

DAISY MACHADO

“Modulação da agressividade do melanoma por flavinas”

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DAISY MACHADO

“Modulação da agressividade do melanoma por flavinas”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Daisy Machado</u> <u>Ferreira</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder
Co-Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Mika Shishido

CAMPINAS,
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M18m Machado, Daisy, 1981-
Modulação da agressividade do melanoma por
flavinas / Daisy Machado. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Carmen Veríssima Ferreira Halder.
Coorientador: Silvia Mika Shishido.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Melanoma. 2. Riboflavina. 3. Metaloproteinase.
4. Agressividade. 5. Proteínas Hedgehog. I. Ferreira,
Carmen Veríssima, 1969-. II. Shishido, Silvia Mika. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Modulation of melanoma aggressiveness by flavins

Palavras-chave em Inglês:

Melanoma

Irradiated riboflavin

Metalloproteinase

Agressiveness

Hedgehog

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carmen Veríssima Ferreira Halder [Orientador]

Maurício da Silva Baptista

Silvy Stuchi Maria-Engler

Carmen Silvia Passos Lima

Alessandro dos Santos Farias

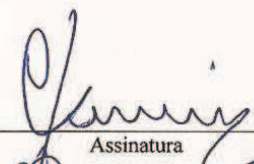
Data da defesa: 02-07-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

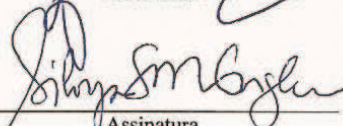
Campinas, 02 de Julho de 2012

BANCA EXAMINADORA

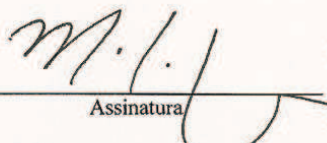
Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler


Assinatura

Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista


Assinatura

Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima


Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

Prof. Dr. Angelo de Fátima

Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Donizeti Martins Cavagis

Assinatura

Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias


Assinatura

“Não acrescente dias a sua vida, mas vida no seu dia.”

Harry Benjamin

Dedicatória

À Família Machado

Meus pais *Wanderlúcio e Neuza*,
pessoas que me guiaram até este momento com muito amor e cuidado,
a quem devo minha vida e meus princípios,
pessoas que me espelho para um dia poder constituir uma família e ser feliz com ela;

Meus irmãos *Henilson, Denise e Neilson*,
amigos e companheiros,
sempre com muita paciência;
Meus avôs '*in memorian*',
pessoas que iluminam o meu caminho, levando-me a vitórias e conquistas;

Minha tia *Cristina*,
sempre presente, defensora número um dos sobrinhos,
alguém que quer agradar a todos.

O meu muito obrigado por tudo.

Amo todos vocês.

Agradecimento

À Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira.

Há seis anos a Profa. Carmen abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse estagiar e aprender Bioquímica, para dar início ao meu grande sonho de fazer Pós Graduação na UNICAMP. Com esta oportunidade fiz mestrado e doutorado sob a supervisão dessa mulher, profissional e mãe que eu tenho como inspiração para ser alguém melhor. Agora preciso seguir o meu caminho, mas antes tenho que agradecer a pessoa maravilhosa que me ensinou a ser a profissional que sou. Além disto, agradeço por ter tido a chance de carregar profissionalmente o seu nome junto ao meu. Obrigada!

À Profa. Dra. Silvia Mika Shishido.

Já escrevi, apaguei e reescrevi diferentes agradecimentos a esta pessoa tão importante na minha vida. Todos não expressaram aquilo que realmente ela merece e acredito que nunca conseguirei fazê-lo. Meus olhos enchem de lágrimas só de pensar/relembrar tudo que fez por mim, tudo que vivemos, todo o sentimento que aconteceu entre nós e todos aqueles que nos cercaram com muita alegria.

Tenho a grande felicidade de sempre tropeçar em anjos/pessoas iluminadas em diferentes fases da minha vida. Na UNICAMP não foi diferente, DEUS me presenteou com a felicidade de ter a Mika iluminando a minha vida como um todo. Agradecer simplesmente é muito pouco, não sei o quê dizer, o quê escrever.

Obrigada por ser a pessoa que é e ajudar-me a ser uma pessoa melhor.

Têm tantas formas de agradecer as pessoas, mas é sempre difícil expressar no dia a dia o que realmente sentimos por elas. Às vezes, somos mal interpretados nas nossas atitudes, palavras, mas quando gostamos/amamos sempre tentamos fazer o melhor. Aqui tentarei lembrar e dizer algo para agradecer a todos que de uma forma direta ou indireta me ajudaram nesta conquista.

Sempre fui bem querida pela Família Costa (**Tonho e Tia**) e Takano (**Tia Carmen, Dayane, Thais e Claudio**), fazem tudo para o meu bem, para ter um sorriso no meu rosto, tento dar o melhor de mim para merecer fazer parte destas famílias.

Eles me ajudaram a crescer e acompanharam tudo, não só eles. Meus velhos, queridos e verdadeiros amigos **Thiago, Fagner, Aline e Marli**, sempre estiveram presentes dando apoio, ouvindo, falando, sorrindo e chorando comigo, nunca me abandonaram.

Quando decidi pela Pós Graduação e comecei no laboratório, apareceram grandes amigos para o resto da vida, **Ana Carolina, Rodrigo e Mika**, que até hoje são pessoas importantes tanto para a minha vida profissional quanto pessoal. É até difícil escrever algo que expresse o quanto eles são importantes para mim. Aos poucos fui conhecendo meus amigos de lab **Cláudia, Denise, Willian, Antônio e Paula** e de república, que mesmo não sendo minha eu vivi lá como se fosse membro, **Alex Rafacho e Géssika**, pessoas estas com quem aprendi a trabalhar em grupo, a respeitar as diferenças; tivemos bons e maus momentos, mas com eles eu cresci.

Logo percebi que não existia somente o Laboratório de Bioensaios e Transdução de Sinal e sim uma linda união entre ele e o Laboratório de Enzimologia, que tem como responsável uma pessoa ímpar, sincera, iluminada, a qual eu tive a honra de conhecer e

poder aprender um pouco - **Prof. Hiroshi**. Além do professor, conquistei a amizade de pessoas importantes como a **Erika, Luciana (Luli), Camila, Roberta e Mirian**.

É lógico que durante estes seis anos eu tive a honra de conhecer pessoas que foram importantes para a minha formação, dentre eles estão professores como: **Marcelo Lancellotti, Eneida, Denise** e funcionários como: **Andréia Vigilato, Marina Andressa e Silvia**. Amigos de corredor como **Paulo Gandra, Fernando Catanho e Luciana Hollanda** que aos poucos viraram amigos do dia a dia, das festas e da vida, eles são tão importantes que a saudade machuca.

Mas como a vida são ciclos alguns partiram, outros chegaram como a **Júlia, Halley, Pablo, Sarah, Karin, Milena e Cintia**, e cada um deles conquistou-me com seu carisma. E são nestes ciclos que as oportunidades aparecem e precisamos agarrá-las porque elas não voltam. Graças à presença de outra pessoa iluminada que apareceu na minha vida, tive a coragem de dizer sim para a minha ida a Amsterdam-Holanda. Escrever algo sobre o **Gilbert** para mim é difícil porque do professor de inglês, passou para meu confidente, meu psicanalista e agora é meu amigo que tem sempre um ombro amigo nos momentos mais difíceis.

Os seis meses na Holanda fortaleceram muito a minha amizade com a **Roberta e Bispo**, mas lá conheci uma pessoa de um caráter ímpar, divertida, companheira que é a **Karla**, a qual gostaria de não perder o contato, porque é uma pessoa que sempre tem algo para ensinar. Mas é claro que não só eles foram importantes, conheci melhor o marido da Karla, o **Arie**, que é uma pessoa muito simpática e calorosa. A distância das pessoas que amamos foi difícil e esta situação fortaleceu o que sinto por pessoas especiais como **Ítalo e**

Ricardo as quais sempre com a sua preocupação e palavras secavam cada lágrima de saudade que eu pudesse sentir.

Hoje estou novamente perto fisicamente destes que citei e cada momento com eles é uma alegria. Agradecê-los seria pouco, quero é estar presente na vida de cada um deles e espero que meu olhar cheio de lágrimas simbolize que meu sentimento é muito verdadeiro e que tudo valeu a pena. Amo vocês e a saudade que sinto quando não nos vemos e falamos machuca muito. Obrigada por permitir que eu entrasse nas suas vidas e assim pegar um pedacinho de cada um de vocês para me tornar uma pessoa cada vez melhor.

Além de todas estas pessoas citadas acima, gostaria de agradecer ao **Dr. C. Arnold Spek** que me recebeu em seu laboratório em Amsterdam durante seis meses os quais me proporcionaram um desenvolvimento pessoal e profissional. Ao grupo do Dr. C. Arnold Spek: **Karla, Roberta, Hella, Lois, Jean Willen, Kum, Lin, Keren, Marieke e Joost** por todo o apoio. Aos professores que aceitaram o convite de participar da minha banca de qualificação **Dr. Jörg Kobarg, Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão e Dra. Luciana Hollanda**. E aos professores que aceitaram o convite para a defesa desta tese **Dr. Maurício da Silva Baptista, Dra. Silvy Stuchi Maria Engler, Dra. Carmen Silvia Passos Lima e Dr. Alessandro dos Santos Farias**, suas colocações foram importantes para tornar esta tese melhor compreendida.

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio.”

(Martin Luther King Jr.)

Agradecimento Especial às seguintes Instituições:



Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP) - Processo 2009/00144-7 e 2010/50356-8



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas



Center for Experimental and Molecular Medicine, Academisch Medisch Centrum,

Universiteit van Amsterdam, The Netherlands

Resumo

Melanoma é o tipo mais agressivo de tumor de pele e uma das principais causas de morte por tumor de pele, devido a sua alta capacidade metastática. Em termos de estratégias terapêuticas de combate ao melanoma tem-se dado ênfase no controle da resistência e da metástase. Nosso grupo de pesquisa observou que a riboflavina irradiada (RFi) induz apoptose de células de câncer de próstata, renal e leucemia mielóide. Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi utilizar a RFi para modular química e geneticamente as vias de transdução de sinal associadas com a sobrevivência, resistência e agressividade do melanoma. Assim, neste trabalho estão apresentados os dados sobre a influência da RFi em diferentes aspectos metabólicos das células de melanoma murino (B16F10), tais como: citotoxicidade, adesão, invasão, migração, capacidade de formação de colônia e em mediadores de transdução de sinal: Src quinase, mTOR e componentes da via sonic hedgehog. Em todos os experimentos a riboflavina (RF) foi previamente irradiada com UVA (dose de 9 J/cm²). Foi observado inibição da proliferação celular com valor de IC₅₀ de 50 µM. De forma interessante, RFi na faixa de concentração de nanomolar foi eficiente na inibição da formação de colônias. Além disso, causou a redução da adesão das células B16F10, quando utilizada na concentração de 1 µM. A capacidade de migração e invasão das células de melanoma foi reduzida na presença da RFi, nas concentrações de 1 e 30 µM respectivamente, porém a resposta foi independente da dose. A atividade e expressão das metaloproteinases foram diminuídas na presença de RFi, indicando inibição na capacidade de invasão. Sob o contexto de sinalização a RFi modulou negativamente a via sonic hedgehog, PI3K/mTOR e aumentou a expressão da p53 e PTEN. O conjunto de resultados obtidos nesse trabalho mostra que flavinas são candidatas promissoras para a intervenção farmacológica do melanoma.

Abstract

Melanoma is the most aggressive type of skin disorder and a major cause of death by skin's disease due to its highly metastatic ability. In terms of melanoma therapeutic strategies has given emphasis on control of resistance and metastasis. Our group observed that irradiated riboflavin (RF) induces apoptosis of prostate cancer cells, kidney cancer cells and myeloid leukemia. Therefore, the goal of this study was to employ irradiated RF for modulating chemical and genetically signal pathways associated with melanoma survival, resistance and aggressiveness. Thus, in this manuscript data about the influence of RF in different cellular metabolic aspects of murine melanoma (B16F10) such as cytotoxicity, adhesion, invasion, migration, colony formation and signal transduction mediators Src kinase, mTOR and sonic hedgehog components, will be presented. In all experiments the RF was previously irradiated with UVA (dose of 9 J/cm²). Inhibition of cell proliferation was observed with IC₅₀ value of 50 µM. Interestingly, RF in a nanomolar concentration inhibited the formation of colonies. In addition, 1 µM irradiated RF caused a reduction of B16F10 cells adhesion. The ability of migration and invasion of melanoma cells was reduced in the presence of RF, however, those cells response was dose-independent. The activity and expression of metalloproteinases were diminished indicating reduction of cellular invasiveness capacity. Sonic hedgehog and PI3K/mTOR pathways were negatively modulated and the expression of p53 and PTEN were increased in melanoma cells treated with irradiated RF. The findings showed in this study brought out flavins as promising candidates for pharmacological intervention of melanoma.

Lista de Abreviaturas

2H11: células de endotélio murino
 λ : comprimento de onda
 $\mu\text{g/mL}$: micrograma por mililitro
 μL : microlitros
 μm : micrômetro
 μM : micromolar
A549: células de câncer de pulmão
AKT: proteína quinase B
Apaf-1: fator 1 de ativação de proteases pró-apoptóticas
B16F10: células de melanoma murino
BCC: carcinoma de células basais
Bcl-2: proteína relacionada à sobrevivência celular
Bcl-x_L: proteína relacionada à sobrevivência celular
CaCl₂: cloreto de cálcio
cIAP: proteína inibidora de apoptose
cm²: centímetros quadrados
CO₂: dióxido de carbono
CR: crescimento radial
CV: crescimento vertical
DMEM: meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA: ácido desoxirribonucleico
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF: fator de crescimento epidérmico
EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico
FAD: flavina adenina dinucleotídeo
FAK: quinase de adesão focal
FMF: formilmetilflavina
FMN: flavina mononucleotídeo
Fyn: tirosina quinase protooncogênica, pertencente à família Src
GSK3: glicogênio sintase quinase 3
h: hora
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HaCaT: células imortalizadas de queratinócitos humanos
HCl: ácido clorídrico
Hh: Hedgehog
HL60: células leucêmicas
IC₅₀: concentração do composto que diminui em 50% a viabilidade celular
JAK: Janus quinase
J/cm²: joule por centímetro quadrado
LC: lumicromo
Lck: proteína tirosina quinase específica de linfócitos, pertencente à família Src
LF: lumiflavina
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

Mcl-1: proteína indutora de diferenciação de células leucêmicas mielóides
 MDR: resistência à múltiplas drogas
 mg/mL: miligramas por mililitros
 min: minuto
 mL: mililitros
 mm: milímetro
 mM: milimolar
 MMP: metaloproteinase
 mTOR: proteína serina/treonina quinase alvo da rapamicina em mamíferos
 MTT: 3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio
 m/v: massa/volume
 NaCl: cloreto de sódio
 NaF: fluoreto de sódio
 nM: nanomolar
 nm: nanometro
 NHI3T3: células de fibroblasto de camundongo
 O₂: oxigênio
 O₂^{•-}: radical superóxido
¹O₂:oxigênio singleto
[•]OH: radical hidroxila
 OH⁻: hidroxila
 p53: proteína 53 ou proteína de tumor 53
 PBS: solução tampão fosfato
 PC3: células de câncer de próstata
 PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
 PET: polietileno tereftalato
 pH: potencial hidrogeniônico
 PI: iodeto de propídeo
 PI3K: fosfatidilinositol-3 quinase
 PKA: proteína quinase dependente de AMP cíclico
 PTCH: Patched
 PTEN: proteína fosfatase homóloga de tensina
 PTP: proteína tirosina fosfatase
 PVDF: polivinilideno fluorido
 RF: riboflavina
³RF*: estado excitado de riboflavina triplete
 RF^{•-}: radical ânion de riboflavina
 RF_i: riboflavina irradiada
 RF_{ox}: riboflavina oxidada
 RF_{red}: riboflavina reduzida
 RNA: ácido ribonucleico
 rpm: rotação por minuto
 S: substrato
 S^{•+}: radical cátion do substrato
 SCC: carcinoma de células escamosas
 SDS: dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino
SHH: Sonic Hedgehog
SMO: smoothened
Src: proteína tirosina quinase proto-oncogênica Src ou pp60c-src
STAT: proteína transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição
TBS: tampão salino Tris
TBS-t: tampão salino Tris com Tween
TIMP: inibidor de metaloproteinase de tecido
UV: radiação ultravioleta
UVC: radiação ultravioleta de comprimento de onda de 280 a 200 nm, também conhecido como onda curta ou “germicida”
VEGF: fator de crescimento vascular endotelial
v/v: volume/volume

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Estrutura da Pele	2
1.2.	Câncer de Pele e Melanoma	2
1.3.	Metástase	3
1.4.	Resistência	8
1.5.	Riboflavina	9
1.6.	Potenciais Alvos Moleculares Para o Controle da Agressividade do Melanoma Avaliados Neste Trabalho	13
1.6.1.	Sonic Hedgehog	13
1.6.2.	Metaloproteinase	15
1.6.3.	Src quinase	15
1.6.4.	mTOR	17
2.	Objetivo	19
3.	Materiais e Métodos	21
3.1.	Materiais	22
3.2.	Métodos	22
3.2.1.	Cultura de Células	22
3.2.2.	Obtenção da Riboflavina Irradiada	23
3.2.3.	Teste de Permeabilidade	23
3.2.4.	Teste de Formação de Vaso	23
3.2.5.	Ensaio de Citotoxicidade	24

3.2.5.1.	Ensaio de Viabilidade Celular Através da Redução do MTT (3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio)	24
3.2.5.2.	Ensaio de Viabilidade Celular Utilizando Pré-Tratamento com Inibidor de Gli e Smoothened e Agonista da Via da Sonic Hedgehog	24
3.2.6.	Teste de Formação de Colônia	25
3.2.7.	Proliferação Celular por BrdU	25
3.2.8.	Ensaio de Adesão Celular	26
3.2.8.1.	Adesão Celular em Placas de Cultura de Células	26
3.2.8.2.	Adesão Co-cultura	26
3.2.9.	Ensaio de Migração Celular	27
3.2.9.1.	<i>Scratch assay</i>	27
3.2.9.2.	Migração com FluoroBlok	27
3.2.9.2.1.	Migração	27
3.2.9.2.2.	Transmigração	27
3.2.10.	Análise da Expressão de Proteínas por <i>Western Blotting</i>	28
3.2.11.	Zimografia	29
3.3.	Análise Estatística	29
4.	Resultados e Discussão	30
4.1.	Avaliação da Citotoxicidade da Riboflavina Irradiada Através da Redução do MTT	31
4.2.	Avaliação da Proliferação Celular a partir da Incorporação do BrdU e Formação de Colônia	32

4.3.	Avaliação da Adesão das Células de Melanoma Tratadas com Riboflavina Irradiada	36
4.4.	Efeito da Riboflavina Irradiada na Migração das Células de Melanoma	39
4.5.	Influência da Riboflavina Irradiada sobre Marcadores Moleculares da agressividade do Melanoma	44
4.5.1.	Hedgehog	44
4.5.2.	Metaloproteinase	49
4.5.3.	Proteínas Src e mTOR	51
4.6.	Avaliação da Permeabilidade e Capacidade de Formação de Vasos pela Riboflavina Irradiada	56
5.	Conclusões	59
6.	Referência Bibliográfica	61
7.	Anexo	70
7.1.	Anexo – Curriculum durante o doutorado	71
7.2.	Artigo submetido	75

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura da Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha funções essenciais à homeostase do organismo como todo, tais como regulação da temperatura do organismo, impede a perda de água excessiva, eliminação de toxinas e proteção contra agentes nocivos externos. Para que a pele possa exercer estas funções a mesma depende da ação conjunta de todas as células que a compõem e da integridade dos seus constituintes moleculares. Em termos estruturais a pele é dividida em três camadas (Gonzalez, 2010, Robbins e Cotran, 2005):

Hipoderme - camada mais profunda da pele formada por vasos sanguíneos e células de gordura.

Derme - camada intermediária da pele constituída por fibras de colágeno, elastina e glicosaminoglicanos responsáveis pela firmeza, elasticidade e equilíbrio da pele. Nesta camada encontram-se as glândulas sebáceas, folículo piloso, glândulas sudoríparas, vasos sanguíneos, fibras de colágeno/elastina, terminações nervosas e fibroblastos.

Epiderme - camada mais superficial da pele responsável pela proteção frente a agentes externos, a qual apresenta profundidade diferente dependendo da região do organismo. É constituída pelos queratinócitos (células produtoras de queratina), melanócitos (células produtoras de melanina) e células de Langerhans (células do sistema imune).

1.2. Câncer de Pele e Melanoma

Carcinoma de células basais (BCC) e carcinoma de células escamosas (SCC), denominados cânceres não-melanoma, são as neoplasias cutâneas mais comuns originadas de células epiteliais (Owens e Watt, 2003; Green e Khavari, 2004). O melanoma se origina dos melanócitos que se intercalam com as células epiteliais. No Brasil, o câncer de pele é o mais frequente e corresponde a 25% de todos os tumores registrados no país. O número de

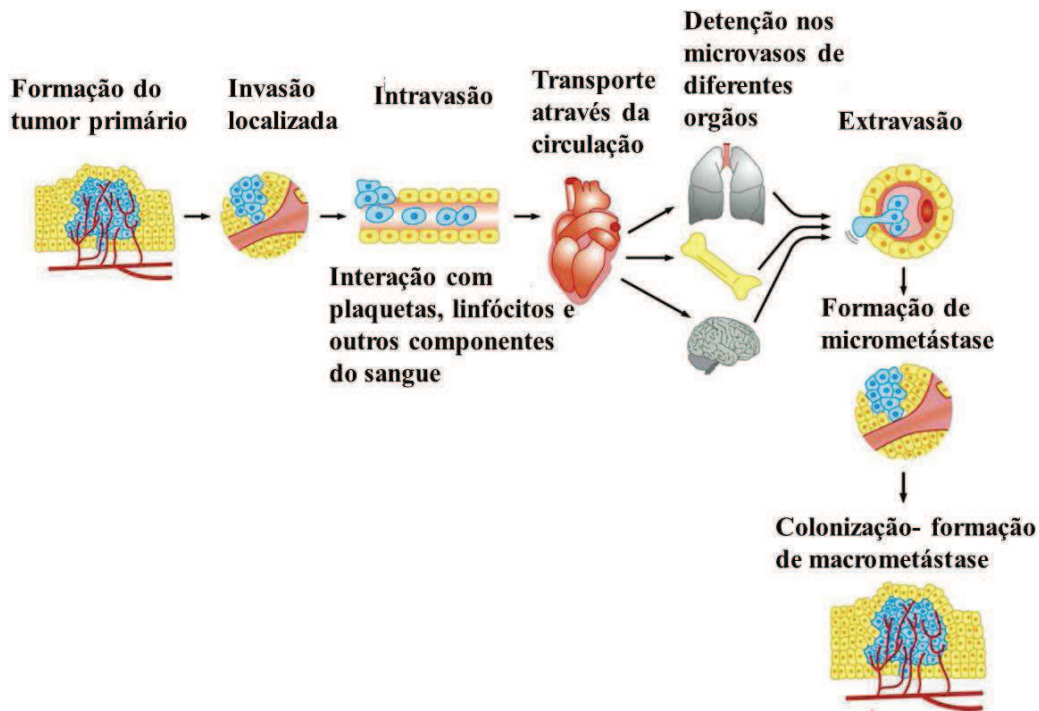
casos novos de câncer de pele não-melanoma corresponde a um risco estimado de 65 casos novos a cada 100 mil homens e 71 para cada 100 mil mulheres. Em geral, o aumento contínuo nas taxas de incidência de melanoma reflete a mudança de padrões de exposição do sol e o uso de cabines de bronzeamento por mulheres jovens, levando à de lesões que não detectadas podem levar ao desenvolvimento da doença (Simard *et al.*, 2012). Apesar de o melanoma representar apenas 4% das neoplasias malignas da pele, é considerado o mais grave devido à sua alta capacidade metastática e sua alta letalidade. Acomete principalmente os caucasianos que moram em países com alta intensidade de radiação ultravioleta. No entanto, esse tipo de câncer afeta todos os grupos étnicos em alguma proporção. Se detectado em estádios iniciais, os melanomas são curáveis e seu prognóstico é considerado bom (Estimativa INCA, 2012). Siegel e colaboradores (2012) mostraram que nos Estados Unidos a letalidade e mortalidade do melanoma estão aumentando. Além disto, o mesmo grupo mostrou que a chance de desenvolvimento do melanoma aumenta com a idade. A Organização Mundial de Saúde estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer, sendo que o maior efeito incidirá em países de baixa e média renda (Estimativa INCA, 2012). Quando os melanomas são detectados em estágios iniciais, os mesmos são curáveis. No entanto, quando o melanoma já se encontra em um grau mais avançado, normalmente apresenta metástase e resistência a quimioterápicos, portanto, o tratamento se torna extremamente ineficaz.

Durante o desenvolvimento do melanoma ocorre uma disfunção geral do balanço queratinócitos/melanócitos (Satyamoorthy e Herlyn, 2002; Postovit *et al.*, 2008). Inicialmente a razão melanócito/queratinócito aumenta, resultando na formação de verrugas comuns, os quais levam às verrugas displásticas com estrutura irregular. A verruga displástica pode subsequentemente progredir para um melanoma na fase de crescimento radial (CR), caracterizada pelo crescimento lateral confinada na epiderme. O tumor na fase de CR pode então adquirir a habilidade de invadir a derme e o tecido subcutâneo e formar

um melanoma em fase de crescimento vertical (CV). Ao contrário do melanoma na fase CR que depende de fatores de crescimento derivados de queratinócitos, os melanomas na fase CV escapam do controle dos queratinócitos e podem crescer de forma independente de ancoragem, adquirindo competência metastática (Hsu *et al.*, 2002; Chin, 2003; Bennett, 2008). Os principais locais de metástase de melanoma são fígado, linfonodos e cérebro. Uma vez ocorrida a metástase em linfonodos, a taxa de sobrevivência pelo período de 5 anos é de 13 a 69%, dependendo do número de linfonodos afetados. Com metástase visceral esta taxa cai para 6% aproximadamente e a média de sobrevivência a partir da data de diagnóstico é de 7,5 meses (Chudnovsky *et al.*, 2005).

1.3. Metástase

Enquanto a remoção cirúrgica e terapia adjuvante podem curar de maneira eficiente tumores primários que estejam localizados (confinados), tumores metastáticos são praticamente incuráveis devido à natureza sistêmica e resistência das células a agentes terapêuticos. Este fato explica porque mais de 90% das mortes por câncer resultam de metástases (Gupta e Massagué, 2006). Portanto, o grande desafio para o tratamento eficiente do câncer é impedir e/ou reverter o processo metastático. A metástase é a capacidade de um tumor maligno de estabelecer sítios secundários em tecidos funcionalmente não relacionados com aquele que o originou. Durante a disseminação metastática, uma célula de câncer de um tumor primário executa a seguinte sequência de etapas: invasão localizada, intravasão, sobrevivência na circulação sanguínea, extravasão, formação de micrometástases, colonização (Chaffer e Weinberg, 2011; Fidler, 2003) (Esquema 1)

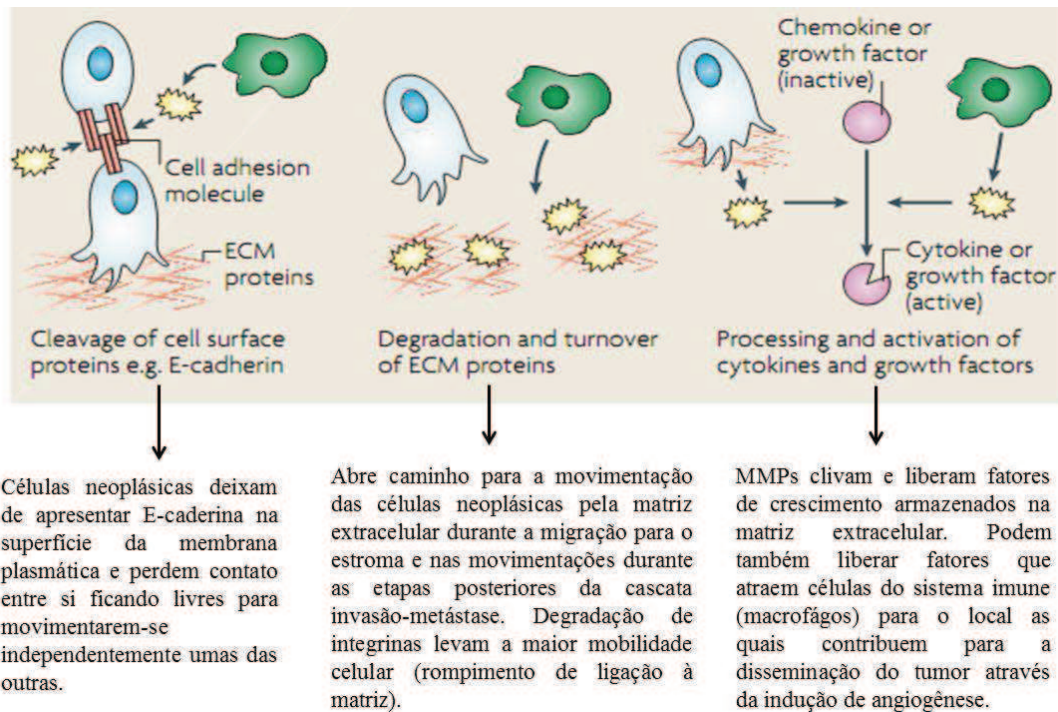


Esquema 1: Etapas da disseminação metastática. O tumor primário invade o local e posteriormente adquire a capacidade de invasão no sistema linfático e sanguíneo. Através da circulação sanguínea atinge outros órgãos no qual consegue extravasar e iniciar a formação de outro tumor, micrometástase, que evolui para a macrometástase (modificado Fidler, 2003).

Na etapa de invasão localizada as células neoplásicas epiteliais do tumor primário devem romper a membrana basal que as separa do estroma. Uma variedade de células estromais no ambiente circundante é recrutada para tumores, e estas não só aumentam o crescimento do câncer primário, mas também facilitam sua difusão metastática para órgãos distantes (Chamber *et al.*, 2002). Existem duas teorias para o processo de invasão que são: (1) invasão localizada por células tronco tumorais: esta hipótese baseia-se no princípio de que os tumores são formados por populações heterogêneas de células que se replicam de maneira limitada. Nesse caso as células tronco tumorais seriam responsáveis por manter o tumor através de suas capacidades peculiares como a de auto-renovação; (2) invasão

localizada por transição epitelial-mesenquimal: baseia-se no fato de que a transição epitelial-mesenquimal transforma fenotipicamente as células tumorais fazendo com que ganhem habilidades necessárias para invadir a membrana basal e outros tecidos. Durante a transição as células neoplásicas adquirem um fenótipo mesenquimal (fibroblástico) que as confere maior capacidade invasiva (Nguyen *et al.*, 2009).

A troca de E-caderina por N-caderina faz com que as células neoplásicas percam contato com as células epiteliais e ganhem contato com as estromais, portanto aumentando a invasividade. Contudo, o aumento de contato com as células estromais não resulta em aprisionamento das células neoplásicas no estroma já que as ligações célula-célula mediadas por N-caderinas são bem menos adesivas que as mediadas por E-caderinas. Outro evento de grande importância para o ganho de potencial invasivo e metastático durante a transição epitelial-mesenquimal é a estimulação de produção e liberação de proteases como as metaloproteinases (MMPs). Células neoplásicas altamente invasivas e metastáticas secretam grandes quantidades de MMP-2 e MMP-9 (Joyce e Pollard, 2009) (Esquema 2).



Esquema 2: Hipótese da invasão localizada por transição epitelial-mesenquimal. As células neoplásicas conseguem movimentar-se livremente, posteriormente conseguem romper as suas ligações com a matriz. Proteases como as metaloproteínas (MMPs) auxiliam no processo de invasão através da clivagem de proteínas (Joyce e Pollard, 2009).

Durante a intravasão as células neoplásicas adentram os capilares de vasos sanguíneos e linfáticos e podem ser levadas a locais distantes. A produção de proteases por células neoplásicas e macrófagos auxilia na degradação da membrana basal e das proteínas que mediam a ligação entre as células endoteliais. Nos vasos sanguíneos as células tumorais circulantes (*cancer circulating cells*) devem resistir a indução de morte programada por desligamento de um substrato sólido (anoikis), às forças hidrodinâmicas do sangue, ao ataque de células do sistema imune, etc. A migração das células neoplásicas pelo sangue é acompanhada por sua ligação à plaquetas e esta interação é utilizada como uma forma de proteção durante o período que as células neoplásicas estão na corrente sanguínea (Joyce e Pollard, 2009).

Mesmo que uma célula neoplásica consiga sobreviver às etapas anteriores da disseminação metastática, conseguir invadir o parênquima do tecido do órgão-alvo não é um processo simples. Cada tipo de tumor primário tem predileção a órgãos específicos. Paget criou a teoria “seed and soil” que diz que as células malignas (“seed- sementes”) gradualmente adquirem alterações genéticas e epigenéticas que conferem as mesmas habilidades de deixarem o tumor primário, sobreviver na circulação sanguínea e prosperar em locais distantes. Esse “solo” (soil- órgão) deve ter características que permitam a célula metastática aderir e proliferar, enquanto outros “solos” não apresentam essas características (Fidler, 2003). Atualmente, sabe-se que as células tumorais adquirem alterações que as capacitam a selecionar os tecidos alvos, poderiam produzir fatores que “preparam” certos órgãos para sua invasão; o microambiente dos órgãos alvo pode selecionar as células tumorais devido a sua estrutura anatômica e a produção de fatores de atração, além disto, padrões de circulação sanguínea privilegiam a formação de metástases em alguns órgãos em detrimento de outros (Joyce e Pollard, 2009).

1.4. Resistência

O processo de resistência de células tumorais a quimioterápicos é um mecanismo multifatorial, cujos detalhes moleculares ainda são poucos conhecidos. A resistência a quimioterápicos é um dos principais obstáculos no tratamento de pacientes com câncer. Por esta razão, a elucidação dos mecanismos que conferem resistência a fármacos com diferentes alvos e estruturas químicas e o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para o tratamento do câncer, têm sido as principais metas dos pesquisadores da área, nos últimos anos (O'Connor, 2007; Baguley, 2010). A resistência a quimioterápicos pode se manifestar clinicamente logo nos estágios iniciais de tratamento, constituindo o fenômeno de resistência *de novo* ou ser induzida durante a quimioterapia quando são selecionadas células resistentes ao tratamento. Em consequência, observa-se que resistência genética

pode ser induzida tanto pelo próprio tratamento com agentes anti-neoplásicos ou emergir como um evento espontâneo (Baguley, 2010; Logue e Morrison, 2012).

Os mecanismos de resistência de melanomas a drogas podem envolver a desregulação de proteínas da família Bcl-2, desregulação da atividade da Apaf-1, mutações no gene *PTEN/MMAC1* que leva à inativação da proteína PTEN, mutações em proteínas quinases como *BRAF* deixando-a constitutivamente ativa, aumento na expressão das bombas de efluxo (proteínas da família MDR/P-glicoproteína) e alteração na atividade da topoisomerase (Hu e Xuan, 2008; Kim, 2010; Pratheeshkumar *et al.*, 2012).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de fármacos para alvos específicos, a quimioterapia tradicional ainda se mantém como opção preferencial de escolha nos protocolos terapêuticos do câncer. No entanto, a eficácia desses protocolos ainda se encontra abaixo do esperado. Portanto, o entendimento do metabolismo tumoral no contexto da transdução de sinal, bem como a identificação de alvos que possam permitir maior eficiência terapêutica e melhor qualidade de vida do paciente, têm sido o grande desafio de pesquisas na área. No caso específico do melanoma, o inibidor da quinase BRAF foi considerado inicialmente como tendo grande potencial para o tratamento deste câncer. No entanto, vários pacientes se tornaram resistentes ao mesmo. Portanto, novos compostos com potencial antitumoral são atrativos para a indústria farmacêutica. Neste contexto, a riboflavina e seus fotoprodutos surgem como moléculas interessantes (Souza *et al.*, 2006; de Souza Queiroz *et al.*, 2007; Machado, 2009).

1.5. Riboflavina

A riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina) - (RF) é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B₂, apresenta coloração amarela e possui na sua estrutura uma cadeia ribitol e um sistema de anéis isoaloxazina (Figura 1).

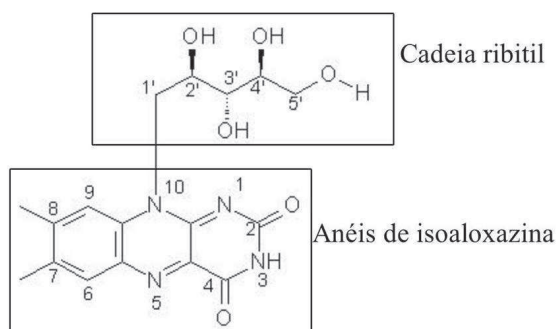
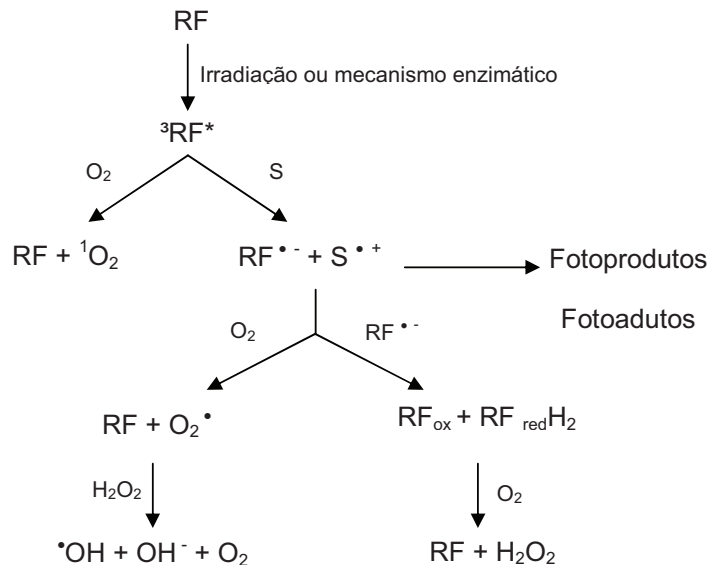


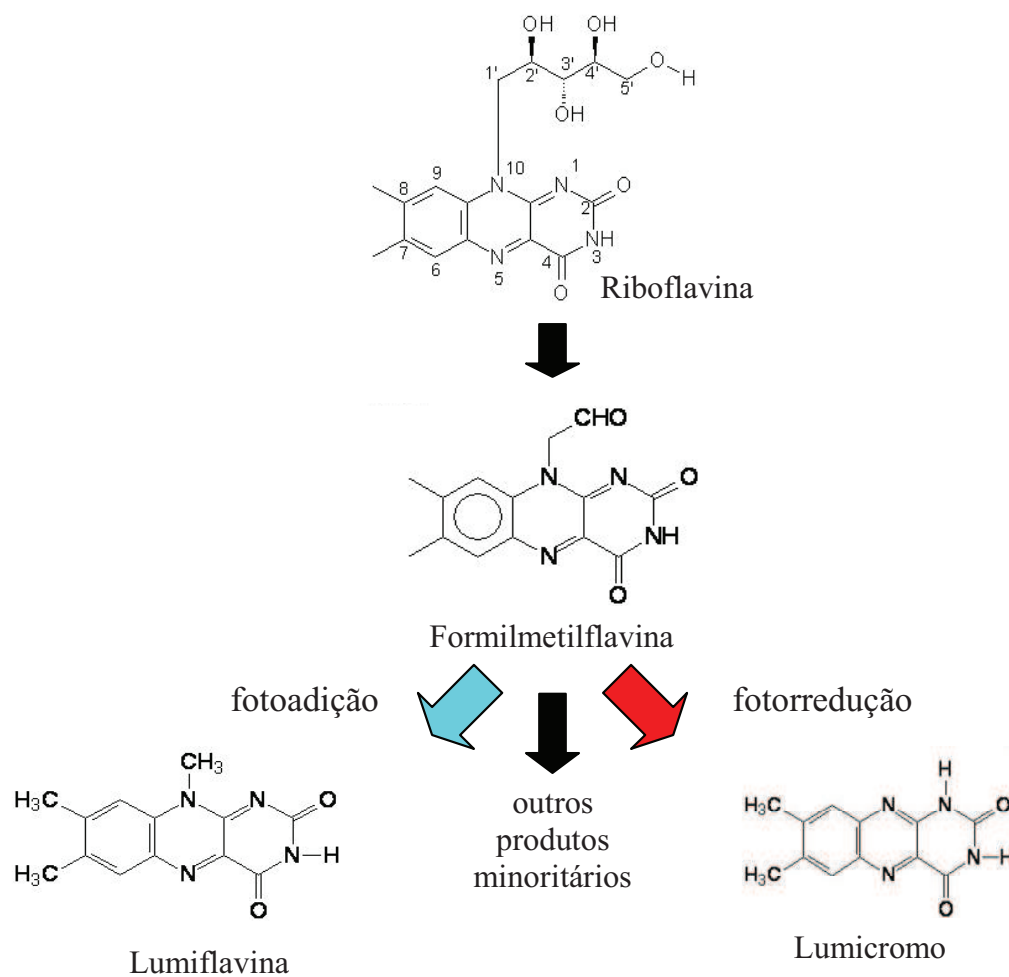
Figura 1: Estrutura da riboflavina com o seu sistema de anéis isoaloxazina e cadeia ribitol.

Essa vitamina está presente no plasma humano na concentração de 5 nM, além disso, é um componente das coenzimas FMN (flavina mononucleotídeo) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo), as quais participam de diversas reações de óxido-redução importantes no metabolismo (Hustad *et al.*, 1999). Há relatos que a RF apresenta outras funções biológicas como quimioproteção (Webster *et al.*, 1996), modulação do estado redox (Massey, 2000) e agente citotóxico/antitumoral (Edwards *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2006; de Souza Queiroz *et al.*, 2007). Tal vitamina também é um fotossensibilizador endógeno, apresentando sensibilidade à radiação UV e visível. A RF ao absorver luz atinge o estado triplete excitado que é desativado seguindo mecanismos do tipo I ou II. No mecanismo do tipo I, a RF no estado excitado age diretamente sobre o substrato levando a fotooxidação do mesmo e como consequência, ocorre a geração de radicais intermediários, além de espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio. No mecanismo do tipo II, a RF no estado excitado interage com o oxigênio molecular gerando oxigênio singlete (Esquema 3).



Esquema 3: Mecanismos tipo I e tipo II em presença de oxigênio molecular. $^3\text{RF}^*$ representa o estado excitado de flavina tripleto, S substrato alvo da riboflavina irradiada, $\text{RF}^{\bullet-}$ radical ânion de riboflavina, $\text{S}^{\bullet+}$ radical cátion do substrato, $^1\text{O}_2$ oxigênio singlete (Souza *et al.*, 2005).

A RF, como todas as flavinas, exibe fluorescência em solução aquosa com máxima emissão em $\lambda=520$ nm. As flavinas, de modo geral, quando irradiadas podem sofrer reações de fotorredução, fotodealquilação ou fotoadição (Heelis, 1982). A literatura mostra que na fotodecomposição da RF, a formilmetilflavina (FMF) é o principal intermediário o qual se hidrolisa formando o lumicromo (LC) e a lumiflavina (LF) como fotoprodutos majoritários (Heelis, 1982; Ahmad e Rapson, 1990; Ahmad *et al.*, 2004) (Esquema 4). De Souza Queiroz e colaboradores (2007) determinaram, por espectrometria de massa, que a RF preparada em meio de cultura e irradiada com UVC por 15 min, resultava em 79% de RF, 6,2% de lumicromo e 14,8% de uma mistura composta de formilmetilflavina, lumiflavina, 2-cetoriboflavina e 4-cetoriboflavina. Embora os fotoprodutos majoritários sejam conhecidos, uma determinação mais exata de todos os fotoprodutos formados é muito complexa, uma vez que praticamente todos eles mantêm a estrutura dos anéis (flavina) alterando apenas os grupos ligados ao N1 ou N10.



Esquema 4: Possíveis reações de fotodecomposição da RF. O lumicromo e a lumiflavina são os principais fotoprodutos

A capacidade fotossensibilizadora da RF em sistemas biológicos relaciona-se ao alto potencial redox de sua forma triplete ativada. Substâncias com capacidade fotossensibilizadora foram alvos de estudos na área de tratamento e prevenção de doenças com emprego de luz, tais como vitiligo e câncer (Jayanth *et al.*, 2002; Menichini *et al.*, 2012).

Nosso grupo demonstrou que a RF irradiada (RFi) apresenta efeito antitumoral em células da leucemia mielóide aguda (Souza *et al.*, 2006) e potencial anti-metastático em células de câncer de próstata (de Souza Queiroz *et al.*, 2007). Assim, torna-se extremamente atraente a idéia da utilização da RFi no controle da progressão do melanoma.

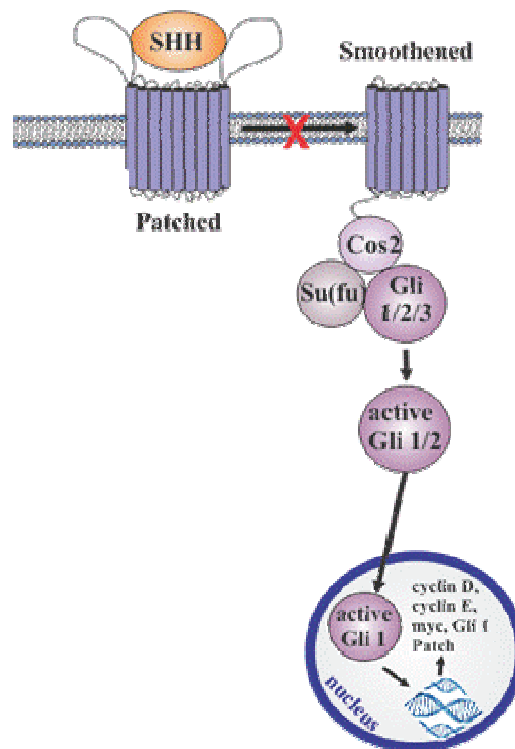
1.6. Potenciais Alvos Moleculares Para o Controle da Agressividade do Melanoma Avaliados Neste Trabalho

1.6.1. Sonic Hedgehog

A via Sonic Hedgehog (SHH) é essencial para o crescimento e diferenciação de células tronco e embrionárias (Beachy *et al.*, 2004). Hedgehog (Hh) é uma proteína solúvel secretada pelas células, que se liga ao transportador de membrana denominado Patched (PTCH), o qual regula a função de outra proteína de membrana, a smoothened (SMO), um receptor acoplado à proteína-G. A SMO ativa uma família de fatores de transcrição, denominada GLI (proveniente do oncogênico associado ao glioma), que regula os genes envolvidos na morfogênese do tecido (Esquema 5). A expressão de GLI1 é considerada o único marcador confiável para a avaliação da atividade da via SHH (Remsberg *et al.*, 2007).

A via hedgehog é necessária para o crescimento de várias neoplasias. Sabe-se que essa via se encontra desregulada em cânceres de mama, próstata, estômago, cólon, fígado, pâncreas, pulmão, mieloma múltiplo, carcinoma de células basais, meduloblastoma e melanoma (Li *et al.*, 2011). Embora o envolvimento da via hedgehog seja observado de forma mais freqüente em cânceres de pele não-melanoma, Stecca e colaboradores (2007) reportaram que a via SHH está ativa na matriz do folículo capilar humano, e que é necessária para a proliferação normal de melanócitos *in vitro*. Esta via também regularia a proliferação e sobrevivência de melanoma humano *in vivo*. Esses autores mostraram que a interferência local ou sistêmica na via hedgehog inibe o crescimento do melanoma e previne a recorrência e a metástase. Além disto, este grupo mostrou evidências de que a

sinalização endógena de Ras-MEK e AKT regulam a localização nuclear e atividade transcricional da GLI1 em melanoma. Quando bloqueada a atividade de MEK ou AKT esses autores observaram o aumento de GLI1 citoplasmático enquanto que, com suas atividades normais ocorria um aumento de GLI1 nuclear. Desta forma, a inibição de Ras/MEK ou AKT leva a uma inibição da via hedgehog. Assim, tais autores sugerem que a inibição da função da GLI diretamente ou através de uma estratégia combinatória de bloqueio das vias hedgehog e Ras-MEK e PI3K/AKT pode representar uma opção terapêutica para melanomas e muitos outros cânceres. Govindarajan e colaboradores (2007) mostraram que a ativação de AKT contribui para a progressão do melanoma, portanto a expressão exacerbada de AKT leva à regulação positiva de VEGF, com aumento da angiogênese e tumorigenicidade *in vivo*.



Esquema 5: Via Hedgehog. Quando a proteína hedgehog (Hh) se liga à Ptch, ocorre o desligamento da proteína SMO, levando a sua ativação, permitindo que a Gli se transloque para o núcleo ativando a via HH.

1.6.2. Metaloproteinase

Metástase é um processo complexo que envolve adesão, migração celular e proteólise da matriz extracelular e da membrana basal. Metaloproteinases (MMPs) fazem parte de uma família de endopeptidases dependentes de Zn^{2+} envolvidas na degradação dos constituintes da matriz extracelular e membrana basal e são produzidas nas células na forma de zimogênios. Ativados através da ação de enzimas proteolíticas que clivam os pró domínios resultando na ativação dos centros catalíticos. A MMP ativa é regulada em três níveis: síntese (primeiramente na transcrição), ativação do zimogênio e inibição da atividade proteolítica, por inibidores protéicos específicos chamados TIMPs (inibidor de metaloproteinases tecidual) (Rittié e Fisher, 2002). MMPs são comumente relacionadas com malignidade e metástase. Dentre as MMPs, as gelatinases A e B [MMP-2 (72 KDa) e MMP-9 (92 KDa)] respectivamente envolvem-se na proteólise e rompimento de membranas basais, degradação de colágenos tipo IV e V, colágenos desnaturados (gelatinas), fibronectina e elastinas (Lee *et al.*, 2010). As MMPs são reguladas por inúmeros mecanismos e diferentes vias de sinalização, sendo o processo dependente da atuação de citocinas e fatores de crescimento como EGF e TNF- α . Malaponte e colaboradores (2010) relatam que em pacientes com melanoma metastático os níveis de MMP-2 plasmáticos são maiores que os pacientes controles, que não apresentam tal doença. Assim as MMPs apresentam um importante papel na invasão do câncer através da degradação da matriz extracelular.

1.6.3. Src quinase

Src quinase é frequentemente associada com a progressão tumoral e é conhecida por promover a proliferação celular, sobrevivência, adesão, motilidade, invasão e angiogênese (Jones *et al.*, 2002; Buettner *et al.*, 2008; Fecchi *et al.*, 2012). Devido ao fato da Src exercer uma função crítica em muitas vias de sinalização, sua elevada expressão ou atividade está associada à metástase em sítios distantes (Qi *et al.*, 2006; Buettner *et al.*, 2008). A atividade da Src é regulada pela fosforilação e por interações intramoleculares envolvendo os

domínios SH2 e SH3. A fosforilação de Tyr-527 leva à ligação da região C-terminal ao seu domínio SH2 resultando em uma conformação fechada, inativando-a (Qi *et al.*, 2006).

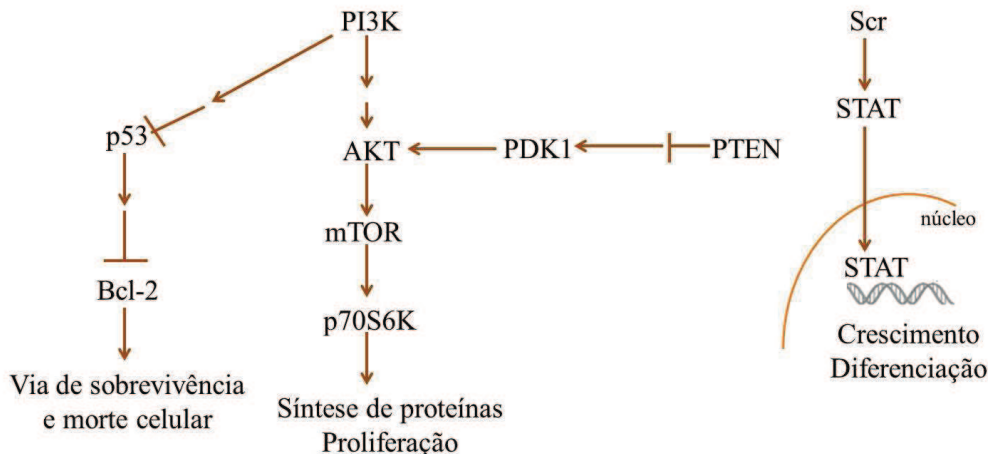
O aumento na expressão e/ou atividade da Src pode ativar transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) (Esquema 6). A ativação inapropriada das STATs ocorre com alta frequência em uma grande variedade de cânceres humanos: leucemias, mama, próstata e pulmão (Mirmohammadsadegh *et al.*, 2006). Mirmohammadsadegh e colaboradores (2006) observaram um aumento significativo da expressão de STAT5b e de proteínas envolvidas na ativação deste fator de transcrição, em aproximadamente 71% dos pacientes com melanoma cutâneo em fase de metástase. A STAT5 ativa parece exercer uma função importante na transformação maligna de melanócitos e crescimento de melanoma em peixes. No melanoma, a sinalização de STAT5 pode ser ativada por EGF, e é mediada pela tirosina quinase EGFR e pelas tirosina quinases do tipo não-receptor como Src e JAK1. Além disto, a inibição de Src abole a fosforilação de STAT5, inativando-a (Homsí *et al.*, 2007).

Niu e colaboradores (2002) mostraram que, interrompendo a via de sinalização Src-STAT3 ocorre uma redução na expressão de Bcl-x_L e Mcl-1 (proteínas pró-crescimento), sugerindo que a atividade de STAT3 em células de melanoma promove crescimento, pelo menos em parte, devido ao aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas.

Qi e colaboradores (2006) sugeriram que a ativação da Src pode promover um mecanismo de estabilização de β -catenina liberada da N-caderina. A β -catenina acumulada no núcleo ativaria a transcrição de genes envolvidos no aumento de invasão. Assim, esses autores relacionam o aumento da ativação da Src com o aumento da migração transendotelial de células de melanoma.

O estudo das vias de sinalização em cânceres humanos serve como ferramenta para identificação de alvos moleculares e consequentemente, para o desenvolvimento de terapias antitumoral racionalmente projetadas. Em particular, as vias que envolvem tirosinas quinases como a Src apresentam-se muito promissoras, uma vez que esta quinase encontra-

se constitutivamente ativada em vários tipos de tumores malignos, incluindo melanoma (Buettner *et al.*, 2008).



Esquema 6: Via PI3K/AKT e Src. Esquema simplificado da via da PI3K/AKT que culmina na sobrevivência/morte celular, com exemplo das proteínas que atuam nesta via p53 e Bcl-2, e síntese de proteínas/proliferação, como exemplo as proteínas mTor e p71S6K. A via da proteína Src quinase leva a ativação de STATs que serão fator de transcrição de proteínas relacionadas com o crescimento e diferenciação.

1.6.4. mTOR

mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) é uma serina/treonina quinase de 289KDa (Keith e Schreiber, 1995) e a serina/treonina quinase p70S6K1 é um dos destinos mais conhecidos de mTOR (Esquema 6). S6K1 também pode ser ativado por vias de sinalização como MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno). Apesar disto, a fosforilação de S6K1 em Thr389 por mTOR é necessária para sua ativação e os três locais de fosforilação identificados de S6K1 podem ser bloqueados por inibidores de mTOR (Dennis *et al.*, 1996).

Tendo em conta o papel fundamental de mTOR no crescimento celular e metabolismo, é previsível a existência de uma associação entre alterações na atividade de mTOR e estados patológicos, incluindo câncer. Faivre e colaboradores (2006a) mostraram que em linhagens celulares e em modelos murinos, ocorre aumento da ativação de mTOR

através de estimulação de oncogenes ou perda de supressores de tumor o que contribui para o crescimento do tumor, angiogênese e metástase. Assim, a sinalização mTOR é ativada em condições de desregulamentação de proliferação e em muitos tipos de câncer. Desregulamentação dos vários elementos da via mTOR (amplificação/mutação de PI3K, perda de função da PTEN, superexpressão de AKT, S6K1, 4EBP1 e eIF4E) foram relatada em câncer como o de: mama, ovário, renal, cólon e cânceres de cabeça e pescoço (Faivre *et al.*, 2006b).

Ativação de vias de sinalização da AKT/mTOR desempenha um papel no início de tumores epitelial, modulando os sinais extracelulares que controlam o crescimento celular, proliferação e apoptose (Populo *et al.*, 2011). Perda de PTEN, o inibidor da via PI3K, foi descrita em 30 a 50% dos melanomas e correlacionada com progressão do melanoma (Dai *et al.*, 2005). No melanoma, a maior expressão da proteína AKT ativa foi associada com progressão do tumor e menor sobrevivência dos pacientes (Meier *et al.*, 2005). Tumores agressivos exibem reduzida expressão PTEN (Abdel-Rahman *et al.*, 2006) e superexpressão de AKT fosforilada em Ser473 o que foi proposto como um sinal de piora no prognóstico (Saraiva *et al.*, 2005). Em geral, as alterações em componentes principais da via MAPK, tal como mutações em BRAF, e via da mTOR, perda PTEN e superexpressão de AKT, parecem ter influência substancial na progressão do melanoma, sendo precursores ligados à sobrevivência e quimioresistência em melanoma (Easton e Houghton, 2006). Tomados em conjunto, estes dados ressaltam a importância da sinalização de mTOR em câncer e reforçam a importância de mTOR como alvo na terapia contra o câncer.

Mediante as informações que foram discutidas até o presente momento foram escolhidas essas vias de sinalização por serem importantes indicadores de proliferação, metástase, angiogênese, crescimento e apoptose. Desta forma acreditamos que a RFI modula essas vias de sinalização diminuindo a massa tumoral, aumentando a qualidade de vida dos camundongos tratados e criando, talvez, uma nova forma de tratamento para pacientes acometidos pelo câncer de pele, o que torna este trabalho de grande relevância científica e médica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desse estudo foi avaliar o potencial da RFi em diminuir a agressividade do melanoma murino. Assim, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da RFi na viabilidade e proliferação das células B16F10;
- Verificar a influência da RFi na capacidade de formação de colônias pelas células de melanoma;
- Avaliar o efeito da RFi na migração e adesão das células B16F10;
- Avaliar o potencial anti-metastático da RFi através da análise da expressão e/ou atividade de metaloproteinases;
- Avaliar o efeito da RFi na expressão de proteínas da via Sonic Hedgehog (Gli-1, Patched, Suf(u)), Bcl-2, p-Src, PTEN;
- Examinar o efeito da RFi nas células de endotélio (2H11);

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

RF, ribonuclease A, iodeto de propídeo (PI), Triton X-100 e MTT (3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Cell Tracker Green CMFDA (5-clorometilfluoresceína diacetato) e marcador CFDA-SE (5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester) da Invitrogen. Kit para análise da proliferação através da incorporação ao DNA do BrdU e kit para detecção das bandas das proteínas por quimioluminescência-western blotting (Lumi-Light PLUS Western Blotting Substrate) foram adquiridos da Roche Applied Science. Kit para quantificação de proteína (BCATM Protein Assay Kit) foi adquirido da Thermo Scientific. Os inibidores utilizados ciclopamina e gant 61 foram da LC Laboratories e Calbiochem, respectivamente, e super ativador Sonic Hedgehog da R&D Systems. Os anticorpos β - actina, Bcl-2, p53, Patched, PI3K e Suf(u) foram adquiridos da Santa Cruz, Gli da Abcam e os demais anticorpos primários da Cell Signaling. Os anticorpos secundários utilizados foram da Dako.

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura de Células

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens de melanoma murino B16F10 e de endotélio murino 2H11 que foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Arnold Spek (Academic Medical Center, Amsterdam University). As células de queratinócitos humanos foram gentilmente cedidas pela Dr. Liudmila L. Kodach (Academic Medical Center, Amsterdam University). As células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e L-glutamina (2 mM) e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida com 5% de CO₂.

3.2.2. Obtenção da Riboflavina Irradiada.

As placas contendo as soluções estoque de RF, dissolvidas em meio DMEM sem soro, na concentração de 150 μ M, foram expostas à radiação UVA na dose de 9 J/cm². As irradiações foram feitas utilizando-se de uma lâmpada de UVA (UVL-28EL serie UV Lamp 365 nm UV/ 8 watt/ 115 V ~ 60 Hz/ 0,32 Amps, UVP), cuja irradiância foi determinada, em todas as irradiações, utilizando um radiômetro (UVX radiometer, UVP).

3.2.3. Teste de Permeabilidade

As células endoteliais, 2H11, foram plaqueadas em placas Transwell (6,5 mm de diâmetro e 0,4 μ m de poro) e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ até atingir a confluência. Posteriormente, os *inserts* foram colocados em placa nova, onde na parte superior foram colocados 200 μ L de meio sem soro na presença ou ausência de RFi e na parte inferior 1 mL de meio sem soro. Para cada 200 μ L de tratamento adicionaram-se 4 μ L de FITC (fluoresceína isocianetada). Como controle positivo foi utilizado tripsina (20 nM). Após, tempos específicos a fluorescência foi detectada.

3.2.4. Teste de Formação de Vaso

Adicionou-se matrigel (5 mg/mL) em placas de 24 poços e posteriormente foram colocados em estufa para polimerização. Após a polimerização do matrigel, as células 2H11 foram tripsinizadas, resuspendidas em PBS com 5% SFB e centrifugadas por 5 minutos a 1550 rpm. Ressuspendeu-se o *pellet* em meio sem soro e posteriormente a suspensão filtrada em *Cell Strainer* (BD Falcon, 40 μ m de poro, membrana de nylon). Foram adicionados em cada poço 300 μ L da suspensão de 2H11, na densidade 50.000 células, na presença ou ausência de diferentes concentrações de RFi, a concentração final de SFB foi de 2%. As células foram incubadas para a formação de tubos. Os valores

expressos representam a formação de tubos, sendo que em cada condição foram contados 5 campos.

3.2.5. Ensaios de Citotoxicidade

3.2.5.1. Ensaio de Viabilidade Celular Através da Redução do MTT (3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio).

As células B16F10 foram plaqueadas na densidade de 7×10^3 células/mL em placas de 96 poços, e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 24h. O meio foi substituído pela RFi (0-80 µM) diluída em meio suplementado. Após 24h de incubação, o meio de tratamento foi removido, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado meio sem soro contendo o corante MTT (0,5 mg/mL). Após incubação por 3h a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 µL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida no leitor de placas (Synergy HT, BioTek) em $\lambda=570$ nm. Os valores foram expressos em porcentagem de redução de MTT em relação ao controle, onde as células não foram expostas ao agente teste (Mosmann, 1983).

3.2.5.2. Ensaio de Viabilidade Celular Utilizando Pré-Tratamento com Inibidor de Gli e Smoothened e Agonista da Via da Sonic Hedgehog.

Plaqueou-se as células B16F10 a uma densidade de 7×10^3 células por poço em microplacas de 96 poços e cultivadas por 24h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Após este período, as células foram pré-tratadas por 6h com 5 µM de gant 61 (inibidor da proteína Gli), 5 µM de ciclopamina (inibidor de Smoothened) e 0,5 µg/mL de hedgehog (Hh). Após o término do pré-tratamento as células foram expostas ao composto teste como descrito anteriormente. Avaliou-se a viabilidade celular pelo teste de redução do sal de tetrazólio (MTT) e os valores de absorbância dos grupos pré-tratados foram comparados com os valores de absorbância das células sem pré-tratamento expostas à RFi.

3.2.6. Teste de Formação de Colônia

As células B16F10 foram plaqueadas na densidade de 100 células por poço em placas de 6 poços e cultivadas por 24h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Após este período, o meio foi substituído por diferentes concentrações de RFi (0-10 µM) diluído em meio suplementado. Após 10 dias de incubação, o meio de tratamento foi removido, os poços foram lavados com PBS e incubados com cristal violeta 0,2% m/v e glutaraldeído 6,0% v/v por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de corante e o número de colônias foi determinado com o auxílio de uma lupa. Os valores foram expressos em porcentagem de colônias em relação ao controle, onde as células não foram expostas à RFi.

3.2.7. Proliferação Celular por BrdU

A quantificação da proliferação celular foi baseada na medida da incorporação do BrdU (uma alternativa não radioativa para o ensaio de incorporação de [³H] timidina) durante a síntese de DNA. As células B16F10 foram plaqueadas na densidade de 7 x 10³ células por poço em microplacas de 96 poços específicas para medir quimioluminescência e cultivadas por 24 h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Após este período, o meio foi substituído por outro contendo RFi (0-60 µM) diluída em meio suplementado. Após 24h o BrdU foi adicionado ao tratamento e incubado por mais 3h a 37°C. Após este período, o meio foi removido e as células foram fixadas com solução de fixação (FixDenat) e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. A solução de fixação foi removida e o anticorpo secundário (anti-BrdU) foi adicionado e incubado por 1h, a temperatura ambiente e protegido da luz. As células foram lavadas 3 vezes por 5 minutos e o substrato foi adicionado após as lavagens. O substrato foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e a quimioluminescência foi detectada usando um leitor (Synergy HT, BioTek). Os valores foram expressos em porcentagem de quimioluminescência em relação ao controle, onde as células não foram expostas ao agente teste.

3.2.8. Ensaio de Adesão Celular

3.2.8.1. Adesão Celular em Placas de Cultura de Células

Para este ensaio foram utilizadas as células B16F10 na densidade de 2×10^5 células por poço na microplaca de 24 poços. As células foram centrifugadas (Hettich Zentrifugen) na densidade de plaqueamento, resuspendidas nas soluções de tratamento contendo RFi (0 a $40 \mu\text{M}$) e incubadas por 3h em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO_2 . Posteriormente o tratamento foi descartado e os poços foram lavados com PBS. Para verificar a quantidade de células aderidas foi utilizado o teste de viabilidade determinada pela redução do MTT, como descrito anteriormente. Os valores foram expressos em porcentagem de redução do MTT em relação ao controle, onde as células não foram expostas à riboflavina.

3.2.8.2. Adesão Co-cultura

Células endoteliais, 2H11, e de câncer de pulmão, A549, foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO_2 até atingir a confluência. Após este tempo, células B16F10 foram tratadas com marcador CFDA-SE ($1 \mu\text{M}$) e mantidas no banho maria a 37°C por 10 minutos. Posteriormente as células foram lavadas com meio contendo SFB e centrifugadas. Para verificar a eficiência do tratamento com CFDA-SE as células foram resuspensas e a fluorescência foi verificada em microscópio. Células B16F10 foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células/mL na presença ou ausência de RFi nas placas com as células endoteliais e de câncer de pulmão. Após 3h o sobrenadante foi descartado e as células aderidas foram tripsinizadas e colocadas em tubo FACS. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACScan (*Fluorescence Activated Cell Analyse* r- Facscan da Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) - software FlowJow 8.7).

3.2.9. Ensaio de Migração Celular

3.2.9.1. *Scratch Assay*

As células B16F10 foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células por poço em placa de 6 poços e incubadas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂ por 24h. Após as células atingirem a confluência, o meio foi retirado e feito um risco no centro do poço para a determinação da área de migração das células. O poço foi lavado duas vezes com PBS e em seguida a solução de RFi (1 e 10 µM) foi adicionada. As micrografias foram obtidas nos tempos 0 e 16h e os valores foram expressos como a razão da área ocupada (relação entre a área obtida em 0h e a área no tempo 16h) (Denker e Barber, 2002).

3.2.9.2. Análise da Migração celular através do FluoroBlok

3.2.9.2.1. Migração

Para este teste de migração as células B16F10 na densidade de 1×10^6 células/mL foram centrifugadas, lavadas com PBS, resuspendidas em meio sem soro contendo *Cell Tracker Green* CMFDA na concentração de 10 µM e incubadas por 1h em estufa úmida a 37°C contendo 5% CO₂. As células foram lavadas 3 vezes com PBS, resuspendidas novamente em meio com soro fetal bovino e incubadas por 1h em estufa. Foram utilizadas placas de 24 poços onde na parte inferior do *insert* (HTS FluoroBlok™ 8.0 µM colored PET Membrane Inserts for 24 well plates, BD Falcon) foi adicionado 600 µL de meio completo e na superior do *insert* 100 µL da suspensão celular com ou sem a RFi (30 e 50 µM) sem SFB. Como controle foi utilizado *insert* que na parte superior continha apenas RFi. A fluorescência de cada poços foi analisada a cada 2 minutos por 4h. No cálculo final foi retirado do valor das células tratadas com a fluorescência somente da RFi.

3.2.9.2.2. Transmigração

Para este ensaio os FluoroBlok foram plaqueados com células 2H11 e A549 e incubados em estufa úmida a 37°C contendo 5% CO₂ até atingir a confluência. Posteriormente os *inserts* foram colocados em outra placa, sem nenhuma solução na parte

de baixo do *insert*, para confirmação da confluência. Seguiram-se, posteriormente, o mesmo procedimento do experimento de migração (3.2.9.2.1.) citado acima.

3.2.10. Análise da Expressão de Proteínas por *Western Blotting*

As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 60 cm² e cultivadas por 24 h, a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente as células foram lavadas com PBS, tratadas com diferentes concentrações de RFi por 24 h. Após este período as células foram coletadas e centrifugadas por 5 min a 4000 rpm. O *pellet* foi coletado e lisado em 200 µL de tampão de lise 50 mM Tris -HCl [pH 7,4], 1% Tween 20, 0,25% deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM O-Vanadato, 1 mM NaF, e inibidores de proteases (1 µg/mL de aprotinina, 10 µg/mL de leupeptina e 1 mM 4-(cloridrato de fluoreto aminoetil benzosulfonila)) por 2 h em gelo. Os extratos proteicos foram centrifugados e a concentração de proteínas foi determinada pelo BCATM Protein Assay kit. Aos extratos foi adicionado tampão de amostra na proporção 1:1. Tampão de amostra: 2X dodecil sulfato de sódio (SDS), 100 mM Tris-HCl [pH 6,8], 200 mM de ditioneitol (DTT), 4% SDS, 0,1% azul de bromofenol e 20% de glicerol. Os extratos celulares foram resolvidos por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) e transferidos para membranas de PVDF. As membranas foram então bloqueadas em 5% de BSA em tampão salino Tris (TBS)-Tween 20 (0,05%) (TBS-t) e incubados “overnight” a 4°C com anticorpo primário Gli, Patched, Bcl-2, PTEN, p-Src (Tyr 416), p-mTor (Ser 2448), p53, PI3K, LMWPTP ou β-actina diluídos na proporção de 1:1000. Após lavagem em TBS-t, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição de 1:5000) em tampão de bloqueamento por uma hora, seguido por lavagem em TBS. A detecção das bandas foi realizada através de quimioluminescência.

3.2.11. Zimografia

Após 24h de tratamento o meio de cultura das células B16F10 foi coletado, centrifugado a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante coletado para a quantificação proteica pelo BCATM Protein Assay kit.

As metaloproteinases (MMP-2 e -9) foram fracionadas em gel de poliacrilamida a 12% contendo gelatina a 4%. Após o fracionamento, os géis foram lavados em solução aquosa de Triton X-100 (2% m/v) e incubados 18 h em tampão de proteólise (Tris-CaCl₂) a 37°C. O gel foi corado com solução contendo corante Coomassie Blue G-250 durante 3 h; em seguida, o gel foi descorado e fixado com uma solução contendo metanol 50% e glicerol 5% (Souza *et al.*, 2000). A análise das bandas foi realizada por densitometria pelo programa Scion Image.

3.3. Análise Estatística

Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados obtidos foram apresentados na forma de gráfico com seu respectivo desvio padrão. Para as análises estatísticas foi usado o programa one way ANOVA (e não paramétrico) com as amostras comparadas entre si pelo método de Tukey. Foram considerados significativamente diferentes os valores com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da Citotoxicidade da Riboflavina Irradiada Através da Redução do MTT

A fim de avaliar os efeitos da RF sobre as células de melanoma B16F10, de endotélio 2H11 e queratinócitos humanos HaCaT, a função mitocondrial das mesmas foi avaliada após exposição a RF ou sua forma irradiada com UVA. Pode-se observar que a RF não foi citotóxica para as linhagens (Fig. 2A). Quando as células foram expostas a RFi a mesma apresentou-se citotóxica para a linhagem de melanoma, com valor de IC_{50} em torno de 50 μ M. Importante notar que o efeito citotóxico da RFi foi menos intenso para as células endoteliais e queratinócitos (Fig. 2B). Além disto, foi realizado teste de citotoxicidade da RFi em diferentes tempos nas células de melanoma murino e os resultados obtidos mostraram que a RFi atua na viabilidade celular dos melanócitos de forma dose e tempo dependente (Fig. 2C). Estes dados reforçam os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo que também mostraram maior efeito citotóxico da RF, irradiada na lâmpada UVC, sobre células de câncer de próstata, PC3 (de Souza Queiroz *et al.*, 2007) e sobre células leucêmicas, HL60 (Souza *et al.*, 2006). O potencial citotóxico da RFi sobre melanoma murino indicou a necessidade de investir na definição do mecanismo molecular de ação da mesma, bem como na validação deste efeito *in vivo*.

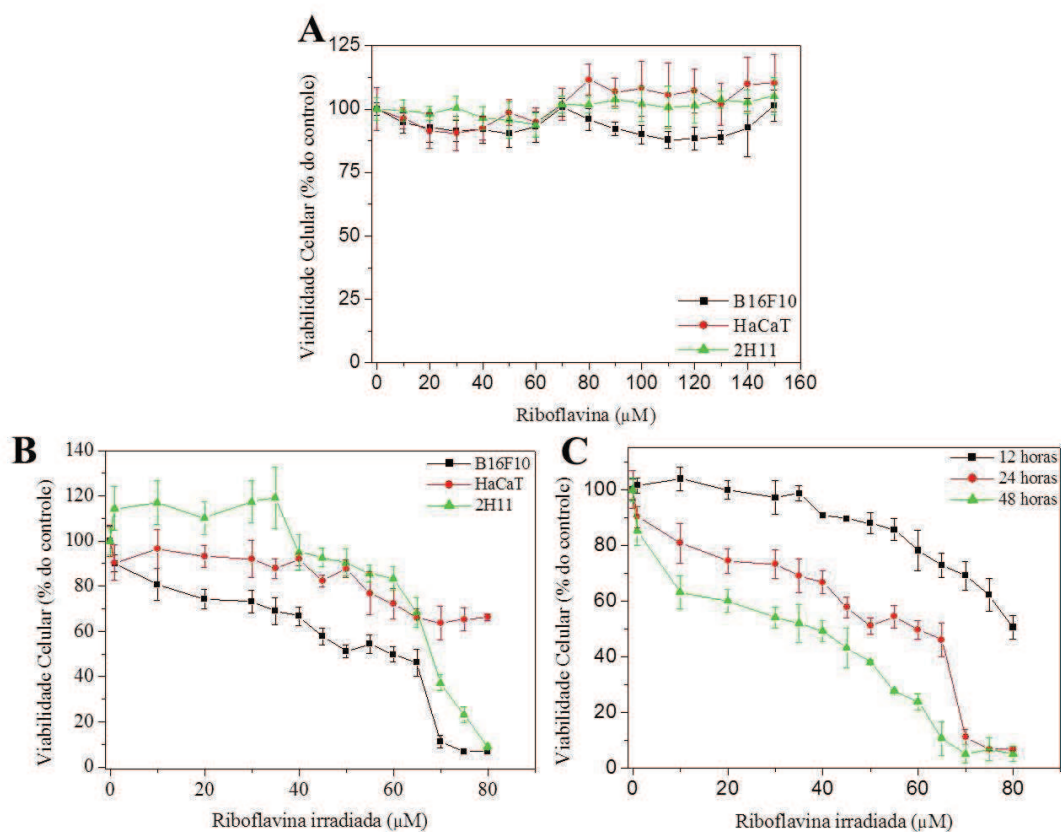


Figura 2: Avaliação da citotoxicidade da riboflavina e riboflavina irradiada em células B16F10, HaCaT e 2H11. As células B16F10(■-), HaCaT (-●-) e 2H11(-▲-) foram tratadas com diferentes concentrações de (A) RF e (B) RFi por 24h. (C) As células B16F10 foram tratadas em diferentes tempos 12 (-■-), 24 (-●-) e 48h (-▲-). Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas à RF ou RFi. O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvios padrão do experimento (ANOVA).

4.2. Avaliação da Proliferação Celular a partir da Incorporação do BrdU e Formação de Colônia

As células B16F10 foram tratadas com diferentes concentrações de RFi e após 24h de tratamento, a análise da incorporação do BrdU foi realizada. O BrdU é um método onde o bromodeoxiuridina, um análogo da timidina, é incorporado no DNA durante a divisão celular. A figura 3 mostra que a RFi induziu uma redução significativa na incorporação do

BrdU. As concentrações de RFi que reduzem em 50% a proliferação celular foram de 23,5 μ M na linhagem B16F10, sendo esse valor menor do que observado quando foi analisada a viabilidade pela redução do MTT.

Com relação à formação de colônias foi possível notar, em concentrações baixas de RFi (da ordem de nanomolar) as quais não afetam a viabilidade celular no tempo de 48 h, efeito significativo no número de colônias formadas. Na figura 4A observa-se que quando o número de colônias é normalizado, os valores encontrados para os tratamentos de 2 ou 10 dias são semelhantes. Adicionalmente quando se observa o diâmetro das colônias das células B16F10 (Fig. 4B) a resposta encontrada foi diferente para os tempos de tratamento. As células expostas ao tratamento por 10 dias apresentaram um diâmetro da colônia menor do que as tratadas por 2 dias, mostrando que a RFi realmente afetou a proliferação celular. Em acordo, Ohara e colaboradores (2003) demonstraram que a RF quando presente no meio de cultura e exposta a luz azul causou diminuição na capacidade de proliferação das células de melanoma B16. Os testes de proliferação através da incorporação do BrdU e formação de colônia foram realizados com a RF porém não houve alteração nenhuma com relação ao controle, mesmo em concentrações altas (resultados não apresentados).

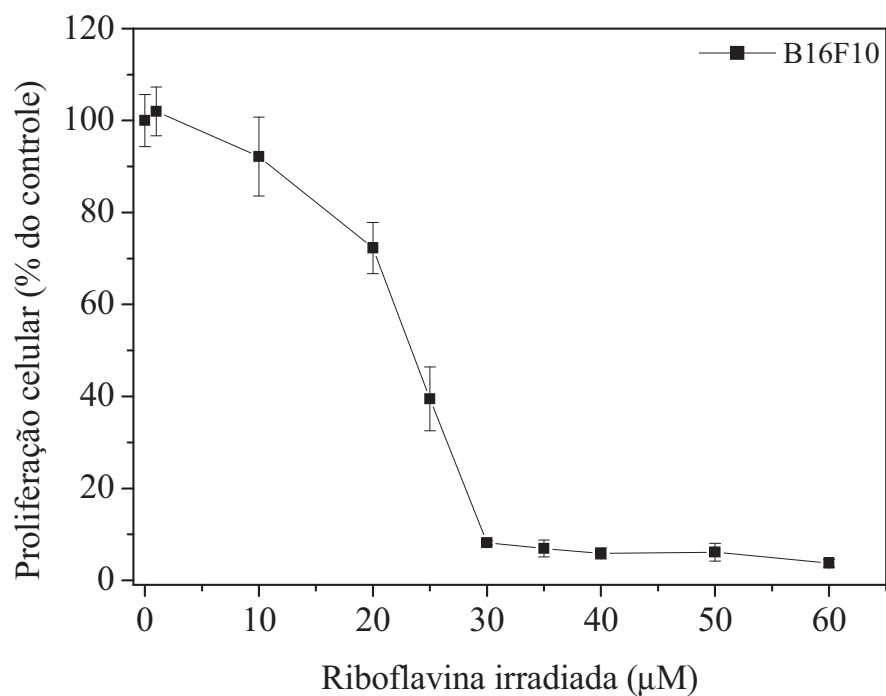


Figura 3: Avaliação da proliferação celular através da incorporação do BrdU em células B16F10 tratadas com riboflavina irradiada. As células B16F10 foram tratadas com diferentes concentrações de RFi por 24h. Após este período o BrdU foi adicionado e incubado por 3h. Os valores foram expressos em porcentagens de quimiluminescência em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas à RFi. O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços e os resultados representam as médias e desvio padrão de 3 experimentos independentes (ANOVA).

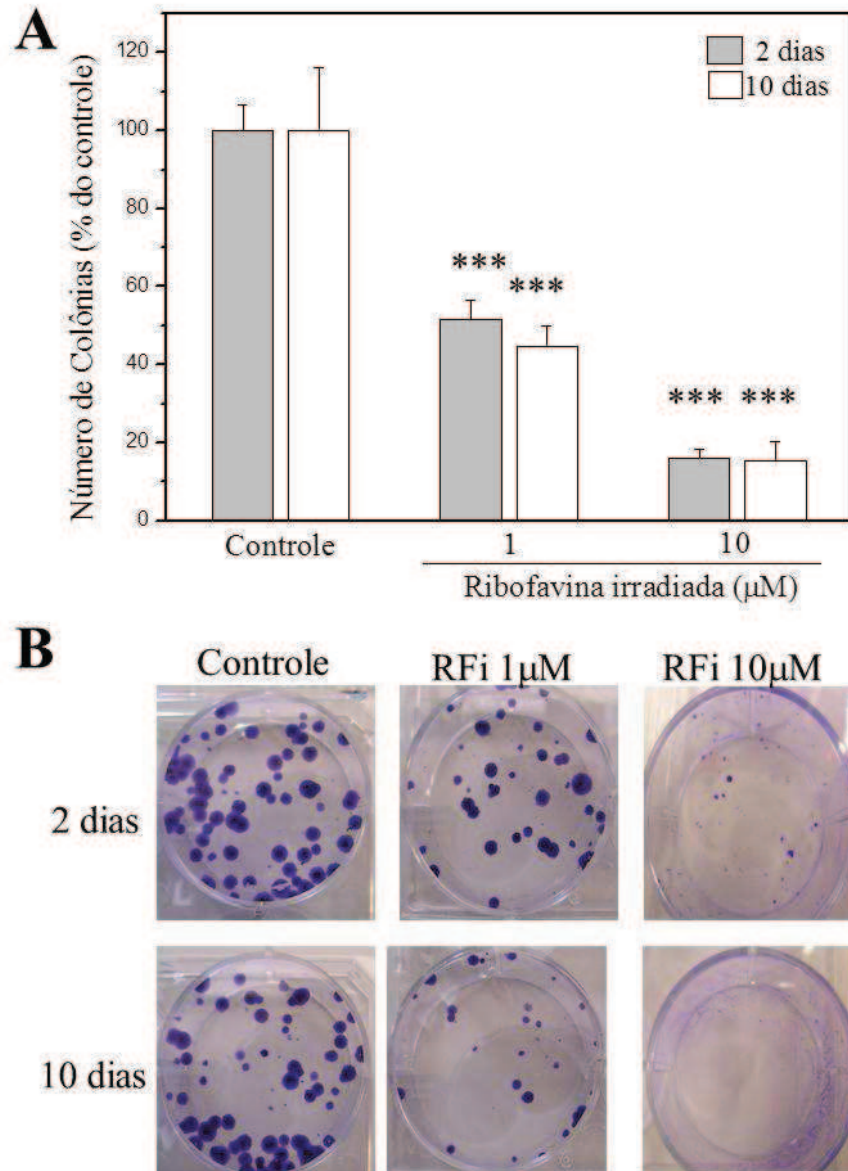


Figura 4: Avaliação da capacidade de formação de colônias das células B16F10 tratadas com riboflavina irradiada. As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços, na densidade de 100 células/poço. Após 24h as células foram tratadas com diferentes concentrações de RFi por 2 dias (-■-) ou 10 dias (-□-). Após o período o meio foi retirado e as células foram lavadas com solução tampão e coradas. (A) Os valores foram expressos em porcentagens de colônia formadas em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas à RFi. (B) Imagens das colônias formadas após serem coradas. Os resultados representam as médias e desvio padrão de 4 experimentos independentes (ANOVA). *** $p < 0,001$ análise estática do tratado em relação ao controle.

4.3. Avaliação da Adesão das Células de Melanoma Tratadas com Riboflavina Irradiada

Uma vez que foi observado o efeito inibitório da RFi sobre a proliferação do melanoma, a ação da mesma na capacidade de adesão, invasão e migração, características importantes durante metástase, foi investigada.

A figura 5 mostra que a adesão das células de melanoma B16F10, na superfície tratada da placa, foi reduzida em aproximadamente 30% em concentrações de 1 μ M a 30 μ M de RFi.

A partir destes resultados verificou-se o efeito da RFi na capacidade de adesão das células de melanoma na superfície de outro tipo celular. Para este fim, foram escolhidas as linhagens de endotélio (2H11) e câncer de pulmão (A549). As células de endotélio foram escolhidas para mimetizar a parede vascular, e as de câncer de pulmão porque nos ensaios *in vivo* o principal foco de metástase das células cancerígenas são os pulmões. A figura 6 mostra que a presença da RFi estimula a adesão das células de melanoma nas células endoteliais (Fig. 6A) enquanto que nas células de câncer de pulmão não houve alteração na quantidade de células B16F10 aderidas (Fig. 6B). Tais resultados indicam que a presença da RFi interfere no processo de adesão das células de melanoma, entretanto esta alteração é no sentido de aumentar a capacidade de adesão das células B16F10 sobre a monocamada endotelial. Estes resultados foram interessantes, uma vez que na literatura não se encontrado com compostos que afetem a capacidade de adesão das células B16F10 *in vitro*.

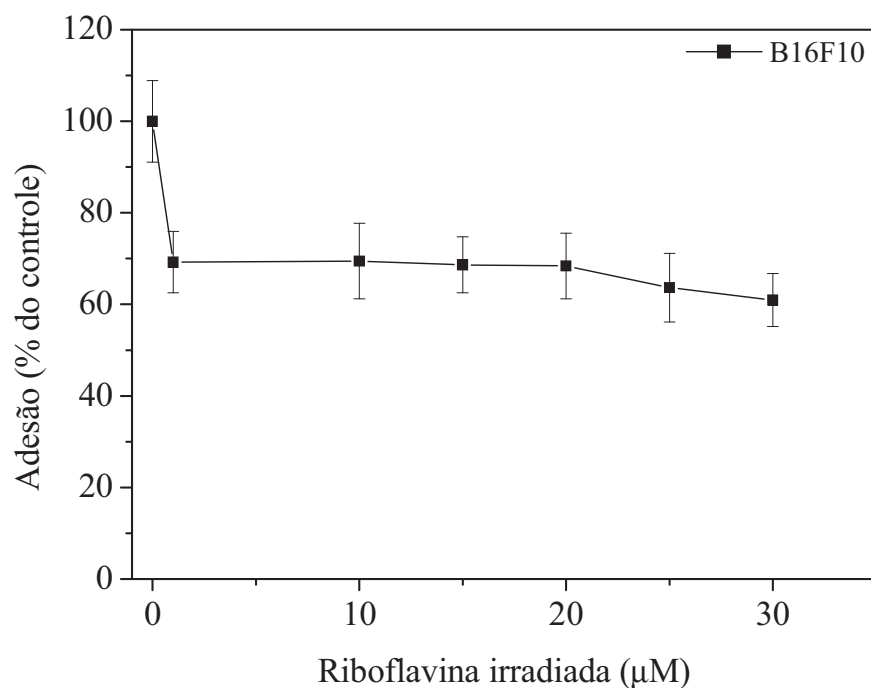


Figura 5: Avaliação da capacidade de adesão das células B16F10 tratadas com riboflavina irradiada. As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 24 poços com diferentes concentrações de RFi por 2h. Após o período o meio com o tratamento foi retirado e as células incubadas com MTT. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao ensaio controle, onde as células não foram expostas à RFi. Os resultados representam as médias e desvio padrão de 3 experimentos independentes (ANOVA).

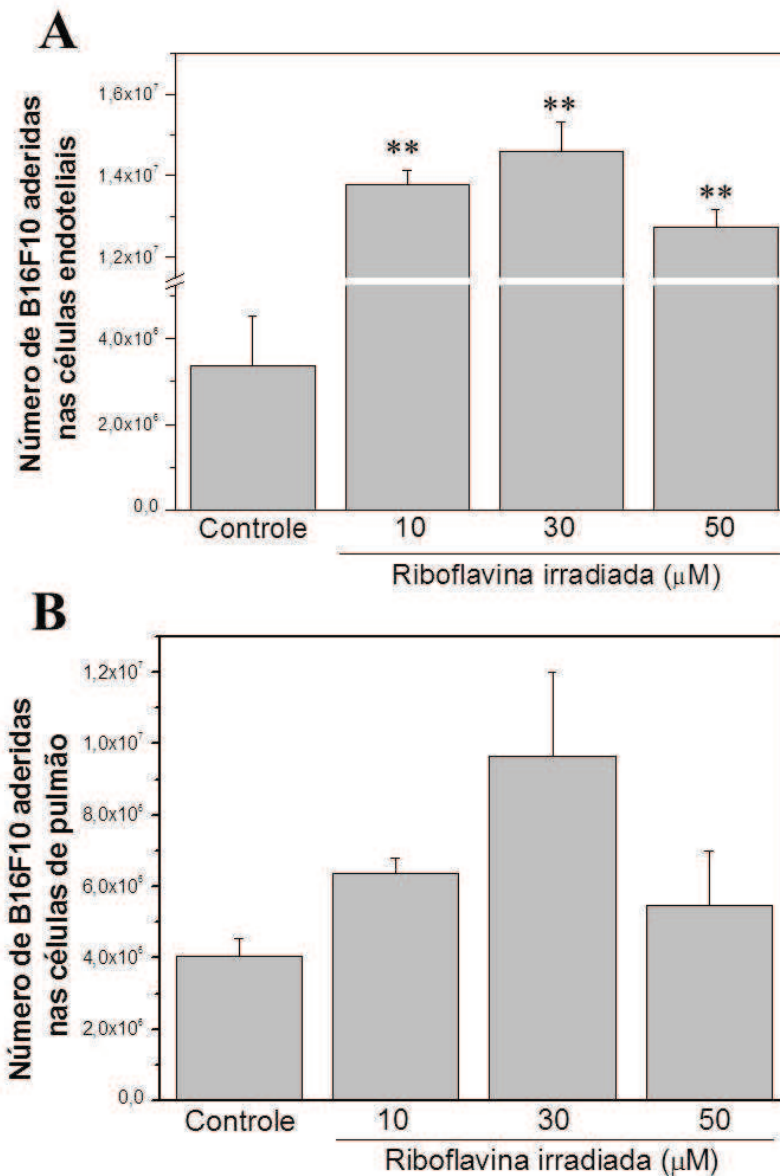


Figura 6: Avaliação da capacidade de adesão das células B16F10 tratadas com riboflavina irradiada em cultura de células endoteliais e de câncer de pulmão. (A) As células endoteliais, 2H11, e (B) de pulmão, A549, foram plaqueadas e incubadas até a confluência. Após este período as células de melanoma, B16F10, foram tratadas com marcador CFDA-SE e posteriormente as células foram plaqueadas na presença e ausência da RFi. A análise foi realizada em FACS e representam a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes (ANOVA). ** $p < 0,01$ análise estática do tratado em relação ao controle.

4.4. Efeito da Riboflavina Irradiada na Migração das Células de Melanoma

Durante a embriogênese, metástase e regeneração tecidual, as células normalmente têm grande capacidade migratória (Singh e Katiyar, 2011). No ensaio de *scratch*, após as células atingirem a confluência formando uma monocamada, é feito um risco onde as células são removidas e assim, estimuladas a migrar em direção à área sem células. Cada célula se move individualmente ou como parte de um grupo na tentativa de ocupar o espaço vazio, permitindo assim estudar a interação célula-célula para o processo de migração. Portanto, para tal experimento foram escolhidas concentrações de RFi que não afetariam a viabilidade celular, assim os resultados apresentados não seriam decorrentes de um efeito citotóxico. Na figura 7 verifica-se que a RFi diminui a capacidade de migração das células B16F10. A partir das micrografias obtidas nos tempos 0 e 16h, a área não ocupada foi medida e a razão entre as áreas nos tempos 0h e 16h calculada. Embora a RFi tenha reduzido a capacidade de migração de forma significativa, não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas, indicando que esse efeito não é dependente da dose. Jeong e colaboradores (2010) mostraram que imidazole, mesmo não apresentando citotoxicidade até a concentração de 100 μ M nas células B16F10, diminui a capacidade de migração das células de melanoma.

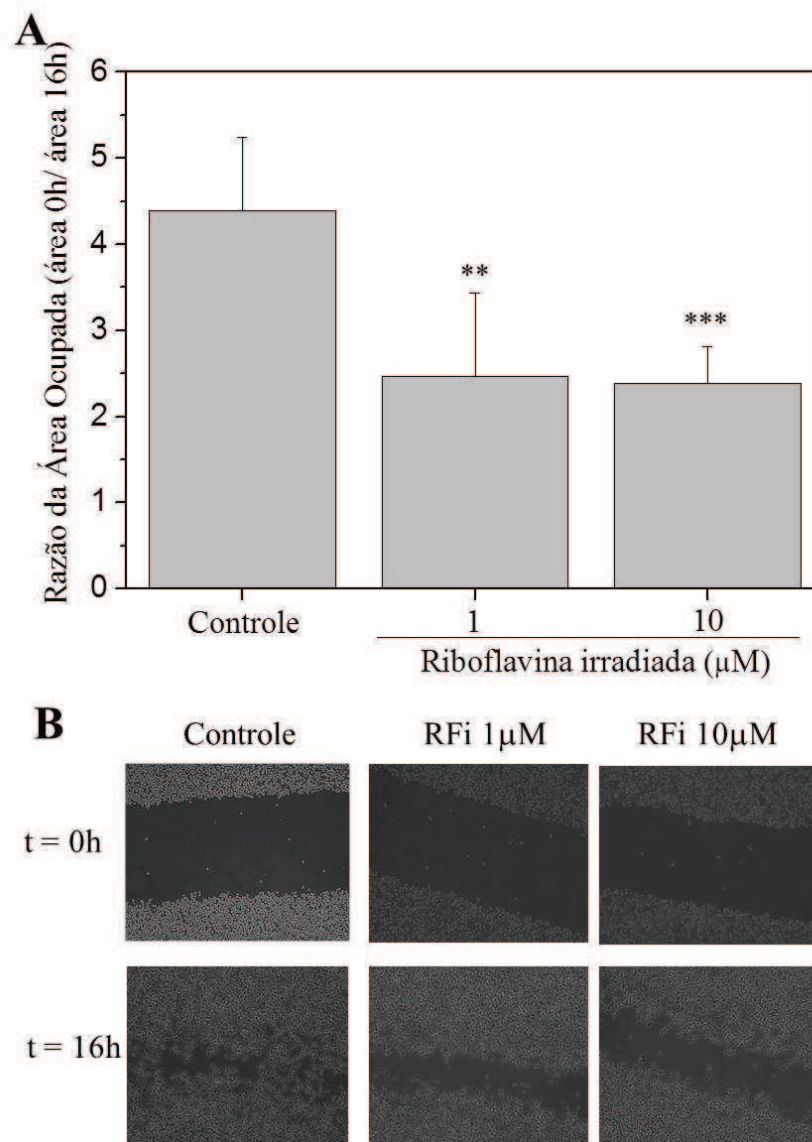


Figura 7: Avaliação da capacidade de migração das células B16F10 tratadas com riboflavina irradiada. As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas por 24h. Após este período foram tratadas por diferentes concentrações de RFi e uma micrografia foi obtida no tempo 0. Após 16h outra micrografia da mesma região foi obtida. (A) Gráfico mostrando o cálculo da razão da área ocupada. (B) Exemplo das micrografias nos tempos de 0 e 16h. Os valores foram expressos como a razão entre a área medida após 16h e a área no tempo 0. Os resultados representam as médias e desvio padrão de 3 experimentos independentes (ANOVA). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ análise estático do tratado em relação ao controle.

Posteriormente, o ensaio de migração utilizando-se um fluoróforo fez-se interessante, uma vez que o resultado desta análise depende da velocidade de migração considerando-se a velocidade de difusão das células por uma membrana permeável. A RFi demonstrou capacidade de inibir a migração das células de melanoma através de uma membrana permeável (Fig. 8), porém esse efeito como o mostrado no *scratch* parece ser independente da dose.

Além do estudo da capacidade de migração das células de melanoma através de uma membrana permeável, analisou-se também o efeito da RFi na capacidade de transmigração das células B16F10, isto é, a capacidade dessas células de migrar através de uma monocamada. As células utilizadas para tal experimento foram as células endoteliais e de pulmão e as concentrações de RFi utilizadas não afetam a viabilidade em mais de 15% no tempo de 12h. Na figura 9A foi possível verificar que, nos tempos estudados, a presença da RFi afeta a migração das células B16F10 através da monocamada de células endoteliais. Interessante observar que na concentração de 10 μ M de RFi, concentração esta que em 24h não afeta a viabilidade celular da B16F10, a capacidade de transmigrar das células de melanoma foi diminuída. Este resultado complementa os dados obtidos sobre o efeito da RFi na adesão das células B16F10 na monocamada de células endoteliais (Fig. 6A), porque mostram que a RFi aumenta a adesão ao endotélio, portanto ela inibe a passagem das células tumorais para dentro do vaso (intravasão) ou para fora do vaso (extravasão). Contudo quando a monocamada era de células de pulmão (Fig. 9B), as células B16F10 não apresentaram alteração significativa na transmigração quando comparada à presença ou ausência de RFi, exceto no tempo de 3h que a concentração de 10 μ M de RFi aumentou significativamente a capacidade das células de melanoma de migrar entre a monocamada de células de pulmão.

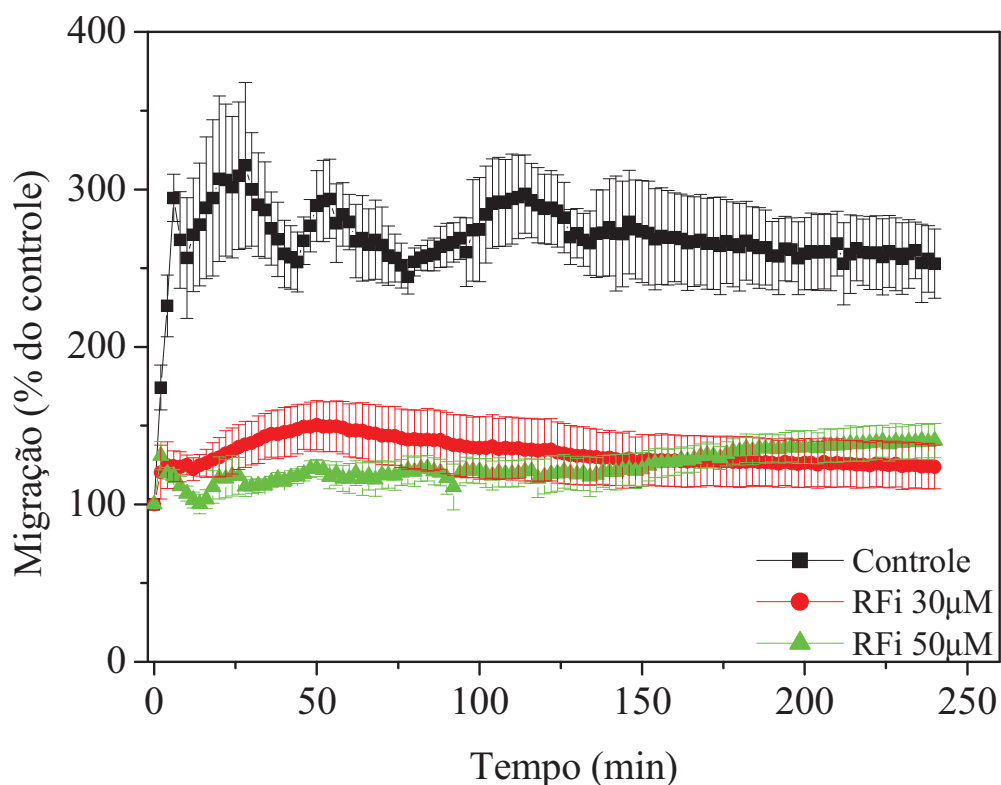


Figura 8: Avaliação da capacidade de migração das células B16F10 tratadas com riboflavina irradiada. As células B16F10 foram incubadas com meio sem soro contendo Cell Tracker Green CMFDA por 1h. Após este período o meio foi substituído por meio com soro e as células foram incubadas por mais 1h. Posteriormente, as células com as diferentes concentrações de RFi sem SFB foram colocadas sobre o FluoroBlok, na parte inferior foi colocado meio com 15% de SFB, e incubadas no leitor de fluorescência a 37°C por 4h. Foram adquiridos os valores de fluorescência a cada 2 minutos. Os valores foram expressos em porcentagem normalizando em relação à fluorescência em t=0. Os resultados representam as médias e desvio padrão de 2 experimentos independentes (ANOVA).

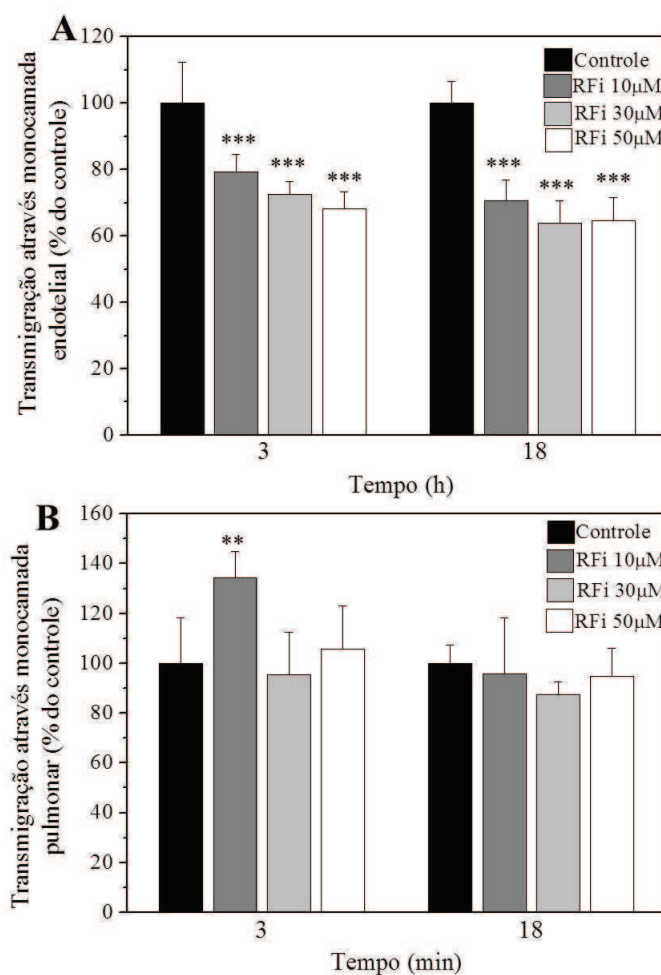


Figura 9: Avaliação da capacidade de transmigração das células B16F10 tratadas com riboflavina irradiada. (A) As células endoteliais, 2H11, e (B) de pulmão, A549 foram plaqueadas em FluoroBlok e incubadas até a confluência. Posteriormente, as células B16F10 foram incubadas com meio sem soro contendo *Cell Tracker Green* CMFDA por 1h. Após este período o meio foi substituído por meio com soro e as células foram incubadas por mais 1h. Posteriormente, as células com as diferentes concentrações de RFi sem SFB foram colocadas sobre a monocamada, na parte inferior do FluoroBlok foi colocado meio com 15% de SFB, e incubadas. Foram adquiridos os valores de fluorescência em 3 e 18 horas. Os valores foram expressos em porcentagem normalizando em relação à fluorescência em t=0. Os resultados representam as médias e desvio padrão de 2 experimentos independentes (ANOVA). ** p<0,01 *** p<0,001 análise estatística do tratado em relação ao controle.

Os dados apresentados mostraram que a RFi atua inibindo tanto a proliferação de células de melanoma, como a adesão e migração das mesmas, sugerindo um efeito antimetastático desse composto, *in vitro*.

Os testes de migração por *scratch* e fluoroblok foram realizados com a RF e novamente a presença desta vitamina não afetou a capacidade de migração das células de melanoma (resultados não apresentados).

4.5. Influência da Riboflavina Irradiada sobre Marcadores Moleculares da agressividade do Melanoma

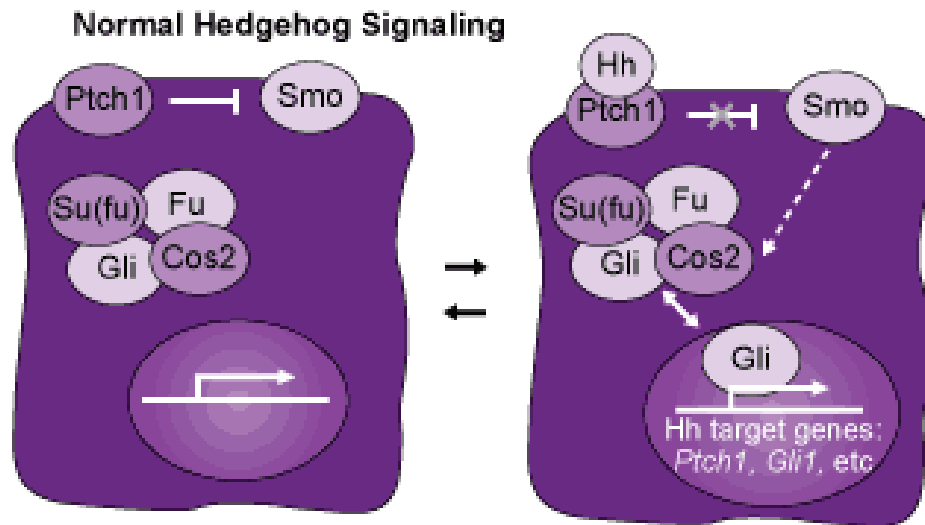
4.5.1. Hedgehog

A via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH) é fundamental para muitos processos durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, incluindo proliferação, especialização, diferenciação e definição do destino celular e morfogênese (McMahon *et al.*, 2003). Essa sinalização ocorre através de vários componentes, incluindo as proteínas transmembrana Patched (Ptch) e Smoothened (SMO), que culminam na ativação da proteína Gli (Ruiz *et al.*, 2002). A ativação constitutiva da via é observada em muitas formas de tumores, principalmente nos malignos. O estudo desenvolvido explorou a conexão entre a via de sinalização SHH e os efeitos da RFi em células de melanoma. Para isso, foram realizados experimentos com os inibidores: ciclopamina (inibidor de SMO) e gant 61 (inibidor de Gli-1), e com o agonista da via SHH. Além disso, foram analisadas as expressões de proteínas importantes para as vias de sinalização de SHH relacionadas com sobrevivência celular.

O esquema 7 mostra a via de sinalização SHH e a localização das proteínas analisadas nesse trabalho. Resumidamente, a proteína transmembrana Ptch fica ligada à SMO mantendo-a inativa. Sem a ativação da SMO as proteínas Gli são processadas na forma repressora (Gli-R) que desativa a via SHH. Quando a proteína hedgehog (Hh) se liga à Ptch, ocorre o desligamento da proteína SMO, levando a sua ativação, permitindo que a Gli se transloque para o núcleo ativando a via SHH (Esquema 5). A figura 10A mostra que

a tanto a Patched como a Gli-1 importantes quando a via SHH estão ativas, tiveram a sua expressão diminuída quando as células B16F10 foram expostas a RFi, porém este resultado só foi observado na concentração correspondente ao IC₅₀. Por outro lado, a proteína Suf(u) importante pela inibição da translocação de Gli para o núcleo, teve a sua expressão aumentada em ambas as concentrações de RFi testadas. Além da análise das expressões de proteínas relacionadas com a SHH foi feita a utilização dos inibidores e do agonista da via.

Para examinar a importância da via SHH na ação da RFi, analisamos a ação da RFi nas células pré-tratadas com os inibidores e agonista. A ciclopamina é utilizada na prevenção do crescimento de células cancerígenas como as células de câncer de próstata (Chung *et al.*, 2009), neuroblastoma (Mao *et al.*, 2009) e linfoma (Singh *et al.*, 2009) na concentração de 10 a 20 μ M. Porém, essas concentrações foram tóxicas para as células B16F10, portanto a concentração utilizada foi de 5 μ M. O ensaio de viabilidade celular pela redução de MTT mostrou que a ciclopamina (Fig. 10B) potencializou a inibição do crescimento das células B16F10 induzida pela RFi, de forma dependente da dose, indicando assim, que a proliferação do melanoma está relacionada com a via SHH. Ainda, utilizando-se o inibidor gant 61, que atua na proteína Gli-1, foi observado um efeito semelhante ao da ciclopamina. Uma indicação mais contundente da importância da via SHH no efeito da RFi pode ser observada na figura 10B, onde o pré tratamento com o agonista Hh induz a reversão do efeito da RFi na proliferação celular da B16F10. Na concentração de 20 μ M de RFi as células pré tratadas com Hh apresentam resultado estatisticamente significativo quando comparado com as células que foram expostas somente ao composto. Estes resultados corroboram com a ideia de que a RFi atua interferindo na via SHH.



Esquema 7: Via Hedgehog. Na sinalização normal da via SHH, a proteína transmembrana Patched (Ptch) fica ligada à Smoothened (SMO) mantendo-a inativa. Sem a ativação da SMO o complexo Gli, Su(Fu) é processado na forma repressora (Gli-R) que desativa a via SHH. Quando a hedgehog se liga à Ptch, ocorre o desligamento da proteína SMO, levando a sua ativação, permitindo que a Gli se transloque para o núcleo ativando a via SHH. (http://www.med.umich.edu/derm/research/res_embryonic.shtml)

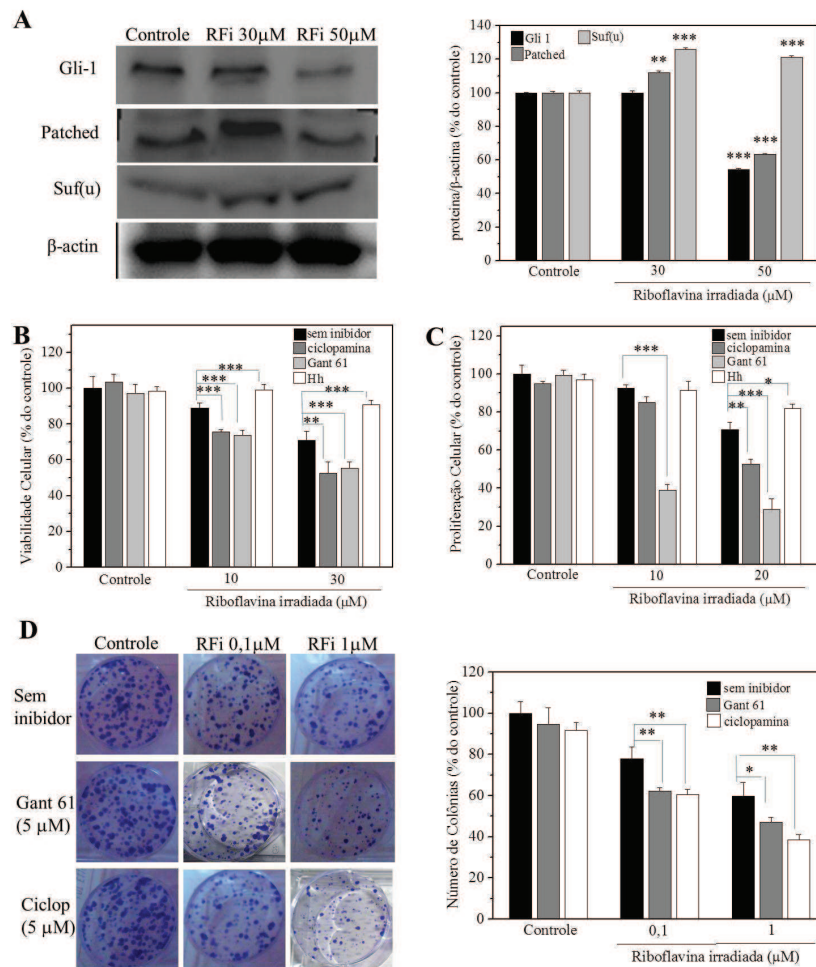


Figura 10: Análise da conexão entre a via da Sonic Hedgehog e a riboflavina irradiada nas células de melanoma. (A) A expressão das proteínas Gli-1, Patched e Suf(u) foi realizada através de *western blotting*. As células B16F10 foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C por 24h. Após este período as células foram pré tratadas por 6h com (B) os inibidores ciclopamina (-■-) ou gant 61 (-■-) ou agonista Hh (-□-). A análise da viabilidade celular foi realizada através da redução do MTT. (C) Para o ensaio de proliferação celular as células B16F10 foram pré-tratadas com ciclopamina (-■-), gant 61 (-■-) ou SHH (-□-) seguido do tratamento com RFi por 24h. A análise da proliferação foi realizada pela captação do BrdU. (D) O teste de colônia com os inibidores gant 61 (-■-) e ciclopamina (-□-) foi realizado no tempo de tratamento de 10 dias. Imagens das colônias formadas após serem coradas foram representadas. Os resultados representam as médias e desvio padrão de 3 experimentos independentes (ANOVA). * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 análise estatística do tratado com relação ao controle.

Com os resultados positivos da ação da RFi na via da SHH, tanto na expressão de proteínas como na viabilidade celular através da associação da ação de inibidores com a RFi, verificou-se a necessidade de saber se a proliferação das células de melanoma também apresentaria resultados significantes usando a combinação de inibidores e RFi.

A figura 10C mostra os dados do ensaio de proliferação através da utilização do BrdU, no qual as células B16F10 foram pré tratadas com os inibidores gant 61 e ciclopamina e agonista Hh seguido do tratamento das células com RFi por 24h. Os resultados apresentados foram significativos tanto para os inibidores quanto para o agonista, uma vez que houve diminuição e aumento, respectivamente, na proliferação das células quando comparado com as células tratadas somente com RFi. Estes resultados foram mais conclusivos na concentração de 20 μ M de RFi, onde todos os pré tratamentos apresentaram resultados significativos. Além disto, o inibidor gant 61 foi o único que apresentou diminuição na capacidade de proliferação das células de melanoma na concentração de 10 μ M quando comparada com as células tratadas somente com RFi, indicando que o composto estudado pode atuar primeiramente impedindo a translocação da proteína Gli para o núcleo.

Além do teste de proliferação com o BrdU, foram realizados testes de formação de colônia com os inibidores da via da SHH (Fig. 10D). O pré tratamento das células B16F10 com os inibidores, gant 61 e ciclopamina, quando comparada com as células tratadas durante 10 dias somente com RFi apresentou diminuição no número de colônias formadas em concentrações na escala de nanomolar, como é possível analisar no gráfico e imagens contidas na figura 10D.

Todos os resultados apresentados indicam que a via SHH tem grande importância no mecanismo de ação da RFi, indicando assim que a relação entre o efeito da RFi e a via SHH apresenta um grande potencial a ser explorado no combate da agressividade do melanoma, uma vez que não há relatos na literatura da associação de um composto, da via SHH e do melanoma para o combate a tal doença.

4.5.2. Metaloproteinases

Metaloproteinases apresentam uma importante função na degradação da matriz extracelular, que é uma característica especial na invasão de tumores e metástase. As MMPs humanas são relatadas como bons alvos para drogas anticancerígenas porque elas degradam gelatina, que é um dos principais componentes da membrana basal. O melanoma expressa diferentes MMPs, dependendo do estágio da progressão do tumor (Chen *et al.*, 2011). Dentre elas, MMP-9 há muito tem sido considerada como marcador de invasão do tumor. Alguns autores encontraram que MMP-9 foi expressa em níveis diferentes na fase de crescimento radial do melanoma primário, indicando que a expressão de MMP-9 está correlacionada com a invasão precoce do melanoma (Fingleton, 2006). Outros trabalhos revelam que a expressão da MMP-9 está presente na fase de crescimento vertical do melanoma, mas não no crescimento radial (Van Den Oord *et al.*, 1997). Macdougall e colaboradores (1999) reportaram que contrariamente ao encontrado na pele normal, MMP-9 é fortemente expressa a partir das células de melanoma de 73,3% de pacientes com melanoma cutâneo maligno. Malaponte e colaboradores (2010) relataram que em pacientes com melanoma metastático os níveis de MMP-2 plasmáticos são maiores que os pacientes controles, que não apresentam tal doença, apresentando assim as MMPs um importante papel na invasão do câncer através da degradação da matriz extracelular.

As MMP-2 e MMP-9 apresentam peso molecular de 72 kDa e 92 kDa, respectivamente. Estas metaloproteinases foram analisadas através de zimografia. A figura 11A mostra o perfil das MMP-2 e -9 das células expostas à RFi. É possível observar que na linhagem B16F10 a atividade da MMP-2 diminui de forma semelhante à MMP-9, sendo que a diminuição não foi dose dependente. A atividade diminuída da MMP-2 vem de encontro com os dados de Sil e colaboradores (2010) que demonstraram que o flavonóide de chá preto (theaflavin) diminuiu a atividade da enzima na linhagem A375 de melanoma humano. A zimografia dos tratamentos da RF com melanoma mostrou que ela diminui ambas as MMPs, porém este resultado é independente da linhagem, isto é, em todas as

linhagens utilizadas neste trabalho, normal ou cancerígena, o tratamento da RF diminuiu a atividade das MMP-2 e -9 (resultados não apresentados).

Além da atividade das metaloproteinases foi analisada a expressão das MMPs e do inibidor TIMP1 (inibidor de metaloproteinase de tecido) por *western blotting*. TIMP é o principal inibidor das MMPs e sua atividade inibitória resulta na formação de um complexo não covalente de TIMP com o domínio C-terminal da pró MMP (Makimura *et al.*, 1993), assim suprimindo a capacidade de invasão e metástase (Chambers e Matrisian, 1997). Estudo *in vivo* em camundongos revelaram que a overexpressão de TIMP inibe metástase e inibe angiogenese (Bloomston *et al.*, 2002). A figura 11B mostrou que a expressão das MMP-2 e -9 diminuiu e a de TIMP1 aumentou quando comparado com o controle, corroborando com os dados obtidos na zimografia.

Assim os resultados apresentados de diminuição das MMPs nas células de melanoma tratadas com RFi corroboram com os resultados apresentados de invasão e migração.

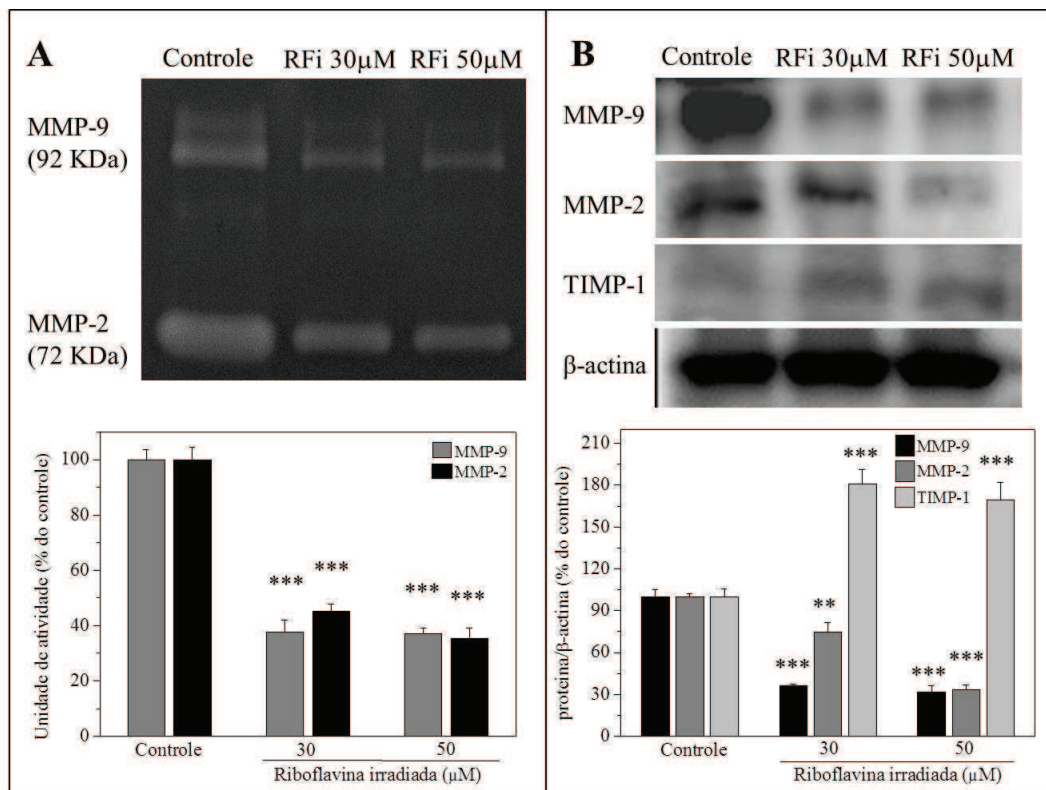


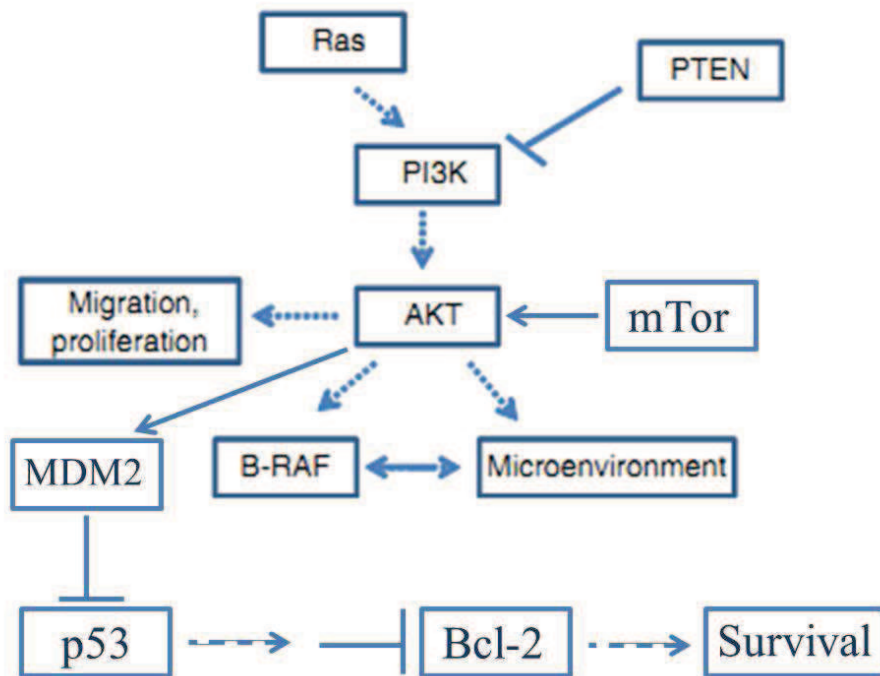
Figura 11: Efeito da riboflavina irradiada nas metaloproteinases 2 e 9 da célula de melanoma. (A) As células B16F10 foram tratadas com RFi em diferentes concentrações por 24 h. A imagem obtida dos géis demonstra a expressão (atividade) das MMP-2 e MMP-9 no meio de cultura das células após tratamento por 24 h. (B) A expressão das proteínas MMP-9, MMP-2 e TIMP foram analisadas por *western blotting*. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento. ** $p < 0,001$ *** $p < 0,001$ análise estatística do tratado com relação ao controle.

4.5.3. Proteínas Src e mTOR

Além das proteínas da via SHH e das MMPs, outros marcadores também foram estudados para o esclarecimento da ação da RFi nas células de melanoma.

As células respondem a estímulos internos e externos através de redes integradas de sinalização que envolvem cascatas de fosforilação sequencial ou desfosforilação mediada pela ação de proteínas quinases e fosfatases. Especificamente, a fosforilação de tirosina é geralmente aceita como um regulador crítico de vários processos biológicos da célula, incluindo a proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência celular (Ferreira *et al.*,

2006). Das várias proteínas tirosina quinases conhecidas atualmente, a Src quinase tem um papel importante nos processos fisiológicos e patológicos como sobrevivência de célula, diferenciação, carcinogênese, inflamação (Rucci *et al.*, 2008), adesão e motilidade celular (Bromann *et al.*, 2004) (Esquema 8). Na figura 12A pode-se notar que a fosforilação do resíduo ativador da proteína Src diminuiu com o aumento da concentração da RFi o que corrobora com os resultados mostrados de inibição da proliferação, adesão e da migração.



Esquema 8: Regulação da via PI3K/AKT. Na sinalização da via PI3K/AKT, as proteínas PTEN, mTor, p53 e Bcl-2 estão relacionadas com vias de proliferação, migração e sobrevivência. (esquema modificado, Lin *et al.*, 2010).

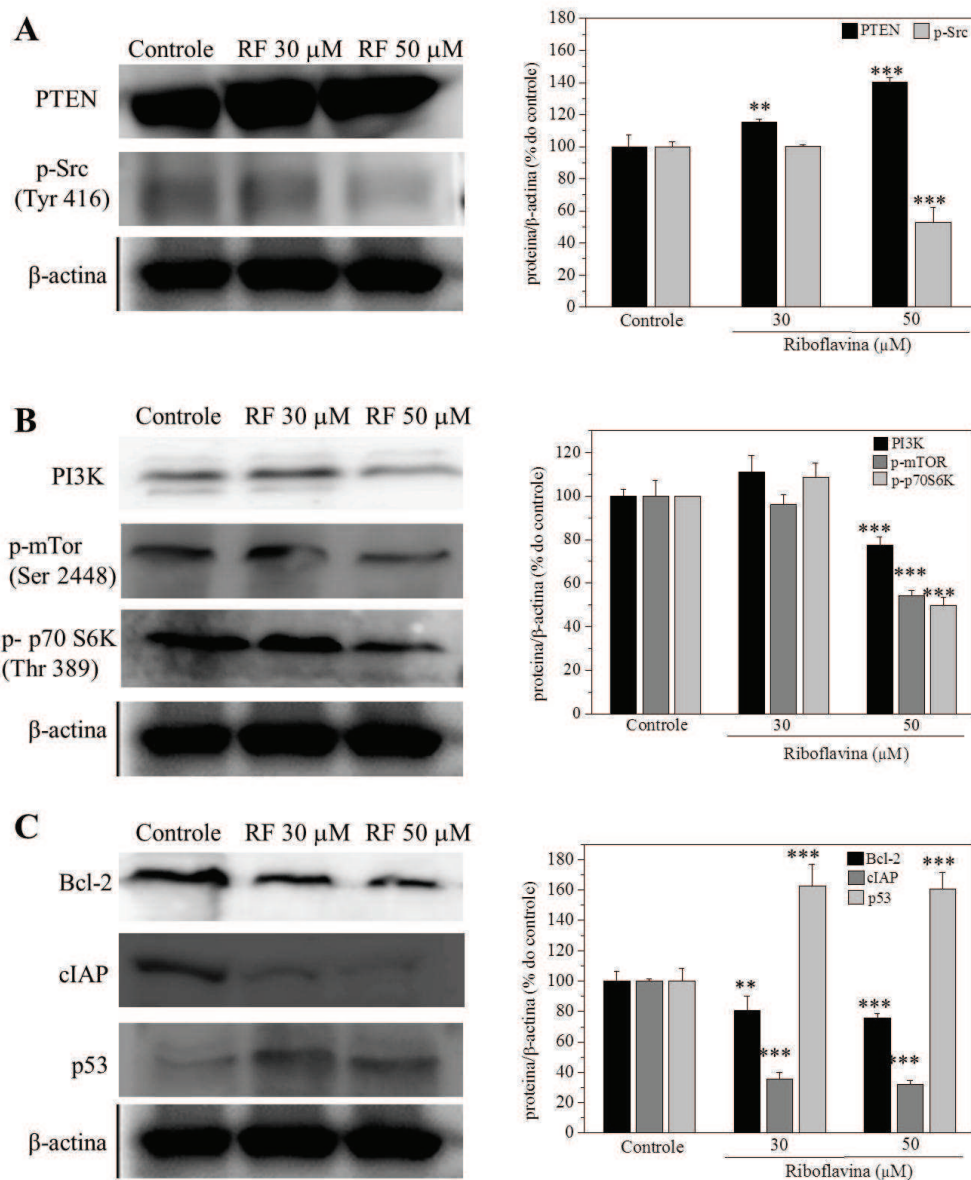
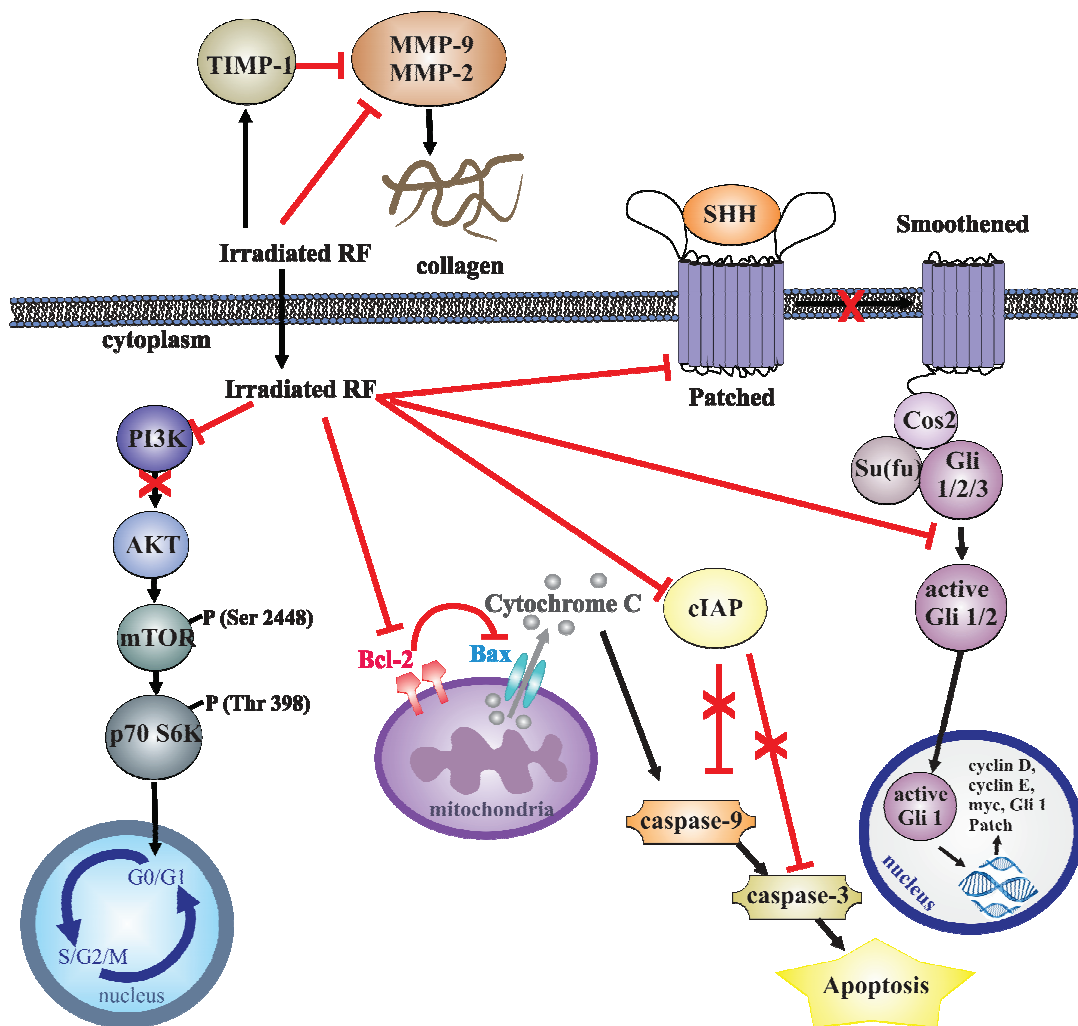


Figura 12: Análise da expressão das proteínas PI3K, p-mTor (Ser 2448), p-p70S6K (Thr 389), Bcl-2, cIAP, p53, PTEN e p-Src (Tyr 416) nas células de melanoma B16F10 tratadas com riboflavina irradiada. A expressão das proteínas (A) PTEN, LMWPTP, p-Src (Tyr 416), (B) PI3K, p-mTor (Ser 2448), p-p70 S6K (Thr 389), (C) Bcl-2, cIAP, p53 foram realizadas através de *western blotting*. *** $p < 0,001$ análise estatística do tratado com relação ao controle.

A proteína mTOR desempenha um papel crítico em vias de sinalização desencadeada pela ativação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e proteína quinase B (AKT), regulando o crescimento celular e morte (Averous e Proud, 2006). Sendo que a mTOR se apresenta frequentemente ativada em células de câncer por vários oncogenes, como PI3K e AKT. Os supressores de tumor, como PTEN, NF1A, LKB1 e o complexo TSC1/TSC2, dependem de regulação da atividade de mTOR para a transformação celular (Meric-Bernstam e Gonzalez-Angulo, 2009). A atividade oncogênica de mTOR envolve a síntese protéica através da fosforilação de substratos necessários para a biossíntese do RNA ribossomal e tradução do mRNA (Hay e Sonenberg, 2004). A implicação de mTOR no controle da proliferação tem estimulado estudos que visam interferir com a sua atividade em células de câncer (Meric-Bernstam e Gonzalez-Angulo 2009). Neste estudo verificou-se que a RFi induziu uma diminuição na fosforilação em serina 2448 da proteína mTOR, e o aumento da expressão da proteína PTEN, principal regulador negativo de PI3K e AKT (Figura 12B). m-TOR é responsável pela fosforilação da proteína p70 S6K em Thr38 que é correlacionado com a atividade de p70 quinase *in vivo*. Esses resultados comprovam que a proliferação das células de melanoma em presença de RFi foi prejudicada provavelmente devido à redução de expressão de mTOR e p70 S6K e aumento da expressão de PTEN. Kim (2010) mostrou que a inibição de PTEN e ativação de RAS levam a progressão do melanoma. Ainda, a PTEN pode regular os níveis e atividade de p53 que também teve a sua expressão aumentada com o tratamento com a RFi.

Além das proteínas citadas acima foram estudados os níveis de expressão das proteínas Bcl-2 e cIAP importantes proteínas antiapoptóticas. Placzer e colaboradores (2010) demonstram através de 12 linhagens celulares de melanoma diferente que os níveis dos membros antiapoptóticos da família Bcl-2 estão superexpressos principalmente as proteínas Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, o que contribui para a resistência do melanoma à apoptose. Porém, os níveis da proteína Bcl-2 não apresentam diferença entre as células de melanoma e melanócitos. Ambas as proteínas tiveram a sua expressão diminuída indicando de que a indução de morte apoptótica está ativa quando as células foram expostas a RFi.

Portanto, a partir dos resultados obtidos a RFi apresenta perspectiva de ser um quimioterápico para a metástase de pulmão já que causou citotoxicidade, diminuição na capacidade de migração, invasão e proliferação, além de estimular vias que levam a morte, como a apoptótica (Esquema 9).



Esquema 9: Vias de sinalização afetadas pela riboflavina irradiada nas células de melanoma. A RFi apresentou as seguintes alterações nas células B16F10. Diminuiu a fosforilação de mTOR e p70 S6K o que inibiu a proliferação. Além disto, aumentou a expressão de p53 e diminui de Bcl-2 e cIAP o que leva a morte, principalmente por apoptose. Diminuiu a atividade e expressão das MMPs o que diminuiu a capacidade de migração e invasão. E na via Sonic Hedgehog houve diminuição na expressão de Gli e Patched e aumento em Suf(u) mostrando que a via foi inibida acarretando na diminuição da proliferação, especialização, diferenciação e definição do destino celular.

4.6. Avaliação da Permeabilidade e Capacidade de Formação de Vasos pela Riboflavina Irradiada

As neoplasias malignas são invasivas provocando destruição dos tecidos adjacentes e podendo desenvolver metástase. O revestimento de células endoteliais da vascularização define uma barreira semipermeável entre o sangue e os espaços intersticiais de todos os órgãos. Ruptura da barreira de célula endotelial pode resultar em aumento da permeabilidade e vazamento vascular. Alguns tumores produzem substâncias que podem alterar ou danificar os tecidos, facilitando a passagem das células tumorais. Os mecanismos que controlam a função de barreira são complexos e sua plena compreensão exige uma abordagem multidisciplinar (Chen *et al.*, 2012). Para o estudo da capacidade da RFi em afetar a permeabilidade endotelial foram feitos experimentos em *transwell* cobertas por monocamadas de células endoteliais. A Figura 13A mostra que tanto a RF quanto a RFi na concentração de 150 μ M não apresentam diferença na permeabilidade das células endoteliais quando comparadas com o controle, portanto não afetam as proteínas de interação célula-célula. Como controle positivo utilizou-se a tripsina, uma endopeptidase, que em contato com a monocamada tem a capacidade de permitir o desagregamento das células, evento que ocorre através de sua propriedade proteolítica sobre proteínas de adesão intercelulares, além de alterar a estabilidade das membranas ao quelar o íon cálcio. Portanto, a permeabilidade em presença da tripsina aumentou em 40% quando comparada com o controle. Contudo, quando foi estudada a associação da tripsina com a RF ou RFi somente a RFi conseguiu diminuir a capacidade da tripsina em afetar a permeabilidade das células endoteliais, voltando a valor próximo do controle, assim a RFi favorece a adesão célula-célula do endotélio exposto a ação de endopeptidases.

Além do estudo da permeabilidade foi avaliada a capacidade de formação de vaso em presença da RFi. Supõe-se geralmente que tumores requerem um suprimento de sangue para o crescimento e metástase. Além de apoiar o crescimento do tumor, a vascularização do tumor fornece a rota de entrada principal para as células do tumor na circulação (Zetter,

1998), e até 2 milhões de células de tumor entrarem na circulação por centímetro cúbico do tumor primário (Evans *et al.*, 2012). Dados mostram que a entrada de células tumorais no sangue é proporcional à metástase, portanto conclui-se que o tumor mais vascularizado leva a metástase avançada (Evans *et al.*, 2012; Zetter, 1998). O desenvolvimento do compartimento de microcirculação do tumor inclui a produção de novos vasos sanguíneos (neoangiogênese) ou a remodelação dos pré-existentes. Na verdade, o número de vasos e os padrões da microcirculação por eventos de remodelação são utilizados como marcadores histológicos da progressão do tumor (Weidner, 1998) e quase todas as células endoteliais têm a capacidade, *in vitro*, de participar da formação de conexões idênticas as que são formadas durante a formação de um vaso (Maniotis *et al.*, 1999). Na figura 13B pode-se observar que a presença da RFi inibe a formação de vasos, até mesmo na menor concentração testada, 10 μ M de RFi.

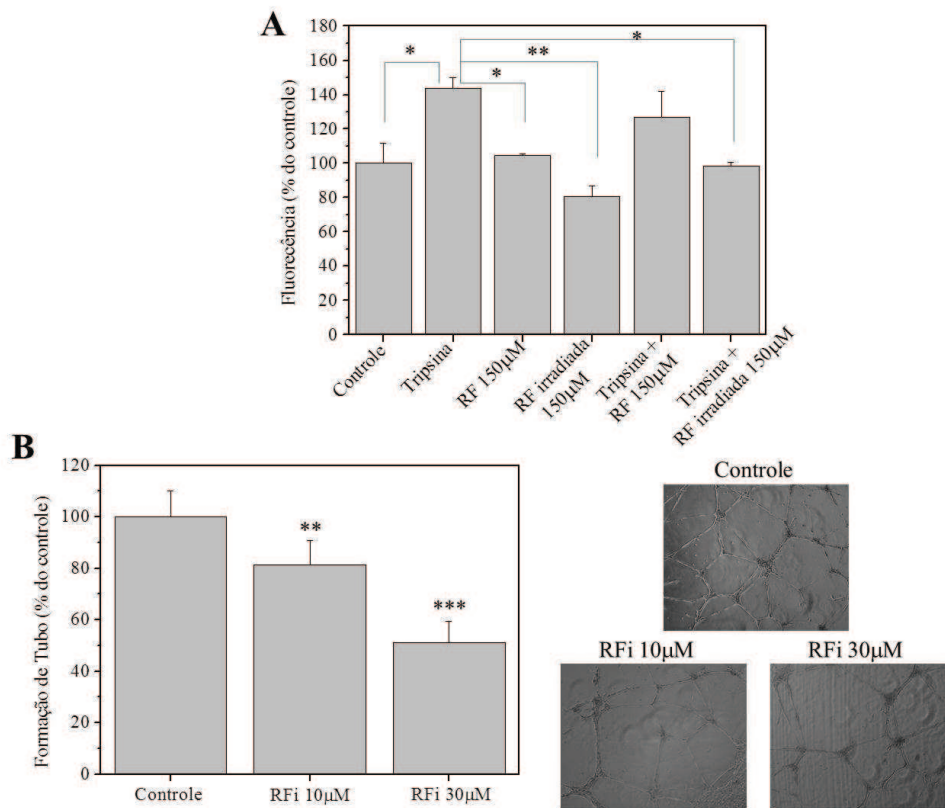


Figura 13: Influência da riboflavina e riboflavina irradiada na permeabilidade de células endoteliais e da riboflavina irradiada na formação de tubos. (A) A capacidade de permeabilização da camada de células endoteliais foi estudada usando a RF e RFI na presença e ausência de tripsina (20 nM). Os resultados representam as médias e desvios padrão do experimento no tempo de 18h. (B) A capacidade de formação de vasos pelas células 2H11 foi estudada na presença e ausência da RFI. Os resultados representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes (ANOVA). Análise estatística * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados forneceram evidências experimentais para apoiar que a RFi é uma agente eficiente e forte candidato para a quimioproteção e/ou tratamento da progressão do melanoma. Foram mostrados que este efeito é mediado por inibição da proliferação e do potencial metastático.

De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir:

- ✓ A RFi apresentou efeito citotóxico em células de melanoma;
- ✓ A proliferação das células de melanoma foi reduzida na presença de RFi, bem como a capacidade de formação de colônias, adesão e migração;
- ✓ A modulação da via hedgehog, MMPs e proteínas quinases (p-mTor, PI3K e p-Src) pela RFi parece ser fundamental para a diminuição da agressividade das células de melanoma;
- ✓ A formação de vasos é inibida na presença de RFi.

REFERÊNCIA

BIBLIOGRÁFICA

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdel-Rahman MH, Yang Y, Zhou XP, Craig EL, Davidorf FH, Eng C. **High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma.** *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24: 288–295.
- Ahmad I, Fasihullah Q, Noor A, Ansari AI, Ali QNM. **Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study.** *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 280(1-2): 199-208.
- Ahmad I, Rapson HDC. **Multicomponent spectrophotometric assay of riboflavine and photoproducts.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1990; 8(3): 217-223.
- Averous J, Proud CG. **When translation meets transformation: the mTOR story.** *Oncogene* 2006; 25: 6423-6435.
- Baguley BC. **Multiple drug resistance mechanisms in cancer.** *Molecular Biotechnology* 2010; 46: 308-316.
- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. **Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis.** *Nature* 2004; 432: 324-331.
- Bennett DC. **How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events?** *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008; 21: 27-38.
- Bloomston M, Shafii A, Zervos EE, Rosemurgy AS. **TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis.** *The Journal Surgical Research* 2002; 102: 39-44.
- Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. **The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases.** *Oncogene* 2004; 23(48): 7957-7968.
- Buettner R, Mesa T, Vultur A, Lee F, Jove R. **Inhibition of Src family kinases with dasatinib blocks migration and invasion of human melanoma cells.** *Molecular Cancer Research* 2008; 6(11): 1766-1774.
- Chaffer CL, Weinberg RA. **A perspective on cancer cell metastasis.** *Science* 2011; 331: 1559-1564.
- Chamber AF, Groom AC, MacDonald IC. **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 563-572.
- Chambers AF, Matrisian L. **Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis.** *Journal of National Cancer Institute* 1997; 89 :1260-1270.

- Chen Y, Chen Y, Hunag L, Yu J. **Evaluation of heparanase and matrix metalloproteinase-9 in patients with cutaneous malignant melanoma.** *The Journal of Dermatology* 2011; 38: 1-5.
- Chen J, Li H, Chen H, Hu D, Xing Q, Ren G, Luo X. **Dickkopf-1 inhibits the invasive activity of melanoma cells.** *Clinical and Experimental Dermatology* 2012; doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04276.x
- Chin L. **The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man.** *Nature Reviews Cancer* 2003; 3(8): 559-570.
- Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. **Melanoma genetics and the development of rational therapeutics.** *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115(4): 813-824.
- Chung MK, Kim HJ, Lee YS, Han ME, Yoon S, Baek SY, Kim JB, Oh SO. **Hedgehog signaling regulates proliferation of prostate cancer cells via stathmin1.** *Clinical and Experimental Medicine* 2009; 10: 51-57.
- Dai DL, Martinka M, Li G. **Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: A clinicopathologic study of 292 cases.** *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23, 1473–1482.
- de Souza Queiroz KC, Zambuzzi WF, Santos de Souza AC, da Silva RA, Machado D, Justo GZ, Carvalho HF, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. **A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours.** *Cancer Letter* 2007; 258(1): 126-134.
- Denker SP, Barber DL. **Cell migration requires botj ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1.** *The Journal of Cell Biology* 2002; 159:1087-1096.
- Dennis PB, Pullen N, Kozma SC, Thomas G. **The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases.** *Molecular Cell Biology* 1996; 16: 6242–6251.
- Easton JB, Houghton PJ. **mTOR and cancer therapy.** *Oncogene* 2006; 25: 6436–6446.
- Edwards AM, Barredo F, Silva E, Deioannes AE. **Apoptosis induction in nonirradiated human HL-60 and murine NSO/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin.** *Photochemistry and Photobiology* 1999; 70(4): 645-649.
- Estimativa INCA 2012: www.cancer.org.br acesso em 01 de maio de 2012.
- Evans CE, Branco_price C, Johnson RS. **HIF-mediated endothelial response during cancer progression.** *International Journal of Hematology* 2012; 95: 471-477.
- Faivre S, Kroemer G, Raymond E. **Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents.** *Nature Reviews: Drug Discovery* 2006a; 5: 671–688.

- Faivre S, Djelloul S, Raymond E. **New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors.** *Seminars in Oncology* 2006b; 3: 407-420.
- Fecchi K, Travaglione S, Spadaro F, Quattrini A, Parolini I, Piccaro G, Raggi C, Fabbri A, Felicetti F, Carè A, Fiorentini C, Sargiacomo M. **Human melanoma cells express FGFR/Src/Rho signaling that entails na adhesion-independent caveolin-1 membrane association.** *International Journal of Cancer* 2012; 130(6): 1273-1283.
- Ferreira CV, Justo GZ, Souza ACS, Queiroz KCS, Zambuzzi WF, Aoyama H, Peppelenbosch MP. **Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives.** *Biochimie* 2006; 88: 1859-1873.
- Fidler IJ. **The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited.** *Nature Reviews Cancer* 2003; 3(6): 453-458.
- Fingleton B. **Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis.** *Frontiers in Bioscience* 2006; 11:479-491.
- Gonzalez H. **Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens.** *Photochemical and Photobiological Sciences* 2010; 9:482-488.
- Govindarajan B, Sligh JE, Vincent BJ, Li M, Canter JA, Nickoloff BJ, Rodenburg RJ, Smeitink JA, Oberley L, Zhang Y, Slingerland J, Arnold RS, Lambeth JD, Cohen C, Hilenski L, Griendling K, Martínez-Diez M, Cuezva JM, Arbiser JL. **Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma.** *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 719-729.
- Green C, Khavari PA. **Targets for molecular therapy of skin cancer.** *Seminars in Cancer Biology* 2004; 14: 63-69.
- Gupta GP, Massagué J. **Cancer metastasis: building a framework.** *Cell* 2006; 127:679-695.
- Hay N, Sonenberg N. **Upstream and downstream of mTOR.** *Genes & Development* 2004; 18: 1926-1945.
- Heelis PF. **The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines).** *Chemical Society Reviews* 1982; 11: 15-39.
- Homsí J, Cubitt C, Daud A. **The Src signaling pathway: a potential target in melanoma and other malignancies.** *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2007; 11(1): 91-100.
- Hsu MY, Meier F, Herlyn M. **Melanoma development and progression: a xonspiracy between tumor and host.** *Differentiation* 2002; 132: 522-536.

- Hu X, Xuan Y. **Bypassing cancer drug resistance by activating multiple death pathways – a proposal from the study of circumventing cancer drug resistance by induction of necroptosis.** *Cancer Letters* 2008; 259: 127-137.
- Hustad S, Ueland PM, Scheneede J. **Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection.** *Clinical Chemistry* 1999; 45(6): 862-868.
- Jayanth DP, Pai BS, Shenoi SD, Balachandran C. **Efficacy of antioxidants as an adjunct to photochemotherapy in vitiligo: a case study of 30 patients.** *Indian Journal Dermatology, Venereology and Leprology* 2002; 68(4): 202-205.
- Jeong YM, Li H, Kim SY, Yun HY, Baek KJ, Kwon NS, Kin DS. **Imidazole inhibits B16 melanoma cell migration via degradation of beta-catenin.** *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 62(4): 491-496.
- Jones RJ, Avizienyte E, Wyke AW, Owens DW, Brunton VG, Frame MC. **Elevated c-Src is linked to altered cell-matrix adhesion rather than proliferation in KM12C human colorectal cancer cells.** *British Journal of Cancer* 2002; 87(10): 1128-1135.
- Joyce JA, Pollard JW. **Microenvironmental regulation of metastasis.** *Nature Reviews Cancer* 2009; 9: 239-252.
- Keith CT, Schreiber SL. **PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints.** *Science* 1995; 270: 50–51.
- Kim M. **Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis.** *Small GTPase* 2010; 1: 161-164.
- Lee YC, Lin HH, Hsu CH, Wang CJ, Chiang TA, Chen JH. **Inhibitory effects of andrographolide on migration and invasion in human non-small cell lung cancer A549 cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway.** *European Journal of Pharmacology* 2010; 632:23–32.
- Li C, Chi S, Xie J. **Hedgehog signaling in skin cancers.** *Cell Signal* 2011; 23(8): 1235-1243.
- Lin K, Baritaki S, Militello L, Malaponte G, Bevelacqua Y, Bonavida B. **The role of B-Raf mutations in melanoma and the induction of EMT via dysregulation of the NFκB/Snail/RKIP/PTEN Circuit.** *Gene & Cancer* 2010; 1: 409-420.
- Logue JS, Morrison DK. **Complexity in the signaling network: insights from the use of targeted inhibitors in cancer therapy.** *Genes & Development* 2012; 26:641-650.
- Macdougall JR, Bani MR, Lin Y, Muschel RJ, Kerbel RS. **Proteolytic switching: opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B expression.** *British Journal of Cancer* 1999; 80: 504-512.

- Makimura M, Hirasawa M, Kobayashi K, Indo J, Sakanaka S, Taguchi T, Otake S. **Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity.** *Journal of Periodontology* 1993; 64: 630-636.
- Malaponte G, Zacchia A, Bevelacqua Y, Marconi A, Perrotta R, Mazzarino MC, Cardile V, Stivala F. **Co-regulated expression. Of matrix metalloproteinase-2 and transforming growth factor-beta in melanoma development and progression.** *Oncology Reports* 2010; 24(1):81-7.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LMG, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJC. **Vascular channel formation by human melanoma cells in vitro and in vivo: Vasculogenic mimicry.** *American Journal of Pathology* 1999; 155(3): 739-752.
- Mao L, Xia YP, Zhou YN, Dai RL, Yang X, Duan SJ, Qiao X, Mei YW, Hu B, Cui H. **A critical role of Sonic Hedgehog in maintaining the tumorigenicity of neuroblastoma cells.** *Cancer Science* 2009; 100: 1848-1855.
- Massey V. **The chemical and biological versatility of riboflavin.** *Biochemical Society Transaction* 2000; 28(4): 283-296.
- McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. **Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling.** *Current Topics in Developmental Biology* 2003; 53: 1-114.
- Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K, Li G, Herlyn M. **The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma.** *Frontiers in Bioscience* 2005; 10: 2986–3001.
- Menichini G, Alfano C, Provenzano E, Marrelli M, Statti GA, Menichini F, Conforti F. **Cachrys pungens Jan inhibits human melanoma cell proliferation through photo-induced cytotoxic activity.** *Cell Proliferation* 2012; 45(1): 39-47.
- Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM. **Targeting the mTOR signalling network for cancer therapy.** *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: 2278-2287.
- Mirmohammadsadegh A, Hassan M, Bardenheuer W, Marini A, Gustrau A, Nambiar S, Tannapfel A, Bojar H, Ruzicka T, Hengge UR. **STAT5 phosphorylation in malignant melanoma is important for survival and is mediated through Src and JAK1 kinases.** *The Journal of Investigative Dermatology* 2006; 126: 2272-2280.
- Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. **Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization.** *Nature Reviews Cancer* 2009; 9: 274-284.
- Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, Chang A, Kraker A, Jove R, Yu H. **Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth.** *Oncogene* 2002; 21: 7001-7010.

- O'Connor R. **The pharmacology of cancer resistance.** *Anticancer Research* 2007; 27:1267-1272.
- Ohara M, Fujikura T, Fujiwara H. **Augmentation of the inhibitory effect of blue light on the growth of B16 melanoma cells by riboflavin.** *International Journal of Oncology* 2003; 22(6): 1291-1295.
- Owens DM, Watt FM. **Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours.** *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 444–51.
- Placzer WJ, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed JC, Pellecchia M. **A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy.** *Cell Death and Disease* 2010; 1(5): 40-48.
- Populo H, Soares P, Faustino A, Rocha AS, Silva P, Azevedo F, Lopes JM. **mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics.** *Pigment Cell Melanoma Research* 2011; 24: 254–257.
- Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Hendrix MJ. **Role of nodal signaling and the microenvironment underlying melanoma plasticity.** *Pigment Cell Melanoma Research* 2008; 21: 348-357.
- Pratheeshkumar P, Sheeja K, Kuttan G. **Andrographolide induces apoptosis in B16F-10 melanoma cells by inhibiting NF- κ B-mediated bcl-2 activation and modulation p53-induced caspase-3 gene expression.** *Immunopharmacology and immunotoxicology* 2012; 34(1):143-151.
- Qi J, Wang J, Romanyuk O, Siu CH. **Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and beta-catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells.** *Molecular Biology of the Cell* 2006; 17: 1261-1272.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. **Cancer Statistics, 2012.** *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 2012; 62: 10-29.
- Remsberg JR, Lou H, Tarasov SG, Dean M, Tarasova NI. **Structural analogues of smoothened intracellular loops as potent inhibitors of Hedgehog pathway and cancer cell growth.** *Journal of Medicinal Chemistry* 2007; 50: 4534-4538.
- Rittié L, Fisher GJ. **UV-light-induced signal cascades and skin aging.** *Ageing Research Reviews* 2002; 1(4): 705-720.
- Robbins SL, Cotran RS. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças.* Rio de Janeiro, Elsevier Publishing, 2005.
- Rucci N, Susa M, Teti A. **Inhibition of protein kinase c-Src as a therapeutic approach for cancer and bone metastases.** *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 2008; 8: 342-349.

- Ruiz I, Altaba A, Snachez P, Dahmane N. **Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells.** *Nature Review Cancer* 2002; 2: 361-372.
- Saraiva VS, Caissie AL, Segal L, Edelstein C, Burnier MNJr. **Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma.** *Melanoma Research* 2005; 15: 245–250.
- Satyamoorthy K, Herlyn M. **Cellular and molecular biology of human melanoma.** *Cancer Biology Therapy* 2002; 1: 14-17.
- Sil H, Sen T, Moulik S, Chatterjee A. **Black tea polyphenol (theaflavin) downregulates MMP-2 in human melanoma cell line A375 by involving multiple regulatory molecules.** *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 2010; 29(1):55-68.
- Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A. **Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008.** *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 2012 doi: 10.3322/caac.20141
- Singh RR, Cho-Vega JH, Davuluri Y, Ma S, Kasbidi F, Mito C, Lennon PA, Drakos E, Medeiros LJ, Luthra R, Vega F. **Sonic hedgehog signaling pathway is activated in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma.** *Cancer Research* 2009; 69: 2550-2558.
- Singh T, Katiyar SK. **Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition.** *PLoS One* 2011; 6(10): e25224
- Souza ACS, Cavagis ADM, Jucá MB, Ferreira CV, Aoyama H, Peppelenbosch MP. **Riboflavina: uma vitamina multifuncional.** *Química Nova* 2005; 28(5): 887-891.
- Souza AC, Kodach L, Gadelha FR, Cavagis ADM, Aoyama H, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. **A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death.** *Apoptosis* 2006; 11(10): 1761-1771.
- Souza AP, Gerlach RF, Line SR. **Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts.** *Dental Material* 2000; 16(2): 103-108.
- Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Altaba AR. **Melanomas require Hedgehog-Gli signaling regulated by interaction between Gli1 and the RAS-MEK/AKT pathways.** *PNAS* 2007; 14: 5895-5900.
- Van Den Oord JJ, Paemen L, Opdenakker G, De Wolf-Peters, C. **Expression of gelatinase B and extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIM in benign and malignant pigment cell lesions of skin.** *The American Journal of Pathology* 1997; 151: 665-670.
- Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. **Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repairs enzyme activity by dietary riboflavin.** *Cancer Letters* 1996; 98(2): 129-135.

Weidner N. **Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow.** *The Journal of Pathology* 1998; 184: 119–122.

Zetter BR. **Angiogenesis and tumor metastasis.** *Annual Review of Medicine* 1998; 49: 407-424.

http://www.med.umich.edu/derm/research/res_embryonic.shtml site acessado em 21 de novembro de 2011.

ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. Anexo – Curriculum durante o doutorado

Estágio no exterior

Estágio no laboratório do Dr C. Arnold Spek, no AMC (Academisch Medisch Centrum), Universiteit van Amsterdam, Holanda, no período de 04 de abril até 10 de setembro de 2011.

Participação no PED

Participação no Programa de Estágio Docente (PED) na UNICAMP. Estágio realizado no primeiro semestre letivo de 2010, no curso de Farmácia, disciplina de Bioquímica sob a supervisão da Profa. Dra. Fernanda Gadelha.

Capítulo de livro

Justo, GZ; Shishido, M; **Machado, D**; Silva, RA; Ferreira, CV. Druggable Targets for Skin Photoaging: Potential Application of Nanocosmetics and Nanomedicines News Approaches for Skin Care. 1ed., Springer, 2011, 197-227.

Artigos publicados

Ridolfi, DM; Marcato, PD; Justo, GZ; **Machado, D**; Durán, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. Colloids and Surface B Biointerfaces, 93: 36-40, 2012.

Marcato, PD; Caverzan, J; Rossi-Bergmann, B, Pinto, EF; **Machado, D**; Silva, RA; Justo, GZ; Ferreira, CV; Duran, N. Nanostructures polymer and lipid carriers for sunscreen: Biological effects and skin permeation. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 11:1880-1886, 2011.

Chaves Neto, AH; **Machado, D**; Yano, CL; Ferreira, CV. Antioxidant defense and apoptotic effectors in ascorbic acid and beta glicerophosphate induced osteoblast differentiation. *Development, Growth & Differentiation*, 53: 88-96, 2011.

Ridolfi, DM; Marcato, PD; **Machado, D**; Silva, RA; Justo, GZ; Duran, N. In vitro cytotoxicity assays of solid lipid nanoparticles in epithelial and dermal cells. *Journal of Physics, Conference Serie*, 304: 012032, 2011.

Chaves Neto, AH; Yano, CL; Paredes-Gamero, EJ; **Machado, D**; Justo, GZ; Peppelenbosch, MP; Ferreira, CV. Riboflavin and photoproducts in MC3T3-E1 differentiation. *Toxicology in Vitro*, 24: 1911-1919, 2010.

Trabalho em Congresso

Ridolfi, DM; Marcato, PD; **Machado, D**; Silva, RA; Justo, GZ; Duran, N. In vitro citotoxicity assays of solid lipid nanoparticles in epithelial cells. *NANOSAFE*, 2010.

Silva, RA; Paredes-Gamero, EJ; **Machado, D**; Souza, ACS; Ferreira, CV; Nader, HB; Justo, GZ. Disorganization of actin filaments in human epidermal keratinocytes during oxidative stress. *Meeting Brazilian Society for Cell Biology*, 2010.

Ridolfi, DM; Marcato, PD; **Machado, D**; Silva, RA; Justo, GZ; Duran, N. Chitosan to improve properties of solid lipid nanoparticles (SLN) in treatment of skin diseases. *7th International Symposium on Natural Polymers and Composites*, 2010.

Ridolfi, DM; Marcato, PD; **Machado, D**; Silva, RA; Justo, GZ; Duran, N. Solid lipid nanoparticles (SLN) for dermal application of tretinoin: In vitro cytotoxicity and phototoxicity. *XXXIX Annual Meeting of SBBq*, 2010.

Silva, RA; Paredes-Gamero, EJ; **Machado, D**; Souza ACS; Tersariol, ILS; Ferreira, CV; Nader, HB; Justo, GZ. The Messenger of death: Ca^{2+} increase contributes to apoptosis induction in human keratinocytes. *XXXIX Annual Meeting of SBBq*, 2010.

Ridolfi, DM; Marcato, PD; **Machado, D**; Duran, N. Nanopartículas lipícas sólidas (NLS) para encapsulação de tretinoína em aplicações dérmicas. I Simpósio em Nanociências e Materiais Avançados, 2010.

Silva, RA; **Machado, D**; Souza, ACS; Shishido, SM; Ferreira, CV; Paredes-Gamero, EJ; Justo, GZ. Hyperosmotic and oxidative stress induce intracellular Ca^{2+} dependent apoptosis through the cathepsin B and caspase 3 mediated pathways in skin epidermal human cell line. OzBio, 2010.

Teixeira, Z; **Machado, D**; Silva, RA; Justo, GZ; Ferreira, CV; Guterres, SS; Duran, N. Estudos de citotoxicidade e fotoirritação de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de palmitato de retinila.V Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, 2010.

Machado, D; Silva, RA; Souza, ACS; Justo, GZ; Aoyama, H; Ferreira, CV; Shishido, SM. Mechanism of riboflavina phototoxicity based on inflammation, senescence and apoptosis marks: Potential application on photodynamic therapy. XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009.

Premiação

SBBq Award com o trabalho Mechanism of riboflavina phototoxicity based on inflammation, senescence and apoptosis marks: Potential application on photodynamic therapy, SBBq

Menção Honrosa com o trabalho Disorganization of actin filaments in human epidermal keratinocytes during oxidative stress, Brazilian Society for Cell Biology.

Participação em organização de evento

Participação na organização do 1º Workshop da Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia – UNICAMP, no período de 30 de junho a 01 de julho de 2011, no Espaço Cultural Casa do Lago, UNICAMP.

Participação em banca examinadora de Tese de Conclusão de Curso (TCC)

Participação em banca de TCC de Camila Kopezky Possari com o título “Alimentos vendidos por ambulantes no Brasil: Contaminação por microorganismo” para conclusão no curso de Ciências Biológicas- Bacharelado, pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas, 2009.

Participação em banca de TCC de Barbara Bruna Causs Fracaroli com o título “Hepatite C: Características gerais e epidemiológicas no Brasil” para conclusão no curso de Ciências Biológicas- Bacharelado, pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas, 2009.

Supervisão concluída de TCC

Orientação das alunas Jucilene Aparecida Martins e Juliana Aparecida Silva para a defesa de TCC com o título “Morte celular por apoptose em células tumorais” para aquisição do título do curso de Ciências Biológicas, pela Universidade Paulista, 2009.

7.2. Artigo submetido

Irradiated riboflavin diminishes the aggressiveness of melanoma cells.

Machado, D.^{1#}; Shishido, S.M.^{1#}; Queiroz, K.C.S.²; Spek, C.A.²; Ferreira, C.V.^{1*}

¹Laboratory of Bioassays and Signal Transduction, Department of Biochemistry, Institute of Biology, University of Campinas, Brazil.

²Center for Experimental and Molecular Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands.

*Corresponding author: Ferreira, C.V.

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica.

Cidade Universitária Zeferino Vaz – Barão Geraldo

13083-970, Campinas-SP, Brasil

Fax: +55 19 3521-6129

email: carmenv@unicamp.br

#These authors contributed equally to this work.