

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA SIMÕES PIRES RIBEIRO

**SINVASTATINA INDUZ O PROCESSO AUTOFÁGICO EM CÉLULAS DE
MELANOMA HUMANO METASTÁTICO: POTENCIAL AÇÃO NA
RESISTÊNCIA TUMORAL**

CURITIBA

2016

CAROLINA SIMÕES PIRES RIBEIRO

**SINVASTATINA INDUZ O PROCESSO AUTOFÁGICO EM CÉLULAS DE
MELANOMA HUMANO METASTÁTICO: POTENCIAL AÇÃO NA
RESISTÊNCIA TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Bioquímica.

Orientadora:

Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer

Co-orientadora:

Profa. Dra. Glauca Regina Martinez

CURITIBA

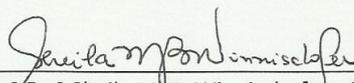
2016

TERMO DE APROVAÇÃO

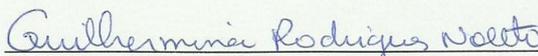
CAROLINA SIMÕES PIRES RIBEIRO

Sinvastatina induz o processo autofágico em células de melanoma humano metastático: potencial ação na resistência tumoral

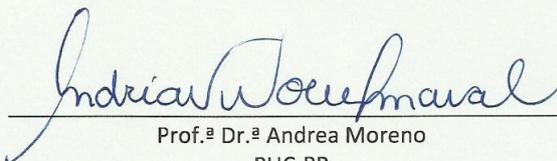
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.ª Dr.ª Sheila M. B. Winnischofer - Orientadora
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Guilhermina Rodrigues Noletto
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Andrea Moreno
PUC-PR

Curitiba, 30 de março de 2016.

Dedico esse trabalho à lembrança do meu “Vô Velho”.
A ti que sempre me lembrou de jamais pararmos de estudar e foi um dos meus
maiores incentivos pra chegar onde cheguei.
Onde quer que tu estejas que continues a olhar por mim.
Com todo o meu amor e saudade...

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus amados pais, pois o amor, o incentivo e todo apoio de vocês foi essencial para essa conquista.

Obrigada pai, por acreditar em mim, pelas palavras necessárias em todos os momentos que precisei e por todo o teu amor e dedicação.

Obrigada mãe, pelos puxões de orelha na medida certa, pelo carinho e zelo que muitas vezes demorei a reconhecer, por teu amor e por também me fazer uma pessoa melhor.

Obrigada aos meus avós, Enio, Celina e Lenyra por me colocarem em um patamar que sequer atingi, mas ainda assim, os faço sentir orgulho e amor. E peço desculpa pela saudade e ausência no dia a dia de vocês.

Agradeço à minha irmã, Luiza, por me proporcionar momentos de descontração e por ser minha eterna companheira pra tudo. Podes ter certeza que me orgulho de ti e sinto tua falta.

Ao meu noivo, Pedro, por estar comigo em todos os momentos e ser minha maior inspiração na área da pesquisa. Não tenho palavras pra agradecer toda tua ajuda, tua paciência e todo o teu amor quando mais precisei. Tu me fazes querer ser melhor todos os dias e eu te amo muito por isso.

A todos os meus familiares e amigos, muito obrigada. Vocês sabem que foram e são muito importantes nessa minha escolha profissional e o carinho e afeto de vocês me faz querer retribuir ainda mais.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, principalmente os “sheilets”, que além do trabalho se tornaram uma família pra mim aqui em Curitiba e são laços que quero levar pra sempre comigo.

Agradeço em especial ao Otávio, que além de colega e amigo, se tornou meu braço direito durante esses dois anos e me ajudou em praticamente todos os experimentos, do início ao fim. Sem palavras pela tua dedicação e companheirismo.

A minha querida orientadora, Prof^a. Sheila, pela confiança, paciência e todo carinho durante esse período. Obrigada pelas oportunidades e por dividir teus conhecimentos comigo.

A prof^a. Glaucia, pela atenção, correções e coorientação nesse trabalho.

A prof^a. Guilhermina, pelas correções de trabalho, pelo incentivo e conselhos sempre que precisei.

As demais professoras do grupo de oxidações biológicas pelas orientações e ensinamentos.

As agências CAPES, CNPq, Fundação Araucária e INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma, pelo apoio financeiro.

*“A única maneira de fazer um bom trabalho é amando o que você faz.
Se ainda não encontrou isso, continue procurando.
Como tudo que diz respeito ao coração, você vai saber quando
encontrar.”*

- Steve Jobs

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele que possui baixa incidência, porém é muito agressivo e com alto índice de mortalidade. Vale destacar que um dos grandes desafios da terapêutica atual é a ocorrência do processo de resistência. O mecanismo de resistência tumoral é complexo e, em geral, acontece porque as células tumorais sofrem mutações, amplificações ou superexpressões de genes regulatórios ou por modulação de mecanismos compensatórios (como senescência e autofagia) que produzem a resistência. A condição de resistência propicia aumento da tolerância das células tumorais aos efeitos citotóxicos do fármaco e/ou ativa sinais de sobrevivência nas mesmas. Esses fatos enfatizam a necessidade da busca por novas alternativas de tratamento que sejam mais eficientes e que superem os mecanismos de resistência tumoral. A sinvastatina é um fármaco da classe das estatinas utilizado para o tratamento de dislipidemias. Atualmente, sabe-se que possui ação antitumoral, capaz de induzir apoptose, parada do ciclo celular e modular o processo de autofagia em diversas linhagens de tumores. A relação entre autofagia e apoptose é controversa, pois, a autofagia ora é tratada como mecanismo capaz de suprimir o desenvolvimento do tumor, ora capaz de promover o tumor fornecendo substratos da degradação de componentes celulares. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da sinvastatina na modulação da autofagia em células de melanoma metastático humano da linhagem WM9. Nossos resultados mostram que a sinvastatina é capaz de reduzir a viabilidade das células WM9 e WM1617 de forma dependente da concentração, atingindo 53,5 % e 90,3 % (pelo método de MTT) após tratamento das células com sinvastatina nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M, respectivamente. A redução de viabilidade foi acompanhada por aumento no índice autofágico em torno de 2,5 unidades para o tratamento na concentração de 5 μ M de sinvastatina e aumento da quantidade de células na fase G_0 - G_1 do ciclo celular de forma dependente da concentração. O co-tratamento de sinvastatina com o inibidor de autofagia hidroxyclorequina promoveu inibição efetiva do processo autofágico, com concomitante aumento da sensibilidade das células WM9 aos efeitos citotóxicos da sinvastatina, promovendo redução mais expressiva da viabilidade celular (atingindo 97% com a combinação sinvastatina/hidroxyclorequina, 5 μ M/25 μ M), acompanhada de aumento da quantidade de células com DNA fragmentado (atingindo 18,4% com a combinação). Para melhor compreender o mecanismo de ação da sinvastatina, foram avaliados dois marcadores chaves do processo autofágico: LC3-I/II e p62. Pode-se observar níveis aumentados da expressão de LC3-I/II proporcional ao aumento da concentração de sinvastatina e concomitante redução dos níveis de proteína p62. Quando o processo autofágico foi inibido pelo uso da hidroxyclorequina observou-se que a expressão de LC3-I/II foi diminuída e os níveis de p62 não foram alterados. Ainda, foi observado que o número de células WM9 com vacúolos fluorescentes (marcados com a proteína de fusão GFP-LC3) aumentam percentualmente com o aumento da concentração de sinvastatina utilizada nos tratamentos, fato que corrobora os resultados de expressão. Juntos, esses dados indicam que o tratamento das células WM9 com sinvastatina é capaz de induzir o processo autofágico de maneira concentração-dependente, sendo este um mecanismo de resistência tumoral em modelo de melanoma humano. Vale destacar que, independente do aumento no fluxo autofágico, a sinvastatina foi citotóxica, tornando interessante a possibilidade de ser utilizada como um agente terapêutico alternativo e/ou adjuvante ao uso de quimioterápicos.

Palavras-chave: Melanoma, sinvastatina, autofagia.

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer that has low incidence, but is very aggressive and with high mortality rate. One of the big challenges of the modern therapy is the occurrence of the resistance process. The tumor resistance mechanism is complex and usually happens because the tumor cells undergo mutations, amplifications or superexpressions by regulatory genes or by modulation of compensatory mechanisms that produces resistance. The tumor resistance condition increases the tolerance of tumor cells to the cytotoxic effects of the drug and/or activate survival signals in tumor cells. These facts emphasize the necessity to look for new and more effective treatment alternatives that overcome the resistance mechanisms of tumor cells. Simvastatin is a drug of the statin class used for the treatment of dyslipidemia. Currently, it's known that have antitumor activity, capable of inducing apoptosis, cell cycle arrest and modulate the process of autophagy in several tumor lines. The link between autophagy and apoptosis is controversial because, autophagy is sometimes treated as a mechanism able to suppress tumor development, sometimes able to promote tumor providing degradation substrates. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of simvastatin on the modulation of autophagy in human metastatic melanoma cells WM9 lineage. Our results demonstrate that simvastatin is able to reduce the viability of WM9 cell concentration dependent manner, reaching 53,5 % and 90,3 % (by MTT method) after treatment of cells with simvastatin at concentrations of 5 μ M and 1 μ M, respectively. The decrease in viability was followed by an increase in autophagic index of about 2.5 units for the treatment at a concentration of 5 μ M and simvastatin increased amount of cells in the G0-G1 phase of the cell cycle concentration dependent manner. The co-treatment of simvastatin with the inhibitor hydroxychloroquine promoted effectively inhibition of the autophagic process, with concomitant increased sensitivity of WM9 cells to the cytotoxic effects of simvastatin, promoting more significant reduction in cell viability (97 %, simvastatin 5 μ M/25 μ M hydroxychloroquine) accompanied by significant increase in the number of cells with fragmented DNA (18,4 % simvastatin/hydroxychloroquine 5 μ M/25 μ M). To further understand the mechanism of the action of simvastatin capable of inducing autophagy, were evaluated two key markers of the autophagic process. It can be observed increased levels of expression of LC3-I/II proportional to the concentration of simvastatin and concomitant reduction of p62 protein levels. When the autophagic process was inhibited by the use of hydroxychloroquine it was observed that the expression of LC3-I/II was reduced, and p62 levels were unchanged. Confirming the results of expression, it was observed that the number of WM9 cells with fluorescent vacuoles (marked with LC3-GFP protein fusion) percentage increase with increasing concentration of simvastatin used in the treatments. Together, these results indicates that the treatment of cells with simvastatin WM9 is capable of inducing the autophagic process in a concentration-dependent manner, which is a tumor resistance mechanism in human melanoma model. Note that independent of the increase in autophagic flux simvastatin was cytotoxic, making interesting possibility to be used as an alternative therapeutic agent and/or adjuvant to chemotherapy.

Key-Words: Melanoma, simvastatin, autophagy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação da localização dos melanócitos na epiderme e sua interação com os queratinócitos.....	17
FIGURA 2 - Estágios da progressão do melanoma.....	18
FIGURA 3 - Comparação entre melanomas e <i>nevus</i> benignos.....	19
FIGURA 4 - Etapas da autofagia.....	22
FIGURA 5 - Participação dos ATG's na autofagia.....	23
FIGURA 6 - Ação das estatinas na via do mevalonato.....	27
FIGURA 7 - Estrutura química da sinvastatina.....	28
FIGURA 8 - Efeitos antitumorais propostos dos inibidores da HMG-CoA redutase.....	30
FIGURA 9-A - Efeito do tratamento com sinvastatina na viabilidade celular por MTT.....	43
FIGURA 9-B - Efeito do tratamento com sinvastatina na viabilidade celular por cristal violeta	43
FIGURA 9-C - Efeito do tratamento com sinvastatina na viabilidade celular por vermelho neutro.....	44
FIGURA 9-D - Efeito do tratamento com sinvastatina na viabilidade celular por MTT na linhagem WM1617.....	45
FIGURA 9-E - Efeito do tratamento com sinvastatina na viabilidade celular por cristal violeta na linhagem WM1617.....	45
FIGURA 9-F - Efeito do tratamento com sinvastatina na viabilidade celular por vermelho neutro na linhagem WM1617.....	46
FIGURA 10-A – Unidades Arbitrárias Autofágicas.....	48
FIGURA 10-B – Unidades Arbitrárias Autofágicas da linhagem WM1617.....	48
FIGURA 11-A - Distribuição das células através das fases do ciclo celular após 72h de tratamento com sinvastatina.....	49
FIGURA 11-B - Distribuição das células através das fases do ciclo celular após 72h de tratamento com sinvastatina da linhagem WM1617.....	50
FIGURA 11-C - Porcentagem de células com DNA fragmentado.....	51
FIGURA 11-D - Porcentagem de células com DNA fragmentado da linhagem WM1617.....	51

FIGURA 12-A - Viabilidade celular após tratamento com sinvastatina em combinação com a Hidroxicloroquina pelo método de MTT.....	53
FIGURA 12-B - Viabilidade celular após tratamento com sinvastatina em combinação com a Hidroxicloroquina pelo método de cristal violeta.....	54
FIGURA 12-C - Viabilidade celular após tratamento com sinvastatina em combinação com a Hidroxicloroquina pelo método de vermelho neutro.....	55
FIGURA 12-D – Distribuição das células através das fases do ciclo celular após 72h de tratamento com sinvastatina em combinação com hidroxicloroquina....	56
FIGURA 12-E - Efeito da hidroxicloroquina na porcentagem de DNA fragmentado.....	57
FIGURA 13-A - Imagem representativa de células WM9 coradas com laranja de acridina.....	59
FIGURA 13-B - Imagem representativa das células marcadas com GFP-LC3.....	60
FIGURA 13-C - Gráfico representativo da contagem de células marcadas com GFP-LC3.....	61
FIGURA 14-A - Expressão de LC3-I/II e p62 após tratamento com sinvastatina em células da linhagem WM9.....	63
FIGURA 14-B - Expressão de LC3-I/II e p62 após tratamento com sinvastatina combinada com cloroquina em células da linhagem WM9.....	63
FIGURA 15 - Proposta do mecanismo de ação da sinvastatina em células de melanoma humano metastático.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AAU – Índice autofágico
ACS – American Cancer Society
ANOVA – Análise de variância
ATG – Genes relacionados à autofagia
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP-LC3 – Proteína verde fluorescente acoplada a LC3
HBSS – solução Salina balanceada de Hanks
HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
INCA – Instituto Nacional de Câncer
MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno
mTOR – Mammalian target of rapamycin
MTT - brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5difeniltetrazólio
PBS – solução salina tamponada
PI – Iodeto de propídeo
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila
PVDF – fluoreto de polivinilideno
RGP – Fase de crescimento radial
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SDS-PAGE – poliacrilamida gel de eletroforese
SFB – Soro fetal bovino
ULK-1 – serina/threonina-proteínaquinase1
UV – Ultravioleta
UVA – Radiação ultravioleta A
UVB – Radiação ultravioleta B
UVC – Radiação ultravioleta C
VGP – Fase de crescimento vertical

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Melanoma.....	17
2.2 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de melanoma.....	18
2.3 Melanogênese e Progressão Tumoral.....	19
2.4 Terapias antitumorais para melanoma.....	22
2.5 Processos celulares envolvidos na resistência tumoral.....	23
2.6 Papel da autofagia na oncogênese e terapia antitumoral.....	23
2.7 Modulação da autofagia por quimioterápicos.....	27
2.8 Estatinas.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	36
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
6.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR.....	37
6.1.1 Esterilização e manejo de materiais e células.....	37
6.1.2 Soluções e meios de cultura.....	37
6.1.3 Avaliação da viabilidade celular.....	38
6.1.4 Determinação do Índice Autofágico – AAU.....	40
6.1.5 Ensaio de ciclo celular.....	40
6.1.6 Avaliação da autofagia.....	41
6.1.6.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA.....	41
6.1.6.3 Análise estatística.....	43
7. Resultados.....	44
7.1 Efeito da sinvastatina na viabilidade celular.....	44
7.2 Índice Autofágico – AAU.....	49
7.3 Análise da Progressão do Ciclo Celular.....	51
7.4 Dependência do processo autofágico para ação antitumoral da sinvastatina – Efeito do co-tratamento com hidroxycloquina.....	54
7.4.1 Efeito na viabilidade celular após tratamento combinado de sinvastatina e hidroxycloquina.....	54

7.4.2 Efeito do tratamento combinado de sinvastatina e hidroxicloroquina na progressão do ciclo celular	57
7.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE AUTOFAGIA.....	59
7.5.1 Avaliação do processo autofágico utilizando Laranja de Acridina	60
7.5.2 Microscopia confocal de fluorescência	61
7.5.3 Avaliação da expressão de proteínas de autofagia.....	64
8. DISCUSSÃO.....	67
9. CONCLUSÕES.....	74
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de neoplasia de pele que possui baixa incidência, porém, é extremamente agressivo e com alto índice de mortalidade, pois na maioria dos casos evolui para metástase (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007; AMERICAN CANCER SOCIETY- ACS, 2009). É o tipo de câncer mais comum em indivíduos jovens de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Foi estimada no ano de 2014, a ocorrência de pelo menos 2.960 casos de melanoma em homens e 2.930 em mulheres no Brasil, sendo estes casos mais prevalentes na região sul e sudeste. Já a estimativa realizada pela American Cancer Society, no ano de 2015 previu mais de 73.000 novos casos de melanoma nos Estados Unidos, e desses, 9.940 podendo evoluir para óbito. O melanoma humano é caracterizado pelo modelo de progressão de Clark, que determina as fases do tumor de acordo com as mudanças histológicas nos melanócitos após sua transformação, desde as fases benignas (*nevus* benigno e *nevus* displásico) até as fases malignas (fases de crescimento radial, RGP; vertical, VGP e fase metastática) (MILLER e MIHM, 2006; CLARK *et al.*, 1984).

O melanoma metastático é mais resistente às terapias convencionais e possui um mau prognóstico, tem um baixo índice de sobrevida e o tratamento não promove a cura dos pacientes (GARBE *et al.*, 2010).

Sabe-se que os melanomas são altamente resistentes às terapias clássicas e que alguns processos celulares, como a autofagia, têm sido relacionados com a resistência tumoral e a ocorrência de morte celular por apoptose (MARQUEZ-RODAS *et al.*, 2001; VERMA *et al.*, 2006).

Diversas pesquisas mostram que o processo autofágico pode apresentar papel controverso em relação à tumorigênese (DAVIDS *et al.*, 2009; WHITE, 2012; GIULIANI e DASS, 2013). Tem sido descrito que a autofagia pode prevenir a formação do tumor ao degradar componentes celulares e organelas danificadas; porém, as células tumorais podem utilizar esse mecanismo para promover a sua sobrevivência e proliferação, utilizando os produtos da degradação como fonte de energia (GIULIANI e DASS, 2013; MAES e AGOSTINIS, 2014).

Recentes estudos mostram que a sinvastatina é capaz de induzir morte celular por apoptose e parada do ciclo celular em linhagens tumorais, como

linfomas e mielomas (ACOSTA e GIL, 2012). Em células de melanoma humano tratadas com sinvastatina verificou-se a redução da viabilidade celular, seguido de alterações morfológicas, alteração da progressão do ciclo celular, indução de apoptose e senescência (GUTERRES *et al.*, 2013).

Diante dos fatos apresentados que mostram a elevada resistência do melanoma metastático às terapias convencionais, a descrição da ação antitumoral da sinvastatina em diversos modelos tumorais e o fato de que a autofagia tem sido relacionada com o fenótipo de resistência, o propósito deste trabalho foi investigar a atividade antitumoral da sinvastatina em células de melanoma metastático humano e determinar se este fármaco é capaz de modular o processo autofágico. Como modelo de estudo foi utilizada a linhagem de melanoma metastático humano WM9.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer de pele de baixa incidência, 2-4%, comparado aos demais tipos de câncer de pele, porém muito agressivo, aproximadamente 90% dos casos de melanoma metastático evolui para óbito (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Contudo, se for diagnosticado precocemente as chances de cura do paciente são superiores a 95% (SATYAMOORTHY e HERLYN, 2001).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima para o ano de 2016, a incidência de cerca de 3.000 novos casos de melanoma no Brasil. As principais regiões de incidência são a região sul e sudeste do país (INCA, 2016).

Os melanomas têm origem nos melanócitos, células dendríticas que produzem o pigmento melanina e estão localizadas próximas à lâmina basal da epiderme, também sendo encontrados no intestino, cabelos, nos olhos e no sistema nervoso central (PLONKA *et al.*, 2009; CICHOREK *et al.*, 2013; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). A melanina é produzida e transportada dos melanócitos aos queratinócitos, permitindo a proteção da pele contra danos da radiação ultravioleta (UV). Normalmente existe um melanócito para cada 5 a 8 queratinócitos na epiderme, isso compõe uma unidade de “pigmentação” (Figura 1) (CICHOREK *et al.*, 2013; MEYLE e GULDBERG, 2009).

A proliferação dos melanócitos é regulada pelos queratinócitos, e quando há perda do controle dessa proliferação pode ocorrer o surgimento do melanoma (MEYLE e GULDBERG, 2009).

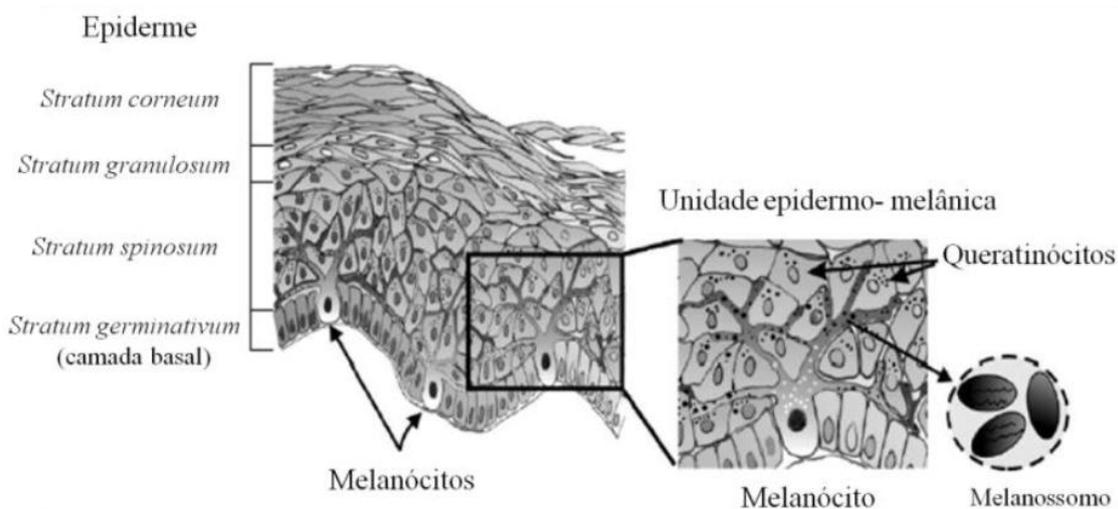


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DOS MELANÓCITOS NA EPIDERME E SUA INTERAÇÃO COM OS QUERATINÓCITOS
 FONTE: Adaptado de Cichorek *et al.* (2013).

2.2 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de melanoma

A presença e o número de pintas ou *nevus* displásicos é um dos principais fatores fenotípicos relacionados ao surgimento do melanoma (GANDINI *et al.*, 2005).

Além dos *nevus*, a exposição à radiação UV também tem relação com o aparecimento do melanoma (GARIBYAN e FISHER, 2010). Essa radiação UV faz parte do espectro da luz do sol e pode ser subdividida em UVA (320- 400 nm), UVB (280- 320 nm) e UVC (200- 280 nm). A radiação UV tem muitos efeitos sobre a pele, como a indução de mudanças genéticas, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações no sistema imune e produção de fatores de crescimento (LO e FISHER, 2014).

Histórico familiar de melanoma ou tumores prévios também é considerado fator de risco associado a essa doença (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005; MILLER e MIHM, 2006).

A cor da pele é outro fator importante, já que indivíduos de pele clara são mais suscetíveis ao desenvolvimento de displasias e lesões melanocíticas do que indivíduos de pele escura (GANDINI *et al.*, 2005; BERWICK *et al.*, 2009), devido os melanócitos produzirem dois tipos principais de melanina, eumelanina e feomelanina. A eumelanina é mais abundante em indivíduos de pele escura, é capaz de absorver a radiação UV prejudicial e dissipar a energia

em forma de calor, impedindo que ocorra danos no DNA. Já a feomelanina mais abundante em pessoas de pele clara e não possui essa propriedade da eumelanina, além de estar relacionada com a produção de ROS (GARIBYAN e FISHER, 2010).

2.3 Melanogênese e Progressão Tumoral

O modelo utilizado para explicar a progressão do melanoma foi proposto por Clark *et al.* (1984). De acordo com esse modelo, os melanócitos passam por algumas etapas de progressão até o surgimento do melanoma (Figura 2).

Na primeira etapa da progressão ocorre uma hiperproliferação de melanócitos normais, que podem entrar em processo de senescência, formando o *nevus* (pinta) benigno. A segunda etapa começa quando o *nevus* benigno cresce ou quando surge uma nova lesão e passa a se chamar *nevus* displásico. A fase de crescimento radial (RGP) é quando a lesão se torna maligna. Nela, as células proliferam por toda a epiderme e a diferenciação dos melanócitos é menor. Na fase de crescimento vertical (VGP), as células tumorais têm capacidade de penetrar a membrana basal e atingir a derme, formando nódulos. A etapa final é a metástase, quando as células tumorais crescem em tecidos mais profundos da pele, atingem o sistema circulatório e colonizam tecidos distantes do tecido que originou o tumor (MILLER e MIHM, 2006; CLARK *et al.*, 1984).

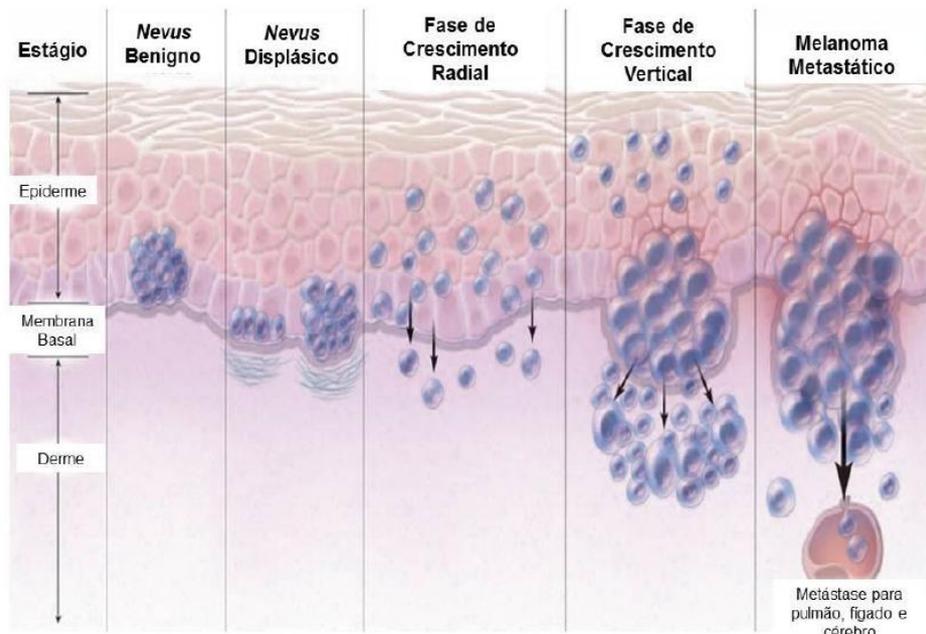


FIGURA 2 – ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO MELANOMA

FONTE: Adaptado de Miller e Mihm (2006).

NOTA: De acordo com o modelo de Clark *et al.* (1984), os estágios da progressão do melanoma são determinados a partir das transformações histológicas. A fase inicial é a menos agressiva, quando há aumento significativo de melanócitos (*nevus* benigno). Se a lesão progredir, leva a perda da homeostase no tecido onde se encontra (*nevus* displásico). O primeiro estágio de malignidade ocorre na fase de crescimento radial (RGP), que progride para a fase de crescimento vertical (VGP). A última etapa é a metástase, quando as células do tumor passam a colonizar tecidos distantes do local de origem do tumor.

A simples observação de *nevus* é importante para detecção de lesões suspeitas de malignidade, permitindo um diagnóstico precoce. Com o autoexame, a chance de cura do melanoma é aumentada já que na maioria das vezes a detecção precoce gera um bom prognóstico para o paciente. Para isso, pode-se fazer uma avaliação simples com o intuito de identificar qualquer pigmentação que possa ser suspeita seguindo a regra do ABCDE: A- assimetria; B- bordas irregulares; C- coloração diferenciada; D- diâmetro maior que 6 mm; E- evolução (RIGEL; RUSSAK; FRIEDMAN, 2010; TRONNIER *et al.*, 2013). A Figura 3 mostra uma comparação entre *nevus* benignos e o melanoma, exibindo as características ABCDE.

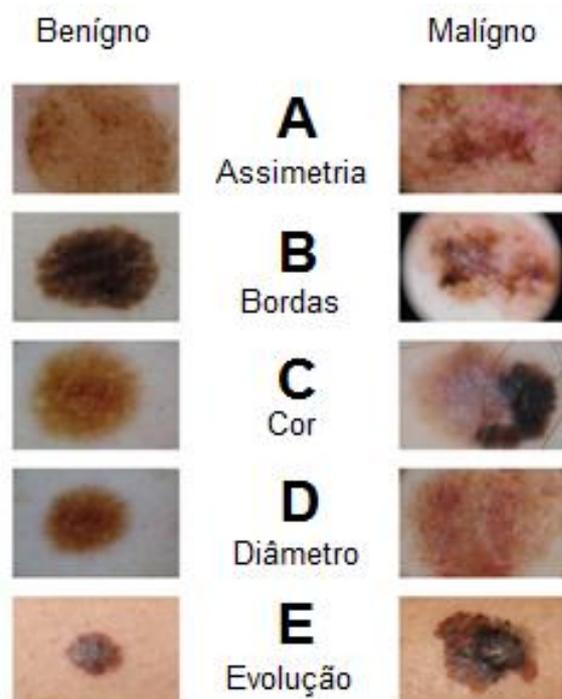


FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE *NEVUS* BENIGNOS E MELANOMAS

FONTE: <marbellahighcare.com/en/abcde-melanoma/> (2015).

NOTA: A figura mostra a comparação entre a morfologia das manchas características de melanoma e os nevos benignos, apresentando, o primeiro, morfologia ABCDE: A- assimetria; B- bordas irregulares; C- mais de uma coloração; D- dimensões maiores que 6 mm; E- evolução.

Nos casos em que há suspeita de melanoma, a confirmação do diagnóstico pode ser realizada através de microscopia epiluminescente, dermoscopia digital, análise histopatológica ou imunohistoquímica utilizando marcadores específicos para melanoma, como Melan-A, Mart e HMB-45 (TRONNIER *et al.*, 2013).

Pacientes com melanoma metastático possuem uma média de sobrevida que varia de 6 a 10 meses, e são poucos os que têm uma boa resposta às terapias sistêmicas (SOSMAN *et al.*, 2012).

No ano de 2002, pesquisadores descobriram que ocorrem mutações no gene que codifica a proteína quinase serina-treonina B-RAF (BRAF) em mais de 60% dos casos de melanoma. Nesses casos em que há a mutação em BRAF, ocorre a ativação da via da proteína quinase MAPK, levando a proliferação das células tumorais e evitando que haja morte por apoptose (LI *et al.*, 2016). Esse dado é interessante visto que a ocorrência da mutação em BRAF pode estar relacionada com a resistência tumoral em células de melanoma humano em diversas linhagens, como a WM9.

2.4 Terapias antitumorais para melanoma

Atualmente sabe-se que o melanoma metastático possui um prognóstico ruim, pois é mais resistente às terapias convencionais quando comparado com tumores em fase inicial, devido a sua resistência a apoptose e habilidade angiogênica (MARQUEZ- RODAS *et al.*, 2011). Quando diagnosticados precocemente, os tumores podem ser eliminados por procedimentos cirúrgicos, sem a necessidade do uso de quimioterápicos (TRONNIER *et al.*, 2013; MILLER e MIHM, 2006; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

Os quimioterápicos de escolha para o tratamento de melanomas em fase inicial, onde são utilizados como complementos à cirurgia, são dacarbazina, carboplatina, paclitaxel, temozolomida e fotemustina (THOMPSON; SCOLYER; KEFFORD, 2005). Alguns quimioterápicos que atuam nos genes BRAF, como o vemurafenib, apresentam maior eficiência e menos efeitos colaterais quando comparados às terapias convencionais (LO e FISHER, 2014). Já nos casos de metástase também são utilizadas citocinas, como interleucina-2 e interferon- α (usados como terapia passiva, os anticorpos antitumorais ou células mononucleares exógenas são administradas para promover maior capacidade imunológica de combate à doença), pois os fármacos utilizados no tratamento inicial são efetivos em menos de 10% dos casos metastáticos (TARHINI e AGARWALA, 2006; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007, RUSSO *et al.*, 2009).

O uso dos quimioterápicos convencionais e da radioterapia provocam efeitos colaterais como, queda de cabelo, náuseas, deficiência imunológica, entre outros. Em virtude do desenvolvimento de efeitos colaterais e das limitações dos tratamentos convencionais, torna-se necessária à busca por novas alternativas de tratamentos, bem como a modulação de alvos moleculares envolvidos na progressão tumoral e que promovam morte celular ou parada de proliferação (SMALLEY, 2010).

2.5 Processos celulares envolvidos na resistência tumoral

A principal meta das terapias convencionais contra o câncer é a indução de morte celular por apoptose, porém um dos grandes obstáculos à terapêutica é o surgimento do processo de resistência tumoral. O mecanismo de resistência tumoral é complexo e em geral acontece ou porque as células tumorais sofrem mutações, ampliações ou superexpressões de genes que codificam para reguladores de vias de sinalização intracelular, ou por modulação de mecanismos compensatórios que aumentam a tolerância das células tumorais aos efeitos citotóxicos do fármaco e/ou ativam sinais de sobrevivência nas células tumorais. Ainda, alterações no microambiente tumoral (dependentes, por exemplo, de: vascularização do tumor, níveis de oxigenação, presença de necrose tecidual, presença de células do sistema imune, características do infiltrado inflamatório) contribuem significativamente para a falha da terapia com quimioterápicos e para a resistência tumoral (COSSE e MICHIELS, 2008; ONUCHI e CHAMMAS, 2010; ROHWER e CRAMER, 2011).

Entre os agentes que podem aumentar a sensibilidade de células tumorais aos agentes quimioterápicos encontram-se os moduladores de autofagia.

2.6 Papel da autofagia na oncogênese e terapia antitumoral

A autofagia é um processo de degradação celular que sequestra elementos presentes no citoplasma (como proteínas mal formadas, fragmentos celulares e organelas danificadas) em um autofagossomo de membrana dupla. Após isso, o autofagossomo liga-se ao lisossomo, forma o autolisossomo e este realiza a degradação dos produtos captados. A figura 4 ilustra esse processo (FENG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2013; DEL BELLO *et al.*, 2013; TURCOTTE e GIACCIA, 2010).

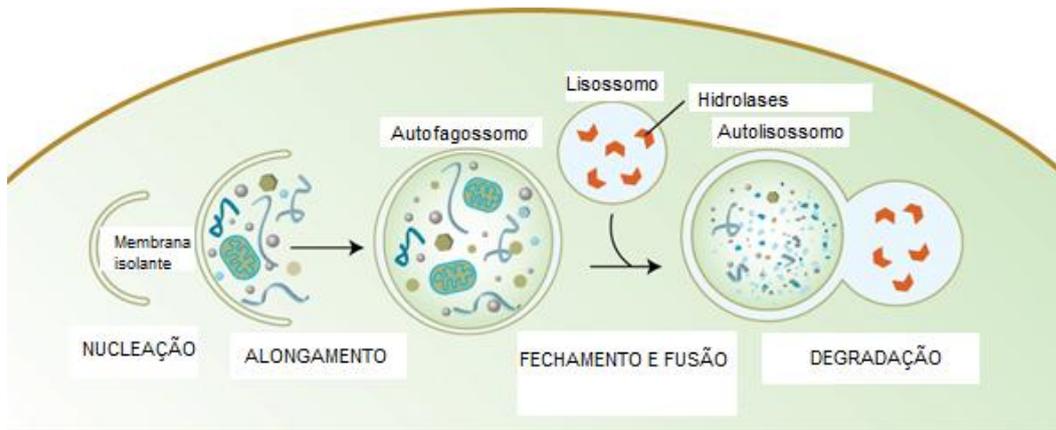


FIGURA 4 – ETAPAS DA AUTOFAGIA
 Copyright: ©2009 Alicia Melendéz e Beth Levine.
 FONTE: Melendéz e Levine, 2009.

As fases da autofagia são mediadas por genes conhecidos como Autophagy-related genes (Atgs). O início da autofagia envolve principalmente três Atgs, sendo Atg6 (Beclin-1), Atg5 e Atg12. Para formar o autofagossomo, o Atg12 é conjugado ao Atg5 e encaminhado para a membrana do autofagossomo e essa conjugação é mediada por Atg7 e Atg10 (KIMMELMAN *et al.*, 2011; ROSENFELDT e RYAN, 2011).

O Atg mais importante na etapa do sequestro e formação do autofagossomo é o Atg8 (amplamente conhecido como LC3), pois ao sofrer lipidação por Atg7, é acoplado à membrana do autofagossomo que está sendo formado e passa a ser LC3-II (revisado por FILIPPI-CHIELA, 2011). Essa proteína LC3-II é utilizada como marcador principal para verificação da ocorrência do processo autofágico (KLIONSKY *et al.*, 2012) (Figura 5).

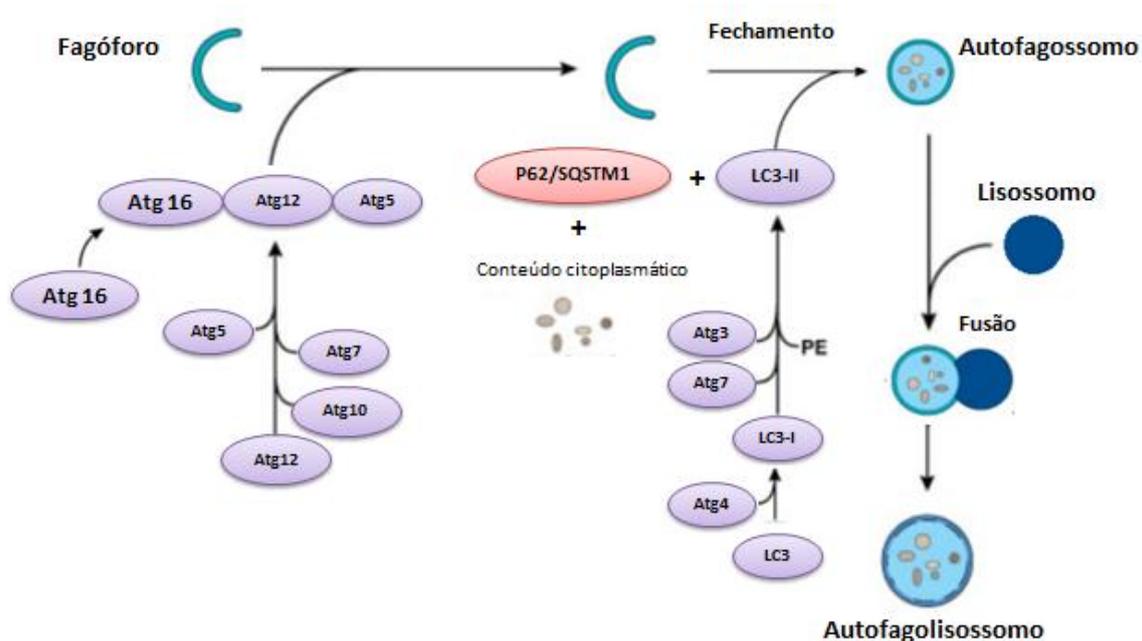


FIGURA 5 – PARTICIPAÇÃO DOS ATGs NA AUTOFAGIA
 FONTE: O autor, adaptado de CHIELA, 2011.

O processo autofágico é induzido por diversos fatores, como: privação de nutrientes, estresse metabólico, infecção por patógenos, condições de hipóxia, na eliminação de proteínas danificadas e adaptação ao estresse (KIMMELMAN, 2011; SOENGAS, 2012).

A autofagia é modulada também por vias de sinalização que atuam por meio da proteína mTOR, importante inibidora desse processo. Em situações de abundância de nutrientes, mTOR complexa com as proteínas ULK1, Atg13, FIP200 e Atg101. Quando há a formação do complexo, a autofagia é inibida enquanto em situações de privação de nutrientes e aminoácidos na célula ou na presença de inibidores de mTOR, a autofagia é estimulada para que se possa manter a homeostase celular (KAZA *et al.*, 2012).

As proteínas Beclin-1, p150 e Vps34 também são importantes no processo de autofagia, pois participam da etapa de alongamento e fechamento do fagóforo. O complexo formado por essas proteínas reúne outras proteínas Atgs necessárias nessa etapa (SOENGAS, 2012).

Dependendo de quais forem as proteínas ligantes em Beclin-1 nesse processo, pode-se iniciar a autofagia (se Beclin-1 for ligado a AMBRA1, UVRAG ou Atg14) ou então promover a inibição do processo (caso Beclin-1 se ligue às proteínas Bcl-2 ou RUBICON) (SOENGAS, 2012).

A proteína p62, também chamada de sequestosomo1 (SQSTM1) é considerada um marcador importante do processo autofágico visto que se liga diretamente em LC3-II facilitando a degradação de agregados proteicos (permite que ocorra autofagia seletiva ao marcar estruturas a serem degradadas no autofagossomo). Sob condições de estresse metabólico, há acúmulo de estruturas danificadas nas células e aumenta a expressão de p62/SQSTM1, que marcam essas organelas e proteínas antes de serem degradadas no autofagossomo (PANKIV *et al.*, 2007).

O processo autofágico ocorre em níveis basais, suficiente para manter a homeostase e o controle de qualidade citoplasmático, além de ser induzido em estados como privação de nutrientes e estresse oxidativo (KLIONSKY e CODOGNO, 2013).

Na literatura, a autofagia apresenta um papel controverso no processo de tumorigênese, o que a torna uma interessante abordagem na pesquisa contra o câncer. Sabe-se que o processo autofágico tem função supressora de tumores ao eliminar organelas danificadas, evitando o acúmulo de produtos tóxicos que podem causar a instabilidade do genoma. Por exemplo, de acordo com Qu *et al.* (2003), o silenciamento de Beclin-1 aumentou a tumorigênese em ratos, causando câncer de pulmão, fígado e linfoma. Nesse caso, o processo autofágico atuou como supressor tumoral porque manteve a integridade celular sobre condições de estresse (a homeostase evitou possíveis danos causados por moléculas ou organelas danificadas). Por outro lado, em alguns casos autofagia promove a sobrevivência de células tumorais mesmo com baixa disponibilidade de nutrientes e protege o tumor contra a apoptose induzida por terapia (BRECH *et al.*, 2009; GIULIANI e DASS, 2013). Além disso, a autofagia promove à célula tumoral mecanismos de resistência à ação de quimioterápicos convencionais (MATHEW; KARANTZA-WADSWORTH; WHITE, 2007; DAVIDS *et al.*, 2009; GIULIANI e DASS, 2013; MAES *et al.*, 2013).

Sabe-se que há esse papel controverso da autofagia em diversos tipos de tumores, inclusive nos casos de melanoma. Em relação aos ATG's, por exemplo, o ATG5 e LC3-I/II são geralmente menos expressos em melanomas primários quando comparados a *nevus* benignos (SAITO *et al.*, 2015). Nesse caso, a indução de autofagia no *nevus* benigno pode contribuir para a

ocorrência de senescência e controlar a proliferação de melanócitos (LIU *et al.*, 2013). Já a proteína Beclin-1 regula uma das primeiras etapas do processo autofágico. A primeira relação feita entre Beclin-1 e a tumorigênese foi quando se observou que ratos que tiveram a expressão de Beclin-1 suprimida, desenvolveram tumores espontâneos, mostrando então o papel supressor tumoral da autofagia caso o processo estivesse acontecendo normalmente. A identificação de que Beclin-1 se liga diretamente a membros da família Bcl-2 foi a primeira correlação entre apoptose e autofagia (ELGENDY e MINUCCI, 2015).

A autofagia tem um papel essencial para manter a homeostase das células tumorais em situações de estresse oxidativo. Além disso, no melanoma metastático tanto autofagia como esse tipo de estresse são extremamente elevados (MA *et al.*, 2014). Quando o processo autofágico natural ultrapassa um determinado limiar pode levar ao que se chama de morte autofágica ou morte celular programada tipo II (mecanismo de ação sugerido para alguns quimioterápicos e fármacos utilizados na clínica, como a temozolomida, por exemplo) (FILLIPI-CHIELA, 2011).

2.7 Modulação da autofagia por quimioterápicos

Existem evidências claras na literatura que muitos quimioterápicos como doxorubicina, cisplatina, etoposídeo e temozolomida, que induzem dano ao DNA e promovem autofagia como mecanismo citoprotetor (XU *et al.*, 2012; KATAYAMA *et al.*, 2007; KANZAWA *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2011). O racional para se combinar quimioterápicos que danificam o DNA com inibidores de autofagia é que o primeiro induz um fluxo autofágico intenso e o segundo impede o conteúdo autofágico de ser degradado, levando a um acúmulo de vacúolos autofágicos ineficazes ou tóxicos, o que levaria a célula à morte. Estudos pré-clínicos sugerem que a inibição da autofagia estaria associada com um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, promoveria danos ao DNA e ativação de apoptose (revisado por RANGWALA *et al.*, 2014).

Em modelo de melanoma humano, Del Bello *et al.* (2013) mostraram que em algumas linhagens celulares a cisplatina inibiu a autofagia e induziu apoptose. Também foi observado que quando a autofagia foi induzida por fatores exógenos, as células de melanoma não morreram mesmo com tratamento com cisplatina. Sendo assim, pode-se dizer que a autofagia teve um efeito pró-tumoral.

De fato, um estudo clínico de fase I em pacientes com tumores sólidos em estágio avançado e melanoma mostrou que a combinação de altas doses do inibidor de autofagia, hidroxicloroquina, com o quimioterápico temozolomida prolongou o tempo de estabilidade da doença (período em que não há evolução do tumor ou ocorrência de metástase), sugerindo um potencial dessa combinação em protocolos clínicos futuros como adjuvante (RANGWALA *et al.*, 2014).

Goodall *et al.* (2014) mostraram que o uso do inibidor de autofagia VATG-027 sensibilizou células de melanoma humano, com o oncogêne mutante BRAF^{V600E} (característico desse tipo de tumor), à ação do quimioterápico vemurafenib, promovendo a diminuição da viabilidade celular e o aumento de morte celular por apoptose.

Em outro estudo, células de melanoma com a mutação em BRAF foram tratadas com o inibidor vemurafenib e observou-se a indução de autofagia. Isso sugere, mais uma vez, o envolvimento do processo autofágico na melanogênese e na resistência a quimioterápicos convencionais (SAITO *et al.*, 2015).

De acordo com esse cenário a respeito do envolvimento da autofagia no mecanismo de resistência tumoral, almeja-se com o presente trabalho estudar o processo autofágico em linhagens de melanoma metastático humano, visto a importância dessa via para que ocorra a morte das células de melanoma induzida por terapia.

2.8 Estatinas

As estatinas são um grupo de fármacos antilipêmicos e atuam inibindo a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase).

Essa enzima converte de forma irreversível a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato, que é a etapa limitante para a síntese do colesterol (Figura 6) (SCHACHTER, 2005; BARREIRO e FRAGA, 2008). Ainda, por inibir a formação de derivados isoprenóides, as estatinas são capazes de modular processos de sinalização celular relacionados à prenilação de proteínas (como Ras e Rho), podendo influenciar no crescimento, diferenciação e sobrevivência das células (Figura 6) (SAITO *et al.*, 2008).

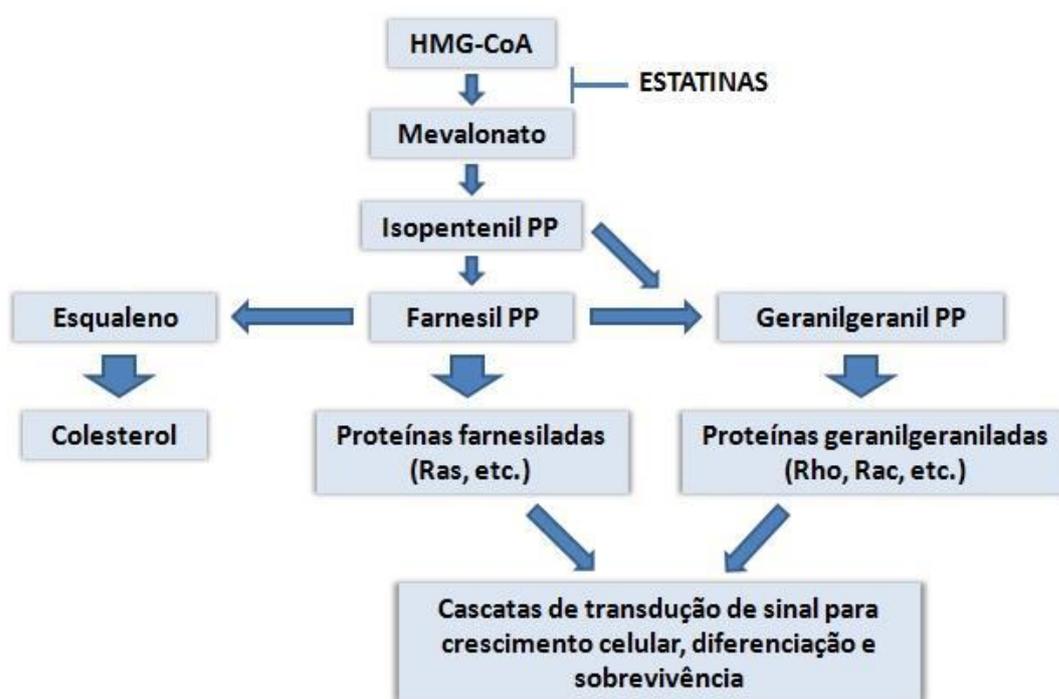


FIGURA 6 – AÇÃO DAS ESTATINAS NA VIA DO MEVALONATO

FONTE: SAITO *et al.*, 2008.

NOTA: Ação das estatinas na cascata do mevalonato, inibindo a biossíntese de colesterol, a formação de derivados isoprenóides e os processos de sinalização relacionados à prenilação de proteínas como Ras e Rho.

Além do efeito antilipêmico, estudos de Demierre e Sondak (2005) comprovaram que o uso de estatinas na profilaxia de doenças cardíacas diminuiu a incidência de melanoma (e outros tipos de câncer) nos pacientes que fizeram uso desse grupo de fármacos. Em outro estudo, observou-se que pacientes diagnosticados com câncer, entre 1995 e 2007, que fizeram uso de estatinas para outros problemas de saúde tiveram uma diminuição na taxa de mortalidade em cerca de 15% (NIELSEN *et al.*, 2012). Também foi comprovado que o uso de estatinas teve um efeito na progressão de tumores de pele e diminuiu significativamente a densidade de Breslow - medida do volume tumoral

que relaciona com o prognóstico do paciente, quanto maior essa densidade, pior o prognóstico (BRESLOW, 1970).

Nos últimos anos, o mecanismo de ação antitumoral das estatinas tem sido investigado (OSMAK, 2012). Alguns estudos comprovam que as estatinas podem promover morte celular por apoptose (COSSE e MICHIELS, 2008), modulação do microambiente tumoral (CHAE *et al.*, 2015), alteração na progressão do ciclo celular (ACOSTA e GIL, 2012) e diminuição da invasão de alguns tipos de tumores (JIANG *et al.*, 2014).

Um dos primeiros fármacos isolado do grupo das estatinas foi a lovastatina (mevilonina). Já a sinvastatina é um derivado semi-sintético 2'-metilado da lovastatina (Figura 7) e foi aprovada para uso terapêutico nos Estados Unidos em 1992 com o nome comercial Zocor[®] (BARREIRO e FRAGA, 2008). A sinvastatina está entre os 10 medicamentos mais vendidos no mundo para o tratamento de hipercolesterolemia visto que a incidência dessa doença na população em geral tem aumentado ao longo dos anos (KING, 2013).

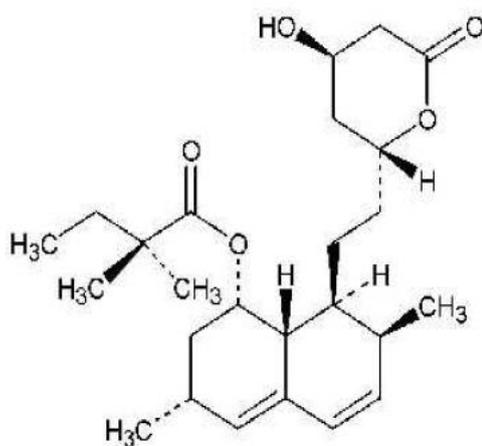


FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SINVASTATINA
FONTE: SAITO *et al.*, 2008

Especificamente em relação à sinvastatina, estudos *in vitro* demonstraram que este composto possui ação antitumoral em diversos modelos celulares, como gliomas (WU *et al.*, 2009), câncer de mama (AHERN *et al.*, 2014), câncer pulmão (YEGANEH *et al.*, 2014), câncer colorretal (LOCHHEAD e CHAN, 2013). Em modelo de melanoma, utilizando a linhagem A375M, as células foram tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina e observou-se a diminuição da viabilidade celular, seguido de alterações morfológicas, alteração

na progressão do ciclo celular e aumento da expressão das proteínas p21 e p27 (SAITO *et al.*, 2008). Ainda, ensaios de Glynn *et al.* (2008) avaliaram o efeito de algumas estatinas (lovastatina, mevastatina e sinvastatina) em diferentes linhagens de melanoma humano, sendo a sinvastatina a estatina mais eficaz ao inibir a proliferação celular, pois foi utilizada na concentração de 1,2 μM e promoveu maior diminuição de proliferação, enquanto as demais estatinas do estudo foram testadas na concentração de 3,0 μM .

Com base nesses dados, tem-se investido no uso das estatinas como adjuvantes aos tratamentos com quimioterápicos devido ao desenvolvimento de efeitos sinérgicos e até mesmo aditivos à terapia convencional (LEE *et al.*, 2009; STOEHR *et al.*, 2014).

Sabe-se que o principal efeito antitumoral das estatinas é promoção da morte celular por apoptose, porém, esta ocorre com concentrações mais altas desses fármacos (1 a 60 μM). Entretanto, ao serem usados para o controle da hipercolesterolemia, esses fármacos são administrados na ordem de concentrações de nanomolar. Esses dados evidenciam a importância do estudo dos possíveis efeitos antitumorais ao administrar doses mais baixas de estatinas (WU *et al.*, 2009; SOLOMON e FREEMAN, 2008; RANG *et al.*, 2008).

Recentemente, a ação antitumoral de diferentes estatinas tem sido relacionada com a capacidade de modulação do processo autofágico em diferentes modelos celulares (JIANG *et al.*, 2014), porém ainda não são descritos em modelo de melanoma (Figura 8).

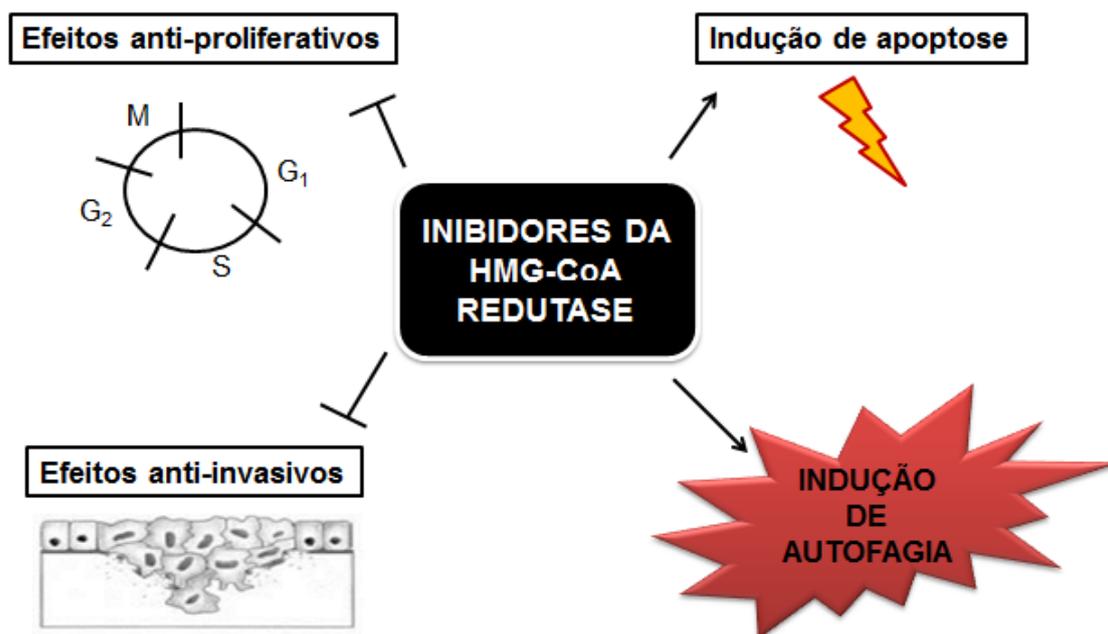


FIGURA 8 – EFEITOS ANTITUMORAIS PROPOSTOS DOS INIBIDORES DA HMG-CoA REDUTASE

FONTE: O autor, 2016.

NOTA: Demonstração esquemática ilustrativa dos efeitos anti-proliferativos, anti-invasivos, da indução de apoptose e indução de autofagia mediados pelas estatinas.

O melhor entendimento dos mecanismos de ação da sinvastatina nos processos celulares que interferem na baixa eficácia das terapias convencionais (dentre eles, a autofagia) torna-se relevante para a obtenção de uma terapia alternativa e adjuvante permitindo maior sobrevida aos pacientes com melanoma.

Pesquisas recentes no nosso grupo comprovaram que uso da sinvastatina, em baixas concentrações, foi capaz de promover ação anti-proliferativa em células de melanoma metastático humano e apresentou efeito diferenciado dependendo da concentração utilizada. O tratamento na concentração de 0,25 μM promoveu senescência nas células de melanoma metastático humano enquanto o tratamento das células com sinvastatina na concentração de 1 μM foi capaz de promover senescência e também apoptose (GUTERRES, 2013). Quando a senescência é induzida por terapias, como nesse caso, pode atuar como um fator adjuvante no tratamento dos tumores, pois leva a parada de proliferação celular (EWALD *et al.*, 2010). Esse dado corrobora com estudos da literatura que evidenciam a necessidade do uso de

concentrações mais elevadas de estatinas para que ocorra morte celular por apoptose.

Nesse contexto, torna-se importante a avaliação do processo de autofagia mediado por sinvastatina para que se possa avaliar a possível modulação desse processo e correlacionar com uma maior incidência de morte por apoptose ou de senescência celular nas células de melanoma humano.

A resposta a estas questões pode ajudar a elucidar a relação entre senescência, autofagia e apoptose de células tumorais, contribuindo para a prevenção e/ou tratamento de tumores, tendo como base terapêutica o uso de estatinas.

3. JUSTIFICATIVA

O melanoma é um tipo de tumor extremamente agressivo e quando na forma metastática, apresenta maior resistência às terapias convencionais, sendo um dos motivos para o estudo de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dessa doença. Dessa forma, torna-se necessária a busca por novos compostos terapêuticos com ações em vias importantes no estabelecimento e progressão tumoral.

Estudos epidemiológicos mostram que o uso de estatinas diminuiu a incidência de melanoma e outros tipos de tumores (CHAE *et al.*, 2015).

Atualmente a ação antitumoral das estatinas tem sido comprovada e seus mecanismos de ação têm sido explorados, sendo a sinvastatina um dos membros dessa classe de estatinas mais bem estudado e amplamente prescrito para a população. Em modelo tumoral *in vitro*, utilizando células de melanoma humano tratadas com sinvastatina foi observada diminuição da viabilidade celular, seguido de alterações morfológicas, alteração na progressão do ciclo celular, indução de apoptose e senescência (SAITO *et al.*, 2008; GUTERRES *et al.*, 2013).

Sabe-se que a autofagia está relacionada com a resistência tumoral e a modulação de morte celular por apoptose, e vale destacar que publicações recentes da literatura indicam o processo autofágico como um alvo emergente para o tratamento de tumores, em especial do melanoma (SAITO *et al.*, 2015).

Diante dos dados apresentados, justifica-se avaliar a ocorrência do processo autofágico nas células de melanoma humano tratadas com sinvastatina e correlacionar o perfil de expressão das proteínas chaves da autofagia com características fenotípicas da ação deste composto (efeitos na viabilidade celular, alteração na progressão do ciclo celular e indução de morte – fragmentação de DNA).

4. OBJETIVOS

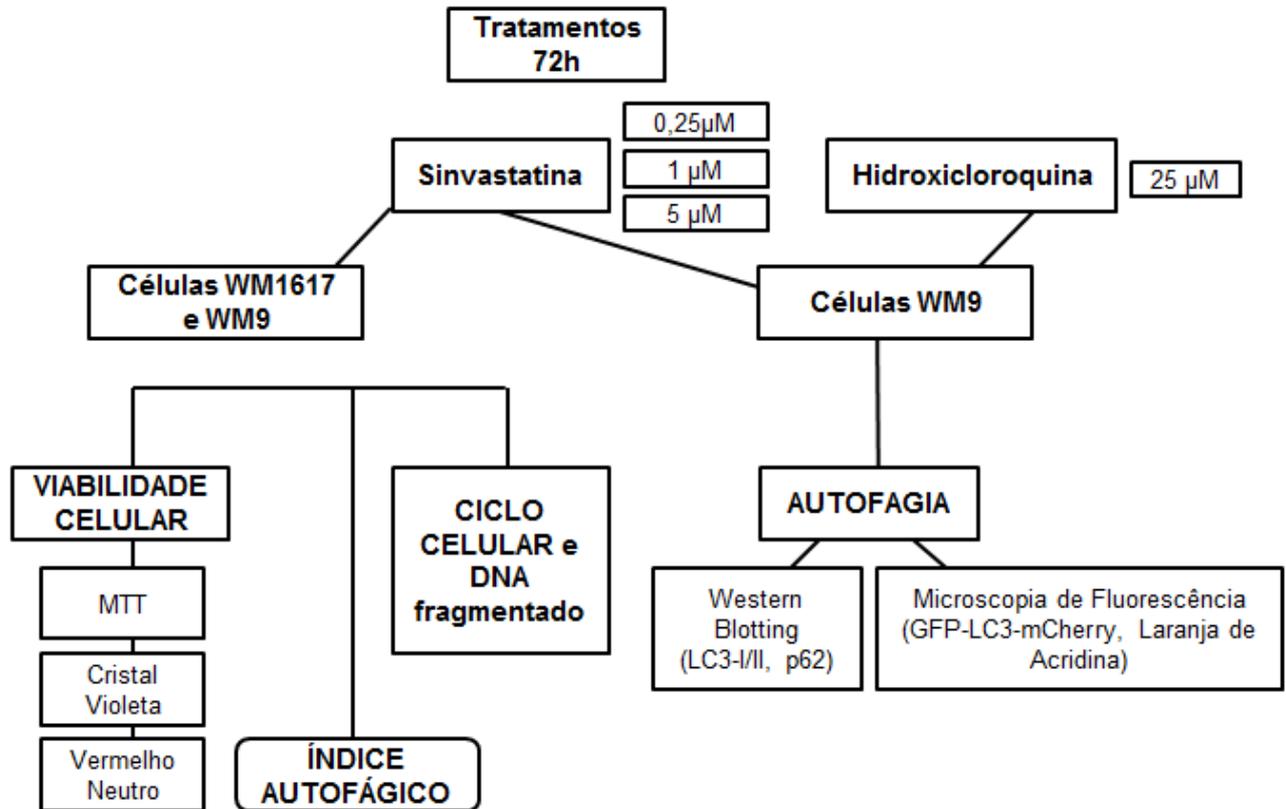
Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a modulação do processo autofágico induzido por sinvastatina em células de melanoma humano metastático.

Objetivos Específicos

- Investigar se a sinvastatina é capaz de modular o processo autofágico em modelo de melanoma humano metastático, a partir da análise da expressão das proteínas LC3 I/II e p62 (marcadores específicos do processo autofágico)
- Correlacionar o perfil de expressão das proteínas chaves do processo autofágico com características fenotípicas da ação da sinvastatina (efeitos na viabilidade celular, alteração na progressão do ciclo celular e indução de morte – fragmentação de DNA);
- Avaliar a dependência do processo autofágico para o efeito antitumoral da sinvastatina em modelo de melanoma humano, a partir de seu uso combinado com um inibidor do processo autofágico (hidroxicloroquina).

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR

6.1.1 Esterilização e manejo de materiais e células

Todos os materiais e vidrarias utilizados para os procedimentos de cultivo celular (frascos para soluções e meio de cultura, equipamento para filtração de soluções, tampas, ponteiras plásticas para pipetas e pipetas de vidro) foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante 45 minutos e sob pressão de 1 atm. Após a esterilização, o material foi seco em estufa a 50°C. O manejo das culturas de células foi realizado em condições de esterilidade, no interior de capela de fluxo laminar.

6.1.2 Soluções e meios de cultura

6.1.2.1 Soluções

A solução salina fosfato tamponada (PBS) utilizada para lavagem das células em cultura foi preparada como uma solução estoque concentrada cinco vezes (NaCl 680 mmol/L, KCl 13,4 mmol/L, Na₂HPO₄ 40,5 mmol/L), e diluída para uso posterior com pH ajustado para 7,4, sendo esterilizada em autoclave nas condições anteriormente mencionadas e armazenada em temperatura ambiente.

Células aderentes foram soltas de seu substrato utilizando-se solução de tripsina-EDTA (NaCl 137 mmol/L, KCl 54 mmol/L, glucose 5 mmol/L, Na₂HPO₄ 0,42 mmol/L, KH₂PO₄ 0,44 mmol/L, NaHCO₃ 2,3 mmol/L, EDTA 0,53 mmol/L e 50mg/% de tripsina, pH 7,4). Esta solução é esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 µm (Millipore) sob pressão em aparato Sartorius, em câmara de fluxo laminar e armazenada a -20°C.

A solução estoque de sinvastatina (Zocor®), gentilmente cedida pelo Merck, Sharp & Dohme Laboratórios, encontra-se na concentração de 0,1M diluída em etanol e armazenada a -80°C. Para os experimentos com células

foram utilizadas concentrações entre 0,25 e 5 μ M de sinvastatina, também diluídas em etanol. Como controle foi utilizado: células na presença de etanol (veículo da droga; volume equivalente ao utilizado no tratamento com 1 μ M de sinvastatina).

6.1.2.2 Meio de cultura, linhagens celulares e condições de cultivo

O meio de cultura utilizado foi o meio TU, composto de 80% do volume final de meio MCDB153 (Sigma-Aldrich) e 20% do meio L15 de Leibovitz (Sigma-Aldrich). Estes dois meios são preparados separadamente, esterilizados por meio de filtração em membrana de 0,22 μ m e misturados posteriormente. O meio TU é suplementado com 2 mmol/L de CaCl₂, 5 μ g/mL de insulina humana (Humulin-R, Lilly France S.A.S), 2% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e 50 μ g/mL do antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich).

As linhagens celulares estudadas (WM9 e WM1617) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Meenhard Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia – EUA). Ambas as linhagens de melanoma humano metastático apresentam mutação em BRAF (V600E).

Nos ensaios *in vitro*, as células WM9 e WM1617 se desenvolvem como culturas aderentes e são cultivadas em garrafas de poliestireno estéreis (Techno Plastic Products – TPP). Estas culturas foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. As subculturas foram realizadas de acordo com a confluência das células, utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprendê-las do substrato plástico.

6.1.3 Avaliação da viabilidade celular

6.1.3.1 Ensaio de MTT

Para determinar a viabilidade celular por esse método (descrito anteriormente por REILLY *et al.*, 1998), as células foram plaqueadas (1,4 x 10⁴ células/poço) em placas de 96 poços e incubadas durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ para total adesão das células. Após esse período, as células foram

tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina (0,25µM, 1µM e 5µM) e com o inibidor de autofagia, hidroxiquina (25µM) durante 72 horas. Depois do tratamento o meio foi removido e as células foram incubadas com solução de MTT (500µg/mL em HBSS) por 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. A solução de MTT é removida e os cristais de formazan são solubilizados em DMSO e a absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Tecan Infinite 200, Tecan Systems, Inc.), a 550nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100% de células viáveis).

6.1.3.2 Método de Cristal Violeta

Para a análise da viabilidade celular por esse método foram plaqueadas $1,4 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços e estas deixadas em incubadora a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 24h para a adesão das células. Após este período, foi realizado o tratamento com sinvastatina, nas concentrações de 0,25µM, 1µM e 5µM e com a cloroquina (25µM) durante 72 horas. Após o tratamento, o meio de cultura com os tratamentos foi retirado, as células lavadas com PBS, e posteriormente fixadas com metanol 100% durante 10 minutos.

Após este tempo, o metanol foi retirado e adicionou-se aos poços a solução de cristal violeta (cristal violeta 0,2% em etanol 2%) durante 3 minutos. O cristal violeta cora ácidos nucléicos das células aderidas e fixadas (KUENG *et al.*, 1989). O cristal violeta é retirado e são realizadas dez lavagens com PBS para a remoção do excesso de corante. Após estas lavagens, foi realizada a eluição do conteúdo aderido às placas com uma solução de citrato de sódio (citrato de sódio 0,05mol/L em etanol 50%) durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Tecan Infinite 200, Tecan Systems, Inc.), a 540nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100% de células viáveis).

6.1.3.3 Método de vermelho neutro

As células foram plaqueadas $1,4 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços e estas deixadas em incubadora a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 durante 24h para a adesão das células. Após este período, foi realizado o tratamento com sinvastatina, nas concentrações de $0,25\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ e $5\mu\text{M}$ e com a cloroquina ($25\mu\text{M}$) durante 72 horas. Nas últimas duas horas antes de completar o tempo de tratamento às células foram adicionados $20\mu\text{L}$ de solução de vermelho neutro (Sigma, N6634) na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$. Após o tempo de tratamento as células foram lavadas com PBS e foi adicionado $100\mu\text{L}$ de solução de extração (Etanol/ Ácido acético, 50%/1%). Após esse período, a leitura da absorbância foi realizada a 550nm em leitor de microplacas (Tecan Infinite 200, Tecan Systems, Inc.). Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100% de células viáveis).

6.1.4 Determinação do Índice Autofágico – AAU

O cálculo das unidades autofágicas arbitrárias (AAU), foi realizado segundo Martins *et al.*,(2013) a partir da fórmula:

$$AAU = \left\{ \frac{X_a}{[X_b + X_c] / 2} \right\}$$

Onde:

X_a =níveis de sobrevivência celular pelo método de vermelho neutro

X_b = níveis de sobrevivência celular pelo método de MTT

X_c = níveis de sobrevivência celular pelo método de cristal violeta

6.1.5 Ensaio de ciclo celular

Para verificar o efeito da sinvastatina no ciclo celular, células foram plaqueadas (2×10^5 células/placa) em placas de 6 poços. Após 24h de

incubação para aderência, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com sinvastatina e cloroquina durante 72h. Após o tratamento, foi realizada a coleta das células. Foi coletado o sobrenadante das culturas, o qual foi recolhido em tubos de fundo cônico de 5mL. A seguir, as células aderentes foram lavadas e colhidas com solução de tripsina-EDTA. Esta suspensão foi adicionada ao sobrenadante no tubo de coleta. Este material foi centrifugado (2000rpm, 5min) e após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, permanecendo apenas o *pellet* de células. O *pellet* obtido foi ressuspendido em PBS e centrifugado novamente por duas vezes consecutivas. Depois desse procedimento, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) 50µg/mL, 0,1% de Triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 0,2mg/mL de RNase A por 30 minutos, a 4°C, protegido de luz. A análise do conteúdo de DNA nas células foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri e a análise da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi definida por histogramas obtidos no *software* Cyflogic 1.2.1.

6.1.6 Avaliação da autofagia

6.1.6.1 Microscopia de fluorescência

Para a avaliação da ocorrência de autofagia, foi realizada a observação e contagem de células WM9 por meio da proteína LC3-GFP (permite avaliar a formação do autofagossomo nas células tratadas). A linhagem WM9 foi transfectada com o vetor de expressão pRGFP-LC3 com o kit comercial FuGene (Roche) e posteriormente as células foram visualizadas e contadas em microscópio de fluorescência confocal (Axiovert 40CFL, Zeiss). A autofagia é determinada através da contagem de células fluorescentes com cinco ou mais vacúolos autofágicos no seu interior (MISIRKIC *et al.*, 2011).

6.1.6.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA

6.1.6.2.1 Extração e quantificação de proteínas

As células foram plaqueadas em placas de 100mm, na concentração de $1,3 \times 10^6$ e incubadas por 24 horas em estufa, a 37°C com 5% de CO₂ para que fossem aderidas na placa. Após esse período, as células foram tratadas com 0,25 µM, 1,0 µM e 5 µM de sinvastatina, assim como 25 µM de Hidroxicloroquina e incubadas por 72 horas nas mesmas condições. A seguir, retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas com PBS resfriado. Após a lavagem, adiciona-se tampão RIPA+ (10mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, desoxicolato de sódio 1%, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1mM β-glicerofosfato, 2,5mM Na₃P₂O₇) com PMSF às placas. O lisado foi transferido para tubo de 1,5mL e colocado imediatamente a 4°C e deixado por 30 minutos. Posteriormente, as amostras são centrifugadas a 15000g, por 10 minutos a 4°C. Retira-se o sobrenadante e coloca-se em tubos novos, mantendo no gelo. A quantificação das proteínas totais foi realizada imediatamente após a extração pelo kit de quantificação 2D-Quant. Após, as amostras foram aliqüotadas e armazenadas a -80°C.

6.1.6.2.2 Imunodeteção de proteínas

Alíquotas de 35 µg de proteína foram utilizadas para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS PAGE (com géis de concentração 8 a 12% de acordo com cada proteína a ser detectada), utilizando em média voltagem de 90V por 2 horas. Após, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de PVDF. Pode-se visualizar a transferência por meio de coloração da membrana com solução de Ponceau. A detecção das proteínas foi realizada a partir de anticorpos primários (especificamente: LC3-I/II, p62 e Anti-GAPDH). Para a revelação a membrana foi incubada com o substrato quimioluminescente ECL (Pierce® ECL Western Blotting Substrate – Thermo Scientific) durante 1min, em temperatura ambiente. O excesso de substrato foi retirado, e a membrana posicionada em cassete revestido por filme de PVC. Em câmara escura na ausência total de luz, o filme fotográfico (Amersham Hyperfilm TM ECL – GE Healthcare) foi colocado em contato com a membrana. Após a exposição, o filme foi imerso em solução reveladora até o aparecimento das bandas, lavado em água, imerso em solução fixadora e novamente lavado

em água (Soluções Reveladora e Fixadora utilizadas: Kodak® processing chemicals for autoradiography films – Sigma Aldrich). A quantificação foi realizada pelo método do software ImageJ 1.38e/Java 1.5 (desenvolvido por Wayne Rasband – SITE).

Os anticorpos primários utilizados para ensaio de Western Blotting foram: LC3-I/II (LC3A/B Antibody), p62 (SQSTM1/p62) e GAPDH (Anti-GAPDH antibody produced in rabbit). Como anticorpos secundários foram utilizados: anticorpo policlonal de origem caprina anti-IgG (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody). Estes anticorpos foram diluídos e armazenados de acordo com as instruções de cada fabricante.

6.1.6.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Para análises de múltiplas populações, foi utilizado o teste de variância ANOVA One-Way seguido pelo método Tukey t-test. Para a análise de duas populações foi utilizado o Teste-t de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

7. Resultados

7.1 Efeito da sinvastatina na viabilidade celular

O efeito da sinvastatina na viabilidade das células WM9 foi avaliado pelos ensaios de MTT (Figura 9-A), cristal violeta (Figura 9-B) e vermelho neutro (Figura 9-C). Para isto, as células foram tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina (0,25 μ M, 1 μ M e 5 μ M), e a avaliação da viabilidade ocorreu após 72 horas de tratamento. O resultado foi expresso como valor de porcentagem de células viáveis em relação ao controle do experimento (células tratadas somente com etanol, veículo da droga).

A partir dos resultados obtidos, indicados nas Figuras 9A, 9B e 9C, observou-se que o tratamento com a concentração de 0,25 μ M de sinvastatina promove uma pequena redução na viabilidade das células WM9, detectado apenas pelos métodos de cristal violeta (17%) e vermelho neutro (23,6%). Utilizando a metodologia de MTT, não foi observada diferença na viabilidade celular após tratamento com a menor concentração de sinvastatina. Porém, quando as células de melanoma foram tratadas com a concentração de 1 μ M de sinvastatina a redução na viabilidade celular foi significativa, atingindo: 53,5% pelo método de MTT, 58,3% pelo método de cristal violeta e 59,7% pelo método de vermelho neutro. Por último, o tratamento das células WM9 com sinvastatina na concentração de 5 μ M promoveu uma redução de viabilidade mais expressiva: 90,3% pelo MTT, 81% por cristal violeta e 63% pelo vermelho neutro).

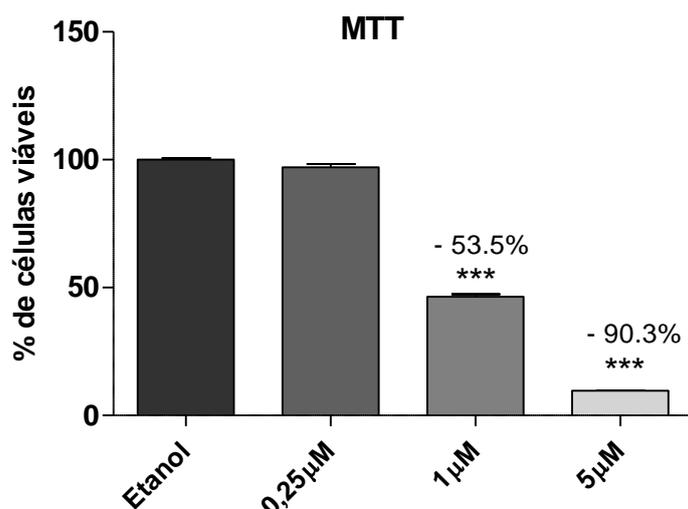


Figura 9-A - EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA VIABILIDADE CELULAR
 FONTE: O autor (2016)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 após o tratamento com 0,25, 1 e 5 µM de sinvastatina no tempo de 72h. O método utilizado foi o ensaio com 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol (1%), indicado como 100% de células viáveis. O resultado é representado pela média ± DP das porcentagens de células viáveis de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle - etanol (** $p < 0,0001$).

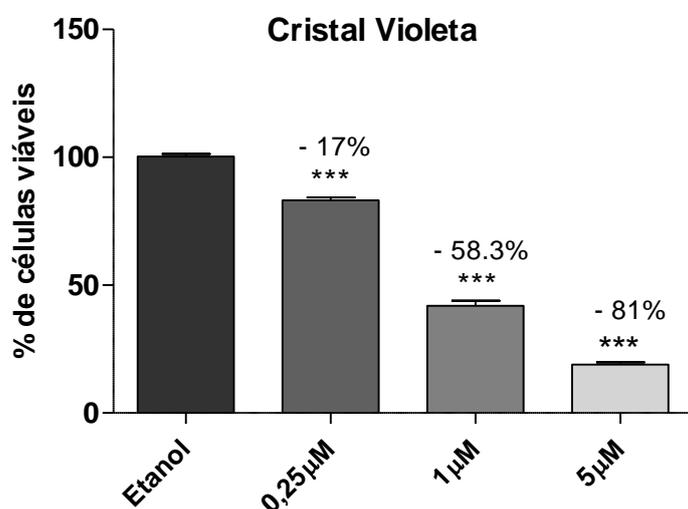


Figura 9-B - EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA VIABILIDADE CELULAR
 FONTE: O autor (2016)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 pelo método de cristal violeta após o tratamento com 0,25, 1 e 5 µM de sinvastatina no tempo de 72h. Na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol (1%), indicado como 100% de células viáveis. O resultado é representado pela média ± DP das porcentagens de células viáveis de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle, etanol (** $p < 0,0001$).

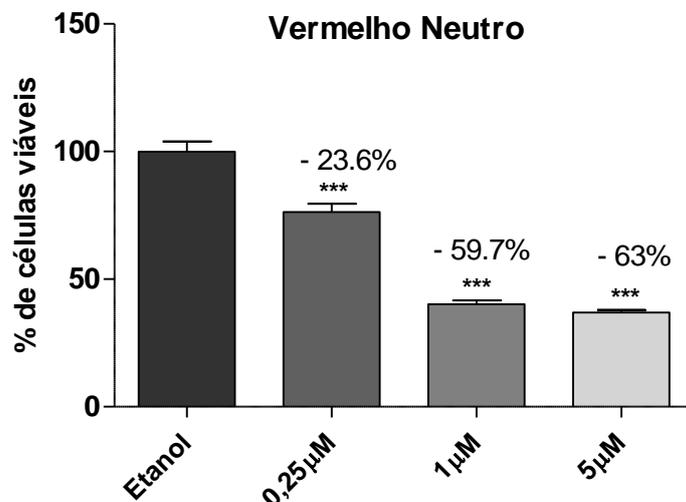


Figura 9-C - EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA VIABILIDADE CELULAR
 FONTE: O autor (2016)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 pelo método de vermelho neutro após o tratamento com 0,25, 1 e 5µM de sinvastatina no tempo de 72h. Na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol (1%), indicado como 100% de células viáveis. O resultado é representado pela média ± DP das porcentagens de células viáveis de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle, etanol (***) $p < 0,0001$.

Para efeito de comparação, foram realizados os mesmos ensaios de viabilidade utilizando outra linhagem de melanoma metastático humano: a linhagem WM1617. Os resultados estão indicados nas Figuras 9D, 9E e 9F, e mostram que a condição de tratamento com 0,25µM de sinvastatina promove a redução na viabilidade das células WM1617, sendo 37,7% pelo método de MTT e 65% pelo método de cristal violeta. Utilizando a concentração de 1µM de sinvastatina a redução na viabilidade celular foi significativa, atingindo: 83% pelo método de MTT, 82,5% pelo método de cristal violeta e 26,9% pelo método de vermelho neutro. Já o tratamento das células WM1617 com sinvastatina na concentração de 5µM promoveu uma redução de viabilidade mais expressiva: 99% pelo MTT, 96% por cristal violeta e 60,3% pelo vermelho neutro.

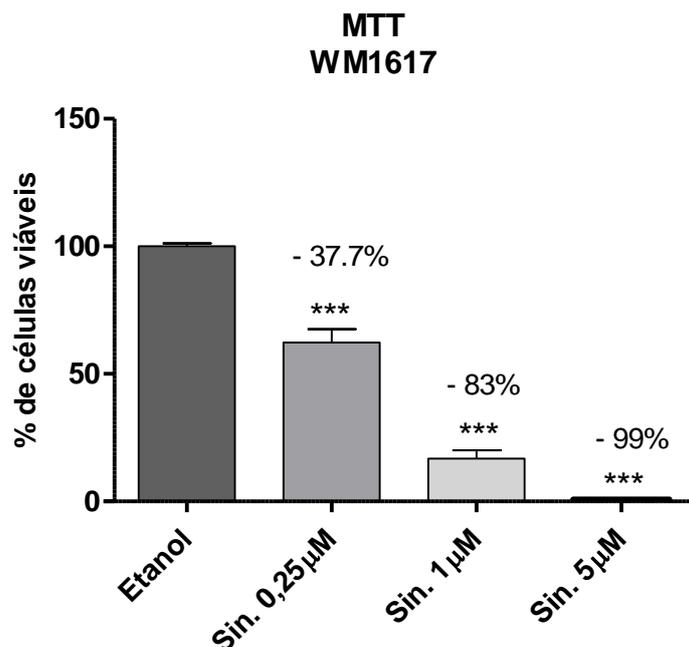


Figura 9-D - EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA VIABILIDADE CELULAR
 FONTE: O autor (2016)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM1617 pelo ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide (MTT) após o tratamento com 0,25, 1 e 5µM de sinvastatina no tempo de 72h. Na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol (1%). O resultado é representado pela média ± SEM das porcentagens de células viáveis de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata, e cada tempo possui seu controle representado como 100%. As significâncias estatísticas obtidas em relação a cada dose são referentes aos seus controles nos diferentes tempos (***) $p < 0,0001$.

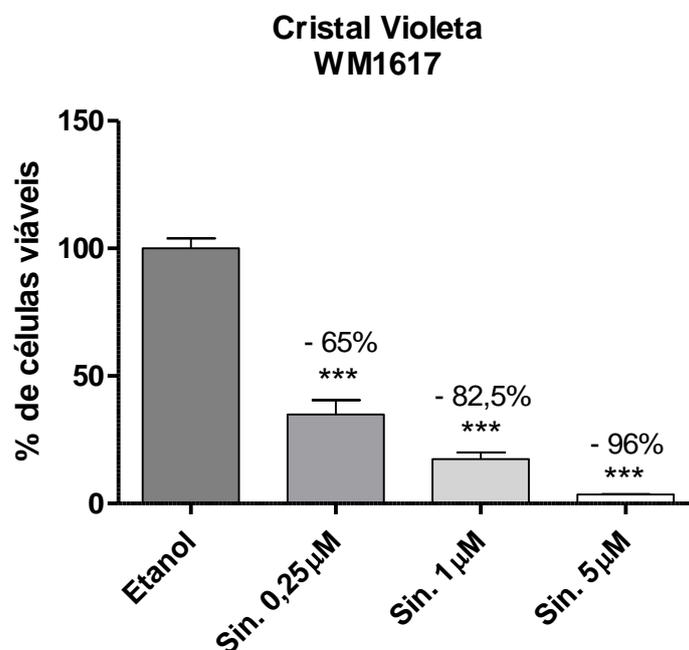


Figura 9-E - EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA VIABILIDADE CELULAR
 FONTE: O autor (2016)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM1617 pelo ensaio de cristal violeta após o tratamento com 0,25, 1 e 5µM de sinvastatina no tempo de 72h. Na condição controle foi

adicionado apenas o veículo da droga, etanol (1%). O resultado é representado pela média \pm SEM das porcentagens de células viáveis de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata, e cada tempo possui seu controle representado como 100%. As significâncias estatísticas obtidas em relação a cada dose são referentes aos seus controles nos diferentes tempos (** $p < 0,0001$).

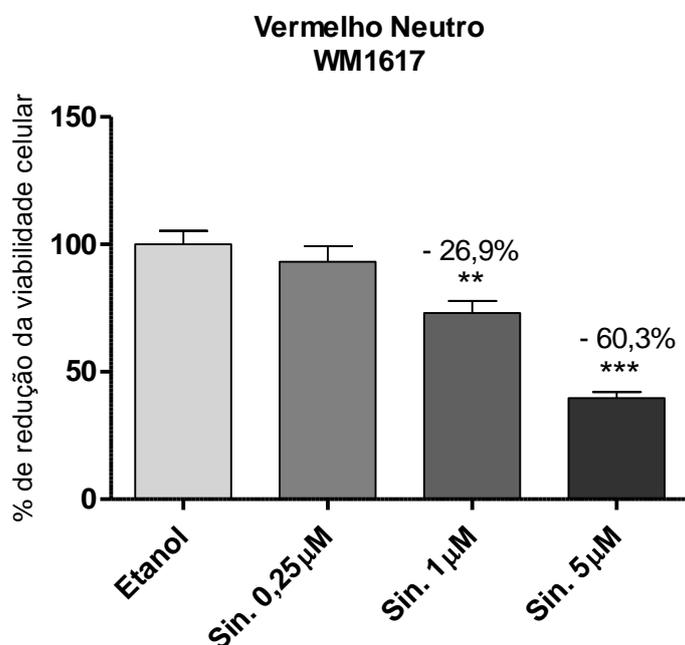


Figura 9-F - EFEITO DO TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA VIABILIDADE CELULAR
FONTE: O autor (2016)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM1617 pelo ensaio de vermelho neutro após o tratamento com 0,25, 1 e 5µM de sinvastatina no tempo de 72h. Na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol (1%). O resultado é representado pela média \pm SEM das porcentagens de células viáveis de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata, e cada tempo possui seu controle representado como 100%. As significâncias estatísticas obtidas em relação a cada dose são referentes aos seus controles nos diferentes tempos (** $p < 0,0001$).

Apesar da diminuição de viabilidade mediada por sinvastatina ter sido mais expressivo na linhagem WM1617 em comparação com a linhagem WM9, de forma geral, os resultados obtidos mostram que ocorreu uma redução da viabilidade das células de melanoma humano, dependente da concentração de sinvastatina utilizada.

Para efeito de comparação, nas tabelas 1 e 2 estão indicadas as porcentagens de células viáveis após tratamento com sinvastatina obtidas pelos três métodos utilizados. Os dados estão expressos como valor de porcentagem de células viáveis em relação ao controle do experimento. Foram consideradas significativas as diferenças com valor de $p < 0,05$.

Sinvastatina (μM)	Redução na viabilidade celular (%)		
	MTT	VERMELHO NEUTRO	CRISTAL VIOLETA
0,25	3.9 \pm	23.6 \pm ***	17 \pm ***
1	53.5 \pm ***	59.7 \pm ***	58.3 \pm ***
5	90.3 \pm ***	63 \pm ***	81 \pm ***

Tabela 1 - COMPARAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM9 ATRAVÉS DOS ENSAIOS DE MTT, CRISTAL VIOLETA E VERMELHO NEUTRO

NOTA: Valores em porcentagem da redução na viabilidade das células WM9 após o tratamento com diferentes concentrações de sinvastatina. Os dados da redução de viabilidade foram calculados quando comparados com a condição controle (etanol, veículo da droga). Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0.05$.

Sinvastatina (μM)	Redução na viabilidade celular (%)		
	MTT	VERMELHO NEUTRO	CRISTAL VIOLETA
0,25	37,7 \pm ***	7,9 \pm	65 \pm ***
1	83 \pm ***	26,9 \pm **	82,5 \pm ***
5	99 \pm ***	60,3 \pm ***	96 \pm ***

Tabela 2 - COMPARAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM1617 ATRAVÉS DOS ENSAIOS DE MTT, CRISTAL VIOLETA E VERMELHO NEUTRO

NOTA: Valores em porcentagem da redução na viabilidade das células WM9 após o tratamento com diferentes concentrações de sinvastatina. Os dados da redução de viabilidade foram calculados quando comparados com a condição controle (etanol, veículo da droga). Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0.05$.

7.2 Índice Autofágico – AAU

O índice autofágico é uma variável numérica que correlaciona os diferentes métodos de viabilidade e pode estar relacionada com a ocorrência de morte celular autofágica (MARTINS *et al.*, 2013). A seguir, temos a representação gráfica do número de unidades autofágicas obtido após tratamento das células WM9 e WM1617 com a sinvastatina em diferentes concentrações, em comparação com a condição controle (células tratadas somente com o veículo da droga, etanol). Os resultados obtidos com a

linhagem WM9 mostram uma diferença entre a maior concentração, 5 μM de sinvastatina, e o controle (etanol), evidenciando aumento significativo de 2,5 unidades autofágicas após tratamento dessas células por 72 horas (Figura 10-A). Já para a linhagem WM1617 os resultados mostram aumento significativo de 6,2 unidades autofágicas após tratamento com 1 μM de sinvastatina em comparação ao controle e de 19 unidades autofágicas após tratamento com 5 μM (Figura 10-B).

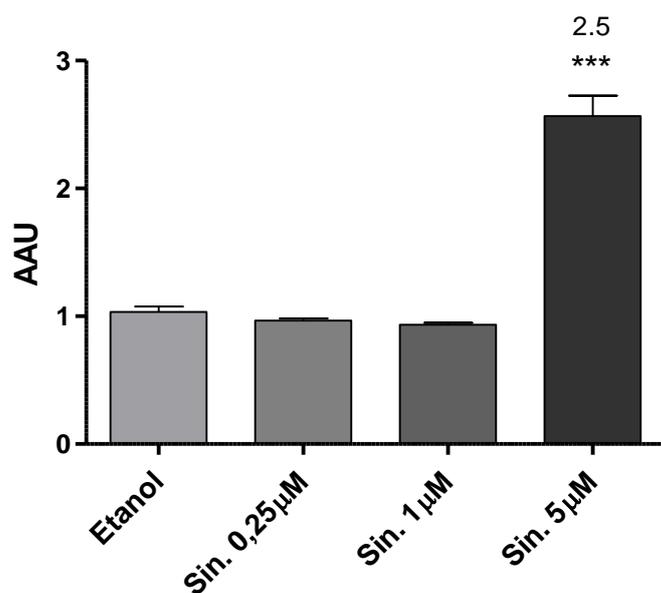


Figura 10-A - UNIDADES ARBITRÁRIAS AUTOFÁGICAS DA LINHAGEM WM9

FONTE: O autor (2016).

NOTA: O cálculo das unidades autofágicas arbitrárias é estimado a partir da razão da normalização das taxas de sobrevivência celular do método de vermelho neutro, pela média aritmética da razão da normalização dos métodos de MTT e cristal violeta. Esse índice aponta a quantificação do fluxo autofágico nas células estudadas.

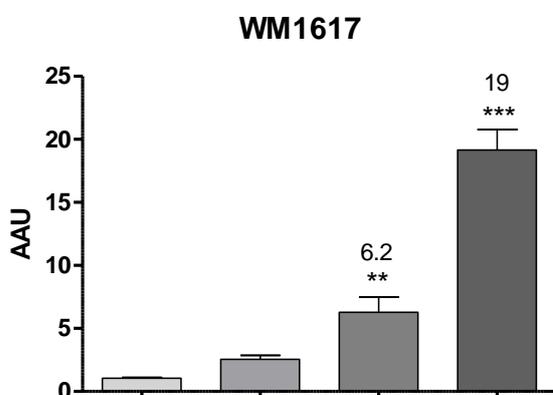


Figura 10-B - UNIDADES ARBITRÁRIAS AUTOFÁGICAS DA LINHAGEM WM1617

FONTE: O autor (2016).

NOTA: O cálculo das unidades autofágicas arbitrárias é estimado a partir da razão da normalização das taxas de sobrevivência celular do método de vermelho neutro, pela média aritmética da razão da normalização dos métodos de MTT e cristal violeta. Esse índice aponta a quantificação do fluxo autofágico nas células estudadas.

7.3 Análise da Progressão do Ciclo Celular

A avaliação da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi realizada por ensaios de Citometria de fluxo, utilizando células WM9 e WM1617 permeabilizadas e marcadas com PI. Os resultados estão representados nas Figuras 11-A e 11-B e mostram que após o tratamento das células de ambas as linhagens com sinvastatina por 72 h foi observado o aumento significativo da porcentagem de células na fase G_0 - G_1 do ciclo celular. Este aumento é estatisticamente significativo nas condições experimentais que se utilizou sinvastatina nas concentrações de 1 e 5 μ M.

Além do aumento da porcentagem de células em G_0 - G_1 , observou-se que o tratamento com sinvastatina promoveu uma concomitante diminuição da porcentagem de células na fase G_2 -M do ciclo celular. Quando comparado ao controle, a diminuição foi estatisticamente significativa nas concentrações de 1 e 5 μ M de sinvastatina para a linhagem WM9 e apenas na concentração de 5 μ M de sinvastatina na linhagem WM1617.

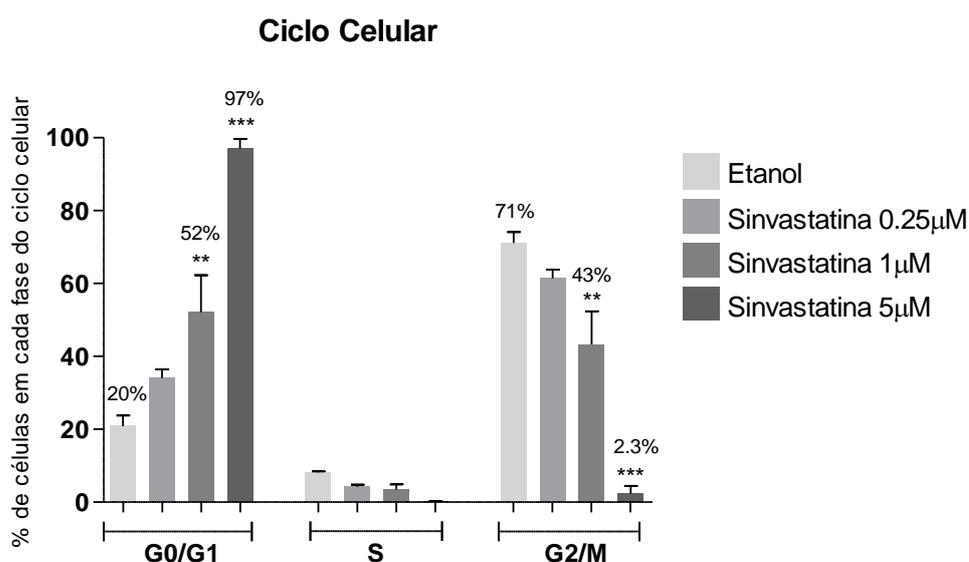


Figura11-A - DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS WM9 ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA POR 72 h

FONTE: O autor (2016)

NOTA: O gráfico representa a porcentagem de células da linhagem WM9 nas fases do ciclo celular de acordo com cada condição de tratamento utilizando a sinvastatina (0,25 μ M, 1 μ M e 5 μ M) e na condição controle foi utilizado apenas o veículo da droga, etanol (1%). O resultado mostra dados de três experimentos independentes realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

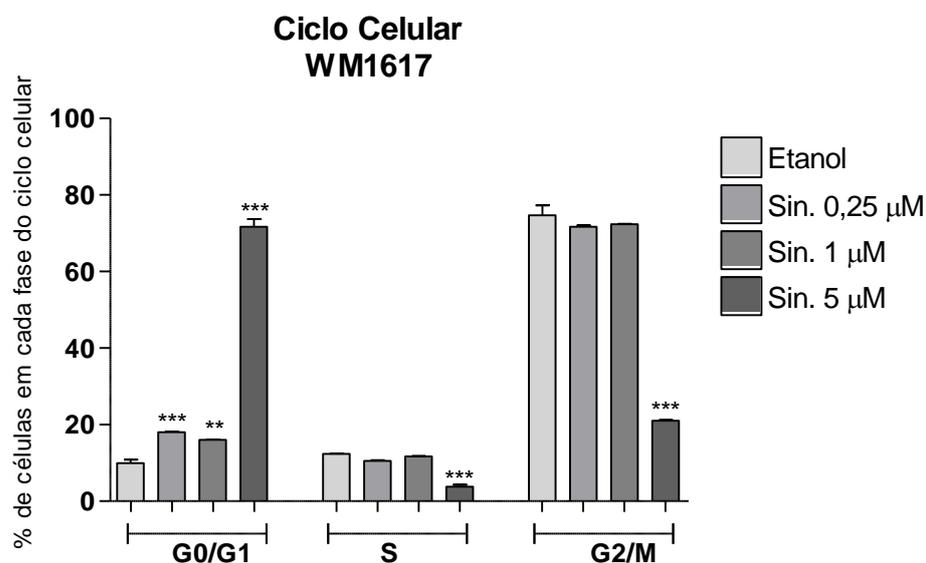


Figura 11-B - DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA POR 72h

FONTE: O autor (2016)

NOTA: O gráfico representa dados de dois experimentos independentes realizados em duplicata (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A análise por citometria de fluxo de células permeabilizadas e coradas com PI permite também a análise do conteúdo de DNA fragmentado. Observou-se que células WM9 tratadas com sinvastatina na maior concentração (5 μ M) apresentam um aumento significativo da porcentagem de DNA fragmentado (10%) em relação à condição controle (Figura 11-C), indicando que, nessa concentração, a morte celular é mais expressiva. Já nas células WM1617 tratadas com sinvastatina na maior concentração (5 μ M) houve um aumento significativo da porcentagem de DNA fragmentado (7.45%) em relação à condição controle (Figura 11-D), indicando que, nessa concentração, a morte celular é mais expressiva.

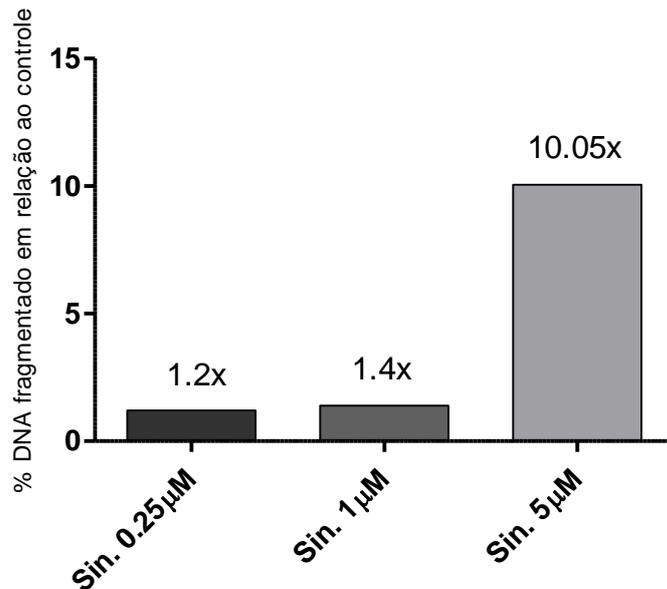


Figura 11-C - PORCENTAGEM DE CÉLULAS COM DNA FRAGMENTADO

FONTE: O autor (2016)

NOTA: O gráfico representa a porcentagem de células da linhagem WM9 com DNA fragmentado de acordo com cada condição de tratamento utilizando a sinvastatina (0,25 μM, 1 μM e 5 μM) em comparação à condição controle, utilizada apenas o veículo da droga, etanol. A quantidade de células no controle foi considerada 1%. O resultado mostra dados de três experimentos independentes realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle (**p<0,01; *** p< 0.001).

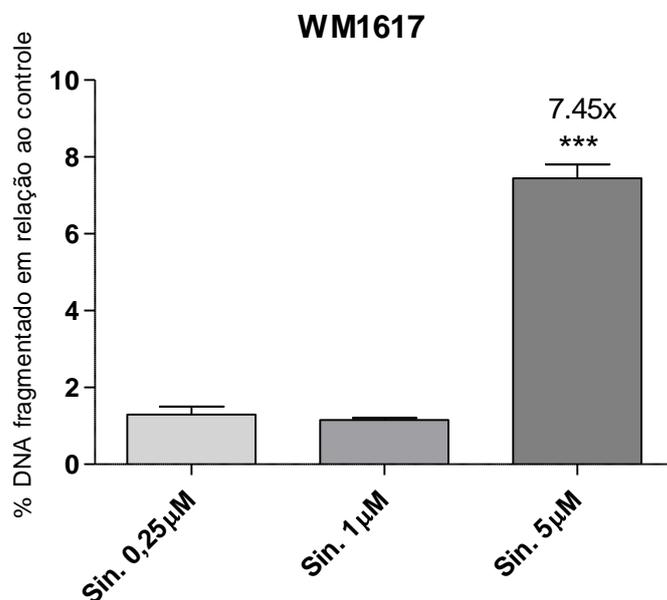


Figura 11-D - PORCENTAGEM DE CÉLULAS COM DNA FRAGMENTADO

FONTE: O autor (2016)

NOTA: O gráfico representa a porcentagem de células da linhagem WM1617 com DNA fragmentado de acordo com cada condição de tratamento utilizando a sinvastatina (0,25 μM, 1 μM e 5 μM) em comparação à condição controle, utilizada apenas o veículo da droga, etanol. A quantidade de células com DNA fragmentado no controle foi considerada como valor relativo de 1%. O resultado mostra dados de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$).

7.4 Dependência do processo autofágico para ação antitumoral da sinvastatina – Efeito do co-tratamento com hidroxyclorequina

A hidroxyclorequina é um inibidor do processo autofágico que atua impedindo a ação das proteases lisossomais e a fusão do autofagossomo com o lisossomo. Dessa forma, com o intuito de avaliar a dependência do processo autofágico para ação antitumoral da sinvastatina realizamos o tratamento combinado da sinvastatina (em diferentes concentrações) com um inibidor clássico de autofagia (hidroxyclorequina) na linhagem WM9 de melanoma humano metastático.

Vale destacar que a partir deste momento todos os ensaios foram feitos em uma única linhagem celular de melanoma humano metastático: a linhagem WM9. Essa decisão foi tomada frente a informações recentes de que a linhagem WM1617 teve sua distribuição suspensa formalmente, pois foi submetida a análises genômicas e detectou-se que possivelmente tenha sido contaminada com outra linhagem celular em seu laboratório de origem.

7.4.1 Efeito na viabilidade celular após tratamento combinado de sinvastatina e hidroxyclorequina

A viabilidade das células WM9 tratadas com a sinvastatina em combinação com o inibidor de autofagia foi avaliado pelos ensaios de MTT (Figura 12-A), cristal violeta (Figura 12-B) e vermelho neutro (Figura 12-C). Para isto, as células foram tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina (0,25 μM , 1 μM e 5 μM) e em combinação com hidroxyclorequina 25 μM , e a avaliação da viabilidade ocorreu após 72 horas de tratamento. O resultado foi expresso como valor de porcentagem de células viáveis em relação ao controle do experimento (células tratadas com etanol/DMSO, veículo das drogas), considerado como 100% de células viáveis.

A partir dos resultados obtidos, indicados nas Figuras 12A, 12B e 12C, observou-se que o tratamento com a concentração de 0,25 μM de sinvastatina combinada com hidroxyclorequina 25 μM promove uma pequena redução na

viabilidade das células WM9, sendo 23% pelo método de MTT, 34% por cristal violeta e 13.6% pelo método de vermelho neutro. As células tratadas com a concentração de 1 μM de sinvastatina combinada com hidroxiclороquina 25 μM apresentaram redução na viabilidade celular significativa, atingindo: 32% pelo método de MTT, 53,8% pelo método de cristal violeta e 36% pelo método de vermelho neutro. Por último, o tratamento das células WM9 com sinvastatina na concentração de 5 μM combinada com hidroxiclороquina 25 μM promoveu uma redução de viabilidade mais expressiva: 97% pelo MTT, 95,6% por cristal violeta e 60,8% pelo vermelho neutro).

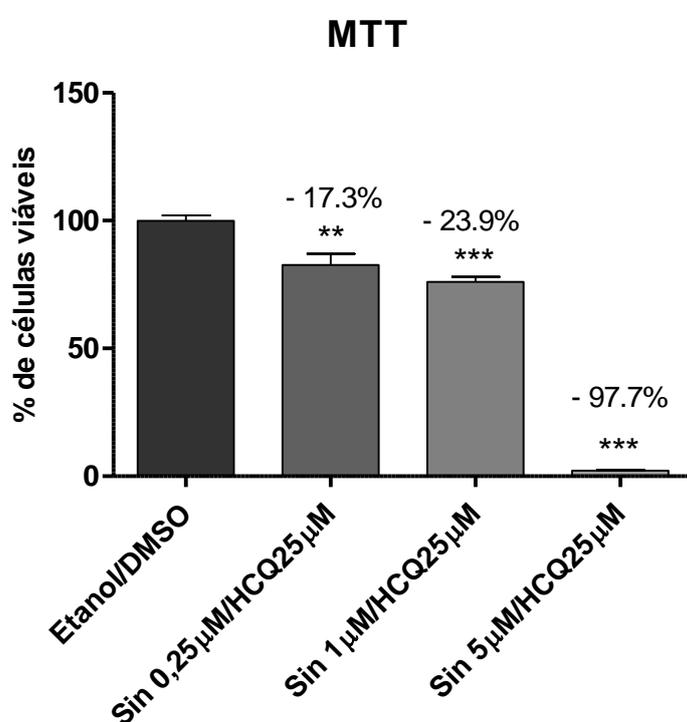


Figura 12-A - VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM COMBINAÇÃO COM A HIDROXICLOROQUINA PELO MÉTODO DE MTT

FONTE: O autor (2016)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 após o tratamento com 0,25, 1 e 5 μM de sinvastatina em combinação com hidroxiclороquina 25 μM , no tempo de 72h. A metodologia utilizada foi o ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) As condições controles correspondem ao o veículo da droga hidroxiclороquina, DMSO (1%) e a combinação dos veículos Etanol/DMSO (veículos de ambas as drogas). O resultado é representado pela média \pm DP das porcentagens de células viáveis de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle, etanol (***) $p < 0,0001$).

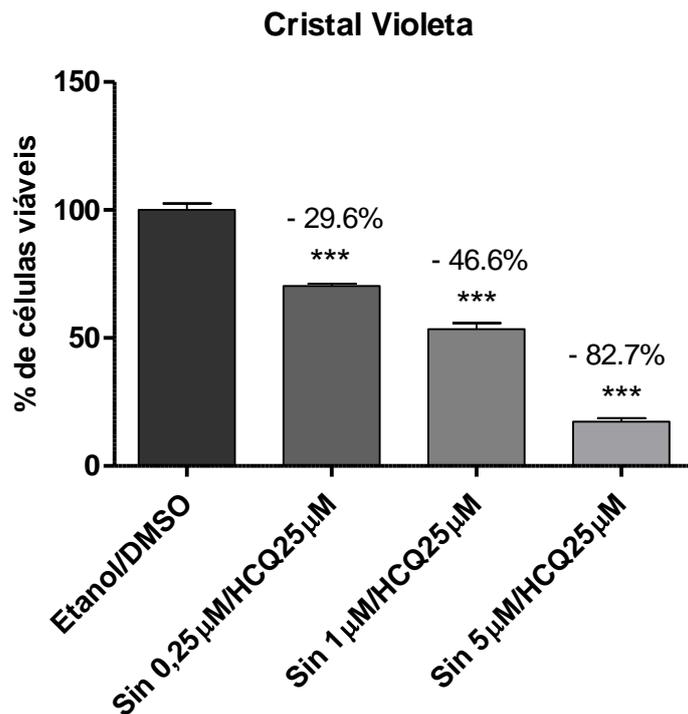


Figura 12-B - VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM COMBINAÇÃO COM A HIDROXICLOROQUINA PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA
 FONTE: O autor (2016)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 pelo ensaio de cristal violeta após o tratamento com 0,25, 1 e 5 μM de sinvastatina em combinação com hidroxiclороquina 25 μM, no tempo de 72h. A condição controle de cloroquina foi apenas o veículo da droga, DMSO (1%) enquanto a condição controle para os tratamentos combinados foi com Etanol/DMSO (veículos das drogas). O resultado é representado pela média ± SEM das porcentagens de células viáveis de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle, etanol (** $p < 0,0001$).

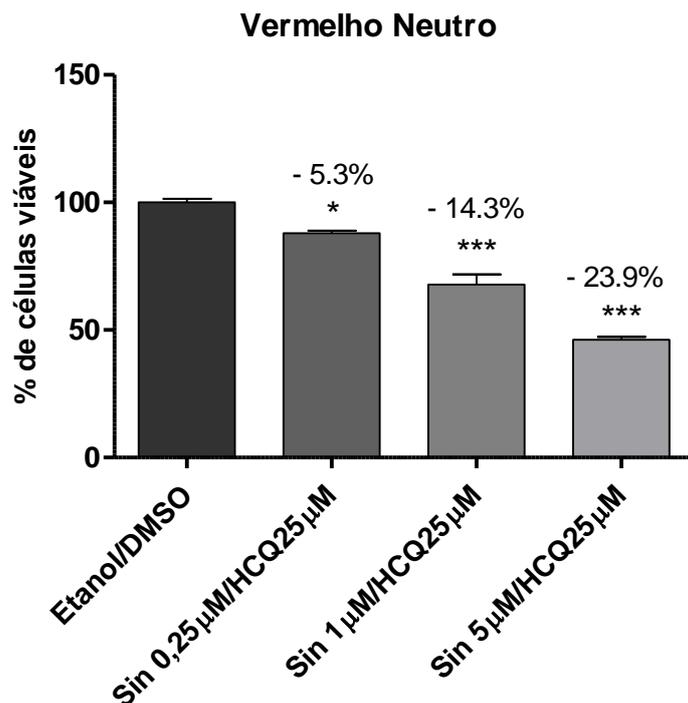


Figura 12-C - VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM COMBINAÇÃO COM A HIDROXICLOROQUINA PELO MÉTODO DE VERMELHO NEUTRO
 FONTE: O autor (2016)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 pelo ensaio de vermelho neutro após o tratamento com 0,25, 1 e 5 μM de sinvastatina em combinação com hidroxiclороquina 25 μM, no tempo de 72h. A condição controle de cloroquina foi apenas o veículo da droga, DMSO (1%) enquanto a condição controle para os tratamentos combinados foi com Etanol/DMSO (veículos das drogas). O resultado é representado pela média ± SEM das porcentagens de células viáveis de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle, etanol (***) $p < 0,0001$.

7.4.2 Efeito do tratamento combinado de sinvastatina e hidroxiclороquina na progressão do ciclo celular

A avaliação da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi realizada por ensaios de citometria de fluxo, utilizando células WM9 permeabilizadas e marcadas com PI. Os resultados estão representados na Figura 12-D e mostram que após o tratamento das células WM9 com a combinação por 72h foi observada a redução da porcentagem de células na fase G_0-G_1 do ciclo celular. Esta redução tende a ocorrer em todas as condições de tratamentos quando comparados ao controle (Etanol/DMSO).

Além disso, observou-se que a porcentagem de células na fase G_2-M do ciclo celular também tende a estar reduzida em comparação ao controle, o que

é um indicativo de que o tratamento com hidroxiclороquina está alterando a progressão das células WM9 no ciclo celular.

Na condição de sinvastatina 5 μM combinada com 25 μM de hidroxiclороquina o número de células não foi suficiente para análise da progressão no ciclo celular. Esses resultados serão repetidos posteriormente. Vale destacar ainda que a condição de sinvastatina 1 μM combinada com 25 μM de hidroxiclороquina foi avaliada a partir de um número menor de eventos durante o experimento no citômetro, o que indica que esses dados podem estar subestimados em comparação as demais condições de tratamento.

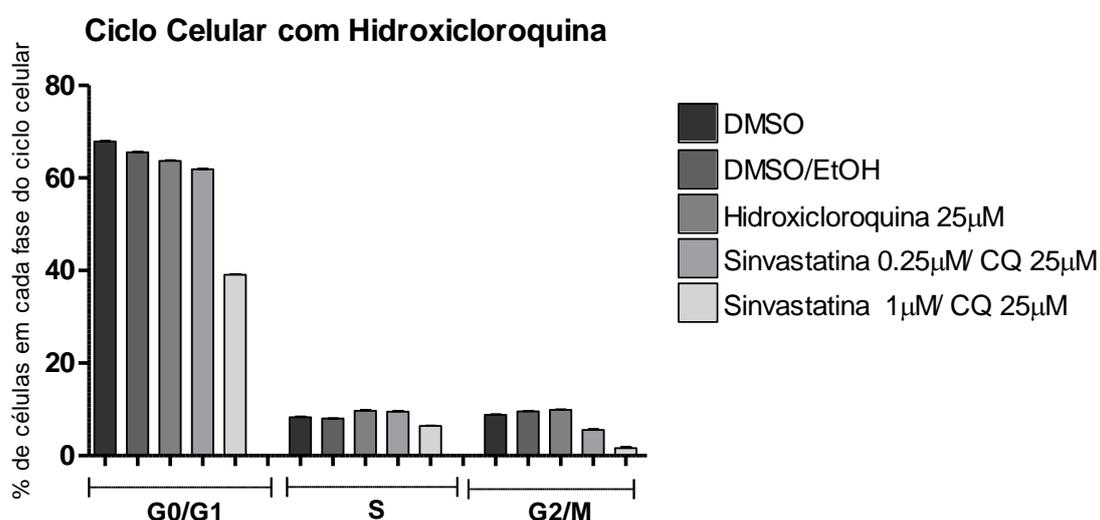


Figura 12-D - DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR APÓS 72h DE TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM COMBINAÇÃO COM HIDROXICLOROQUINA

FONTE: O autor (2016)

NOTA: O gráfico representa a porcentagem de células da linhagem WM9 nas fases do ciclo celular de acordo com cada condição de tratamento utilizando a sinvastatina (0,25 μM , 1 μM e 5 μM) em combinação com a hidroxiclороquina (25 μM) e na condição controle foi utilizado veículo das drogas (etanol/DMSO). O resultado mostra dados de um experimento independentes realizados em duplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$).

A análise por citometria de fluxo de células permeabilizadas e coradas com PI permite também a avaliação do conteúdo de DNA fragmentado. A figura 12-F mostra os resultados obtidos. Observou-se um aumento significativo da porcentagem de DNA fragmentado nas três condições experimentais que utilizam tratamentos combinados de sinvastatina e hidroxiclороquina, sendo especificamente: 3,1% na condição de sinvastatina 0,25 μM /25 μM de

cloroquina e 3,3% na condição de sinvastatina 1 μ M/25 μ M de cloroquina (Figura 12-F). Este resultado sugere a ocorrência de morte celular mesmo nas condições experimentais que foram utilizadas baixas concentrações de sinvastatina em combinação com hidroxicloroquina.

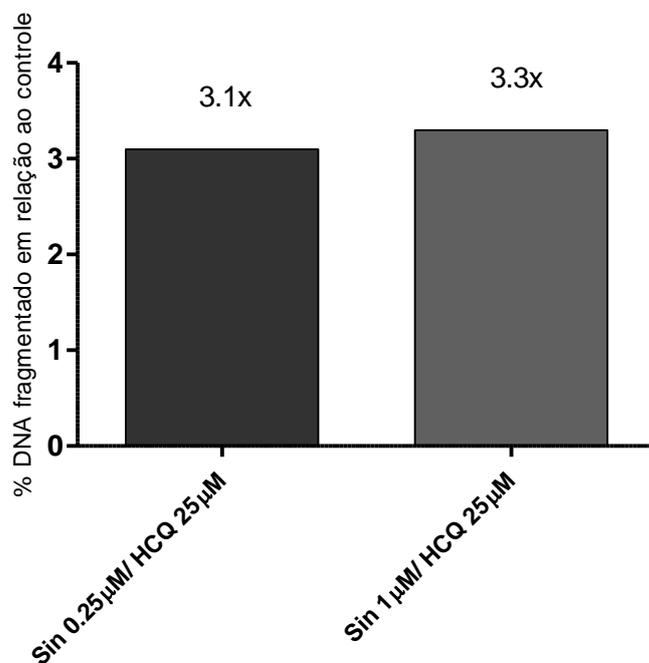


Figura 12-E - PORCENTAGEM DE CÉLULAS COM DNA FRAGMENTADO

FONTE: O autor (2016)

NOTA: O gráfico representa a porcentagem de células da linhagem WM9 com DNA fragmentado de acordo com cada condição de tratamento utilizando a sinvastatina (0,25 μ M, 1 μ M e 5 μ M) em combinação com hidroxicloroquina (25 μ M) comparadas à condição controle (etanol/DMSO). A quantidade de células com DNA fragmentado no controle foi considerada como valor relativo de 1%. O resultado mostra dados de um experimento realizado em duplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais referente a cada concentração de sinvastatina são referentes ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$).

7.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE AUTOFAGIA

A autofagia é um processo fisiológico de degradação de componentes e organelas danificadas presentes no citoplasma, para manutenção da homeostase celular em condições adversas. A avaliação da ocorrência de autofagia nas células WM9 foi realizada pelos seguintes métodos: marcação das células com o corante laranja de acridina, contagem de células marcadas

com LC3-GFP-mCherry e avaliação da expressão de proteínas específicas do processo autofágico pelo método de Western Blotting (LC3-I/II e p62).

7.5.1 Avaliação do processo autofágico utilizando Laranja de Acridina

Existem vários marcadores e proteínas específicas utilizadas para avaliar a ocorrência de autofagia. Uma característica bastante útil é o fato de os autofagossomos maduros e autofagolisossomos serem organelas ácidas, o que pode ser uma vantagem na utilização do corante laranja de acridina, que marca especificamente esses ambientes celulares (citoplasma e núcleo celulares com fluorescência verde e as vesículas ácidas com fluorescência vermelha). Nesse caso, a presença de células verdes com uma fluorescência vermelha elevada as caracteriza como células realizando autofagia, podendo ser quantificada por citometria de fluxo (RANGWALA *et al.*,2014).

Ao marcarmos as células da linhagem WM9 com o corante laranja de acridina observamos uma interferência na intensidade de coloração vermelha, pois as células de melanoma possuem muitos melanossomos no seu interior (que também são vesículas ácidas), não permitindo determinar se teriam mais vacúolos autofágicos a medida em que aumentava-se a concentração de sinvastatina nos tratamentos utilizados ou se eram melanossomos ou outro tipo de vacúolo ácido no interior dessas células. Aparentemente nas células tratadas com sinvastatina a intensidade do corante é maior, porém, já na condição controle ocorre um background (nem todas as células deveriam estar coradas) (Figura 13-A).

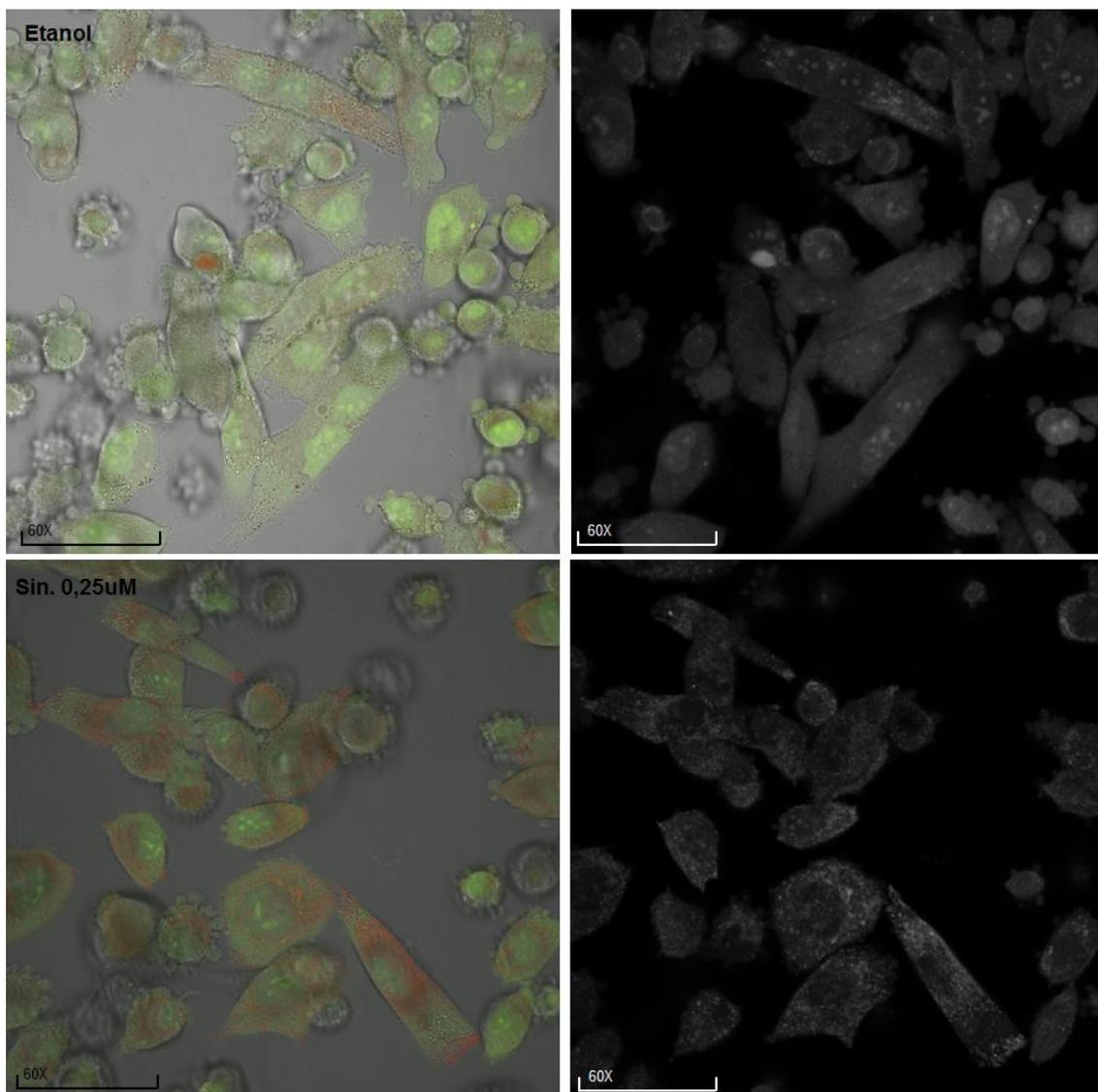


Figura 13-A - Imagem representativa de células WM9 coradas com laranja de acridina

FONTE: O autor 2016

NOTA: Imagens representativas de células WM9 tratadas ou não com sinvastatina por 72h e marcadas com o corante laranja de acridina. A figura mostra células WM9: (A; B) marcadas nas condições controle (etanol) e (C; D) tratada com sinvastatina (0,25µM).

7.5.2 Microscopia confocal de fluorescência

A avaliação da autofagia foi também realizada pela análise da formação do autofagossomo por meio da proteína LC3-GFP. As células WM9 foram transfectadas com o vetor de expressão LC3-PrGFP-mCherry com o kit comercial FuGene (Roche®) e posteriormente visualizadas e contadas em microscopia confocal de fluorescência (Figura 13-B e 13-C). A autofagia foi determinada pela contagem de células autofágicas (células com cinco ou mais vacúolos fluorescentes no seu interior) após o tratamento com a sinvastatina. A

Figura 13-B mostra imagens representativas das células WM9 após transfecção de LC3-GFP-mCherry. As setas indicam os vacúolos autofágicos formados.

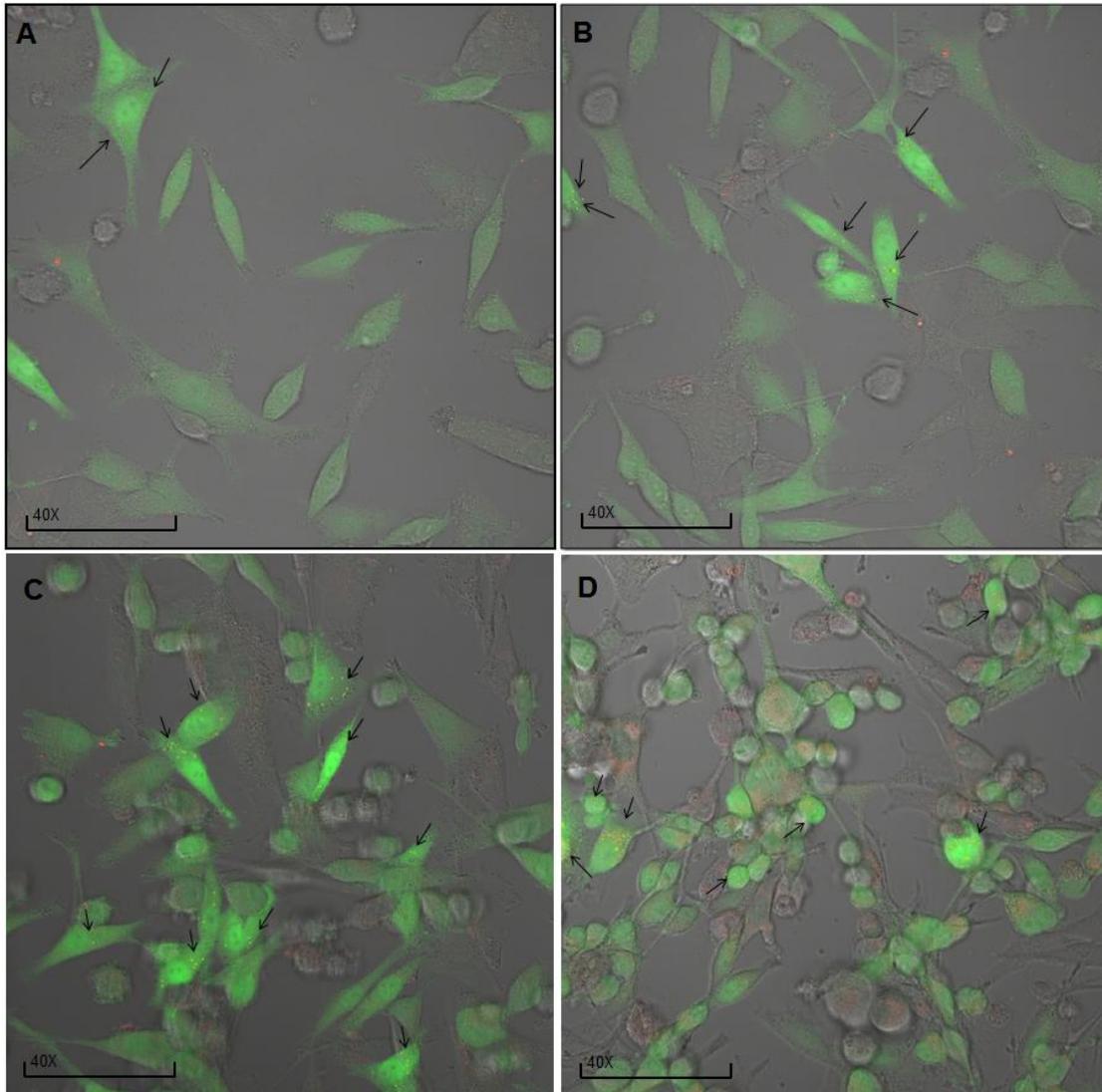


Figura 13-B - Imagem representativa de células WM9 transfectadas com LC3-GFP

FONTE: O autor 2016

NOTA: Imagens representativas de células WM9 após a transfecção com o plasmídeo conjugado com LC3. A figura mostra células WM9 fluorescentes após transfecção com GFP-LC3. (A) controle, (B) tratamento com sinvastatina - 0,25 μ M, (C) tratamento com sinvastatina - 1 μ M e (D) tratamento com sinvastatina - 5 μ M. As setas indicam a presença dos vacúolos autofágicos.

Para análise quantitativa da formação dos vacúolos autofágicos (indicado pelos pontos verdes) após o tratamento das células WM9 com diferentes concentrações de sinvastatina, foi realizada a contagem de células transfectadas com o plasmídeo GFP-LC3 que apresentem pelo menos cinco

pontos fluorescentes no seu interior (indicativo de que são células com fluxo autofágico aumentado). O gráfico a seguir mostra os resultados obtidos da porcentagem de células LC3-GFP com vacúolos fluorescentes após tratamento com sinvastatina e/ou o tratamento combinado de sinvastatina e hidroxiclороquina (Figura 13-C).

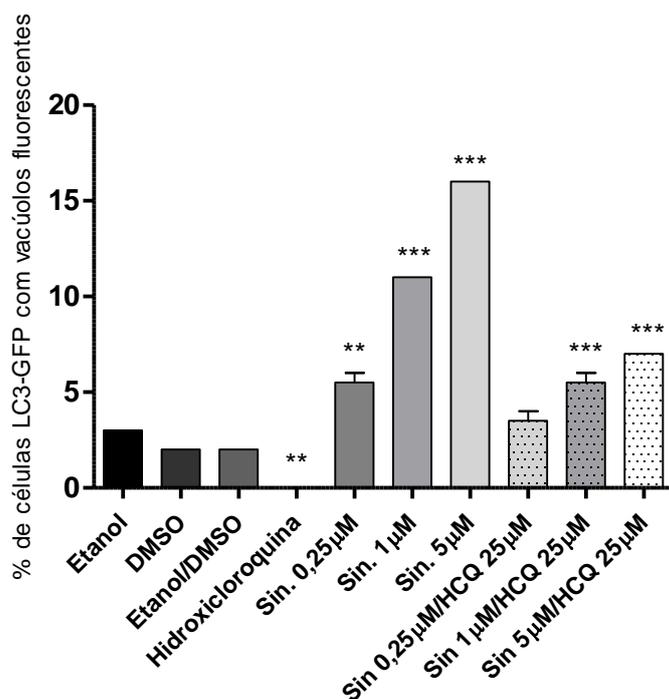


Figura 13-C - Quantificação de células GFP-LC3 com vacúolos fluorescentes

FONTE: O autor 2016

NOTA: As células foram contadas em microscópio de fluorescência com objetiva 40x, em um total de 10 campos por poço (placa de 96 poços). Foi realizada uma contagem de um mínimo de 100 células e dessas, o número de células que possuíam 5 ou mais vacúolos fluorescentes no interior.

De acordo com a figura 13-C, pode-se observar que houve aumento no número de pontos verdes fluorescentes nas células após os tratamentos com sinvastatina isolada, principalmente na concentração de 5µM, em comparação ao controle (etanol). Já quando as células foram tratadas com as combinações de sinvastatina e hidroxiclороquina o aumento do número de vacúolos marcados também foi progressivo conforme o aumento da concentração de sinvastatina utilizada, porém, esse aumento foi significativamente menor em relação aos tratamentos sem o inibidor.

7.5.3 Avaliação da expressão de proteínas de autofagia

A avaliação da expressão de proteínas marcadoras do processo autofágico foi realizada pela metodologia de western blotting. As células WM9 foram tratadas como descrito em Materiais e Métodos. O primeiro anticorpo testado foi LC3 I/II, considerado o principal marcador do processo autofágico. O resultado da expressão proteica para LC3 I/II está representado na Figura 14-A. É possível verificar que o tratamento com sinvastatina na concentração de 0,25 μ M já promove um aumento da expressão de LC3-I/II (ao comparar com a condição controle) e após o tratamento com sinvastatina à 1 μ M e 5 μ M a expressão de LC3-I/II é ainda maior. Dessa maneira, pode-se observar um aumento na expressão de LC3-I/II na linhagem WM9 tratada com sinvastatina em relação às células mantidas na condição controle (aumento diretamente proporcional ao aumento da concentração de sinvastatina).

Na sequência foi realizada a análise da expressão de p62 nas células de melanoma após tratamento com as mesmas concentrações de sinvastatina (Figura 14-A). A proteína p62 está ligada ao conteúdo dentro das vesículas autofágicas antes de ocorrer a degradação. Foi possível observar que à medida que se aumenta a concentração de sinvastatina, a expressão de p62 diminui, o que corrobora com a análise da expressão de LC3-I/II. Juntos, esses dados mostram que à medida que se aumenta a concentração de sinvastatina o processo autofágico está sendo estimulado.

Ainda, tanto LC3-I/II como p62 também foram avaliados nas células WM9 após tratamentos combinados de sinvastatina com a hidroxicloroquina. Os resultados estão indicados na Figura 14-B. Foi possível observar que quando o processo autofágico está inibido, o tratamento com sinvastatina na concentração de 0,25 μ M combinada com hidroxicloroquina não promove expressão de LC3-I/II. Ainda, após tratamento das células WM9 com 1 e 5 μ M de sinvastatina em combinação com hidroxicloroquina a expressão de LC3-I/II aumenta em relação à menor concentração de sinvastatina utilizada (0.25 μ M), porém, a expressão não é alterada em relação ao controle (etanol/DMSO). Já no caso de p62, nas condições experimentais onde a autofagia foi inibida, a expressão dessa proteína se mantém semelhante para qualquer concentração

de sinvastatina utilizada nos tratamentos quando comparada à condição controle.

Juntos, esses resultados mostram que tratamento com sinvastatina em diferentes concentrações aumenta progressivamente o fluxo autofágico nas células WM9, evidenciado pelo aumento de LC3-I/II e diminuição da expressão de p62, e ao utilizarmos um inibidor de autofagia a expressão das proteínas é alterada, levando a uma diminuição da expressão de LC3-I/II e acúmulo de p62 quando comparado com a condição sem hidroxicloroquina.

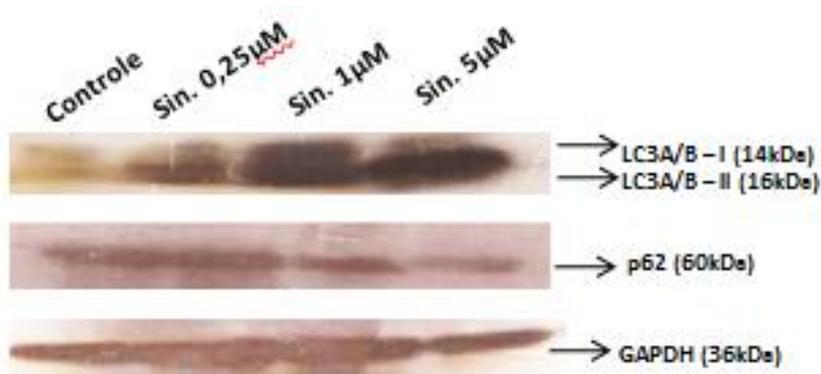


Figura 14-A - EXPRESSÃO DE LC3-I/II E p62 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA EM CÉLULAS DA LINHAGEM WM9

FONTE: O autor (2016)

NOTA: A figura mostra a expressão das proteínas LC3-I/II e p62 em células WM9 tratadas em diferentes concentrações de sinvastatina. Extratos de proteína total foram obtidos e amostras relativas à condição controle (Etanol) e condições de tratamentos com sinvastatina nas concentrações de 0,25 μM, 1 μM e 5 μM foram submetidos à SDS – Page, seguido de detecção por Western-Blotting. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno da quantidade de proteína por condição experimental.

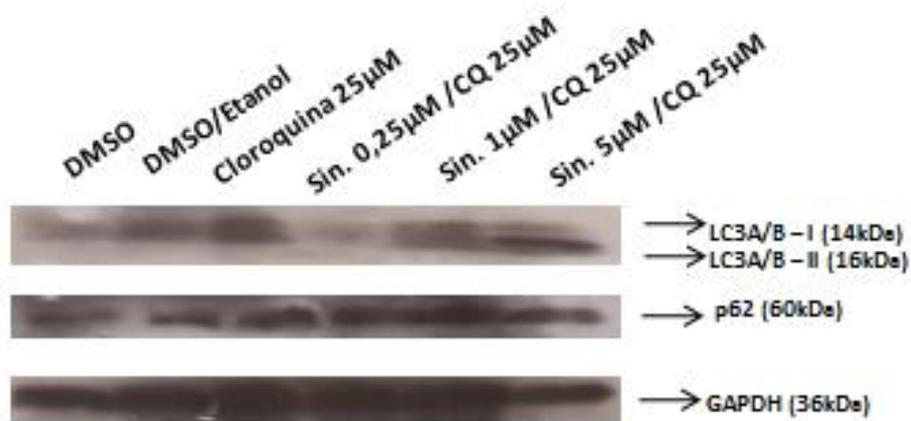


Figura 14-B - EXPRESSÃO DE LC3-I/II E p62 EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM A COMBINAÇÃO DE SINVASTATINA E HIDROXICLOROQUINA

FONTE: O autor (2016)

NOTA: A figura mostra a expressão das proteínas LC3-I/II e p62 em células WM9 tratadas as diferentes combinações de sinvastatina e hidroxiclороquina. Extratos de proteína total foram obtidos e amostras relativas às condições controle (DMSO e Etanol/DMSO) e condições de tratamentos com sinvastatina nas concentrações de 0,25µM, 1µM e 5µM em combinação com cloroquina 25µM foram submetidos à SDS –Page, seguido de detecção por Western-blotting. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno da quantidade de proteína por condição experimental.

8. DISCUSSÃO

O melanoma metastático é um tipo de neoplasia extremamente agressivo, com alto índice de mortalidade e altamente resistente às terapias clássicas. Alguns processos celulares, como a autofagia, estão relacionados com a resistência tumoral (MARQUEZ-RODAS *et al.*, 2001; VERMA *et al.*, 2006).

Recentes estudos mostram que a sinvastatina é capaz de induzir morte celular por apoptose e parada do ciclo celular em diversas linhagens tumorais (ACOSTA e GIL, 2012).

Com base nesses estudos, buscamos avaliar a citotoxicidade da sinvastatina em células de melanoma humano metastático. Nossos resultados mostram um perfil de redução da viabilidade celular à medida que se utiliza concentrações crescentes de sinvastatina e este perfil foi semelhante nos três métodos utilizados (MTT, cristal violeta e vermelho neutro), o que sugere que o tratamento das células WM9 e WM1617 com sinvastatina foi citotóxico, principalmente nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M.

Em nosso grupo, a redução de viabilidade em células WM9 havia sido mostrada apenas pelo método de cristal violeta e em concentrações menores de sinvastatina (de 0,05 até 1 μ M) (GUTERRES *et al.*, 2013).

Demonstramos também que após o tratamento com sinvastatina houve um aumento da porcentagem de células na fase G₀-G₁ do ciclo celular de forma concentração dependente (Figura11-A). Este aumento foi acompanhado pela redução da quantidade de células na fase G₂-M, o que indica uma alteração na progressão das células pelas diferentes fases do ciclo. Esse dado é semelhante aos resultados anteriores de Guterres *et al.*, 2013, onde foi visto que as células WM9 tratadas com 0,25 μ M até 1 μ M de sinvastatina induzem o processo de senescência. Além disso, foi possível avaliar a porcentagem de DNA fragmentado (Figura 11–C) em cada condição do tratamento e notou-se que houve um aumento significativo de fragmentação do DNA (cerca de 10x mais em relação ao controle) após tratamento com a maior concentração de sinvastatina utilizada (5 μ M).

Desta forma, pode-se sugerir que a redução da viabilidade celular observada nas células de melanoma está sendo causada por alteração na progressão do ciclo celular e indução de morte e que ocorre de forma

dependente da concentração de sinvastatina utilizada, comprovando a citotoxicidade da droga.

Um estudo realizado com diversas linhagens celulares de melanoma (A375M, G361, C8161, GAK e MMac) mostrou que o uso de uma concentração relativamente alta de sinvastatina (10 μ M) é capaz de induzir aumento da porcentagem de células na fase G₀-G₁ do ciclo celular (ACOSTA e GIL, 2012).

Os dados atuais de avaliação da citotoxicidade da sinvastatina (Figuras 9 A, B e C e Tabela 1) permitem calcular um índice arbitrário autofágico (MARTINS *et al.*, 2013). Os resultados evidenciaram o aumento significativo do fluxo autofágico (2,5 AAU) após o tratamento das células WM9 com sinvastatina na concentração de 5 μ M por 72 horas (Figura 10-A). Isso sugere que quanto maior a concentração de sinvastatina utilizada no tratamento, maior o fluxo autofágico nas células.

Com base nesses resultados, propomos que o tratamento das células de melanoma humano com sinvastatina leva a um aumento do fluxo autofágico como uma estratégia de tentativa de sobrevivência celular. Vale citar que as linhagens utilizadas nesse trabalho apresentam mutação em BRAF^{V600E}, associada a um fenótipo mais agressivo desse tipo de tumor.

Corroborando nossos resultados, foi visto que células de melanoma contendo a mutação em BRAF quando tratadas com o quimioterápico vemurafenib observa-se a indução de autofagia (SOSMAN *et al.*, 2012). Isso sugere, mais uma vez, o envolvimento do processo autofágico no desenvolvimento do melanoma e na resistência a quimioterápicos convencionais. Porém, é muito interessante destacar entre nossos resultados que mesmo na condição onde se evidenciou o fluxo autofágico aumentado, o tratamento com sinvastatina foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das células de melanoma e de promover alteração na progressão do ciclo celular e indução de morte.

Para efeito de comparação foram realizados os mesmos ensaios de viabilidade celular, cálculo do índice autofágico, análise da progressão do ciclo celular e porcentagem de DNA fragmentado em uma outra linhagem de melanoma humano metastático – linhagem WM1617. Os resultados corroboram os dados apresentados para a linhagem WM9, evidenciando a

ação citotóxica da sinvastatina em modelo de melanoma humano e sugerindo a modulação do processo autofágico por sinvastatina.

Para avaliarmos a formação do autofagossomo, realizou-se uma transfecção de células WM9 com um plasmídeo que codifica para uma proteína de fusão contendo a sequência da proteína GFP-mCherry em fusão com a sequência da proteína LC3-I. Após os tratamentos com sinvastatina, quando um sinal pró-autofágico ocorre, LC3-I é clivada e direcionada à membrana dos autofagossomos (visualizados como pontos fluorescentes mais intensos no citoplasma da célula que representam a proteína de fusão LC3-GFP-mCherry nos autofagossomos). Foram consideradas células em processo autofágico aquelas que possuíam pelo menos 5 vacúolos fluorescentes intracelulares. O tratamento com sinvastatina induziu a formação de autofagossomos nas células WM9 (Figura 13-B). A relação N° células com pontos fluorescentes/N° células total mostrou que na medida em que se aumentou a concentração de sinvastatina, aumentou também o número de células com 5 ou mais vacúolos autofágicos em seu interior (Figura 13-C). Esse resultado corrobora os dados anteriores que descrevem o índice autofágico e sugere que o tratamento com a sinvastatina está induzindo autofagia de maneira dependente da concentração.

Por fim, avaliamos a expressão de proteínas específicas para autofagia, pelo método de western blotting. Sabe-se que o principal marcador da ocorrência de autofagia nas células é LC3-I/II, já que está presente na membrana do autofagolisossomo (sinalizando então que o processo ocorreu completamente). Observamos que em comparação ao controle (etanol), o tratamento com a sinvastatina promoveu aumento na expressão de LC3-I/II proporcional ao aumento da concentração da droga (Figura 14-A).

Além dessa proteína, foi analisada a expressão de p62 (proteína diretamente ligada ao conteúdo a ser degradado dentro das vesículas autofágicas) nas células WM9 após tratamento com as mesmas condições (Figura 14-A). Foi possível observar que conforme aumentamos a concentração de sinvastatina, a expressão de p62 foi reduzida, o que corrobora com a análise da expressão de LC3-I/II, pois após a degradação, a proteína p62 não poderia estar sendo expressa já que é degradada junto com o conteúdo das vesículas.

Vale destacar que com o uso da rapamicina, um ativador clássico do processo autofágico e amplamente utilizado como controle positivo em ensaios *in vitro*, é observado o mesmo perfil de modulação da expressão dos genes marcadores chaves de autofagia: aumento da expressão de LC3-I/II e diminuição da expressão de p62 (RUSTEN e STENMARK, 2010.).

A análise desses dois marcadores em nosso modelo de estudo sugere que quando as células de melanoma foram tratadas com sinvastatina, o fluxo autofágico foi induzido e aumentou conforme aumentou-se a concentração da droga, sugerindo que a autofagia seja um mecanismo de resposta à ação citotóxica do composto. Nossa sugestão é que as células de melanoma humano estejam respondendo ao tratamento com sinvastatina induzindo o processo autofágico na tentativa de promover sobrevivência das células tumorais frente ao agente citotóxico.

No nosso grupo, observou-se anteriormente que após tratamento das células WM9 com sinvastatina na concentração de 0,25µM as células tumorais entram em processo de senescência (param de proliferar), com concomitante aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e aumento da expressão de p21. Aumentando a concentração de sinvastatina para 1µM ainda há ocorrência de senescência, aumento ainda maior das espécies reativas de oxigênio e já há indícios de morte celular (GUTERRES *et al.*, 2013). Com os resultados deste trabalho, podemos sugerir que o tratamento com sinvastatina está modulando simultaneamente o processo autofágico, onde utilizando o tratamento com sinvastatina na concentração de 0,25µM já é possível observar um aumento da expressão de LC3-I/II (ao comparar com o controle, etanol) e nas concentrações de 1µM e 5µM essa expressão é ainda maior, indicando fluxo autofágico aumentado (Figura 14-A).

Para investigarmos se o processo autofágico estaria influenciando o mecanismo de ação antitumoral da sinvastatina, utilizaram-se tratamentos combinados de sinvastatina com hidroxicloroquina (importante inibidor de autofagia, evita a fusão do autofagossomo com o lisossomo ao reduzir a acidez lisossomal).

Nossos resultados mostram que utilizando a concentração de 0,25 µM de sinvastatina em combinação com 25 µM de hidroxicloroquina a redução do número de células viáveis é mais acentuada em comparação com o tratamento

com a sinvastatina isolada (Figuras 12-A, 12-B e 12-C). Além disso, utilizando 5 μ M de sinvastatina em combinação com a hidroxicloroquina 25 μ M a redução da viabilidade celular também é maior comparado aos 5 μ M de sinvastatina isolada (resultados equivalentes para os três métodos utilizados). Isso mostra que após a inibição da autofagia, as células de melanoma humano WM9 se tornaram mais sensíveis aos efeitos citotóxicos da sinvastatina.

Estudos recentes com células de melanoma tratadas com compostos citotóxicos e combinações com hidroxicloroquina comprovam que os tratamentos combinados utilizando o inibidor reduzem significativamente a viabilidade celular (JUNCO *et al.*, 2014), o que corrobora com os dados obtidos em nosso trabalho mostrando que a autofagia tem um papel importante na sobrevivência tumoral.

Em relação à progressão das células WM9 pelas fases do ciclo celular constatamos que após o tratamento combinado, a modulação sobre o ciclo celular foi completamente diferente de quando as células foram tratadas apenas com sinvastatina (Figura 11-A e Figura 12-D). Ao tratarmos com sinvastatina isolada observamos aumento progressivo de células em G_0 - G_1 e diminuição em G_2 -M de maneira dependente da concentração de sinvastatina. Já com o tratamento combinado, observamos que há uma tendência de redução na porcentagem de células em todas as fases do ciclo conforme aumentamos a concentração de sinvastatina e que já não há aumento do número de células em G_0 - G_1 , o que salienta que o efeito é completamente diferente do efeito visto após tratamento com a sinvastatina isolada.

Observamos também que com o tratamento combinado, já nas menores concentrações houve aumento da porcentagem de células com DNA fragmentado comparado aos tratamentos com a sinvastatina isolada.

Corroborando nossos resultados, Goodall *et al.* (2014) mostraram que o uso do inibidor de autofagia VATG-027 sensibilizou células de melanoma humano, com o oncogene mutante BRAF^{V600E}, à ação do quimioterápico vemurafenib, promovendo a diminuição da viabilidade celular e o aumento de morte celular por apoptose.

Nas condições onde se utilizou apenas o inibidor de autofagia, foi possível observar que o tratamento efetivamente reduziu o número de células com vacúolos fluorescentes (não foi possível identificar nenhuma célula com pontos

fluorescentes no citoplasma). Ainda, avaliando o tratamento combinado, a quantidade de células com vacúolos autofágicos diminuiu em comparação ao tratamento com sinvastatina isolada, embora o número de vacúolos ainda aumente de forma dependente da concentração de sinvastatina no tratamento combinado (Figura 13-C).

A expressão de LC3-I/II e p62 também foi avaliada após os tratamentos combinados (Figura 14-B). Quando o processo autofágico está inibido, utilizando a concentração de 0,25 μ M de sinvastatina combinada com hidroxicloroquina, não há expressão de LC3-I/II, enquanto nos tratamentos com 1 e 5 μ M de sinvastatina em combinação com hidroxicloroquina a expressão de LC3-I/II aumenta em relação à combinação utilizando sinvastatina na menor concentração (0,25 μ M). Porém, vale destacar que esse aumento é menos intenso se comparado com a condição de tratamento isolado de 0,25 μ M de sinvastatina. Já no caso de p62, a expressão dessa proteína se mantém semelhante nas condições utilizando tratamentos combinado de sinvastatina e hidroxicloroquina em comparação com o controle, sugerindo a possível inibição da degradação de p62 observada anteriormente utilizando tratamentos isolados com sinvastatina (Figuras 14-A e 14-B).

A modulação na expressão das proteínas LC3 e p62 nas condições onde foi utilizado o tratamento combinado demonstra que o fluxo autofágico foi realmente interrompido pelo uso do inibidor e isso torna as células de melanoma humano WM9 mais sensíveis aos efeitos citotóxicos da sinvastatina.

Correlacionando os resultados obtidos nesse trabalho com Guterres *et al.* 2013, pode-se ilustrar, de forma resumida, possíveis mecanismos de ação da sinvastatina em células de melanoma humano metastático (Figura 15).

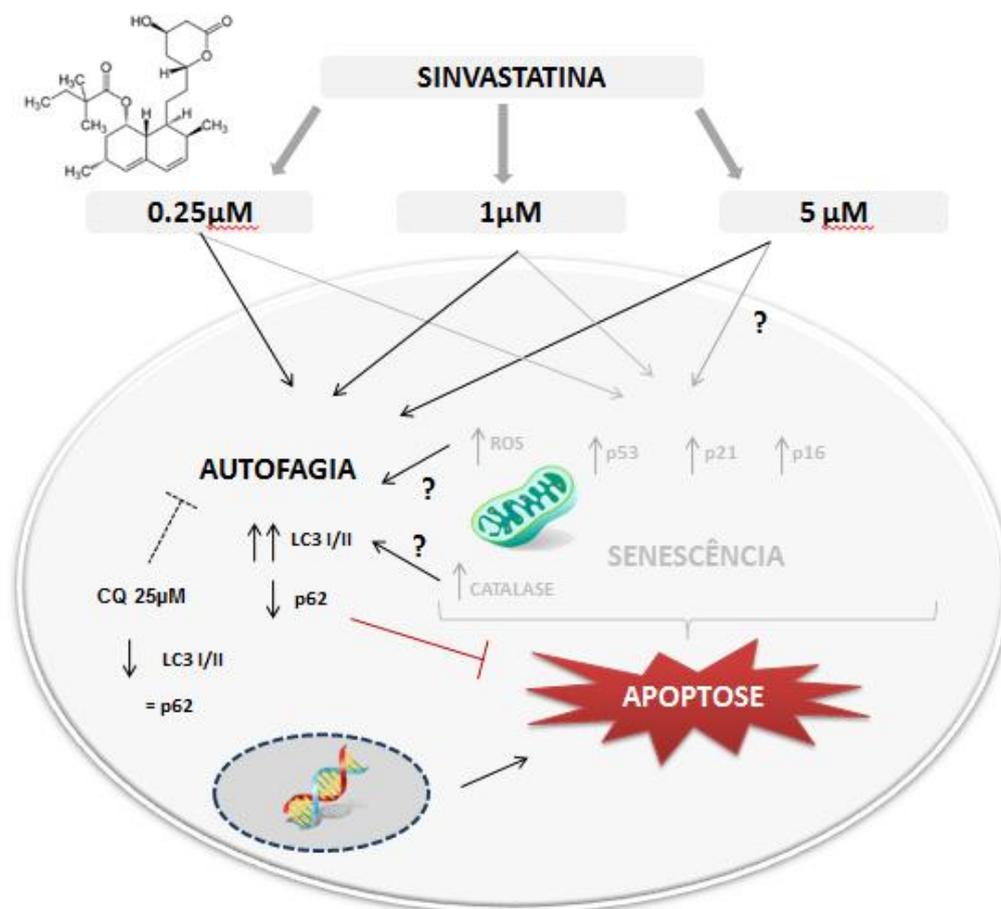


Figura 15: PROPOSTA DO MECANISMO DE AÇÃO DA SINVASTATINA EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO METASTÁTICO
 FONTE: O autor 2016

Sugerimos que a autofagia está sendo induzida pelo tratamento com sinvastatina de maneira concentração-dependente e parece mediar um mecanismo de resistência tumoral em modelo de melanoma humano.

Sabe-se que o tratamento de células de melanoma humano com sinvastatina é capaz de promover aumento de espécies reativas de oxigênio e indução de senescência celular (efeitos dependentes da concentração celular) (Guterres *et al.*, 2013).

Apesar da indução da resposta autofágica como uma tentativa de sobrevivência das células de melanoma frente ao estresse citotóxico gerado pela droga, a sinvastatina está sendo capaz de reduzir significativamente a viabilidade das células de melanoma independente do aumento do fluxo autofágico. Esse fato torna a sinvastatina uma possibilidade interessante a ser explorada, visando seu uso como um agente terapêutico alternativo e/ou adjuvante a quimioterápicos.

9. CONCLUSÕES

Sabendo que a principal meta das terapias convencionais contra o câncer é a indução de morte celular por apoptose, que um dos obstáculos à terapia é o surgimento de resistência tumoral e que a autofagia está relacionada com esse mecanismo, buscamos caracterizar a modulação do processo autofágico mediado por sinvastatina em modelo de melanoma humano e relacionar esses dados com a ocorrência de morte celular.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que o tratamento das células de melanoma humano com sinvastatina leva a um aumento do fluxo autofágico, como uma tentativa de sobrevivência celular. Contudo, é muito interessante destacar que mesmo quando se evidenciou o fluxo autofágico aumentado, o tratamento com sinvastatina foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das células WM9 e de promover alteração na progressão do ciclo celular e indução de morte. Além disso, a inibição do fluxo autofágico após tratamento das células WM9 com hidroxicloroquina tornam as células de melanoma humano WM9 mais sensíveis aos efeitos citotóxicos da sinvastatina, levando a um aumento da porcentagem de células com DNA fragmentado, provavelmente levando essas células à morte por apoptose.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, J. C.; GIL, J. **Senescence: a new weapon for cancer therapy.** Trends Cell Biol, v. 22, p. 211-219, 2012.

ACS.American Cancer Society. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em janeiro 2016.

AHERN, T.P.; LASH, T.L.; DAMKIER, P.; CHRISTIANSEN, P.M. **Statins and breast cancer prognosis: evidence and opportunities.** Lancet Oncology, v.10, p. 461-468, 2014.

BARREIRO, E. J.; FRAGA C. A. M. **Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos.** Porto Alegre: Artmed, 2008.

BERWICK, M.; ERDEI, E.; HAY, J. Melanoma epidemiology and public health.**Dematologic Clinics**, v. 27, n. 2, p. 205- 214, 2009.

BRECH, A.; AHLQUIST, T.; LOTHE, R.A. e STENMARK, H. **Autophagy in tumoursupression and promotion.**Molecular oncology, v.3, p.366-375, 2009.

BRESLOW, A. **Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma.**Ann Surg, v. 172, p. 902-908, 1970.

CAFFORIO, P.; DAMMACCO, F.; GERNONE, A.; SILVESTRIS, F. **Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells.** Carcinogenesis, v. 26, p. 883-891, 2005.

CHAE, Y.K.; YOUSAF, M.; MALECEK, M.; CARNEIRO, B.; CHANDRA, S.; KAPLAN, J.; KALYAN, A.; SASSANO, A.; PLATANIAS, L.; GILES, F. **Statins as Anti-Cancer Therapy; Can We Translate Preclinical and Epidemiologic Data into Clinical Benefit?**. Discovery Medicine, v. 20, p. 413-427, 2015.

CHAN, K. K.; OZA, A. M.; SIU, L. L.**The statins as anticancer agents.**Clin Cancer Res, v. 9, p. 10-19, 2003.

CICHOREK, M. *et al.* Skin melanocytes: biology and development. **Postepy Dermatologia I Alergologii**, v. 30, p. 30-41, 2013.

CLARK, W. H., JR. *et al.* **A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma.** Hum Pathol, v. 15, n. 12, p. 1147-65, Dec 1984.

COSSE, J.P. e MICHIELS, C. **Tumour Hypoxia Affects the Responsiveness of Cancer Cells to Chemotherapy and Promotes Cancer Progression.** Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, v.8, p.790-797, 2008.

DAVIDS, L. M. *et al.* **Melanomas displays increased cytoprotection to hypericin- mediated cytotoxicity through the induction of autophagy.**Cell Biology International, v. 33, v. 1065-1072, 2009.

DEL BELLO, B. *et al.* **Cisplatin-induced apoptosis inhibits autophagy, which acts as a pro-survival mechanism in human melanoma cells.** *Plos One*, v.8, n.2, p. 1-14, 2013.

DEMIERRE, M. F.; SONDAK, V. K. **Cutaneous melanoma: pathogenesis and rationale for chemoprevention.** *Crit Rev OncolHematol*, v. 53, p. 225-239, 2005.

ELGENDY, M. e MINUCCI, S. **A novel autophagy-independent, oncosuppressive function of BECN1: degradation of MCL1.** *Autophagy* 11, 581–582, 2015.

EWALD, J. A.; DESOTELLE, J. A.; WILDING, G.; JARRARD, D. F. **Therapy-induced senescence in cancer.** *J Natl Cancer Inst*, v. 102, p. 1536-1546, 2010.

FENG, Y.; HE, D.; YAO, Z.; KLIONSKY, D. J. **The machinery of macroautophagy.** *CellResearch*, v. 24, p. 24- 41, 2014.

FILLIPI-CHIELA, E.C. **A autofagia e o ciclo celular desempenham papel central no mecanismo de ação do resveratrol e do co-tratamento com temozolomida em células de linhagem de glioblastoma humano.** Dissertação de mestrado em biologia celular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GANDINI, S. *et al.* **Meta- analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I common and atypical naevi.** *European Journal of Cancer*, v. 41, p. 28- 44, 2005.

GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A.; SAIAG, P.; MIDDLETON, M.; SPATZ, A.; (...) EGGERMONT, A. **Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus based interdisciplinary guideline.** *Eur J Cancer*, v. 46, p. 270-283, 2010.

GARIBYAN, L.; FISHER, D. E. **How sunlight causes melanoma.** *Current Oncology Reports*, v. 12, n. 5, p. 319- 326, 2010.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. **Determination of cell number in monolayer cultures.** *Analytical Biochemistry*, v. 159, p. 109-113, 1986.

GIULIANI, C. M.; DASS, C. R. **Autophagy and cancer: taking the 'toxic' out of cytotoxics.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, p. 777- 789, 2013.

GLYNN, S. A.; O'SULLIVAN, D.; EUSTACE, A. J.; CLYNES, M.; O'DONOVAN, N. **The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells.** *BMC Cancer*, v. 8, p. 9, 2008.

GOODAL, M.L.; WANG, T.; MARTIN, K.R.; KORTUS, M.G.; KAUFFMAN, A.L.; TRENT, J.M.; GATELY, S. e MACKEIGAN, J.P. **Development of potent autophagy inhibitors that sensitize oncogenic BRAF V600E mutant melanoma tumor cells to vemurafenib.** *Autophagy*, v.10, p.1120-1136, 2014.

GRAY-SCHOPFER, V., WELLBROCK, C., MARAIS, R. **Melanoma biology and new targeted therapy.** *Nature*, v. 445, n. 7130, p. 851-7, Feb 22 2007.

GUMP, J.M.; THORBURN, A. Autophagy and apoptosis – what's the connection? *Trends Cell Biology*, v.21, n.7, p. 387-392, 2011.

GUTERRES, F.A.L.B. **Senescência induzida por sinvastatina em modelo de melanoma humano: envolvimento de espécies reativas de oxigênio e da via p53/p21.** Tese de doutorado em Ciências – Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

HOQUE, A.; CHEN, H.; XU, X. C. **Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 17, p. 88-94, 2008.

INCA. **INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER.** Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: janeiro 2016.

JIANG, P.; MUKTHAVARAM, R.; CHAO, Y.; NOMURA, N.; BHARATI, I.; FOGAL, V.; PASTORINO, S.; TENG, D.; CONG, X.; PIGLE, S.C.; KAPOOR, S.; SHETTY, K.; AGRAWAL, A.; VALI, S.; ABBASI, T.; CHIEN, S.; KESARI, S. **In vitro and in vivo anticancer effects of mevalonate pathway modulation on human cancer cells.** *British Journal of Cancer*, v. 111, p. 1562-1571, 2014.

JUNCO, J.; RAMIREZ, A.M.; MALIK, G.; WEI, S.; KIM, D.J.; LIANG, H.L. e SLAGA, T. **Ursolic acid and resveratrol synergize with chloroquine to reduce melanoma cell viability.** *Melanoma Research*, v. 25, p. 103-112, 2014.

KANG, S. *et al.*, **Simvastatin and lovastatin inhibit breast cell invasion induced by H-Ras.** *Oncology reports*, v.21, p. 1317-1322, 2009.

KANZAWA T, GERMANO IM, KOMATA T, ITO H, KONDO Y, KONDO S. **Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells.** *Cell Death Differ*, v.11, p.448-457, 2004.

KATAYAMA M, KAWAGUCHI T, BERGER MS, PIEPER RO. **DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells.** *Cell Death Differ*, v.14, p.548-558, 2007.

KAZA, N. *et al.* **Autophagy in brain tumors: A new target for therapeutic intervention.** *Brain Pathology*, v.22, p. 89-98, 2012.

KIMMELMAN, A. **The dynamic nature of autophagy in cancer.** *Genes & Development*, v.25, p.1999-2010, 2011.

KING, S. **The best selling drugs of all time; Humira joins the elite.** Forbes. Disponível em: <<http://www.forbes.com/sites/simonking/2013/01/28/the-best-selling-drugs-of-all-time-humira-joins-the-elite/>> Acesso em: 19 jul 2014.

KLIONSKY, D.J. *et al.* **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.** *Autophagy*, v.8, n.4, p. 445-544, 2012.

LEE, J.; JUNG, K. H.; PARK, Y. S.; AHN, J. B.; SHIN, S. J.; IM, S. A., (...) KANG, W. K. **Simvastatin plus irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin (FOLFIRI) as first-line chemotherapy in metastatic colorectal patients: a multicenter phase II study.** *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 64, p. 657-663, 2009.

LENNERNAS, H.; FAGER, G. **Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences.** *Clin Pharmacokinet*, v. 32, p. 403-425, 1997.

LI, X. *et al.* **Rapamycin induces autophagy in the melanoma cell line M14 via regulation of the expression.** Levels of Bcl-2 and Bax. *Oncology Letters*, v.5, p. 167-172, 2013.

LI, Y. *et al.* **The amplified cancer gene LAPT4B promotes tumor growth and tolerance to stress through the induction of autophagy.** *Autophagy*, v.8, p. 273-274, 2012.

LI, Z.; JIANG, K.; ZHU, X.; LIN, G.; SONG, F.; ZHAO, Y.; PIAO, Y.; LIU, J.; CHENG, W.; BI, X.; GONG, P.; SONG, Z. **Encorafenib (LGX818), a potent BRAF inhibitor, induces senescence accompanied by autophagy in BRAFV600E melanoma cells.** *Cancer Letters*, p. 332-344, v.370, 2016.

LIANG, Y.; CHANG, C.; HUNG, C.; CHEN, T.; HUANG, T. e HSU, Y. **Preclinical Activity of Simvastatin Induces Cell Cycle Arrest in G1 via Blockade of Cyclin D-Cdk4 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC).** *Int. J. Mol. Sci.*, v.14, p. 5806-5816, 2013.

LIU, L. **MAP1S enhances autophagy to suppress tumorigenesis.** *Autophagy*, v.8, n.2, p. 278-280, 2012.

LIU, H., HE, Z., VON RUTTE, T., YOUSEFI, S., HUNGER, R.E. e SIMON, H.U. **Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma.** *Sci. Transl. Med.* 5, p. 202-123, 2013.

LO, J. A.; FISHER, D. E. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 945- 949, 2014.

LOCHHEAD P. e CHAN A. **Statins and colorectal cancer.** *Clin Gastroenterol Hepatol.* v. 11, p.109-114, 2013.

LUM, J. J. *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell**, v. 120, n. 2, p. 237- 248, 2005.

MA XH, PIAO S, WANG D, McAFEE QW, NATHANSON KL, LUM JJ, LI LZ, AMARAVADI RK. **Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma.** Clin Cancer Res, v.17, p.3478-3489, 2015.

MA, X.H. *et al.* **Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma.** J. Clin. Invest. 124, 1406–1417, 2014.

MAES, H. *et al.* Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. **Trends in molecular medicine**, v. 19, n. 7, p. 428- 446, 2013.

MAES, H.; AGOSTINIS, P. Autophagy and mitophagy interplay in melanoma progression. **Mitochondrion**, v. 19, p. 58-68, 2014.

MARINO, M.L. **Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells.** Cell death and disease, v.1, 2010.

MARQUEZ-RODAS, I. *et al.* A new era in the treatment of melanoma: from biology to clinical practice. **Clinical and Translational Oncology**, v. 13, n. 11, p. 787-92, 2011.

MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V. K.; WHITE, E. Role of autophagy in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 961- 967, 2007.

MELÉNDEZ, A.; LEVINE, B. **Autophagy in C. elegans***. Wormbook, 2009.

MEYLE, K. D.; GULDBERG, P. **Genetic risk factors for melanoma.** Hum Genet, v. 126, p. 499-510, 2009.

MILLER, A. J., MIHM, M. C., JR. **Melanoma.** N Engl J Med, v. 355, n. 1, p. 51-65, Jul 6 2006.

MISIRKIC, M.; JANJETOVIC, K.; VUCICEVIC, L.; TOVILOVIC, G.; RISTIC, B.; VILIMANOVICH, U.; HARHAJI-TRAJKOVIC, L.; SUMARAC-DUMANOVIC, M.; MICIC, D.; BUMBASIREVIC, V. e TRAJKOVIC, V. **Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro antiglioma effects of simvastatin.** Pharmacological research, v.65, p. 111-119, 2012.

NIELSEN, S. F.; NORDESTGAARD, B. G.; BOJESSEN, S. E. **Statin use and reduced cancer-related mortality.** N Engl J Med, v. 367, p. 1792-1802, 2012.

OSMAK, M. **Statins and cancer: current and future prospects.** Cancer Lett, v. 324, p. 1-12, 2012.

PANKIV, S.; CLAUSEN, T.H.; LAMARK, T.; BRECH, A.; BRUUN, J.; OUTZEN, H.; OVERVATN, A.; BJOROY, G.; JOHANSEN, T. **p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy**. The journal of biological chemistry, v.282, p. 24131-24145, 2007.

PLONKA, P. M. *et al.* What are melanocytes really doing all day long...?. Controversies in **experimental dermatology**, v. 18, p. 799- 819, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale: Farmacologia**. Elsevier: Rio de Janeiro, 2006.

RANGWALA, R.; LEONE, R.; CHANG, Y.C.; FECHER, L.A.; SCHUCHTER, L.M.; KRAMER, A.; TAN, K.S.; HEITJAN, D.F.; RODGERS, G.; GALLAGHER, M.; PIAO, S. TROXEL, A.B.; EVANS, T.L.; DeMichele, A.M.; NATHANSONS, K.L.; O'DWYER, P.J.; KAISER, J.; PONTIGGIA, L.; DAVIS, L.E. e AMARAVAD, R.K. **Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma**.Autophagy v.10, p.1369–1379, 2014.

REILLY, T. P. *et al.* Comparison of the In Vitro Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803-810, 1998.

RIGEL, D. S.; RUSSAK, J.; FRIEDMAN, R. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. **CA: a cancer journal for clinicians**, v.60, n.5, p. 301-316, 2010.

ROHWER, N. e CRAMER, T. **Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways**.Drug Resistance Updates, v.14, p.191–201, 2011.

ROSENFELDT, M.T.; RYAN, K.M.**The multiple roles of autophagy in cancer**.Carcinogenesis, v.32, n.7, p. 955-963, 2011.

RUSSO, A. E.; TORRISI, E.; BEVELACQUA, Y.; PERROTTA, R.; LIBRA, M.; MCCUBREY, J. A.; (...) MALAPONTE, G. **Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review)**. Int J Oncol, v. 34, p. 1481-1489, 2009.

RUSTEN, E. e STENMARK, H. **p62, an autophagy hero or culprit?** Nature Cell Biology, v.12, p.207-209, 2010.

SAITO, A.; SAITO, N.; MOL, W.; FURUKAWA, H.; TSUTSUMIDA, A.; OYAMA, A.; (...) YAMAMOTO, Y. **Simvastatin inhibits growth via apoptosis and the induction of cell cycle arrest in human melanoma cells**. Melanoma Res, v. 18, p. 85-94, 2008.

SAITO, R.; TORTELLI, T.C.; JACOMASSI, M.D.; OTAKE, A.H.; CHAMMAS, R. **Emerging targets for combination therapy in melanomas.** Febs letters, v. 589, p. 3438-3448, 2015.

SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. Cellular and molecular biology of human melanoma. **Cancer biology and therapy**, p. 14- 17, 2002.

SCHACHTER, M. **Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update.** FundamClinPharmacol, v. 19, p. 117-125, 2005.

SMALLEY, K. S. **Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy.** J Invest Dermatol, v. 130, p. 28-37, 2010.

SOENGAS, M. **Mitophagy or how to control the Jekyll and Hyde embedded in mitochondrial metabolism: implications for melanoma progression and drug resistance.** Pigment cell and Melanoma, v.5, n.6, p. 721-731, 2012.

SOLOMON, K. R.; FREEMAN, M. R. **Do the cholesterol-lowering properties of statins affect cancer risk?** Trends in endocrinology and metabolism: TEM, v. 19, p. 113-121, 2008.

SOSMAN JA, KIM KB, SCHUCHTER L, et al. **Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib.** N Engl J Med. 2012; 366:707, 2014.

STOEHR, M.; MOZET, C.; BOEHM, A.; AIGNER, A.; DIETZ, A. e WICHMANN, G. **Simvastatin suppresses head and neck squamous cell carcinoma ex vivo and enhances the cytostatic effects of chemotherapeutics.** Cancer ChemotherPharmacol, v. 73, p. 827-837, 2014.

TAKEDA, I.; MARUYA, S.; SHIRASAKI, T.; MIZUKAMI, H.; TAKAHATA, T.; MYERS, J. N.; (...) SHINKAWA, H. **Simvastatin inactivates beta1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells.** Cancer Sci, v. 98, p. 890-899, 2007.

TARHINI, A. A., AGARWALA, S. S. **Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease.** DermatolTher, v. 19, n. 1, p. 19-25, Jan-Feb 2006.

THOMPSON, J. F., SCOLYER, R. A., KEFFORD, R. F. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 687-701, 2005.

TRONNIER, M. *et al.* Malignant melanoma: epidemiologic aspects, diagnostic and therapeutic approach. **Wiener MedizinischeWochenschrift**, v. 163, p. 354- 358, 2013.

TURCOTTE, S.; GIACCIA, A.J. **Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy.** Current opinion in cell biology, v.22, p. 246-251, 2010.

VERMA, S. *et al.* Systematic Review of Systemic Adjuvant Therapy for Patients at High Risk for Recurrent Melanoma. **Cancer**, v. 106, n. 7, p. 1431- 1442, 2006.

WHITE, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. **Nature Reviews**, v.12, p. 401-410, 2012.

WU, H.; JIANG, H.; LU, D.; XIONG, Y.; QU, C.; ZHOU, D.; (...) CHOPP, M. **Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis.** *Neurosurgery*, v. 65, p. 1087-1096; discussion 1096-1087, 2009.

XU N, ZHANG J, SHEN C, LUO Y, XIA L, XUE F, XIA Q. **Cisplatin-induced downregulation of miR- 199a-5p increases drug resistance by activating autophagy in HCC cell.** *BiochemBiophys Res Commun*, v.423, p.826-831, 2012.

YANG, Y. C.; XIAO, D. W.; LIU, H.; CHUAN, L. M.; ZENG, Y. L.; ZHOU, D. A.; (...) HUANG, W. F. **Mechanism of simvastatin-induced K562 cell apoptosis.** *Pharmacology*, v. 84, p. 191-195, 2009.

YEGANEH, B.; WIECHEC, E.; ANDE, S.; SHARMA, P.; MOGHADAM, A.; POST, M.; FREED, D.; HASHEMI, M.; SHOJAEI, S.; ZEKI, A. e GHAVAMI, S. **Targeting the Mevalonate Cascade as a New Therapeutic Approach in Heart Disease, Cancer and Pulmonary Disease.** *Pharmacol Ther.*, v. 143, p. 87-110, 2014.