.; Ping, S.; Ye, K. **SRPK2 Phosphorylates Tau and Mediates the Cognitive Defects in Alzheimer's Disease**. The Journal of Neuroscience. 2012; 32(48): 17262–17272.

Huh, Y. H.; Kim, S. H.; Chung, K.; Oh, S.; Kwon, M.; Choi, H.; Rhee, S.; Ryu, J.; Park, Z. Y.; Jun, C.; Song, W. K. **Swiprosin-1 modulates actin dynamics by regulating the F-actin accessibility to cofilin**. Cell Mol Life Sci. 2013; 70:4841–4854.

Instituto Nacional Do Câncer. **Estimativas 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. 2016a.

\_\_\_\_\_. **Tipos de câncer**. Disponível em <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma)>. Acesso em: 22 de jun. 2017b.

\_\_\_\_\_. **Tratamento**. Disponível em <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/tratamento](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/tratamento)>. Acesso em: 22 de jun. 2017c.

Jang, S. W.; Yang, S. J.; Ehlen, A.; Dong, S.; Khoury, H.; Chen, J.; Persson, J. L.; Ye, K. **Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1**. Cancer Research. 2008; 68: 4559–4570.

Jokinen, E.; Koivunen, J. P. **Bcl-xl and Mcl-1 are the major determinants of the apoptotic response to dual PI3K and MEK blockage.** International Journal of Oncology. 2015; 1103-1110.

Kalampalikis, A.; Goetze, S.; Elsner, P. **Development of recalcitrant skin ulcers as a side-effect of treatment with topical 5% imiquimod cream: Report of two cases.** JEADV. 2014; 28:1572–1578.

Karakama, Y.; Sakamoto, N.; Itsui, Y.; Nakagawa, M.; Tasaka-Fujita, M.; Nishimura-Sakurai, Y.; Kakinuma, S.; Oooka, S.; Azuma, S.; Tsuchiya, K.; Onogi, H.; Hagiwara, M.; Watanabe, M. **Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by a Specific Inhibitor of Serine-Arginine-Rich Protein Kinase.** Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 2010; 54(8): 3179–3186.

Khanna, C.; Hunter, K. **Modeling metastasis *in vivo*.** Carcinogenesis. 2005; 26 (3):513-523.

Klaunig, J. E.; Kamendulis, L. M. **The role of oxidative stress in carcinogenesis.** Annual Review of Pharmacology Toxicology. 2004; 44:239-67.

Korn, E. L.; Liu, P.; Lee, S. J.; Chapman, J. W.; Niedzwiecki, D.; Suman, V. J.; Moon, J.; Sondak, V. K.; Atkins, M. B.; Eisenhauer, E. A.; Parulekar, W.; Markovic, S. N.; Saxman, S.; Kirkwood, J. M. **Meta-Analysis of Phase II Cooperative Group Trials in Metastatic Stage IV Melanoma to Determine Progression-Free and Overall Survival Benchmarks for Future Phase II Trials.** Journal of Clinical Oncology. 2008; 26(4).

Kuzu, O. F.; Nguyen, F. D.; Noory, M. A.; Sharma, A. **Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research.** Cancer Growth Metastasis. 2015; 8(S1):81–94.

Lim, J.; Thiery, J. P. **Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development.** Development. 2012; 139:3471-3486.

Liu-Smith, F.; Dellinger, R.; Meyskens Jr, F. L. **Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression.** Arch Biochem Biophys. 2014; 0:51–55.

Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Amon, A.; Scott, M. P. **Molecular cell biology.** 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Mello, A. O. **Identificação de parceiros de interação para a cinase reguladora de splicing SRPK2.** Dissertação. 91f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2014.

Meyers, M. L.; Balch, C. M. **Diagnosis and treatment of metastatic melanoma.** In: Balch, C. M.; Houghton, A. N.; Sober, A. J.; Soong, S. - Cutaneous melanoma. Saint Louis, Quality Medical Publishing. 1998; 325-72.

Moreira, G. A. **Efeito Citotóxico e Antimetastático da Inibição das Cinases SRPKs em Células de Melanoma Cutâneo.** Dissertação. 78f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

Mosher, S.; Lio, P. **Cytokine Dermatitis and Febrile Seizure From Imiquimod.** PEDIATRICS. 2012; 129(2):519-522.

Mustapha, N.; Mokdad-Bzéouich, I.; Maatouk, M.; Ghedira, K.; Hennebelle, T.; Chekir-Ghedira, L. **Antitumoral, antioxidant, and antimelanogenesis potencies of Hawthorn, a potential natural agent in the treatment of melanoma.** Melanoma Research. 2016; 26(3):211-22.

Nakagawa, O.; Arnold, M.; Nakagawa, M.; Hamada, H.; Shelton, J. M.; Kusano, H.; Harris, T. M.; Childs, G.; Campbell, K. P.; Richardson, J. A.; Nishino, I.; Olson, E. N. **Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2.** Genes & Development. 2005; 19(17): 2066-77.

Naro, C.; Sette, C. **Phosphorylation-mediated regulation of alternative splicing in cancer.** International Journal of Cell Biology. 2013; 15p.

Nikolakaki, E.; Kohen, R.; Hartmann, A.M.; Stamm, S.; Georgatsou, E.; Giannakouros, T. **Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B.** The Journal of Biological Chemistry. 2001; 276(43): 40175-82.

Nowak, D. G.; Amin, E. M.; Rennel, E. S.; Hoareau-Aveilla, C.; Gammons, M.; Damodoran, G.; Hagiwara, M.; Harper, S. J.; Woolard, J.; Ladomery, M. R.; Bates, D. O. **Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis.** The Journal of Biological Chemistry. 2010; 285: 5532–5540.

PAHO - Pan American Health Organization. **Cancer in the region of the Americas.** Disponível em: <<http://www.paho.org/hq/>>. Acesso em: 22 de jun. 2017.

Pappalardo, F.; Russo, G.; Candido, S.; Pennisi, M.; Cavalieri, S.; Motta, S.; McCubrey, J. A.; Nicoletti, F.; Libra, M. **Computational Modeling of PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways in Melanoma Cancer.** Plos One. 2016.

Picardo, M.; Maresca, V.; Eibenschutz, L.; De Bernardo, C.; Rinaldi, R.; Grammatico, P. **Correlation between antioxidants and phototypes in melanocytes cultures. A possible link of physiologic and pathologic relevance.** J Invest Dermatol. 1999; 113(3).

Penthala, N. R.; Ketkar, A.; Sekhar, K. R.; Freeman, M. L.; Eoff, R. L.; Balusu, R.; Crooks, P. A. **1-Benzyl-2-methyl-3-indolylmethylene barbituric acid derivatives: anti-cancer agents that target nucleophosmin 1 (NPM1).** Bioorg Med Chem. 2015; 23(22):7226–7233.

Shenenberger, D. W. **Cutaneous Malignant Melanoma: A Primary Care Perspective.** American Family Physician. 2012. 85(2): 161-8.

Silva, C. F. N.; Melo, G. P.; Bernardes, S. S.; Cecchini, A. A. **Experimental models of *in vivo* murine melanoma.** Biosaúde. 2013; 15(2).

- Siqueira, R. P.; Barbosa, E. A. A.; Polêto, M. D.; Righetto, G. L.; Seraphim, T. V.; Salgado, R. L.; Ferreira, J. G.; Barros, M. V. A.; Oliveira, L. L.; Laranjeira, A. B. A.; Almeida, M. R.; Júnior, A. S.; Fietto, J. L. R.; Kobarg, J.; Oliveira, E. B.; Teixeira, R. R.; Borges, J. C.; Yunes, J. A.; Bressan, G. C. **Potential Antileukemia Effect and Structural Analyses of SRPK Inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl) Isonicotinamide (SRPIN340)**. Plos One. 2015.
- Sosa, V.; Moliné, T.; Somoza, R.; Paciucci, R.; Kondoh, H.; Lleonart, M. E. **Oxidative stress and cancer: an overview**. Ageing Research Reviews. 2013; 12(1):376-90.
- Tanaka, K.; Tomita, H.; Hisamatsu, K.; Hatano, Y.; Yoshida, K.; Hara, A. **Acute Liver Failure Associated with Diffuse Hepatic Infiltration of Malignant Melanoma of Unknown Primary Origin**. Internal Medicine. 2015; 54:1361-1364.
- Teiti, I.; Florie, B.; Pich, C.; Gence, R.; Lajoie-Mazenc, I.; Rochaix, P.; Favre, G.; Tilkin-Mariamé, A. ***In vivo* effects in melanoma of ROCK inhibition-induced FasL overexpression**. Frontiers in Oncology. 2015; 5(1561).
- Thiery, J. P.; Acloque, H.; Huang, R. Y. J.; Nieto, M. A. **Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease**. Cell. 2009; 139.
- Thorsen, F.; Fite, B.; Mahakian, L. M.; Seo, J. W.; Qin, S.; Harrison, V.; Johnson, S.; Ingham, E.; Caskey, C.; Sundstrom, T.; Meade, T. J.; Harter, P. N.; Skaftnesmo, K. O.; Ferrara, K. W. **Multimodal imaging enables early detection and characterization of changes in tumor permeability of brain metastases**. Journal of Controlled Release. 2013; 172(3): 812–822.
- Turner, C. E. **Paxillin and focal adhesion signalling**. Nature Cell Biology. 2000; 2: E231-E236.
- Wang, Z.; Wang, D.; Liu, L.; Guo, D.; Yu, B.; Zhang, B.; Han, B.; Sun, X.; Zheng, Q. **Alteronol inhibits the invasion and metastasis of B16F10 and B16F1 melanoma cells *in vitro* and *in vivo***. Life Sciences. 2014; 98:31-38.
- Wang, H. Y.; Lin, W.; Dyck, J. A.; Yeakley, J. M.; Songvang, Z.; Cantley, L. C.; Fu, X. **SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells**. The Journal of Cell Biology. 1998; 140(4):737-50.
- Ward, A. J.; Cooper, T. A. **The Pathobiology of Splicing**. J Pathol. 2010; 220(2): 152–163.
- Wood, M. J. A.; Gait, M. J.; Yin, H. **RNA-targeted splice-correction therapy for neuromuscular disease**. Brain – A Journal of Neurology. 2010; 133: 957–972.
- Wu, Q.; Chang, Y.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Tian, T.; Feng, G.; Zhou, S.; Zheng, Q.; Han, F.; Huang, F. **SRPK1 Dissimilarly Impacts on the Growth, Metastasis, Chemosensitivity and Angiogenesis of Glioma in Normoxic and Hypoxic Conditions**. Journal of Cancer. 2013; 4: 727–735.

Yamaura, M.; Mitsushita, J.; Furuta, S.; Kiniwa, Y.; Ashida, A.; Goto, Y.; Shang, W. H.; Kubodera, M.; Kato, M.; Takata, M.; Saida, T.; Kamata, T. **NADPH Oxidase 4 Contributes to Transformation Phenotype of Melanoma Cells by Regulating G2-M Cell Cycle Progression.** *Cancer Res.* 2009; 69(6):2647-2654.

Xie, J.; Yun, J.; Yang, Y.; Hua, F.; Zhang, X.; Lin, H.; Lv, X.; Li, K.; Zhang, P.; Hu, Z. **A novel ECG analog 4-(S)-(2,4,6-trimethylthiobenzyl)-epigallocatechin gallate selectively induces apoptosis of B16-F10 melanoma via activation of autophagy and ROS.** *Sci. Rep.* 2017; 7:42194.

Zahler, A. M.; Lane, W. S.; Stolk, J. A.; Roth, M. B. **SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors.** *Genes & Development.* 1992; 6: 837-847.

Zheng, Y.; Fu, X. D.; Ou, J. H. **Suppression of hepatitis B virus replication by SRPK1 and SRPK2 via a pathway independent of the phosphorylation of the viral core protein.** *Virology.* 2005; 342(1): 150-8.

Zhong, X. Y.; Ding, J. H.; Adams, J. A.; Ghosh, G.; Fu, X. D. **Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones.** *Genes & Development.* 2009; 23: 482–495.

Zhou, Z.; Fu, X. D. **Regulation of Splicing by SR proteins and SR Protein-Specific Kinases.** *Chromosoma.* 2013; 122(3): 191–207.

Zhou, Z.; Qiu, J.; Liu, W.; Zhou, Y.; Plocinik, R. M.; Li, H.; Hu, Q.; Ghosh, G.; Adams, J. A.; Rosenfeld, M. G.; Fu, X. D. **The AKT-SRPK-SR Axis constitutes a major pathway in transducing EFG signaling to regulate alternative splicing in the nucleus.** *Molecular Cell.* 2012; 47: 422–433.

### **PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO SUBCUTÂNEO**

#### **RESUMO**

Melanoma é um câncer agressivo, altamente metastático e letal. Devido à baixa eficácia terapêutica dos tratamentos atuais, estudos usando modelos animais são críticos para o desenvolvimento de novas drogas. Nesse contexto, um dos mais importantes modelos animais para o estudo do melanoma é o modelo de tumor subcutâneo, o qual utiliza células de melanoma murino B16-F10 inoculadas no dorso de camundongos C57BL/6. A linhagem de melanócito B16-F10 é isolada desses camundongos, tornando esse modelo animal interessante para o estudo do melanoma. Entretanto, na literatura não existe um padrão estabelecido da concentração celular ótima para a indução do tumor subcutâneo, fazendo-se necessário, portanto, a padronização dessa concentração celular para experimentos futuros. Essa padronização auxiliará na formação de uma massa tumoral que não debilite nem mate os animais rapidamente e que tenha um tamanho ótimo, o qual permitirá o posterior tratamento com compostos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi padronizar a concentração celular ótima para a formação de tumor subcutâneo de melanoma murino. Para isso, foram utilizados 52 camundongos machos C57BL/6 divididos em quatro grupos experimentais (n=13/grupo), de acordo com as seguintes concentrações celulares:  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  células B16-F10, além do grupo controle, o qual foi inoculado apenas com 200  $\mu$ L de PBS. Os animais foram divididos em dois subgrupos dentro de cada grupo, sendo o primeiro subgrupo (n=6) eutanasiado quando o primeiro animal chegou ao volume tumoral de 3000 mm<sup>3</sup> e o segundo subgrupo não foi eutanasiado, pois foi analisado quanto ao tempo de sobrevivência. O volume tumoral e a massa do animal foram mensurados a cada dois dias. Os resultados mostraram que os animais inoculados com  $4 \times 10^5$  células foram os primeiros eutanasiados, com 23 dias após a inoculação; os animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células foram os próximos, com 30 dias após a inoculação; e os animais inoculados com  $2 \times 10^5$  células foram os últimos, com 34 dias após a injeção celular. Em relação ao aparecimento e ao tempo de desenvolvimento do tumor, a indução usando  $2 \times 10^5$  células promoveu melhor desenvolvimento do tumor subcutâneo em termos de menor agressividade dos tumores e maior longevidade dos animais, permitindo

com que os animais vivessem por mais tempo. Além disso, a média da massa tumoral desses animais encontrou-se entre a média dos valores obtidos pelos outros grupos. O percentual de sobrevivência também se mostrou entre as médias observadas para os outros grupos. Apesar da massa absoluta do fígado dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  células, da massa relativa do fígado dos animais inoculados com  $2 \times 10^5$  células e da massa absoluta do baço dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  mostrarem-se maiores, as análises histológicas não diagnosticaram alterações morfológicas nesses órgãos. Apenas o baço dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células apresentou pontos escuros em grande parte do campo histológico. Portanto, conclui-se que a melhor concentração celular utilizada para a indução de tumor subcutâneo foi a de  $2 \times 10^5$  células.

## 1. INTRODUÇÃO

Melanoma é o mais severo tipo de câncer de pele e tem altas taxas de mortalidade, contabilizando 75% de todas as mortes por câncer de pele no mundo (Shenenberger, 2012). Quando o câncer é diagnosticado em seu estágio precoce, o prognóstico pode ser considerado bom. Entretanto, tumores metastáticos são muito comuns nos estágios tardios, atingindo órgãos-alvo tais como pulmão e fígado, e os resultados terapêuticos quase nunca apresentam sucesso nessa etapa. Além disso, as terapias atuais apresentam inúmeros efeitos colaterais e efetividade limitada. Então, novos estudos são necessários de forma a entender melhor o comportamento biológico desse câncer, especialmente estudos relacionados a novas drogas e terapias. Nesse contexto, os modelos animais têm sido usados em estudos focados no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do melanoma, uma vez que estudos envolvendo humanos são muito limitados por restrições éticas e técnicas (Silva et al., 2013; Becker et al., 2010).

Os modelos animais mais usados para o estudo do melanoma *in vivo* são: o modelo de xenoenxerto, no qual o enxerto de células de melanoma humano é transplantado em animais imunodeficientes; o modelo singênico, o qual abrange a inoculação de células de melanoma na mesma espécie; e o modelo geneticamente modificado no qual a expressão de genes envolvidos no processo carcinogênico é modificada (Kuzu et al., 2015). Dentre esses, o modelo singênico tem sido bem descrito, pois permite avaliar a resposta imune e sua relação com o câncer (Klarquist e Janssen, 2012). Um exemplo desse modelo é a utilização de células B16-F10 inoculadas no dorso de camundongos C57BL/6. Essa linhagem celular de melanócitos transformados foi isolada de camundongos C57BL/6 e é considerada muito metastática. Por essa razão, essa espécie tem sido um bom modelo para estudar tumores subcutâneos e metástase. Diversos modelos animais utilizam células B16-F10 em camundongos C57BL/6, diferindo entre si devido às diversas formas em que essas células são inoculadas (Overwijk and Restifo, 2001). Um modelo animal bastante estudado é o que utiliza células B16-F10 inoculadas via veia caudal, de modo a gerar nódulos pulmonares e permitir o posterior tratamento dos animais com o composto de interesse (Timmons et al., 2016).

A indução de tumor subcutâneo tem sido outro modelo largamente utilizado para avaliar drogas com potencial terapêutico, considerando que o surgimento espontâneo de melanoma é raro em animais de laboratório (Gheorgheosu et al., 2011). A fim de induzir a formação do tumor, a dose celular típica utilizada é de  $1 \times 10^5$  por camundongo, o que

corresponde a 1,5 a 2 vezes a dose mínima tumorigênica em camundongos C57BL/6 normais (Overwijk and Restifo, 2001). Entretanto, a dose ótima celular ainda não foi estabelecida para nosso grupo de pesquisa e uma grande variedade da concentração celular utilizada pode ser encontrada na literatura (Silva et al., 2013; Azevedo et al., 2014; Teiti et al., 2015; Mustapha et al, 2016). Mustapha et al. (2016) usaram  $2 \times 10^6$  células, concentração alta se comparada com as  $3 \times 10^5$  células utilizadas por Teiti et al. (2015). Portanto, objetivou-se padronizar a concentração celular ótima para a formação do tumor subcutâneo de melanoma murino em camundongos machos C57BL/6, baseado no tempo de surgimento do tumor e de seu desenvolvimento, para ser utilizada em nossos próximos experimentos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Linhagem celular e cultura**

Células de linhagem tumorigênica do tipo melanoma murino (B16-F10) foram cultivadas no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos (LBCB) da UFV. Todo o procedimento de cultivo foi realizado em condições assépticas, utilizando-se capela de fluxo laminar e material esterilizado e descartável. As culturas celulares foram mantidas em meio RPMI 1640, pH 7,4 (Gibco, Invitrogen, CA, USA) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (10% SFB), penicilina (1%), estreptomicina (1%) a 37 °C, sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. Antes de cada experimento, as células foram removidas das garrafas de cultivo, centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI 1640, sendo suplementadas com SFB e contadas em câmara de Neubauer.

### **2.2. Animais e comitê de ética**

Camundongos C57BL/6 machos (n = 52, 7-8 semanas), oriundos do Biotério Central da UFV, foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Geral (UFV) alojados em gaiolas (30 cm x 20 cm x 13 cm) e em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar (60-70%) e luminosidade (12 - 12h claro/escuro). Os animais receberam comida e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais seguiram as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto submetido e

aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA número de protocolo 41/2016).

### **2.3. Grupos experimentais**

Para formação de massa tumoral subcutânea, suspensões de células nas quantidades de  $1 \times 10^5$  células,  $2 \times 10^5$  células e  $4 \times 10^5$  células foram preparadas em solução salina esterilizadas, sendo que dessas suspensões 200  $\mu$ L foram inoculados, por via subcutânea, no dorso de 39 camundongos. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=13/grupo). Animais de três grupos receberam as diferentes quantidades de células e um quarto grupo foi necessário, a fim de se fazer um controle onde apenas PBS foi inoculado (n=13). Dentro de cada um dos quatro grupos, os animais foram subdivididos em dois grupos. Animais do primeiro subgrupo (n=6) foram analisados quanto ao surgimento/estabelecimento do tumor e ao tempo de desenvolvimento do mesmo. Esses animais foram eutanasiados quando o primeiro animal atingiu o volume tumoral de 3000 mm<sup>3</sup> (Figueiredo et al., 2015). O segundo subgrupo (n=7) foi analisado quanto ao tempo de sobrevivência dos animais, sem eutanásia programada.

### **2.4. Medição tumoral e pesagem dos animais**

De acordo com a data do aparecimento do tumor, este teve seu tamanho mensurado a cada dois dias utilizando-se paquímetro. O volume tumoral foi calculado utilizando-se a fórmula  $\text{Volume} = V = 0,52 \times D \times d^2$ , onde D e d correspondem ao maior e menor diâmetro do tumor, respectivamente (Figueiredo et al., 2015). A massa do animal também foi aferida a cada dois dias em balança digital.

### **2.5. Eutanásia e análises anátomo-patológicas**

A eutanásia ocorreu após o primeiro animal de cada grupo atingir o volume tumoral de 3000 mm<sup>3</sup>. Os animais foram pesados e sedados utilizando cloridrato de xilazina (10 mg/kg/intraperitoneal) e anestesiados com cloridrato de quetamina em alta dose (150 mg/kg/intraperitoneal). Após abertura da cavidade abdominal, puncionou-se o coração para obtenção do sangue. Este foi centrifugado a 700 x g por 15 min e obtido o soro, o qual foi

armazenado a -20°C. Órgãos como fígado, pulmão, baço, além do tumor, foram removidos e pesados para obtenção das massas absoluta e relativa. As massas relativas foram calculadas utilizando a seguinte fórmula:  $\text{Massa relativa (g/100g)} = \text{Massa do órgão (g)} \times 100 / \text{Massa corporal final do animal (g)}$ .

Posteriormente, os órgãos foram imersos em solução fixadora Karnovsky (glutaraldeído a 4% e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,2 M/pH 7,3) por 24 h. Neste período, os órgãos foram analisados quanto à ocorrência ou não de metástase (pontos escuros) com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Olympus Japan SZ40).

## **2.6. Análises histopatológicas**

Após fixados, fragmentos de fígado, pulmão e baço foram desidratados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90% e álcool absoluto) e processados para inclusão em glicol metacrilato (Leica, Historesin®). Cortes histológicos semi seriados de 3 µm de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo (Leica, RM225) com navalhas de vidro descartável. As lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), para avaliação microscópica, com posterior montagem usando Entellan® (Merck). As lâminas foram analisadas nas objetivas de 10X, 20X e 40X e as imagens foram capturadas na objetiva de 20X usando microscópio de luz (Olympus BX-50®, Tóquio, Japão) conectada a uma câmera digital.

## **2.7. Volume de líquido no fígado e no baço**

O volume de líquido de água por unidade de massa de tecido hepático ou do baço (mL/g) foi calculado a partir da subtração da massa fresca (100 mg de fragmento do órgão fixado em Karnovsky) e a massa seca do fragmento (massa úmida - massa seca), sendo a massa seca obtida após secagem do fragmento em estufa 70°C até atingir massa seca constante (Novaes et al., 2012).

## **2.8. Análise estatística**

Os resultados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância

(ANOVA), sendo suas médias comparadas pelo teste de Student Newman Kells a 5% de significância. Já os resultados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis, sendo suas médias comparadas pelo teste de Dunn ( $P = 5\%$ ). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As análises de sobrevivência foram feitas pelo método de Kaplan-Meier, a 5% de significância.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Volume tumoral e sobrevivência

Os tumores dos animais inoculados com  $4 \times 10^5$  células B16-F10 estabeleceram-se em todos os animais do grupo oito dias após a inoculação. Nos grupos dos animais inoculados com  $2 \times 10^5$  células os tumores levaram 14 dias para se estabelecerem em todos os animais. Já os tumores dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células estabeleceram-se em todos os animais com 16 dias após a inoculação das células. Os animais inoculados com  $4 \times 10^5$  células foram eutanasiados com 23 dias após a injeção celular, seguidos por animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células, com 30 dias após a inoculação. Os últimos animais a serem eutanasiados foram os que receberam  $2 \times 10^5$  células, eutanasiados 34 dias após a inoculação. Animais que receberam  $2 \times 10^5$  células apresentaram um tumor menos agressivo e que permaneceu por mais tempo, levando mais dias para que o primeiro animal atingisse o volume tumoral de  $3000 \text{ mm}^3$  (Figura 1A). Não houve diferença estatística entre os grupos para a massa tumoral absoluta. Entretanto, a média dessa massa tumoral dos animais inoculados com  $2 \times 10^5$  células encontra-se entre a média dos valores obtidos dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  células (Figura 1B). Além disso, o grupo com  $2 \times 10^5$  células apresentou percentual de sobrevivência entre as médias observadas para animais inoculados com  $1 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  células (Figura 1C).

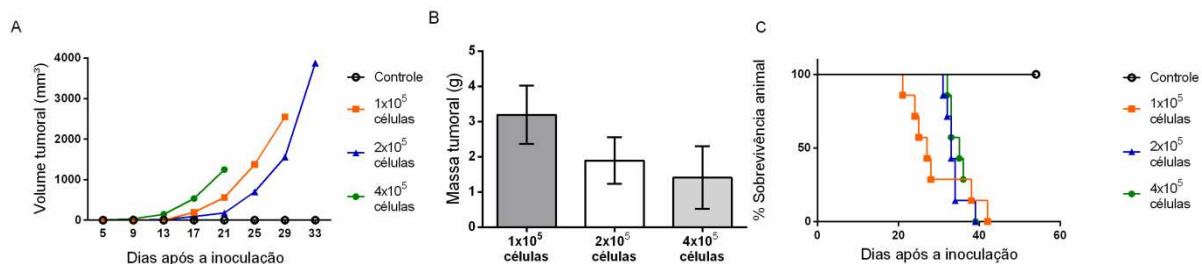


Figura 1 - Volume tumoral, massa tumoral e porcentagem de sobrevivência dos animais inoculados com diferentes concentrações celulares. A e B, teste Student Newman Kells ou Dunn; C, método de Kaplan-Meier.

### 3.2. Massa corporal e massa absoluta e relativa dos órgãos e volume de líquido em fígado e baço

Os parâmetros biométricos e o volume de líquido do fígado e do baço estão dispostos na tabela 1. O fígado dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  células apresentou maior massa absoluta em relação ao grupo controle e ao grupo inoculado com  $4 \times 10^5$  células. A massa relativa do fígado foi maior nos animais inoculados com  $2 \times 10^5$  células. O baço dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células apresentou maior massa absoluta comparado com os outros grupos. Os demais parâmetros não foram diferentes significativamente entre os grupos.

Tabela 1. Massa corporal (MC) inicial, MC final e peso absoluto e relativo dos órgãos e do tumor de camundongos Black C57BL/6 inoculados com diferentes quantidades de células B16-F10.

	Controle	$1 \times 10^5$ células	$2 \times 10^5$ células	$4 \times 10^5$ células
MC Inicial (g)	$19,72 \pm 1,06^a$	$20 \pm 0,41^a$	$21,09 \pm 0,75^a$	$20,41 \pm 0,63^a$
MC Final (g)	$21,13 \pm 1,06^a$	$23,63 \pm 0,94^a$	$23,96 \pm 1,24^a$	$23,17 \pm 0,65^a$
Ganho de peso (g)	$1,41 \pm 0,12^a$	$3,62 \pm 0,62^a$	$2,87 \pm 1,26^a$	$2,76 \pm 0,55^a$
Pulmão (g)	$0,18 \pm 0,01^a$	$0,19 \pm 0,01^a$	$0,23 \pm 0,04^a$	$0,18 \pm 0,01^a$
Pulmão (g/100g)	$0,84 \pm 0,04^a$	$0,78 \pm 0,04^a$	$0,96 \pm 0,17^a$	$0,76 \pm 0,04^a$
Fígado (g)	$0,98 \pm 0,04^a$	$1,22 \pm 0,06^b$	$1,32 \pm 0,09^b$	$1,11 \pm 0,04^a$
Fígado (g/100g)	$4,63 \pm 0,05^a$	$5,21 \pm 0,38^a$	$5,49 \pm 0,22^b$	$4,80 \pm 0,13^a$
Baço (g)	$0,06 \pm 0,01^a$	$0,15 \pm 0,03^b$	$0,11 \pm 0,03^a$	$0,09 \pm 0,01^a$
Baço (g/100g)	$0,27 \pm 0,02^a$	$0,65 \pm 0,15^a$	$0,45 \pm 0,1^a$	$0,37 \pm 0,05^a$
Líquido no Fígado (mL/g)	$0,62 \pm 0,01^a$	$0,65 \pm 0,02^a$	$0,64 \pm 0,01^a$	$0,62 \pm 0,01^a$
Líquido no Baço (mL/g)	$0,66 \pm 0,03^a$	$0,68 \pm 0,01^a$	$0,71 \pm 0,01^a$	$0,65 \pm 0,01^a$

Valores expressos em média  $\pm$  EPM. <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste Student Newman Kells ou Dunn.

### 3.3. Análises anatômico e histopatológicas

Não foram observadas metástases visíveis macro e microscopicamente (Figura 2). O fígado dos animais controle e animais inoculados com as três concentrações celulares manteve sua arquitetura tecidual normal, composta por cordões de hepatócitos divididos em lóbulos e entremeados por capilares sinusóides, com a veia centro lobular preservada. Os

alvéolos pulmonares mantiveram-se delgados, com o epitélio de revestimento simples pavimentoso presente. Já o baço apresentou arquitetura tecidual normal preservada, com polpa branca e polpa vermelha. No entanto, o baço de animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células apresentou pontos escuros em grande parte do campo histológico.

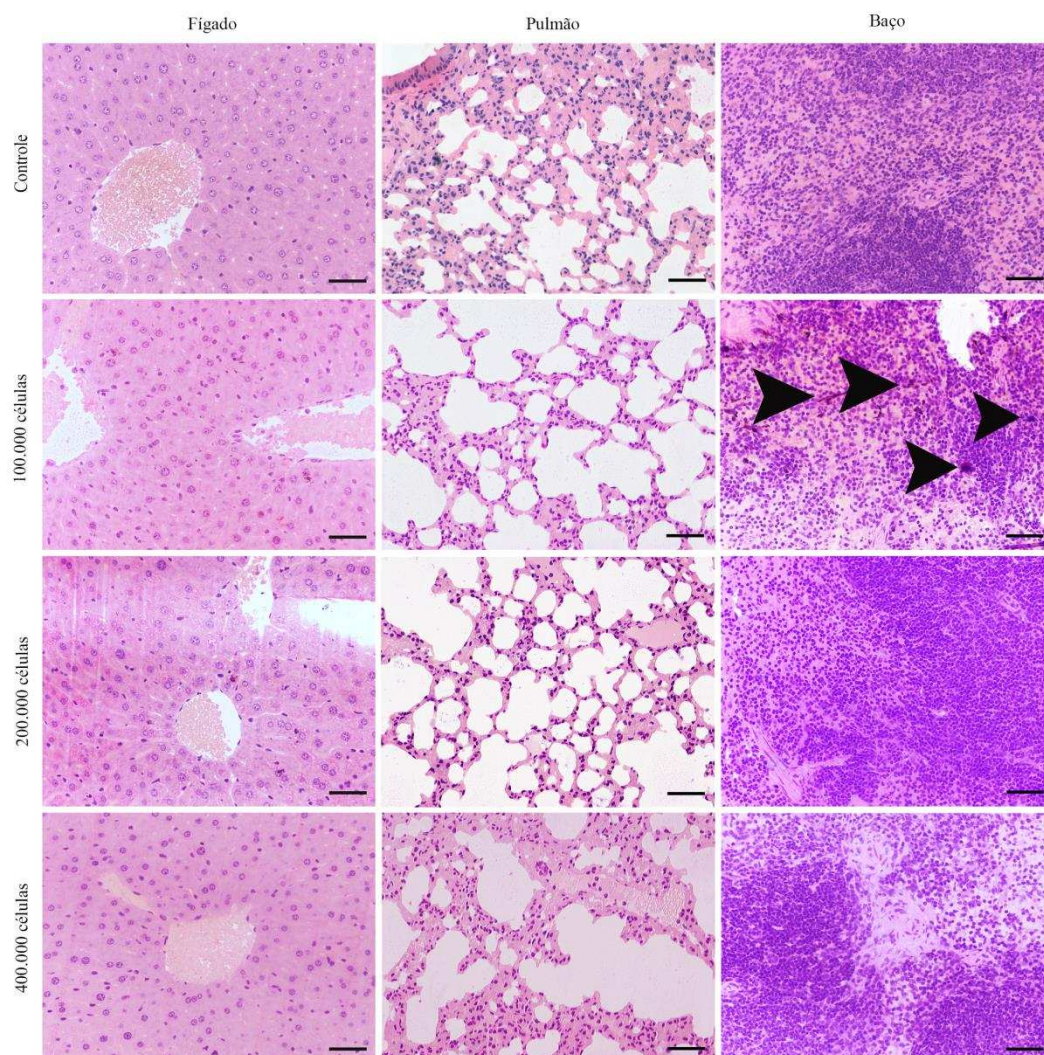


Figura 2 - Fotomicrografias representativas da histologia de fígado, pulmão e baço de animais controle e animais inoculados com  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  células tumorais. Coloração: hematoxilina-eosina; barra: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4. DISCUSSÃO

Estudos *in vitro* são importantes para o *screening* inicial de fármacos e para conhecer a ação de compostos em potencial. Porém, estão longe de reproduzir a complexidade dos organismos como um todo. Para isso, estudos *in vivo* que envolvem modelos animais são

relevantes para a melhor compreensão da atuação de fármacos na biologia de doenças, uma vez que esses modelos compartilham similaridades com o humano. O modelo pré-clínico mais utilizado para o estudo do melanoma é o modelo murino (Kuzu et al., 2015). Nesse contexto, a inoculação de células B16-F10 em camundongos C57BL/6 tem sido largamente utilizada para o estudo do melanoma e de compostos antitumorais. Visto que diferentes quantidades de células B16-F10 são utilizadas em experimentos descritos na literatura (Silva et al., 2013; Azevedo et al., 2014; Teiti et al., 2015), esse estudo buscou padronizar a quantidade celular para a formação de tumor subcutâneo. Tal quantidade deverá permitir a sobrevivência animal por mais tempo sem debilitar o mesmo.

Os resultados obtidos mostraram que o fígado dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  células apresentou aumento da massa absoluta. Como estes foram os últimos grupos a serem eutanasiados, o aumento na massa absoluta do fígado poderia estar correlacionado com a presença de metástase. Nakamura et al. (1999) perceberam o aumento da massa do fígado de camundongos inoculados com células de Carcinoma Pulmonar de Lewis e encontraram metástase no fígado ao analisar a histopatologia desse órgão. Porém, a concentração celular inoculada nos animais desse estudo foi de  $2 \times 10^6$  células, ou seja, 10 a 20 vezes maior que as concentrações celulares utilizadas no presente estudo, o que explica tal ocorrência. Gebremeskel et al. (2015) também perceberam aumento da massa absoluta do fígado, ao inocular  $2.5 \times 10^5$  células de B16-F10 em camundongos C57BL/6, porém injetadas pela rota intra-esplênica. Esse aumento da massa absoluta foi em decorrência de metástases hepáticas, algo que já era esperado, pois o uso dessa rota de inoculação celular induz esse tipo de metástase (Coradini et al., 2004). No presente estudo, as análises histológicas não mostraram nódulos tumorais no fígado e nem alterações na arquitetura tecidual. O aumento da massa poderia estar relacionado ao acúmulo de líquido no fígado. Porém, o volume de líquido não mostrou diferença significativa para esse órgão entre os grupos experimentais e o controle.

A massa relativa do fígado dos animais inoculados com  $2 \times 10^5$  células também foi maior que a dos outros grupos. A massa relativa pode ser utilizada como medida de toxicidade de compostos (Grewal et al., 2010), como indicativo de uma boa ou má dieta (Sugino et al., 2008), ou pode sugerir a presença de metástase em órgãos (Nakamura et al., 1999). No presente trabalho, como dito acima, o fígado dos animais não apresentou metástase. Nakamura et al. (1999) também mostraram aumento da massa relativa do fígado de camundongos C57BL/6 inoculados com células de Carcinoma Pulmonar de Lewis em relação aos animais sem células inoculadas, sendo esse aumento da massa relacionado à presença de

metástase no fígado. Embora os animais inoculados com  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  células foram os que permaneceram por mais tempo vivos, esse tempo não foi suficiente para gerar metástase em sítios distantes. Além disso, os animais foram eutanasiados quando o primeiro animal do grupo atingiu volume tumoral de  $3000 \text{ mm}^3$ , de forma a impedir o sofrimento do animal. Portanto, acredita-se que, caso os animais não fossem eutanasiados após atingirem esse volume tumoral, metástases surgiriam em outros órgãos.

O baço de animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células apresentou aumento de massa em relação ao baço dos animais dos outros grupos. Igualmente ao fígado, o volume de líquido no baço desses animais não apresentou diferença significativa, descartando a hipótese do aumento da massa absoluta ser por causa da retenção hídrica no órgão. Além disso, o baço apresentou pontos escuros que possivelmente são depósitos de hemossiderina, uma vez que no baço ocorre destruição de hemácias. Esse achado foi encontrado na maioria dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células, em um animal do grupo controle, em um animal inoculado com  $2 \times 10^5$  células e em um animal inoculado com  $4 \times 10^5$  células. Devido à presença desses pontos escuros em um animal do grupo controle, a hipótese de serem nódulos de melanoma foi descartada. Tal presença pode ser correlacionada com a fagocitose de eritrócitos após processos hemorrágicos decorrentes da presença do tumor, nos animais inoculados com células tumorais, ou com a fagocitose de hemácias senescentes, no caso dos animais controle (Marques et al., 2004; Wang et al., 2010). Kim et al. (2014) verificaram aumento do estoque de ferro tecidual no baço e no fígado de animais inoculados com células de Carcinoma Pulmonar de Lewis, sugerindo a relação entre câncer e acúmulo de ferro no tecido. Esse acúmulo de ferro tecidual ocasionou anemia devido à restrição de ferro nos animais estudados por Kim et al. (2014). Portanto, o aumento da massa absoluta do baço dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  pode ser relacionado ao acúmulo de ferro tecidual.

Nas concentrações e tempo testados, o tumor não foi capaz de gerar metástases em órgãos distantes, como fígado, baço e pulmão. O aumento da massa do fígado e do baço, mesmo na ausência de metástase, pode estar relacionado à formação de um nicho pré-metastático formado no órgão-alvo a partir da influência do tumor primário. Células do tumor primário secretam fatores que atraem células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea, as quais irão interagir com o estroma e a matriz extracelular do sítio secundário, propiciando um ambiente adequado para as células tumorais sofrerem metástase (Kaplan et al., 2005; Sceneay et al., 2013).

A análise do volume tumoral ao longo dos dias juntamente com a avaliação do tempo de estabelecimento do tumor indicou que a inoculação com  $2 \times 10^5$  células promoveu um crescimento tumoral menos agressivo que a as outras concentrações celulares utilizadas. Além disso, essa concentração produziu tumores que demoraram mais tempo para atingirem o volume tumoral de  $3000 \text{ mm}^3$ . Isso é interessante para estudos que avaliam o efeito de novas drogas para a inibição tumoral e antimetastática, uma vez que levando mais tempo para atingirem seu volume máximo permitido, maior será o tempo para formar metástases em órgãos distantes. Esse foi o último grupo a ser eutanasiado porque os tumores levaram mais tempo para atingirem o volume de  $3000 \text{ mm}^3$ . De fato, os tumores levaram mais tempo para estabelecer nos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células, mas eles rapidamente atingiram o volume de  $3000 \text{ mm}^3$ . Em contraste, os tumores estabeleceram-se em oito dias após a inoculação celular nos animais que receberam  $4 \times 10^5$  células e eles rapidamente atingiram o volume tumoral de  $3000 \text{ mm}^3$ , sendo os primeiros animais a serem eutanasiados. A ausência de alterações nos órgãos dos animais inoculados com essa concentração celular está refletida no tempo em que o tumor desses animais demorou a chegar em  $3000 \text{ mm}^3$ . Ou seja, como esse foi o primeiro grupo a ser eutanasiado por chegarem rapidamente ao volume tumoral de  $3000 \text{ mm}^3$ , o tempo de duração do tumor foi curto para gerar metástases em órgãos distantes. Logo, os animais inoculados com  $2 \times 10^5$  células permitiram uma janela de tratamento maior, o que torna essa concentração um bom modelo para estudar melanoma e compostos antitumorais.

Overwijk and Restifo (2001) mencionaram que  $1 \times 10^5$  células é a concentração típica usada para inoculação de melanoma subcutâneo em camundongos para o estudo do melanoma. Entretanto, essa concentração formou um tumor muito agressivo, o qual rapidamente atingiu o volume tumoral de  $3000 \text{ mm}^3$  e apresentou baixo percentual de sobrevivência animal no presente estudo. Silva et al. (2013) citaram que a concentração típica celular utilizada é  $2 \times 10^5$  células, a qual corrobora a concentração ótima observada no presente trabalho para tumores subcutâneos.

## **5. CONCLUSÕES**

Pode-se concluir que a concentração de  $2 \times 10^5$  células de B16-F10 produziu tumores em poucos dias e induziu um crescimento tumoral adequado para ser utilizado em estudos envolvendo modelos animais e possíveis tratamentos para o melanoma. Essa concentração

celular possibilitou a permanência do tumor por mais tempo no animal e apresentou uma interessante taxa de sobrevivência, embora não tenha permitido a formação de metástase em órgãos distantes, no tempo e concentração testados.

## 6. REFERÊNCIAS

Azevedo, R. A.; Figueiredo, C. R.; Ferreira, A. K.; Matsuo, A. L.; Massaoka, M. H.; Girola, N.; Auada, A. V. V.; Farias, C. F.; Pasqualoto, K. F. M.; Rodrigues, C. P.; Barbuto, J. A.; Levy, D.; Bydlowski, S. P.; Sá-Junior, P. L.; Travassos, L. R.; Lebrun, I. **Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor activity *in vivo***. *Peptides*. 2015; 68:113–119.

Becker, J. C.; Houben, R.; Schrama, D.; Voigt, H.; Ugurel, S.; Reisfeld, R. A. **Mouse models for melanoma: a personal perspective**. *Exp. Dermatol.* 2010; 19:157–164.

Coradini, D.; Zorzet, S.; Rossin, R.; Scarlata, I.; Pellizzaro, C.; Turrin, C.; Bello, M.; Cantoni, S.; Speranza, A.; Sava, G.; Mazzi, U.; Perbellini, A. **Inhibition of Hepatocellular Carcinomas *in vitro* and Hepatic Metastases *in vivo* in Mice by the Histone Deacetylase Inhibitor HA-But**. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:4822–4830.

Figueiredo, C. R.; Matsuo, A. L.; Azevedo, R. A.; Massaoka, M. H.; Girola, N.; Polonelli, L.; Travassos, R. L. **A novel microtubule destabilizing complementarity-determining region C36L1 peptide displays antitumor activity against melanoma *in vitro* and *in vivo***. *Sci. Rep.* 2015; 5:14310.

Gebremeskel, S.; Vatte, T. L.; Liwski, R. S.; Johnston, B.; Bezuhyly, M. **The reversible P2Y12 inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer**. *Int. J. Cancer.* 2015; 136:234–240.

Gheorgheosu, D.; Dehelean, C.; Cristea, M.; Muntean, D. **Development of the B16 murine melanoma model**. *Annals of RSCB.* 2011; 16(2).

Grewal, K. K.; Sandhu, G. S.; Kaur, R.; Brar, R. S.; Sandhu, H. S. **Toxic Impacts of Cypermethrin on Behavior and Histology of Certain Tissues of Albino Rats**. *Toxicol. Int.* 2010; 17(2):94-98.

Kaplan, R. N.; Riba, R. D.; Zacharoulis, S.; Bramley, A. H.; Vincent, L.; Costa, C.; MacDonald, D. D.; Jin, D. K.; Shido, K.; Kerns, S. A.; Zhu, Z.; Hicklin, D.; Wu, Y.; Port, J. L.; Altorki, N.; Port, E. R.; Ruggero, D.; Shmelkov, S. V.; Jensen, K. K.; Rafii, S.; Lyden, D. **VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche**. *Nature.* 2005; 438(7069):820–827.

Kim, A.; Rivera, S.; Shprung, D.; Limbrick, D.; Gabayan, V.; Nemeth, E.; Ganz, T. **Mouse Models of Anemia of Cancer**. *PLoS ONE.* 2014; 9(3):e93283.

- Klarquist, J. S.; Janssen, E. M. **Melanoma-infiltrating dendritic cells - Limitations and opportunities of mouse models.** *OncoImmunology*. 2012; 1(9):1584–1593.
- Kuzu, O. F.; Nguyen, F. D.; Noory, M. A.; Sharma, A. **Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research.** *Cancer Growth Metastasis*. 2015; 8(S1):81–94.
- Marques, R. G.; Petroianu, A.; Coelho, J. M. C. O.; Portela, M. C. **Morphology and phagocytic function of regenerated autogenous splenic implant in rats.** *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004; 19(6).
- Mustapha, N.; Mokdad-Bzéouich, I.; Maatouk, M.; Ghedira, K.; Hennebelle, T.; Chekir-Ghedira, L. **Antitumoral, antioxidant, and antimelanogenesis potencies of Hawthorn, a potential natural agent in the treatment of melanoma.** *Melanoma Research*. 2016; 26(3):211-22.
- Nakamura, K.; Yamagushi, Y.; Kagota, S.; Kwon, Y. M. **Inhibitory Effect of Cordyceps sinensis on Spontaneous Liver Metastasis of Lewis Lung Carcinoma and B16 Melanoma Cells in Syngeneic Mice.** *Jpn. J. Pharmacol.* 1999; 79:335-341.
- Novaes, R. D.; Gonçalves, R. V.; Marques, D. C. S.; Cupertino, M. C.; Peluzio, M. C. G.; Leite, J. P. V.; Maldonado, I. R. S. C. **Effect of Bark Extract of Bathysa cuspidata on Hepatic Oxidative Damage and Blood Glucose Kinetics in Rats Exposed to Paraquat.** *Toxicol. Pathol.* 2012; 40:62-70.
- Overwijk, W.W. and Restifo, N.P. **B16 as a Mouse Model for Human Melanoma.** *Curr Protoc Immunol*. 2001.
- Sceneay, J.; Smyth, M. J.; Möller, A. **The pre-metastatic niche: finding common ground.** *Cancer Metastasis Rev.* 2013; 32:449–464.
- Shenenberger, D.W. **Cutaneous Malignant Melanoma: A Primary Care Perspective.** *Am Fam Physician*. 2012; 85(2):161-8.
- Silva, C. F. N.; Melo, G. P.; Bernardes, S. S.; Cecchini, A. A. **Experimental models of *in vivo* murine melanoma.** *Biosaúde*. 2013; 15(2).
- Sugino, H.; Kumagai, N.; Watanabe, S.; Toda, K.; Takeuchi, O.; Tsunematsu, S.; Morinaga, S.; Tsuchimoto, K. **Polaprezinc attenuates liver fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.** *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23:1909–1916.
- Teiti, I.; Florie, B.; Pich, C.; Gence, R.; Lajoie-Mazenc, I.; Rochaix, P.; Favre, G.; Tilkin-Mariamé, A. ***In vivo* effects in melanoma of ROCK inhibition-induced FasL overexpression.** *Frontiers in Oncology*. 2015; 5(1561).
- Timmons, J. J.; Cohessy, S.; Wong, E. T. **Injection of Syngeneic Murine Melanoma Cells to Determine Their Metastatic Potential in the Lungs.** *J. Vis. Exp.* 2016; (111):e54039.
- Wang, Y.; Juan, LV.; Ma, X.; Wang, D.; Ma, H.; Chang, Y.; Nie, G.; Jia, L.; Duan, X.; Liang, X. **Specific Hemosiderin Deposition in Spleen Induced by a Low Dose of Cisplatin:**

**Altered Iron Metabolism and Its Implication as an Acute Hemosiderin Formation Model.** *Curr Drug Metab.* 2010; 11(6):507–515.

## ARTIGO II

---

### EFEITO DA INIBIÇÃO DE *SERINE ARGININE PROTEIN KINASES* (SRPKs) EM MODELO DE MELANOMA MURINO SUBCUTÂNEO

#### RESUMO

Modelos animais são úteis para a avaliação de compostos antitumorais em potencial, uma vez que permitem testar a segurança e eficácia de fármacos. Compostos que agem de forma específica são mais promissores, uma vez que inibem alvos moleculares específicos. Inibidores da maquinaria de *splicing* têm sido descritos por sua atividade antitumoral e antimetastática. Nesse contexto, a atividade antitumoral do SRPIN340 foi comprovada. Esse composto age inibindo, de forma específica, as *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs) 1 e 2. Na busca de novos compostos com melhor atividade antitumoral, criou-se o SRVIC30, análogo do SRPIN340. Como ainda não se tem estudos sobre esse análogo sobre o modelo acima mencionado, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da inibição farmacológica de SRPKs em modelo de melanoma murino subcutâneo. Para isso, 20 camundongos C57BL/6 foram inoculados com células B16-F10 na concentração celular de  $2 \times 10^5$ . Esses animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=5/grupo). Os primeiros dois grupos foram tratados por via tópica, sendo o grupo controle o que recebeu apenas a pomada comercial (Lanette®) e o grupo tratado o que recebeu o SRVIC30 diluído na Lanette®; os outros dois grupos foram tratados por via peritumoral, sendo que o grupo controle recebeu 150 µl de DMSO 1% e o grupo tratado recebeu 150 µl do SRVIC30 diluído em DMSO 1%. O tratamento ocorreu durante 14 dias, totalizando 10 aplicações em cada grupo. O volume tumoral e a massa animal foram mensurados a cada três dias. No 15º dia os animais foram pesados e o sangue e os órgãos foram coletados. Os resultados mostraram que, embora o SRVIC 30 não fosse eficiente em reduzir o volume tumoral, esse composto induziu maior área de morte celular tumoral nos grupos tratados em relação aos grupos controles, sendo esse valor significativo para o grupo em que foi utilizada a via tópica de tratamento. Além disso, observou-se presença de infiltrado inflamatório na pele dos animais tratados com o SRVIC30, por ambas as vias. Esse aumento da morte celular foi confirmado pelo uso do corante *acridine orange*, marcador de apoptose, e por marcações de imunofluorescência *in vitro* e *in vivo* para caspase-3. Marcações para estresse oxidativo (peroxidase) também foram feitas e mostraram

que houve aumento da atividade de enzimas antioxidantes no tumor dos animais tratados com o composto por via tópica. Por fim, embora o peso do fígado dos animais tratados com SRVIC30 por via peritumoral tenha sido menor, não houve dano hepático, o que foi comprovado pelas análises sorológicas de enzimas hepáticas e pela histopatologia. Portanto, pode-se concluir que embora o SRVIC30 não tenha reduzido o tumor subcutâneo, nas concentrações e tempo testados, ocorreram alterações significativas no tumor como morte celular e aumento da atividade de enzimas oxidantes, o que torna esse composto promissor para o tratamento do melanoma.

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos pré-clínicos são úteis e necessários para a avaliação preliminar da possível atividade antitumoral de compostos. Um dos modelos animais largamente utilizado em estudos pré-clínicos é o modelo murino. Esse modelo animal recria características do microambiente tumoral e a complexidade dos processos biológicos, além de permitir a progressão natural do tumor, desde a proliferação em seu sítio primário até a metástase para órgãos distantes. Portanto, estudos com modelos animais auxiliam nas pesquisas clínicas fornecendo dados cruciais para a condução das mesmas, garantindo a rápida entrega de novos tratamentos mais eficazes para pacientes doentes (Kuzu et al., 2015; Becker et al., 2010). Nesse contexto, o uso de células B16-F10 inoculadas no dorso de camundongos C57BL/6 tem sido um modelo bastante utilizado para averiguar a ação de compostos antitumorais em melanoma (Bobek et al., 2010; Kuzu et al., 2015). Esse tipo de câncer apresenta alta taxa de mortalidade, embora represente apenas 3 a 5% de todos os cânceres de pele (Cancer facts & figures, 2013).

Devido à ineficácia dos atuais tratamentos oncológicos e os seus inúmeros efeitos colaterais (American Cancer Society, 2017a,b; Garbe et al., 2008), novos estudos em busca de compostos com maior potencial terapêutico devem ser desenvolvidos. Para isso, os modelos animais são pertinentes e buscam avaliar a eficácia e segurança desses compostos em potencial, antes de se iniciarem os estudos da fase clínica. Esses estudos pré-clínicos também permitem avaliar a toxicidade de compostos (Carvalho et al., 2013), de forma a permitir ou não a próxima fase de estudos. Caso o composto seja tóxico, os estudos não vão para as próximas fases. Os compostos atuais administrados por via sistêmica geralmente são tóxicos, o que diminui a sobrevivência dos pacientes. Portanto, a criação de novas drogas com maior potencial antimetastático e que, ao mesmo tempo, exiba baixa toxicidade, contribuirá para reduzir as altas taxas de mortalidade relacionadas ao melanoma (Kamran e Gude, 2012).

Tratamentos oncológicos que atuam de forma específica, diretamente sobre alvos moleculares, são mais promissores e os pacientes tratados dessa forma adquirem melhores resultados (Grosso et al., 2008). A maquinaria de *splicing* é um alvo molecular bastante estudado. O *splicing* é um processo fisiologicamente normal que ocorre em todas as células. Porém, em diversas doenças, inclusive no câncer, apresenta-se alterado, gerando isoformas tumorais que contribuem para a proliferação, crescimento, sobrevivência e metástase das células cancerosas. A desregulação de fatores que regulam o processo de *splicing* impacta as

diferentes vias relacionadas com a formação e propagação do câncer (Da Silva et al., 2015). Nesse contexto, um dos fatores que possuem sua regulação alterada nos diversos cânceres são os fatores de *splicing* da família SR. Esses fatores são regulados por uma família de proteínas cinases, as *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs), as quais fosforilam sítios específicos desses fatores, alterando a sua atividade na célula. Essas SRPKs possuem sua expressão aumentada em diversos cânceres, inclusive no melanoma (Hayes et al., 2007; Gout et al., 2012; Gammons et al., 2014).

A inibição farmacológica de SRPKs é o objetivo de muitos estudos que visam um tratamento mais efetivo e específico contra o melanoma. Devido à alta expressão de SRPKs nesse câncer, os pesquisadores buscam fármacos com maior potencial antitumoral e que reduzam a expressão gênica dessas SRPKs, para inibir a progressão do tumor. A superexpressão de SRPK1 no melanoma foi associada à modulação de uma isoforma pró-angiogênica do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), favorecendo a angiogênese e o crescimento tumoral. Quando SRPK1 foi inibida por um fármaco, o SRPIN340 (N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide) (Figura 1), sua expressão foi reduzida e, conseqüentemente, diminuiu a formação da isoforma pró-angiogênica de VEGF e o crescimento tumoral (Gammons et al., 2014).

O SRPIN340 age como inibidor específico das SRPK1 e SRPK2, competindo pelo sítio de ligação ao ATP dessas cinases (Fukuhara et al., 2006; Hagiwara et al., 2009) e a sua atividade antitumoral foi descrita contra a leucemia e o melanoma (Siqueira et al., 2015; Gammons et al., 2014). Um análogo desse composto foi utilizado por via tópica em modelo murino de degeneração macular e inibiu significativamente a neovascularização ocular ao inibir VEGF (Morooka et al., 2015). Portanto, análogos do SRPIN340 são promissores como drogas antitumorais. Com o intuito de avaliar outros análogos, o SRVIC30 (Figura 2) foi selecionado dentre 22 novas substâncias análogas ao SRPIN340, pois foi o que apresentou melhores resultados em testes *in vitro* de migração, invasão e adesão celular (Moreira, 2016). O SRVIC30 difere do SRPIN340 pela presença de uma amina secundária entre dois grupos fenil, um grupo nicotinamida e um átomo de bromo em um grupo fenil. Segundo Moreira (2016), as características moleculares de SRVIC30, principalmente a presença de bromo em um grupo fenil, podem estar relacionadas com a capacidade desse composto em intervir em processos celulares como os supracitados. Testes *in vivo* iniciais já foram realizados com o SRVIC30 em camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10 pela veia caudal, não tendo sido tóxico e nem debilitando o animal (Moreira et al., 2016). O modelo animal

utilizado no presente estudo foi o da inoculação de células B16-F10 no dorso de camundongos C57BL/6 e o objetivo foi avaliar o efeito da inibição farmacológica de SRPKs neste modelo de melanoma murino subcutâneo, por meio do inibidor químico SRVIC30, administrado pelas vias tópica e peritumoral.

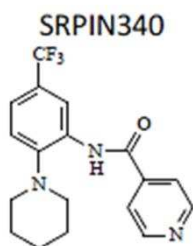


Figura 1 - Estrutura do SRPIN340.

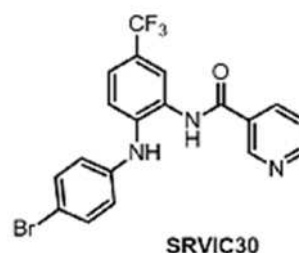


Figura 2 - Estrutura do SRVIC30, análogo do SRPIN340.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Composto

O composto N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide (SRPIN340) foi sintetizado como publicado previamente (Fukuhara et al., 2006; Hagiwara et al., 2009) e modificado para a formação do análogo SRVIC30, fornecido pelo grupo de pesquisa do Prof. Róbson R. Teixeira, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Esse composto foi escolhido com base em resultados anteriores obtidos por Moreira (2016), o qual recebeu o nome de SRPIN340#17 em seu trabalho. Porém, no presente trabalho, esse análogo é mencionado com o nome com o qual foi registrado em patente (SRVIC30).

### 2.2 Pomada

A pomada base utilizada para a mistura do composto foi a Lanette®, conhecida por suas características de auto-emulsão, ideal para a preparação de cremes. A cada 1 grama da pomada, 50 mg do composto foi diluído.

### **2.3 Animais e comitê de ética**

Camundongos C57BL/6 machos (n=20, 7-8 semanas), oriundos do Biotério Central da UFV, foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Geral (UFV) alojados em gaiolas individuais (30 cm x 20 cm x 13 cm) e em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar (60-70%) e luminosidade (12 - 12h claro/escuro). Os animais receberam comida e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais seguiram as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA número de protocolo 41/2016).

### **2.4 Grupos experimentais**

Para formação da massa tumoral subcutânea, 200  $\mu\text{L}$  de suspensão de células B16-F10 com  $2 \times 10^5$  células foram preparados em solução salina esterilizada e inoculados, por via subcutânea, no dorso de 20 camundongos. Conforme os tumores iam aparecendo, os animais foram separados em grupos. O primeiro grupo controle recebeu 40 mg da pomada sem o SRVIC30, por via tópica (n=5), já o segundo grupo controle recebeu 150  $\mu\text{L}$  de DMSO 1% em PBS, por via peritumoral (n=5). O terceiro grupo foi tratado com pomada contendo o SRVIC30, sendo espalhadas 40 mg da pomada no tumor do animal (n=5), já o quarto grupo foi tratado com 150  $\mu\text{L}$  do SRVIC30 diluído em DMSO 1% em PBS, na dose de  $16 \mu\text{M}/\text{mL}^{-1}$  (n=5), por via peritumoral. Os tratamentos foram administrados cinco vezes por semana, no decorrer de 14 dias.

### **2.5 Pesagem e medição tumoral**

Após o aparecimento do tumor, este teve seu tamanho mensurado utilizando-se paquímetro a cada três dias, sendo seu volume calculado utilizando-se a fórmula  $\text{Volume} = V = 0,52 \times D \times d^2$ , onde D e d correspondem ao maior e menor diâmetro do tumor, respectivamente (Figueiredo et al., 2015). A massa do animal também foi aferida a cada três dias em balança digital.

## **2.6 Eutanásia e análises anatomopatológicas**

No 15º dia de experimento, os animais foram pesados, sedados utilizando cloridrato de xilazina (10 mg/kg/intraperitoneal) e anestesiados com cloridrato de quetamina em alta dose (150 mg/kg/intraperitoneal). Após abertura da cavidade abdominal, punccionou-se o coração para obtenção do sangue. Este foi centrifugado a 700 x g por 15 min e obtido o soro, o qual foi armazenado a -20°C. Órgãos como fígado, pulmão, rim, baço e pele, bem como o tumor, foram removidos e suas massas (absoluta e relativa à massa corporal) foram determinados. As massas relativas foram calculadas utilizando a seguinte fórmula: Massa relativa (g/100g) = massa do tumor ou órgão (g) X 100/Massa corporal final do animal (g).

Após serem pesados, um fragmento do tumor, do fígado, do pulmão e da pele foram removidos e fixados por imersão em paraformaldeído 4%, por 24 h. O rim e baço foram removidos e fixados por imersão em Karnovsky (glutaraldeído a 4% e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M/pH 7,3), por 24 h. Por fim, outro fragmento do tumor foi fixado por imersão em paraformaldeído por 2 h e armazenado em PBS 0,1 M, para as análises de imunofluorescência *in vivo*.

Posteriormente, todos os órgãos foram analisados com o auxílio de uma lupa, a fim de verificar a ocorrência ou ausência de metástase. O fígado foi submetido à histologia, por ser órgão-alvo para ocorrência de metástase e da toxicidade de compostos.

## **2.7 Análises sorológicas**

Níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), biomarcadores de dano hepático, foram quantificados no soro dos animais usando kit enzimático comercial da Bioclin®. O equipamento utilizado foi o BS-200 Chemistry Analyzer, da Bioclin®. Os resultados foram expressos em Unidades por litro de soro.

## **2.8 Análises histopatológicas**

### **2.8.1 Fígado**

Após terem sido fixados, os fragmentos do fígado foram desidratados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e

incluídos em parafina. Cortes histológicos semi seriados de 4 µm de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo (Leica, RM225) com navalhas de aço descartáveis. Lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histopatológica geral. As lâminas foram analisadas nas objetivas de 10X, 20X e 40X e as imagens capturadas na objetiva de 20X usando um microscópio de luz (Olympus BX-50 ®, Tóquio, Japão) conectada a uma câmera digital.

### **2.8.2 Tumor e pele**

Após terem sido fixados, os fragmentos do tumor e da pele foram desidratados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e incluídos em parafina. Cortes histológicos semi seriados de 4 µm de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo (Leica, RM225) com navalhas de aço descartáveis. Lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e azul de toluidina para avaliação histopatológica geral e com Sirius Red para avaliação da presença de colágeno. As lâminas foram analisadas nas objetivas de 10X, 20X e 40X e as imagens foram capturadas na objetiva de 20X usando um microscópio de luz (Olympus BX-50 ®, Tóquio, Japão) conectada a uma câmera digital. As quantificações foram realizadas utilizando-se o software Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

### **2.9 Volume de líquido no tumor**

O volume de líquido de água por unidade de massa de tecido tumoral (mL/g) foi feito pela relação da massa fresca (100 mg de fragmento tumoral fixado em paraformaldeído 4%) e a massa seca do fragmento (peso úmido - peso seco), sendo a massa seca obtida após secagem do fragmento de tumor em estufa 70°C até atingir massa seca constante (Novaes et al., 2012).

### **2.10 Coloração *acridine orange* para apoptose**

Após fixados, os fragmentos de tumor foram desidratados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e incluídos em parafina. Cortes histológicos semi seriados de 4 µm de espessura foram obtidos utilizando-se

micrótomo rotativo (Leica, RM225) com navalhas de aço descartáveis. As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e lavadas com ácido acético, por um minuto. Posteriormente, as mesmas foram lavadas com água destilada e coradas com acridine orange 0,02% (Sigma) em PBS, por 30 segundos. *Acridine orange* penetra em todas as células corando-as em verde, enquanto iodeto de propídeo penetra apenas nas células mortas, as quais perderam a integridade de membrana, exibindo fluorescência vermelha. As lâminas foram lavadas com PBS (pH 6.0), por um minuto, diferenciadas em cloreto de cálcio e novamente lavadas com PBS. Por fim, as lâminas foram montadas com glicerina e observadas em microscópio de fluorescência EVOS® utilizando os filtros GFP LED CUBE e RFP LED CUBE.

### **2.11 Imunofluorescência do tumor**

Após fixados e mantidos em PBS 0,1 M, fragmentos do tumor foram deixados em PBS contendo 1% de Triton X-100 (PBST), por 2 h. Em seguida, foram incubadas por 24 h a 4 °C em solução de anticorpo primário anti-caspase-3 (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA) (1:500) ou anti-peroxidase (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA) (1:800), todos diluídos em PBS. Após essa etapa, as amostras foram lavadas com PBS três vezes, por 10 minutos cada lavagem, e incubadas por 24h a 4°C em solução de anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA) (1:500). No dia seguinte, foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada com PBS. As amostras foram desidratadas em série etanólica crescente (70%, 80%, 90% e álcool absoluto) e processadas para inclusão em glicol metacrilato (Leica, Historesin®). Cortes histológicos seriados de 10 µm de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo (Leica, RM225) com navalhas de vidro descartável. Os núcleos foram corados com DAPI (4',6-Diamidino-2'-fenylindole dihydrochloride) (1:1000) por 30 minutos, sendo as lâminas montadas em Mowiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e analisadas no microscópio de fluorescência EVOS®, utilizando os filtros DAPI LED CUBE e RFP LED CUBE. As marcações das proteínas caspase-3 e peroxidase foram contabilizadas em dez áreas diferentes do tumor de cada animal.

### **2.12 Imunofluorescência *in vitro***

Após os procedimentos de cultivo de células B16-F10,  $8 \times 10^4$  células/mL (Figueiredo et al., 2015) foram plaqueadas em placas de 24 poços, sendo que cada poço continha uma lamínula circular previamente autoclavada e as placas foram mantidas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, em atmosfera úmida, *overnight*, antes de iniciar os diferentes tratamentos a seguir. Para a análise com os inibidores de SRPK (SRPIN340 e SRVIC30), 50 µM dos inibidores diluídos em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) esterilizado foram adicionados aos poços por três horas sendo a concentração final de DMSO de 0,4% por poço (Siqueira et al., 2015). Poços com as células sem a presença do inibidor e poços com as células na presença do DMSO foram utilizados como controles. Em seguida, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS por 20 minutos, lavadas três vezes com PBS, permeabilizadas e bloqueadas com 0,5% de Triton X-100 e 3% de Albumina do Soro Bovino (BSA) por uma hora e lavadas três vezes com PBS. As células foram incubadas com os diferentes anticorpos primários monoclonais separadamente em tampão de bloqueio (anti-caspase 3 ou anti-peroxidase) produzidos em coelhos (1:500, 1:800, respectivamente, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA) por 40 minutos em câmara úmida, lavadas cinco vezes com PBS e incubadas com os anticorpos secundários anti IgG de coelho produzido em cabra (1:500, Alexa 488-conjugado, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), mantidas em câmara úmida e no escuro por 30 minutos e novamente lavadas sete vezes com PBS. As lâminas foram montadas utilizando Prolong Gold® com DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) (Molecular Probes) (Huh et al., 2013; Kwon et al., 2013; Zhao et al., 2014). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência EVOS® utilizando os filtros DAPI LED CUBE e GFP LED CUBE.

### **2.13 Análise estatística**

Os resultados foram avaliados por estatística utilizando o teste t de Student, não-pareado, a 5% de significância, sendo então expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Análises biométricas**

No presente estudo, o tumor tratado com SRVIC30 não levou à morbidez ou mortalidade dos animais e nem a metástases nos órgãos analisados. Em relação às análises biométricas, não houve diferença significativa nas massas inicial e final dos animais e nem nas massas absoluta e relativa do tumor, do pulmão, do fígado, do baço e do rim dos animais, comparando-se grupos controle e tratado pela via tópica. Já em relação aos grupos controle e tratado pela via peritumoral, houve diferença significativa apenas para a massa absoluta do fígado, sendo menor no grupo tratado ( $0,95\pm 0,01$ ) que no controle ( $1,09\pm 0,05$ ). No entanto, as massas absoluta e relativa dos outros órgãos analisados, bem como a massa do tumor e massas corporais inicial e final não apresentaram diferença significativa. O volume de líquido no tumor também não apresentou diferença significativa entre os diferentes grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Massa corporal (MC) inicial, MC final, massa absoluta e relativa dos órgãos e do tumor e volume de líquido no tumor de camundongos Black C57BL/6 tratados com SRVIC30, após inoculação de células B16-F10.

	Controle Pomada	SRVIC30 Pomada	Controle Peritumoral	SRVIC30 Peritumoral
MC Inicial (g)	21,54±0,93 <sup>a</sup>	20,68±0,40 <sup>a</sup>	21,60±0,42 <sup>a</sup>	20,75±0,20 <sup>a</sup>
MC Final (g)	23,36±0,76 <sup>a</sup>	24,05±1,05 <sup>a</sup>	23,63±0,63 <sup>a</sup>	23,05±0,40 <sup>a</sup>
Tumor (g)	0,39±0,06 <sup>a</sup>	0,55±0,17 <sup>a</sup>	0,82±0,15 <sup>a</sup>	0,77±0,37 <sup>a</sup>
Tumor (g/100g)	1,66±0,20 <sup>a</sup>	2,19±0,67 <sup>a</sup>	3,46±0,66 <sup>a</sup>	3,27±1,54 <sup>a</sup>
Pulmão (g)	0,18±0,00 <sup>a</sup>	0,19±0,01 <sup>a</sup>	0,20±0,01 <sup>a</sup>	0,19±0,01 <sup>a</sup>
Pulmão (g/100g)	0,79±0,03 <sup>a</sup>	0,81±0,03 <sup>a</sup>	0,84±0,05 <sup>a</sup>	0,84±0,02 <sup>a</sup>
Fígado (g)	1,09±0,04 <sup>a</sup>	1,11±0,04 <sup>a</sup>	1,09±0,05 <sup>a</sup>	0,95±0,01 <sup>b</sup>
Fígado (g/100g)	4,69±0,08 <sup>a</sup>	4,62±0,15 <sup>a</sup>	4,65±0,26 <sup>a</sup>	4,11±0,08 <sup>a</sup>
Baço (g)	0,04±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,00 <sup>a</sup>	0,05±0,00 <sup>a</sup>	0,11±0,05 <sup>a</sup>
Baço (g/100g)	0,15±0,01 <sup>a</sup>	0,17±0,01 <sup>a</sup>	0,21±0,02 <sup>a</sup>	0,48±0,23 <sup>a</sup>
Rim (g)	0,11±0,01 <sup>a</sup>	0,11±0,01 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,11±0,00 <sup>a</sup>
Rim (g/100g)	0,49±0,02 <sup>a</sup>	0,46±0,03 <sup>a</sup>	0,55±0,04 <sup>a</sup>	0,49±0,02 <sup>a</sup>
Líquido no Tumor (mL/g)	0,86±0,00 <sup>a</sup>	0,86±0,01 <sup>a</sup>	0,88±0,01 <sup>a</sup>	0,88±0,00 <sup>a</sup>

Valores expressos em média ± EPM. <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (P<0,05) pelo teste t de Student.

### 3.2 Análises sorológicas

Análises para avaliar dano hepático foram feitas para dois marcadores, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), ambos lançados no sangue na presença de quaisquer danos hepáticos. Esses marcadores não apresentaram diferenças entre os grupos controles e tratados, como pode ser visto nas figuras 3 e 4.

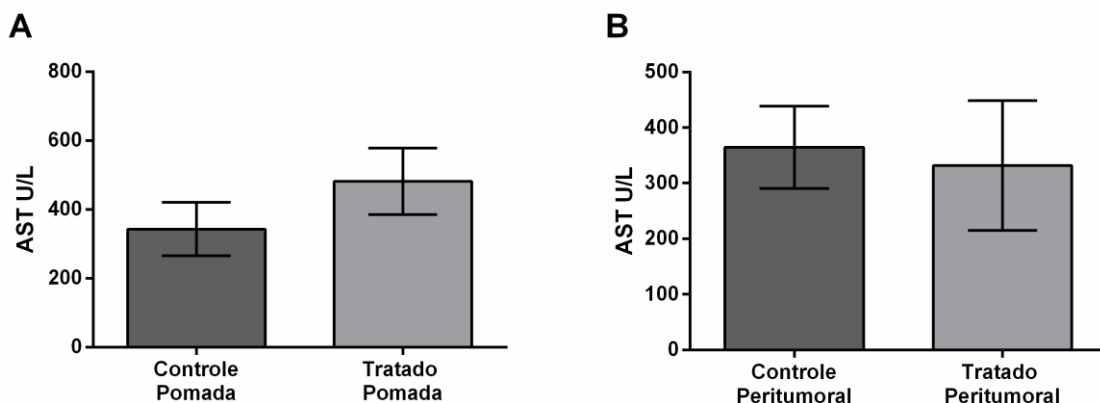


Figura 3 – Concentração de aspartato aminotransferase (AST) no soro (unidades por litro de soro) de animais controles tratados com a pomada base (Lanette®) e animais tratados com a pomada contendo SRVIC30, em A. Em B, concentração de AST no soro de animais controles inoculados com DMSO 1% e tratados com o SRVIC30, por via peritumoral.

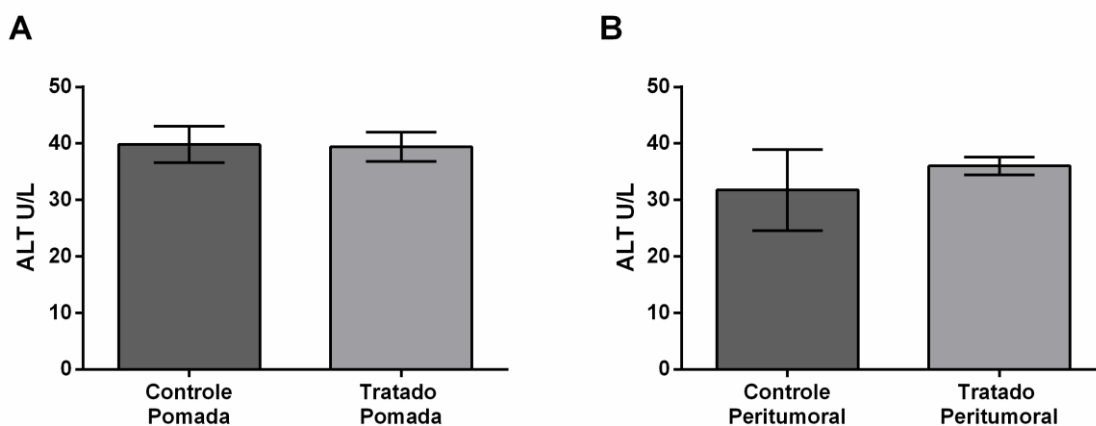


Figura 4 - Concentração de alanina aminotransferase (ALT) no soro (unidades por litro de soro) de animais controles tratados com a pomada base (Lanette®) e animais tratados com a pomada contendo o SRVIC30, em A. Em B, concentração de ALT no soro de animais controles inoculados com DMSO 1%

### 3.3 Análise histológica do fígado

A arquitetura tecidual do fígado dos animais tratados com o SRVIC30, por ambas as vias de administração (Figura 5), manteve-se normal em relação à dos animais controle. Não houve presença de infiltrado inflamatório, hipotrofia ou hipertrofia dos hepatócitos,

vacuolização citoplasmática, necrose dos tecidos, expansão da matriz extracelular e nem fibrose.

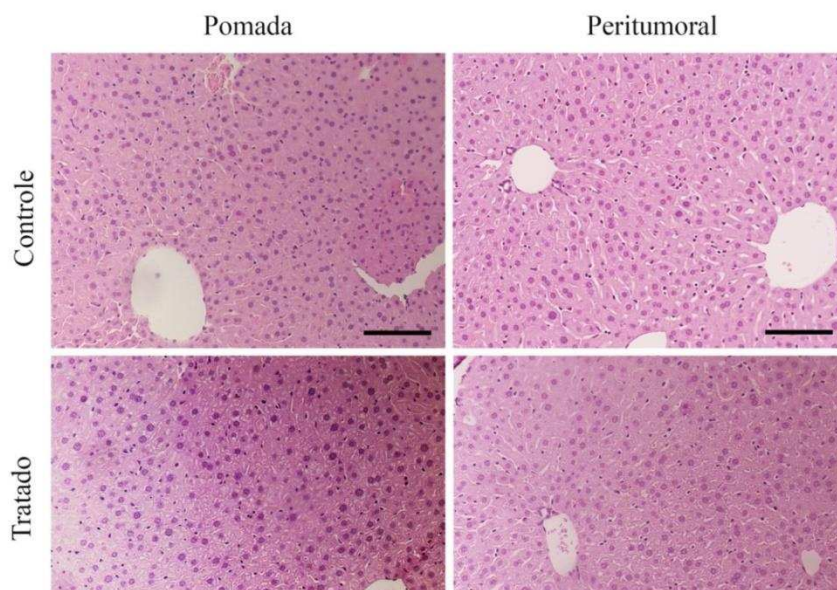


Figura 5 - Fotomicrografias dos lóbulos hepáticos dos animais controles e tratados com o SRVIC30 por via tópica e por via peritumoral, mostrando cordões de hepatócitos com morfologia normal. Coloração hematoxilina-eosina; barra de escala 100  $\mu$ m.

### 3.4 Volume tumoral

O volume tumoral do grupo controle em que foi utilizada a via tópica de tratamento apresentou média de  $24,89 \pm 4,33 \text{ mm}^3$  no primeiro dia de tratamento, enquanto o grupo tratado com SRVIC30 apresentou volume tumoral de  $41,12 \pm 13,32 \text{ mm}^3$ . No último dia de tratamento, os tumores dos animais não apresentaram diferença significativa, sendo a média do volume tumoral do grupo tratado  $520,19 \pm 171,53 \text{ mm}^3$  e a do grupo controle  $580,33 \pm 103,28 \text{ mm}^3$  (Figura 6). O volume tumoral dos animais tratados aumentou 12,65 vezes enquanto o volume tumoral dos animais controles aumentou 23,32 vezes.

Em relação ao volume tumoral dos animais tratados pela via peritumoral, o grupo controle apresentou média de  $113,62 \pm 27,58 \text{ mm}^3$  no primeiro dia de tratamento enquanto o grupo tratado apresentou média de  $61,03 \pm 24,91 \text{ mm}^3$ . No último dia de tratamento, os tumores dos animais do grupo controle apresentaram volume tumoral de  $910,97 \pm 157,38 \text{ mm}^3$ , enquanto o volume tumoral dos animais do grupo tratado foi de  $836,84 \pm 318,45 \text{ mm}^3$ , não diferindo estatisticamente (Figura 7). O volume tumoral dos animais tratados aumentou 13,71 vezes, enquanto o dos animais controle aumentou 8,02 vezes.

Como observado, o tratamento com o SRVIC30 não foi capaz de inibir o crescimento tumoral ao longo dos 14 dias de tratamento e na concentração de composto utilizada (Figuras 6 e 7).

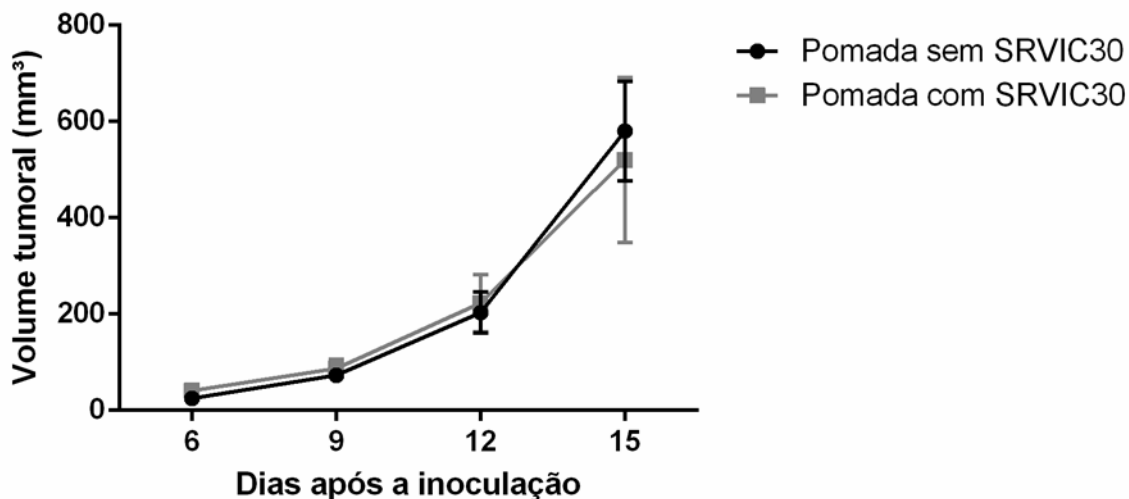


Figura 6 - Volume tumoral dos animais dos grupos controle (pomada Lanette®) e tratado (pomada Lanette acrescida do SRVIC30), utilizando a via tópica. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

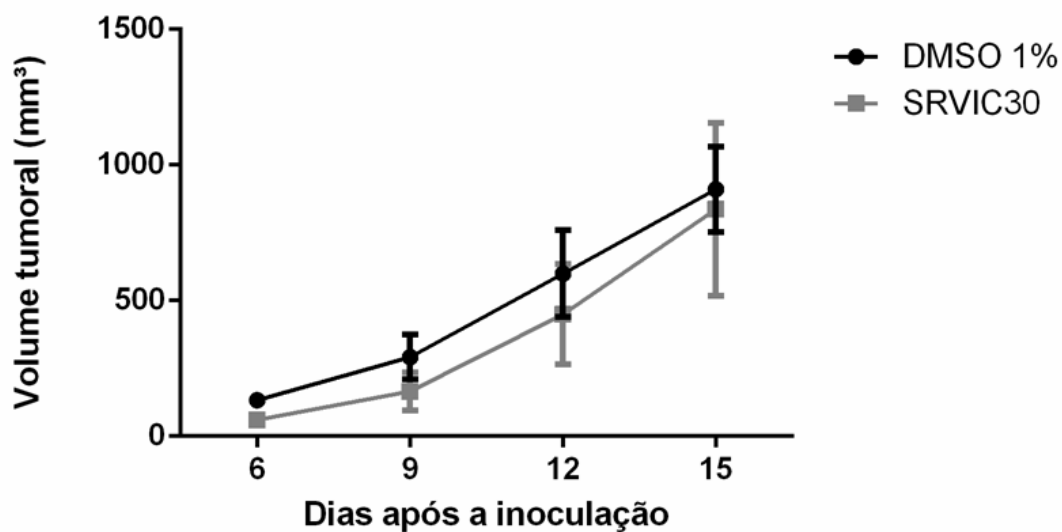


Figura 7 - Volume tumoral dos grupos controle (DMSO 1%) e tratado (SRVIC30), utilizando a via peritumoral. Não houve redução do volume tumoral dos animais tratados com o SRVIC30, pela via peritumoral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

### 3.5 Análises histológicas do tumor e da pele

#### 3.5.1 Tumor

As análises histológicas do tumor mostraram grande quantidade de células neoplásicas, entremeadas por vasos sanguíneos, grande quantidade de melanina e presença de figuras de mitose. Os grupos tratados apresentaram fibras colágenas intratumorais, fato esse não observado nos animais dos grupos controles, os quais apresentaram fibras colágenas apenas em torno dos vasos sanguíneos (Figura 8). Em relação às análises morfométricas, não houve diferença estatística significativa para figuras de mitose, melanina, vaso sanguíneo, infiltrado e tecido conjuntivo. Contudo, mesmo que o tratamento com SRVIC30 não tenha reduzido o volume tumoral, os tumores dos animais do grupo tratado por via tópica apresentaram maior área de morte celular ( $26,60 \pm 8,11$ ) que o grupo controle ( $5,25 \pm 0,89$ ), como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2. Proporção volumétrica dos constituintes do tumor de camundongos tratados com SRVIC30, por via tópica e peritumoral, após inoculação de células B16-F10 ( $P > 0,05$ ).

	Controle Pomada	SRVIC30 Pomada	Controle Peritumoral	SRVIC30 Peritumoral
Célula tumoral	$49,56 \pm 3,52^a$	$45,45 \pm 5,62^a$	$59,57 \pm 0,83^a$	$59,41 \pm 3,01^a$
Figuras de mitose	$0,42 \pm 0,06^a$	$0,25 \pm 0,07^a$	$0,23 \pm 0,03^a$	$0,17 \pm 0,04^a$
Melanina	$32,15 \pm 3,40^a$	$23,52 \pm 3,29^a$	$29,13 \pm 0,25^a$	$24,78 \pm 1,93^a$
Morte celular	$5,25 \pm 0,89^a$	$26,60 \pm 8,11^b$	$4,15 \pm 1,30^a$	$9,60 \pm 3,69^a$
Vaso sanguíneo	$10,85 \pm 4,11^a$	$3,12 \pm 0,63^a$	$6,90 \pm 1,32^a$	$5,28 \pm 0,88^a$
Infiltrado	$0,06 \pm 0,04^a$	$0,50 \pm 0,37^a$	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,49 \pm 0,38^a$
Tecido conjuntivo	$1,71 \pm 1,32^a$	$0,56 \pm 0,34^a$	$0,02 \pm 0,01^a$	$0,27 \pm 0,21^a$

Valores expressos em média  $\pm$  EPM. <sup>ab</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste t de Student.

### 3.5.2 Pele

As análises histológicas da pele mostraram áreas de morte celular e presença de infiltrado inflamatório na pele dos animais tratados com o SRVIC30, independente da via de administração. A pele dos animais dos grupos controle e tratado, por ambas as vias de

administração, apresentou grande quantidade de colágeno, marcado pela coloração Picro Sirius Red (Figura 9).

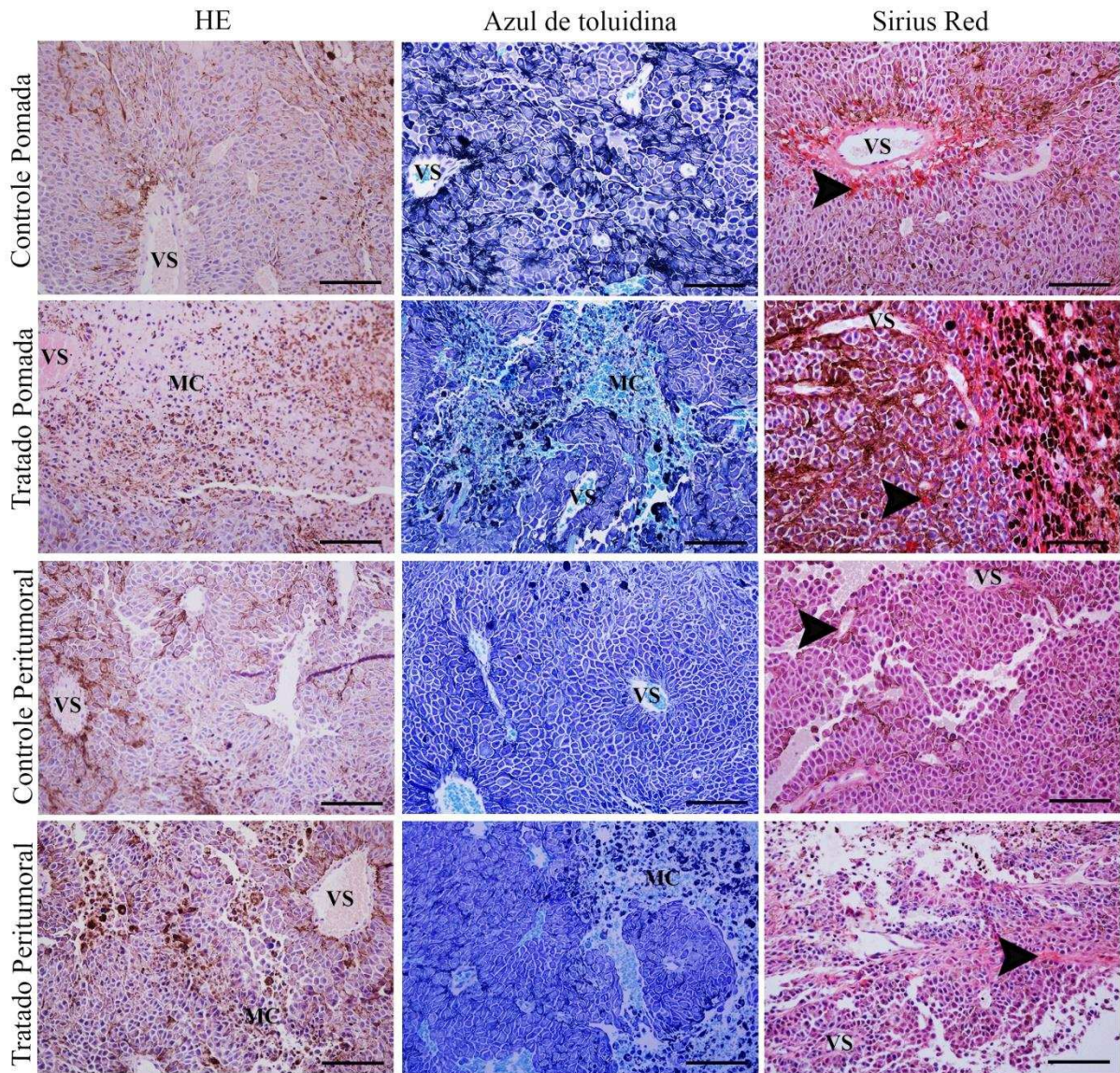


Figura 8 - Fotomicrografias representativas do tumor dos animais controle e tratados com o SRVIC30, pelavias tópica e peritumoral. Cabeças de setas: tecido conjuntivo evidenciando fibras colágenas; VS: Vaso Sanguíneo; MC: Morte Celular. Colorações: Hematoxilina-Eosina (HE), Azul de Toluidina, Sirius Red; barra de escala 100  $\mu$ m.

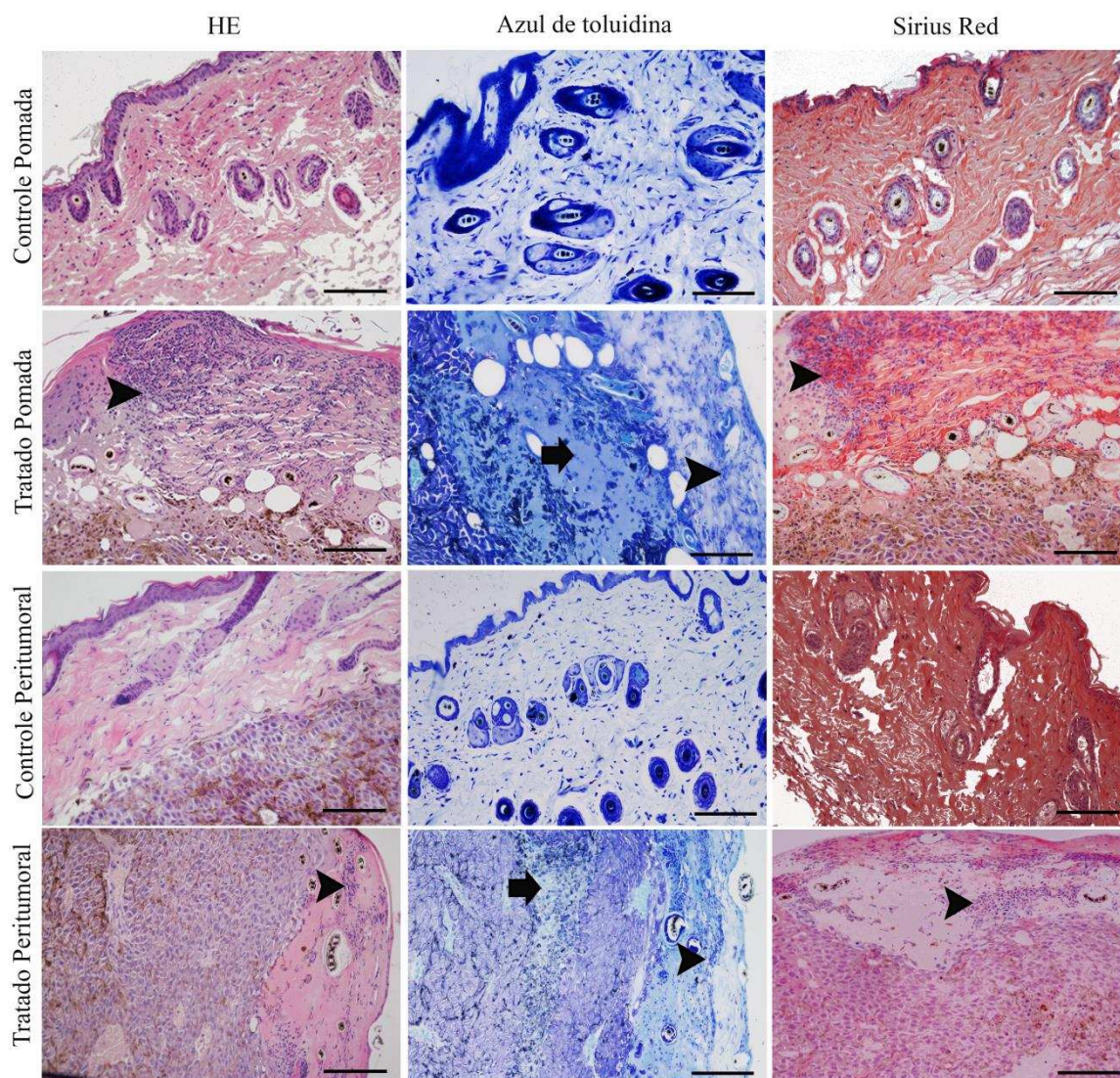


Figura 9 - Fotomicrografias representativas da pele dos animais controles e tratados com SRVIC30 pelas vias tópica e peritumoral. Setas: áreas de morte celular; Cabeça de seta: infiltrado inflamatório; Áreas em vermelho: fibras colágenas. Colorações: Hematoxilina-Eosina, Azul de Toluidina, Sirius Red; barra de escala 100  $\mu$ m.

### 3.6 Coloração *acridine orange* para apoptose

Para confirmar se a morte celular das células tumorais tratadas *in vivo* com o SRVIC30 ocorreu por meio de morte celular por apoptose, após a retirada do tumor e o processamento histológico para inclusão em parafina, os fragmentos foram corados com *acridine orange* e observados em microscópio de fluorescência. A figura 10 mostra os fragmentos de tumor tratados com o SRVIC30 corados pela cor alaranjada, característica de processos apoptóticos. A intensidade da marcação para células apoptóticas foi maior nos fragmentos de tumor tratados com SRVIC30, por ambas as vias de administração.

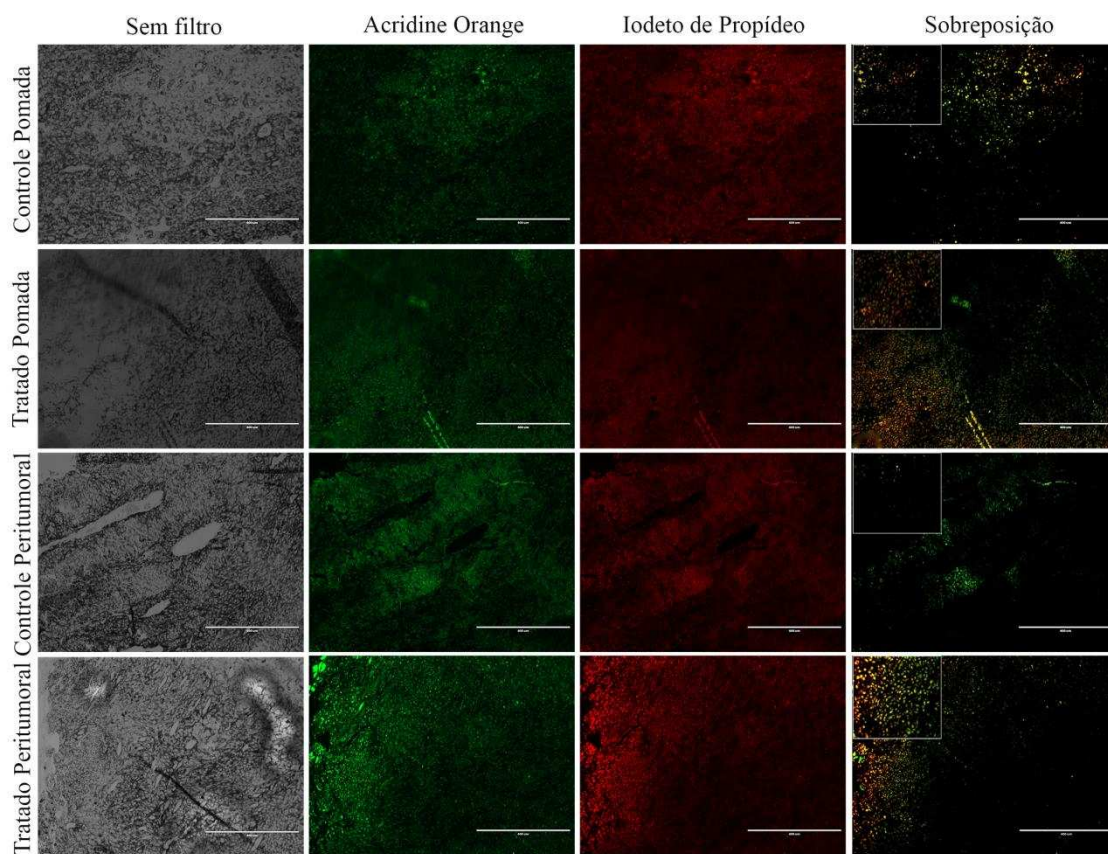


Figura 10 – Fotomicrografias representativas do tumor dos animais controles e tratados com SRVIC30, pelas vias tópica e peritumoral, utilizando *acridine orange*. Inserção representa um zoom da área de apoptose. Coloração: *Acridine orange*. Barra de escala: 400  $\mu$ m.

### 3.7 Imunofluorescência do tumor

O controle negativo da técnica pode ser visto na figura 11.

#### 3.7.1 Apoptose (caspase-3)

As células do tumor foram imunomarcadas para caspase-3, uma proteína efetora da via de apoptose celular. Nos animais tratados com SRVIC30, por ambas as vias de administração do composto, houve aumento da caspase-3, confirmando os dados morfométricos anteriormente mostrados de morte celular tumoral nos grupos tratados (Figura 12).

#### 3.7.2 Estresse oxidativo (peroxidase)

Nos tumores tratados com SRVIC30 houve aumento das imunomarcações para peroxidase, uma enzima que catalisa a quebra do peróxido de hidrogênio e faz parte da defesa enzimática antioxidante da célula. Esse resultado foi significativo apenas para os animais tratados com SRVIC30 pela via tópica (Figura 13).

### 3.8 Imunofluorescência *in vitro*

O controle negativo da técnica pode ser visto na figura 14.

#### 3.8.1 Apoptose (caspase-3)

As células tratadas com os inibidores de SRPIN340 ou SRVIC30 apresentaram mais marcações de caspase-3 que as células não tratadas (Figura 15).

#### 3.8.2 Estresse oxidativo (peroxidase)

Células B16-F10 tratadas com o SRPIN340 ou SRVIC30 apresentaram mais marcações para peroxidase que as células não tratadas (Figura 16).

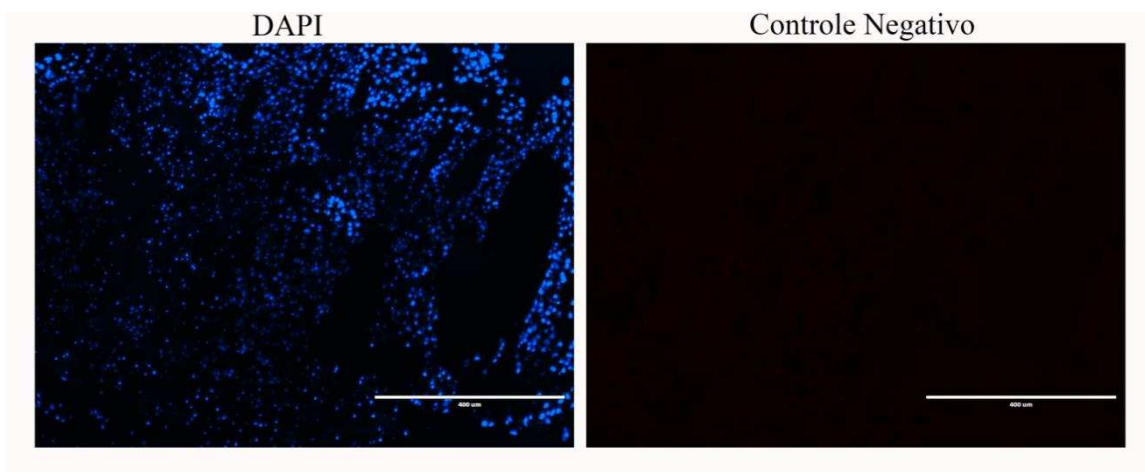


Figura 11 – Fotomicrografias representativas do controle negativo do tumor dos animais tratados com SRVIC30, mostrando ausência de marcações inespecíficas. Marcações: DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride). Barra de escala: 400  $\mu$ m

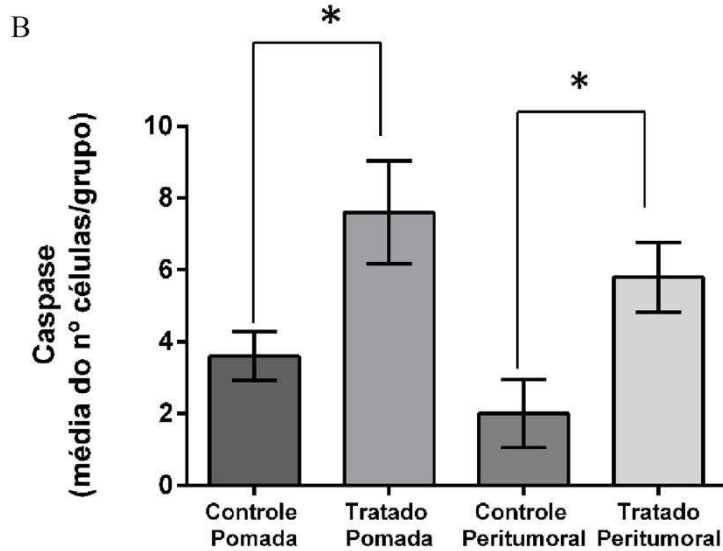
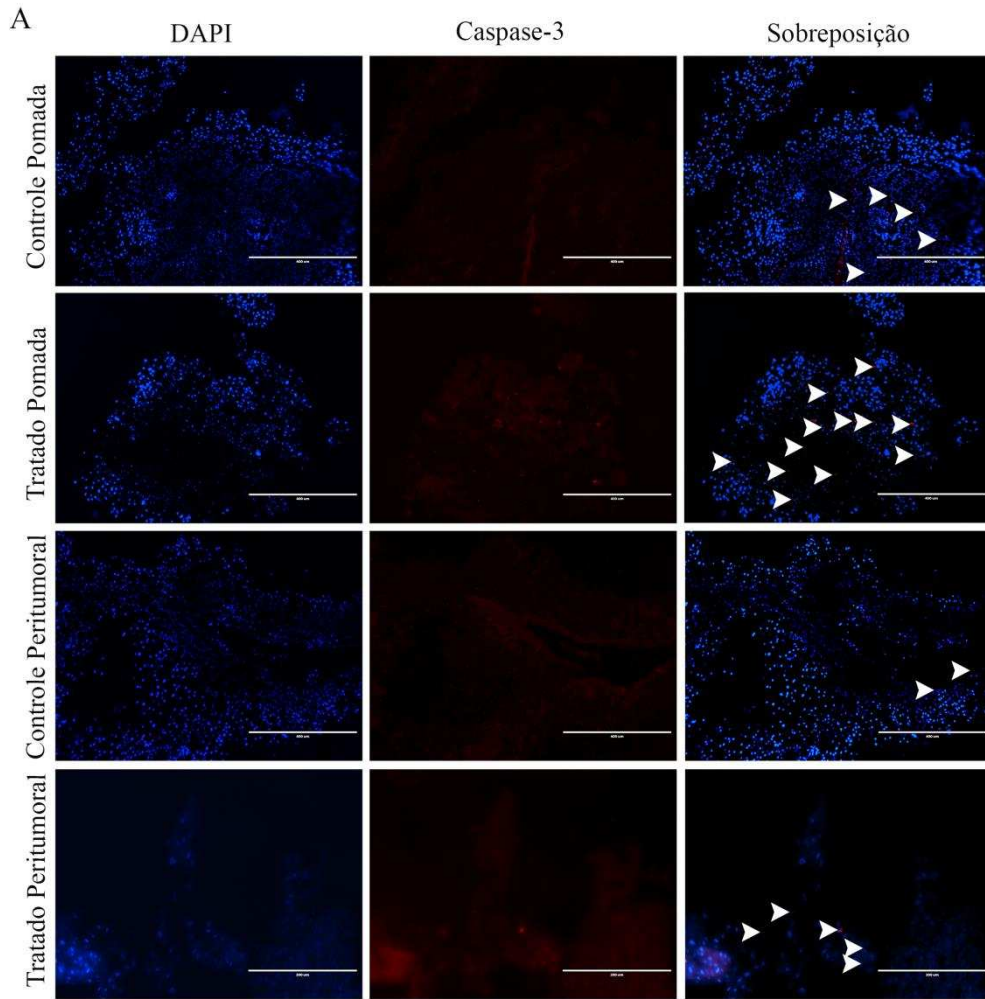


Figura 12 – Fotomicrografias representativas do tumor dos grupos controles e tratados pelas vias tópica e peritumoral, evidenciando as células imunomarcadas para caspase-3. Em A, as cabeças de setas indicam células imunomarcadas com caspase-3. Em B, representação da contagem de células imunomarcadas para caspase-3. Marcações: DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride), imunofluorescência para caspase-3. Barra de escala: 400  $\mu$ m.

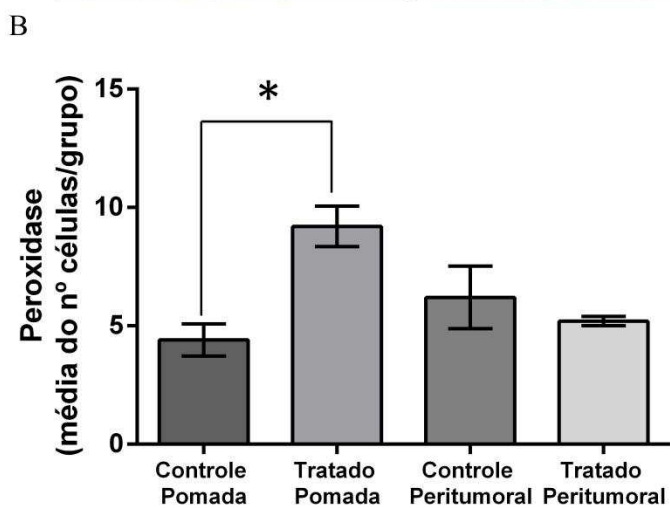
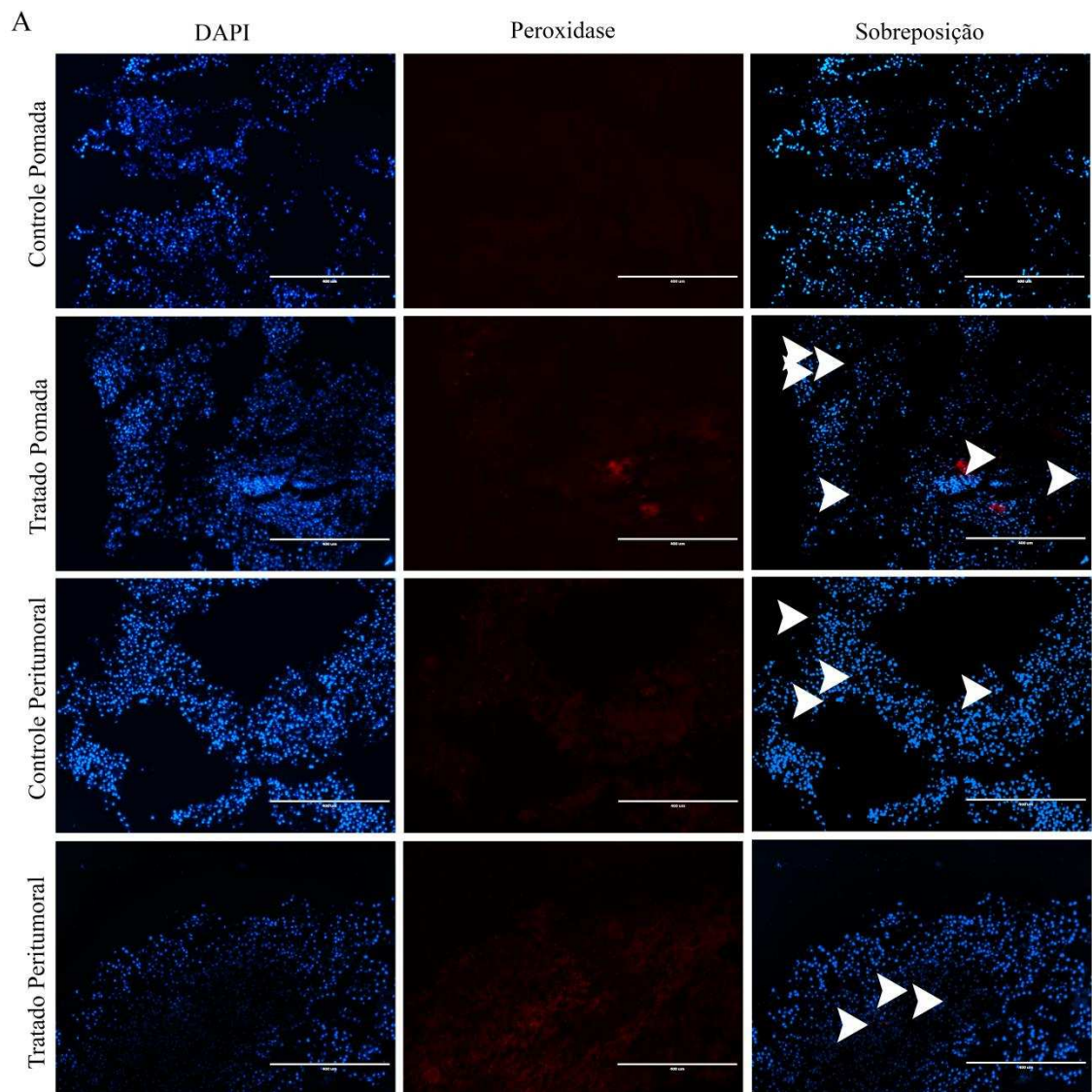


Figura 13 - Fotomicrografias representativas do tumor dos grupos controles e tratados pelas vias tópica e peritumoral, evidenciando as células imunomarcadas para peroxidase. Em A, cabeças de setas indicam células imunomarcadas com peroxidase. Em B, representação da contagem de células marcadas com peroxidase em dez campos aleatórios de cada animal. Marcações: DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride), imunofluorescência para peroxidase. Barra de escala: 400  $\mu$ m.

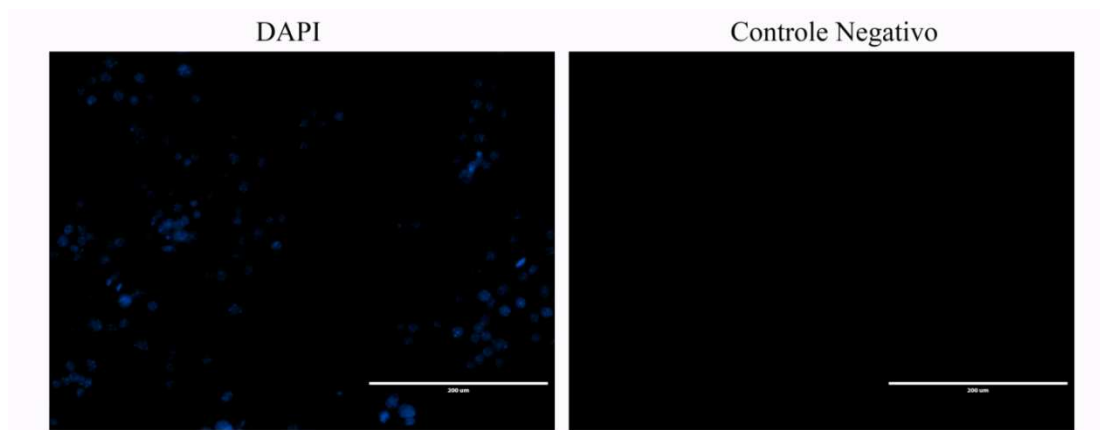


Figura 14 - Fotomicrografias representativas do controle negativo das células B16-F10 tratadas com SRPIN340 ou SRVIC30, mostrando ausência de marcações inespecíficas. Marcações: DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride). Barra de escala: 200  $\mu$ m

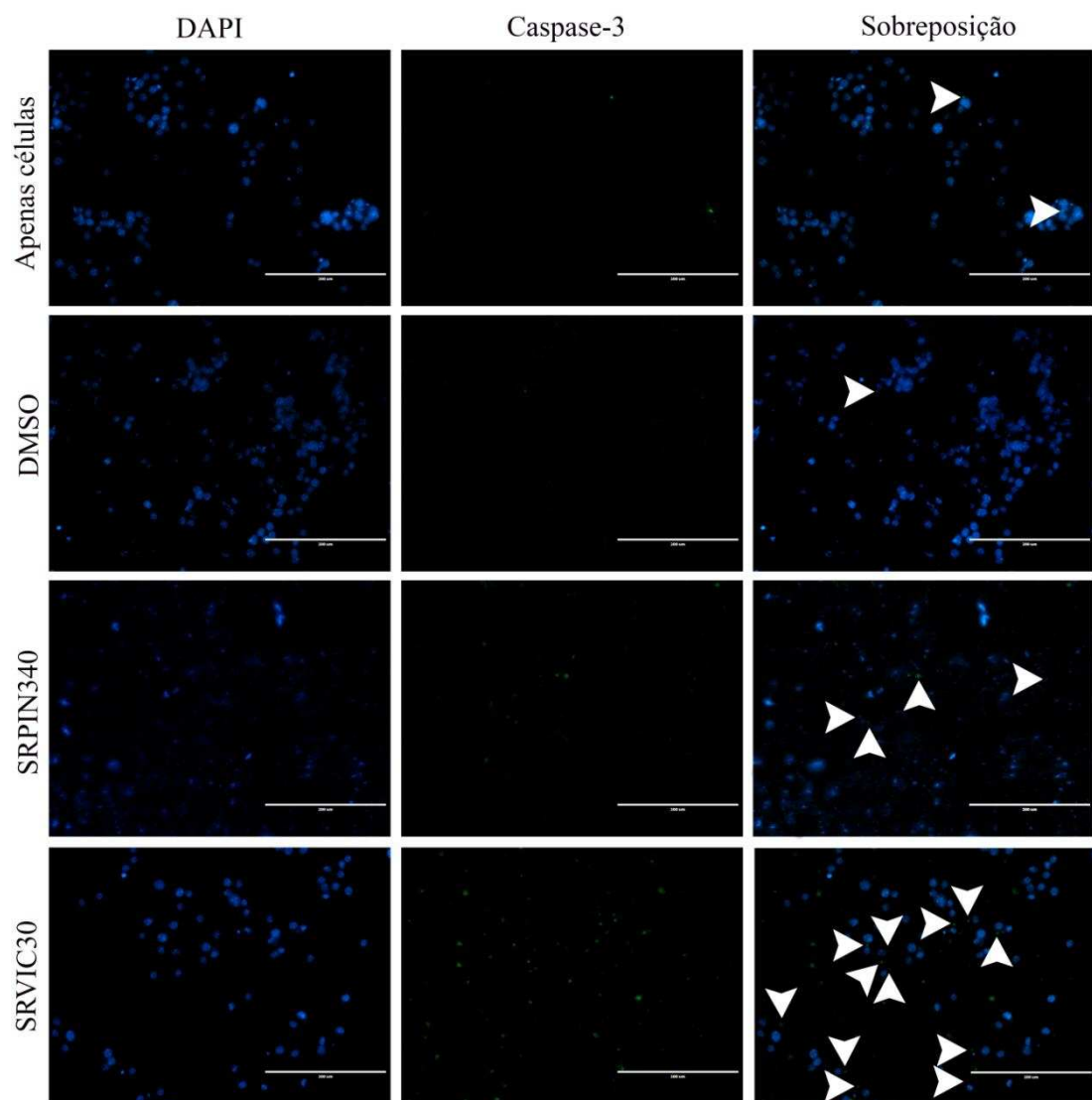


Figura 15 – Fotomicrografias representativas de células B16-F10 tratadas com os inibidores SRPIN340 ou SRVIC30, e não tratadas (apenas células ou células com DMSO), evidenciando que os inibidores induziram apoptose nestas células. Cabeças de setas indicam células imunomarcadas para caspase-3. Marcações: DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride), imunofluorescência para caspase-3. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

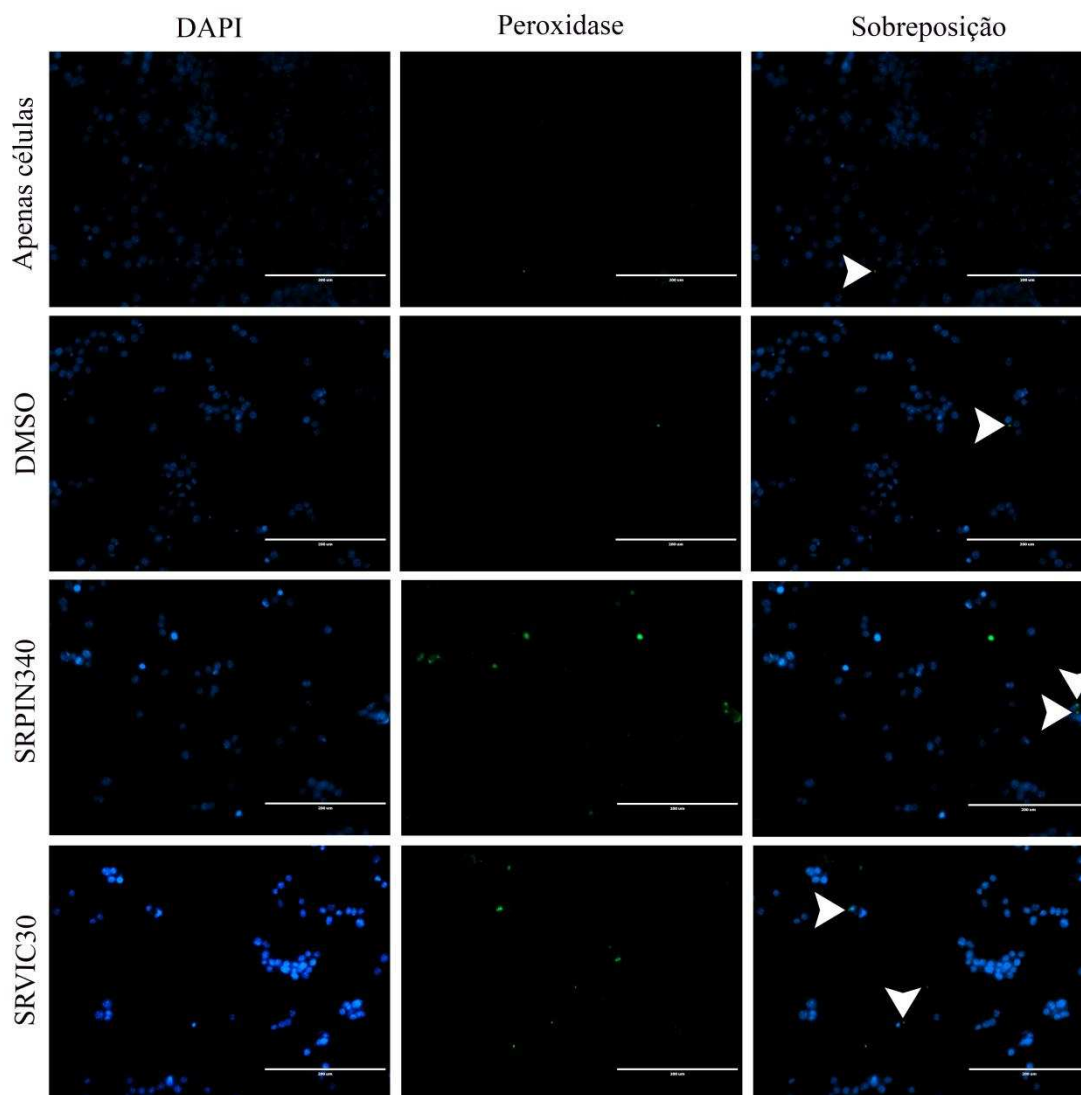


Figura 16 – Fotomicrografias representativas de células B16-F10 tratadas com os inibidores SRPIN340 ou SRVIC30, e não tratadas (apenas células ou células com DMSO), evidenciando que os inibidores induziram aumento de peroxidase nestas células. Cabeças de setas indicam células imunomarcadas para peroxidase. Marcações: DAPI (4',6-Diamidino-2'-fenylindole dihydrochloride), imunofluorescência para peroxidase. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

#### 4. DISCUSSÃO

O melanoma é o tipo mais letal de câncer de pele apesar de não ser o câncer mais comum. Sua capacidade de gerar metástases em sítios distantes e a sua agressividade faz com que o número de mortes por melanoma seja alto (Karimkhani et al., 2017). Embora existam muitas estratégias terapêuticas para o tratamento do melanoma, pesquisas sobre novas drogas ainda ganham bastante destaque, principalmente devido aos efeitos colaterais e à resistência do melanoma aos tratamentos existentes (Baharara et al., 2016). Drogas que agem de forma

específica diferentemente dos tratamentos convencionais são mais promissoras e geram melhores prognósticos ao paciente (Grosso et al., 2008). O composto N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide, conhecido como SRPIN340, tem se destacado nesse cenário como inibidor de *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs), moléculas alvo que estão super expressas no melanoma (Gammons et al., 2014). A inibição dessa proteína pelo SRPIN340 e seus análogos mostrou resultados esperançosos na busca de um tratamento mais efetivo contra o melanoma (Moreira, 2016). No presente estudo, um análogo do SRPIN340 foi selecionado para prosseguir com os estudos *in vivo* após uma bateria de estudos prévios feitos *in vitro*.

A procura por novos tratamentos contra o câncer não se restringe apenas à busca por compostos que exibam alta atividade antitumoral. Além de o composto ter a sua eficácia antitumoral comprovada, o mesmo deve ser seguro e de baixa toxicidade, de forma a evitar os efeitos colaterais e prolongar a sobrevida do paciente (Kamran e Gude, 2012). Estudos pré-clínicos permitem avaliar a toxicidade de compostos antes dos mesmos passarem para a fase clínica do estudo (Carvalho et al., 2013). O modelo animal utilizado no presente estudo foi o da inoculação de células B16-F10 no dorso de camundongos C57BL/6. Para esse modelo, também não foram encontrados sinais de toxicidade do composto. Nesse estudo, os animais não apresentaram sinais de morbidez e não ocorreram mortes. Além disso, os animais não perderam massa corporal nem massa dos pulmões, fígado, baço e rim. Apenas o fígado dos animais tratado com o SRVIC30, por via peritumoral, apresentou menor massa ( $0,95\pm 0,01$ ) em relação ao controle ( $1,09\pm 0,05$ ). Porém, essa menor massa não pode ser relacionado à toxicidade do composto, uma vez que as análises da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT), não mostraram diferença significativa entre os grupos, bem como a histopatologia do fígado não apresentou sinais de danos hepáticos. Portanto, esse estudo confirma o achado por Moreira em 2016, ou seja, o SRVIC30 nas concentrações e tempo testados não foi tóxico para os animais.

O tratamento com SRVIC30 tanto pela via tópica quanto pela via peritumoral não teve efeito antitumoral, no que se diz respeito à redução do volume tumoral, pois não reduziu o volume deste de forma significativa e nem a massa tumoral dos animais dos grupos tratados. A massa do tumor dos animais tratados com o composto pela via tópica tendeu a ser maior que a massa tumoral dos animais do grupo controle, embora essa diferença não tenha sido significativa. Essa tendência ao aumento de massa tumoral não esteve relacionada com acúmulo de líquido no tumor, pois o volume de líquido tumoral não variou

significativamente. Logo, o que pode ter ocorrido é o acúmulo de células no tumor desse animal como fibroblastos, células do estroma, linfócitos e outros tipos celulares, principalmente células do sistema imune, recrutadas pelo composto SRVIC30, como forma de tentar combater as células tumorais (Wu et al., 2013).

A ausência da inibição do crescimento tumoral pelo composto SRVIC30 pode ser explicada por alguns fatores. O primeiro deles é o próprio modelo animal utilizado. Nesse modelo, células de melanoma murino B16-F10 são inoculadas no dorso de camundongos C57BL/6 e só após o estabelecimento de um tumor sólido é que o mesmo começa a ser tratado. Essa linhagem celular, obtida por Fidler em 1973 é altamente agressiva e com maior capacidade de invasão e metástase quando comparada com a linhagem B16-F1. Diferentemente, quando se utilizam células B16-F10 inoculadas pela veia caudal de camundongos C57BL/6, o tratamento já se inicia 24 h após a inoculação dessas células, ou seja, quando os nódulos tumorais ainda não foram estabelecidos no pulmão (Carvalho et al., 2013; Wang et al., 2014; Sadhu et al., 2017). Além disso, muitas dessas células são perdidas na corrente sanguínea, não chegando ao pulmão a mesma quantidade de células inoculadas pela veia caudal. Esse modelo também é chamado de “modelo de metástase pulmonar”, porém o que ocorre não é uma verdadeira metástase, uma vez que cada nódulo localizado no pulmão é, de fato, um tumor “primário” independente (Silva et al., 2013). Ainda nesse modelo, já se sabe que nódulos serão formados no pulmão justamente porque o leito capilar pulmonar é o primeiro leito que essas células atingem após a injeção caudal (Khanna e Hunter, 2005). Portanto, mesmo que o modelo utilizado nesse trabalho seja bastante agressivo, é o modelo que mais se aproxima de uma situação real, vez que as metástases que ocorrerem serão originadas de forma espontânea.

O segundo fator que pode explicar a ausência da inibição do crescimento tumoral é a baixa atividade citotóxica apresentada pelo SRVIC30 em células tumorais, como comprovado em estudos previamente feitos por Moreira (2016). A atividade citotóxica pode ser medida pelo IC50, ou seja, a concentração capaz de inibir metade da atividade biológica. O IC50 para o SRVIC30 é de 65,7  $\mu\text{M}$ , sendo necessária essa concentração do composto para que 50% da viabilidade celular seja reduzida. Rodrigues et al. (2008) estudaram o efeito antitumoral tópico da gomesina, um peptídeo antimicrobiano isolado de uma aranha, e observaram um significativo atraso no desenvolvimento do tumor. Isso porque o IC50 da gomesina é de 3,58  $\mu\text{M}$ , quase 20 vezes menor que o do SRVIC30, o que quer dizer que uma menor quantidade desse composto é requerida para que o mesmo seja efetivo na redução tumoral. Gammons et

al. (2014) avaliaram a ação do SRPIN340 em células A375 de melanoma humano e perceberam redução do tumor subcutâneo. Embora o SRPIN340 apresente o IC50 maior que o do SRVIC30 (>100 µM), o modelo experimental em questão foi outro. Gammons et al. (2014) utilizaram camundongos do tipo nude e células de melanoma humano A375. Portanto, devido ao IC50 do SRVIC30 ser relativamente alto e o tipo de tumor tratado ser bastante agressivo, foi esperado que o mesmo não fosse erradicado e sim que crescesse a uma taxa mais lenta que os tumores do grupo controle. Da mesma forma, no estudo de Figueiredo et al (2015) os autores avaliaram a ação antitumoral de um pequeno peptídeo com IC50 de 235 µM em modelo murino de melanoma subcutâneo e perceberam uma diminuição da progressão tumoral do grupo tratado em relação ao controle. Logo, compostos com baixa atividade citotóxica, quando analisados em modelos com tumores já estabelecidos, dificilmente erradicarão o tumor, mas poderão fazer com que o mesmo cresça a uma taxa mais lenta que os tumores dos animais do grupo controle.

O terceiro fator correlacionado com a não diminuição do tumor é a própria resistência do melanoma aos tratamentos antitumorais. Autores argumentaram que a resistência das células tumorais se deve ao fato de ser uma população de células com características de células-tronco (Luo et al., 2012; Richard et al., 2013). Chen et al. (2006) demonstraram que a ativação do Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) leva a um aumento da quimioresistência dessas células-tronco tumorais. A fosfoinositídeo-3-cinase (PI3K) também foi relacionada com a quimioresistência dessas células-tronco em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Imai et al. (2012) estudaram um inibidor de PI3K que inibiu três classes de transportadores ABC. Esses transportadores ABC estão altamente expressos em células-tronco tumorais e foram relacionados à resistência multidrogas dessas células. A via PI3K/AKT pode modular a função desses transportadores e levar a resistência multidrogas. O eixo EGFR/PI3K/AKT, relacionado a vários cânceres, constitui o principal mecanismo de ativação das SRPKs através da via AKT-SRPK-SR (Siqueira et al., 2015; Zhou e Fu, 2013). A via PI3K/AKT é uma das vias mais alteradas no melanoma e as SRPKs estão super expressas nesse câncer. Portanto, essa via de sinalização pode estar relacionada à resistência do melanoma aos compostos antitumorais.

A resistência das células B16-F10 para com os tratamentos antitumorais, inclusive com o SRVIC30, já foi comprovada *in vitro* por Moreira (2016). Contudo, Moreira (2016) percebeu que, apesar da resistência das células B16-F10 e da baixa citotoxicidade do SRPIN340 e do SRVIC30, outros eventos celulares tiveram resultados satisfatórios após a

inibição das SRPKs, afetando negativamente processos cruciais para a disseminação do melanoma como invasão, adesão e migração celular. No presente estudo, embora o uso do SRVIC30 não impactasse na redução do tumor, o efeito da inibição das SRPKs revelou resultados interessantes como o aumento das áreas de morte celular nos animais dos grupos tratados. Esse dado, inicialmente encontrado através da análise morfológica do tumor, foi confirmado por *acridine orange*, um corante marcador de células apoptóticas, e pela imunomarcação de caspase-3, componente da via intrínseca e extrínseca da apoptose. Similarmente, o efeito citotóxico da Dacarbazina, fármaco utilizado no tratamento de melanoma metastático, ocorreu por indução da apoptose em células de melanoma B16-F10 (Baharara et al., 2016). Siqueira et al. (2017) descreveram a presença de células leucêmicas em processo apoptótico após o tratamento com inibidores de SRPKs. Ainda em seu primeiro trabalho publicado, os autores propuseram que a ocorrência de apoptose em células leucêmicas após o tratamento com SRPIN340 foi devido ao comprometimento intracelular da atividade de SRPK, uma vez que esse composto é um inibidor específico dessa cinase (Siqueira et al., 2015). Além disso, outro estudo mostrou que inibidores de outra proteína cinase envolvida na maquinaria do *splicing* geraram supressão do crescimento e indução da apoptose através da modulação de genes envolvidos no crescimento e sobrevivência (Araki et al., 2015). Portanto, esses dados sugerem que o SRVIC30 pode ter agido nas células de melanoma inibindo as SRPKs e, conseqüentemente, induzindo a morte celular por apoptose.

Uma possível explicação para como o inibidor de SRPK induziu a apoptose nos tumores tratados do presente trabalho envolve uma citocina chamada Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), relacionada com a angiogênese. SRVIC30, assim como SRPIN340, é um inibidor de SRPK altamente específico. Um estudo recente demonstrou que a inibição de SRPK por SRPIN340 levou a uma redução nos níveis de VEGF pró-angiogênico em células de melanoma humano, acarretando a redução do crescimento tumoral de melanoma humano *in vivo* (Gammons et al., 2014). Anteriormente, um estudo já havia sido publicado relatando a relação entre a inibição da expressão de VEGF e a indução da apoptose (Ge et al., 2009). Nesse estudo, feito em células de câncer de mama, os autores perceberam que a inibição de VEGF por RNA de interferência levou à redução na relação das proteínas Bcl-2/Bax, proteínas relacionadas com o processo apoptótico. Essas proteínas fazem parte de uma família que compreende proteínas pró-apoptóticas, como Bax, e anti-apoptóticas, como Bcl-2. Portanto, a redução da razão Bcl-2/Bax indica um aumento da indução da apoptose. Ainda nesse estudo, os autores descobriram que a razão Bcl-2/Bax reduzida levava a uma

liberação de citocromo C, o qual ativa caspase-3 e desencadeia a apoptose. Portanto, a indução da apoptose no presente estudo pode ter ocorrido a partir da inibição de SRPKs, reduzindo a expressão de VEGF pró-angiogênico. A redução da expressão de VEGF pró-angiogênico pode ter induzido à diminuição da razão Bcl-2/Bax, a liberação do citocromo C e, por fim, a ativação da caspase-3, culminando na morte celular por apoptose. Como visto, os níveis de caspase-3 estavam aumentados tanto nos tumores tratados pela via tópica quanto nos tumores tratado pela via peritumoral com o SRVIC30.

Ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila são exemplos de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Na presença de um desequilíbrio entre a produção e eliminação dessas ROS ocorre o estresse oxidativo, o qual é responsável por causar danos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Sosa et al., 2013). Normalmente, as células contam com um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. Porém, em condições patológicas esse sistema de defesa é ineficiente. No melanoma, por exemplo, os níveis de peroxidases, as quais compõem o sistema de defesa enzimático, estão reduzidos, agravando os danos causados pelo estresse oxidativo à célula (Picardo et al., 1999). Nesse contexto, autores já relataram que os níveis de espécies reativas de oxigênio estão elevados no melanoma, uma vez que o nível das enzimas antioxidantes é baixo (Yamaura et al., 2009; Liu-Smith et al., 2014). As ROS já foram mencionadas como responsáveis pela atividade citotóxica de várias drogas antitumorais (Woźniak et al., 2005). Esses autores demonstraram que a incubação de células de melanoma com drogas antitumorais levou à diminuição da sobrevivência e aumento da atividade de enzimas antioxidantes quando comparadas ao controle. Esse aumento das enzimas antioxidantes foi relacionado ao aumento da geração de superóxido e peróxido de hidrogênio, substrato para superóxido dismutase e peroxidases (catalase e glutathione peroxidase), respectivamente, em decorrência do composto antitumoral. No presente trabalho, houve um aumento significativo de peroxidase no tumor dos animais tratados com SRVIC30 por via tópica. Esse aumento também foi visto *in vitro* nas células de melanoma B16-F10 após o uso do SRPIN340 e SRVIC30. Portanto, sugere-se que o composto SRVIC30 possa ter contribuído para a geração de ROS em melanoma e, como consequência, para o aumento dos níveis de peroxidase.

As análises morfométricas mostraram um potencial em diminuir as células tumorais, mas esse valor não foi significativo. É de se esperar que, com o aumento das áreas de morte celular, haja diminuição na proliferação celular. Porém, provavelmente devido à agressividade do modelo animal e à baixa atividade citotóxica do composto SRVIC30, esse parâmetro não

foi significativo no atual estudo, embora a proporção de células tumorais tenha sido tendencialmente menor no grupo tratado pela via tópica. Gammons et al. (2014) estudaram a inibição de SRPKs em modelo animal e perceberam diminuição do crescimento tumoral *in vivo*, contudo utilizaram camundongos do tipo nude e células A375 de melanoma humano. As análises morfológicas para os outros componentes teciduais do tumor como grânulos de melanina, figuras de mitose e vasos sanguíneos apresentaram um potencial em reduzir, enquanto infiltrado inflamatório apresentou potencial para aumentar. Mesmo que esses dados não sejam significativos, não deixam de ser dados atrativos. Como a busca por novos compostos antitumorais requer compostos que inibem a proliferação celular, aumentem a morte celular e recrutem células do sistema imune como estratégia para combater as células do tumor, esses dados indicam o SRVIC30 como um promissor composto para o tratamento do melanoma.

Em relação à análise histológica da pele dos animais do presente estudo, encontrou-se extensa área de infiltrado inflamatório na derme daqueles tratados com SRVIC30. Greay et al. (2010) também encontraram inflamação dermal decorrente do tratamento tópico de melanoma com o óleo de *Melaleuca alternifolia* (tea tree). Durante o tratamento, esse óleo induziu a inflamação na pele e os autores relataram que essa inflamação era necessária para o efeito antitumoral do composto. Em seus achados, os autores perceberam presença abundante de neutrófilos e uma densa infiltração de macrófagos, mastócitos e linfócitos. Portanto, eles sugeriram que o tratamento tópico com o óleo poderia agir através da ativação local do sistema imune. Jury et al. (2005) correlacionaram maiores níveis de inflamação, devido ao tratamento tópico de queratose actínica com imiquimod e 5-FU (Fluorouracila), com a diminuição da lesão na pele, evidenciando que a inflamação provavelmente é requerida para a eficácia de tratamentos anticâncer tópicos. Outro estudo relatou a ação imunomoduladora de um composto, substrato para esfingosina cinase, em células de melanoma murino (Pereira et al., 2013). Esse composto foi capaz de induzir a apoptose, limitar o desenvolvimento de metástases *in vivo* e modular o sistema imune, corroborando a ideia de que muitos compostos antitumorais agem por meio da modulação do sistema imune. Assim, o modelo animal utilizado no presente estudo é interessante para avaliar imunoterapias e estudar a relação entre células imune e câncer (Klarquist e Janssen, 2012). Portanto, maior atenção deve ser dada a compostos com atividade imunomoduladora, visto que são promissores na busca da cura do câncer.

## 5. CONCLUSÕES

Conclui-se que o SRVIC30 administrado por via tópica e peritumoral foi capaz de gerar maior área de morte celular no tumor e infiltrado inflamatório na pele dos animais tratados com o composto. Além disso, o SRVIC30 não apresentou danos tóxicos aos animais, embora tenha aumentado os níveis de peroxidase, indicando estresse oxidativo no tumor dos animais tratados pela via tópica. Portanto, ainda que o composto não tenha reduzido o volume tumoral, na concentração e tempo testados, os dados indicam o SRVIC30 como um composto antitumoral promissor para o tratamento do melanoma.

## 6. REFERÊNCIAS

American Cancer Society. **Cancer facts & figures 2013**. Atlanta: American Cancer Society; 2013.

\_\_\_\_\_. **Treatment of Melanoma Skin Cancer, by Stage**. Disponível em <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/by-stage.html>>. Acesso em: 20 de jun. 2017a.

\_\_\_\_\_. **Treatments and side effects**. Disponível em <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects.html>>. Acesso em: 20 de jun. 2017b.

Araki, S.; Dairiki, R.; Nakayama, Y.; Murai, A.; Miyashita, R.; Iwatani, M.; Nomura, T.; Nakanishi, O. **Inhibitors of CLK Protein Kinases Suppress Cell Growth and Induce Apoptosis by Modulating Pre-mRNA Splicing**. PLoS ONE. 2015; 10(1): e0116929.

Baharara, J.; Amini, E.; Nikdel, N.; Salek-Abdollahi, F. **The Cytotoxicity of Dacarbazine Potentiated by Sea Cucumber Saponin in Resistant B16F10 Melanoma Cells through Apoptosis Induction**. Avicenna J Med Biotechnol. 2016; 8(3).

Becker, J. C.; Houben, R.; Schrama, D.; Voigt, H.; Ugurel, S.; Reisfeld, R. A. **Mouse models for melanoma: a personal perspective**. Exp. Dermatol. 2010; 19:157–164.

Bobek, V.; Kolostova, K.; Pinterova, D.; Kacprzak, G.; Adamiak, J.; Kolodziej, J.; Boubelik, M.; Kubecova, M.; Hoffman, R. M. **A Clinically Relevant, Syngeneic Model of Spontaneous, Highly Metastatic B16 Mouse Melanoma**. Anticancer Res. 2010; 30:4799-4804.

Carvalho, A. A.; Costa, P. M.; Souza, L. G. S.; Lemos, T. D. G.; Alves, A. P. N. N.; Pessoa, C.; Moraes, M. O. **Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line *in vivo* and *in vitro* by biflorin**. Life Sci. 2013; 93:201–207.

Chen, J. S.; Pardo, F. S.; Wang-Rodriguez, J.; Chu, T. S.; Lopez, J. P.; Aguilera, J.; Altuna, X.; Weisman, R. A.; Ongkeko, W. M. **EGFR Regulates the Side Population in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma**. *Laryngoscope*. 2006; 116.

Da Silva, M.R.; Moreira, G. A.; Silva, R. A. G.; Barbosa, E. A. A.; Siqueira, R. P.; Teixeira, R. R.; Almeida, M. R.; Silva, A.; Fietto, J. L. R.; Bressan, G. C. **Splicing Regulators and their roles in cancer biology and therapy**. *BioMed Research International*.2015; 12 p.

Fidler, I. J. **Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis**. *Nature New Biology*. 1973; 242:148-149.

Figueiredo, C. R.; Matsuo, A. L.; Azevedo, R. A.; Massaoka, M. H.; Girola, N.; Polonelli, L.; Travassos, R. L. **A novel microtubule destabilizing complementarity-determining region C36L1 peptide displays antitumor activity against melanoma *in vitro* and *in vivo***. *Sci. Rep*. 2015; 5:14310.

Fukuhara, T.; Hosoya, T.; Shimizu, S.; Sumi, K.; Oshiro, T.; Yoshinaka, Y.; Suzuki, M.; Yamamoto, N.; Herzenberg, L. A.; Hagiwara, M. **Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(30): 11329-33.

Gammons, M. V.; Lucas, R.; Dean, R.; Coupland, S. E.; Oltean, S.; Bates, D. O. **Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma**. *British Journal of Cancer*.2014; 111: 477–485.

Garbe, C.; Terheyden, P.; Keilholz, U.; Kölbl, O.; Hauschild, A. **Treatment of Melanoma**. *Dtsch Arztebl Int*. 2008; 105(49): 845–51.

Ge, Y.; Zhang, X.; Zhang, J.; Hou, L.; Tian, R. **The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells**. *Int Immunopharmacol*. 2009; 9: 389–395.

Gout, S.; Brambilla, E.; Boudria, A.; Drissi, R.; Lantuejoul, S.; Gazzeri, S., Eymin, B. **Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma**. *PLoS One*. 2012; 7: e46539.

Greay, S. J.; Ireland, D. J.; Kissick, H. T.; Heenan, P. J.; Carson, C. F.; Riley, T. V.; Beilharz, M. W. **Inhibition of established subcutaneous murine tumour growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil**. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 66:1095–1102.

Grosso, A. R.; Martins, S.; Carmo-Fonseca, M. **The emerging role of splicing factors in cancer**. *European Molecular Biology Organization*.EMBO reports. 2008; 9: 1087-1093.

Hagiwara, M.; Fukuhara, T.; Suzuki, M.; Hosoya, T. **Method for Controlling Protein Phosphorylation, and Antiviral Agents Whose Active Ingredients Comprise Agents that Control SR Protein Activity**. United States Patent, v. US7569536 B2, 2009.

Hayes, G. M.; Carrigan, P. E.; Miller, L. J. **Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas**. *Cancer Research*.2007; 67: 2072–2080.

Huh, Y. H.; Kim, S. H.; Chung, K.; Oh, S.; Kwon, M.; Choi, H.; Rhee, S.; Ryu, J.; Park, Z. Y.; Jun, C.; Song, W. K. **Swiprosin-1 modulates actin dynamics by regulating the F-actin accessibility to cofilin.** Cell Mol Life Sci. 2013; 70:4841–4854.

Imai, Y.; Yamagishi, H.; Ono, Y.; Ueda, Y. **Versatile inhibitory effects of the flavonoid-derived PI3K/AKT inhibitor, LY294002, on ATP-binding cassette transporters that characterize stem cells.** Clin Transl Med. 2012; 1:24.

Jury, C. S.; Ramraka-Jones, V. S.; Gudi, V.; Herd, R. M. **A randomized trial of topical 5% 5-fluorouracil (Efudix® cream) in the treatment of actinic keratoses comparing daily with weekly treatment.** Br J Dermatol. 2005; 153:808–810.

Kamran, M. Z.; Gude, R. P. **Preclinical evaluation of the antimetastatic efficacy of Pentoxifylline on A375 human melanoma cell line.** Biomed. Pharmacother. 2012; 66:617–626.

Karimkhani, C.; Green, A. C.; Nijsten, T.; Weinstock, M. A.; Dellavalle, R. P.; Naghavi, M.; Fitzmaurice, C. **The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015.** B J Dermatol. 2017.

Khanna, C.; Hunter, K. **Modeling metastasis *in vivo*.** Carcinogenesis. 2005; 26 (3):513-523.

Klarquist, J. S.; Janssen, E. M. **Melanoma-infiltrating dendritic cells - Limitations and opportunities of mouse models.** OncoImmunology. 2012; 1(9):1584–1593.

Kuzu, O. F.; Nguyen, F. D.; Noory, M. A.; Sharma, A. **Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research.** Cancer Growth Metastasis. 2015; 8(S1):81–94.

Kwon, M. S.; Park, K. R.; Kim, Y. D.; Na, B. R.; Kim, H. R.; Choi, H. J.; Piragyte, I.; Jeon, H.; Kyung, H. C.; Woo, K. S.; Eom, S. H.; Jun, C. D. **Swiprosin-1 is a novel actin bundling protein that regulates cell spreading and migration.** PLoS ONE. 2013; 8(8): e71626.

Liu-Smith, F.; Dellinger, R.; Meyskens Jr, F. L. **Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression.** Arch Biochem Biophys. 2014; 0:51–55.

Luo, Y.; Ellis, L. Z.; Dallaglio, K.; Takeda, M.; Robinson, W. A.; Robinson, S. E.; Liu, W.; Lewis, K. D.; McCarter, M. D.; Gonzalez, R.; Norris, D. A.; Roop, D. R.; Spritz, R. A.; Ahn, N. G.; Fujita, M. **Side Population Cells from Human Melanoma Tumors Reveal Diverse Mechanisms for Chemoresistance.** J Invest. Dermatol. 2012; 132:2440–2450.

Moreira, G. A. **Efeito Citotóxico e Antimetastático da Inibição das Cinases SRPKs em Células de Melanoma Cutâneo.** Dissertação. 78f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

Morooka, S.; Hoshina, M.; Kii, I.; Okabe, T.; Kojima, H.; Inoue, N.; Okuno, Y.; Denawa, M.; Yoshida, S.; Fukuhara, J.; Ninomiya, K.; Ikura, T.; Furuya, T.; Nagano, T.; Noda, K.; Ishida, S.; Hosoya, T.; Ito, N.; Yoshimura, N.; Hagiwara, M. **Identification of a Dual Inhibitor of**

**SRPK1 and CK2 That Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice.** Mol Pharmacol. 2015; 88:316–325.

Novaes, R. D.; Gonçalves, R. V.; Marques, D. C. S.; Cupertino, M. C.; Peluzio, M. C. G.; LEITE, J. P. V.; Maldonado, I. R. S. C. **Effect of Bark Extract of *Bathysa cuspidata* on Hepatic Oxidative Damage and Blood Glucose Kinetics in Rats Exposed to Paraquat.** Toxicol. Pathol. 2012; 40:62-70.

Pereira, F. V.; Arruda, D. C.; Figueiredo, C. R.; Massaoka, M. H.; Matsuo, A. L.; Bueno, V.; Rodrigues, E. G. **FTY720 induces apoptosis in B16F10-NEX2 murine melanoma cells, limits metastatic development *in vivo*, and modulates the immune system.** Clinics. 2013; 68(7): 1018-1027.

Picardo, M.; Maresca, V.; Eibenschutz, L.; De Bernardo, C.; Rinaldi, R.; Grammatico, P. **Correlation Between Antioxidants and Phototypes in Melanocytes Cultures. A Possible Link of Physiologic and Pathologic Relevance.** J Invest Dermatol. 1999; 113(3):424-425.

Richard, V.; Nair, M. G.; Kumar, T. R. S.; Pillai, M. R. **Side Population Cells as Prototype of Chemoresistant, Tumor-Initiating Cells.** BioMed Res. Int. 2013.

Rodrigues, E. G.; Dobroff, A. S. S.; Cavarsan, C. F.; Paschoalin, T.; Nimrichter, L.; Mortara, R. A.; Santos, E. L.; Fázio, M. A.; Miranda, A.; Daffre, S.; Travassos, L. R. **Effective Topical Treatment of Subcutaneous Murine B16F10-Nex2 Melanoma By the Antimicrobial Peptide Gomesin.** Neoplasia. 2008; 10:61–68.

Sadhu, S. S.; Wang, S.; Dachineni, R.; Averineni, R. K.; Seefeldt, T.; Xie, J.; Tummala, H.; Bhat, G. J.; Guan, X. ***In Vitro* and *In Vivo* Antimetastatic Effect of Glutathione Disulfide Liposomes.** Cancer Growth Metastasis. 2017; 10: 1–11.

Silva, C. F. N.; Melo, G. P.; Bernardes, S. S.; Cecchini, A. A. **Experimental models of *in vivo* murine melanoma.** Biosaúde. 2013; 15(2).

Siqueira, R. P.; Barbosa, E. A. A.; Polêto, M. D.; Righetto, G. L.; Seraphim, T. V.; Salgado, R. L.; Ferreira, J. G.; Barros, M. V. A.; Oliveira, L. L.; Laranjeira, A. B. A.; Almeida, M. R.; Júnior, A. S.; Fietto, J. L. R.; Kobarg, J.; Oliveira, E. B.; Teixeira, R. R.; Borges, J. C.; Yunes, J. A.; Bressan, G. C. **Potential Antileukemia Effect and Structural Analyses of SRPK Inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl) Isonicotinamide (SRPIN340).** PLoS ONE. 2015; 10(8): e0134882.

Siqueira, R. P.; Barros, M. V. A.; Barbosa, E. A. A.; Onofre, T. S.; Gonçalves, V. H. S.; Pereira, H. S.; Júnior, A. S.; Oliveira, L. L.; Almeida, M. R.; Fietto, J. L. R.; Teixeira, R. R.; Bressan, G. C. **Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs).** Eur J Med Chem. 2017; 134:97-109.

Sosa, V.; Moliné, T.; Somoza, R.; Paciucci, R.; Kondoh, H.; Lleonart, M. E. **Oxidative stress and cancer: an overview.** Ageing Research Reviews. 2013; 12(1):376-90.

Wang, Z.; Wang, D.; Liu, L.; Guo, D.; Yu, B.; Zhang, B.; Han, B.; Sun, X.; Zheng, Q. **Alteronol inhibits the invasion and metastasis of B16F10 and B16F1 melanoma cells *in vitro* and *in vivo***. Life Sciences. 2014; 98:31-38.

Woźniak, A.; Drewa, G.; Woźniak, B.; Schachtschabel, D. O.; Mila-Kierzenkowska, C.; Drewa, T.; Olszewska-Słonina, D.; Sopońska. **The effect of antitumor drugs on oxidative stress in B16 and S91 melanoma cells *in vitro***. M. Med Sci Monit. 2005; 11(1): BR22-29.

Wu, Q.; Chang, Y.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Tian, T.; Feng, G.; Zhou, S.; Zheng, Q.; Han, F.; Huang, F. **SRPK1 Dissimilarly Impacts on the Growth, Metastasis, Chemosensitivity and Angiogenesis of Glioma in Normoxic and Hypoxic Conditions**. Journal of Cancer. 2013; 4: 727–735.

Yamaura, M.; Mitsushita, J.; Furuta, S.; Kiniwa, Y.; Ashida, A.; Goto, Y.; Shang, W. H.; Kubodera, M.; Kato, M.; Takata, M.; Saida, T.; Kamata, T. **NADPH Oxidase 4 Contributes to Transformation Phenotype of Melanoma Cells by Regulating G2-M Cell Cycle Progression**. Cancer Res. 2009; 69(6):2647-2654.

Zhao, K.; Wei, L.; Hui, H.; Dai, Q.; You, Q. D.; Guo, Q. L.; Lu, N. **Wogonin suppresses melanoma cell B16F10 invasion and migration by inhibiting ras-mediated pathways**. PLoS ONE. 2014; 9(9): e106458.

Zhou, Z.; Fu, X. D. **Regulation of Splicing by SR proteins and SR Protein-Specific Kinases**. Chromosoma. 2013; 122(3): 191–207.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, a padronização da concentração de células B16-F10 a serem inoculadas no dorso de camundongos C57BL/6 possibilitou a formação de um modelo animal adequado para o prosseguimento com os estudos *in vivo* do nosso grupo de pesquisa. Os resultados do experimento de padronização do modelo subcutâneo indicaram que a melhor concentração celular a ser utilizada para a indução dos tumores é a concentração de  $2 \times 10^5$  células. Após a padronização do modelo, o efeito da inibição das *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs) foi avaliado e, embora não tenha reduzido o volume tumoral, mostrou um aumento das áreas de morte celular nos grupos tratados por ambas as vias de administração e maiores níveis de peroxidase nos animais tratados com o SRVIC30 pela via tópica. Além disso, o composto permitiu o recrutamento de células do sistema imune para a pele, evidenciado pela presença de infiltrado inflamatório na mesma. Por fim, SRVIC30 não causou efeitos tóxicos para o animal. Portanto, sabendo que o uso do SRVIC30 em modelo animal de melanoma subcutâneo é inédito e que o mesmo gerou resultados significativos no tumor sem causar efeitos tóxicos aos animais, esse composto se torna promissor para o tratamento do melanoma.

Em vista dos inúmeros efeitos colaterais causados pelas terapias atuais e da ineficácia das mesmas, o presente trabalho procurou averiguar o efeito de um composto em potencial para o tratamento do melanoma. Estudos com modelos animais são importantes e funcionam como base para os estudos da fase clínica. Deste modo, o presente trabalho apresentou informações importantes acerca da atividade e da toxicidade do SRVIC30, favorecendo a continuidade dos estudos com esse composto.

Como perspectivas, propõem-se estudos mais aprofundados sobre a região próxima ao tumor por meio da análise histológica, para avaliar se o composto está interferindo apenas nas células de melanoma e não nas células normais. Análises de citocinas também devem ser feitas a fim de avaliar se o SRVIC30 influencia o padrão de citocinas secretado e, por meio delas, modula a resposta imune local. Testes moleculares deverão ser feitos para avaliar a expressão de SRPKs, VEGF, Bax, Bcl-2 e de fatores de *splicing* no tumor após o tratamento com o composto. Além disso, estudos pré-clínicos acerca da eficácia e segurança do composto devem ser realizados, de forma a permitir o uso do SRVIC30 em estudos da fase clínica. Por fim, sugerem-se novos estudos relacionando tempo de exposição e concentração do composto para melhor verificar o efeito promissor do composto.