

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Efeitos da 5-iodotubercidina em linhagens de melanoma humano parentais e resistentes ao inibidor de BRAF

Stephanie Cristine Carvalho Dos Santos

Dissertação para obtenção do título de Mestra em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Silvy Maria Stuchi Engler

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Efeitos da 5-iodotubercidina em linhagens de melanoma humano parentais e resistentes ao inibidor de BRAF

Stephanie Cristine Carvalho Dos Santos

Versão Corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do título de Mestra em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S237e Santos, Stephanie Cristine Carvalho dos
Efeitos da 5-iodotubercidina em linhagens de melanoma humano parental e resistentes ao inibidor de BRAF / Stephanie Cristine Carvalho dos Santos. -- São Paulo, 2018.
90p. + anexos

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi

1. Tumores Malignos 2. DNA : Lesão. I. T. II. Maria-Engler, Silvy Stuchi, orientador.

616.994 CDD

Stephanie Cristine Carvalho Dos Santos

**Efeitos da 5-iodotubercidina em linhagens de melanoma humano
parentais e resistentes ao inibidor de BRAF**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção de
título de Mestra em Ciências

Prof. Dr. Orientador/ Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, __ de _____ de 2019

Em memória do meu irmão,
Hemerson Alezi Carvalho dos Santos,
que sempre torceu pelo meu sucesso e acreditou na minha capacidade.
Saudades eternas do meu companheiro de infância e juventude.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por tudo, pois tudo que tenho e sou devo a Ele, e à Nossa Senhora que intercede por mim sem cessar.

À minha orientadora, Slvyta Stuchi Maria Engler, pela oportunidade de ter feito parte deste grupo de pesquisa.

À minha família, meus pais Hélio e Maria Lucia, que investiram e acreditaram em mim e me apoiaram por todos estes anos. Minha mãe, minha maior incentivadora, amiga e companheira. E ao Luis Filipe por renovar minhas forças com apenas um sorriso.

Ao Gustavo, meu namorado, pela amizade, companheirismo, compreensão, por ser um bom ouvinte e tentar me fazer ver o lado positivo das coisas.

Ao BioCeM, grupo de pesquisa onde fiz a minha iniciação científica, que me ensinou o que é fazer ciência.

Ao Adam meu eterno co-orientador, que desde a iniciação científica me ajuda, aconselha e apoia, muito obrigada por dedicar parte do seu tempo a me ajudar e ensinar e até mesmo pelos puxões de orelha.

As amizades cultivadas durante o mestrado foi uma das principais recompensas que recebi nessa jornada. Obrigada aos meus companheiros de bancada e bandeirão, Michele e Luis, pelas discussões acadêmicas, pelos momentos de descontração, desabafos e pelo auxílio com computadores e microscópios.

À Érica, por toda ajuda, por ser tão solícita e por me orientar em muitos momentos.

À Dani, Larissa Carvalho, Débora, Larissa Sekimoto, Denisse, Vanessa, Bárbara, Adriana e Vitória pelos momentos descontraídos e pela companhia no fluxo e na bancada.

À Silvia Romano por sempre me ajudar a encontrar as coisas no laboratório, obrigada por estar sempre disposta a ajudar e por me deixar a usar seu computador, me desculpe por ter te atrapalhado.

Novamente à Érica, Larissa Carvalho e Débora, por terem me auxiliado muitíssimo nas correções de trabalhos.

À todos os professores das disciplinas da graduação e da pós-graduação que contribuíram par a minha formação.

Ao professor Alexandre Bruni por permitir o uso do microscópio de fluorescência para o ensaio de citotoxicidade em esferoides.

Ao professor Jorge Luiz Mello Sampaio por permitir o uso do equipamento de PCR e à técnica Fabiana Teixeira pelo auxílio com o equipamento.

Aos professores Ricardo Ambrósio Fock e Primavera Borelli Garcia por permitir o uso do microscópio de fluorescência para análise das lâminas e ao técnico Edson Naoto Mikiyama pelo auxílio do microscópio.

À Renata Albuquerque pelas análises de citometria de fluxo.

Ao Walter Turato pela análise do ensaio clonogênico.

À todos aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Resumo

Santos. S. C. C. 2018. **Efeitos da 5-iodotubercidina em linhagens de melanoma humano parentais e resistentes ao inibidor de BRAF**. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O melanoma é responsável por menos de 5% dos cânceres de pele, porém, 95% das mortes ocorrem devido a ocorrência de metástases. O melanoma metastático é refratário às terapias convencionais e rapidamente adquire resistência às terapias como as oncogene-dirigidas, como o inibidor de BRAF, da via de MAPK. Estudos prévios de *screening* in silico do nosso grupo, onde se utilizou as bases de dados TCGA e GEO, identificaram o gene adenosina quinase (ADK) como sendo diferencialmente expresso entre o melanoma invasivo e os nevos. A 5-iodotubercidina (5-ITu) é um potente inibidor farmacológico da ADK que dentre os diversos efeitos relatados na literatura destaca-se pelo potencial genotóxico. Os danos no DNA são os principais ativadores de *checkpoint* do ciclo celular, que levam a parada do ciclo celular transitória ou permanente, além de induzir morte celular, levando a hipótese de que ADK possa ser potencial agente anti-melanoma. Este trabalho objetivou avaliar a expressão do gene ADK em melanomas humanos e quimiorresistentes ao inibidor de BRAF (iBRAF), avaliou os impactos de 5-ITu sobre a proliferação, progressão do ciclo celular e morte celular e por fim avaliamos sua capacidade de aumentar a sensibilidade das células. Foi realizado PCR em tempo real para avaliar os níveis de expressão de mRNA de ADK em linhagens de melanoma e na cultura primária de melanócitos; a fim de avaliar a citotoxicidade de 5-ITu foram realizados os ensaios de exclusão por azul de tripan e de apoptose – Anexina V e PI e em modelo de esferoide, usando *live/dead*; também foi avaliada a influência de 5-ITu sobre a capacidade clonogênica e seus efeitos sobre a proliferação celular, a partir dos ensaios de ciclo celular e avaliação de marcadores de proliferação por imunofluorescência; as linhagens foram submetidas a diferentes regimes de tratamento com 5-ITu e o iBRAF, a fim de avaliar a curva de crescimento e a sensibilidade ao iBRAF por MTT níveis de expressão de mRNA de ADK maiores nas linhagens tumorais em relação aos melanócitos. 5-ITu mostrou-se capaz de inibir a proliferação (IC₅₀) das linhagens de melanoma em concentrações de 1,9 a 3,5 µM. 5-ITu não foi capaz de induzir inviabilidade celular, apesar de reduzir a quantidade de células viáveis em todas as condições de tratamento, também não foi capaz de induzir aumento significativo de células apoptóticas, nem mesmo necróticas. No entanto, o tratamento com 5-ITu reduziu a capacidade clonogênica de linhagens de melanoma e promoveu parada de ciclo celular nas fases G1 e G2/M, levou ao aumento da população subG1. O tratamento com 5-ITu promoveu a redução da expressão de marcadores de proliferação, como ki67, e a combinação de tratamentos 5-ITu e iBraf foi capaz de aumentar o tempo de dobramento das linhagens de melanoma, embora tenha se mostrado incapaz de sensibilizar as células de melanoma ao tratamento com iBRAF. Desse modo, pode-se concluir que 5-ITu induz o efeito citostático e se mostra um potente agente antiproliferativo para melanoma parental e resistente.

Palavras chaves: Melanoma; resistência; adenosina quinase, 5-Iodotubercidina; danos no DNA, *checkpoint* e agente citostático.

ABSTRACT

Santos. S. C. C. 2018. **Effects of 5-iodotubercidin on human melanoma lines of parental and resistant to the BRAF inhibitor.** 95 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Melanoma accounts for less than 5% of skin cancers, but 95% of deaths occur due to metastases. Metastatic melanoma is refractory to conventional therapies and rapidly acquires resistance to therapies such as oncogene-directed, such as the BRAF inhibitor, of the MAPK pathway. Previous studies of screening *in silico* of our group, using the databases TCGA and GEO, identified the adenosine kinase gene (ADK) as differentially expressed between invasive melanoma and nevus. 5-iodotubercidin (5-ITu) is a potent pharmacological inhibitor of ADK that among the several effects reported in the literature stands out for the genotoxic potential. DNA damage is the main activator of the cell cycle checkpoint, which leads to transient or permanent cell cycle arrest, in addition to inducing cell death, leading to the hypothesis that ADK may be a potential anti-melanoma agent. This work aimed to evaluate the expression of the ADK gene in human melanomas and chemoresistant to the BRAF inhibitor (iBRAF), evaluated the impacts of 5-ITu on proliferation, cell cycle progression and cell death and finally we evaluated its ability to increase the sensitivity of cells. Real-time PCR was performed to assess the levels of ADK mRNA expression in melanoma lines and primary melanocyte culture; in order to evaluate the cytotoxicity of 5-ITu, the trypan blue and apoptosis - Annexin V and PI exclusion and blue spheroid models were performed using live / dead; the influence of 5-ITu on the clonogenic capacity and its effects on cell proliferation, from the cell cycle assays and the evaluation of proliferation markers by immunofluorescence; the cell lines were submitted to different treatment regimens with 5-ITu and iBRAF in order to evaluate the growth curve and the sensitivity to iBRAF by MTT levels of mRNA expression of ADK higher in the tumor lines in relation to the melanocytes. 5-ITu was able to inhibit the proliferation (IC 50) of melanoma lines at concentrations of 1.9 to 3.5 μM . 5-ITu was not able to induce cell non-viability, although it reduced the amount of viable cells in all treatment conditions, nor was it able to induce a significant increase in apoptotic or even necrotic cells. However, treatment with 5-ITu reduced the clonogenic capacity of melanoma cells and promoted cell cycle arrest in the G1 and G2 / M phases, leading to an increase in the subG1 population. Treatment with 5-ITu promotes the reduction of expression of proliferation markers, such as ki67, and the combination of 5-ITu and iBRAF treatments was able to increase the doubling time of melanoma cells, although it has been shown to be unable to sensitize melanoma cells to treatment with iBRAF. Thus, it can be concluded that 5-ITu induces the cytostatic effect and shows a potent antiproliferative agent for parental and resistant melanoma.

Keywords: Melanoma; resistance; adenosine kinase, 5-Iodotubercidin; DNA damage, checkpoint and cytostatic agent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via das MAPK	24
Figura 2. Dados da expressão de ADK.....	28
Figura 3. Isoformas de ADK.....	32
Figura 4. Papel de ADK na reação de transmetilação.....	33
Figura 5. Fórmula estrutural da adenosina, 5-iodotubercidina (5-ITu) e da tubercidina..	35
Figura 6. Modelo simplificado do ciclo celular.....	39
Figura 7. Caracterização da resistência ao vemurafenibe em linhagens de melanoma.....	45
Figura 8. Produto do PCR de <i>Mycoplasma SP</i>	46
Figura 9. Calendário de tratamento para o tratamento combinatório.....	51
Figura 10. Fotomicrografia das células submetida ao tratamento combinatório.....	53
Figura 11. Linhagens de melanoma apresentam maior expressão de ADK em relação ao controle não tumoral.....	56
Figura 12. O tratamento com 5-iodotubercidina reduz a quantidade de células viáveis dose dependente.....	57
Figura 13. O tratamento com 5-ITu não é capaz de induzir morte celular.....	59
Figura 14. Fotomicrografias das linhagens de melanoma submetidas ao tratamento contínuo.....	62
Figura 15. Linhagens de melanoma tratadas com 5-ITu por 24, 48 e 72h proliferam menos que as células do grupo controle.....	63
Figura 16. Linhagens de melanoma tratadas com 5-ITu por 24h e mantidas sem o tratamento por 24 e 48h proliferam menos que as células do grupo controle.....	64
Figura 17. Representação das semelhanças entre esferoide e a tumores.....	68
Figura 18. 5-ITu reduz a capacidade clonogênica de linhagens de melanoma	70

Figura 19. 5-ITu induz parada de ciclo celular e aumento da população SubG1 em linhagens de melanoma.....	72
Figura 20. 5-ITu reduz a quantidade de células positivas para Ki67.....	74
Figura 21. Curva de crescimento das células submetidas ao tratamento combinatório de iBRAF e 5-ITu.....	76
Figura 22. O tratamento combinatório de iBRAF e 5-ITu não é capaz de evitar ou atrasar a resistência ao iBRAF em linhagens de melanoma.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Caracterização das linhagens de melanoma	44
Quadro 2. Determinação das concentrações que inibem 50% e 25% da proliferação celular em linhagens de melanoma tratadas com 5-ITu.....	58
Quadro 3. Diferença entre tratamento contínuo e recuperado	65
Quadro 4. Tempo de dobramento das linhagens de melanoma e dos grupos de tratamento combinatório de iBRAF e 5-ITu.....	77

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Currículo Lattes

ANEXO B. Ficha do Aluno

LISTA DE SIGLAS

A1R - Receptor 1 de adenosina

A2R - Receptor 2 de adenosina

A3R - Receptor 3 de adenosina

ADA - Adenosina deaminase

ADK - adenosina quinas / *Adenosine Kinase*

ADK-L - isoforma longa de ADK

ADK-S - isoforma curta de ADK

ADP - adenosine monofosfato

AKT - Serina/treonina quinase conhecida como PKB / *protein kinase B*

AMPK - quinase dependente de adenosine

AP-1 - Activator protein 1

APC - *Allophycocyanin*

APC/C - *anaphase-promoting complex/cyclosome*

ARAF - A-Raf proto-oncogene proteína quinase serina/treonina

ATM - *ataxia-telangiectasia mutated*

ATP - trifosfato de adenosina

ATR - *ataxia telangiectasia and Rad3-related*

BRAF - **BRAF** proto-oncogene proteína quinase serina/treonina

BRAFV00K - mutação que resulta de uma substituição de uma valina (V) a um lisina (K) na posição 600 em BRAF

BRAFV600D/R - mutação que resulta de uma substituição de uma valina (V) a um ácido aspártico ou arginina (D ou R) respectivamente, na posição 600 em BRAF

BRAFV600E - mutação que resulta de uma substituição de uma valina (V) a um ácido glutâmico (E) na posição 600 em BRAF

Bcl - *B-cell lymphoma 2*

C1-IB-MECA - N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide, agonista seletivo do receptor de adenosina A3

CAK - *CDK-activating kinase*

cAMP - AMP cíclico

CDK - *Cyclin-dependent kinases*

cDNA - DNA complementar, sintetizado a partir do mRNA

COT - *cancer Osaka thyroid*

CPC - *chromosomal passenger complex*

CRAF - C-Raf proto-oncogene proteína quinase serina/treonina

CTLA-4 - *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

Cdc25a - Fosfatase indutora da fase M 1

Cdc25c - Fosfatase indutora da fase M 1

Chk1 - *Cell Cycle Checkpoint Kinase 1*

Chk2 - *Cell Cycle Checkpoint Kinase 2*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - Dimetil Sulfóxido

DNA - *Desoxiribonucleic Acid* ou Ácido desoxirribonucleico

DSB - *DNA double strand breaks*

EGFR - *Epidermal growth factor receptor* ou fator de crescimento epidermal

ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinase* ou quinase regulada por sinal extracelular

FDA - *Food and Drug Administration*

FITC - *Fluorescein isothiocyanate* ou Isotiocianato de fluoresceína

FS - Fosfatidil serina

G1 - Gap 1 phase

G2 - Gap 1 phase

GEO - *Gene Expression Omnibus*

HIF-1 α - *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

IC25 - Concentração inibitória de 25%

IC50 - Concentração inibitória de 50%

iBRAF – inibidor de BRAF

IL-2 - Interleucina-2

iMEK - inibidor de MEK

INCA - Instituto Nacional de câncer

5-ITu - 5-iodotubercidina

JNK - *C-Jun N-terminal kinase*

KRAS - *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

Ki67 - é uma proteína nuclear que está associada à proliferação celular

K_m - é a constante de Michaelis, é numericamente igual à concentração do substrato quando a velocidade inicial é igual à metade da sua velocidade máxima

M - Mitose

MAPK - *Mitogen activated protein kinase* – proteínas quinases ativadas por sinal mitogênico

MEK - Proteína quinase da via de MAPK

MITF - *Microphthalmia-Associated Transcription Factor*

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-triazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

Mcl-1 - *myeloid cell leukemia 1*

Mre11 - *Double Strand Break Repair Nuclease*

mRNA - RNA mensageiro

mTOR - mechanistic target of rapamycin

NRAS - Gene da família RAS

Nbs1 - gene relacionado à *Nijmegen breakage syndrome*

OMS - Organização Mundial de Saúde

p21 - uma reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular

p27 - uma proteína que regula o ciclo celular

p38 - *P38 mitogen-activated protein kinase*

p53 - Proteína que regula ciclo celular, reparo de DNA e morte celular por apoptose

PBSA - Phosphate Saline Buffer

PCR - *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em cadeia da polimerase

PD-1 - *Programmed cell death protein 1 (Receptor)*

PD-L1 - *Programmed death-ligand 1 - Ligand 1*

PI3K - *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate PI3K 3-kinase*, família de proteínas envolvidas em funções celulares como crescimento, proliferação diferenciação, tráfego de vesículas e motilidade

PKL-1 - *polo-like kinase 1*

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*, regula negativamente a via de sinalização de AKT

RAF - *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*, gene que codifica proteínas da família Raf, envolvidas na cascada de MAPK

RAS - *Rat sarcoma*, gene que codifica proteínas da família Ras, envolvidas na via de crescimento celular, diferenciação e sobrevivência

RB - *retinoblastoma protein*

RNA - Ácido ribonucleico

RNase - Ribonuclease

Rad50 - uma proteína envolvida na reparação de quebra da dupla cadeia de DNA

S - Fase de Síntese de DNA

SAC - *spindle assembly checkpoint*

SAH - S-adenosilhomocisteína

SAHH - S-adenosilhomocisteína hidrolase

SAM - S-adenosilmetionina

SFB - Soro Fetal Bovino

ssDNA - *single stranded DNA*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Melanoma	
1.1.1 Epidemiologia.....	21
1.1.2 Etiologia.....	22
1.1.3 Via das MAPK.....	22
1.1.3 Terapias para melanoma.....	24
1.1.4 Resistência aos inibidores de BRAF.....	27
1.2 Adenosina quinase (ADK)	
1.2.1 Adenosina.....	29
1.2.2 ADK.....	30
1.2.3 Inibidores de ADK.....	34
1.3 5-iodotubercidina	35
1.4 <i>Checkpoint</i> do ciclo celular	
1.4.1 Ciclo celular.....	37
1.4.2 <i>Checkpoint</i> do ciclo celular.....	39
2. JUSTIFICATIVA.....	42
3. OBJETIVOS.....	43
4. METODOLOGIA	
4.1 Cultura de células.....	44
4.2 PCR para detecção de <i>Mycoplasma sp</i>	46
4.3 Extração de mRNA e obtenção de cDNA.....	46
4.4 Reação em Cadeia polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)	47
4.5 Ensaio de Viabilidade Celular com 5-iodotubercidina – Exclusão Azul de Tripan.....	47
4.6 Análise de Apoptose por Citometria de Fluxo.....	48
4.7 Ensaio de Esferoide.....	48
4.8 Ensaio Clonogênico ou Ensaio de Formação de Colônias.....	49
4.9 Análise de Ciclo Celular por Citometria de Fluxo.....	49
4.10 Imunofluorescência.....	50
4.11 Tratamento combinatório.....	51
4.12 Curva de Crescimento.....	54
4.13 Ensaio de Viabilidade Celular por MTT.....	54
5. RESULTADOS	
5.1 Expressão Gênica Basal de ADK em Linhagens de Melanoma e em Melanócitos.....	55
5.2 Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripan.....	56

5.3 Avaliação da Morte Celular.....	58
5.4 Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripán.....	60
5.5 Ensaio de Esferoide.....	65
5.6 Ensaio Clonogênico.....	69
5.7 Ciclo Celular por Citometria de Fluxo.....	71
5.8 Imunofluorescência.....	74
5.9 Curva de Crescimento.....	75
5.10 Ensaio de Viabilidade Celular por MTT.....	77
6. DISCUSSÃO.....	79
7. CONCLUSÃO	85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

1. Introdução

1.1. Melanoma

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de pele, incluindo melanoma e não-melanoma, é o tipo de câncer mais frequente no mundo e corresponde a 30% dos tumores malignos registrados no Brasil (INCA, 2018). O Instituto do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2018 o diagnóstico de 2.920 novos casos de melanoma em homens e 3.340 casos em mulheres; já a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima o diagnóstico de cerca de 132.000 novos casos e cerca de 50.000 mortes relacionadas ao melanoma por ano no mundo (MATTIA et al., 2018). No entanto, dados epidemiológicos da população europeia e norte-americana indicam o contínuo aumento no número de pacientes diagnosticados com melanoma (SHARMA et al., 2017; MATTIA et al., 2018).

Entre os fatores relacionados ao aumento da probabilidade de desenvolver o melanoma incluem-se: histórico familiar, que aumenta em 30% a 70% de chances de desenvolver a doença em relação a população geral (IBRAHIM E HALUSKA, 2009), a presença de múltiplos *nevi* benigno ou atípico, pessoas com histórico de melanoma, características fenotípicas, tais como: pigmentação clara dos olhos e da pele; imunossupressão e exposição à radiação ultravioleta.

O melanoma representa menos de 5% dos cânceres de pele diagnosticados, mas é o mais agressivo dentre eles, sendo responsável por cerca de 95% dos casos de morte relacionados a câncer de pele (VAZQUEZ et al., 2015). Cerca de 80% dos casos de melanoma são precocemente diagnosticados e cirurgicamente curados (GRAY-SCHOPFER et al., 2007), sendo que a taxa de sobrevivência de pacientes nos estágios IA e IB – câncer com espessura inferior a 2mm que pode ou não ser ulcerado, sem metástases próximas - em 10 anos é de 95% e 86% respectivamente, contudo o melanoma metastático (estágio IV) (AMERICAN SOCIETY, 2016) é amplamente refratário às terapias convencionais (GRAY-SCHOPFER et al., 2007) reduzindo para 10% a 15% a taxa de sobrevivência em 10 anos do paciente de estágio IV (AMERICAN SOCIETY, 2016).

1.1.2 Etiologia

O melanoma é uma neoplasia maligna que se origina a partir de melanócitos, localizados na pele, mucosas e úvea (VAZQUEZ et al., 2015; ISOLA et al., 2016; IBRAHIM E HALUSKA, 2009). Os melanócitos são derivados de células progenitoras da crista neural, os melanoblastos. Durante o desenvolvimento embrionário, estas células migram da crista neural para a epiderme, o folículo piloso, a cóclea, o trato uveal, o epitélio de mucosas, as meninges do cérebro e do cordão espinal (REITNIKOV et al., 2016; GRAY-SCHOPFER et al., 2007, UONG E ZONG, 2011; IBRAHIM E HALUSKA, 2009; SLIPICEVIC e HERLYN, 2012).

Na pele, os melanócitos residem na camada basal da epiderme, na junção derme-epiderme (GRAY-SCHOPFER et al., 2007; IBRAHIM E HALUSKA, 2009). Os melanócitos são células produtoras de melanina, que é acumulada em vesículas conhecidas como melanossomos (ISOLA et al., 2016). A melanina é produzida em resposta a radiação ultravioleta (UV), protegendo a pele dos efeitos da radiação (SOENGAS E LOWE, 2003).

Quando os melanócitos se estabelecem na epiderme, eles permanecem sob o controle dos queratinócitos, uma vez que estes secretam fatores que regulam a sobrevivência, diferenciação e proliferação e motilidade dos melanócitos, porém mutações em genes reguladores do crescimento, a produção autócrina de fatores de crescimento e a perda de receptores de adesão contribuem para a desregulação da sinalização celular nos melanócitos, possibilitando que eles escapem da regulação pelos queratinócitos, permitindo que os melanócitos migrem, invadam e sobrevivam em um ambiente hostil levando ao desenvolvimento e progressão do melanoma (GRAY-SCHOPFER et al., 2007; SLIPICEVIC e HERLYN, 2012).

O melanoma pode se originar a partir de melanócitos cutâneos e não-cutâneos, que podem ser encontrados nas superfícies de mucosas (melanoma mucosal) e da úvea do olho (melanoma uveal) e nas meninges (IBRAHIM E HALUSKA, 2009; KUK et al., 2016), no entanto os melanomas cutâneos são os mais frequentes (KUK et al., 2016).

1.1.3 Via das MAPK

A cascata de sinalização das quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (figura 1) é um importante mediador de proliferação e de diferenciação celular, que liga os receptores de fatores de crescimento na superfície celular aos fatores de transcrição de genes que

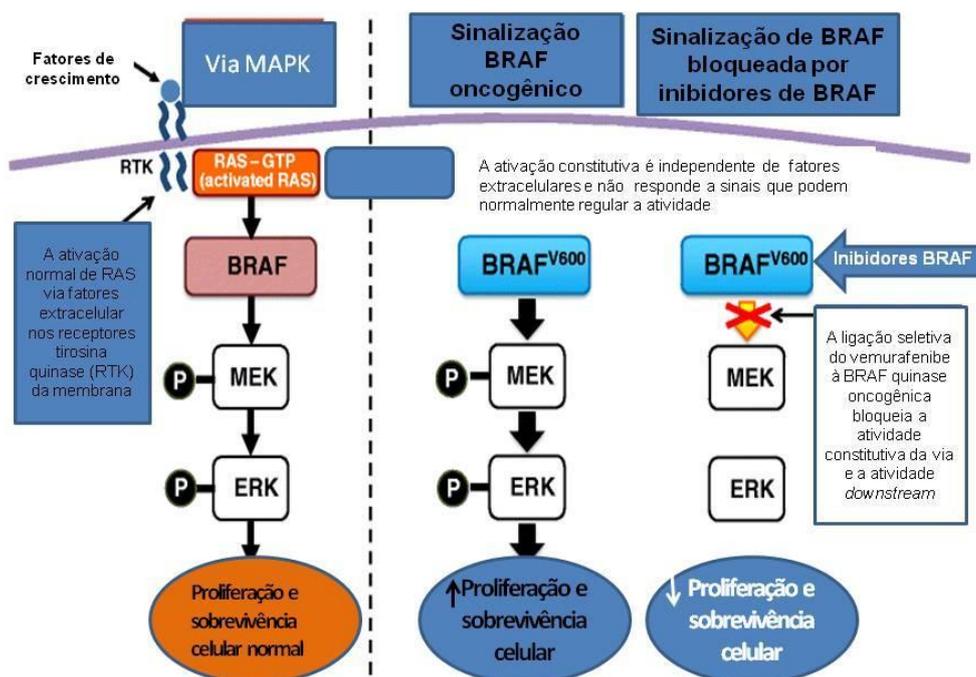
atuam em vias de proliferação, diferenciação, sobrevivência, morte e transformação (KUDCHADKAR, PARAISO E SMALLEY, 2012; MATTIA et al. 2018; APLIN, KAPAN E SHAO, 2011).

O melanoma é uma doença genética complexa, no qual as vias de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/PTEN/AKT (AKT) estão constitutivamente ativas em melanócitos presentes nos *nevi*, devido às mutações acumuladas por fatores ambientais ou hereditários. A via MAPK é a melhor elucidada em relação à progressão do melanoma e em outros tipos de câncer, em decorrência da elevada taxa de mutações oncogênicas (Johansson e Brage, 2014, PLATZ et al., 2008, YAJIMA et al., 2012). Em 2002 foi descoberto que o gene NRAS está mutado em 20% dos melanomas e cerca de 65% dos melanomas apresentam mutações que levam a superexpressão de BRAF (Uon e Zong, 2011) – um membro da família de serina/trionina quinases RAF, que incluem ARAF, BRAF E CRAF.

As mutações descritas em BRAF resultam da substituição da valina (V) no códon 600. A mais frequente corresponde a mais de 80% dos casos, em que a valina é substituída pelo ácido glutâmico (E), a mutação BRAFV600E. Outra mutação comum é a BRAF600K, com frequência de 16%, além da V600D/R (DAVIES et al., 2002; FINN et al., 2012; KUDCHADAKAR, PARAISO E SMALLEY, 2012; MATTIA et al., 2018). Todas estas mutações resultam na atividade constitutiva da proteína BRAF (MATTIA et al., 2018) e, por consequência, leva ao aumento da atividade da via das MAPK (JANG e ATKINS, 2013).

Foi descrito que a mutação BRAFV600E, quando introduzida, leva a transformação maligna de melanócitos humanos imortalizados, tanto *in vitro* e *in vivo*; além disso, a expressão de BRAF mutante leva a redução da expressão do inibidor de ciclo celular p27 (KUDCHADAKAR, PARAISO E SMALLEY, 2012). A ativação constitutiva de BRAF leva ao aumento da expressão de ERK1/2, e observa-se também o aumento da sinalização de sobrevivência, devido ao aumento expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl e Mcl-1 (KUDCHADAKAR, PARAISO E SMALLEY, 2012; MATTIA et al., 2018) bem como de genes que regulam o ciclo celular, aumentando a expressão de ciclina D1, que aumenta a atividade de quinases dependentes de ciclina (CDKs) para promover a hiperfosforilação de pRB levando a transição da fase G1/S (KUDCHADAKAR, PARAISO E SMALLEY, 2012; APLIN, KAPAN e SHAO, 2011).

Figura 1. Via das MAPK



Fonte: adaptado de Ascierio et al., 2012

A via das MAPK é ativada por um ligante como, por exemplo, fatores de crescimento, aos receptores tirosina-quinase que ativam a via das MAPK levando a proliferação e sobrevivência celular. A mutação BRAFV600 leva a ativação constitutiva da via das MAPK, independente da sinalização extracelular, promovendo o aumento da sinalização para sobrevivência e proliferação celular. Os inibidores da mutação BRAFV600 bloqueiam a atividade constitutiva da via reduzindo a sinalização para proliferação e sobrevivência celular.

1.1.4 Terapias para melanoma

A excisão cirúrgica é uma abordagem efetiva para os estágios iniciais de melanoma (IBRAHIM E HALUSKA, 2009; MATTIA et al., 2018). No entanto, para pacientes com melanoma do estágio IV é utilizada a terapia sistêmica, incluindo quimioterapia citotóxica, terapia alvo-dirigida, imunoterapia e combinação terapêutica (BHATIA et al., 2009; APLIN, KAPAN e SHAO, 2011). O tratamento do melanoma metastático continua sendo um desafio, devido ao seu baixo prognóstico e por não ser responsivo às terapias convencionais (IBRAHIM E HALUSKA, 2009; MATTIA et al., 2018).

A quimioterapia padrão para o melanoma se baseia no uso de agentes alquilantes, que promovem a transferência do grupo alquil para as bases nitrogenadas gerando adutos de DNA (SWIFT & GOLSTEYN, 2014), como a dacarbazina, aprovado inicialmente pelo FDA em 1975 e continua sendo o tratamento padrão para melanoma metastático, apesar da baixa taxa de resposta (cerca de 10%) e carência de dados sobre o benefício para a sobrevivência (BHATIA et al., 2009). Seguindo uma linha do tempo, da terapia para melanoma, o tratamento com altas doses de IL-2 foi aprovado pelo FDA em 1998. A IL-2 atua estimulando a proliferação e atividade de linfócitos-T e de células natural *killer*, no entanto, este tratamento é limitado pela baixa taxa de resposta e severa toxicidade, apesar de uma parcela dos pacientes apresentarem resposta durável (BHATIA et al., 2009; FINN et al., 2012).

Até o ano de 2011, somente estas duas terapias haviam sido aprovadas para o tratamento de melanoma metastático pelo FDA (Finn et al., 2012), mas desde então, os bloqueadores de *checkpoint* imunológico (ipilimumabe, pembrolizumabe e nivolumabe) e as terapias alvo-dirigidas (dabrafenibe, trametinibe e vemurafenibe) têm conduzido a um grande progresso no tratamento levando a promoção da vida livre de doença e/ou da sobrevida global em pacientes com melanoma metastático (GROB et al., 2015).

O melanoma se apresenta suscetível a abordagens para a modulação do sistema imune (BHATIA et al., 2009). Nas últimas décadas, intensificaram-se os estudos sobre o microambiente tumoral, que permitiu a identificação de *checkpoints* imunológicos, moléculas com papel regulatório/ supressor, possibilitando a imunoterapia contra algumas moléculas chaves (MATTHIA et al., 2018). O antígeno 4 associado ao linfócito-T citotóxico (CTLA-4), quando se liga ao respectivo ligante, transmite sinal inibitório, que resulta na diminuição da resposta imune. O ipilimumab (Yervoy[®]) é o anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 melhor estudado, e foi avaliado em testes clínicos em vários tumores (UGUREL et al., 2016; MATTIA et al., 2018). Este anticorpo pode bloquear a sinalização inibitória, podendo reativar a resposta antitumoral (FLAHERTY et al., 2012; BHATIA et al., 2009). Em um estudo prospectivo com pacientes em estágio IV do melanoma, foi verificado melhoria da sobrevida global em três anos, apresentando significância de 5%, quando comparados pacientes que receberam ipilimumab em combinação com a dacarbazina com grupos que receberam monoterapia com dacarbazina ou o placebo (MATTIA et al., 2018).

O segundo *checkpoint* que tem potencial terapêutico antitumoral são as proteínas PD-1 e seu ligante (PD-L1). PD-1 é uma proteína transmembranânica de sinalização

inibitória para a resposta imune, em que PD-L1 se liga a PD-1 presente nos linfócitos ativadas, levando a sua morte celular e assim promovendo a imunotolerância (FINN et al., 2012; MATTIA et al., 2018). Diferentes anticorpos foram desenvolvidos para bloquear o *checkpoint* PD-1; o nivolumab (Opdivo[®]), aprovado pelo FDA em 2014, foi o primeiro anticorpo anti-PD-1 desenvolvido. Um teste clínico recente revelou que a combinação de ipilimumab e nivolumab leva ao aumento da sobrevida livre de progressão em comparação a monoterapia (MATTIA et al., 2018).

O conhecimento de vias de sinalização essenciais para a progressão do tumor tem sido um campo para novas estratégias de tratamento de melanoma, levando ao desenvolvimento de drogas que atuam sobre moléculas e vias específicas como, por exemplo, vemurafenibe e dabrafenibe – inibidores específicos de mutações em BRAF, e o trametinibe – inibidor de MEK (MERLINO et al., 2016; NIKOLOAU et al., 2012; KWONG E DAVIES, 2013; FINN et al., 2012).

A identificação de mutações *drivers* para o desenvolvimento do melanoma foi o pontapé inicial para o desenvolvimento de terapias alvo-dirigidas. O vemurafenibe foi desenvolvido como um potente inibidor competitivo de ATP da quinase RAF, com “preferência” para o mutante (APLIN, KAPLAN E SHAO, 2011), e se mostrou um potente agente terapêutico para o tratamento de melanoma BRAF V600E positivo (figura 1), promovendo a redução da massa tumoral por um curto prazo, com média de resposta de 5 a 6 meses (KWONG E DAVIES, 2013). Em triagem randomizada de fase 3 (*BRAF inhibitors in melanoma - BRIM3*), foi avaliada a efetividade dos inibidores de BRAF em pacientes (não foram previamente tratados) com melanoma metastático, eles receberam tratamento com vemurafenibe e dacarbazina, apresentando taxa de resposta para os tratamentos de 48% e 5% de, respectivamente (FINN et al., 2012). As terapias alvo-dirigidas têm apresentado maior eficácia para o tratamento de melanoma metastático em relação à terapia convencional. Tanto o vemurafenibe, iBRAF, quanto o cobimetinibe, iMEK, demonstraram atividade superior à da dacarbazina, levando ao aumento significativo da sobrevida livre de progressão e a sobrevida global dos pacientes (UGUREL t al., 2016).

Na maioria dos pacientes tratados com vemurafenibe, ocorre o relapso do tumor em menos de um ano, pois este rapidamente adquire resistência ao tratamento (Kwong e Davies, 2013) Desse modo, novas estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas, como, por exemplo, a combinação de vemurafenibe e cobimetinibe, aprovada pelo FDA em 2015, que levou a prolongação da sobrevida livre de progressão e a sobrevida global dos

pacientes; no entanto, a combinação não foi capaz de prevenir o relapso do tumor (UGUREL et al., 2016).

1.1.5 Resistência aos inibidores de BRAF

A resistência a quimioterápicos é dividida em duas categorias: a intrínseca e a adquirida. A resistência intrínseca se dá pela seleção de clones que possuem fatores pré-existentes que tornam a terapia ineficiente; já a resistência adquirida é desenvolvida durante o tratamento, no qual as células que eram inicialmente sensíveis sofrem mutações e reprogramação celular devido às respostas adaptativas (HOLOHAN et al., 2013; MATTIA et al., 2018).

O período de resposta das terapias alvo-dirigida é curto, pois a quimioterapia, bem como a imunoterapia, levam ao desenvolvimento de resistência ao tratamento, que é um dos maiores desafios para o sucesso da terapia anticâncer (HAMMERLINDL e SCHAIDER, 2018).

A resistência ao tratamento emerge da heterogeneidade tumoral, da reativação da via das MAPK por mutações adicionais e da ativação de vias compensatórias alternativas (HOLOHAN et al., 2013; HAMMERLINDL e SCHAIDER, 2018; MATTIA et al., 2018). A heterogeneidade tumoral surge a partir da diversidade genética das células dentro do tumor primário, ou entre os diferentes sítios; da plasticidade fenotípica, em que se verifica a mudança do estado proliferativo para o invasivo; e da variação da expressão de marcadores de células-tronco tumorais (HAMMERLINDL e SCHAIDER, 2018).

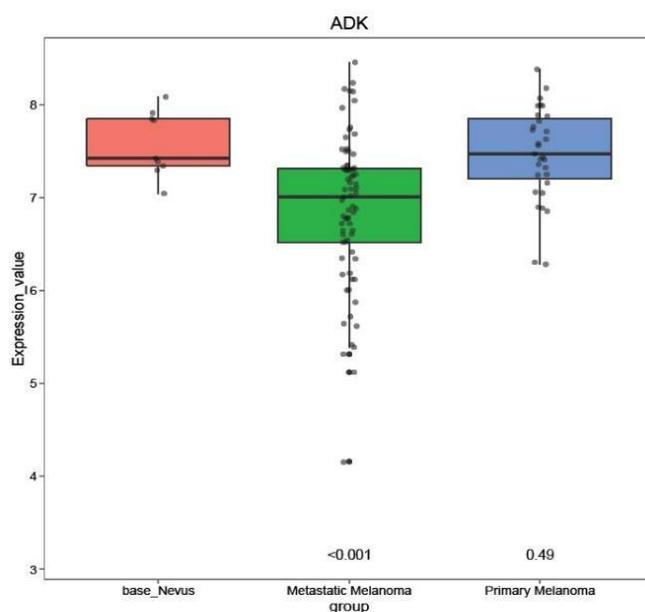
A reativação da via das MAPK se dá por mutações nos genes RAS ou MEK1, por dimerização de *splice* aberrante de BRAF, amplificação de BRAF e KRAS, ativação da via de PI3K-AKT, através da redução de PTEN ou mutações em AKT1, pelo aumento da expressão de CRAF e ativação de EGFR, acarretando o aumento dos níveis de ERK1/2 (SHARMA et al., 2017; HAMMERLINDL e SCHAIDER, 2018; MATTIA et al. 2018; APLIN, KAPAN E SHAO, 2011; NAZARIAN et al., 2010; SALTON et al., 2015).

Outros fatores que levam a resistência às drogas são: perturbação da maquinaria de apoptose, superativação de vias de sinalização de transportadores de drogas e ativação de vias compensatórias como, por exemplo, a superexpressão de COT1 (MATTIA et al. 2018; SHARMA et al., 2017; APLIN, KAPAN E SHAO, 2011)

A fim de conhecer melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência adquirida e na progressão do melanoma o nosso grupo (Oliveira et al., 2017)

obteve, a partir de uma plataforma toxicogenômica e do cruzamento de informações de banco de dados *The Gene Expression Omnibus* (GEO), um grupo de genes que apresentam expressão alterada em diferentes fases da progressão do melanoma, dentre estes genes se destaca ADK. Oliveira e colaboradores (2017) avaliaram, partir de bancos de dados públicos, a expressão do gene ADK em pacientes portadores de *nevus*, tumores primários e melanoma maligno metastático. A figura 2 evidencia que há diferença no padrão de expressão gênica de ADK nas diferentes fases da progressão do melanoma, em que se verifica que a média dos pacientes com melanoma maligno metastático apresentam redução da expressão de ADK em relação ao *nevus*. Esse dado sugere que há uma relação entre a atividade da enzima ADK e a agressividade do tumor.

Figura 2. Dados da expressão de ADK



Fonte: Oliveira et al., 2017. Expressão gênica de ADK em nevus, melanomas primários e metastáticos originados a partir do banco de dados GSE GSE46517.

1.2 Adenosina quinase (ADK)

1.2.1 Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo púrico presente em todos os tecidos e fluídos corpóreos (SCHULT e FREDHLOM, 2003). Os níveis intra e extracelulares de adenosina são regulados por duas enzimas: a adenosina deaminase (ADA) e a adenosina quinase (ADK), que catalisam as reações de deaminação, levando a formação de inosina, e de fosforilação, formando a adenosina monofosfato (AMP), respectivamente (SCHULT e FREDHLOM, 2003; PARK e GUPTA, 2013; KÖHLER et al., 2016; MOROTE-GARCIA et al., 2008; BOISON, 2013).

As respostas à adenosina são mediadas por quatro receptores acoplados à proteína G, que são designados A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ e A_3R (MOROTE-GARCIA et al., 2008; BOISON, 2013; PARK e GUPTA, 2013; LEE et al., 2005; KOWALUK e JARVIS, 2000). Os receptores de adenosina A_1R e A_3R estão acoplados à proteína G_i , inibindo a adenilato ciclase e, conseqüentemente, inibindo a produção de AMP cíclico (cAMP) e interagindo com a fosfolipase C; já os receptores A_2R estão acoplados à proteína G_s , estimulando a adenilato ciclase resultando na produção de cAMP (LEE et al., 2005; KOWALUK e JARVIS, 2000).

Os receptores de adenosina podem tanto favorecer quanto inibir a proliferação de uma variedade de tipos celulares (SCHULTE E FREDHOLM, 2003). A adenosina apresenta efeito mitogênico ERK1/2-dependente sobre as células endoteliais via $A_{2A}R$, que está envolvido na proliferação em vários tipos de células, podendo ativar a todas as três famílias de MAPK: a ERK1 / 2, p38 e JNK (SCHULTE E FREDHOLM, 2003); já para o A_3R a adenosina induz a inibição da proliferação celular, em linhagens de melanoma (BOISON, 2013, SCHULTE E FREDHOLM, 2003, FISHMAN et al., 2002, MERIGHI et al., 2005).

A adenosina regula diversos processos fisiológicos e mecanismos celulares, dentre os quais destacam-se os efeitos cardioprotetores, que inclui proteção contra a isquemia e a reperfusão; atenuação da hipertrofia e a insuficiência cardíaca durante sobrecarga de pressão (CUI et al., 2009; FASSET et al., 2011), além de atuar sobre o tônus muscular e a hemodinâmica (MELLO et al., 2014; UGAKAR ET AL., 2000). A adenosina também apresenta efeito neuromodulador (CUI et al., 2009; LEE et al., 2005), neuroprotetor,

durante a isquemia, a epilepsia e outros agravos neurais (PIGNATARO, SIMON e BOISON, 2007; CUI et al., 2009), além de regular a sensação de dor e o sono (MELLO et al., 2014; PALCHYKOVA et al., 2010); possui ainda efeito anti-inflamatório (LEE et al., 2005) e atua como modulador da resposta imune e da degranulação de mastócitos (SHEN et al., 2011).

Foi descrito que a adenosina pode induzir morte celular em diferentes tipos celulares (HASHEMI et al., 2005; MELLO et al., 2014), atuar sobre o metabolismo (LEVOIME, CLAEYSSSENS e CHECLEVELE, 1990), estimular a angiogênese e remodelamento de tecidos (SHEN et al., 2011; SCHULTE E FREDHOLM, 2003), além de ativar a inibição do crescimento celular e interferir na progressão do ciclo celular (HASHEMI et al., 2005). Alguns estudos (FISHMAN et al., 2002, MERIGHI et al., 2005) demonstraram que a adenosina inibe a proliferação celular em linhagens de melanoma via receptor A_3 . Ambos os grupos utilizaram um análogo de adenosina, o Cl-IB-MECA; o primeiro grupo trabalhou com linhagem murina, B16-F10, enquanto o segundo avaliou essa atividade na linhagem humana A375. Os dois trabalhos verificaram redução da expressão de componente da via das MAPK e aumento da expressão de AKT.

Desse modo, a adenosina vem sendo estudado em diversas patologias como um poderoso agente anticonvulsivante e contra a epilepsia e em desordens neurais e neurodegenerativas, bem como em diversos tumores, tais como: epiteliais, câncer de mama, de cólon e de ovário (MELLO et al., 2014).

1.2.2 Adenosina quinase (ADK)

A adenosina quinase (ADK, AK; EC 2.7.1.20) pertence à família das proteínas riboquinases (CUI et al., 2009); ela é uma fosfotransferase altamente conservada na evolução, tanto na sequência quanto na estrutura, e abundante em todas as células eucarióticas, contudo a sua presença também foi descrita em *Mycobacterium tuberculosis* (WANG et al., 2003; PALCHYKOVA et al., 2010; CUI et al., 2009).

Schnebli, Hill e Bennet (1996) demonstraram a especificidade da adenosina quinase para os substratos adenosina e 2-aminoadenosina. ADK é uma enzima chave no catabolismo de adenosina, catalisando a reação que transfere o γ -fosfato do ATP ou GTP para a adenosina, produzindo 5'-adenosina monofosfato (Adenosina + ATP \rightarrow AMP +

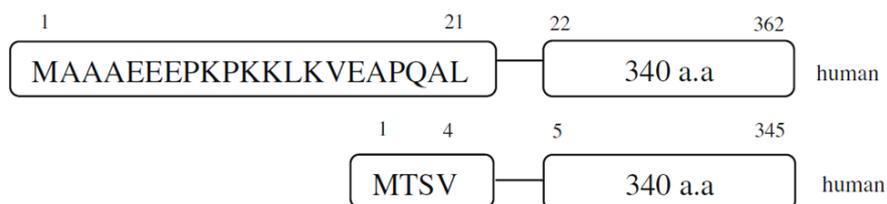
ADP) (PARK E GUPTA, 2013; LEE et al., 2005; BOISON, 2013; FLUCKIGER-ISLER e WALTER, 1993; KOWALUK e JARVIS, 2000).

A enzima ADK apresenta baixo K_m para adenosina ($1\mu\text{M}$) enquanto que o K_m da ADA para adenosina é de $25\text{-}1150\mu\text{M}$, indicando que ADK faz parte da rota primária do metabolismo de adenosina na evolução (PIGNATARO, SIMON e BOISON, 2007; BOISON, 2013; PARK e GUPTA, 2013).

Groot e colaboradores (2012) destacam que, dentro de tumores gliais, há expressão variável dos níveis de ADK, e que esta diferença pode ser devido a perfusão intratumoral e aos gradientes de hipóxia, uma vez que se verifica o aumento da expressão de ADK na margem do tumor e na frente de invasão, também verificado em tumores sólidos, com altas concentrações de adenosina em áreas de tecido necrótico (GIGLIONI et al., 2008). O aumento da concentração de adenosina está associado com a repressão transcricional de ADK. Estudos de ganho e perda de função de HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 α) demonstraram que este fator de transcrição é responsável pela repressão da expressão de ADK durante a hipóxia (MOROTE-GARCIA et al., 2008).

Já a ativação da expressão de ADK é modulada por insulina. Os resultados de Pawelcyk e colaboradores (2002) demonstram, usando modelo de camundongos diabéticos, que a via MAPK é a responsável por esse efeito *downstream* da insulina, e que o complexo AP-1 pode atuar regulando a ativação da transcrição de ADK, uma vez que este gene apresenta vários motivos "AP-1-like".

A enzima ADK apresenta duas isoformas: ADK-curto (ADK-S) e ADK-longo (ADK-L), codificadas por *splicing* diferencial no primeiro éxon, sendo as isoformas idênticas, com exceção da porção N-terminal; a isoforma longa contém de 20-21 aminoácidos extras que são substituídos por 4 aminoácidos na isoforma curta (figura 3) (PARK e GUPTA, 2013; CUI et al., 2009; BOISON, 2013). As duas isoformas de ADK possuem diferença quanto a sua sublocalização celular: as duas são encontradas no citoplasma, mas somente ADK-L é encontrada no núcleo; discute-se que a sequência dos aminoácidos N-terminal codifica um sinal para a localização nuclear, também presente em outras proteínas nucleares (PARK e GUPTA, 2013; CUI et al., 2009; BOISON, 2013; CUI et al., 2011).

Figura 3. Isoformas de ADK

Fonte: Adaptado de CUI et al., 2009. As isoformas de ADK são codificadas por *splicing* diferencial no primeiro éxon, sendo as isoformas idênticas, com exceção da porção N-terminal; a isoforma longa contém de 20-21 aminoácidos extras que são substituídos por 4 aminoácidos na isoforma curta.

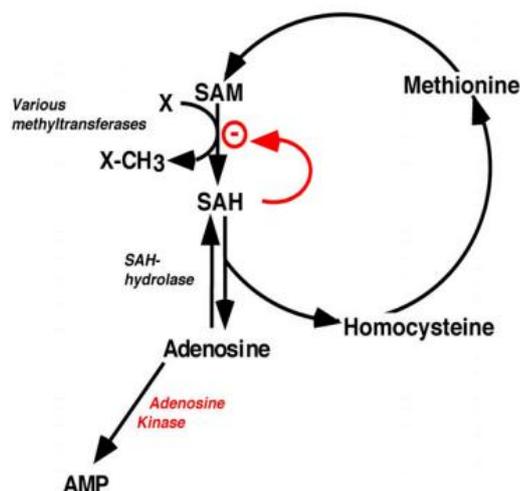
As duas isoformas de ADK são diferencialmente expressas nos tecidos humanos. Estudos têm demonstrado que o coração, o timo, o músculo esquelético e o cérebro expressam predominantemente uma das isoformas; já no fígado, no rim, no pulmão e no pâncreas as duas isoformas são expressas em níveis comparáveis (PARK e GUPTA, 2013; CUI et al., 2011).

As isoformas de ADK apresentam diferentes funções: ADK-S está envolvida na regulação dos níveis de adenosina nos tecidos, e seus efeitos são dependentes dos receptores de adenosina (BOISON, 2013) e, pelo fato de regular os níveis de AMP, ADP e ATP, torna-se um sensor do sistema energético da célula (SHEN et al., 2011; BOISON, 2013), enquanto que ADK-L pode atuar na regulação da proliferação em células- β pancreáticas, via ativação de mTOR (ANNES et al., 2012), na regulação da metilação do DNA e assim participar de mecanismos de controle epigenéticos (SHEN et al., 2011; BOISON, 2013).

Foi descrito que ADK pode mediar efeitos anti-hipertróficos em cardiomiócitos (FASSET et al., 2011), induzir inflamação, devido a atividade da S-adenosilhomocisteína hidrolase (SAHH) levar ao aumento dos níveis de TNF- α (XU et al., 2017), e atuar em um dos mecanismos de controle epigenético. ADK tem importante papel na transmetilação (figura 4), reação que envolve a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o grupo aceptor (etanolamina ou DNA) resultando na formação de S-adenosil-homocisteína (SAH). Esta pode ser convertida a adenosina e homocisteína pela enzima SAHH, quando as concentrações de adenosina estão baixas. SAH é um potente inibidor da atividade de metiltransferases dependentes de SAM, desse modo ADK é essencial para a via de transmetilação, uma vez que consome o produto inibitório dessa via - a adenosina - permitindo assim, o seu funcionamento (PARK e GUPTA, 2013; BOISON, 2013), reação representada na figura 4. Foi verificado que os

camundongos transgênicos ADK^{-/-} apresentaram mortalidade precoce, uma vez que os mecanismos de controle epigenético são essenciais para o desenvolvimento dos organismos (PARK e GUPTA, 2013; CUI et al., 2009)

Figura 4. Papel de ADK na reação de transmetilação



Fonte: BOISON, 2013. Durante a transmetilação ocorre a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o grupo aceptor (etanolamina ou DNA) resultando na formação de S-adenosil-homocisteína; esta pode ser convertida à adenosina e homocisteína pela enzima SAHH, quando os níveis de adenosina estão baixos. Como o acúmulo de SAH inibe a atividade de SAM, o consumo da adenosina pelo ADK mantém baixos os níveis de adenosina, e por consequência da conversão de SAH em adenosina, os níveis do primeiro se mantêm baixos permitindo o funcionamento da via de transmetilação.

Palchykovak e colaboradores (2010) demonstraram tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* que há uma relação entre a atividade de ADK e o sono; o grupo observou que a superexpressão de ADK leva a redução do sono e que a privação de sono leva a maior atividade de ADK no córtex de roedores. ADK está relacionada com algumas patologias, dentre elas se destacam: epilepsia, diabetes e câncer (BOISON, 2013). A adenosina tem efeito neuroprotetor, de modo que ADK é reduzida durante ataques epiléticos e isquemia, para que seja aumentado os níveis de adenosina (GROOT et al., 2012), Shen e colaboradores demonstraram que camundongos *knockout* para ADK apresentam tolerância para isquemia, evidenciando o efeito neuroprotetor da adenosina, desse modo ADK vem sendo estudado como alvo terapêutico para epilepsia crônica e convulsões, uma vez que é observado nesses casos a sua superexpressão (GROOT et al., 2012; LI, SIMON e BOISON, 2008; LUAN et al., 2008). Fasset e colaboradores (2011) descreveram que ADK atua como um atenuador da hipertrofia de cardiomiócitos. Outro

estudo verificou que ambos os inibidores de ADK e a inibição de ADK usando RNA de interferência promovem a proliferação de células- β pancreáticas de roedores e de porcos, em modelo de diabetes tipo 2, desse modo acredita-se que ADK seja um regulador da proliferação dessas células (ANNES et al., 2012; NAVARRO et AL., 2017).

A expressão diferencial de ADK já foi relatada em diversos tumores. Foi demonstrado que, em câncer colorretal humano há superexpressão de ADK quando comparado ao tecido não tumoral do mesmo paciente (GIGLIONI et al., 2008). Também nos tumores cerebrais, gliomas e tumores astrocíticos, se verificou maior expressão de ADK no tecido infiltrado em relação ao não infiltrado (GROOT et al., 2012). Já em hepatomas de ratos foi verificado menor expressão de ADK em relação ao fígado normal, de modo que há uma atividade proliferativa inversamente proporcional à expressão de ADK (JAKSON, MORRIS e WEBER, 1978); em linhagens derivadas de câncer de mama, a adenosina e a deoxiadenosina foram capazes de induzir apoptose, e este processo foi ativado quando ADK converte a adenosina em AMP (HASHEMI et al., 2005).

Como foi apresentado, os níveis de adenosina e a atividade de ADK podem desempenhar papel crucial na tumorigênese e em diversos tumores, porém há uma escassez de estudos com melanoma.

1.2.3 Inibidores de ADK

A atividade de ADK e a regulação dos níveis de ADK estão envolvidas com diversas patologias, desse modo ADK se mostra como um importante alvo terapêutico. Os inibidores de ADK podem ser aplicados na analgesia, uma vez que a adenosina atua na sinalização de dor para o medula espinal; na inflamação, uma vez que se verifica que a adenosina modula a função de neutrófilos e a permeabilidade endotelial; como anticonvulsivante; anti-epileptogênico e agente cardioprotetor (PARK e GUPTA, 2013; KOWALUK e JARVIS, 2000; XU et al., 2007). Desse modo foram desenvolvidos alguns inibidores para essa enzima, que pertencem, principalmente, a duas classes: os inibidores nucleosídeos e os não-nucleosídeos (BOISON, 2013; PARK e GUPTA, 2013).

Os inibidores nucleosídeos análogos estruturais da adenosina, são: 5'-amino,5'-deoxiadenosina, 5-iodotubercidina e 5'-deoxi,5-iodotubercidina (BOISON, 2013; PARK e GUPTA, 2013) estes inibidores apresentam IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da atividade da enzima) na ordem de nanomolar, sendo altamente potente na inibição *in vitro*

ADK isolado de humanos (PARK e GUPTA, 2013; UGAKAR et al., 2000). Estes inibidores apresentam modificações no grupo 5' da adenosina, que incluem hidroxili-, cloro-, azido-, deoxi-, amino-, fluoro- e iodina-, pois isto permite a competição com a adenosina pelo sítio de ligação da enzima (BOISON, 2013).

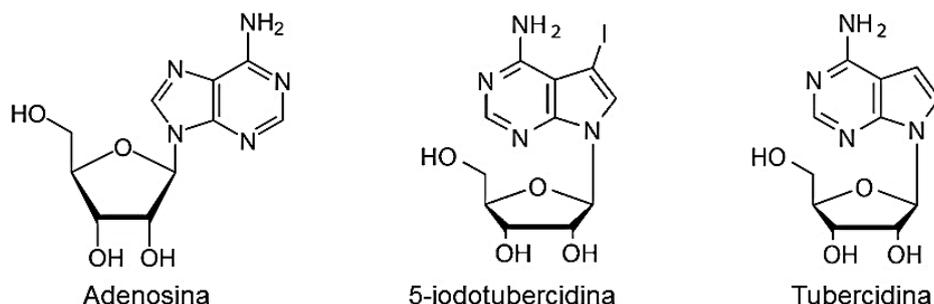
Os inibidores não-nucleosídeos são moléculas que perdem a ribose ou o anel ciclopentano. Esses inibidores são divididos em duas classes: piridopirimidina e alquinilpririmidina, a ABT-702 por exemplo é uma piridopirimidina que demonstra IC₅₀ de 1,7nM e afeta igualmente as duas isoformas (BOISON, 2013; PARK e GUPTA, 2013)

1.3 5-iodotubercidina (5-ITu)

A 5-iodotubercidina (5-ITu), também conhecida como 5-iodo-7-deazaadenosina, é um derivado da tubercidina (7-dezaadenosina) (figura 5). A substituição na posição 5' da tubercidina por um átomo halógeno, tal como: cloro, bromo e iodo, aumenta significativamente a afinidade por ADK, sendo 100 vezes maior a afinidade de 5-ITu por ADK em relação a tubercidina (KOWALUK e JARVIS, 2000; UGAKAR et al., 2000).

5-ITu foi descrita como um potente e seletivo inibidor de ADK, apresentando IC₅₀ de 22nM (FLUCKIGER-ISLER e WALTER, 1993; PHILLIS e SMITH-PARBOUR, 1993; GARCIA-VILLAFRANCA & CASTRA, 2002; MASSOLIN et al., 1994; ZHANG et al., 2013; KIM et al., 2017), esta seletividade está associada com a sua estrutura molecular que é semelhante à adenosina, diferindo na substituição do nitrogênio na posição 7 da adenosina por um carbono que está ligado ao iodo na 5-ITu (ZHANG et al., 2013; KIM et al., 2017), como pode ser observado na figura 5.

Figura 5. Fórmula estrutural da adenosina, 5-iodotubercidina (5-ITu) e da tubercidina



Fonte: autoria própria . A figura 4 apresenta a estrutura da adenosina, 5-iodotubercidina e a tubercidina, demonstrando a semelhança entre as moléculas.

A 5-ITu é um potente inibidor de ADK (GARCIA-VILLAFRANCA & CASTRA, 2002; MASSOLIN et al., 1994; ZHANG et al., 2013; KIM et al., 2017) e é amplamente usado em estudos sobre o efeito de adenosina, bem como para determinar a função de ADK (GARCIA-VILLAFRANCA & CASTRA, 2002). Devido ao papel crítico de inibição de ADK, os efeitos da 5-ITu têm sido estudados como um potencial tratamento para desordens nos sistemas imune, cardiovascular e nervoso relacionadas aos níveis de adenosina (ZHANG et al., 2013).

Como já foi mencionado, ADK transfere o grupo fosfato do ATP para a adenosina, produzindo ADP e AMP, o aumento dos níveis de AMP ativam a quinase dependente de AMP (AMPK) (SAMARI e SEGLEN, 1998; KOZGUNOVA; HIGASHIYAMA & KIURIHAIA, 2016) que pode suprimir a autofagia, desse modo 5-ITu é capaz de reverter o efeito supressor da adenosina (SAMARI e SEGLEN, 1998; PEYTON et al., 2012) de indução da autofagia em hepatócitos de rato (SAMARI e SEGLEN, 1998) e induzir a proliferação de células endoteliais humanas (PEYTON et al., 2012).

No entanto, alguns estudos sugerem que 5-ITu atua como um inibidor de várias quinases (MASSOLIN et al., 1994; GARCIA-VILLAFRANCA & CASTRA, 2002; ZHANG et al., 2013), e seus efeitos foram descritos sobre o metabolismo. O metabolismo de glicogênio é controlado principalmente pelas enzimas glicogênio sintase e a fosforilase, 5-ITu se liga a desfosforilase, promovendo a desfosforilação e assim permitindo a ativação da glicogênio sintase em hepatócitos de rato (MASSOLIN et al., 1994; FLUCKIGER-ISLER e WALTER, 1993); 5-ITu também se mostrou capaz de inibir a glicólise além de reduzir a taxa de síntese de ácidos graxos *de novo* e a atividade da Acetil-CoA carboxilase em hepatócitos de rato (GARCIA-VILLAFRANCA e CASTRO, 2001).

Itu apresenta uma alta seletividade para a inibição da Haspin quinase, com IC_{50} de 5 – 9nM (MAIOLICA et al., 2014; DE ANTONI et al., 2012). Haspin é uma proteína nuclear que fosforila a histona 3 na treonina 3 (H3T3) promovendo o recrutamento do complexo cromossomo *passenger* (CPC), desse modo a inibição de Haspin por 5-ITu leva a perturbação da localização centromérica e da atividade da Aurora B quinase, consequentemente desalinha os cromossomos e desfaz a coesão das cromátides irmãs,

além de impedir o recrutamento do *checkpoint* de montagem do fuso ao cinetócoro (QUARTUCCIO, DIPALI e SCHINDLER, 2016; DE ANTONI et al., 2012; BALZANO et al., 2011; HADDAD et al., 2012).

Kozgunova, Higashiyama & Kiurihaia (2016) descreveram que o tratamento com 5-ITu nas células vegetais BY-2 promove defeitos na citocinese, caracterizada pela expansão da placa celular tardia e perturbação da dinâmica dos filamentos de actina.

Recentemente foi descrito que 5-ITu promove a despigmentação de células de melanoma humano HM3KO e inibe a melanogênese em embriões de *zebrafish*, estes efeitos estão relacionados a redução do nível de proteínas relacionadas à pigmentação, MITF a tirosinase e TRP1 além do aumento da fosforilação de AKT e ERK, a ativação de AKT leva a inibição da melanogênese, (KIM et al., 2017).

Como foi possível observar na figura 5, a 5-ITu tem estrutura similar à do nucleosídeo adenosina, podendo assim ser considerada um análogo de nucleosídeo. Estes tipos de compostos podem ter efeitos citotóxico, desregulando a síntese normal de DNA, devido sua incorporação no DNA se tornando um obstáculo para a forquilha de replicação, causando quebra em uma ou nas duas fitas de DNA ou desestabilizando o balanço dos desoxinucleotídeos (EWALD et al., 2008; ZANG et al., 2013)

ZHANG e colaboradores (2013) demonstraram que a 5-iodotubercidina apresenta potencial para tratamento anti-tumoral, uma vez que se verificou que 5-ITu atua como ativador de p53 em cultura primária de fibroblasto embrionário de camundongo e linhagem HCT116, derivada de câncer de colón humano, no entanto, este efeito não é via ADK. Além disso, foi verificado que 5-ITu apresenta-se como um potencial agente genotóxico, promovendo a parada do ciclo celular e morte celular dependente e independente de p53, estes efeitos se devem à 5-ITu ativar a via Atm-p53.

1.4 Checkpoint do ciclo celular

1.4.1 Ciclo celular

O ciclo celular é uma série de eventos no qual as células replicam o seu genoma e se dividem em duas células idênticas (ALBERTS et al., 2010; BARNUM e O'CONNELL, 2014). Este processo é regulado e organizado por uma rede complexa de vias de sinalização, que atuam para promover a progressão correta do ciclo celular (ALBERTS et al., 2010; DIAZ-MORALLI et al., 2013).

O ciclo celular consiste em quatro fases sequenciais, são elas: G1, S, G2 e mitose. Na fase S (fase de síntese de DNA) o genoma é duplicado, enquanto que na mitose ocorre a segregação cromossômica e a divisão celular; as duas fases *gap*, G1 e G2, separam a fase S da mitose. Também é nesta fase que as células integram os sinais de crescimento e organizam-se para a divisão celular (BARNUM e O' CONNELL, 2014; ALBERTS et al., 2010; JHONSON e WALKER, 1999).

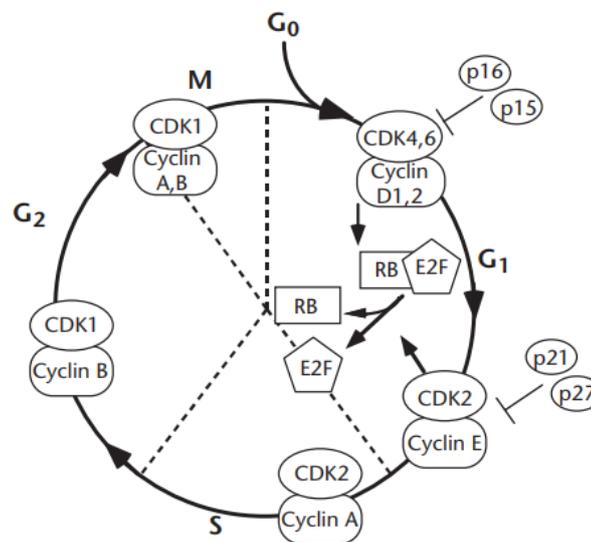
O mecanismo central que regula a progressão do ciclo celular é a ativação do complexo ciclina/CDK. Este complexo é composto por duas subunidades, uma regulatória – clicina e outra catalítica – quinase dependente de ciclina (CDK); a ativação desse complexo é dependente de fosforilação pela quinase ativadora de CDK (CAK) (KRENNING, 2015; FUNK, 2005; DIAZ-MORALLI et al., 2013). Após a ativação, o complexo ciclina/CDK fosforila substratos chaves para a progressão do ciclo celular (BARNUM e O' CONNELL, 2014). CDK é constitutivamente expressa, já a ciclina tem expressão fase-específica, e sua abundância é regulada pela expressão e degradação, estimulada por sinais internos e externos (KRENNING, 2015; DIAZ-MORALLI et al., 2013).

Durante a fase G1, a célula integra os sinais inibitórios, mitogênicos e de crescimento para prosseguir, parar ou sair do ciclo celular (JHONSON e WALKER, 1999). Em resposta à sinalização mitogênica, as células passam a expressar ciclina D, que se liga à CDK4 e a CDK6; quando os complexos ciclina D/CDK4 e ciclina D/CDK6 são ativados, eles fosforilam proteínas membros da família retinoblastoma (RB), levando a sua inibição parcial e liberação do fator de transcrição E2F. Este ativa a transcrição de genes requeridos na fase S, como as ciclinas E e A, e outros genes envolvidos nos *checkpoints* do ciclo celular, na replicação e no reparo do DNA (KRENNING, 2015; FUNK, 2005; DIAZ-MORALLI et al., 2013). Uma vez na fase S, a fim de evitar a re-duplicação do DNA, o complexo ciclinaE/CDK2 é inativado devido a degradação da ciclina E, ao mesmo tempo a inativação de RB permite a transcrição das ciclinas A e B, então a CDK2 livre se liga à ciclina A, que fosforila E2F, liberando-o do DNA e permitindo a transição da fase S para G2 (DIAZ-MORALLI et al., 2013).

Durante a fase G2, a ciclina A é degradada por proteólise mediada pela ubiquitinação, enquanto que a ciclina B é sintetizada. O complexo ciclina B/CDK1 é essencial para iniciar a mitose, pois fosforila várias proteínas envolvidas nos processos regulatórios e estruturas requeridas para a mitose (DIAZ-MORALLI et al., 2013). Para que a segregação das cromátides-irmãs ocorra de maneira correta, é necessário que os

cinetócoros estejam ligados, tensionados e alinhados ao fuso mitótico. A progressão da requer que ubiquitinação e degradação da ciclina B e da securina, pelo complexo ubiquitina quinase, conhecido como complexo promotor da anáfase/ ciclossomo (APC/C), e assim ocorrer separação das cromátides-irmãs e a clivagem das coesinas no complexo dos cinetócoros (KRENNING, 2015; BARNUM e O' CONNELL, 2014; DIAZ-MORALLI et al., 2013).

Figura 6. Modelo simplificado da regulação do ciclo celular



Fonte: Funk, 2005. Diferentes complexos ciclina/CDK regulando a progressão através das fases do ciclo celular, através da fosforilação de RB, liberando o fator de transcrição E2F.

1.4.2 Checkpoint do ciclo celular

O sistema de controle do ciclo celular ativa a progressão do ciclo celular em pontos de transição reguladores ou ponto de verificação, os *checkpoints* (ALBERTS et al., 2010). Os *checkpoints* do ciclo celular são sinais complexos de transdução de sinal que atuam como mecanismos de vigilância que monitoram a origem, a integridade e a fidelidade dos eventos do ciclo celular (BARNUM e O' CONNELL, 2014; FUNK, 2005). Os pontos de verificação são ativados quando há problemas em alguma fase do ciclo celular, de modo a induzir parada na progressão do ciclo celular até que o problema seja resolvido, se possível; e, se o reparo não for efetivo, há indução de parada permanente do

ciclo celular, senescência, ou morte celular (MOMBACH, BUGS e CHAOUIYA, 2013; DIAZ-MORALLI et al., 2013).

O primeiro ponto de verificação é o ponto de restrição no final da fase G1, onde a célula inicia o ciclo celular e duplica seus cromossomos (ALBERTS et al., 2010), a progressão de G1 para S depende de mitógenos e da disponibilidade de nutrientes (DIAZ-MORALLI et al., 2013). O segundo *checkpoint* está na transição entre as fases G2 e M, e o terceiro está na transição metáfase-anáfase, onde o sistema de controle estimula a separação das cromátides-irmãs, levando à conclusão da mitose e citocinese (ALBERTS et al., 2010).

Diferentes lesões no DNA genômico ativam vias de *checkpoint*, que mantêm o complexo ciclina/CDK inativo, assim parando a progressão do ciclo celular em G1, S e G2/M (VISCONTI, DELLA MONICA e GRIECO, 2016). As lesões no DNA podem ser originadas por quebras no DNA ou adutos; as quebras podem ocorrer em apenas uma das fitas - *single strand DNA break*- (ssDNA) ou nas duas fitas - *DNA double strand breaks* - (DSB). As últimas são ameaças para a estabilidade cromossômica e são os principais indutores de respostas ao dano no DNA (MOMBACH, BUGS e CHAOUIYA, 2013; KASTAN e BARTEK, 2004).

O dano no DNA pode decorrer de fontes endógenas, como erros de replicação do DNA, superexpressão de oncogenes, desgastes de telômeros, radicais livres gerados pelo processo metabólico; e por fontes exógenas, como a exposição à radiação ultravioleta, carcinógenos, radiação ionizante, agentes genotóxicos usados na terapia anticâncer, como alquilantes de DNA, que geram adutos de DNA e inibidores da topoisomerase, que levam a quebra do DNA (KASTAN e BARTEK, 2004; BARNUM e O' CONNELL, 2014; LAIHO e LATONEN, 2013). A resposta ao dano no DNA consiste em um importante mecanismo na biologia do câncer, uma vez que os danos no DNA gerando instabilidade cromossômica, que pode levar ao desenvolvimento do câncer; pode ser usado como terapia anti-tumoral, como a quimioterapia e a radioterapia; e devido aos efeitos colaterais das terapias (KASTAN e BARTEK, 2004).

O dano no DNA ativa vários complexos proteicos e vias de sinalização, sendo as mais notáveis Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) e Ataxia Telangiectasia Rad-3 relacionada (ATR) (PATIL, PABLA e DONG, 2013). Em geral, a resposta DSB é iniciada a partir do seu reconhecimento pelo complexo MNR (Mre11, Rad50, Nbs1). Este recruta ATM, que é ativada em qualquer fase do ciclo celular em que o dano for detectado (PATIL, PABLA e DONG, 2013; KRENNING, 2015; SHALTIEL et

aL.,2015). ATM ativa a *checkpoint* quinase 2 (Chk2), que induz parada do ciclo celular através da inibição da atividade da fosfatase Cdc25a, que remove a fosforilação inibitória dos complexos ciclina/CDK, prevenindo a transição das fases do ciclo celular (LAITHO e LAITONEN, 2013; VISCONTI, DELLA MONICA e GRIECO, 2016; PATIL, PABLA e DONG, 2013). Além disso, ATM/Chk2 são requeridas na estabilização de p53, que ativa a transcrição de p21, um inibidor de CDKs (SHALTIEL et aL.,2015; KASTAN e BARTEK, 2004; VISCONTI, DELLA MONICA e GRIECO, 2016).

A resposta a ssDNA é iniciada pela ativação de ATR, que ativa *Checkpoint* quinase 1 (Chk1). Esta é ativada somente em danos detectados nas fases S e G2 (BARNUM e O' CONNELL, 2014). A ativação de ATR/Chk1 ativa as quinases Jun e p38, que ativam vias relacionadas ao reparo por excisão de nucleotídeos e vias de fatores de transcrição como p53, NF-Kb e AP-1 (LAITHO e LAITONEN, 2013). A fase S é uma das mais vulneráveis ao dano no DNA (BARNUM e O' CONNELL, 2014), sendo mais propensa a danos do tipo ssDNA, levando a ativação de ATR e consequentemente Chk1 induz parada nessa fase do ciclo, devido a inativação da fosfatase Cdc25a, mantendo assim as marcas inibitórias do complexo ciclina E/CDK2, parando o ciclo em fase S (LAITHO e LAITONEN, 2013).

A ATR quinase induz parada no ciclo celular por estimular a quinase Wee1, que fosforila CDK1 e Cdc25c, inibindo-as; , a Cdc25c é uma fosfatase que remove a fosforilação inibitória durante a transição G2/M (SHATIEL et al., 2015; VISCONTI, DELLA MONICA e GRIECO, 2016; PATIL, PABLA e DONG, 2013). Chk1 também regula negativamente PLK1 (Polo *like* quinase 1), quinase que está envolvida na maturação do centrossomo, formação do fuso e citocinese (SHATIEL et al., 2015; PATIL, PABLA e DONG, 2013). O ponto de verificação em mitose é ativado em resposta ao dano do DNA e DNA não-replicado; um segundo ponto de verificação é ativado na mitose tardia, que previne a anáfase de cinetócoros não-ligados, o *checkpoint* de montagem do fuso (SAC) (LAITHO e LAITONEN, 2013).

SAC previne erros na segregação cromossômica, ao induzir atraso na progressão da anáfase, uma vez que inibe a atividade de APC/C. SAC é ativado pelo complexo *Checkpoint* mitótico quando os cinetócoros não estão ligados ou não-tensionados (BARNUM e O' CONNELL, 2014).

2. Justificativa

A agressividade dos melanomas metastáticos e sua resistência às terapias convencionais evidenciam que o melanoma representa um problema de saúde pública. Outro desafio no tratamento de melanoma é o desenvolvimento de resistência após o tratamento com inibidores específicos, por exemplo, o vemurafenibe, um inibidor de BRAF (iBRAF) a partir da ativação de vias de sinalização alternativas. Isto evidencia a necessidade de estudar outras vias de sinalização que participam da iniciação e progressão tumoral bem como entender os mecanismos de resistência.

Já foi relatado o envolvimento da enzima ADK em diversas neoplasias. A análise da expressão deste genes em pacientes com nevus, tumores primários e melanoma maligno metastático evidenciam a expressão diferencial de ADK entre *nevus* e tumores malignos (Oliveira et al., 2018), sugerindo uma relação entre a atividade da enzima ADK na agressividade do tumor. Desse modo, ADK pode se constituir como um alvo terapêutico para o tratamento do melanoma. Já foi demonstrado que 5-ITu, um inibidor farmacológico de ADK, apresenta propriedades antitumorais, como um potencial agente genotóxico, promovendo a parada do ciclo celular e morte celular. Somando-se a estes dados a escassez de estudos investigando o papel de ADK e do seu inibidor em melanomas, a proposta desse trabalho é avaliar o papel de ADK e da 5-iodotubercidina, em diversos processos envolvidos na progressão tumoral em linhagens derivadas de melanoma maligno metastático parentais e as resistentes ao inibidor de BRAF.

3. Objetivos

Geral

Avaliar a expressão do gene ADK em melanomas humanos e quimiorresistentes ao medicamento vemurafenibe, um inibidor de BRAF, bem como estudar o papel de 5-ITu, um inibidor de ADK na biologia do melanoma.

Específicos

1. Avaliar a expressão gênica de ADK em um amplo painel de melanomas humanos contendo mutações em BRAF e N-Ras.
2. Determinar a citotoxicidade de 5-ITu sobre cultura primária de melanócitos e linhagens de melanoma humano parentais e resistentes ao inibidor de BRAF (Vemurafenibe) em monocamada e modelos 3D.
3. Avaliar o potencial de 5-ITu na indução da formação de colônias
4. Analisar os efeitos de 5-ITu sobre a proliferação celular e sobre a progressão do ciclo celular
5. Investigar a possibilidade da superação da quimiorresistência ao inibidor de BRAF nas células tratadas com 5-ITu ou na combinação do inibidor de BRAF e 5-ITu.

4. Materiais e Métodos

4.1 Cultura de células

Foi utilizado um amplo painel de linhagens derivadas tanto de tecido não-tumoral quanto de melanomas humano, estas variam quanto o tipo de mutação, nos genes BRAF (V600E) ou N-Ras, e tipo de sítio, primários ou metastático. Foram utilizadas as seguintes linhagens : SKMEL28, SKMEL29, A375, WM164 parentais (P) e resistentes (R) ao vemurafenibe; SKMEL103, SKMEL147, SKMEL173WM35; e cultura primária de melanócitos como é possível observar na quadro 1.

Quadro 1. Caracterização das linhagens de melanoma

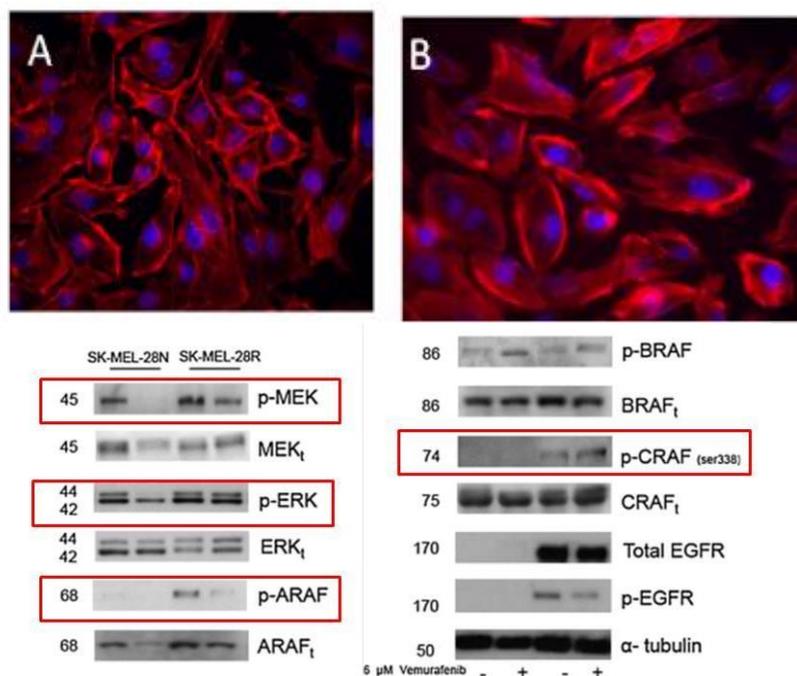
Linhagem	Tipo de sítio	Mutação em B-Raf	Mutação em N-Ras
SK-Mel-28	metastático	+	-
SK-Mel-29	metastático	+	-
A375	metastático	+	-
WM164	metastático	+	-
SK-Mel-103	metastático	-	+
SK-Mel-147	metastático	-	+
SK-Mel-173	metastático	-	-
WM35	primário RPG (fase de crescimento radial)	+	-

Fonte: autoria própria. As linhagens de melanoma foram caracterizadas quanto ao seu sítio de origem, primário ou metastática, quanto as mutações nos genes BRAF e N-Ras.

O nosso grupo desenvolveu um painel de linhagens com a mutação BRAF^{V600E} resistentes ao vemurafenibe (foram tratadas com concentrações crescentes de vemurafenibe, de modo que a resistência foi adquirida em concentrações entre 3µM e 6 µM) e estas células foram mantidas em cultura com as respectivas concentrações de resistência. Para caracterizar a resistência ao vemurafenibe foram analisadas diferentes proteínas da via das MAPK, em que se verificou que o tratamento agudo com vemurafenibe (72h) reduziu significativamente a fosforilação de MEK e ERK nas células

SK-Mel-28P enquanto que a linhagem SK-Mel-28R apresenta a reativação da via das MAPK após a aquisição de resistência ao vemurafenibe a partir do aumento de ARAF, CRAF e EGFR, como é possível observar na figura 7.

Figura 7. Caracterização da resistência ao vemurafenibe em linhagens de melanoma



Fonte: Adaptado de tese Alves-Fernandes, 2018 e de publicação de Sandri et al., 2016. Caracterização da resistência ao vemurafenibe na linhagem SK-Mel-28 após o tratamento agudo com vemurafenibe (72h). 4A e B apresenta as mudanças morfológicas nas linhagens resistentes.. Na figura C verifica-se que o tratamento com vemurafenibe reduz significativamente a fosforilação de MEK e ERK nas células SK-Mel-28P enquanto que a linhagem SK-Mel-29R observa-se a reativação da via das MAPK após a aquisição de resistência ao vemurafenibe a partir do aumento de ARAF, CRAF e EGFR. A fluorescência vermelha (Fluoresceína-Rodamina) está marcando a proteína de citoesqueleto actina, enquanto que a marcação azul (DAPI) cora o núcleo.

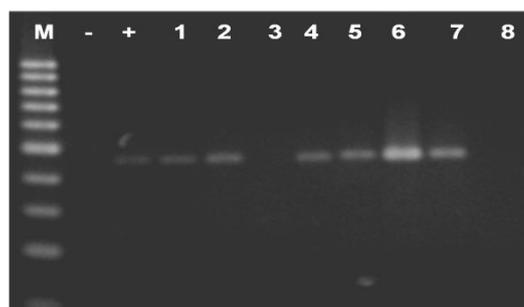
As células foram cultivadas à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células de melanoma foram mantidas em meio DMEM ou RPMI (Sigma, EUA) suplementado com 10% ou 5% de soro fetal bovino e antibióticos (100 u/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina). Os melanócitos foram mantidos em meio

254CF (SKU #M-500-254CF, Cascade Biologics) suplementado com Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS - SKU # S-002-5, Cascade Biologics, Portland - USA)

4.2 PCR para a detecção de *Mycoplasma sp*

Este ensaio tem por objetivo monitorar a contaminação por *Mycoplasma sp* nas células em cultura como parte do controle de qualidade de pesquisa no laboratório. Foi coletado o sobrenadante da cultura celular, que foi metabolizado por pelo menos 48h. Este foi centrifugado ressuspendido em solução LOTE (Low Tris-EDTA) e então incubado por 5 minutos a 95 °C. A detecção do DNA de *Mycoplasma sp* nas amostras foi realizada por meio do PCR convencional utilizando mix (9,7µL de água Mili-Q autoclavada, 4,5µL de MgCl₂ 50mM, 3µL PCR buffer 10x, 1µL de primer oligo sense, 1µL de primer oligo anti-sense, 0,6µL de dNTP e 0,2µL de Taq polimerase 5 U/ µL por amostra). A amostras amplificadas foram submetidas à corrida de eletrofose (100V, 300mA), usando gel de agarose 3%, após a corrida o gel foi incubado com solução de 0,01% de Gel Red em água Mili-Q. Para a detecção das bandas foi utilizado o transiluminador.

Figura 8. Produto do PCR de *Mycoplasma sp*



Fonte: autoria própria. Produtos do PCR de *Mycoplasma sp* em gel de agarose. Linha M DNA ladder (100bp), linha - controle negativo, linha + controle positivo, linhas 1 – 8 amostras de linhagens de melanoma.

4.3 Extração de RNA e geração do cDNA

As células foram plaqueadas em placas de petri de 100 mm. O RNA total foi extraído usando o RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as

orientações de fabricante. O precipitado foi ressuspenso em 30 μ L de água livre de RNase e armazenado a -20 °C. A determinação da concentração de RNA foi realizado no NanoDrop (Thermo Scientific, San Jose, EUA) e o RNA total extraído foi convertido a cDNA utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Nova Jersey, EUA).

4.4 Reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

A expressão gênica das linhagens de melanoma, parental e suas respectivas subpopulações resistentes ao vemurafenibe, foram avaliadas por RT-qPCR, utilizando Taqman[®] Master Mix e Real Time PCR Assays (Thermo Fisher) pré-sintetizadas para os primers para os genes ADK (Hs00417073_m1), e b-actina (Hs01060665_g1) humanos. Foi utilizado, por reação, 1 μ L de cDNA não diluído para cada 9 μ L de mix, composto de 3,5 μ L de água MiliQ (Milipore) livre de nucleases, 0,5 μ L de Assay 20X e 5 μ L de Taqman Universal Master Mix II com UNG (Thermo Fisher). Os dados foram analisados utilizando-se o método de quantificação comparativa $\Delta\Delta$ CT (expressão gênica relativa), utilizando os melanócitos para normalização. Os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas com triplicata experimental. Como controle negativo foram utilizados poços sem amostra.

4.5 Ensaio de viabilidade celular com 5-Iodotubercidina – Exclusão por azul de *Trypan*

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão usando o corante azul de *Trypan*, no qual as células foram consideradas inviáveis ao apresentarem coloração azul em seu interior, ao serem analisadas sob microscópio óptico. Foram plaqueadas, 2x10⁴ células por poço para as linhagens de melanoma e 3x10⁴ células por poço de melanócitos, em placas de 24 poços e foram tratadas com concentrações crescentes de 5-Iodotubercidina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) entre 0,5 e 4,0 μ M, ou com o veículo (DMSO) para a determinação das concentrações inibitórias de 25 e 50% da proliferação celular. O ensaio de exclusão por azul de *Trypan* também foi utilizado para avaliar a citotoxicidade utilizando concentrações correspondentes ao IC₂₅ de 5-Iodotubercidina ou com o veículo (DMSO) em duas condições, o tratamento crônico

nos períodos de 24, 48 e 72h ou tratadas por 24h e mantidas por 24 e 48h, na condição recuperado. Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas coletadas e suspensas em azul de *Trypan* (0,8% em tampão fosfato, PBS). Após a adição do corante as células foram analisadas sob microscópio óptico e contadas na câmara de Neubauer.

Os valores de IC₂₅ e IC₅₀ foram obtidos a partir da equação da reta da viabilidade celular das linhagens de melanoma submetidas a doses crescentes de 5-ITu.

4.6 Análise de morte celular por citometria de fluxo

A apoptose foi avaliada a partir da análise da externalização da fosfatidilserina (FS) utilizando o conjugado fluoresceína Anexina V – APC ou Anexina V – FITC. As linhagens A375P e A375R, SK-Mel-29P e SK-Mel-29R, WM164P e WM164R foram plaqueadas em placas de 12 poços (2 x 10⁴ células por poço). Após 24h de tratamento com 5-ITu nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ de cada linhagem ou com o veículo (DMSO), tanto as células aderidas quanto as do sobrenadante foram coletadas, lavadas duas vezes com PBSA gelado com 2% de SFB e então ressuspensas em 100µL de tampão de ligação (1 mM de HEPES, 15 mM de NaCl, 0,5 mM KCl, 0,1 mM MgCl₂, 0,18 mM CaCl₂), 50µg/mL de iodeto de propídio e 5µL de Anexina V, incubadas por 20 minutos reservada da luz e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCanto Beckton Dickinson, CA, EUA), a fluorescência da Anexina V – APC foi medida a 660nm e IP no comprimento de onda de 585nm. Foram analisados 10.000 eventos por experimento, os resultados foram analisados no software FlowJo v9.9.6.

4.7 Ensaio de esferóides

Os esferóides de melanoma foram preparados utilizando o método da agarose, descrito em Smalley et al., 2006. Foram plaqueadas 5x10³ células por poço em placa de 96 poços contendo 1,5 % de agarose (UltraPure Agarose – Life Technologies). As placas foram incubadas por 72h para a formação dos esferóides. Estes foram coletados,

implantados contendo solução de colágeno de rato tipo I (BD, Biosciences, edford, MA) em 79% de colágeno, 10,5% de HAM-F12 10x (Life Technologies) e 10,5% de tampão de reconstituição 10x (2,2% NaHCO₃, NaOH 0,05M, Hepes 200mM) e transferidos para poços de placas de 24 poços. Após a solidificação do colágeno com os esferoides embebidos foi adicionado meio de cultura. No dia seguinte foi realizado o tratamento com 5-ITu nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ de cada linhagem ou com o veículo (DMSO) por 72h. Após o tratamento, os poços foram lavados com PBSA por 10 minutos e incubados por 1h a 37 °C com Calceina-AM e etídeo homodímero-1 (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit, Life Technologies), e então os esferóides foram fotografados no microscópio invertido de fluorescência DMI8 – Leica utilizando o software LAS X.

4.8 Ensaio Clonogênico ou Ensaio de formação de colônias

Foram plaqueadas 600 células em placas de 6 poços. Após a adesão das células, estas foram tratadas com 5-ITu nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ de cada linhagem por 24h ou com o veículo (DMSO), e então o meio foi trocado e as células mantidas em cultura por até 14 dias.

Após o período para a formação das colônias, os poços foram lavados com PBSA, e as colônias formadas foram coradas com solução contendo 49,75% de metanol, 49,75% de água MiliQ e 0,5% de cristal violeta. As placas foram fotografadas para comparar o efeito do tratamento e a análise de número de colônias e a área ocupada por estas foi realizado conforme Guzmán et al., 2014. Os resultados foram plotados no software GraphPad Prism 5.0 e para a análise estatística foi utilizado o teste t.

4.9 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

As linhagens A375P e A375R, SK-Mel-29P e SK-Mel-29R, WM164P e WM164R foram plaqueadas em placas de 6 poços (5x10⁴ células por poço) e as células foram tratadas por 24h ou 72h com 5-ITu, nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ de cada linhagem, ou com o veículo (DMSO). Após o tempo de tratamento, tanto as células

aderidas quanto as do sobrenadante foram coletadas, lavadas com PBSA , fixadas com etanol 70% por no mínimo 1h e ressuspendidas em solução contendo (PBSA, 2mg/mL de RNase A e 50µg/L e iodeto de propídio) e mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente reservado da luz ou após a lavagem com o PBSA as células foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente reservado da luz em solução de permeabilização contendo (PBSA, 5mg/mL de RNase A, 0,1% de triton x-100, 2% de SFB, 0,1% de citrato de sódio 50µg/L e iodeto de propídio).

A fluorescência foi medida no citometro de fluxo (FACSCanthon Beckton Dickinson, CA, EUA) em canal FL2 – 620nm. Foram analisados 10.000 eventos por experimento, os resultados foram analisados no software FlowJo v9.9.6.

4.10 Imunofluorescência

As células da cultura primária de melanócitos e as linhagens A375P, A375R, WM164P e WM164R foram plaqueadas em placas de 12 poços (4×10^4 células por poço) com lamínula estéril de 13mm² e foram tratadas por 24h com 5-ITu, nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ de cada linhagem, ou com o veículo (DMSO). Após o tempo de tratamento, as células foram fixadas em fomalina 3,7% em PBSA por 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas com glicina 0,75% em água destilada, e depois foram incubadas por 1 hora com solução de bloqueio, contendo BSA 0,2%, Triton X-100 0,02% em PBSA. Após o bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-Ki67 (BD Bioscience 556027), na diluição de 1:100, por 2 horas, e então incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Life Technologies), na diluição de 1:1000. As lâminas foram montadas com 5µL de Vectashield contendo DAPI (Vector Lab Inc) e as imagens foram analisadas e adquiridas no microscópio (NIKON Eclipse 80i, Melville, NY, EUA).

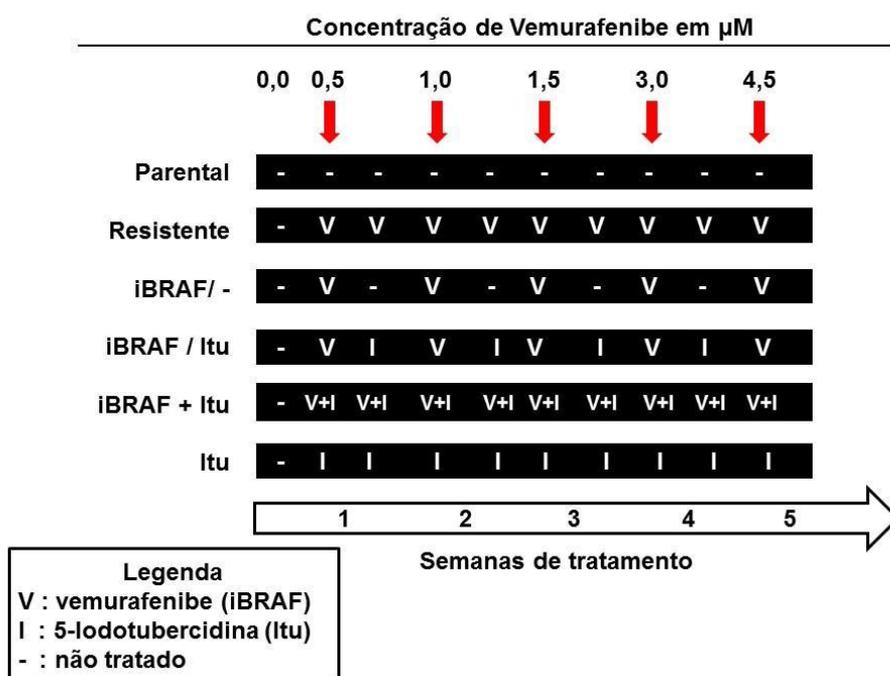
A quantificação do número de células por campo e da marcação de Ki67 foi realizado utilizando o software GraphPad Prism 5.0

4.11 Tratamento combinatório Vemurafenibe e 5-Iodotubercidina

As linhagens A375P e WM164P foram plaqueadas em baixa densidade e tratadas com concentrações crescentes de vemurafenibe, partindo de 0,5 μ M até 3,0 μ M para a linhagem WM164 e até 4,5 μ M para a A375, concentração na qual são mantidas as respectivas linhagens resistentes. Os grupos tratados com 5-ITu foram tratados com as concentrações correspondentes ao IC₂₅ pelo mesmo período que o grupo que recebeu o tratamento com vemurafenibe.

Desse modo, os grupos para o tratamento combinatório são composto por: tratamento crônico com 5-ITu e a combinação de IBRAF e 5-ITu; e os tratamentos alternados de iBRAF e a ausência de tratamento, e iBRAF e 5-ITu. A morfologia das células expostas ao tratamento combinatório está apresentada na figura 10. O calendário de tratamento para o tratamento combinatório para a geração destes grupos está esquematizado na figura 9.

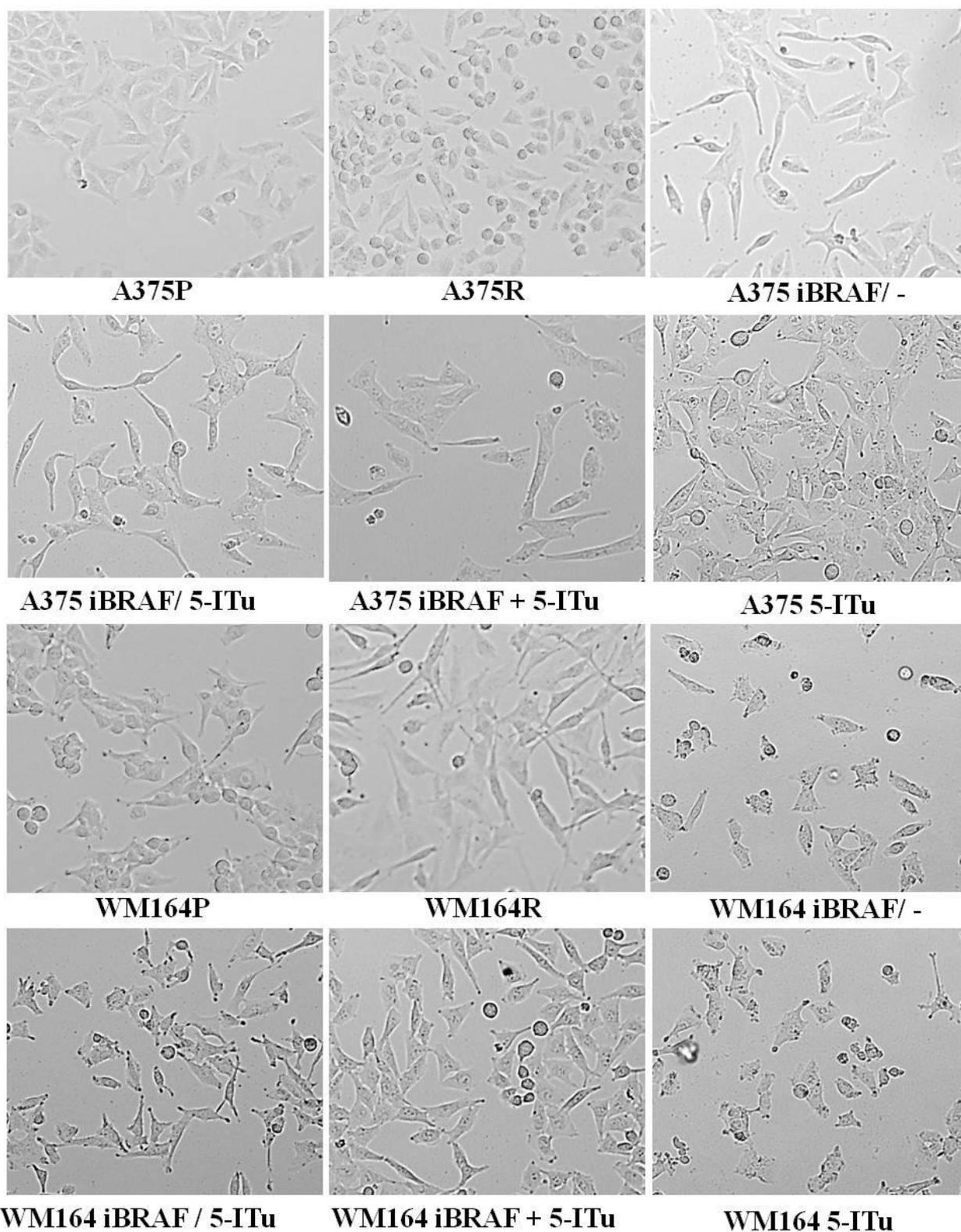
Figura 9. Calendário de tratamento para o tratamento combinatório



Fonte: autoria própria. As linhagens A375P e WM164P foram submetidas ao tratamento com 5-ITu e IBRAF, foram gerados grupos em que as células foram tratadas cronicamente com 5-ITu, e a combinação entre 5-ITu e IBRAF; outros grupos alternavam o tratamento com IBRAF e a ausência de tratamento, e

IBRAF e 5-ITu. As células foram tratadas com concentrações crescentes de IBRAF a cada 6 dias, os tratamentos com os grupos alternados eram tratadas a cada 3 dias, e os grupos tratados com Itu foram sempre tratadas com $0,8\mu\text{M}$ (IC_{25} das linhagens parentais).

Figura 10. Fotomicrografia das células submetida ao tratamento combinatório



Fonte: autoria própria. Fotomicrografias das linhagens A375P, A375R, WM164P e WM164R e das respectivas células tratadas cronicamente com 5-ITu, e a combinação entre 5-ITu e IBRAF; outros grupos alternavam o tratamento com IBRAF e a ausência de tratamento, e IBRAF e 5-ITu. Imagens obtidas em contraste de fase e no aumento de 100x.

4.12 Curva de crescimento

As linhagens foram plaqueadas em placas de 24 poços (1×10^4 células por poço) e então cultivadas na ausência de tratamento. As células foram coletadas nos dias 1, 3, 5 e 7, e então centrifugadas, ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de SFB, e então contadas na câmara de Neubauer. Os resultados foram plotados no software GraphPad Prism 5.0 e o cálculo do tempo de dobramento foi realizado no site: doubling-time.com/compute_more.php, a partir da seguinte fórmula [Doubling Time = duration * $\log(2) / (\log(\text{FinalConcentration}) - \log(\text{InitialConcentration}))$], utilizando apenas os pontos da curva em que as células se encontram em fase de crescimento exponencial (fase log).

4.13 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular das células geradas no tratamento combinatório foi avaliada pelo ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-triazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é baseado na redução desse sal pelo sistema enzimático mitocondrial, através da atividade de desidrogenases que clivam o anel tetrazólio e convertem o MTT em um produto insolúvel denominado formazan, o que reflete o normal funcionamento da mitocôndria e, conseqüentemente, a viabilidade celular. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1.10^4 células por poço), e tratadas por 24 horas com concentrações crescentes de iBRAF (vemurafenibe) variando entre 0,5 e 16 μM . Após o período de tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas com solução de 1mg/mL de MTT durante 4 horas, a 37 °C, abrigada da luz. O precipitado foi dissolvido em 200 μL de DMSO/poço. A absorbância foi lida em leitor de placa no comprimento de onda de 570nm.

5. Resultados

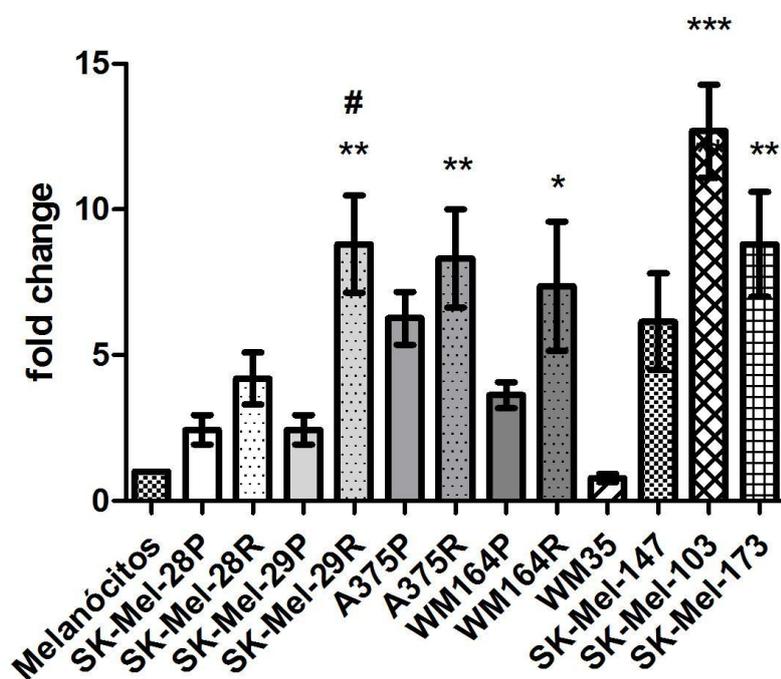
5.1 Expressão gênica basal de ADK em linhagens de melanoma e em melanócitos

Foram avaliados os níveis de expressão relativa de ADK em melanócitos e nas linhagens de melanoma, a figura 11 é possível verificar que 5 (SK-Mel-29R, A375R, WM164R, SK-Mel-103 e SK-Mel-173) das 12 linhagens avaliadas apresentam uma diferença significativa na expressão de ADK em relação ao melanócito (controle não-tumoral), no entanto, é possível verificar que, no geral, as linhagens tumorais apresentam uma tendência maior expressão de ADK em relação ao controle não tumoral.

Analisando o perfil de expressão de ADK nas linhagens tumorais sem mutações em BRAF (SK-Mel-103, SK-Mel-147 e SK-Mel-173), é possível notar que estas apresentam altos níveis de expressão de ADK, com exceção da SK-Mel-147. Em relação à expressão diferencial de ADK entre linhagens parentais e resistentes, verifica-se significância estatística entre as linhagens SK-Mel-29P e SK-Mel-29R. Apesar de se observar uma tendência de que as linhagens resistentes expressam mais ADK em relação às linhagens parentais, as linhagens SK-Mel-28P e SK-Mel-28R; A375P e 375R; e WM164P e WM164R, não apresentam alterações significativas. Estes dados sugerem uma relação entre a resistência ao inibidor de BRAF e os níveis de mRNA de ADK.

Com base na análise da expressão gênica, foram selecionadas a partir deste painel de linhagens, as seguintes linhagens: SK-Mel-29P, SK-Mel-29R, A375P, A375R, WM164P e WM164R a fim de se verificar o possível papel de ADK na transformação maligna e na resistência ao inibidor de BRAF^{V600E}.

Figura 11. Linhagens de melanoma apresentam maior expressão de ADK em relação ao controle não tumoral



Fonte: autoria própria. Foi avaliado os níveis de expressão gênica de ADK em linhagens de melanoma e cultura primária de melanócitos a partir do ensaio de PCR em tempo real. A expressão relativa de mRNA do gene ADK foi calculada em relação à expressão do gene endógeno b-actina. No gráfico acima as barras de erro correspondem ao erro padrão e a significância estatística é representada por *, #, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ sendo que * corresponde a diferença significativa entre as linhagens de melanoma e os melanócitos; # diferença significativa entre as linhagens parentais e resistentes. O teste estatístico utilizado foi ANOVA unifatorial e pós-teste Tukey.

5.2 Viabilidade Celular – Exclusão por azul de Trypan

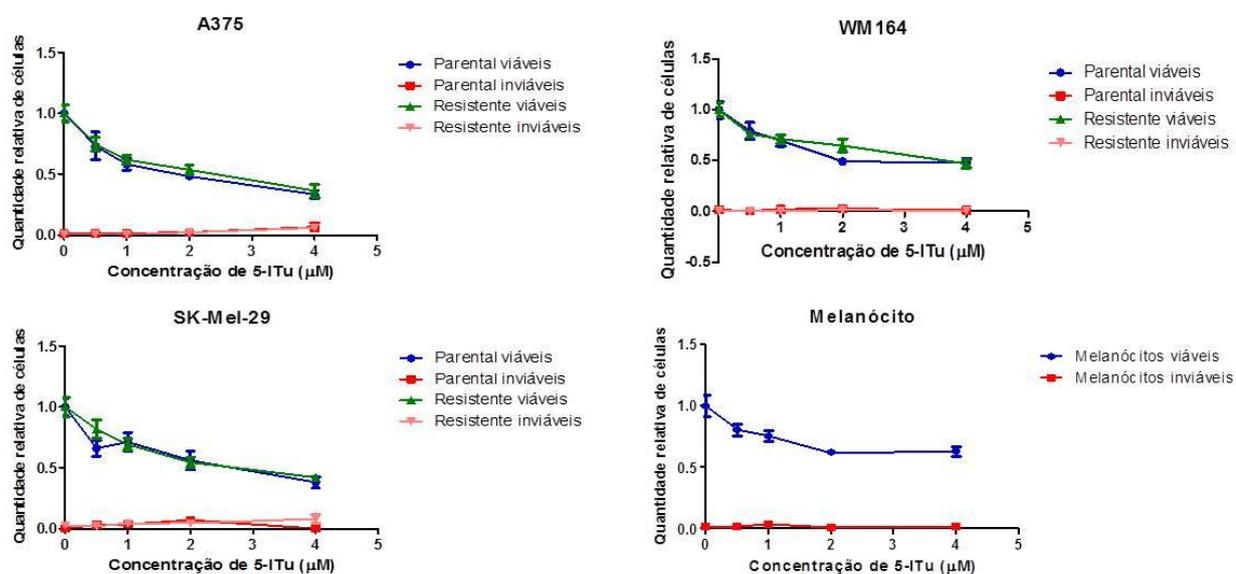
Para determinar a concentração de 5-ITu capaz de inibir 50% e 25% da proliferação celular (IC_{50} e IC_{25} respectivamente), bem como seus efeitos sobre a viabilidade celular, as linhagens SK-Mel-29P, SK-Mel-29R, A375P, A375R, WM164P e a cultura primária de melanócitos foram tratadas com DMSO (veículo), e com concentrações de 0,5; 1; 2; 4 μ M de 5-iodotubercidina. Na figura 12, é possível observar a curva de viabilidade dessas células quando expostas as diferentes concentrações de 5-

ITu apresentando a quantidade de células viáveis e não viáveis.

Na figura 12 observa-se que o tratamento com 5-ITu não é capaz de aumentar consideravelmente a quantidade de células inviáveis, apesar de haver redução da quantidade de células viáveis nos tratamentos com doses crescentes de 5-ITu.

A partir desses dados foi possível obter os valores do IC_{50} e IC_{25} de cada uma das linhagens, apresentados no quadro 2, onde é possível observar que não há uma diferença expressiva quanto a sensibilidade ao 5-ITu entre as linhagens tumorais e o melanócito e entre linhagens parentais e resistentes, apesar de as linhagens resistentes apresentarem maior expressão de ADK.

Figura 12 – O tratamento com 5-iodotubercidina reduz a quantidade de células viáveis dose dependente.



Fonte: autoria própria. Foi avaliada a citotoxicidade da 5-Iodotubercidina a partir do ensaio de exclusão por azul de *Trypan*, as células foram tratadas com concentrações entre 0,5 e 4µM e o controle foi tratado com veículo (DMSO) e após 24h de tratamento as células foram coradas com azul de *Trypan* para a discriminação das células viáveis e inviáveis, os dados estão apresentados no gráfico acima (n = 9) em que as barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Quadro 2 – Determinação das concentrações que inibem 50% e 25% da proliferação celular em linhagens de melanoma tratadas com 5-ITu.

	A375P	A375R	SK-Mel-29P	SK-Mel-29R	WM164P	WM164R	Melanócito
IC ₂₅	0,8 µM	0,8 µM	1,0 µM	1,1 µM	0,8 µM	1,2 µM	1,1 µM
IC ₅₀	2,4 µM	2,6 µM	2,6 µM	2,9 µM	1,9 µM	3,5 µM	2,6 µM

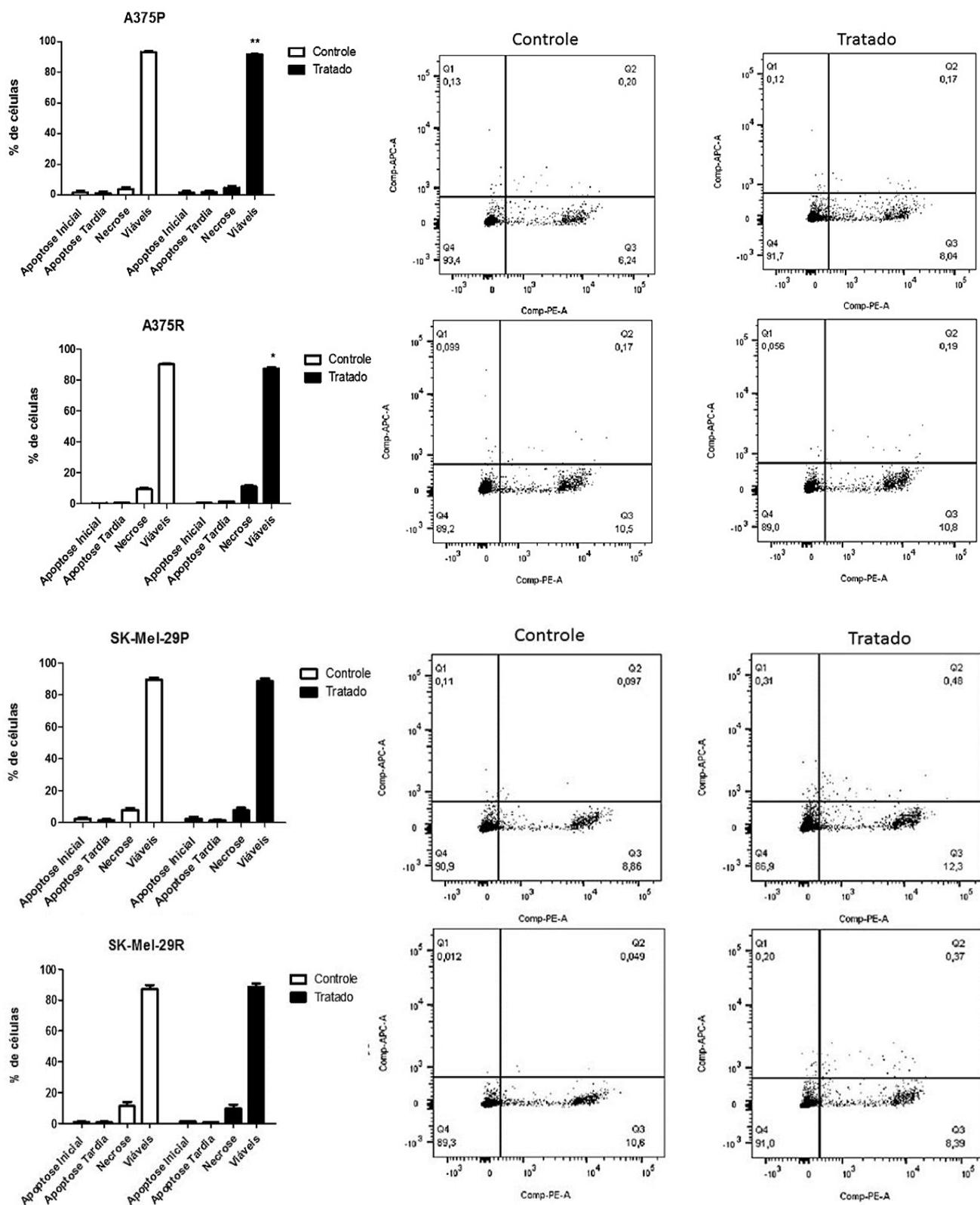
Fonte: autoria própria. As concentrações correspondentes ao IC₅₀ e IC₂₅ da 5-Iodotubercidina foi determinada a partir do ensaio de exclusão por azul de *Trypan*, as células foram tratadas com concentrações entre 0,5 e 4µM e o controle foi tratado com veículo (DMSO) e após 24h de tratamento as células foram coradas com azul de *Trypan* para a discriminação das células viáveis (n = 9).

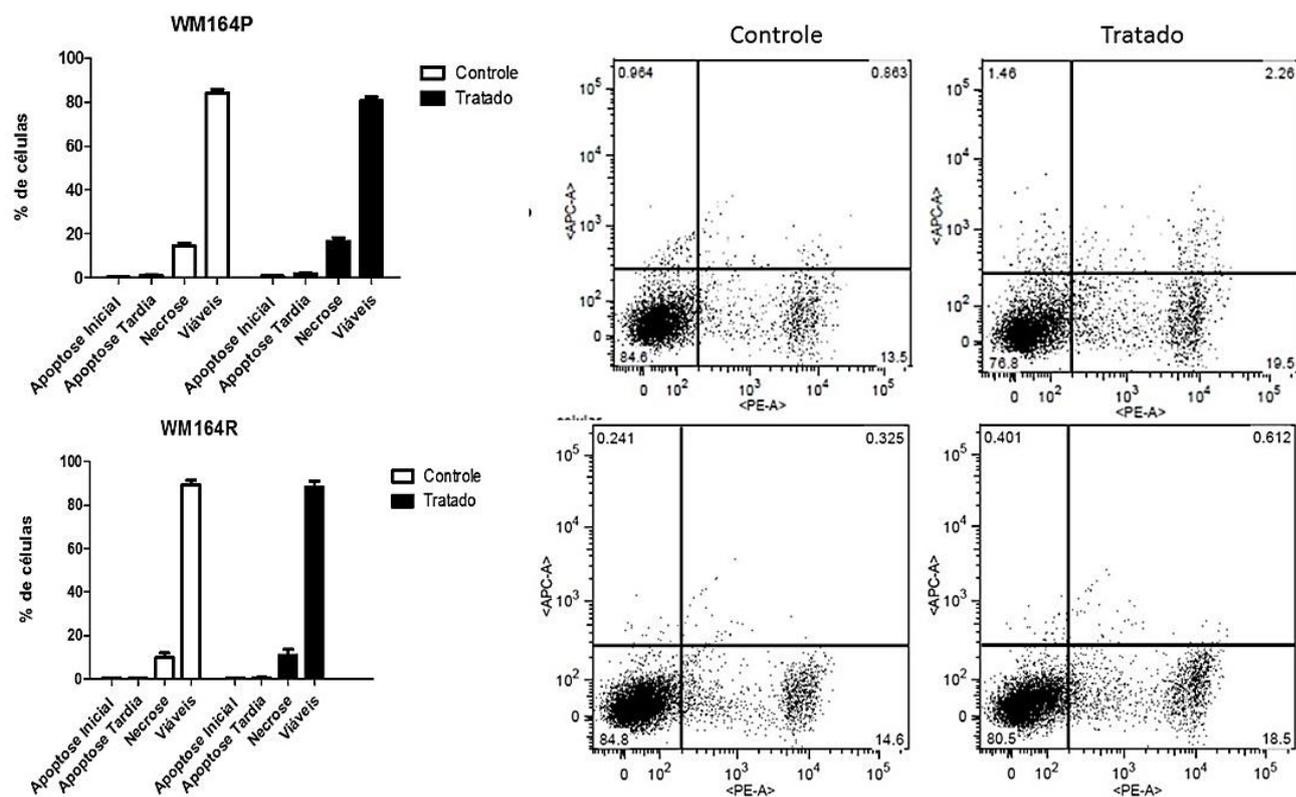
5.3 Avaliação da morte celular

Para avaliar e caracterizar a morte celular após o tratamento com 5-ITu nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ de cada linhagem, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo com a dupla marcação usando Iodeto de Propídeo e Anexina V.

Na figura 13 é possível notar que, em concentrações subtóxicas de 5-ITu, a maioria das células encontram-se viáveis e não se verifica aumento significativo de apoptose ou necrose nos tratamentos com 5-ITu. Contudo, a redução na quantidade de células viáveis é significativa para as linhagens A375P e A375R.

Figura 13 – O tratamento com 5-ITu não é capaz de induzir morte celular.





Fonte: autoria própria. Foi realizado o ensaio de citometria de fluxo com a dupla marcação com IP e Anexina V para avaliação da morte celular. As células foram tratadas por 24h com 5-ITu nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ e o controle recebeu veículo (DMSO), os resultados foram plotados nos gráficos acima a esquerda (n=6) em que barras de erro correspondem ao erro padrão e a significância estatística é representada por *, $P < 0.05$; o teste estatístico utilizado foi o ANOVA multifatorial e o pós-teste Bonferroni. Nos gráficos a direita encontra-se a dispersão das células quadrante 1 superior esquerda: apoptose inicial; quadrante 2 direita superior apoptose tardia; quadrante 3 inferior direita: necrose; quadrante 4 inferior direita: vivas.

5.4 Viabilidade Celular – Exclusão por azul de *Trypan*

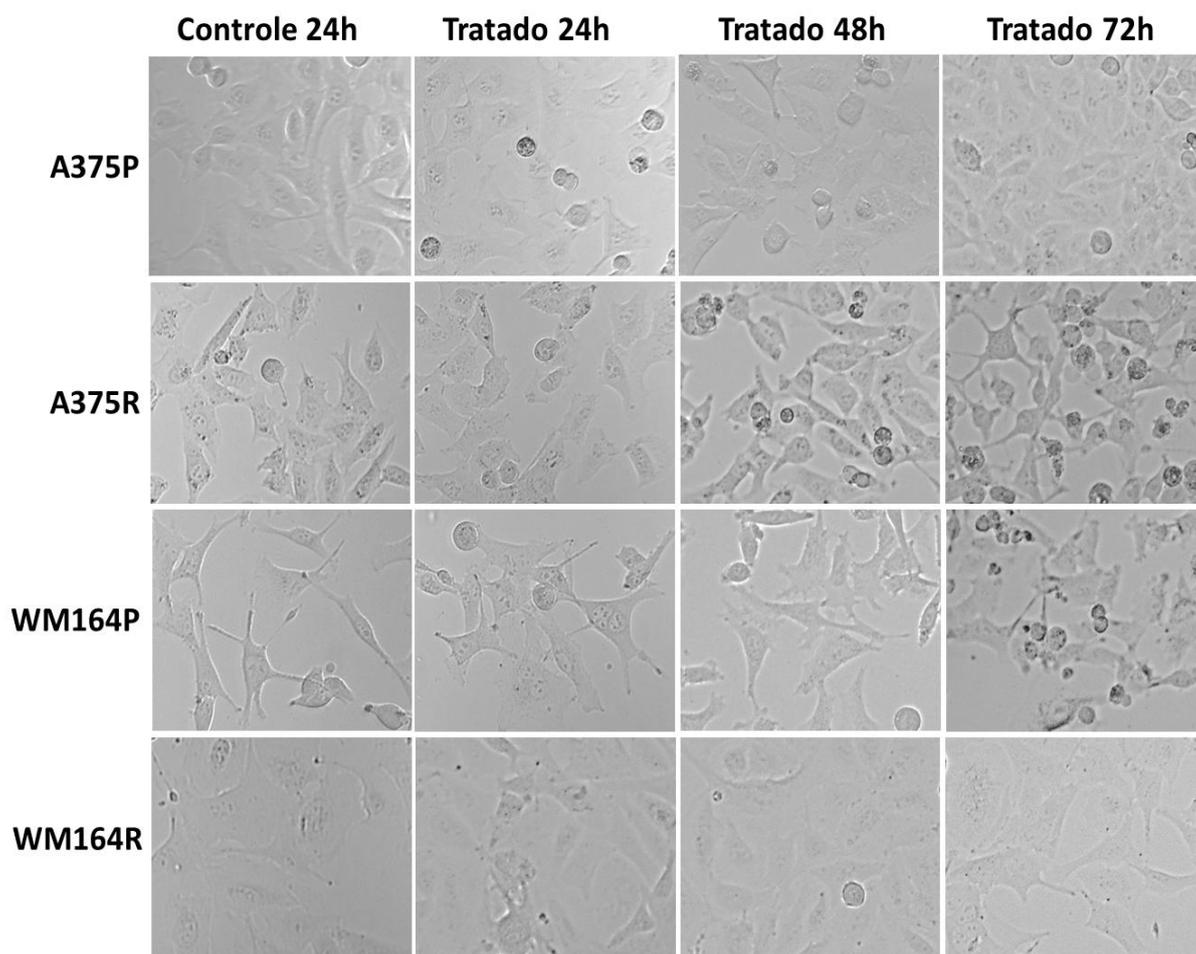
Para avaliar se o tratamento com 5-ITu por tempo prolongado aumenta a citotoxicidade ou se o tratamento com 5-ITu por 24h apresenta citotoxicidade tardia, sendo verificada dias após o tratamento, foi realizado o tratamento o tratamento contínuo pelos períodos de 24, 48 e 72h e a avaliação da citotoxicidade de 5-ITu 24 e 48h após a exposição com 5-ITu por 24h.

É possível observar, na figura 15, que todas as linhagens submetidas ao tratamento contínuo proliferam, uma vez que há o aumento da quantidade de células viáveis ao longo do tempo. No entanto, as células expostas a 5-ITu proliferam menos que o grupo controle,

sendo que esta diferença se torna significativa a partir de 48h de exposição com 5-ITu. Na figura 16, podemos observar que as linhagens expostas a 5-ITu por 24h e mantidas em cultura (recuperado) se observa o mesmo padrão, ambos os grupos proliferam, porém no grupo tratado menos que o controle, esta diferença se torna significativa em células cultivadas 48h em cultura após o tratamento com 5-ITu, evidenciando que o efeito de 5-ITu persiste mesmo na ausência do fármaco.

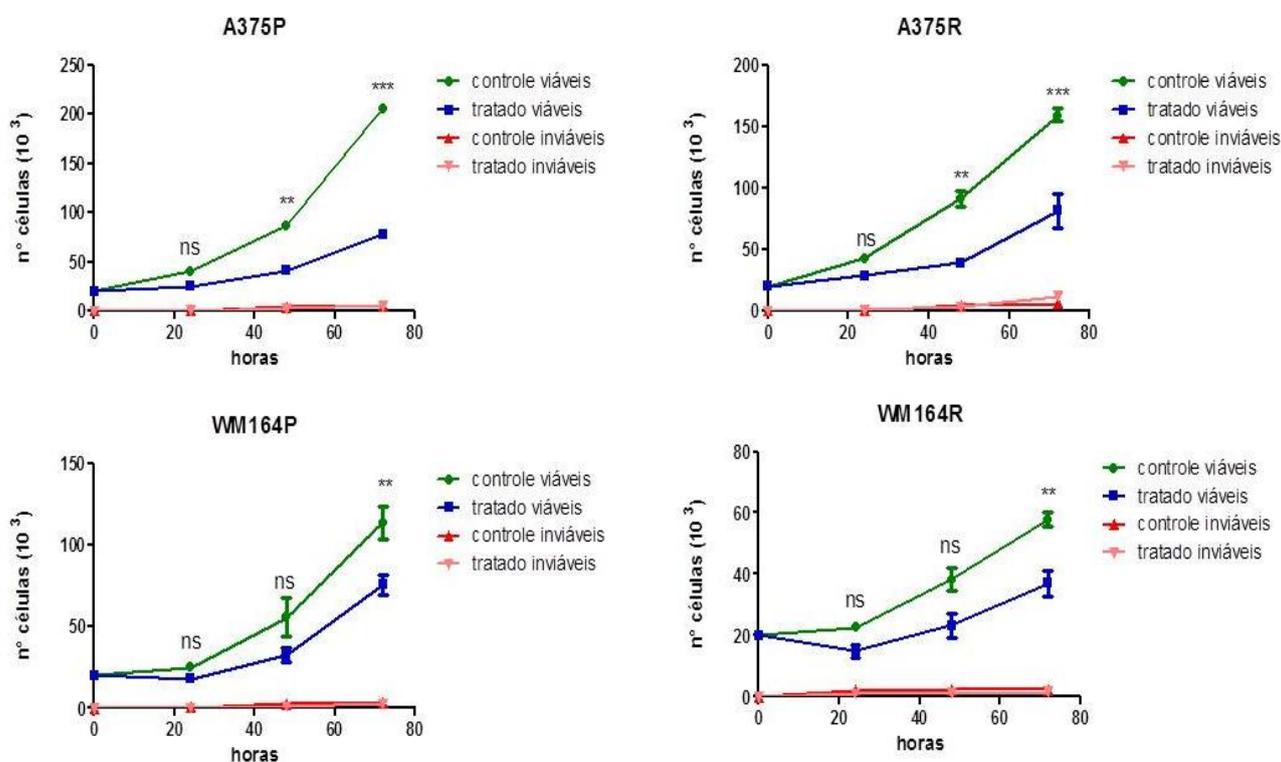
A fim de investigar se há diferença na quantidade entre células mantidas em cultura pelo mesmo período, variando quanto ao tempo de exposição a 5-ITu, comparou-se a quantidade de células entre os grupos tratados por 48h e as células cultivadas por 48h, sendo que foram expostas a 5-ITu em 24 destas; e entre o tratamento por 72h e o recuperado por 48h após o tratamento por 24h com 5-ITu. O resultado da comparação da quantidade de células em cada um desses grupos estes grupos foi plotado na quadro 3. Nesta quadro podemos verificar que a diferença é significativa em todas as linhagens cultivadas por 72h, com exceção da A375R, evidenciando que o tratamento contínuo apresenta inibição mais vigorosa.

Figura 14. Fotomicrografias das linhagens de melanoma submetidas ao tratamento contínuo



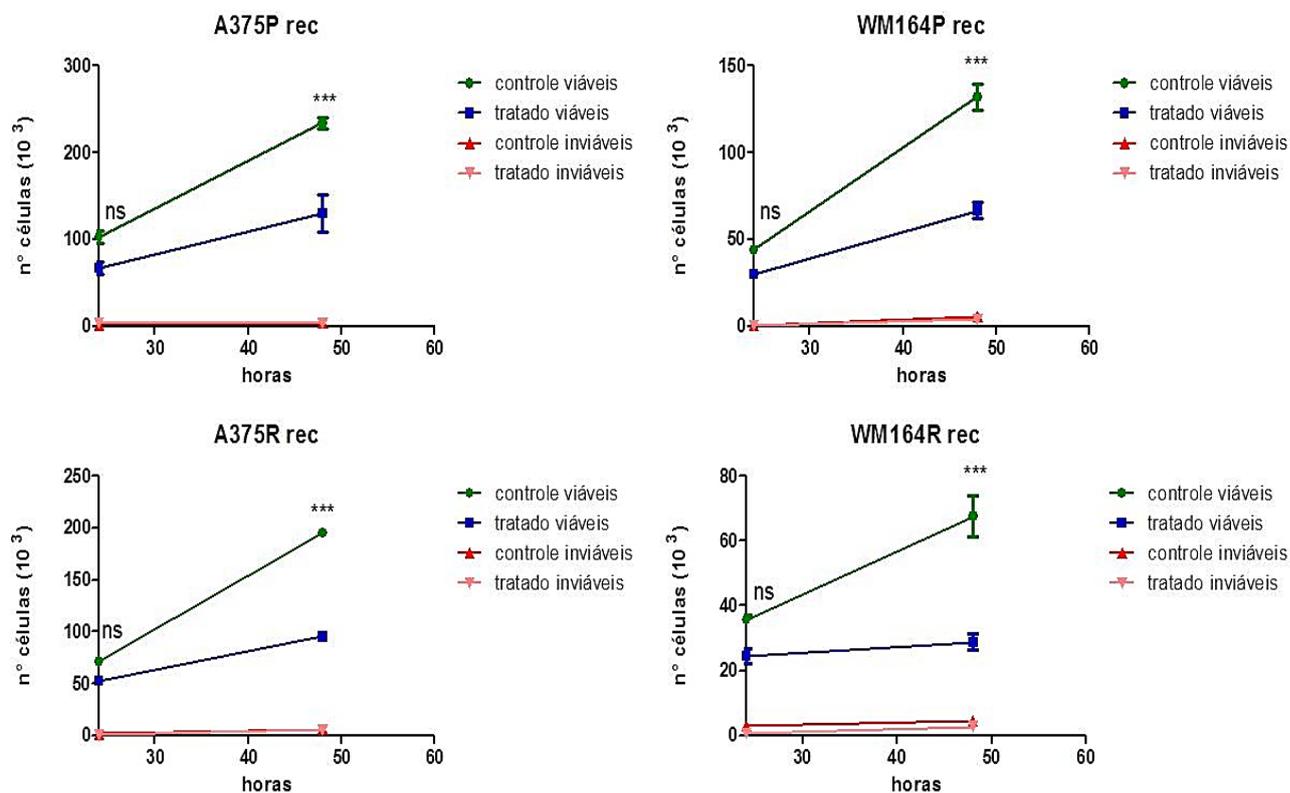
Fonte: autoria própria. Fotomicrografias das linhagens A375P, A375R, WM164P e WM164R controle e tratadas com as concentrações correspondentes ao IC25 de 5-ITu por 24, 48 e 72h. Imagens obtidas em contraste de fase e no aumento de 100x.

Figura 15. Linhagens de melanoma tratadas com 5-ITu por 24, 48 e 72h proliferam menos que as células do grupo controle



Fonte: autoria própria. Foi avaliada a citotoxicidade da 5-iodotubercidina nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ e o controle foi tratado com veículo (DMSO) no período de 24, 48 e 72h no tratamento contínuo, a partir do ensaio de exclusão por azul de *Trypan*. Após os tempos de tratamento as células foram coradas com azul de *Trypan* para a discriminação das células viáveis e inviáveis e os dados foram plotados no gráfico acima em que as barras de erro correspondem ao erro padrão (n = 9) a significância estatística é representada por * P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. O teste estatístico utilizado foi ANOVA unifatorial e pós-teste Tukey.

Figura 16. Linhagens de melanoma tratadas com 5-ITu por 24h e mantidas sem o tratamento por 24 e 48h proliferam menos que as células do grupo controle



Fonte: autoria própria. Foi avaliada a citotoxicidade da com 5-iodotubercidina nas concentrações correspondentes ao IC_{25} e o controle foi tratado com veículo (DMSO) no período de 24 e 48h após o tratamento por 24h, a partir do ensaio de exclusão por azul de *Trypan*. As células foram tratadas por 24h e mantidas em cultura por 24 e 48h com meio de cultura sem 5-ITu. Após appós os períodos de recuperação as células foram coradas com azul de *Trypan* para a discriminação das células viáveis e inviáveis e os dados foram plotados no gráfico acima em que as barras de erro correspondem ao erro padrão (n = 9) a significância estatística é representada por * $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. O teste estatístico utilizado foi ANOVA unifatorial e pós-teste Tukey.

Quadro 3. Diferença entre tratamento contínuo e recuperado

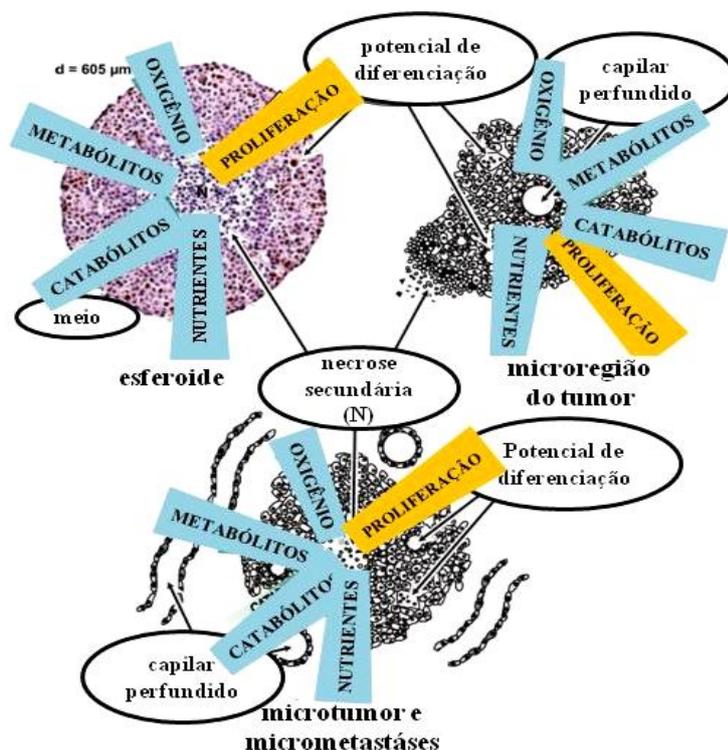
Significância estatística		
Linagem	tratado 48h x tratado recuperado 24h	tratado 72h x tratado recuperado 48h
A375P	ns	***
A375R	ns	ns
WM164P	ns	***
WM164R	ns	***

Fonte: autoria própria. Quadro com a significância estatística entre os grupos tratados submetidos a tratamento crônico ou agudo mantidos pelo mesmo tempo em cultura. significância estatística é representada por * $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. O teste estatístico utilizado foi ANOVA unifatorial e pós-teste Tukey.

5.5 Ensaio de esferoide

O ensaio de esferoide mimetiza o microambiente do tecido tumoral, e pode ser considerado um modelo para testar medicamentos anti-tumorais, pois este modelo imita os nódulos de tumor avasculares ou microrregiões de tumores sólidos em relação a perfusão de oxigênio e nutrientes, acúmulo de metabólitos e cinética de crescimento (Friedrich et al., 2007), como pode ser observado na figura 17.

Figura 17. Representação das semelhanças entre esferoide e tumores



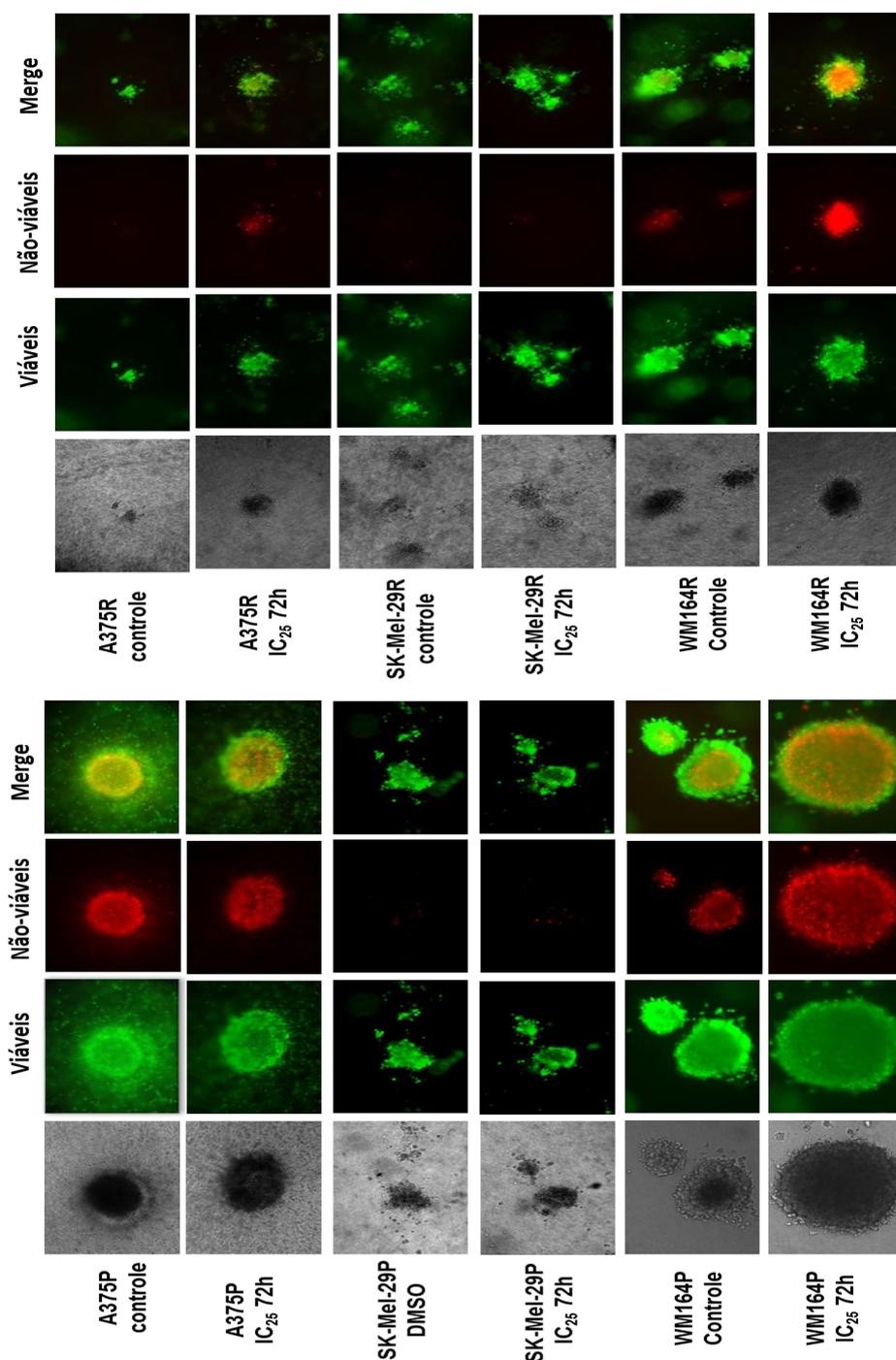
Fonte: adaptado de Friedrich et al., 2007. Os esferoides podem ser utilizados como modelos para mimetizar nódulos de tumor avascular ou microregiões de tumores sólidos quanto a sua difusão de oxigênio e nutrientes e acúmulo de metabólitos; e a cinética de crescimento

Na figura 18, nota-se que apenas nas linhagens A375R e WM164R o tratamento com 5-ITu é capaz de aumentar a fluorescência que corresponde às células não viáveis, quando comparada ao controle, sendo que esta marcação se encontra no cerne do esferoide, e isto pode ocorrer devido a maior susceptibilidade das células ao tratamento associado, uma vez que compreende uma região de estresse, devido aos baixos níveis de oxigênio, nutrientes e metabólitos, e altos níveis de catabólitos. Em relação aos esferoides das linhagens A375P e WM164P na figura 18, verifica-se que, tanto no controle quanto no tratado, há uma grande área marcada com etídio, um corante permeável em células inviáveis. Isso pode decorrer do fato de os esferoides desta linhagem serem muito grandes e apresentarem o *core* necrótico. Contudo, é possível notar, na linhagem WM164P, que os esferoides tratados apresentam uma marcação de células viáveis menos evidente, se comparado ao controle, demonstrando a redução das células viáveis. Em relação às linhagens SK-Mel-29P e SK-Mel-29R, não se verifica diferenças entre o controle e o

tratamento.

Observando os esferoides da linhagem A375R e comparando-a com as demais linhagens, nota-se que esta linhagem não forma esferoides “verdadeiros”, mas um agregado. Outro aspecto que pode ser observado nesse ensaio é a invasão das células do esferoide, na figura 18. Nas fotomicrografias em contraste de fase, nota-se que apenas a linhagem A375P apresenta células do esferoide invadindo no colágeno, mas o tratamento com 5-ITu parece não interferir nesse aspecto, uma vez que não se verifica a redução da invasão.

Figura 18. 5-ITu induz morte celular em modelo 3D – esferoides



Fonte: autoria própria. Foi avaliada a citotoxicidade da 5-Iodotubercidina em modelo 3D, utilizando esferoides. Os esferoides das linhagens de melanoma A375P, A375R, SK-Mel-29P, SK-Mel-29P e WM164R foram tratadas por 72h com 5-ITu nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ e o controle recebeu veículo (DMSO). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio de fluorescência no aumento

de 100X. As imagens foram tiradas em contraste de fase, a de fluorescência verde marca as células viáveis, foi obtida no filtro GFP estas células foram coradas com calceína AM, já a fluorescência vermelha, que marca as células não viáveis, foi obtida no filtro rodamina e as células foram coradas com etídeo homodímero – 1, estes corantes fazem parte do Kit Live/DEAD., a imagem da direita corresponde ao *merge* das fluorescências verde e vermelha.

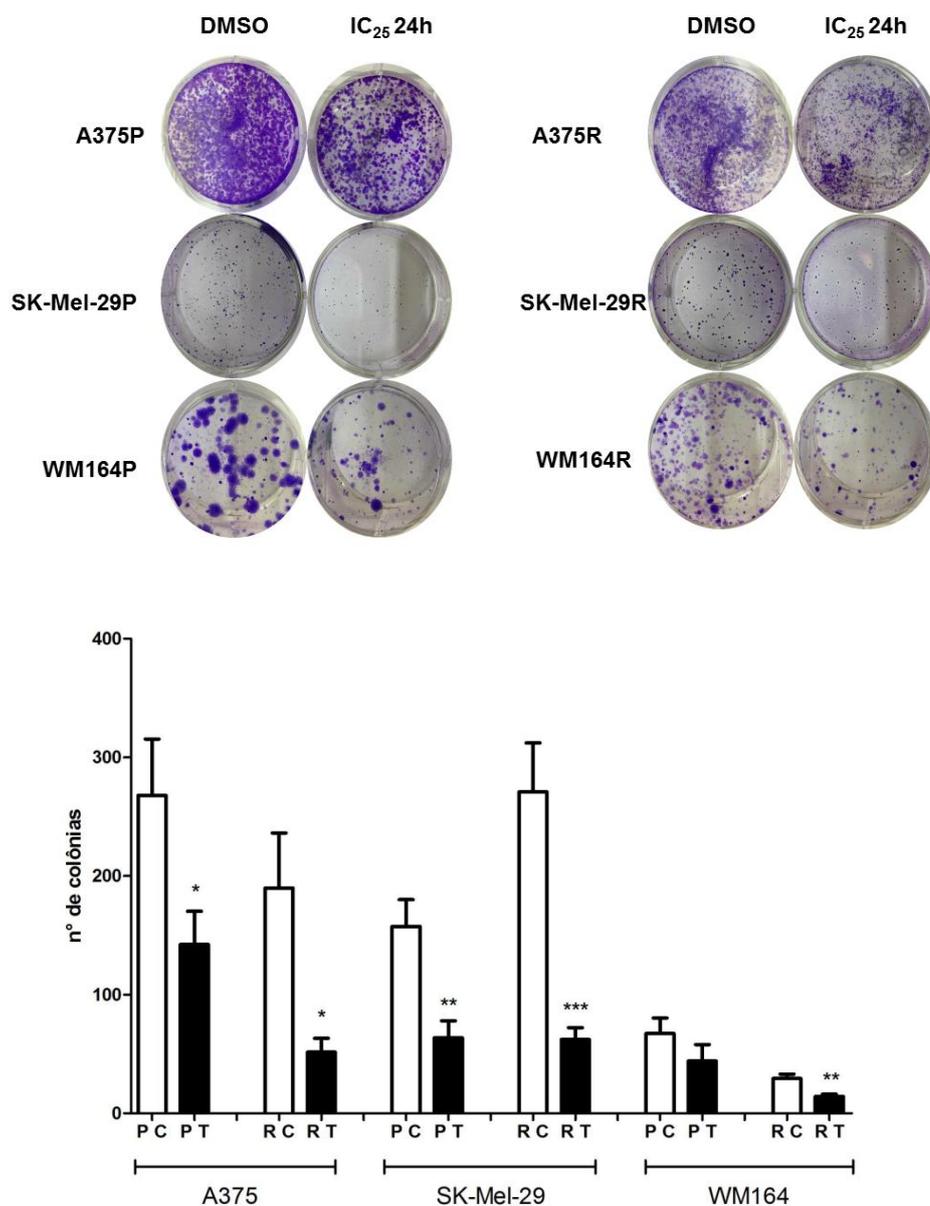
5.6 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico baseia-se na capacidade de uma célula crescer até formar uma colônia, e tem por objetivo avaliar a capacidade das células submetidas ao tratamento com 5-ITu de formarem colônias.

O tratamento por apenas 24h com concentrações subtóxicas (IC_{25}) de 5-ITu mostrou-se capaz de reduzir a capacidade de formação de colônias em todas as linhagens estudadas, exceto a linhagem WM164P, como é possível observar na figura 19A. Os resultados deste ensaio apontam para as diferenças quanto à capacidade clonogênica das linhagens, uma vez que se verifica que as linhagens WM164P e WM164R apresentam reduzido número de colônias em relação às demais linhagens de melanoma (figura 19B), assim, estes resultados evidenciam sua baixa capacidade clonogênica.

Outro ponto importante é em relação à morfologia das colônias da linhagem SK-Mel-29P e SK-Mel-29R, em que se pode verificar, na figura que as colônias são muito pequenas, devido a sua forma de crescimento em “ilha”.

Figura 19. 5-ITu reduz a capacidade clonogênica de linhagens de melanoma



Fonte: Autoria própria. Foi realizado o ensaio clonogênico com as linhagens de melanoma A375P, A375R, SK-Mel-29P, SK-Mel-29R, WM164P e WM164R. As células foram plaqueadas em baixíssima confluência afim de avaliar a capacidade das células formarem colônias, estas células foram tratadas por 24h com 5-ITu nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ e o controle recebeu veículo (DMSO), após o período de tratamento o meio foi trocado por meio sem tratamento e as células mantidas até 14 dias. A figura 19 B são as fotos tiradas dos poços caracterizando as colônias de cada linhagem (as colônias foram coradas com solução de cristal violeta), já a figura 19A apresentam o número de colônias nas condições controle e tratado os dados foram plotados no gráfico acima em que as barras de erro correspondem ao erro padrão (n = 6) a significância estatística é representada por * P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. O teste estatístico utilizado foi o teste *t-student*.

5.7 Ciclo celular por citometria de fluxo

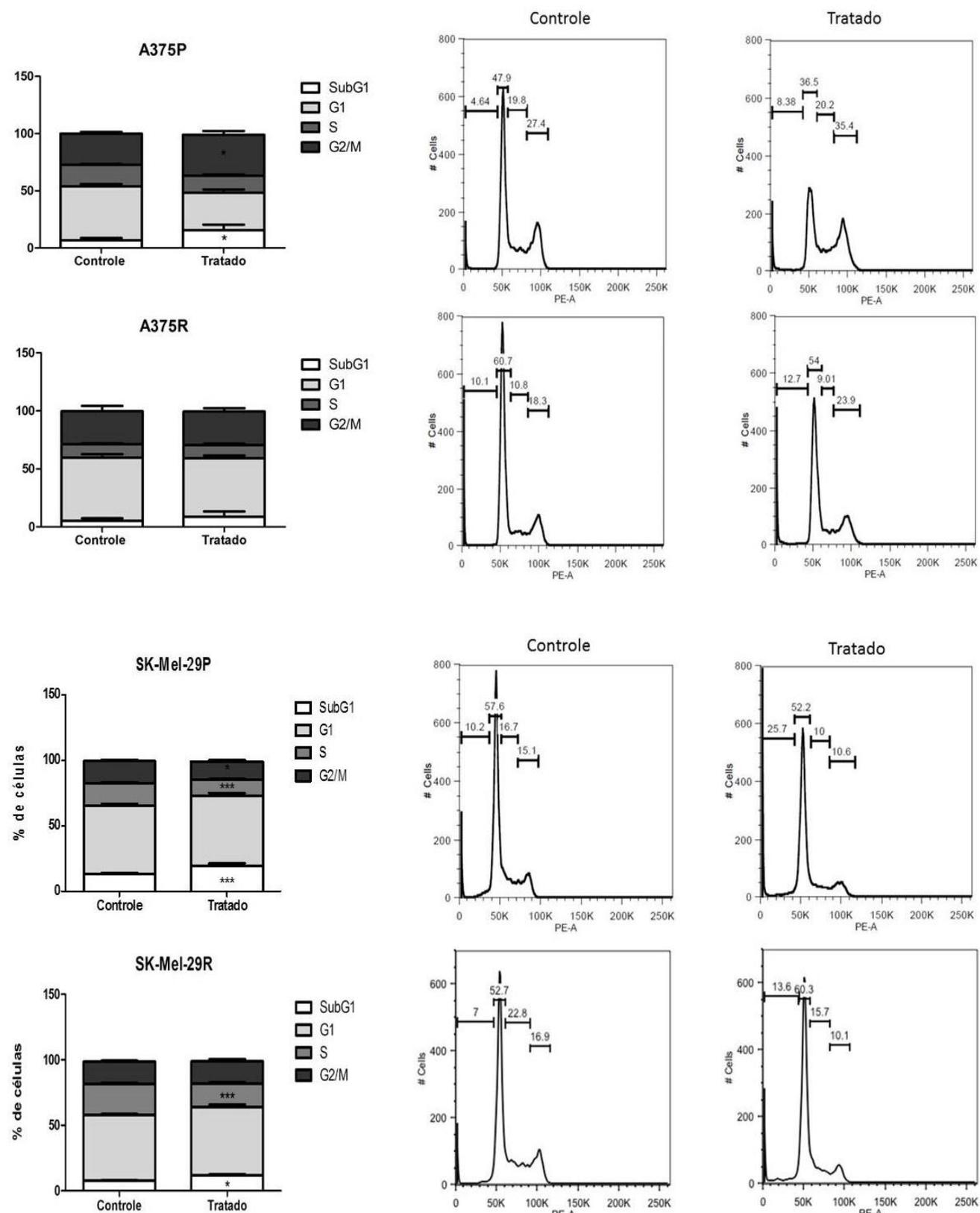
Nos ensaios de citotoxicidade por azul de *Trypan* e no ensaio clonogênico foi verificado que o tratamento com concentrações subtóxicas de 5-ITu promove a inibição de crescimento. Desse modo, foi realizado o ensaio de ciclo celular por citometria de fluxo para avaliar os efeitos da 5-ITu neste evento.

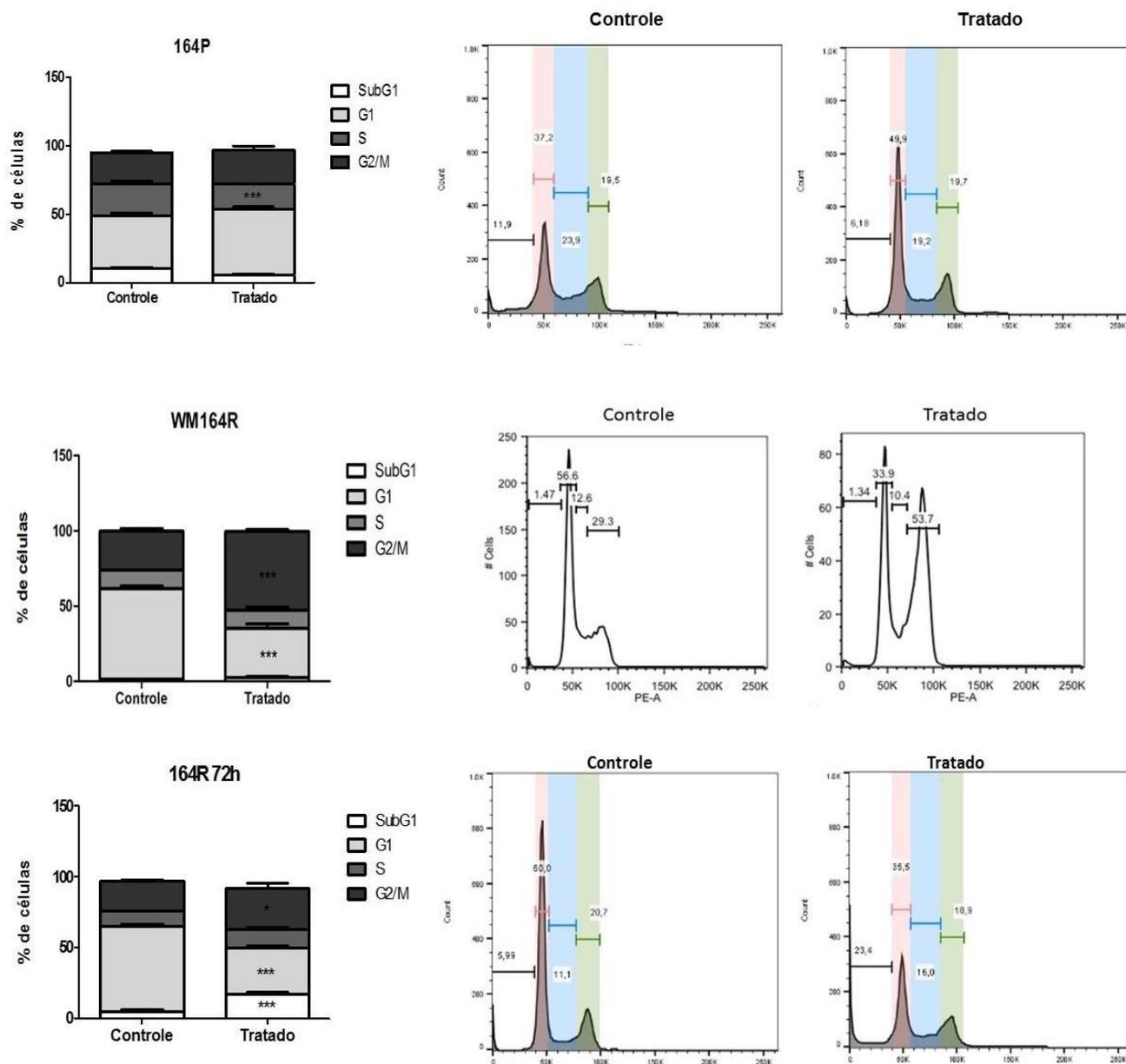
As figuras 20 A, B, C e D mostram a influência de 5-ITu na distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular. É possível notar, nas linhagens A375P e WM164R tratadas por 24 e 72h, o aumento da população na fase G2/M, indicando parada nesta fase do ciclo celular e redução da população na fase G1. Verificase também, na linhagem A375P e WM164R tratadas por 72h, o aumento da população com conteúdo de DNA inferior ao G1, o subG1. Além disso, é possível notar que, na linhagem WM164P (figura 20 C), o tratamento com 5-ITu leva ao aumento da população em G1 devido à redução da população em S, indicando uma parada de ciclo em G1, impedindo as células de progredirem para S.

Nas linhagens SK-Mel-29P e SK-Mel-29R, verifica-se o aumento significativo de subG1 e redução da população em fase de síntese de DNA, fase S.

Inicialmente, o ensaio de ciclo celular foi realizado após 24 horas de exposição com 5-ITu; no entanto, este resultado poderia não estar refletindo os efeitos de 5-ITu sobre esta linhagem, uma vez que esta apresenta tempo de dobramento muito superior ao tempo de tratamento, aproximadamente 68h (quadro 4), desse modo, a linhagem WM164R também foi exposta a 5-ITu por 72h. O tratamento com 5-ITu por 24h promoveu o aumento da população na fase G2/M, indicando parada nesta fase do ciclo celular redução significativa da população em G1, já no tratamento por 72h observa-se o aumento significativo das populações em SubG1 e G2/M. Comparando-se os resultados obtidos nos dois tempos de tratamento, nota-se que o tratamento por 72h ainda apresenta uma significativa parcela da população em G2/M, evidenciando que 5-ITu realmente leva a parada nesta fase do ciclo.

Figura 20 – 5-ITu induz parada de ciclo celular e aumento da população SubG1 em linhagens de melanoma



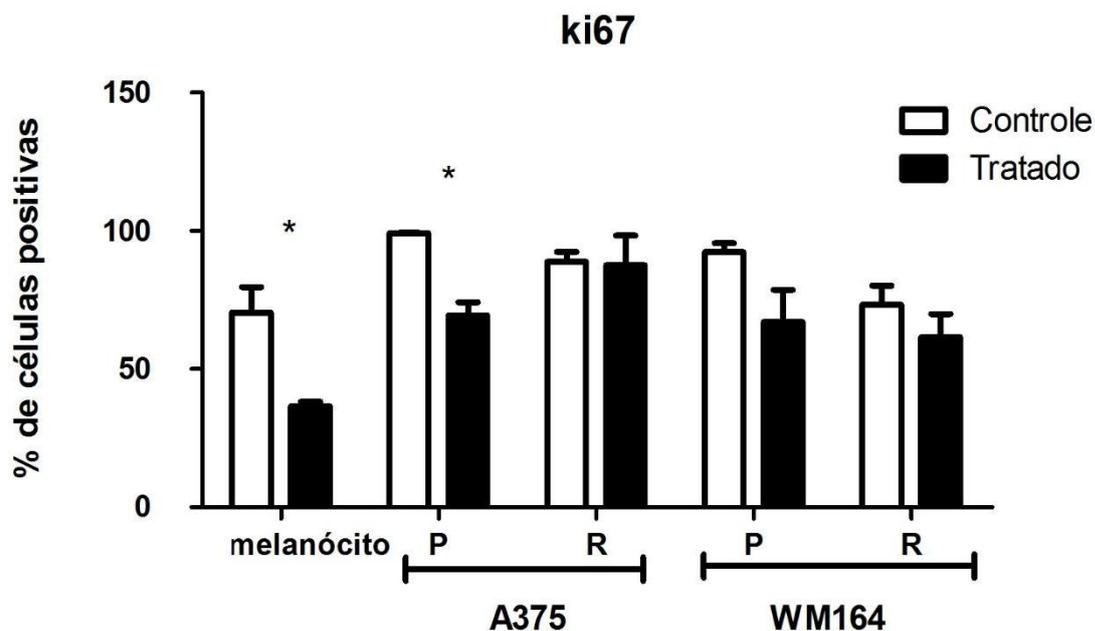


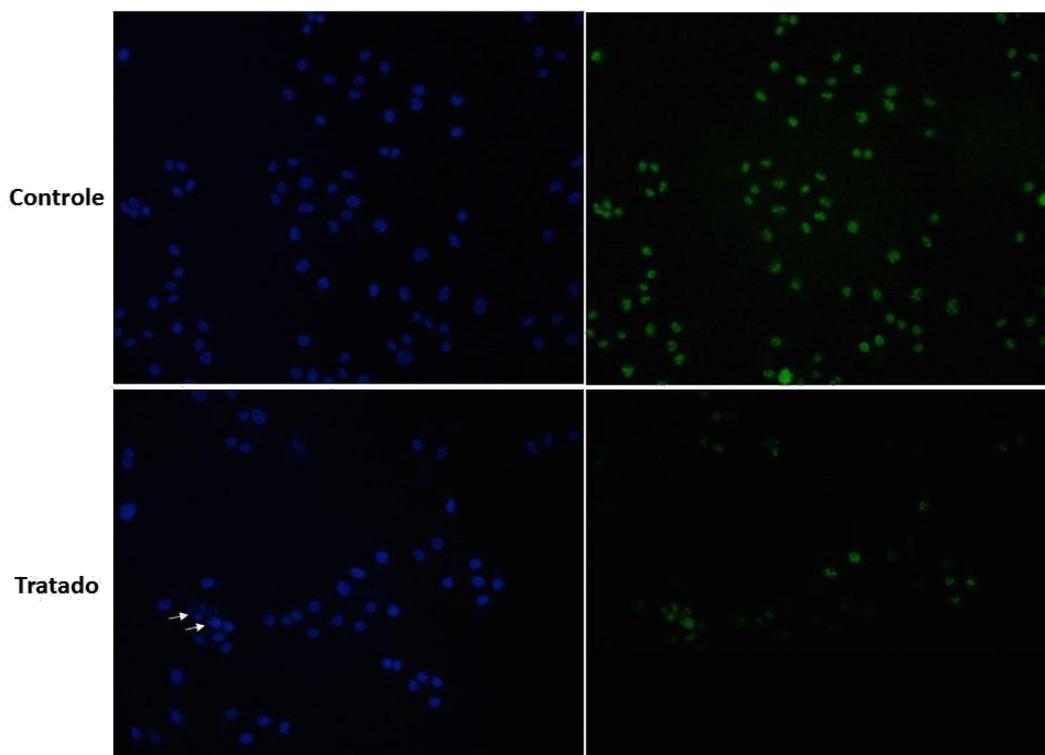
Fonte: autoria própria. Foi realizado o ensaio de ciclo celular por citometria de fluxo a fim de avaliara a distribuição das populações nas diferentes fases do ciclo celular. As células foram tratadas por 24h com 5-ITu nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ e o controle recebeu veículo (DMSO), a quantidade de DNA foi quantificada a partir da marcação com PI para a discriminação das fase do ciclo celular, os dados foram plotados no gráfico acima e a esquerda, em que as barras de erro correspondem ao erro padrão (n = 9) a significância estatística é representada por * P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. O teste estatístico utilizado foi ANOVA multifatorial e pós-teste Bonferroni. E a direita encontram-se os histogramas com a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular nas condições controle tratado.

5.8 Imunofluorescência

Ki67 é um marcador de proliferação celular, sendo expresso em todas as fases do ciclo celular, com exceção de G0 (Li et al., 2015; Iatropoulos & Williams., 1996; Whiterfield et al., 2006). Foi realizado o ensaio de imunofluorescência, a fim de avaliar a quantidade de células positivas para Ki67 após o tratamento com 5-ITu, e verificar se 5-ITu exerce alguma influência sobre a proliferação celular. Na figura 20 A, é possível observar que, após o tratamento com 5-ITu, a maioria das linhagens utilizadas apresentam uma tendência de redução na quantidade de células Ki67 positivas, apesar de ser estatisticamente significativo apenas para o melanócito e para a linhagem A375P.

Figura 21. 5-ITu reduz a quantidade de células positivas para Ki67





Fonte: autoria própria. Foi avaliada a expressão do marcador de proliferação Ki67 a partir do ensaio de imunofluorescência. A cultura primária de melanócitos e as linhagens de melanoma foram tratadas por 24h com 5-ITu nas concentrações correspondentes ao IC₂₅ e o controle recebeu veículo (DMSO), a quantidade total de células foi avaliada utilizando o corante DAPI (azul), que marca o DNA das células; foi avaliada a quantidade de células que apresentavam marcação positiva para Ki67 (verde). Figura A apresenta o gráfico com a quantificação das células positivas para Ki67 em relação ao total de células (n = 4), no gráfico de erro correspondem ao erro padrão e a significância estatística é representada por * P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; o teste estatístico utilizado foi ANOVA multifatorial e pós-teste Bonferroni. A figura B As fotomicrografias foram obtidas no microscópio de fluorescência no aumento de 200X. A marcação em azul corresponde ao núcleo das células e a marcação verde corresponde a marcação da proteína nuclear Ki67.

5.9 Curva de crescimento das células submetidas ao tratamento combinatório

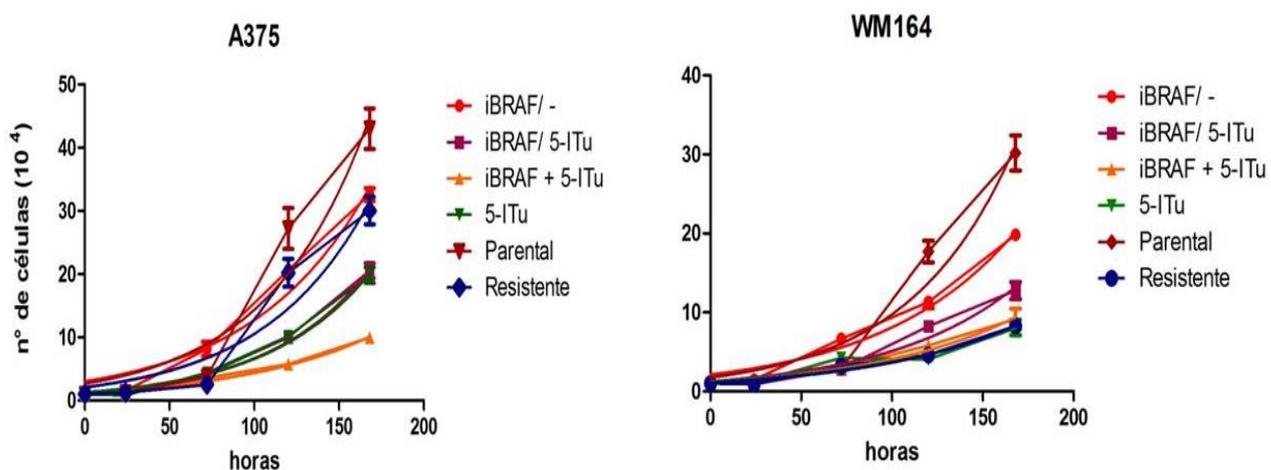
Para conhecer melhor o comportamento das células geradas durante o tratamento combinatório, foi realizado o ensaio para obtenção da curva de crescimento. Nos gráficos da figura 22, estão representadas as curvas de crescimento das linhagens A375P, A375R, WM164P e WM164R e seus respectivos grupos tratados continuamente com 5-ITu, e com a combinação de iBRAF e 5-ITu; e tratados em regime de alternância de iBRAF e 5-

ITu, e o tratamento intermitente com iBRAf. Podemos observar nos gráficos da figura 22 que as células entram na fase de crescimento exponencial a partir de 72h após o plaqueamento.

Baseando-se nos resultados obtidos na curva de crescimento, foi calculado o tempo de dobramento das linhagens utilizadas, usando-se apenas os pontos reconhecidos como fase de crescimento exponencial. No quadro 4, observa-se que as linhagens A375P e A375R apresentam tempos de dobramento semelhantes, e que todos os tratamentos combinatórios com a linhagem A375P foram capazes de induzir o aumento do tempo de dobramento desta linhagem, variando entre 45,57 e 64,54h; sendo que o tempo de duplicação das células expostas ao tratamento crônico com 5-ITu e iBRAf foi o dobro da linhagem parental.

Já as linhagens WM164P e WM164R apresentam diferença significativa quanto ao tempo de dobramento, sendo que a linhagem resistente leva mais que o dobro do tempo da parental, para duplicar. É possível observar que os grupos do tratamento combinatório apresentam tempo de dobramento superior ao tempo de dobramento da linhagem parental, variando entre 50,54 e 68,25h. Todos os grupos tratados com iBRAf, exceto o que alterna entre 5-ITu e iBRAf, apresentam o tempo de dobramento semelhante ao apresentado pela linhagem resistente, sendo que as linhagens expostas ao tratamento contínuo com a combinação entre 5-ITu e iBRAf leva o maior tempo para duplicar a quantidade de células.

Figura 22. Curva de crescimento das células submetidas ao tratamento combinatório de iBRAf e 5-ITu



Fonte: autoria própria. Foi avaliada a curva de crescimento das linhagens de melanoma após a exposição com 5-Iodotubercidina (5-ITu) e o inibidor de BRAF em diferentes combinações. A curva de crescimento foi obtida a partir da contagem do número de células após 24h, 72h, 120h e 144h, a barra de erro representa o erro padrão (n=9).

Quadro 4 – Tempo de dobramento das linhagens de melanoma e dos grupos de tratamento combinatório de iBRAF e 5-ITu

Linhagem	Tempo de dobramento (72h -168h)	Linhagem	Tempo de dobramento (72h -168h)
A375P	32,14	WM164P	25,83
A375R	34,45	WM164R	68,06
A375 iBRAF /-	52,84	WM164 iBRAF /-	60,64
A375 iBRAF / 5-ITu	40,89	WM164 iBRAF / 5-ITu	50,64
A375 iBRAF + 5-ITu	64,54	WM164 iBRAF + 5-ITu	68,25
A375 5-ITu	45,57	WM164 5-ITu	55,66

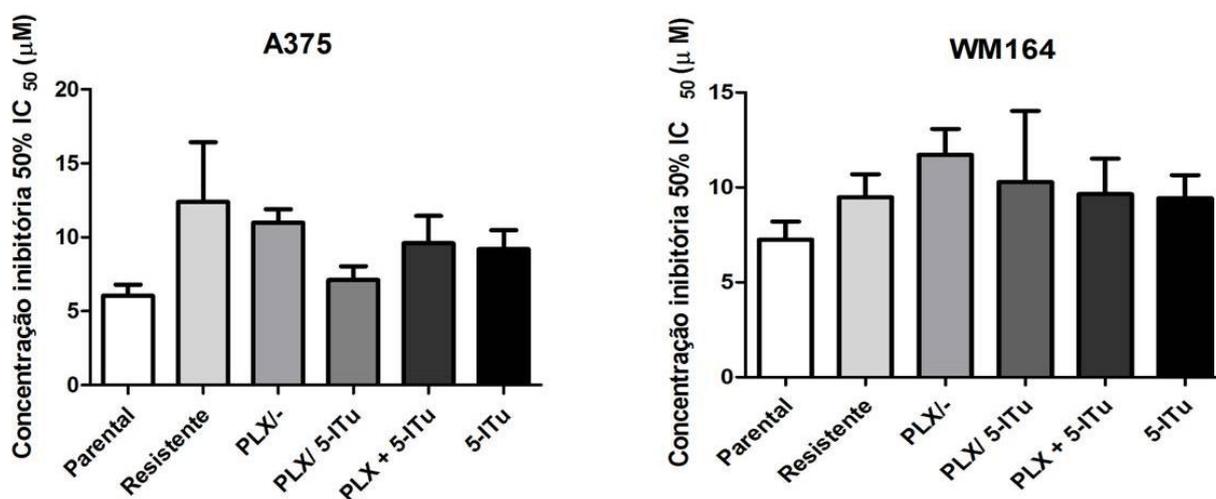
Fonte: autoria própria: O tempo de dobramento das linhagens de melanoma foi calculado a partir dos resultados obtidos na curva de crescimento durante o intervalo correspondente a fase de crescimento exponencial de 72 a 168h.

5.10 Ensaio de viabilidade celular por MTT

As linhagens A375 e WM164 foram submetidas ao tratamento combinatório entre 5-ITu e iBRAF, os grupos de células gerados nestes tratamentos foram submetidos a

concentrações crescentes de iBRAF, variando de 0 a 16 μ M, de modo a avaliar se os tratamentos combinatórios foram capazes de sensibilizar as células ao tratamento iBRAF, reduzindo o IC₅₀ das células em relação à linhagem resistente. Como é possível observar na figura 23, os tratamentos combinatórios não foram capazes de reduzir significativamente o IC₅₀, e conseqüentemente os tratamentos combinatórios não se mostraram eficazes para sensibilizar as linhagens A375 e WM164 para o tratamento com o iBRAF.

Figura 23. O tratamento combinatório de iBRAF e 5-ITu não é capaz de evitar ou atrasar a resistência ao iBRAF em linhagens de melanoma



Fonte: autoria própria. A fim de avaliar se as diferentes combinações de tratamento com a 5-Iodotubercidina (5-ITu) e o Inibidor de BRAF (iBRAF). A partir do ensaio de MTT foi determinada a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) de células submetidas ao tratamento combinatório tratadas por 24h com iBRAF, a foi calculado a partir da equação da reta de viabilidade celular, os dados foram plotados nos gráficos acima as barra de erro representa o erro padrão (n=9).

6. Discussão

A atividade de ADK pode desempenhar papel crucial em processos envolvidos na tumorigênese, porém há poucos estudos nessa área e nenhum estudo investigando seu papel em melanomas. Boison (2013) afirma que são necessários mais trabalhos para entender completamente o papel da adenosina no câncer e investigar se ADK pode constituir um alvo terapêutico para o tratamento de câncer. Este trabalho descreve os níveis de expressão gênica de ADK em melanócitos e em linhagens de melanoma, e os efeitos do seu inibidor farmacológico, a 5-iodotubercidina, em linhagens de melanoma.

Na avaliação da expressão gênica de ADK, verificamos que este é diferencialmente expresso entre culturas primárias de melanócitos e linhagens tumorais, de modo que as linhagens derivadas de melanomas humano apresentam maior expressão de ADK em relação ao melanócito. Giglioni e colaboradores (2008) descreveram que, nas amostras de tumor da mucosa colorretal humano, há um aumento da expressão de mRNA de ADK em relação à região não afetada do mesmo tecido, e este dado da literatura concorda com os nossos resultados, indicando que ADK pode ser um alvo para transformação maligna.

Também foi verificado nos resultados da expressão gênica de ADK que as linhagens resistentes ao inibidor de BRAF têm níveis aumentados de ADK em relação ao seu par parental. Há diversos trabalhos na literatura (PAULITSCHKE et al., 2015; SU et al., 2017; PARKER et al., 2015) que exploram a variação no perfil transcriptômico e proteômico entre linhagens sensíveis e resistentes ao inibidor de BRAF e nosso dado aponta que ADK pode ser incluído na lista de genes que podem estar envolvidos na aquisição da resistência ou que teve sua expressão alterada devido a modificações adaptativas em resposta ao tratamento.

Oliveira e colaboradores (2017) realizaram um estudo *in silico*, usando plataforma de bioinformática e dados de repositórios públicos, em que descreveram a ocorrência da expressão diferencial de ADK em amostras de pacientes com melanomas metastáticos. No entanto, seus dados apontam que há uma redução na expressão de ADK quando comparado ao *nevus*, enquanto que os nossos dados de expressão gênica, utilizando linhagens derivadas de melanoma, apontam o aumento da expressão de ADK quando comparada ao controle não tumoral. Esta divergência quanto aos resultados pode ser

reflexo da influência do microambiente, Mujoomdar, Hoskin e Blay (2003) e Groot e colaboradores (2012) discutem a variação dos níveis de ADK e de adenosina em tumores sólidos devido ao suprimento vascular, a taxa metabólica e a hipóxia, Morote-Garcia e colaboradores (2008) demonstram que o Fator Induzível por Hipóxia 1 α (HIF-1 α) é um repressor transcricional de ADK. Além disso, os estudos depositados nos repositórios avaliam a expressão gênica da massa tumoral, sendo que esta não é composta apenas por células de melanoma. Desse modo, a presença de outros tipos celulares, como células do sistema imune, células endoteliais, fibroblastos entre outros, pode levar a variação quanto aos níveis de ADK. Assim sendo, estes dois fatores podem explicar como o microambiente, ausente no nosso modelo de estudo, pode alterar a expressão de ADK, e assim explicar a diferença entre os dois dados.

No ensaio de citotoxicidade por azul de *Trypan* foi obtido o IC₂₅ (concentração subtóxica) das linhagens de melanoma, sendo que os valores variam entre 0,8 a 1,2 μ M, e da cultura primária de melanócitos, que corresponde a 1,1 μ M. Na literatura há o relato de que concentrações de até 1 μ M de 5-ITu não apresentam citotoxicidade significativa na linhagem de melanoma HM3KO (Kim et al., 2017), e este dado concorda com os nossos resultados. Também foi obtido o valor de IC₅₀ de 5-ITu na cultura primária de melanócitos e nas linhagens de melanoma tratadas por 24h; para melanócitos, o IC₅₀ corresponde a concentração de 2,6 μ M, enquanto para as linhagens tumorais, estas concentrações variam entre 1,9 e 3,5 μ M. Os valores do IC₅₀ das linhagens de melanoma e dos melanócitos são muito próximos, evidenciando que 5-ITu não apresenta seletividade para as células tumorais.

No ensaio de citotoxicidade por azul de *Trypan*, também foi possível notar que, nas condições de tratamento da monocamada por 24h, a redução da quantidade de células viáveis é dose dependente; no entanto, o aumento da concentração de 5-ITu nos tratamentos não é capaz de aumentar significativamente a quantidade de células não-viáveis. No ensaio de morte celular, viu-se que o tratamento com 5-ITu na concentração correspondente ao IC₂₅ também se mostra incapaz de induzir significativamente morte por apoptose ou por necrose.

O tratamento contínuo com 5-ITu revelou que, nos períodos de 48 e 72h, existe diferença significativa na quantidade de células viáveis entre o controle e o tratado. Para o

tratamento agudo, a diferença de células viáveis entre o controle e o tratado só apresenta significância estatística 48h depois a exposição com 5-ITu. Zhang e colaboradores (2013) demonstraram que 5-ITu reduz significativamente a sobrevivência celular quando as células se encontram na fase log, o que está de acordo com nossos resultados, uma vez que se verifica nos gráficos da figura 22 que as linhagens de melanoma entram na fase de crescimento exponencial após 72h do plaqueamento.

Os nossos dados indicam que 5-ITu não foi capaz de aumentar a quantidade de células não-viáveis no modelo de monocamada, quando as células são expostas a concentrações crescentes, quando as células são expostas a tempos de tratamento maiores ou mantidas por períodos prolongados após o tratamento por 24h; no entanto, tratamento com o IC_{25} por 72h foi capaz de induzir morte nas células de esferoides das linhagens A375R e WM164R. Isso pode decorrer do fato de as células no centro do esferoide serem mais susceptíveis ao tratamento, por ser uma região de estresse metabólico, uma vez que apresenta menor aporte de O_2 e nutrientes, e por acumular metabólitos (FRIEDRICH et al., 2007).

No ensaio clonogênico, pode-se observar a redução do número de colônias em todas as linhagens de melanoma, com exceção da WM164P. Franken e colaboradores (2006) afirmam que este ensaio avalia a capacidade de “divisão ilimitada” das células e por isso estas células são capazes de formar colônias, sendo esta característica um dos *hallmarks* do câncer. Desse modo, nossos dados sugerem que 5-ITu é capaz de limitar a capacidade proliferativa das linhagens de melanoma.

Os resultados do ensaio de formação de colônia revelam diferenças quanto à capacidade clonogênica das linhagens, já que as linhagens WM164P e WM164R apresentam reduzido número de colônias em relação às demais linhagens de melanoma, o que pode decorrer da presença de mutações que promovem a superexpressão de fatores de crescimento e/ou em receptores de fatores de crescimento, que leva a sua ativação independente da presença do ligante, nas linhagens A375 parental e resistente e SK-Mel-29 parental e resistente assim favorecendo o crescimento dessas células independente da sinalização parácrina, acarretando em uma maior capacidade de formar colônias.

Os resultados com os grupos recuperados e do ensaio clonogênico demonstraram

que os efeitos de 5-ITu são irreversíveis, mantendo a redução da quantidade de células viáveis 24 e 48h após a exposição ao tratamento e pelo fato de o efeito inibitório de 5-ITu na capacidade clonogênica ser evidente 14 dias de cultivo após o tratamento por apenas 24h. No entanto, quadro 3 revela que o tratamento crônico tem efeito mais vigoroso do que o tratamento agudo, evidenciando a relação entre o tempo de exposição e a eficácia na inibição do crescimento.

Antimetabólitos são moléculas que apresentam estrutura química relacionada ao metabólito, logo 5-ITu faz parte dessa classe de moléculas, pois é um análogo de adenosina, foi descrito que os antimetabólitos derivados de nucleosídeos podem ser incorporados ao DNA e/ou causar danos no DNA e assim promover a parada do ciclo celular e morte celular (ZHANG et al., 2013; SWIFT & GOLSTEYN, 2014). No ensaio de ciclo celular, verificamos que o tratamento com 5-ITu aumenta a população com quantidade de DNA inferior ao conteúdo diploide (SubG1) nas linhagens A375P, WM164R tratada por 72h, SK-Mel-29P e SK-Mel-29R. Já está bem fundamentado na literatura que o aumento da população em SubG1 corresponde a fragmentação do DNA, e muitas vezes associada morte celular programada – apoptose – (KAJSTURA, et al., 2007), porém nossos dados de avaliação de morte celular não evidenciam a capacidade de 5-ITu induzir apoptose em concentrações subtóxicas IC₂₅, sugerindo que este aumento de subG1 seja devido ao potencial genotóxico de 5-ITu. Já foi descrita a capacidade dos análogos de nucleosídeos de causar danos no DNA, como quebra simples ou da dupla fita (EWALD et al., 2008; ZHANG et al., 2013) e que 5-ITu se apresenta como um potente agente genotóxico em células derivadas de câncer de colón , pois o tratamento com 1µM em células derivadas de câncer de colón (concentração próxima à usada em nossos ensaios) (ZHANG et al., 2013). Muitos quimioterápicos têm como alvo componentes chaves para a ativação de *checkpoints* de fase S e G2/M, sendo estes ativados em resposta a danos no DNA e devido a formação defectiva do fuso mitótico (VISCONTI, DELLA MONICA & GRIECO, 2016).

Em relação à redução da população em fase S após o tratamento com 5-ITu observada nas linhagens SK-Mel-29P e SK-Mel-29R, ZHANG e colaboradores (2013) discutem que alguns análogos de nucleosídeos podem levar a parada de ciclo celular acompanhada pela redução da população em fase S, isto pode decorrer da capacidade de 5-ITu em, ao ser incorporado ao DNA, se tornar um obstáculo para a forquilha de

replicação, impedindo a alongação do DNA e inibindo a sua síntese (EWALD et al., 2008; ZHANG et al., 2013). Já foi reportado que o gemcitabine, um análogo de nucleosídeos, ativa o checkpoint de fase S por inibição de CHK1, fosforilação de H2AX e está associado com a redução da sobrevivência, a capacidade de se reproduzir e formar clones (EWALD et al., 2008), isso sugere que assim como o gemcitabine, 5-ITu promove a ativação do *checkpoint* de fase S impedindo a progressão do ciclo celular e redução da população nessa fase do ciclo celular. Este relato também ajuda a explicar o mecanismo pelo qual 5-ITu reduz a capacidade clonogênica das linhagens de melanoma.

Na literatura, encontramos relatos de que 5-ITu pode promover parada de ciclo celular na fase G2/M, assim como foi observado nas linhagens A375P e WM164R. Segundo Zhang e colaboradores (2013), os efeitos genotóxicos da incorporação de 5-ITu no DNA ativam principalmente o checkpoint de G2 via ATM-p53 e, conseqüentemente, a parada do ciclo celular. Um outro mecanismo pelo qual 5-ITu pode estar induzindo a parada de ciclo na fase G2/M é devido a inibição da proteína haspin quinase. Esta proteína atua promovendo o recrutamento do complexo cromossomo *passanger* (CPC); este complexo regula processos da progressão mitótica, entre eles a condensação e a bi-orientação dos cromossomos, o *checkpoint* de montagem do fuso (SAC) e a citocinese (BALZANO et al., 2011; DE ANTONI et al., 2012). A progressão do ciclo celular se dá pela ativação do complexo APC/C, quando SAC é desmontado, e isto só acontece depois que todos os cromossomos estão no fuso bipolar (KRENNIG, 2015; BARNUM e O'CONNELL, 2014). Considerando que inibição da atividade de haspin prejudica a bi-orientação dos cromossomos, e que este é um dos mecanismos de indução de parada de ciclo durante a mitose, pode-se dizer que a inibição de haspin por 5-ITu pode estar induzindo parada de ciclo em G2/M nas linhagens de melanoma.

No ensaio de ciclo celular por citometria de fluxo, verificamos que o tratamento com 5-ITu aumenta as populações em G1 na linhagem WM164P, evidenciando parada nestas duas fases do ciclo. Esta parada de ciclo observada se dá provavelmente pela ativação de *checkpoints*, os quais impedem a transição para a fase S, na linhagem WM164P. Um dos mecanismos de bloqueio da progressão do ciclo celular se dá pela inibição dos complexos ciclina A/CDK2 e ciclina E/CDK2 mediado por p53, ativado por ATM (VISCANTI, DELLA MONICA & GRIECO, 2016), ZHANG e colaboradores (2013) demonstraram que 5-ITu foi capaz de induzir aumento de p53 total e fosforilado,

de ATM e Chk2 fosforilados. Estas proteínas são reconhecidas na literatura como principais mediadores e efetores da resposta ao dano no DNA, levando a ativação de cascata de sinalização que induzem morte celular e parada no ciclo.

A expressão de Ki67 está associada com a atividade proliferativa, uma vez que é expresso em todas as fases do ciclo celular, com exceção de G0 (LI et al., 2015; IATROPOULOS & WILLIAMS., 1996; WHITFIELD et al., 2006). Nossos dados demonstram que o tratamento com 5-ITu é capaz de reduzir a quantidade de células positivas para Ki67, reforçando que 5-ITu é capaz de induzir a saída das células do ciclo celular, assim reduzindo a capacidade proliferativa das células.

Ki67 é comumente utilizado como um marcador tumoral de proliferação em uma variedade de tumores, como de mama, pulmão, próstata e do sistema nervoso central (LI et al., 2015; WHITFIELD et al., 2006). No gráfico da figura 23, também é possível observar que as linhagens tumorais na condição controle apresentam aproximadamente 100% das células positivas para Ki67, enquanto que o melanócito, controle não tumoral, na condição controle apresenta aproximadamente 70% das células positivas para Ki67, esse dado sugere que Ki67 também pode ser usado com um marcador de tumoral proliferação para melanoma.

Os resultados da citotoxicidade por azul de *Trypan*, do ciclo celular e da imunofluorescência sugerem que 5-ITu atua como um potencial agente citostático e não citotóxico, uma vez que é capaz de reduzir a taxa de proliferação celular e induzir a parada de ciclo celular. Uma vantagem desse tipo de drogas é que sua baixa toxicidade e o prolongamento da sobrevida permitem que os pacientes vivam com o câncer (MILLAR & LYNCH, 2003).

O tratamento combinatório emerge da necessidade de se testar variedades de regimes de doses e cronogramas de tratamento a fim de otimizar o tratamento, aumentar a tolerância dos pacientes e retardar a resistência a droga (DOOLEY et al., 2014). Considerando-se uma potencial sinergia entre drogas citotóxicas e citostáticas foram realizado ensaios com células que receberam tratamentos combinados utilizando 5-ITu e iBRAF. No entanto, a combinação, tanto simultânea quanto alternada, não foi capaz de sensibilizar, de maneira significativa, as células ao tratamento com iBRAF. Contudo,

todas as condições do tratamento combinatório foram capazes de induzir o aumento no tempo de dobramento em relação às linhagens A375P, A375R e WM164P.

7. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo geraram as seguintes conclusões:

1. Os níveis de expressão de RNA mensageiro de ADK é maior nas linhagens tumorais em relação ao melanócito (controle não-tumoral).

2. Os dados de expressão gênica sugerem que há uma relação entre a resistência, o inibidor de BRAF e a expressão de ADK, uma vez que as linhagens resistentes apresentam expressão significativamente maior que o melanócito, e maior que os seus pares parentais, apesar de ser significativa apenas entre os pares da linhagem SK-Mel-29.

3. Concentrações subtóxicas de 5-ITu não apresentam efeitos citotóxicos em todas as condições de tratamento no modelo de monocamada, mas são capazes de induzir morte celular em esferoides tratados por 72h.

4. 5-ITu promove a redução da capacidade clonogênica na maioria das linhagens de melanoma utilizada, e é capaz de induzir parada de ciclo celular nas fases G2/M e G1, além de promover a fragmentação do DNA. Estes dados, juntamente com a literatura, sugerem que estes efeitos decorrem de danos no DNA que bloqueiam o ciclo celular devido a ativação de *checkpoints*, evidenciando o potencial genotóxico de 5-ITu.

Desse modo, pode-se concluir que ADK se apresenta como um possível alvo para a progressão tumoral em melanoma, que 5-ITu não apresenta efeito citotóxico significativo, nem é capaz de aumentar a sensibilidade das linhagens de melanoma ao vemurafenibe, em monocamada. No entanto, ele se mostra um potente agente antiproliferativo, uma vez que se mostrou capaz de reduzir a quantidade de células viáveis em diferentes condições de tratamento com 5-ITu, de promover a parada em diferentes fases do ciclo celular e promover a redução da quantidade de células positivas para o marcador de proliferação Ki67, além disso, o tratamento combinatório com 5-ITu leva ao

aumento do tempo de dobramento das linhagens de melanoma, sugerindo que 5-ITu atua como um agente citostático.

Estes dados em conjunto sugerem o gene ADK como um potencial alvo a ser mais explorado em futuros projetos, utilizando-se ferramentas de *knockout* ou *knockdown* para que o papel específico desta proteína seja estudado e sua ação em melanoma. Além disso, os dados obtidos com o tratamento de 5-ITu, mostram que este composto pode ser promissor no tratamento anti-câncer, devendo ser mais explorado para este fim.

Referências Bibliográficas

ALBERTS, B. e colaboradores. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª Ed. Porto Alegre, Artmed, 2010.

Alves-Fernandes, D. K. Avaliação do potencial de superação da quimioresistência do melanoma aos inibidores de BRAF V600E (Vemurafenibe) e de MEK (Trametinibe) utilizando a terapia combinatória com 4-nerolidilcatecol (4-NC). 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

American Cancer Society – Melanoma Skin Cancer
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003120-pdf>.

American Society – Estágios do cancer de pele melanoma -
<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/melanoma-skin-cancer-stages.html>

ANNES, J. P. et al. Adenosine kinase inhibition selectively promotes rodent and porcine islet β -cell replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 10, p. 3915-20, Mar 2012a. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22345561> >.

APLIN, A. E.; KAPLAN, F. M.; SHAO, Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. **J Invest Dermatol**, v. 131, n. 9, p. 1817-20, Sep 2011. ISSN 1523-1747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593776> >.

BALZANO, D. et al. A general framework for inhibitor resistance in protein kinases. **Chem Biol**, v. 18, n. 8, p. 966-75, Aug 2011a. ISSN 1879-1301. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21867912> >.

BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. **Methods Mol Biol**, v. 1170, p. 29-40, 2014. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906307> >.

BOISON, D. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 1, p. 2-7, Feb 2008. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942368> >.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949-54, Jun 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12068308> >.

DE ANTONI, A. et al. A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B. **J Cell Biol**, v. 199, n. 2, p. 269-84, 10 2012a. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071153> >.

DE GROOT, M. et al. Overexpression of ADK in human astrocytic tumors and peritumoral tissue is related to tumor-associated epilepsy. **Epilepsia**, v. 53, n. 1, p. 58-66, Jan 2012. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092111> >.

DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacol Ther**, v. 138, n. 2, p. 255-71, May 2013. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23356980> >.

DOOLEY, A. J. et al. Intermittent dosing with vemurafenib in BRAF V600E-mutant melanoma: review of a case series. **Ther Adv Med Oncol**, v. 6, n. 6, p. 262-6, Nov 2014. ISSN 1758-8340. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25364391> >.

ELSHERBINY, N. M. et al. ABT-702, an adenosine kinase inhibitor, attenuates inflammation in diabetic retinopathy. **Life Sci**, v. 93, n. 2-3, p. 78-88, Jul 2013a. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770229> >.

EWALD, B.; SAMPATH, D.; PLUNKETT, W. Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6522-37, Oct 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955977> >.

FASSETT, J. T. et al. Adenosine kinase regulation of cardiomyocyte hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 300, n. 5, p. H1722-32, May 2011. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21335462> >.

FLÜCKIGER-ISLER, R. E.; WALTER, P. Stimulation of rat liver glycogen synthesis by the adenosine kinase inhibitor 5-iodotubercidin. **Biochem J**, v. 292 (Pt 1), p. 85-91, May 1993a. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8503865> >.

_GARCÍA-VILLAFRANCA, J.; CASTRO, J. Effects of 5-iodotubercidin on hepatic fatty acid metabolism mediated by the inhibition of acetyl-CoA carboxylase. **Biochem Pharmacol**, v. 63, n. 11, p. 1997-2000, Jun 2002a. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093476> >.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-7, Feb 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314971> >.

HAMMERLINDL, H.; SCHAIDER, H. Tumor cell-intrinsic phenotypic plasticity facilitates adaptive cellular reprogramming driving acquired drug resistance. **J Cell Commun Signal**, v. 12, n. 1, p. 133-141, Mar 2018. ISSN 1873-9601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29192388> >.

HASHEMI, M. et al. Adenosine and deoxyadenosine induces apoptosis in oestrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cells via the intrinsic pathway. **Cell Prolif**, v. 38, n. 5, p. 269-85, Oct 2005. ISSN 0960-7722. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16202036> >.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714-26, Oct 2013. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24060863>>.

IATROPOULOS, M. J.; WILLIAMS, G. M. Proliferation markers. **Exp Toxicol Pathol**, v. 48, n. 2-3, p. 175-81, Feb 1996. ISSN 0940-2993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8672872>>.

IBRAHIM, N.; HALUSKA, F. G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 551-79, 2009. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400696> >.

INCA – Tipos de câncer - Melanoma
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018 - <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>

ISOLA, A. L.; EDDY, K.; CHEN, S. Biology, Therapy and Implications of Tumor Exosomes in the Progression of Melanoma. **Cancers (Basel)**, v. 8, n. 12, Dec 2016. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27941674> >.

JACKSON, R. C.; MORRIS, H. P.; WEBER, G. Adenosine deaminase and adenosine kinase in rat hepatomas and kidney tumours. **Br J Cancer**, v. 37, n. 5, p. 701-13, May 1978. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/207296> >.

JANG, S.; ATKINS, M. B. Treatment of BRAF-mutant melanoma: the role of vemurafenib and other therapies. **Clin Pharmacol Ther**, v. 95, n. 1, p. 24-31, Jan 2014a. ISSN 1532-6535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080641> >.

JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, p. 295-312, 1999. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331086> >.

KAJSTURA, M. et al. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. **Cytometry A**, v. 71, n. 3, p. 125-31, Mar 2007. ISSN 1552-4922. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17252584> >

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-23, Nov 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549093> >.

KIM, K. I. et al. Inhibitory effect of 5-iodotubercidin on pigmentation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 490, n. 4, p. 1282-1286, Sep 2017a. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28684314> >.

KOWALUK, E. A.; JARVIS, M. F. Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 9, n. 3, p. 551-64, Mar 2000. ISSN 1354-3784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060695> >.

KOZGUNOVA, E.; HIGASHIYAMA, T.; KURIHARA, D. Cytokinesis defect in BY-2 cells caused by ATP-competitive kinase inhibitors. **Plant Signal Behav**, v. 11, n. 10, p. e1238547, 10 2016. ISSN 1559-2324. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27662076> >.

KUDCHADKAR, R.; PARAISO, K. H.; SMALLEY, K. S. Targeting mutant BRAF in melanoma: current status and future development of combination therapy strategies. **Cancer J**, v. 18, n. 2, p. 124-31, 2012 Mar-Apr 2012a. ISSN 1540-336X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22453012> >.

KUK, D. et al. Prognosis of Mucosal, Uveal, Acral, Nonacral Cutaneous, and Unknown Primary Melanoma From the Time of First Metastasis. **Oncologist**, v. 21, n. 7, p. 848-54, 07 2016a. ISSN 1549-490X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27286787> >.

KÖHLER, D. et al. Inhibition of Adenosine Kinase Attenuates Acute Lung Injury. **Crit Care Med**, v. 44, n. 4, p. e181-9, Apr 2016. ISSN 1530-0293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26491864> >.

KRENNING, L. Cell cycle checkpoints: reversible when possible, irreversible when needed, 2015. Dissertation - The Netherlands Cancer Institute Plesmanlaan , Amsterdam, The Netherlands

LAIHO, M.; LATONEN, L. Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer. **Ann Med**, v. 35, n. 6, p. 391-7, 2003. ISSN 0785-3890. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572162> >.

LAVOINNE, A.; CLAEYSSENS, S.; CHEDEVILLE, A. Metabolism of adenosine through adenosine kinase inhibits gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. **Eur J Biochem**, v. 187, n. 2, p. 403-7, Jan 1990. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153547> >.

LEE, J. K. et al. Adenosine kinase inhibitor attenuates the expression of inducible nitric oxide synthase in glial cells. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 1, p. 151-60, Jan 2005a. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15617735> >.

LI, L. T. et al. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). **Mol Med Rep**, v. 11, n. 3, p. 1566-72, Mar 2015. ISSN 1791-3004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384676> >.

LUAN, G. WANG, et al. Overexpression of Adenosine Kinase in Patients with Epilepsy Associated With Sturge-Weber Syndrome. **Neuropsychiatry**. 7. 640–647. 2017, 10.4172/Neuropsychiatry.1000364. Disponível em: <http://www.jneuropsychiatry.org/peer-review/overexpression-of-adenosine-kinase-in-patients-with-epilepsy-associated-with-sturgeweber-syndrome.pdf>

MAIOLICA, A. et al. Modulation of the chromatin phosphoproteome by the Haspin protein kinase. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 7, p. 1724-40, 07 2014. ISSN 1535-9484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24732914> >.

MASSILLON, D. et al. Identification of the glycolytic compound 5-iodotubercidin as a general protein kinase inhibitor. **Biochem J**, v. 299 (Pt 1), p. 123-8, Apr 1994. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8166629> >.

MATTIA, G. et al. Cell death-based treatments of melanoma:conventional treatments and new therapeutic strategies. **Cell Death Dis**, v. 9, n. 2, p. 112, Jan 2018. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371600> >.

MELLO, P. E. A. et al. Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. **Mol Biol Cell**, v. 25, n. 19, p. 2905-18, Oct 2014. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103241> >.

MILLAR, A. W.; LYNCH, K. P. Rethinking clinical trials for cytostatic drugs. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 7, p. 540-5, Jul 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12835674> >.

MOMBACH, J. C.; BUGS, C. A.; CHAOUIYA, C. Modelling the onset of senescence at the G1/S cell cycle checkpoint. **BMC Genomics**, v. 15 Suppl 7, p. S7, 2014a. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25573782> >.

MOROTE-GARCIA, J. C. et al. HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5571-80, Jun 2008a. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18309031> >.

NAVARRO, G. et al. Genetic Disruption of Adenosine Kinase in Mouse Pancreatic β -Cells Protects Against High-Fat Diet-Induced Glucose Intolerance. **Diabetes**, v. 66, n. 7, p. 1928-1938, 07 2017. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28468960> >.

NAZARIAN, R. et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 973-7, Dec 2010a. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107323> >.

NIKOLAOU, V. A. et al. Melanoma: new insights and new therapies. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 3 Pt 2, p. 854-63, Mar 2012. ISSN 1523-1747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22217739> >.

OLIVEIRA, É. et al. Toxicogenomic and bioinformatics platforms to identify key molecular mechanisms of a curcumin-analogue DM-1 toxicity in melanoma cells. **Pharmacol Res**, v. 125, n. Pt B, p. 178-187, Nov 2017. ISSN 1096-1186. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28882690> >.

PALCHYKOVA, S. et al. Manipulation of adenosine kinase affects sleep regulation in mice. **J Neurosci**, v. 30, n. 39, p. 13157-65, Sep 2010. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20881134> >.

PARKER, R. et al. Phosphoproteomic Analysis of Cell-Based Resistance to BRAF Inhibitor Therapy in Melanoma. **Front Oncol**, v. 5, p. 95, 2015. ISSN 2234-943X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26029660> >.

PATIL, M.; PABLA, N.; DONG, Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 21, p. 4009-21, Nov 2013. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508805> >.

- PAULITSCHKE, V. et al. Proteome profiling of keratinocytes transforming to malignancy. **Electrophoresis**, v. 36, n. 4, p. 564-76, Feb 2015. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395074> >.
- PEYTON, K. J. et al. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits the proliferation of human endothelial cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 342, n. 3, p. 827-34, Sep 2012. ISSN 1521-0103. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22700432> >.
- PHILLIS, J. W.; SMITH-BARBOUR, M. The adenosine kinase inhibitor, 5-iodotubercidin, is not protective against cerebral ischemic injury in the gerbil. **Life Sci**, v. 53, n. 6, p. 497-502, 1993. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8341136> >.
- PIGNATARO, G.; SIMON, R. P.; BOISON, D. Transgenic overexpression of adenosine kinase aggravates cell death in ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 1, p. 1-5, Jan 2007a. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16685255> >.
- PLATZ, A. et al. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. **Mol Oncol**, v. 1, n. 4, p. 395-405, Apr 2008. ISSN 1878-0261. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19383313> >.
- QUARTUCCIO, S. M.; DIPALI, S. S.; SCHINDLER, K. Haspin inhibition reveals functional differences of interchromatid axis-localized AURKB and AURKC. **Mol Biol Cell**, v. 28, n. 17, p. 2233-2240, Aug 2017. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28659416> >.
- ROBINSON, J. P. et al. Resistance mechanisms to genetic suppression of mutant NRAS in melanoma. **Melanoma Res**, v. 27, n. 6, p. 545-557, Dec 2017. ISSN 1473-5636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29076949> >.
- SALTON, M. et al. Inhibition of vemurafenib-resistant melanoma by interference with pre-mRNA splicing. **Nat Commun**, v. 6, p. 7103, May 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971842> >.
- SAMARI, H. R.; SEGLEN, P. O. Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, and N6-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of amp-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 37, p. 23758-63, Sep 1998a. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9726984> >.
- SANDRI, S. et al. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. **Pharmacol Res**, v. 111, p. 523-533, 09 2016. ISSN 1096-1186. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27436149> >.
- SCHULTE, G.; FREDHOLM, B. B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. **Cell Signal**, v. 15, n. 9, p. 813-27, Sep 2003a. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834807> >.
- SHALTIEL, I. A. et al. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. **J Cell Sci**, v. 128, n. 4, p. 607-20, Feb 2015. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609713> >.

SHARMA, P. et al. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 707-723, 02 2017. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28187290> >.

SHEN, H. Y. et al. Adenosine kinase determines the degree of brain injury after ischemic stroke in mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 7, p. 1648-59, Jul 2011a. ISSN 1559-7016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21427729> >.

SLIPICEVIC, A.; HERLYN, M. Narrowing the knowledge gaps for melanoma. **Ups J Med Sci**, v. 117, n. 2, p. 237-43, May 2012. ISSN 2000-1967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22339359> >.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-51, May 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12789290> >.

SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 3, p. 3403-31, Feb 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573252> >.

SU, Y. et al. Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 52, p. 13679-13684, 12 2017. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29229836> >.

UGARKAR, B. G. et al. Adenosine kinase inhibitors. 1. Synthesis, enzyme inhibition, and antiseizure activity of 5-iodotubercidin analogues. **J Med Chem**, v. 43, n. 15, p. 2883-93, Jul 2000. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956196> >.

UONG, A.; ZON, L. I. Melanocytes in development and cancer. **J Cell Physiol**, v. 222, n. 1, p. 38-41, Jan 2010. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19795394> >.

VAZQUEZ, V. E. L. et al. Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 4, Jan 2015. ISSN 1756-0500. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25592837> >.

VISCONTI, R.; DELLA MONICA, R.; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 35, n. 1, p. 153, Sep 2016. ISSN 1756-9966. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27670139> >.

VISCONTI, R. et al. Fcp1-dependent dephosphorylation is required for M-phase-promoting factor inactivation at mitosis exit. **Nat Commun**, v. 3, p. 894, Jun 2012. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22692537> >.

WANG, H. et al. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Plant Cell**, v. 15, n. 12, p. 3020-32, Dec 2003. ISSN 1040-4651. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615595> >.

WHITFIELD, M. L. et al. Common markers of proliferation. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 2, p. 99-106, Feb 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491069> >.

XU, Y. et al. Intracellular adenosine regulates epigenetic programming in endothelial cells to promote angiogenesis. **EMBO Mol Med**, v. 9, n. 9, p. 1263-1278, 09 2017. ISSN 1757-4684. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28751580> >.

YAJIMA, I. et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. **Dermatol Res Pract**, v. 2012, p. 354191, 2012. ISSN 1687-6113. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013435> >.

ZHANG, X. et al. Identification of 5-Iodotubercidin as a genotoxic drug with anti-cancer potential. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62527, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23667485> >.

ANEXOS

Anexo A. Currículo Lattes



Stephanie Cristine Carvalho dos Santos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8274146553467453>

Última atualização do currículo em 30/10/2018

Resumo informado pelo autor

Mestranda do grupo de Biologia da Pele do Departamento de Fisiopatologia e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Bacharel em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (2016), com Iniciação Científica no laboratório de Biologia Celular e Molecular do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade de São Paulo. Tenho experiência na área de Biologia Geral, com ênfase em Biologia Celular.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Stephanie Cristine Carvalho dos Santos

Dados pessoais

Filiação Helio Arzanjo dos Santos e Maria Lúcia Carvalho dos Santos
Nascimento 12/09/1999 - Brasil
Carteira de Identidade 460241448 esp - SP - 12/09/2008
CPF 982.594.408-57

Formação acadêmica/titulação

- 2017** Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Metabolismo do melanoma e o papel do gene ADK
 Orientador: Sylvia Stuchi Maria Engler (Lattes) (Bolsista Jovem), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 - 2016** Graduação em Abi - Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Avaliação do potencial genotóxico dos compostos de telúrio (RF-13R e RF-13S)
 Orientador: Gláucia Maria Machado-Santelli (Bolsista Jovem), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2004 - 2006** Ensino Médio (2o grau), Centro Educacional Sobem, CESOBEN, Brasil. Ano de obtenção: 2006

Formação complementar

- 2016 - 2016** Extensão universitária em III Curso de Inverno em Fisiopatologia e Análises Clínicas. (Carga horária: 42h), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2015 - 2015** I Curso de Biologia Celular e Molecular do Câncer. (Carga horária: 40h), Fundação Antônio Prudente, FAP, São Paulo, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Introdução ao Estudo do Câncer. (Carga horária: 12h), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Respostas ao dano no DNA: Implicações. (Carga horária: 40h), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

Áreas de atuação

1. Biologia Geral

Prêmios e títulos

- 2018** Melhor pôster da categoria aluno de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

11/29/2018

Currículo Lattes

1.  SANTOS, S. C. C.; Martens, AA; Cunha, FLOR; Machado-Santelli, GM. Organotinellurium compounds induce increase in frequency of micronuclei in melanoma cell lines In: XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2016, São Paulo, XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology. , 2016.
2.  Martens, AA; dos Santos SC; Cunha, RL; Machado-Santelli, GM. Investigating the effects of tellurium compounds on melanoma cell lines. In: the 2014 ascbb/fcb meeting, Philadelphia, the 2014 ascbb/fcb meeting. , 2014.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) VIII SIMFAC & III ISPAT, 2018, (Simpósio) ADK INHIBITOR IS A POTENT ANTIPROLIFERATIVE AGENT IN NAVE AND RESISTANT TO B-RAF INHIBITOR HUMAN MELANOMAS.
2. Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB), 2017, (Simpósio)
3. VIII Workshop on Melanoma Models, 2017, (Simpósio)
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) 24 Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 2016, (Simpósio) Avaliação do Potencial Genotóxico de Compostos de Telúrio (RF-13R e RF-13S) em Linhagens de Melanoma.
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2016, (Congresso) Organotinellurium compounds induce increase in frequency of micronuclei in melanoma cell lines.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) 2014 ascbb / fcb meeting, 2014, (Congresso) Investigating the effects of tellurium compounds on melanoma cell lines.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 29/11/2018 às 16:10:44.

Anexo B. Ficha do aluno

11/29/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 7659366/1 - Stephanie Cristine Carvalho dos Santos

Email: stephanie.cristine.santos@usp.br
Data de Nascimento: 12/09/1989
Cédula de Identidade: RG - 46.024.144-8 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharela em Ciências Biológicas - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2016
Graduação: Licenciada em Ciências Biológicas - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2017

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 05/01/2017
Início da Contagem de Prazo: 05/01/2017
Data Limite para o Depósito: 05/07/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvyá Stuchi Maria Engler - 05/01/2017 até o presente. Email: silvy@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 05/01/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 05/03/2018
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 05/01/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 16/07/2018

Impresso em: 29/11/2018 16:12:30

11/29/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 7659366/1 - Stephanie Cristine Carvalho dos Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-13/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	07/03/2017	19/06/2017	15	1	89	A	N	Concluída
BMH5767-3/1	Conceitos, Métodos e Diagnósticos em Biologia Tecidual (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	14/03/2017	26/06/2017	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BIO5739-5/4	Organização do Citoplasma da Célula Animal (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	15/03/2017	27/06/2017	120	8	93	A	N	Concluída
BMH5774-1/1	Metabolismo da Célula Tumoral (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/04/2017	15/05/2017	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
QBQ5717-5/1	Biologia Molecular da Transformação Maligna (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	23/06/2017	10/08/2017	210	14	100	B	N	Concluída
FBC5775-2/1	Modelos de Melanoma	09/08/2017	15/08/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	15/08/2017	27/11/2017	15	1	90	A	N	Concluída
BIO5741-6/3	Ensaio Pedagógico para o Ensino de Biologia (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	06/08/2018	29/10/2018	30	2	90	A	N	Concluída
FBA5728-4/7	Aprimoramento Pedagógico	02/10/2018	29/10/2018	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 16/07/2018

Impresso em: 29/11/2018 16:12:30