

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LEYDY ALEXANDRA CAIMAN PEÑARETE

**PAPÉL DO NOVO DERIVADO N-ACILIDRAZÔNICO INIBIDOR DE HISTONA
DESACETILASES 6/8 SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

Alfenas / MG

2018

LEYDY ALEXANDRA CAIMAN PEÑARETE

**PAPEL DO NOVO DERIVADO N-ACILIDRAZÔNICO INIBIDOR DE HISTONA
DESACETILASES 6/8 SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biociências Aplicadas a
Saúde da Universidade Federal de
Alfenas

Área de concentração: Fisiopatologia

Orientador: Prof. Dr. Angel Mauricio
Castro Gamero

Co-orientadora:

Profa. Dra. Marisa Ionta

Alfenas – MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

C134p Caiman Peñarete, Leydy Alexandra
Papel do novo derivado N-acilidrazônico inibidor de histonas
desacetilases 6/8 sobre células de melanoma humano / Leydy Alexandra
Caiman Peñarete. – Alfenas/MG, 2018.
71 f.: il. -

Orientador: Angel Mauricio Castro Gamero.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2018
Bibliografia.

1. Histona Desacetilases. 2. Evolução. 3. Melanoma. 4. Inibidores
da Síntese de Ácido Nucleico. I. Castro Gamero, Angel Mauricio. II. Título.
CDD- 572.865

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

LEYDY ALEXANDRA CAIMAN PEÑARETE

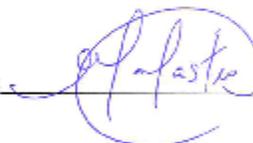
*PAPEL DE NOVO DERIVADO N-ACILIDRAZÔNICO INIBIDOR DE HISTONA
DESACETILASES 6/8 SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO*.

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Biociências Aplicadas à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas . Área de
concentração: Fisiopatologia

Aprovado em: 28 / 11 / 18.

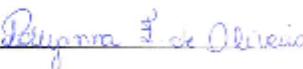
Prof. Dr. Angel Mauricio Castro Gamero
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura:



Profª Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Augusto Faria Andrade
Instituição: Institut de Recherche en Cancérologie
de Montpellier (INSERM 1194)

Assinatura:



Dedico a meus filhos, aos meus pais e amigos pelo apoio na realização deste trabalho. À toda a minha família, que mesmo sem entender o que eu faço, me apoiou e comemorou minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação de Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) pela oportunidade a mim oferecida e pela política de incentivo à pesquisa e produção acadêmica.

A professor, Dr. Angel Mauricio Castro Gamero, orientador, obrigada por ter contribuído positivamente para essa experiência. Sou especialmente grata por ter me orientado quando preciso, mas por ter me deixado livre o suficiente para que eu aprendesse a caminhar com as minhas próprias pernas, o que me fez crescer enormemente como pessoa e profissional. Agradeço por tantas vezes ter reconhecido o meu esforço, por responder meus e-mails o mais rápido possível e por nunca ter medido esforços para me ajudar, mesmo nos feriados.

Profa. Dra. Marisa Ionta, coorientadora, obrigada pela co-orientação. Sou muito grata por todos os ensinamentos, discussões, que contribuíram profundamente para o meu crescimento científico.

A Guilherme Álvaro Ferreira da Silva do Laboratório de Biologia Animal Integrativa, pelo apoio e pelos conhecimentos transmitidos.

A Dra. Marta Miyazawa, a Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira e a Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão por terem feito parte da minha banca de acompanhamento, dispensando tempo para ler a minha tese, contribuir com o meu trabalho e me auxiliar a crescer nessa jornada.

Ao meu grupo de colegas e família do laboratório de Genética Humana da Unifal-MG, cujo trabalho incluí a me ajudar de alguma forma. Agradeço todo carinho e atenção: Ao Rafael Martins e a Leilane Sales de Oliveira, e também a minha colega Larissa Helena de Araújo. Obrigado por terem me acolhido tão bem no laboratório, pelas conversas, ensinamentos, paciência e por serem tão queridos comigo. E ao Danilo Gabriel Oliveira, obrigada pelos momentos de alegria que me renovaram e obrigada por terem comemorado cada conquista minha, como se fosse sua. Sou muito grata e aprecio a cada um de vocês. Agradeço o apoio que me deram ao longo desses meses. Me senti extremamente sortuda por ter tido tantas pessoas incríveis que caminharam ao meu lado na busca por esse sonho.

RESUMO

O melanoma é um dos tipos de câncer com maior taxa de mortalidade. Este tumor teve um importante aumento nos últimos 50 anos, principalmente na população de pele clara e em regiões de baixa latitude. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estima para o bienio 2018-2019, 2920 novos casos de melanoma entre homens e 3340 em mulheres, com mortalidade superior de 80 por cento. O desenvolvimento de resistência aos tratamentos tradicionais e os efeitos adversos graves em pacientes leva à necessidade de desenvolver tratamentos alternativos. Um dos tratamentos atuais mais utilizados são os inibidores da histona desacetilase, mas com efeitos adversos muito severos para os pacientes. As histonas desacetilases (HDACs) são enzimas epigenéticas que representam alvos de pesquisa para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de tumores sólidos. Recentemente, novos inibidores das HDACs têm sido sintetizados em busca de maior especificidade e atividade catalítica, além de uma maior eficiência terapêutica. No presente estudo, procuramos investigar os efeitos *in vitro* de uma nova classe de derivados de N-acil-hidrazona (NAH) que atuam como inibidores de dupla ação das HDACs 6 e 8 em células derivadas de melanoma metastático. Assim, encontramos que o composto 3C reduz a viabilidade celular de células de melanoma WM-1366 e HT 144, diminuindo a capacidade clonogênica, de forma mais intensa nas células WM-1366, induzindo parada do ciclo celular nas fases G2/M em ambas as linhagens, além do aumento da transcrição do gene *p21* e da redução na expressão de *Ciclina B1*, *PLK1*, *AURKA* e *AURKB*. Estes resultados sugerem que a molécula 3C é uma promissora alternativa terapêutica como inibidor das HDAC 6/8, no tratamento do melanoma humano.

Palavras chave: Histonas Desacetilases, Epigenética, Melanoma, Terapia inibidores

ABSTRACT

Melanoma is one of the cancers with the highest mortality rate. This tumor has had an important increase in the last 50 years, mainly in the clear skin population and in regions of low latitude. In Brazil, the National Cancer Institute estimates for the biennium 2018-2019, 2920 new cases of melanoma among men and 3340 in women, with a mortality higher than 80 percent. The development of resistance to traditional treatments and serious adverse effects in patients leads to the need to develop alternative treatments. One of the most commonly used current treatments is histone deacetylase inhibitors, but with very severe adverse effects for patients. Histone deacetylases (HDACs) are epigenetic enzymes that represent research targets for the development of therapies for the treatment of solid tumors. Recently, new inhibitors HDACs have been synthesized in search of greater specificity and catalytic activity, in addition to greater therapeutic efficiency. In the present study, we investigated the *in vitro* effects of a new class of N-acylhydrazone (NAH) derivatives that act as double acting inhibitors of HDACs 6 and 8 in cells derived from metastatic melanoma. Thus, we found that compound 3C reduces cell viability of WM-1366 and HT-144 melanoma cells, decreasing clonogenic capacity, more strongly in WM-1366 cells, inducing cell cycle arrest in G2 / M phases in both strains, in addition to increased transcription of the *p21* gene and reduced expression of *Cyclin B1*, *PLK1*, *AURKA* and *AURKB*. These results suggest that the 3C molecule is a promising therapeutic alternative as an inhibitor of HDAC 6/8 in the treatment of human melanoma.

Keywords: Histones Deacetylases, Epigenetics, Melanoma, Therapy inhibitors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Principais genes conhecidos por serem alterados no melanoma.....	19
Figura 1 – Estrutura Isômeros Inibidores HDACs.....	35
Figura 2 – Conceito de projeto usados para gerar uma nova classe de derivados NAH para Inibição de HDAC.....	36
Gráfico 1 – Viabilidade celular.....	46
Gráfico 2 – Eficiência Clonogênica. WM 1366, HT144.....	48
Gráfico 3– Eficiência Clonogênica. SKAMEL 147 e CHL1.....	49
Gráfico 4– Ciclo Celular WM 1366 e HT 144.....	50
Gráfico 5– Avaliação do nível de transcrição.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informação de *primers* específicos utilizados no ensaio de PCR em tempo real.....43

Tabela 2- IC50 nas linhagens celulares de melanoma..... .47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACD** – gene homólogo da displasia adrenocortical
- ACTR** – antibody coupled T cell receptor (receptor de célula T acoplado a anticorpo)
- Akt** – Serina treonine Kinase 1
- AKT3** – Serina / treonina-proteína-cinases
- AMPC** – Adenosín monofosfato cíclico
- ARID1A** – AT-rich domain-containing 1A protein (Proteína 1A contendo domínio rico em AT)
- ARID2** – Domínio de Interação AT-Rich 2
- AURKA** – Aurora kinase A
- BAP1** – hidrolase carboxi-terminal de ubiquitina
- BaP1** – Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase
- BCL2** – B-cell lymphoma 2 (Linfoma de células B 2)
- BCL2A1** – Proteína A1 relacionada a Bcl-2
- Bcr-Abl** – gene de fusão de BCR ABL
- BRAF** – homólogo B do oncogene proto-oncogene B-Raf
- BRAF** – B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
- BRCA2** – Breast Cancer Type 2 susceptibility protein (Proteína de suscetibilidade do tipo 2 do câncer de mama)
- CCND1** – ciclina D1
- CDK** – quinase dependente de ciclina
- CDK1** – quinasa dependente de ciclina 1
- CDK4** – quinasa dependente de ciclina 4
- CDKN2A** – inibidor de ciclina dependente quinase 2A
- CDKN2A** – inibidor da quinase dependente de ciclina 2A
- c-Jun** – fator de transcrição AP-1
- cMyb** – Ativador transcripcional EKLF
- CPC** – complexo cromossômico passageiro
- c-Raf** – Protooncogen serine treonine kinase
- E2f** – Fatores de transcrição 1
- E2F1** – Transcription Factor 1

ErbB2	– Receptor de tirosina quinase
ERBB4	– Receptor de tirosina-proteína quinase erbB-4
ERRα	– Alfa do receptor relacionado ao estrogênio
ETV1	– Gene translocações cromossômicas variante 1
FEN1	– Fator eritroide Kruppel
GATA	– Fator de transcrição
GNAQ	– Proteína de ligação a nucleotídeos de guanina
GRIN2A	– Subunidade Tipo II do Receptor Ionotrópico de Glutamato 2A
GRM3	– Receptor Metabotrópico de Glutamato 3
H3, H4	– Histonas 3, 4, 2A e 2B
HAT	– Histona acetiltransferases
HDAC8	– Histona Desacetilase 8
HDACi	– Inibidor Histonas desacetilases
HDACs	– Histona Desacetilasa
HNF-4	– Fator hepatócito nuclear 4
HoxA5	– Proteína homeobox A5
Hsp90	– Proteína de shock térmico de 90 kDa
JAK	– Janus Kinase
Ki-67	– Antígeno Ki-67
Ku70	– Proteína Lupus Ku autoantígeno
LCCT	– Linfoma cutâneo células T
MAGI	– Guanilato quinase associada à membrana
MAP2K1	– Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitógeno 1
MAP2K2	– Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitógeno 2
MAP3K5	– Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitógeno 5
MAP3K9	– Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 9
MDM4	– Minuto dobre murino 4
MET	– Receptor do fator de crescimento de hepatócito
MITF	– Fator de transcrição associado à microftalmia
MITF	– Fator de transcrição associado à microftalmia
MYC	– Gen mielocitomatosis

NAH	– N-acil-hidrazona
NEDD9	– Célula Precursora Neural Expressada, Regulada para Baixo em Desenvolvimento 9
NF1	– Neurofibromatosis tipo 1
NF-Kb	– Potenciador do fator nuclear das cadeias leves kappa das células B ativadas
p14ARF	– Proteína envolvida na regulação do ciclo celular
P16INK4a	– Proteína envolvida na regulação do ciclo celular
p21	– Proteína p21
p53	– Proteína p53
PCNA	– Antígeno nuclear de células proliferativas
PKA	– Proteína cinase A
PLK1	– Polo-like 1
POT1	– Protección de telómeros 1
PPP6C	– Subunidade Catalítica da Proteína Fosfatase 6
PREX2	– Fosfato de troca de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato dependente de câmbio 2
PTEN	– Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RAC1	– Substrato de toxina botulínica C3 relacionado a Ras 1
RAR-beta2	– Receptor do ácido retinóico-beta2
RAS	– Proteínas GTPasas
RUNX	– Fator de Transcrição relacionado ao Runt
SAHA	– Ácido hidroxâmico suberoylanilide
SF1	– Fator Estereogênico 1
SMAD3	– Contra homólogos decantaplégicos
SMC3	– Manutenção estrutural dos cromossomos 3
SNF/SWI	– SWItch / Sacarose Não Fermentável
SNX3	– Classificando Nexin 3
Sp3	– Fator de transcrição
STAT3	– Transdutor de sinal e ativadores da transcrição 3
STK19	– Serina / Treonina Quinase 19
TACC	– Transformador da proteína contendo bobina enrolada ácida
TCF	– Fator de célula T
TERF2IP	– Proteína de interação 2 do fator 2 de ligação repetida telomérica
TERT	– Transcriptase reversa da telomerase

- TERT** – Transcriptase reversa da telomerase
- TFIIIE** – Fatores de transcrição RNA polimerase II
- TP53** – Proteína tumoral 53
- TRRAP** – Proteína associada ao domínio de transcrição / transcrição
- TSA** – Tricostatina A
- YY1** – Ying yang 1 representante transcripcional

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	166
2. MELANOMA	18
2.2 HISTONAS DESACETILASE (HDACs)	266
2.2.1 Histona Desacetilase 8 (Hdac8)	29
2.2.2 Histona Desacetilase 6 (Hdac 6).....	311
2.3. INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES (HDACI)	333
3. JUSTIFICATIVA	39
4. OBJETIVOS	400
4.1 OBJETIVO GERAL	400
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	400
5. MATERIAL E MÉTODOS	411
5.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	411
5.2 ESQUEMA DE TRATAMENTO	422
5.3 VIABILIDADE CELULAR	422
5.3.1 Ensaio De Viabilidade Celular utilizando o Método de Exclusão de Azul de Tripano.....	43
5.4 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CLONOGÊNICA	433
5.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR	444
5.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR	444
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	466
6. RESULTADOS	477
6.1 VIABILIDADE CELULAR	477
6.2 EFICIÊNCIA CLONOGÊNICA	4848
6.3 CICLO CELULAR	500
6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	511
7. DISCUSSÃO	533
9. CONCLUSÃO	611
REFERÊNCIAS	622

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um processo de crescimento e disseminação celular descontrolado (OMS, 2018). A anormalidade fundamental que resulta no desenvolvimento do câncer é a contínua proliferação desregulada de células cancerosas. Em vez de responder adequadamente aos sinais que controlam o comportamento celular normal, dessas células crescem e se dividem descontroladamente, invadindo tecidos e órgãos normais (COOPER, 2000).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 70% das mortes por câncer são registradas em países de baixa e média renda e estima-se que cerca de um terço das mortes por câncer sejam devidas a fatores de risco comportamentais e alimentares, bem como infecções oncogênicas como vírus do papiloma humano e hepatite. O envelhecimento é outro fator fundamental no aparecimento do câncer (WHO, 2018).

O melanoma é um dos tipos de câncer com maior taxa de mortalidade, sendo o cutâneo o mais comum. Este tumor teve um importante aumento da sua incidência nos últimos 50 anos, ocorrendo principalmente na população de pele clara e em regiões de baixa latitude. Embora não apresente uma faixa etária mais prevalente, ele é um dos cânceres mais frequentes em adolescentes e jovens adultos atualmente; representando, assim, um importante impacto econômico pelos altos custos do tratamento e o impacto social (MATTHEWS et al., 2017). Todos os anos, entre dois e três milhões de novos casos de câncer de pele não melanocítica ocorrem no mundo e mais de 130.000 novos casos de câncer de pele melanocítica, e estima-se que 66.000 pessoas morrem a cada ano de melanomas e outros tipos de câncer de pele (WHO, 2018). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estima para o biênio 2018-2019, 85.170 novos casos de câncer do melanoma entre homens e 80.410 em mulheres (INCA, 2018).

O potencial das histonas desacetilases como alvo de pesquisa para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de tumores sólidos é muito recente. Estas enzimas atuam sobre o controle de fatores de transcrição, tradutores de sinais e proteínas do citoesqueleto. Dezoito membros da família HDAC foram identificados e agrupados em quatro classes (I- IV) (MOTTAMAL, 2015). Estudos são necessários para entender a ação de cada isoforma e seus possíveis efeitos adversos. Existem vários inibidores de HDAC em uso clínico atualmente e outros ainda em estudo.

Dos inibidores de HDACs de classe I existentes, tem sido sintetizada variações em busca de maior especificidade e atividade catalítica, e vários efeitos antiproliferativos e apoptóticos tem sido descrito em linhagens de células tumorais de melanoma (RODRIGUES, et al.,2015). Assim, no presente estudo, procuramos analisar os efeitos do inibidor específico 3C para HDACs 6/8 *in vitro* em células derivadas de melanoma metastático.

2. MELANOMA

Nos anos 60 e 70's, descreveram-se diversos critérios clínico-patológicos da doença tais como o local anatômico e a presença ou ausência de danos causados pela radiação ultravioleta, além de aspectos demográficos, tais como, o sexo e a idade dos pacientes. Utilizando essas variáveis clínicas e patológicas, Duncan e colaboradores descreveram categorias de classificação para o melanoma cutâneo, sendo reconhecidos três subtipos principais: melanoma maligno invasivo com componente intraepidérmico de superfície adjacente (melanoma de espalhamento superficial) (MSS), sendo o mais comum (70% dos casos); melanoma invasivo com componente intraepidérmico adjacente do tipo sardas melanóticas de Hutchinson (melanoma lentigo maligno, MLM) com uma incidência de 4% a 15% causado principalmente pela exposição prolongada ao sol; e finalmente, melanoma invasivo sem componente adjacente intraepidérmica (melanoma nodular maligno, MNM) com uma incidência de 5%, sendo mais comum em homens do que em mulheres (DUNCAN et al., 2009). Um grupo de patologistas na Austrália, incluiu nessa classificação ao acral lentiginoso, ou melanoma lentigo acral, localizada na pele das extremidades (palmas das mãos, plantas dos pés, dedos e perto das regiões unhas), comum em populações asiáticas, hispânicas e africanas (SITUM, et al., 2014; RASTRELLI et al., 2014).

As estratégias terapêuticas utilizadas para combater o melanoma, após a definição diagnóstica, dependem de vários critérios, tais como a fase de desenvolvimento tumoral (estágios I- IV), a localização da lesão e o estado de saúde do paciente, e pode incluir radioterapia e cirurgia micrográfica de Mohs; enxerto de pele e extirpação cirúrgica extensa; e uso de medicamentos, tais como antivirais, quimioterapia e imunoterapia (ACS, 2018).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento de melanoma incluem defeitos genéticos, exposições ambientais ou uma combinação de ambos. Entre os riscos ambientais, a exposição aos raios ultravioletas é o fator de risco mais importante. Várias síndromes genéticas estão associadas a um risco aumentado de melanoma, incluindo xeroderma pigmentoso, Síndrome do Melanoma Múltiplo Atípico Familiar (FAMMM por sua sigla em inglês), mutação *BRCA2* e nevos melanocíticos congênitos (WARD, et al., 2017; MIZE, et al., 2009).

O melanoma cutâneo evolui a partir de melanócitos aberrantes localizados na camada basal da epiderme. Esses melanócitos são responsáveis pela produção de melanina, uma substância que absorve a radiação ultravioleta (UV) potencialmente prejudicial. Se não for controlada, a radiação

UV afeta as células tegumentares, causando danos diretos às fitas de DNA individuais (WARD, et al., 2017). Embora o dano ao DNA induzido por UV seja geralmente eliminado por mecanismos específicos de reparo de DNA, erros genéticos ou derivados do ambiente dentro desse complexo de reparo podem levar à formação de um melanoma invasivo (WARD, et al., 2017).

Os fatores de risco genéticos, traços fenotípicos hereditários associados ao melanoma incluem pele clara, cabelos claros, cabelos ruivos, sardas e cor de olhos claros (WARD, et al., 2017). Uma história familiar positiva é um forte fator de risco para a evolução desta doença. Indivíduos com um parente em primeiro grau portador de melanoma possuem 1,7 vezes mais chances de serem diagnosticados com melanoma, enquanto que a existência de dois parentes de primeiro grau portadores da doença apresentam um risco nove vezes maior (WARD, et al., 2017). A preexistência de um elevado número de nevos melânicos (regiões de acumulação de melanócitos) e nevos atípicos (displásico) estão dentre os fatores de risco (RASTRELLI et al., 2014). Aproximadamente 5-10% de todos os melanomas acontecem em famílias com predisposição hereditária, devido a mutações no gene *CDKN2A*, principal gene de susceptibilidade que confere alto risco de melanoma, identificado em vários grupos familiares portadores de melanoma hereditário a partir dos estudos de associação apontando o *locus* em 9p21. Subseqüentes estudos de ligação genética produziram *loci* candidatos adicionais no cromossoma 1p36, 9q21, 5q31 e 1p22. As mutações raras da linha germinativa em *CDK4*, *BAP1*, *MITF*, *TERT* (promotor), *POT1*, *ACD* e *TERF2IP* têm sido também relatadas em famílias (ARTOMOV, et al., 2017), além de mutações nos genes *BRAF*, *RAS* e *NF1* do tipo selvagem (SCHOLZ, et al., 2018). No Quadro 1 descrevem-se os genes conhecidos por serem alterados no melanoma junto com as vias de sinalização molecular, tipo de mutação, subtipo de tumor encontrado, frequência, e possíveis terapias.

Quadro 1. Principais genes conhecidos por serem alterados no melanoma

SUBTIPOS PRIMÁRIOS	VIA MOLECULAR	ALTERAÇÕES	ENCONTRADO EM TUMORES COM	FREQUÊNCIA	TERAPIAS POSSÍVEIS
<i>BRAF</i>	<i>MAPK</i>	Mutação pontual Fusões Genéticas	<i>NRAS</i> Tipo selvagem	50-60% atípico	BRAF ⁱ + MEK ⁱ BRAF ⁱ + EGFR ⁱ + AKT ⁱ

Quadro 1. Principais genes conhecidos por serem alterados no melanoma

Continuação

SUBTIPOS PRIMÁRIOS	VIA MOLECULAR	ALTERAÇÕES	ENCONTRADO EM TUMORES COM	FREQUÊNCIA	TERAPIAS POSSÍVEIS
<i>NRAS</i>	<i>MAPK, PI3K, RALGDS</i>		<i>BRAF</i> Tipo selvagem	20-25%	MEKi + CDKi
<i>KIT</i>	<i>MAPK, PI3K</i>	Mutação pontual, amplificação	Tipo selvagem de <i>BRAF</i> na maior parte 1% total; 10% na mucosa; 10% em acral		Sunitinib, nilotinib, imatinib
<i>GNAQ/GNA11</i>	Família $G\alpha$ (q) de subunidades α da proteína G; Ativadores <i>MAPK</i>	Mutação pontual	<i>NRAS e BRAF</i> Tipo selvagem	1% em geral; 40-50% em uveal	MEKi + PI3Ki, enzastaurin
<i>MITF*</i>	Transcrição, linhagem	Amplificação do ciclo celular	Todos os tipos	20%	HDACi
<i>NFI*</i>	<i>MAPK</i> , regulador negativo de <i>PI3K</i> do <i>RAS</i>	Mutações, perda de expressão	<i>BRAF, NRAS</i> tipo selvagem e menos frequentemente em mutação	4% em geral; 25% <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> do tipo selvagem	MEKi + mTORi ou PI3Ki
<i>TERT*</i>	Telomerase	Mutações no promotor da subunidade catalítica	ND	33% primários; 85% metastático	Inibidores de <i>TERT</i> em estudos pré-clínicos

Tabela 2 Quadro 1. Principais genes conhecidos por serem alterados no melanoma

Continuação

SUBTIPOS PRIMÁRIOS	VIA MOLECULAR	ALTERAÇÕES	ENCONTRADO EM TUMORES COM	FREQUÊNCIA	TERAPIAS POSSÍVEIS
<i>ERBB4</i>	<i>PI3K, MAPK</i>	Mutação pontual	Todos os tipos	15-20%	Lapatinib (ERBBi) + PI3Ki
<i>MET</i>	<i>PI3K, MAPK</i>	Ativação por HGF estromal	Todos os tipos	ND	Cabozantinib?
<i>AKT3</i>	<i>PI3K</i>	Amplificação	Todos os tipos	25%	AKTi, PI3Ki, mTORi
<i>PTEN</i>	<i>PI3K</i>	Mutação pontual ou deleções	<i>BRAF</i> mutado; Tipo selvagem <i>BRAF</i> e <i>NRAS</i>	40-60%	PI3Ki
<i>MAGI</i>	<i>PI3K</i> ; estabiliza <i>PTEN</i>	ND	Todos os tipos	ND	PI3Ki
<i>TACC</i>	Possivelmente estimula a sinalização <i>PI3K</i> – <i>AURKA</i>	ND	<i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> mutado	5%	PI3Ki, AURKAi
<i>PREX2</i>	<i>RHO / RAC / MAPK</i> ; Fator de troca Rac	Mutações pontuais	<i>BRAF</i> ou <i>NRAS</i> mutado	14%	ND

Quadro 1. Principais genes conhecidos por serem alterados no melanoma

Continuação

SUBTIPOS PRIMÁRIOS	VIA MOLECULAR	ALTERAÇÕES	ENCONTRADO EM TUMORES COM	FREQUÊNCIA	TERAPIAS POSSÍVEIS
<i>RAC1</i>	<i>RHO / RAC / MAPK</i> ; Regulador de adesão celular, invasão, migração	Mutações pontuais	<i>BRAF</i> ou <i>NRAS</i> mutado	9% do exposiçãoo sol	ND
<i>MAP2K1</i> , <i>MAP2K2</i>	<i>MAPK (MEK1/2)</i>	Mutações	<i>BRAF</i> mutado; <i>BRAF</i> , <i>NRAF</i> do Tipo selvagem	5%	ERKi
<i>MAP3K5</i> , <i>MAP3K9</i>	<i>RHO/RAC/MAP K</i>	Mutações, perda de heterozigocidade	Todos os tipos	85% e 67%	MEKi, ERKi
<i>MYC</i>	Transcrição	Amplificação	Todos os tipos	20-40%	mTORi?
<i>ETV1</i>	Transcrição	Amplificação	Todos os tipos	15%	ND
<i>TP53</i>	Ciclo celular, Apoptose	Mutação pontual	Todos os tipos	10-20%	ND
<i>MDM4</i>	Regulador negativo de <i>p53</i>	Super-expressão	Todos os tipos	65%	Tp53- MDM4 i

Quadro 1. Principais genes conhecidos por serem alterados no melanoma

Continuação

SUBTIPOS PRIMÁRIOS	VIA MOLECULAR	ALTERAÇÕES	ENCONTRADO EM TUMORES COM	FREQUÊNCIA	TERAPIAS POSSÍVEIS
<i>CDKN2A</i> (<i>P16INK4a</i> , <i>p14ARF</i>)*	Regulador Negativo de <i>TP53</i> e <i>RB</i>	Mutação pontual, deleção	<i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> mutados, <i>KIT</i> amplificado	30-40%	CDKi
<i>BCL2</i> , <i>BCL2A1</i>	Supressão de apoptose	Expressão elevada, amplificação (<i>BCL2A1</i>)	Todos os tipos	<i>BCL2</i> ND 30% (<i>BCL2A1</i>)	Miméticos BH3
<i>CCND1</i>	Ciclo celular, ciclina G1 / S	Amplificações	Mais frequente em <i>BRAF</i> , tipo selvagem <i>NRAS</i>	11%	CDKi
<i>CDK4</i> *	Ciclo celular, quinase dependente de ciclina G1 / S	Amplificações	Mais frequente em <i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> tipo selvagem	3%	CDKi seletivo
<i>PPP6C</i>	Unidade catalítica de fosfatase, regulador negativo de <i>CCND1</i> , Aurora	Mutações pontuais	<i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> mutadas	12% do Exposição ao sol	AURKA e CDKi
<i>STK19</i>	Quinase; função desconhecida	Mutações pontuais	<i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> mutadas	5 - 10%	ND
<i>SNX3</i>	Classificação de proteína Endossômica	Mutações Pontuais	<i>BRAF</i> mutado; <i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> de tipo selvagem	7%	ND

Quadro 1. Principais genes conhecidos por serem alterados no melanoma

Conclusão

SUBTIPOS PRIMÁRIOS	VIA MOLECULAR	ALTERAÇÕES	ENCONTRADO EM TUMORES COM	FREQUÊNCIA	TERAPIAS POSSÍVEIS
<i>GRIN2A</i>	Canal iônico Inibido por Glutamato ionotrópico, união a NMDA	Mutações pontuais	ND	25%	ND
<i>GRM3</i>	Possivelmente acessório de sinalização <i>MAPK</i>	Mutações pontuais	ND	13-18%	ND
<i>TRRAP</i>	Parte do complexo de histona acetiltransferase	Mutações pontuais	ND	10-13%	ND
<i>ARID2</i>	Remodelação do complexo de Cromatina SWI / SNF, SWI / SNF	Mutações inativadoras	<i>BRAF</i> ou <i>NRAS</i> mutado	7-9%	ND
<i>BAP1</i>	Reparo de DNA <i>BRCA1</i>	Mutações inativadoras	No Uveal <i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> do tipo selvagem	1% global, 84% uveal	ND
<i>NEDD9</i>	Adaptador Integrina, promove o EMT e a migração; metástase	Amplificação	Provavelmente tudo	50-60%	ND

A fonte em negrito dos nomes dos genes indica que essas mutações são consideradas mutações de controlador baseadas na presença de melanoma familiar e /ou a frequência de mutações é esporádica, embora não se tenham evidências experimentais de seu papel exato na melanomagenese. * mutações na linhagem germinativa em famílias de melanoma

de alto risco; A mutação MC1R não está na lista. Não listado: mutações raras em *HRAS*, *RAF1* e outros oncogenes. *ND: Não Descrito.

Quadro obtida e adaptada de (SHTIVELMAN et al., 2014) e (MARTY et al., 2011).

Adicionalmente aos fatores genéticos, os fatores moduladores epigenéticos têm fornecido uma visão mais ampla para a abordagem no estudo do melanoma, além de ter sido amplamente estudados nos últimos tempos. A metilação do DNA estudada desde 1983 por Feinberg e Vogelstein relatara hipometilação de ilhas de CpG presentes em vários tipos de câncer. A hipermetilação do DNA influencia o diagnóstico e tratamento do melanoma, causando principalmente hipermetilação de genes supressores de tumor específicos e envolvidos na regulação do ciclo celular, no reparo do DNA, na sinalização celular, na transcrição e no apoptose (PATINO & SUSA, 2008). De forma específica, tem sido mostrado que o promotor de inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A*) encontra-se hipermetilado na maioria dos tumores primários de melanoma cutâneo, também associada com uma maior taxa de Ki-67 e uma sobrevivência reduzida dos pacientes (STRAUME, et al., 2002). O gene *CDKN2A*, envolvido na codificação de reguladores negativos da progressão do ciclo celular p16 e p14, é inativado em melanomas cutâneos esporádicos, ou também herdado no melanoma cutâneo familiar. Em um estudo feito em 1986 em amostras de melanoma metastático, quatro genes supressores de tumor foram frequentemente hipermetilados, dentre eles o gene codificante do receptor do ácido retinóico-beta2 (*RAR-beta2*) foi o gene mais frequentemente metilado (70% em espécimes de melanoma primário e metastático), e também tem sido descrito que ele é silenciado em outros tipos de câncer humano (BISHOP et al., 1998); assim, muitos outros supressores tumorais hipermetilados têm sido descobertos e seu número continua em aumento (HOON et al., 2004). Lee e colaboradores (2012) forneceram evidência patológica de que a perda de função da *TET*, como evidenciado pelos baixos níveis de 5-HMC (5-hidroximetilcitosina base nitrogenada de DNA de pirimidina derivada da citosina) e a instabilidade epigenômica resultante, pode ser crítica para a patogênese do melanoma (ZHAN, et al., 2012).

Dentre os mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese do melanoma, as modificações de histonas estão entre as menos estudadas. Além disso, tem sido demonstrado que a inibição terapêutica das histonas desacetilases em linhagens celulares de melanoma aumenta a eficácia apoptótica através da expressão do *p21*, um importante inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK), sugerindo que alterações na desacetilação das histonas pode desempenhar um papel

de patogenicidade em melanoma por regulação negativa de mecanismos apoptóticos (FLORENES et al., 2004).

2.2 HISTONAS DESACETILASE (HDACs)

A cromatina é o estado no qual o DNA é empacotado dentro da célula. O nucleossomo é a unidade básica da cromatina e é composto de um octâmero das quatro histonas centrais (H3, H4, H2A, H2B) em torno das quais 147 pares de bases de DNA são envolvidos (KOUZARIDES, 2007). As histonas são geralmente carregadas positivamente devido aos grupos amino presentes nos resíduos de lisina e arginina, podendo ser modificadas em cerca de 60 resíduos diferentes já detectados. Ademais, uma complexidade bioquímica adicional acontece pelo fato de que a metilação em lisinas ou argininas pode ser três formas diferentes: mono-, di- ou trimetil para lisinas e mono- ou di- (assimétrica ou simétrica) para argininas (KOUZARIDES, 2007). Além da metilação, as histonas também podem ser modificadas por acetilação (STERNER & BERGER, 2000), fosforilação (NOWAK & CORCES, 2004), ubiquitinação (SHILATIFARD, 2006), sumoilação (NATHAN et al., 2006), ADP-ribosilação (HASSA et al., 2006), deaminação (CUTHBERT et al., 2004; WANG et al., 2004b) e isomerização de prolina (NELSON et al., 2006).

A acetilação é a via predominante de ativação da transcrição e representa o processo de modificação pós-traducional das histonas mais estudada. A mesma envolve a transferência de um grupo acetil a partir da coenzima A, catalisada por um grupo de enzimas conhecidas como histona acetiltransferases (HAT) (ROTH et al., 2001). Geralmente é aceito que o efeito primário da acetilação é parcialmente neutralizar a carga positiva de histonas, reduzindo assim a sua afinidade para o DNA e, por conseguinte, a geração de uma estrutura descompactada que permite a ligação de proteínas ao DNA. Além disso, as caudas acetiladas das histonas podem recrutar outras proteínas associadas à cromatina (SENGUPTA & SETO, 2004). Esta redução na afinidade de ligação permite a expansão da cromatina e, assim, a transcrição gênica dessa região cromossômica (SENGUPTA & SETO, 2004).

A importância funcional da acetilação está em sua natureza altamente reversível, que depende da precisão e eficiência da reação reversa. A desacetilação de histonas catalisada por um grupo de enzimas conhecidas como histonas desacetilases (HDACs) (SENGUPTA & SETO, 2004). Este processo reverso, determina uma estrutura da cromatina altamente compactada

(SLINGERLAND, et al., 2013). De forma interessante, as HDACs atuam também em proteínas não-histonas. A desacetilação de fatores de transcrição – como *p53*, *E2F1* e *c-Jun* (ZHANG *et al.*, 2003), moléculas transdutoras de sinal, proteínas de reparo de DNA e chaperonas, por exemplo, pode afetar diversos mecanismos regulatórios do metabolismo celular, visto que altera atividade e estabilidade proteicas, estabilidade de moléculas de mRNA e também expressão gênica (SPANGE *et al.*, 2009).

As HDACs representam assim, um grupo de enzimas que induzem o silenciamento gênico removendo os grupos acetila das histonas. Ao agir em genes chave para a célula, sua inibição leva a múltiplas alterações celulares (MARTÍ, 2012; GUO & ZHANG, 2012; MOTTAMAL *et al.*, 2015), o que resulta na condensação da cromatina e na repressão de transcrição, principalmente em genes supressores de tumor (SRIRAKSA & LIMPAIBOON, 2013) e regulando diretamente diversas funções celulares, como sobrevivência e proliferação celular, angiogênese, inflamação e imunidade (GUO & ZHANG, 2012).

As HDACs são divididas em quatro grupos de acordo com a sua função e a similaridade da sequência de DNA que reconhecem e com base na sua homologia dos domínios acessórios com as desacetilases de histonas de levedura, sendo encontrados homólogos destes três grupos em leveduras com os seguintes nomes: dependente de potássio reduzido 3 (Rpd3), que corresponde à classe I; histona desacetilase I (*hda1*), que corresponde à classe II; controlador de informação silenciosa 2 (Sir2), que corresponde à classe III (SENGUPTA & SETO, 2004). O quarto grupo é considerado atípico, uma vez que se assemelha aos outros três na similaridade da sequência de DNA que reconhece (SENGUPTA & SETO, 2004).

De maneira similar, as 18 desacetilases de histonas humanas atualmente conhecidas são classificadas em quatro grupos (I-IV). A classe I subdivididas em HDAC 1-3,8, localizada principalmente no núcleo; a classe IIa subdivididas em HDAC 4-9, e classe IIb subdivididas em HDAC 6,10, são capazes de entrar e sair do núcleo dependendo do sinal que recebem (RUIGTER, *et al.*, 2003) e a classe IV subdividida em HDAC 11. A classe III é diferente ao estar constituída por HDAC's dependentes de NAD (sirtuinas, SIRT1-7), localizadas no núcleo, citoplasma e associado à membrana (SHOCHIDA, *et al.*, 2017; ZAGDI, *et al.*, 2017).

As HDACs estão envolvidas em muitas doenças humanas, especialmente no câncer, motivo pelo qual, elas se tornam um alvo terapêutico promissor para o tratamento através do

desenvolvimento de uma ampla variedade de inibidores que estão a emergir como uma nova classe de potenciais agentes anticancerígenos.

A modificação de histonas mediada por acetilação e desacetilação é chave nos diferentes processos celulares tais como a transcrição, replicação de DNA e segregação cromossômica. Existe um equilíbrio natural entre a atividade das histonas acetil-transferases (HATs) que possibilitam a descondensação da cromatina, e a ação das histonas desacetilases (HDACs), enzimas que facilitam a compactação do material genético. De forma particular, durante a mitose, esse equilíbrio se perde gradualmente nos estágios iniciais, sendo completamente ausente na metáfase e na anáfase e, em seguida, aumenta gradualmente na fase tardia da mitose. Como é amplamente conhecido, a mitose é um evento muito complexo, que requer inúmeros cuidados, porque a segregação de pares de cromossomos duplicados durante a anáfase é irreversível (SHIN, et al., 2003). O ponto de checagem (*checkpoint*) mitótico mantém a fidelidade desse processo, detectando a união adequada dos microtúbulos com os cinetócoros e as tensões entre os cinetócoros de cromátides irmãs. Além disso, o *checkpoint* mitótico pode ativar cascatas de sinalização para retardar o aparecimento de uma fase até que ambos os cinetócoros em cada par de cromossomos duplicados tenham se ligado com sucesso aos microtúbulos e estejam sob tensão adequada, evitando assim a instabilidade cromossômica e poliploidia associada ao câncer (LENGAUER et al., 1998; RIEDER & SALMON, 1998; AMON, 1999; WASSMANN & BENEZRA, 2000).

Evidente é que o *checkpoint* mitótico desempenha um papel importante na geração do sinal inibitório da anáfase; entretanto, os mecanismos de instabilidade cromossômica e poliploidia após a liberação do *checkpoint* mitótico não são bem compreendidos. Verificou-se que as células cancerosas humanas com um fenótipo de instabilidade cromossômica apresentam defeitos no seu *checkpoint* mitótico, sugerindo uma possível ligação entre o ponto de verificação mitótico deficiente e a tumorigênese (SHIN, et al., 2003).

As famílias de proteínas quinase Polo-like e Aurora são duas das famílias mais estudadas de quinases mitóticas relacionadas com o *checkpoint* mitótico. Uma das funções mais importantes da quinase Polo-like 1 (*PLK1*) na mitose é iniciar o circuito autocatalítico que controla a atividade do complexo *CiclinaB1/CDK1*, o qual uma vez ativado, desencadeia a divisão celular (GAVET & PINES, 2010). Como muitas outras quinases, a ativação da *PLK1* requer a fosforilação de um resíduo de treonina sobre seu *T-loop* (Thr210). Dessa forma, *PLK1*^{Thr210} é fosforilada por Aurora A (também denominada AURKA), um evento assistido pela proteína Bora. A *PLK1*, por sua vez,

promove o recrutamento de AURKA para o centróssomo na fase G2 tardia. Por outro lado, e apesar de estar altamente relacionada com AURKA, a Aurora B (também chamada AURKB) é um componente do complexo cromossômico passageiro (CPC), o qual compreende AURKB, INCENP, Borealina, e Survivina. O CPC se localiza nos cromossomos e cinetócoros na mitose precoce e atua nas interações cromossomo-microtúbulo, coesão de cromátides irmãs e no ponto de checagem do conjunto do fuso. Na mitose precoce, a PLK1^{Thr210} é fosforilada por AURKB em centrómeros e cinetocoros (LI et al, 2015).

Apesar de que PLK1, AURKA, e AURKB possuem funções únicas durante a mitose, elas também co-regulam múltiplos processos, incluindo a entrada na mitose, formação do fuso mitótico, separação de cromátides irmãs, conexões cromossomo-fuso, e citocinese. E pelo fato de estarem alteradas em muitos tumores e correlacionadas com mau prognóstico, elas tem sido propostas como importantes alvos terapêuticos anti-câncer.

2.2.1 Histona Desacetilase 8 (Hdac8)

HDAC8 é uma HDAC de classe I dependente de zinco, identificada como uma proteína de 42 kDa composta por 377 aminoácidos localizada no núcleo e no citoplasma, onde desempenha várias funções fisiológicas e patológicas. Embora seja controverso se as próprias histonas sejam bons substratos da HDAC8, existem dados que reforçam a ideia de que muitas proteínas não-histonas, tais como SMC3, ERR α e p53, também são substratos ou parceiros de interação de HDAC8 (CHAKRABARTI, et al., 2016).

Além disso, tem sido demonstrado que a HDAC8 é essencial para a expressão de p53, a partir de experimentos de inibição de HDAC8 que mostraram atividade antiproliferativa em células de p53 mutantes, mas não de tipo selvagem, sugerindo que os inibidores HDAC8 poderia funcionar como adjuvante no tratamento de tumores com p53 mutante (ZAGNI, et al., 2017). Há evidências crescentes de que a desregulação de HDAC8 desempenha um papel crítico em muitas doenças, especialmente linfoma de células-T, neuroblastoma infantil e Síndrome de Cornelia de Lange (CdLS) (CHAKRABARTI, et al., 2016).

Sob condições fisiológicas, a HDAC8 é fosforilada pela proteína cinase A (PKA) AMPc-dependente, o que reduz a atividade da enzima e leva a hiperacetilação de histonas H3 e H4 (LEE et al., 2004). Sua ativação anormal pela proteína Inv1 é associada a inibição de genes constitutivos

(DURST et al., 2003), além de promover proliferação e inibir apoptose em carcinoma hepatocelular quando superexpressa (SONG et al., 2015). A maioria das moléculas identificadas como substratos da HDAC8 se localizam no núcleo e incluem fatores de transcrição e proteínas envolvidas intimamente com a regulação epigenética, remodelação da cromatina ou *splicing* de RNA (OLSON et al., 2014). Eles incluem o receptor de estrogênio alfa (ER- α), receptor nuclear que interage com estrogênio e com o fator de transcrição TFIIB e a proteína de manutenção da estrutura cromossômica 3 (SMC3), componente do complexo coesina, com importante papel na Síndrome de Cornelia de Lange, a proteína ARID1A (*AT-rich domain-containing 1A protein*), e o regulador transcricional do complexo dependente de ATP remodelador de cromatina (SNF/SWI), assim como também, o fator de transcrição HoxA5 de p53, importante gene supressor tumoral (OLSON et al., 2014; ALAM et al., 2016). Em relação à p53, Yan e colaboradores (2013) observaram a redução da expressão a nível transcricional tanto da forma selvagem como mutada da p53 quando expostas a inibidores de HDAC, e particularmente pelo *knockdown* de HDAC8. Por outro lado, foi descrito que a inibição seletiva de HDAC8 não alterou a acetilação de histonas, indicando que esta isoforma não atua através de desacetilação global de proteínas histona, mas sim em determinados sítios promotores – dentre os quais propõe-se que se encontra o gene HoxA5. Considerando que a inibição de HDAC8 gera deficiência proliferativa em células com p53 mutante apenas, e tendo em vista a alta frequência de tumores com mutação em p53, o estudo de Yan e colaboradores (2013) enfatiza o potencial terapêutico de agentes com alvo específico em HDAC8.

O substrato *ARIDIA* pode ser também destacado devido a sua associação com o controle da progressão do ciclo celular (GUAN et al., 2009; OLSON et al., 2014), e ao fato de que sua atividade é aumentada pela acetilação, e, portanto, pela inibição da HDAC8 (OLSON et al., 2014). Trata-se de um fator de transcrição que contém dois domínios, sendo um que se liga a sequências gênicas ricas em AT, e outro, a porção C-terminal, que recruta o complexo *SNF/SWI* para o DNA ativar a expressão de genes inibidos (CHAKRABARTI et al., 2015). Foram identificados dentre os genes correlacionados à atuação de *ARIDIA* os promotores de *p21* e de *SMAD3*, por sua vez relacionados a p53, sugerindo que *ARIDIA* é um regulador negativo do ciclo celular e um gene supressor tumoral (GUAN et al., 2009).

A HDAC8 é expressa em diversos tumores malignos, incluindo pulmão, cólon, pâncreas, mama e neuroblastoma, sendo correlacionada à tumorigênese e invasão destes dois últimos (WU et al., 2013; SONG et al., 2015). De forma interessante, a HDAC8 apresenta-se como uma proteína

altamente expressa em amostras de melanoma humano, apresentando uma expressão média 2,7 vezes quando comparada à expressão em amostras de tecido normal, como descrito pelo *The Human Protein Atlas*. Esta base de dados descreve também que pacientes portadores de tumores com baixa expressão de HDAC8 apresentam uma sobrevida livre da doença aos 3 anos de 65%, enquanto que pacientes portadores de melanoma com alta expressão de HDAC8 apresentam uma sobrevida livre da doença aos 3 anos de apenas 18% (*The Human Protein Atlas*, 2018). Estas informações colocam em destaque à HDAC8 como um marcador biológico importante expresso preferencialmente em células tumorais e com um papel crucial nos processos de promoção e progressão tumoral em pacientes com melanoma, representando um promissor alvo terapêutico para esta neoplasia.

2.2.2 Histona Desacetilase 6 (Hdac 6)

A HDAC6 é identificada como a primeira histona citoplasmática das HDAC que desacetilam vários substratos não histônicos tais como a proteína tubulina e a proteína de choque térmico 90 (Hsp90). HDAC6 possui características de estrutura diferente e papéis exclusivos na regulação citoplasmática do citoesqueleto, a migração celular, a reprogramação celular e pluripotência, além de ter sido implicada em tumorigênese, doenças neurodegenerativas e desordens inflamatórias (ZHENG, 2017).

A HDAC6 é a única histona desacetilase citoplasmática que tem dois domínios catalíticos desacetilase (DD1 e DD2) e uma ligação de ubiquitina de domínio de zinco não terminal C (BUZ). Também é importante ressaltar a presença de um domínio de repetição do tetradecapeptídeo Ser-Glu (SE14) responsável pela retenção intracelular e interação do HDAC6 humano. Além disso, um sinal de exportação nuclear (NES) conservado na região N-terminal desempenha um papel essencial no processo de translocação nucleo-citoplasmática (ZHENG, 2017). Esta HDAC apresenta domínios catalíticos em tandem, sendo ambos acessíveis aos substratos, e ligados por um interdomínio externo, importante para sua atividade (MIYAKE et al., 2016). É encontrada exclusivamente no citoplasma, nas regiões perinuclear e perimembranosa interna – padrão de distribuição semelhante ao da proteína p150Glued (SMITH et al., 2000), subunidade do complexo ativador de dineína, indicando que a HDAC6 é uma desacetilase associada a microtúbulos (HUBBERT et al. 2002 e LEE, 2010).

Estudos feitos por ZHANG *et al.* 2003 confirmaram ainda que a HDAC6 é capaz de, *in vitro*, desacetilar microtúbulos polimerizados, onde a acetilação é geralmente observada, embora não seja capaz de agir sobre um substrato de dímeros de α/β -tubulina livres – sendo a presença de tubulina acetilada uma característica de microtúbulos estabilizados. Identificou-se a β -tubulina como porção proteica específica a interagir com a enzima HDAC6, de forma que a desacetilase pode ser recrutada a dímeros de tubulina ou a microtúbulos (ZHANG *et al.*, 2003; VALENZUELA – FERNANDEZ, *et al.*, 2008; LONGWORTH, *et al.*, 2006).

Há descrição, também, de atividade da HDAC6 como reguladora da acetilação reversível da Hsp90, cuja ação é essencial para a estabilidade e função de uma ampla gama de proteínas, como receptores e proteínas cinases envolvidos em vias de sinalização e homeostase celular (KOVACS *et al.*, 2005; BALI *et al.*, 2005; KEKATPURE *et al.*, 2009). A acetilação da Hsp90 causa perda de sua função chaperona e expõe seus substratos, conhecidos como “proteínas-cliente”, à ubiquitinação e à degradação (MARKS, 2014). Dessa forma, a inibição específica de HDAC6, e consequente acúmulo de Hsp90 acetilada, pode gerar variadas alterações moleculares em vias de sobrevivência e proliferação celulares, visto que seriam atingidas proteínas como Akt, Bcr-Abl, c-Raf e ErbB2, dentre outras “proteínas-cliente” (CHEN *et al.*, 2005; KAWAGUCHI *et al.*, 2003, MARKS, 2014).

Tendo em vista que os principais agentes antimitóticos utilizados no tratamento de tumores sólidos e hematológicos promovem a polimerização de microtúbulos, tornando-se resistentes à dissociação por estímulos fisiológicos e gerando acúmulo de feixes desorganizados, tem sido proposto que a inibição de HDAC6 levaria a hiperacetilação de tubulina e posterior desestabilização dos microtúbulos para uma atuação antitumoral sinérgica e mais eficiente. Por esses motivos, a investigação desse tipo de fármaco pode ser interessante para o desenvolvimento de novas drogas nesse segmento (ZHANG *et al.*, 2003; VALENZUELA – FERNANDEZ, *et al.*, 2008).

Considerando a implicação do HDAC 6 na progressão do câncer, bem como outras doenças, essa isoenzima representa um alvo farmacológico interessante e importante. O interesse crescente pelos inibidores seletivos de HDAC6, está associado com a modulação da acetilação das proteínas reguladoras não histonas (por exemplo, α -tubulina) implicada na iniciação e progressão do câncer, incluindo migração celular, metástase, angiogênese e vias de resposta ao stress (ZHENG, 2017). De forma relevante, e de maneira similar à HDAC8, a HDAC6 apresenta-se como uma proteína

altamente expressa em amostras de melanoma humano, apresentando uma expressão média 5,8 vezes quando comparada à expressão em amostras de tecido normal, como descrito pelo *The Human Protein Atlas*. Esta base de dados descreve também que pacientes com tumores com baixa expressão de HDAC6 apresentam uma sobrevida livre da doença aos 3 anos de 29%, enquanto que pacientes com melanoma com alta expressão de HDAC8 não sobrevivem além dos 3 anos após o diagnóstico (0%) (*The Human Protein Atlas*, 2018). Estas informações também colocam em destaque à HDAC6 como um marcador biológico importante expresso preferencialmente em células tumorais e com um papel crucial nos processos de progressão e metastatização do melanoma.

2.3. INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES (HDACI)

Os inibidores das histonas desacetilases são um grupo de moléculas pequenas que têm como alvo inibir a atividade de histonas desacetilases (HDACs). Os HDACi possuem uma longa história de uso em neurologia e psiquiatria como antiepilépticos e estabilizadores de humor. Mais recentemente, eles foram investigados como possíveis tratamentos para o câncer. Dessa forma, HDACi tem experimentado um desenvolvimento clínico rápido nos últimos anos, com base na atividade antitumoral pré-clínica *in vitro* e *in vivo* em doenças malignas hematológicas e tumores sólidos (SLINGERLAND, et al., 2013).

Os inibidores de histonas desacetilases (HDACi) atuam exclusivamente nas HDACs de Classe I, II e Classe IV, podendo ser categorizadas de acordo com a porção química que se liga a íons de zinco (exceto tetrapeptídeos cíclicos que se ligam a íons de zinco com um grupo tiol) (SLINGERLAND, et al., 2013; MOTTAMAL, et al., 2015). Além deste mecanismo de ação, os inibidores de HDACs podem apresentar uma ligação direta aos complexos HDAC - fatores de transcrição, tais como *STAT3*, *NF-κB*, *p53*, *TFIIIE*, *E2f*, *ACTR*, *cMyb*, *E2F1*, *EKLF*, *FEN1*, *GATA*, *HNF-4*, *HSP90*, *Ku70*, *NFκB*, *PCNA*, *RUNX*, *SF1*, *Sp3*, *STAT*, *TFIIIE*, *TCF* e *YY1*, entre outros, alterando sua funcionalidade (DRUMMOND, et al., 2005; YANG & SETO, 2007).

Existem inibidores de HDAC das classes I, II e IV aprovados para uso clínico ou que estão em fase clínica (NEBIOSSO, et al., 2012). No grupo de ácidos carboxílicos, estão os inibidores ácido valpróico e o ácido g-fenilbutírico. Além deles, encontra-se o pivanex, que é um precursor análogo do ácido butírico. Todos eles encontram-se em estudos de fase clínica I/II, e na maioria

dos casos em terapias combinadas. Dentre os ácidos hidroxâmicos, o vorinostat (SAHA), foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2006 para o tratamento de linfomas cutâneos de células T (LCCT). Desde então, esta droga tem sido testada (Fases I/II) em vários tipos de tumores (sólidos e hematopoiéticos), tanto como monoterapia ou em terapia combinada, em particular, gencitabina e o inibidor de proteassomo, bortezomib. Um análogo quiral de SAHA, tal como o tefinostat (CHR-3996) está também na fase I para o tratamento de doenças hematológicas (COSSIO, 2011).

Dentro dos ácidos hidroxâmicos, podemos destacar os derivados do ácido benzoico, como givinostat (ITF2357), mocetinostat (MGCD0103) e entinostat (MS-275); derivados do ácido cinâmico, tais como panobinostat (LBH589), belinostat (PXD101) e pracinostat (SB939) e, finalmente, dois derivados do ácido pirimidina-5-carboxílico: CHR-3996 e quisinostat (SB939). Todos esses inibidores estão nas Fases I e II para o tratamento de linfomas, vários tipos de leucemias e tumores sólidos (COSSIO, 2011).

No campo das benzamidas, os inibidores mocetinostat (MGCD0103) e entinostat (MS-275), ambos derivados do ácido benzoico (COSSÍO, 2011), estão nas fases I e II para o tratamento de melanoma, mieloma, leucemias, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, intestino delgado e câncer colorretal, entre outros (NEBIOSSO, et al., 2012).

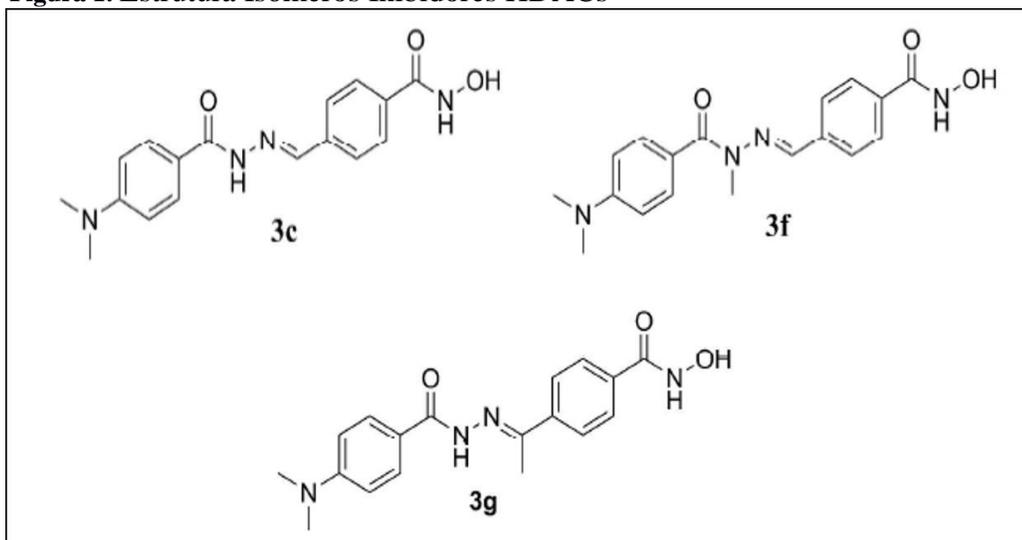
Considerando-se o grupo tiol ou sulfuro como grupo de ligação ao catião de Zn^{2+} do centro activo da HDAC tipo I, II e IV, há, atualmente, apenas um representante, a romidepsina, também conhecida como istodax ou FK228, um depsipeptideo bicíclico, administrado por via intravenosa como dissulfureto, que é reduzido in vivo a dois grupos tiol ou sulfúrico. Vale ressaltar que a romidepsina foi aprovada pela FDA em 2009 para o tratamento de LCCT. Além disso, este agente encontra-se em fase clínica I e II como monoterapia ou em terapia de combinação para o tratamento de diferentes tipos de cânceres (NEBIOSSO, et al., 2012).

Embora a pesquisa e desenvolvimento de HDACi tenham obtido valiosas conquistas na última década, especialmente no campo da oncologia, os inibidores de HDAC aprovados como agentes anticancerígenos têm dentro de suas características não serem seletivos e apresentar inúmeros efeitos adversos. Por isso, ainda há uma necessidade urgente de descobrir HDACi mais seletivos, com índices terapêuticos mais amplos do que os inibidores pan-seletivos aprovados até o momento, e com mínima toxicidade associada ao tratamento (ZHANG, et al., 2018). Por exemplo, os pacientes que receberam o tratamento com Vorinostat, Givinostat e outros HDACi

têm desenvolvido grau 3 e 4 de trombocitopenia, neutropenia, anemia, fadiga, diarreia, náuseas, vômitos, desidratação, anorexia, constipação, até mesmo mortes associadas (ZAGNI et al., 2017). Além disso, outro aspecto importante a considerar é o desenvolvimento de mecanismos de resistência contra a apoptose, por parte das células tumorais tratadas com HDACi, processos mediados por mudanças no stress oxidativo em células de leucemia, a ativação da via de sinalização de JAK / STAT e modulação do balanço autofagia/apoptose (ZAGNI et al., 2017).

Escassos estudos têm investigado os efeitos da inibição de HDACs específicas. Por exemplo, tem sido observado que a inibição específica de HDAC6 em células de melanoma acarreta muitos dos efeitos antitumorais observados na utilização de pan-inibidores, como redução da proliferação e efeitos imunomodulatórios, excetuando-se a citotoxicidade, em linhagens de melanoma com e sem mutação em NRAS/BRAF (WOAN et al., 2015). A parada de proliferação e subsequente diferenciação de células de melanoma tem sido associada à translocação de uma fração da HDAC6 para o núcleo, enquanto que em células proliferativas, sem parada do ciclo celular, a HDAC6 foi encontrada apenas no citoplasma (VERDEL et al., 2000).

Por outro lado, a tricostatina A (TSA) é um derivado natural de ácido dienohidroxâmico isolado de espécies do gênero *Streptomyces* com propriedades antifúngicas, antibióticas e de inibição de HDAC, utilizado como base para muitos estudos da área (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018; RODRIGUES et al., 2016, OCKER, 2010). Segundo a biblioteca terminológica do Instituto Nacional do Câncer norte-americano (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2018), o TSA pode ser classificado no grupo de ácidos hidroxâmicos, mas com atividade inespecífica contra HDACs de classes I, IIa, IIb e IV, visto que possuem um farmacóforo comum, sendo classificado então como pan-inibidor (OCKER, 2010; RODRIGUES et al., 2016). Recentemente, este composto foi utilizado como base para desenvolvimento e síntese de estruturas análogas inéditas, com ação de inibição dual de HDACs 6 e 8, pelo grupo do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em conjunto com o Laboratório de Biologia Animal Integrativa da Universidade Federal de Alfenas. A partir de modificações químicas na subunidade N-acil-hidrazona, as moléculas para-substituídas obtidas demonstraram efeitos de inibição de HDAC6/8, particularmente os análogos denominados 3C, 3F e 3G (Figura 1) (RODRIGUES et al., 2016).

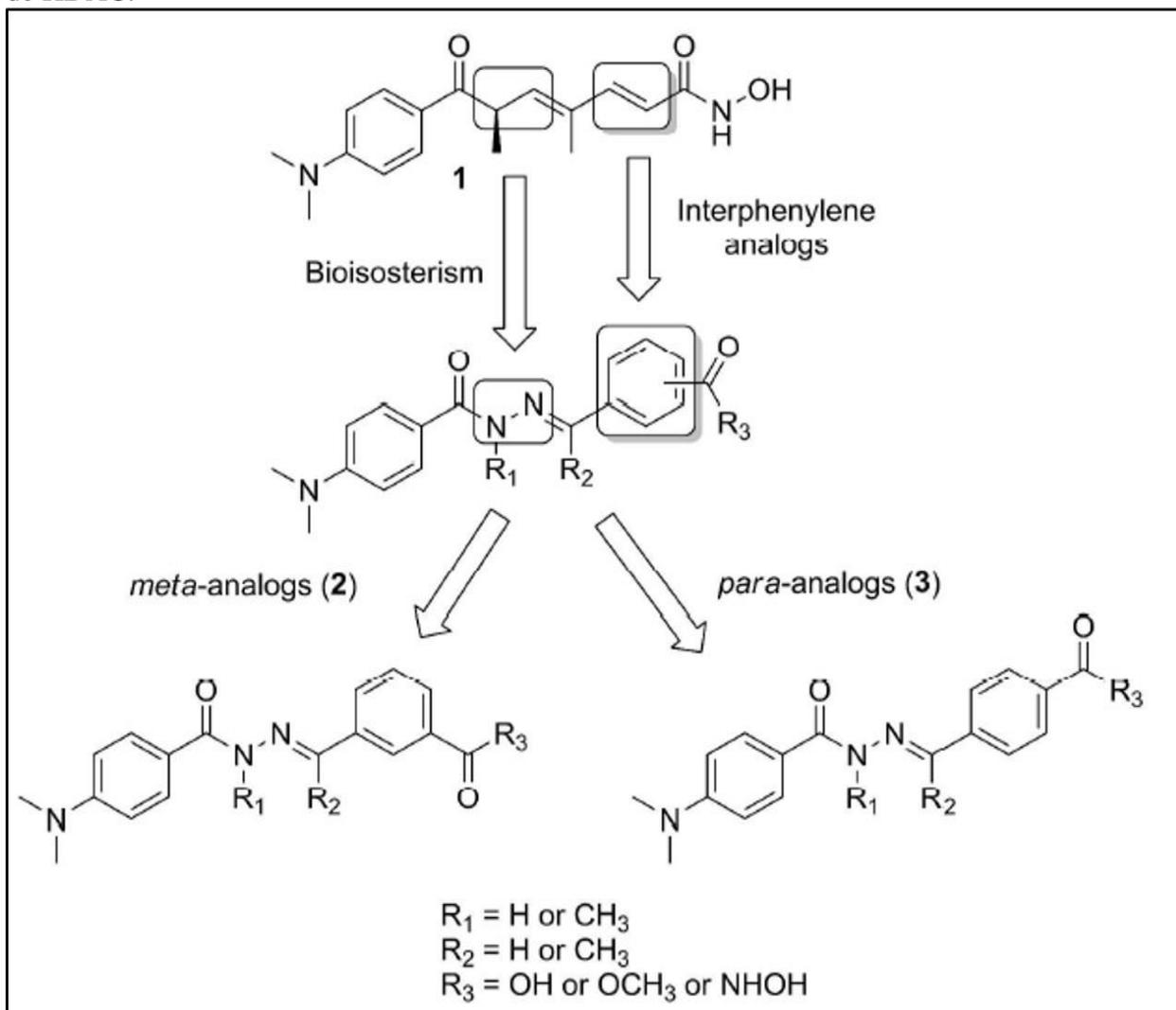
Figura 1. Estrutura Isômeros Inibidores HDACs

3c (E)-4-((2-(4-(dimetilamino) benzoil) hidrazono) metil) -N- hidroxibenzamida,
 3f (E)-4-((2-(4-(dimetilamino) benzoil) -2 -metil-hidrazono) metil) -N-hidroxibenzamida e
 3g (E)-4-(1-(2-(4-(dimetilamino) benzoil) hidrazono) etil) -N-hidroxibenzamida).

Fonte: RODRIGUES et al., 2016.

As moléculas foram desenhadas com base na estrutura da tricostatina A (TSA), um inibidor natural de pan-HDAC. A substituição bioisostérica clássica de dois resíduos de CH com N foi utilizada como principal estratégia de modificação molecular para a síntese de derivados de primários. Foi explorada a subunidade de N-acil-hidrazona (NAH), que tem sido identificada como uma estrutura privilegiada, para o design de novos análogos como se mostra na Figura 2.

Figura 2. Conceito de projeto usados para gerar uma nova classe de derivados NAH para inibição de HDAC.



Foi substituída a região de insaturação conjugada com o ácido hidroxâmico por um ligante interfenileno. Embora três regioisômeros pudessem ser usados para os novos análogos (orto, meta e para-substituído), este desenho se concentrou principalmente no uso dos análogos meta (2) e para (3) porque os compostos orto-substituídos têm dificuldade de entrar no canal na estrutura HDAC.

Fonte: RODRIGUES et al., 2016.

De forma interessante, as três moléculas ocasionaram drástica redução da viabilidade celular, especialmente em linhagens de hepatocarcinoma (HepG2) e melanoma metastático humano (HT-144). Em células HepG2, foi observada, como consequência do tratamento com 3C, parada do ciclo celular na transição entre as fases G2 e M ou durante a fase M, possivelmente devido à inibição de HDAC6 resultando em acetilação de tubulina, inibição mitótica e

citotoxicidade (BLAGOSKLONNY et al., 2002), ao passo que o tratamento com 3G acarretou morte celular por apoptose, possivelmente através do estímulo de múltiplos mediadores apoptóticos e consequente ativação de caspases 3 e 7 (ZHANG et al., 2004).

Com base nisso, foi proposto na realização deste trabalho a avaliação dos efeitos funcionais da molécula 3C sobre a viabilidade celular, capacidade clonogênica, alteração do ciclo celular, e da expressão gênica, nas linhagens celulares de melanoma HT-144 e WM-1366, como forma de investigar o potencial terapêutico da inibição de HDAC6/8, devido aos efeitos aditivos ou sinérgicos da dupla inibição, que podem levar a maior sucesso no tratamento não só do melanoma, mas também de muitas outras malignidades; e obviamente para conhecer as bases biológicas que determinam o fenótipo maligno do melanoma.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar de possuir baixa incidência, o melanoma é um tipo de câncer que apresenta alto índice de mortalidade e prognóstico ruim. Por esse motivo, resulta necessário a realização de estudos sobre frentes terapêuticas alternativas, buscando elevar a estimativa de anos de vida e a qualidade de vida dos pacientes.

Dentre as novas oportunidades terapêuticas, os inibidores de enzimas histonas desacetilases (HDACs) constituem um promissor grupo de novas drogas antitumorais, porque eles podem afetar a sobrevivência das células tumorais e seu ambiente.

Além disso, o desenvolvimento de inibidores de isoformas específicas de HDACs representa um avanço na busca por tratamentos mais efetivos e com menos efeitos colaterais para os pacientes, e considerando os interessantes resultados prévios com os inibidores inéditos sintetizados, a realização da presente proposta se torna mais do que justificada.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos funcionais da molécula 3C, derivado N-acilidrazônico inibidor de histonas desacetilases 6/8 sobre células de melanoma humano.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência e os efeitos da molécula 3C sobre a viabilidade celular de células de melanoma e fibroblastos PL1.
- Identificar as alterações sobre a dinâmica do ciclo celular e expressão gênica nas células WM 1366 e HT144 de melanoma.
- Verificar a influência e os efeitos da molécula 3C sobre a capacidade clonogênica nas células WM 1366, HT144, SK MEL 147 e CHL1 de melanoma.

5. MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens celulares possuem características genéticas específicas, algumas delas são derivadas de tecido metastático. As metodologias foram escolhidas para determinar o efeito da molécula sobre as células de melanoma.

5.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

No presente estudo foi utilizada a linhagem celular HT-144, a qual é derivada de melanoma metastático humano, adquirida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro. Também, foram utilizadas as linhagens celulares de melanoma humano WM-1366, SKMEL 147 e CHL1 cedida gentilmente pelo Dr. Tharcisio Citrangulo Tortelli Junior, do Centro de Investigação Translacional em Oncologia da Faculdade de Medicina da USP-SP. SKMEL 147 derivadas de melanoma metastático humano. E CHL1, derivada do local metastático do derrame pleural. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 (Meio Essencial de Eagle modificado por Dulbecco e suplementado com nutriente HAM-F12 na proporção 1:1, GIBCO™, ThermoFisher Scientific, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil), penicilinina (60 mg/mL, Sigma, CA, USA) e estreptomicina (100mg/mL, Sigma, CA, USA). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Para propósitos de manutenção e expansão após confluência, as células foram enzimaticamente desprendidas das garrafas com 0,05 % tripsina (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), e a suspensão celular foi subsequentemente dividida em novas garrafas de cultura.

Uma cultura primária de fibroblastos, nomeada PL1, foi derivada a partir de uma biópsia de pele normal, a qual foi obtida sob o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas (CEP-UNIFAL, Parecer: 2.082.524) a partir de um doador voluntário atendido cirurgicamente no Centro de Oncologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Alfenas. A amostra fresca de pele foi assepticamente coletada na sala cirúrgica e colocada num tubo Falcon contendo meio de cultura DMEM/F12 estéril e livre de SBF, suplementado com penicilinina (60 mg/mL, Sigma, CA, USA) e estreptomicina (100mg/mL, Sigma, CA, USA). Posteriormente, a amostra foi trasladada em reservatório refrigerado a 4°C ao Laboratório de Genética Humana da Unifal MG, e dentro da capela de fluxo laminar, a amostra foi depositada em placa petri estéril e lavada com PBS, antes de ser fragmentada com lâminas de

bisturi e exposta a desagregação enzimática com uma solução estéril de 0,5% colagenase tipo IV (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) por 4 horas. Após o tratamento enzimático, a suspensão celular resultante foi depositada dentro de um frasco de cultura de 75cm² com meio de cultura completo como descrito previamente, durante 7 dias. Após 60-80% de confluência, as células foram coletadas por desagregação enzimática, sub-cultivadas e mantidas sob condições de cultivo por um baixo número de passagens (P9). Todas as culturas celulares e ensaios foram realizadas no Laboratório de Genética Humana e o Laboratório de Biologia Animal Integrativa – LABAInt, ambos da Unifal-MG.

5.2 ESQUEMA DE TRATAMENTO

O derivado N-acilidrazônico 3C foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga, do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O referido composto, apresentando um peso molecular de 326,35 g/mol, foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO; Mallinckrodt Chemical Works, St Louis, Missouri, USA), numa concentração estoque de 20 mM, e estocada em alíquotas a -20°C. Essa solução estoque foi subsequentemente diluída em DMSO (veículo) em concentrações menores para atingir uma proporção máxima e homogênea do veículo de 0,01% nos diferentes tratamentos *in vitro*.

Após plaqueamento e adesão celular (48h), as culturas foram tratadas com a molécula 3C em estudo. O tempo de tratamento e as concentrações utilizadas, bem como, o inóculo das linhagens e placas de cultivo, variaram em decorrência da abordagem experimental utilizada.

5.3 VIABILIDADE CELULAR

O azul de tripano (azul diamino, azul de niagara, azul vital) é um corante derivado da toluidina que possui capacidade de manchar tecidos e células mortas (Ehrlich, 1904). Este corante é um dos vários funcionários a avaliar a viabilidade das células pela exclusão da captação, uma vez que não consegue penetrar e manchar células vivas com membranas intactas. Neste procedimento, uma

suspensão de células mononucleares (CMN) é misturada com uma solução a 0,4% de azul de tripano antes de ser observada ao microscópio usando um hemocítmetro de Neubauer.

5.3.1 Ensaio De Viabilidade Celular utilizando o Método de Exclusão de Azul de Tripano

Para o ensaio de viabilidade, as células das linhagens WM 1366 e HT 144 e a cultura primária de fibroblastos PL 1 foram semeadas em triplicatas com densidades iniciais de 2×10^4 células viáveis/mL de DMEM, em placa de 24 poços. As células foram tratadas com a molécula 3C nas concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80 μM por 48 h. O tempo foi escolhido tendo em conta o tempo de adaptação e aderência celular de 48h. Após de 48 h de tratamento de exposição, as células foram desaderidas enzimaticamente com tripsina e coradas com o corante azul tripano (0,4%) na proporção 1:1 durante, pelo menos, três minutos a temperatura ambiente, antes da contagem em câmara de Neubauer.

A porcentagem de células viáveis, relativas ao controle DMSO, foram analisadas estatisticamente e apresentadas em gráficos utilizando o programa GraphPAD Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Posteriormente, foram obtidos os valores de IC_{50} através do programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA). Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.4 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CLONOGÉNICA

O ensaio de sobrevivência clonogénica mede a toxicidade de um tratamento de células a uma vasta gama de doses. O tipo de célula medido depende do ensaio, tal como as células cancerosas à toxicidade para as células normais ou para efeitos colaterais. A leitura do ensaio especifica a capacidade das células para se reproduzir e formar clones.

Células HT-144, WM-1366, SKMEL e CHL1 foram semeadas em baixa densidade (200 células por placa de 35mm de diâmetro). De forma que 48 h após o plaqueamento as culturas exibam células aderidas, porém isoladas. Após adesão as culturas foram tratadas com a molécula 3C nas concentrações 0, 5, 10, 20, 40 e 80 μM por 48 horas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi substituído por meio fresco e as placas foram mantidas em estufa a 37 °C, contendo 5% DE CO_2 , por 10 dias. Após o período de incubação as células foram lavadas com PBS, fixadas por

20 minutos com metanol P.A. (Sigma Aldrich LTDA, Brasil). Após secagem, as amostras foram coradas com solução Giemsa 1:4 (Sigma Aldrich LTDA, Brasil), por 5 minutos, depois lavadas com água destilada. A contagem do número de colônias foi realizada com auxílio de estereomicroscópio (aumento 20x). Foram consideradas na análise as colônias que tinham, pelo menos, 50 células. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes.

5.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

As células HT 144 foram semeadas em placa de 24 poços com densidade de 7×10^4 células /poço. Após adesão (48 h), as células foram tratadas com 3C nas concentrações de $10\mu\text{M}$ e $20\mu\text{M}$ (HT-144) e $8\mu\text{M}$ e $16\mu\text{M}$ (WM-1366), durante 48 horas. Após tratamento as células foram coletadas por digestão enzimática (*Trypsin* - EDTA solution /Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e transferidas para tubo Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1000 rpm). As amostras foram fixadas com etanol gelado (75% em PBSA Salina fosfato tamponada) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBSA, RNase (10 mg/mL) e Iodeto de propídio (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A análise foi realizada em citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) usando o software Guava Soft 2.7. Os dados apresentados referem-se a média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

5.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR

As células foram semeadas em placas de 24 poços, com inóculo 8×10^4 . O RNA total das células HT-144 tratadas e não tratadas com o composto 3C foi extraído usando o *kit* Rneasy® Micro (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), de acordo com as recomendações do fabricante, e eluído em $30\mu\text{L}$ de água livre de RNase. As concentrações de RNA foram mensuradas com espectrofotômetro NanoDrop® ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) e $1\mu\text{g}$ de RNA foi incubado com DNase I (1 U/ μg ; Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) para eliminar possível contaminação com DNA genômico, e depois submetido a transcrição reversa utilizando primers aleatórios e o *Kit* de transcrição reversa cDNA *High Capacity* (Applied Biosystems, São Paulo,

SP, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. Os reagentes foram incubados a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, e finalmente 85°C por 5 minutos para inativar a enzima.

A expressão dos genes alvo (*CDKN1A*, *PLK1*, *CCNB1*, *AURKA* e *AURKB*) foram investigados por PCR em tempo real com um termociclador ABI 7500 Master Mix Power Sybr Green PCR (Applied Biosystems) usando os primers listados na Tabela 2.

Tabela 2. Informação de primers específicos utilizados para a amplificação por PCR em tempo real.

Gene	Sequência	Referência
<i>p21</i>	F 5'- CCATAGCCTCTACTGCCACCATC-3'	NM_001291549.1
	R 5'- GTCCAGCGACCTTCCTCATCCA-3'	
<i>PLK1</i>	F 5'- CCTGCACCGAAACCGAGTTAT-3'	NM_005030.5
	R 5'- CCGTCATATTCGACTTTGGTTGC-3'	
<i>CCNB1</i>	F 5'- GTACCCTCCAGAAATTGGTGA-3'	NM_031966.2
	R 5'- GACTACATTCTTAGCCAGGTG-3'	
<i>Aurora-A</i>	F 5'- TCTTCACAGGAGGCAAATCCA-3'	XM_017028035.1
	R 5'- AATAAGTTACACACTCACTCAGGTACTA- 3'	
<i>Aurora-B</i>	F 5'- AAAGAGCCTGTCACCCCATC-3'	XM_017025310.1
	R 5'- CGCCCAATCTCAAAGTCATC-3'	
<i>ACTB</i>	F 5'- AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'	NM_001101.3
	R 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	
<i>GAPDH</i>	F 5'- GGATTTGGTCGTATTGGGC-3'	NM_002046.4
	R 5'- TGGAAGATGGTGATGGGATT-3'	
<i>18srRNA</i>	F 5'- GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	HQ387008.1
	R 5'- CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	

F = primer forward; R = primer reverse.

As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L e os genes foram amplificados usando as seguintes condições: 95°C por 10 min (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 10 segundos, e anelamento e extensão a 60°C por 1 min (40 ciclos). Para selecionar o gene *housekeeping* mais estável, os perfis de amplificação de β -actina (*ACTB*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), e 18S RNA ribossômico (18srRNA) foram comparados utilizando o aplicativo geNorm for Microsoft Excel (medgen.ugent.be/genorm; Vandesompele et al. (2002)); o gene *housekeeping* mais estável foi *ACTB*. A abundância relativa de cada alvo foi calculada usando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência e uma amostra controle para a calibração. A média dos valores de eficiência para cada gene foram calculados através do perfil de amplificação de cada amostra usando o programa LinRegPCR. Cada amostra foi processada em triplicata e um controle não molde foi incluído. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão da média de 4 experimentos independentes.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram apresentados como a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram determinadas de acordo com a análise de variância one – way ANOVA, seguido pelo pós – teste de comparações múltiplas de Bonferroni e/ou Dunnett's, usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 VIABILIDADE CELULAR

No presente estudo foi investigado o impacto do 3C sobre a viabilidade celular das linhagens celulares de melanoma HT-144 e WM-1366, e da cultura primária PL1 de fibroblasto. A molécula foi capaz de inibir a viabilidade celular em ambas as linhagens celulares de maneira dose-dependente ($p < 0,05$). Uma inibição significativa da viabilidade foi detectada a partir de $10 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) e $5 \mu\text{M}$ ($p < 0.1$) nas linhagens HT-144 e WM-1366, respectivamente (**Figura 3**). Comparativamente com PL1 controle negativo observa se que a pesar de ter um efeito a partir da concentração $5 \mu\text{M}$ não tem efeito antiproliferativos, porém, não foram encontradas diferenças estatísticas quando comparado ao controle DMSO, sendo inviável a obtenção do IC_{50} para este modelo celular. Subsequentemente, na linhagem HT-144 o valor de IC_{50} obtido foi de $17,28 \mu\text{M}$, e para a linhagem WM-1366 o valor de IC_{50} foi de $15,08 \mu\text{M}$ (**Tabela 1**).

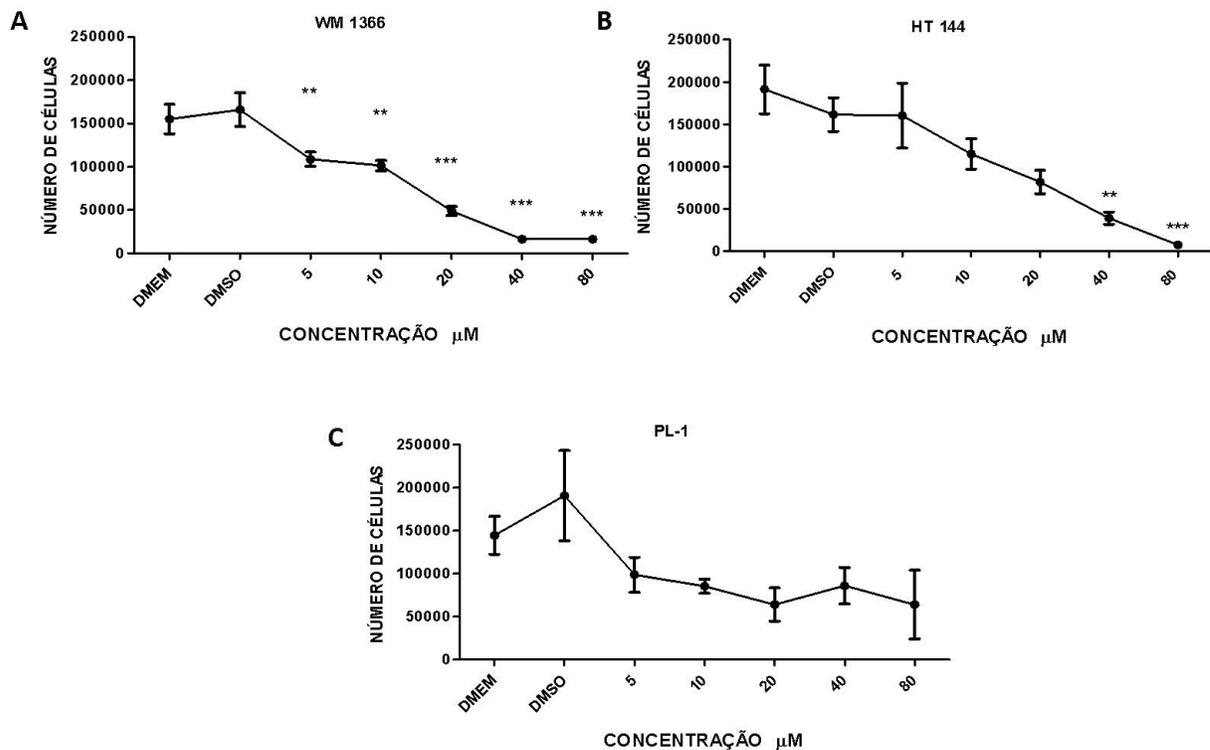


Gráfico 1. Viabilidade celular. As linhagens celulares de melanoma HT 144 e WM 1366 e Fibroblasto, foram cultivadas em presença de várias concentrações da molécula 3C (0-80 μM) durante 48 horas. O número de

células foi mensurado pelo ensaio de exclusão azul de tripano. Os dados representaram a média \pm DP. De três experimentos independentes. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado ao grupo controle (DMSO).

Frente a esses resultados, a molécula 3C foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade e a proliferação celular de ambas linhagens de melanoma (**A-B**), porém de forma mais intensa na linhagem WM 1366 (**A**). Enquanto que nas células normais (**C**), o efeito antiproliferativo é menos intenso sem possibilidade de encontrar o valor de IC_{50} .

Tabela 2. IC_{50} nas linhagens celulares de melanoma. Os valores foram obtidos no programa Calcsyn para o tratamento com 3C por 48 h. Valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Linhagem celular	IC_{50}
WM1366	15,08 \pm 0,291
HT144	17,28 \pm 0,243

6.2 EFICIÊNCIA CLONOGÊNICA

Os ensaios de clonogenicidade permitiram evidenciar que o composto 3C diminuiu significativamente a capacidade de formar colônias em todas as linhagens de melanoma, a partir da dosagem de 5 μ M ($p < 0,05$), enquanto que o efeito mais intenso foi alcançado com a dose de 80 μ M ($p < 0,001$) como especialmente observado na linhagem WM-1366 (**Gráfico 2C**) e SKMEL 147 (**Gráfico 2A**). Estes resultados sugerem um efeito clonogênico inibitório maior em células SKMEL 147 (**Gráfico 2A**), comparado com o efeito dose-dependente na linhagem HT-144 (**Gráfico 2B**), e CHL1 (**Gráfico 2B**). Estes valores confirmaram a sensibilidade parcial de HT-144 e CHL1, e a maior sensibilidade clonogênica de SKMEL 147 e WM-1366.

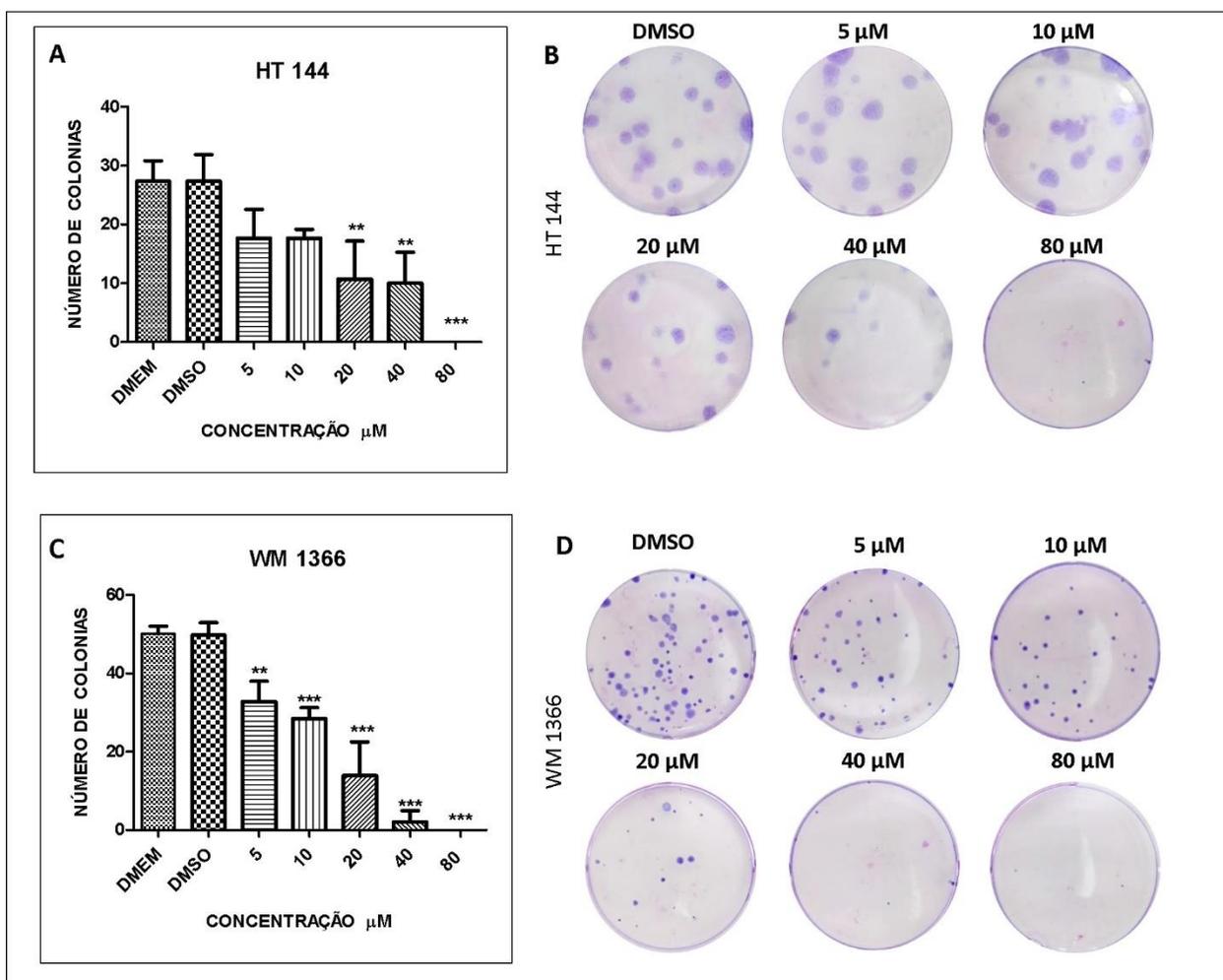


Gráfico 2. Eficiência Clonogênica. Células WM-1366 e HT-144 de melanoma foram tratadas com 3C nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 40 e 80 μM durante 48 horas, depois o composto 3C foi removido e as células foram mantidas em cultura durante 10 dias. As colônias formadas foram quantificadas e analisadas comparativamente ao tratamento com o veículo DMSO (A, C). A significância das diferenças em comparação com os resultados do controle foi determinada por ANOVA * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ seguido pelo teste de Bonferroni. (B, D), apresenta-se uma série representativa do ensaio clonogênico realizado em ambas linhagens de melanoma.

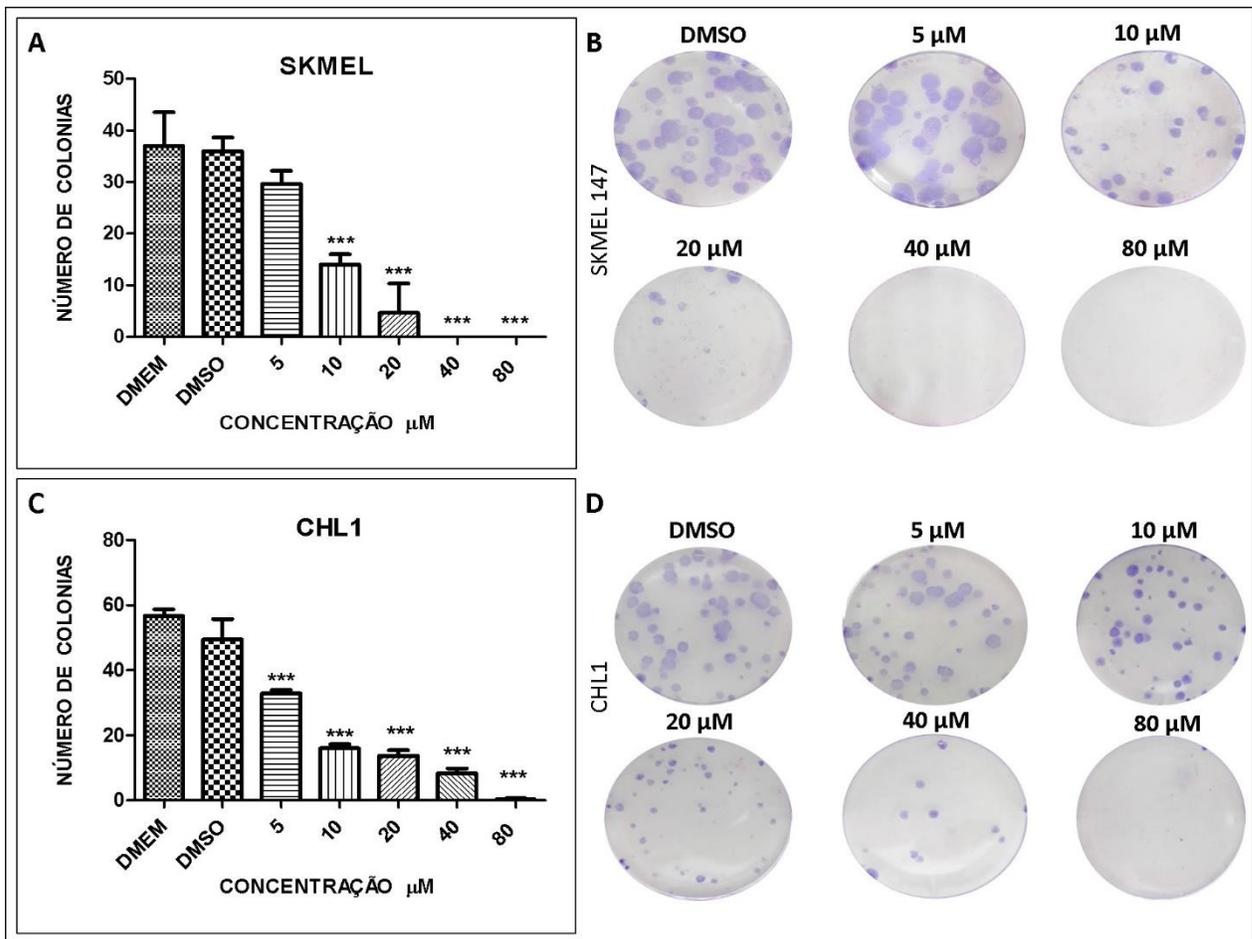


Gráfico 3. Eficiência Clonogênica. Células SKMEL 147 e CHL1 de melanoma foram tratadas com 3C nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 40 e 80 µM durante 48 horas, depois o composto 3C foi removido e as células foram mantidas em cultura durante 10 dias. As colônias formadas foram quantificadas e analisadas comparativamente ao tratamento com o veículo DMSO (A, C). A significância das diferenças em comparação com os resultados do controle foi determinada por ANOVA * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$ seguido pelo teste de Bonferroni. (B, D), apresenta-se uma série representativa do ensaio clonogênico realizado em ambas linhagens de melanoma.

6.3 CICLO CELULAR

Ciclo Celular é o conjunto de fases que uma célula passa com o intuito de duplicar-se, dando origem a duas células novas.

Em vista dos significativos efeitos antiproliferativos e redução da sobrevivência clonogênica da molécula 3C sobre as células de melanoma, ambas linhagens foram submetidas ao ensaio de ciclo celular. Dessa forma, a frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo (Gráfico 4).

Após o tratamento com 3C, as células WM-1366 e HT-144 apresentaram aumento na população G2/M com concomitante diminuição na frequência de células na fase G0/G1. Os dados indicam, portanto, que a molécula induz bloqueio do ciclo celular nas fases G2/M. Adicionalmente, a molécula também induziu aumento da população celular na fase sub-G1, que representa uma população celular com DNA fragmentado, indicando que houve indução de morte celular causada pela molécula 3C (**Graf. 4**).

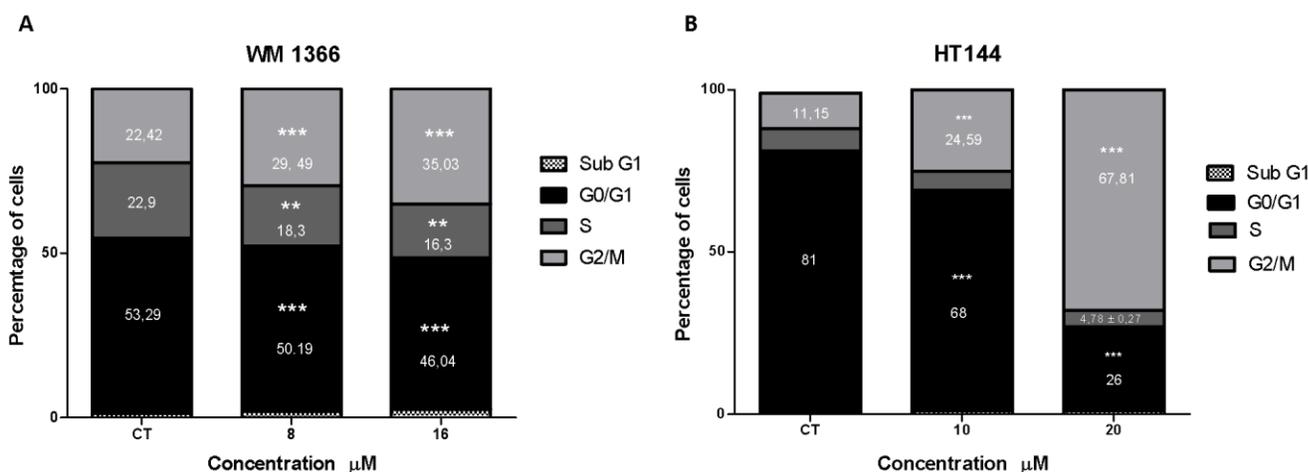


Gráfico 4. Ciclo celular. A análise do ciclo celular de células WM-1366 tratadas com DMSO (controle) e 3C nas concentrações de 8 e 16 μM e células HT-144 nas concentrações de 10 e 20 μM é apresentada, mostrando a distribuição de populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com a molécula 3C por 48 horas. Podem ser observadas diferenças significativas na concentração de 16 μM nas células WM 1366e aumento na população na fase Sub G1(A), e diferenças significativas na concentração 20 μM em células HT 144 (B). A significância das diferenças em comparação com os resultados do controle foi determinada por ANOVA * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$ seguido pelo teste de Bonferroni.

6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A avaliação da expressão gênica a reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa, também reversa da reação em cadeia da polimerase da transcriptase, é uma variante da PCR, uma técnica de laboratório comumente usada em biologia molecular para gerar um grande número de cópias de DNA, esse processo amplifica a expressão das proteínas.

Os achados a dinâmica do ciclo celular, motivaram a investigação de possíveis alvos moleculares de 3C em células de melanoma, considerando que a transição G2 / M e os passos iniciais da mitose são controlados por numerosas proteínas quinases nucleares, que normalmente são desreguladas nas células cancerosas. Assim, foi investigado o perfil de expressão dos genes

CDKN1A (p21), *PLK1* (Polo-like kinase, PLK1), *CCNB1* (Ciclina B1), *AURKA* (Aurora A), e *AURKB* (Aurora B) considerando que esses genes são críticos para a transição G2/M e a progressão da fase M. Como apresentado pela Figura 8, foi encontrado um incremento significativo da abundância de RNAm de p21 nas amostras tratadas quando comparadas com as células controle (Graf. 5A). De maneira diferente, encontramos que 3C reduz significativamente a quantidade de RNAm do gene *CCNB1*, o mesmo que codifica a Ciclina B1 (Graf. 5B).

Também foram encontradas reduções significativas na expressão de três proteínas quinases mitóticas (Polo-like quinase I, Aurora A, e Aurora B) nas culturas tratadas quando comparadas com a cultura controle (5 C-D).

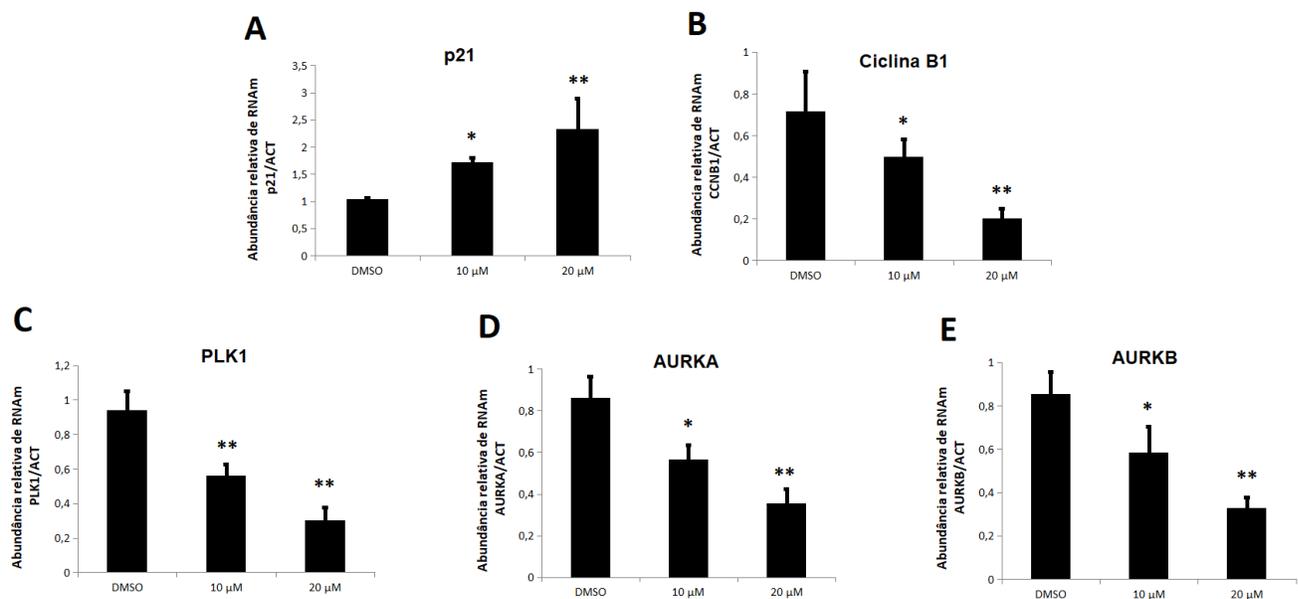


Gráfico 5. Avaliação do nível de transcrição. A análise de PCR em tempo real foi utilizada após 48 h de tratamento com a molécula 3C usando o gene *ATBC* como controle endógeno. A molécula 3C foi usado nas concentrações de 10 e 20µM nas células HT-144. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes para os genes p21 (A), Ciclina B1 (B), PLK1 (C), AURKA (D), e AURKB (E). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ de acordo com a análise de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

7. DISCUSSÃO

As histonas desacetilases (HDACs) são reguladores críticos da expressão gênica que enzimaticamente removem o grupo acetil das histonas e reprimem a expressão gênica. Em vista do importante papel das HDACs em diversos processos biológicos, torna-se muito importante conhecer profundamente as diferentes vias moleculares nas quais estas enzimas atuam normalmente, assim como o seu papel no desenvolvimento de patologias tais como o câncer. Numerosos estudos de correlação têm demonstrado expressão anormal de HDACs em tumores humanos, e de forma específica, as HDACs 6 e 8 tem mostrado um papel de destaque na proliferação e metástase de células de melanoma humano, um dos tumores mais agressivos e metastáticos (LIU et al, 2016; WILMOTT et al., 2015). Nos últimos anos, muitos estudos têm se concentrado no exame da eficácia da HDACI no tratamento do melanoma, sendo a TSA a mais estudada. Foi aprovado que o HDACI desempenha um papel importante na restrição do crescimento e proliferação de células de melanoma, especialmente por induzir a paragem do ciclo celular e a apoptose com diferentes mecanismos. Além disso, a ação sinérgica da HDACI foi estudada com outros inibidores, como inibidores BRAF e inibidores da BET, e foi aprovada como um tratamento bastante eficaz para o melanoma, mas são necessárias mais pesquisas sobre esse assunto (XU, PARMIGIANI & MARKS, 2007). Por causa, do que a maioria dos atuais inibidores possuem atividade inespecífica contra HDACs, sendo chamados então de pan-inibidores (OCKER, 2010; RODRIGUES et al., 2016).

Considerando estes antecedentes, a molécula utilizada na presente pesquisa desenvolvido por Rodrigues e colaboradores (2016), apresentou alta especificidade pelas HDAC 6 e 8 (RODRIGUES et al., 2016) e efeitos antiproliferativos importantes em células de melanoma e hepatocarcinoma. De acordo com Zhang e colaboradores (2014), atualmente existem duas abordagens opostas no desenho de inibidores de HDACs para a terapia anticâncer: o desenvolvimento de inibidores seletivos e o desenvolvimento de inibidores duplo- ou multi-dirigidos (*dual- or multitargeted inhibitors*). A primeira estratégia, que contribui com a elucidação da função de HDACs individuais e fornecer inibidores promissores com poucos efeitos colaterais, tem sido amplamente aceita pelos diferentes grupos de pesquisa em desenvolvimento de drogas. Por outro lado, a segunda abordagem, embora menos praticada, mais promissora para a terapia anticâncer pois os inibidores sintetizados são o resultado da fusão de domínios específicos de

HDACi e domínios para outros alvos, visando uma ação sinérgica simultânea (por exemplo em combinação com complexos de platina, inibidores de RTKs, inibidores de topoisomerasas, etc), oferecendo assim uma bi- ou multifuncionalidade dos inibidores sintetizados (ZHANG et al, 2015). Dessa forma, podemos considerar que a molécula 3C, utilizada no presente trabalho, pode ser classificado como um inibidor de HDACs da primeira categoria, é específico com dupla função inibitória para as HDACs 6 e 8.

No presente estudo, foram utilizadas a linhagem celular HT-144, derivada de um melanoma maligno obtido de sítio metastático (ATCC, 2018), e a linhagem celular WM-1366, derivada de melanoma primário tumorigênico com competência para metástase (ROCKLAND, 2018). SK MEL 147, derivada de melanoma metastático humano e CHL1 derivada do local metastático de derrame pleural. As linhagens apresentam perfis genéticos diferentes, porém relevantes para a biologia do melanoma, tais como mutação V600E no gene *BRAF*, mutação R55S no gene *PTEN* e mutação W2845 no gene *ATM* para a linhagem celular HT-144; mutação Q61L no gene *NRAS* e mutação E285K no gene *TP53* para a linhagem WM-1366. Mutação *NRAS* (Pq61R) para a linhagem SK MEL 147 e mutação H193R e His193Arg no gene *TP53*, e Wt10 no gene *CDKN2A*. Estes perfis genéticos distintos podem determinar não apenas características fenotípicas e comportamentos neoplásicos únicos nas referidas linhagens, mas também respostas funcionais e biológicas diferentes quando tais modelos celulares são expostos a condições terapêuticas diferentes.

Nesse contexto, Yan e colaboradores, encontraram que apenas a inibição específica (*knockdown*) de HDAC8 causou uma seletiva redução de maneira dose- e tempo-dependente da expressão do gene *Tp53* mutante, além de desencadear defeitos proliferativos em células com esse status do *Tp53* (mutante). Este efeito antiproliferativo causado pela inibição de HDAC8, mostrou-se sempre mais intenso em células com o *Tp53* mutante do que em células com o *Tp53* selvagem, sugerindo que o efeito da inibição de HDAC8 pode ser dependente do status mutante do gene *Tp53* nas células, além de propor um mecanismo regulatório da HDAC8 sobre a transcrição de *Tp53* mutante (YAN et al., 2013). Esta importante relação, pode explicar a maior sensibilidade na capacidade clonogênica das células WM-1366, portadoras da mutação E285K no gene *TP53*, e das células CHL1 portadoras da mutação H193R, H100R e H61R no gene *TP53* ao inibidor 3C como demonstrado no presente trabalho. Resulta importante ressaltar que, devido à alta frequência de mutações em *TP53* e a necessidade de HDAC8 para a transcrição de *TP53*^{mut}, os inibidores de

HDACs e especialmente aqueles que apontem a HDAC8, podem ser explorados como um adjuvante para tumores portadores de mutação em *TP53* (YAN et al., 2013).

Diferentes estudos têm descrito que inibidores de HDACs podem atingir seus efeitos antitumorais através da via de sinalização do homólogo de fosfatase e tensina (PTEN)/Proteína quinase B (AKT) (GAN & ZHANG, 2009; HUANG et al, 2012). *PTEN* é um gene supressor tumoral que possui um papel crucial no crescimento celular, desenvolvimento e apoptose. Entre 30-50% das linhas celulares de melanoma e entre 5-20% dos tumores apresentam inativação de *PTEN* por mutação ou deleção, embora não se saiba exatamente quando estas falhas ocorreriam, uma vez que são mais freqüentes em melanomas avançados (PICCO, et al., 2010) tais como a linhagem HT-144 (*PTEN*^{R55S}), e 10% de melanomas primários (GULDBERG et al., 1997; WU et al, 2003). *PTEN* atua como uma fosfatase com atividade contra substratos proteicos e lipídeos, e o seu principal substrato é o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), fosfolípido que normalmente está localizado na membrana plasmática atuando como importante mensageiro secundário ou transdutor de sinais a partir de fatores de crescimento, hormônios e componentes da matriz extracelular. Um dos alvos mais estudados e conhecidos de PIP₃ é AKT. Quando as células são estimuladas, AKT é recrutado por PIP₃ para a membrana plasmática, fosforilado em Thr308/Ser473, e posteriormente ativado. Tomando em consideração que AKT é envolvido na promoção da sobrevivência celular, proliferação e migração celular, a perda de *PTEN* e consequente superativação de AKT, resulta em perda do controle apoptótico e proliferativo (WU et al, 2003), como observado em 40-60% de melanomas esporádicos (STAHL et al, 2004).

Entre os diversos efeitos, a activação directa ou indirecta da Akt no melanoma são: a inibição de *TP53* (através de activação de MDM2) e outros inibidores do ciclo celular (p21, p27), a inibição de factores pró- apoptótico (BAD, pro-caspase-9), e a activação dos factores anti-apoptóticos (Bcl-2, Mcl-1), a activação da cinase mTOR, que estimula o crescimento celular e a activação de factores de transcrição de β -catenina e NFkB, que aumentam a expressão de numerosos genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular (WU, et al., 2003) A ativação dessa via também está relacionada a mudanças na expressão de caderinas que facilitam a invasão tumoral (MEIER et al., 2005) A activação da via PI3K / Akt no melanoma também causada por mutações em PI3K (encontrado em 3% dos melanomas metastáticos) ou por sobre-expressão de Akt3 até 60% dos melanomas) geralmente por amplificação do gene (GRAY-SCHOPFER et al., 2007). Em

comparação com os melanócitos normais, altos níveis de ativação de Akt foram detectados na fase de crescimento radial e aumentaram ao longo dos estágios sucessivos (STAHL et al., 2004). A presença de mutações ou deleções de PTEN no melanoma coincide com a presença de mutações no BRAF, mas não no NRAS. Uma vez que mutações no ARN ativam tanto a via de MAPK como PI3K (ao contrário de BRAF activo que apenas a primeira) é considerado um mecanismo independentemente, a activação de ambas as vias é necessário para o desenvolvimento de melanoma (CURTIN et al., 2005). Isto é suportado pelo facto de tanto a sinalização MAPK como PI3K deve ser inibida com a finalidade de suprimir o crescimento de células em culturas tridimensionais melanoma (PICCO et al., 2010).

Recentemente foi demonstrado que, o supressor tumoral PTEN de tipo selvagem (PTEN⁺), presente em células de glioblastoma U87-MG, pode ser acetilado (em K163) e ativado em resposta à inibição seletiva de HDAC6, promovendo importantes efeitos antitumorais; enquanto que a acetilação e ativação do mutante PTEN-K163R não pode ser induzido pela inibição seletiva de HDAC6 (MENG *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram obtidos por Zhan e Gan em 2017, os quais descreveram que o tratamento com o inibidor seletivo de HDAC6, tubastatina A, promoveu a translocação para a membrana do supressor tumoral PTEN e correspondente desfosforilação da proteína oncogénica AKT em células de carcinoma de células escamosas e carcinoma adenóide cístico favorecendo os efeitos antitumorais sinérgicos atingidos pelo tratamento combinado com inibidores de HDAC6 (tubastatina A) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (Celecoxibe) (ZHANG & GAN, 2017).

Baseados nessas informações, é possível sugerir no nosso estudo que o notável efeito do nosso inibidor de HDAC6/8 sobre a viabilidade celular e sobrevivência clonogénica pode ser devida a inibição seletiva e específica da HDAC6, subsequente ativação do PTEN, preferencialmente nas células WM-1366 (PTEN⁺) do que nas células HT-144 (PTEN^{R55S}), e consequente inativação do AKT que promoveram os efeitos antimelanoma observados.

As linhagens celulares CHL1 e SK MEL, são derivadas de tecido metastático o que fornece umas características previas de invasão, provavelmente mediado pelo *hots pots* da mutação *missense* do gene *TP53*, no caso de exposição à luz ultravioleta e mutações em tandem CC:TT no câncer no de pele, característico de ambas as células. A invasão e disseminação do melanoma está relacionado com alterações na adesão celular. Em condições normais, as moléculas de adesão celular controlam a migração celular, a organização do tecido e a organogénese (JOHNSON, 1999).

As alterações na expressão destas moléculas é causa da sinalização celular anormal, interações anormais com o estroma tumoral e facilita a invasão do tecido circundante. Entre as moléculas que modulam este processo encontram-se as proteínas da família das caderinas e integrinas.

As caderinas são proteínas transmembranares responsáveis pela adesão intercelular, que também participam na sinalização intracelular. Elas possuem um domínio extracelular que juntam as células adjacentes com caderinas, formando regiões de contato de células chamadas junções aderentes. Seu domínio intracelular é parte de um grande complexo de proteína que se liga ao citoesqueleto de actina através proteínas α - e β -catenina de ancoragem. Diversas vias de sinalização provocam a dissociação do complexo de adesão β -catenina e a sua translocação para o núcleo, onde é regulada a transcrição dos genes alvo. As caderinas clássicas são divididas em quatro subtipos, nomeado para o tecido, onde foram encontrados: E (epitelial), presentes em células epiteliais polarizadas da epiderme, incluindo melanócitos e queratinócitos; VE (vascular-endotelial); P (placentário); e N (neural), o último sendo típica de células mesenquimais presentes na derme como fibroblastos. As caderinas são homofílicas isto é, que formam uniões com outras moléculas do mesmo tipo. Ambos os melanócitos como queratinócitos epidérmicos expressam E-caderina e interagem através dele. O contato dos melanócitos com os queratinócitos indiferenciados da membrana basal inibe a proliferação de melanócitos e mantém o equilíbrio entre os tipos de células (HSU et al., 2000; VALYI-NAGY et al., 1993). A progressão do melanoma a partir da fase de crescimento radial em relação à vertical, é caracterizada pela perda de E caderina e aumento da expressão de N-caderina (Danen et al., 1996). A N caderina é característica de carcinomas invasivos e de disseminação metastática permitindo as células de melanoma interagir com outras células expressando Ncaderina como fibroblastos da derme e endotélio vascular (Danen et al., 1996). Nos órgãos, as células não só interagem uns com os outros, eles também fazem isso com a matriz extracelular. A Invasão local e a metástase são responsáveis pela mortalidade no melanoma.

Outro tipo de proteínas transmembrana, as integrinas, atua como receptores para fibronectina, colágeno e laminina, componentes essenciais da MEC (Matriz Extracelular) (KUPHAL et al., 2005), e conectam-na ao citoesqueleto da célula. Eles também ativam as vias de sinalização intracelular que informam a célula das características da matriz na qual ela está imersa.

Essa integrina possui um espectro maior de interação e, portanto, pode se ligar a novos componentes do MEC, como a fibronectina, com a qual os melanócitos normais não interagem. Isso induz a ativação de FAK (Focal adhesion kinase), que contribui para aumentar a expressão de

genes como a metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e outras enzimas que degradam os componentes do MEC e da membrana basal (FENSTERLE et al., 2006). Além disso, as integrinas $\alpha v \beta 3$ aumentam a expressão de BCL-2 (PETITCLERC et al., 1999) e estimulam a motilidade das células do melanoma através da reorganização do citoesqueleto (LI, 2001). Todos esses eventos permitem que a célula migre através do MEC, prolifere e invada outros tecidos (PICCO et al., 2010) A redução na eficiência de formação de colônias no ensaio clonogênico para ambas as células poderia indicar a eficiência da molécula em manter, nas células filhas, a acetilação em níveis próximos aos normais, portanto, diminuindo sua capacidade metastática.

Assim como observaram Rodrigues e colaboradores (2016) na linhagem HepG2, a molécula 3C ocasionou bloqueio do ciclo celular em G2/M na linhagem WM-1366 e HT-144, demonstrado pelo aumento na população G2/M e diminuição na frequência de células na fase G0/G1, como também aumento na população Sub-G1. Estes dados evidenciam alteração na transição entre as fases G2 e M ou na fase M, consistente com resultados obtidos com pan-inibidores de histona-desacetilases como tricostatina A, LAQ824 (dacinostat) e LBH589 (panabinstat) (BALI et al., 2005; CHA et al., 2009; ANH et al., 2012). Diversos estudos com o inibidor inespecífico tricostatina A relataram parada do ciclo na transição G2/M, como resultado da indução de expressão de p21 e redução da transcrição de ciclina B1, Plk1 e survivina, conhecidos envolvidos com a progressão da fase G2 para fase M (NOH et al., 2003; JING et al., 2015; NOH et al., 2009). Aumentando a expressão do inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKI) p21, enquanto regulando negativamente p53. Causa a redução da proteína ciclina D1 e ciclina A e reduz os níveis de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL (BOYLE, et al., 2005).

Olson e colaboradores demonstraram que a inibição específica de HDAC8 levava a expressão aumentada de p21 através de alguns de seus substratos, incluindo ARID1A (OLSON et al., 2014). Foi sugerido que este último, um regulador de expressão gênica, poderia ser responsável, em parte, por tal efeito, uma vez que possui atividade aumentada quando hiperacetilado e se encontra diretamente conectado envolvido à com a expressão de p21 (GUAN et al., 2009; WU et al., 2013). O aumento de p21, por sua vez, é capaz de bloquear a entrada na mitose, visto que inibe a atividade da Cdk1, cuja ligação à ciclina B é necessária para progressão da fase M (TAYLOR & STARK, 2001).

De forma concordante com estas informações, no presente estudo demonstrou-se por ensaios de expressão gênica, o aumento significativo da expressão do gene p21 e redução

significativa da Ciclina B1 após o tratamento com o inibidor 3C, o que sugere fortemente que a parada do ciclo celular nas fases G2/M, observado no presente estudo, é altamente dependente da regulação destas importantes moléculas em ambos modelos celulares de melanoma utilizados.

A inibição de HDAC6, constatada por Hubbert e colaboradores (2002) e por Zhang e colaboradores (2003), foi responsável pela hiperacetilação de tubulina, levando à estabilização de microtúbulos em células tumorais. A polimerização dinâmica de microtúbulos no fuso mitótico é fundamental para a separação de cromossomos na mitose, de maneira que seu impedimento resulta em sinais inibitórios da progressão da fase M (BLAJESKI et al., 2002). Além disso, o aumento observado na população SubG1 indica indução de morte celular pela molécula 3C, efeito observado na literatura após bloqueio do ciclo celular em G2/M, devido a ativação do *checkpoint* mitótico e, conseqüentemente, indução de diversas vias que inibem a ativação de complexos importantes para a progressão do ciclo celular (TAYLOR & STARK, 2001). Por outro lado, a inibição de HDAC8 tem demonstrado induzir apoptose e inibir proliferação e crescimento clonogênico em diversas linhagens celulares tumorais, como também efeitos antitumorais em modelos animais (OEHME et al., 2009), porém, inexitem dados relacionados com os efeitos de inibição da HDAC8 sobre a dinâmica do ciclo celular e sobre os processos de divisão mitótica.

De forma interessante, no nosso estudo, foi encontrada uma significativa redução da expressão gênica de *PLK1*, *AURKA* e *AURKB* após o tratamento com o inibidor 3C. A habilidade desta molécula em modular a expressão destas enzimas é muito importante uma vez que essas quinases orquestram importantes passos do processo mitótico, e comumente estão alteradas em células neoplásicas. A amplificação e sobreexpressão de Aurora A tem sido observada em diversas células tumorais, incluindo melanoma (PUIG-BUTILLE et al., 2017), principalmente como promotor de instabilidade cromossômica e aneuploidia através da amplificação centrossômica e defeitos na citocinese (LENTINI et al., 2007). De forma semelhante, a hiperexpressão de Aurora B tem sido descrito em diversos pacientes com melanoma metastático, contribuindo com a instabilidade cromossômica através de erros merotélicos e de checagem mitótica (BONET et al., 2012). Além disso, a Polo-like quinase 1 também encontra-se expressa de maneira dependente ao nível de malignidade em melanoma, com baixa expressão em nevus benignos e aumentando significativamente ao longo dos diferentes estágios malignos (I-IV) (CHOLEWA et al., 2017). Dessa forma, a inibição destes três importantes alvos terapêuticos, coloca em destaque os

promissores efeitos deste inibidor dual de HDAC 6/8 sobre a instabilidade cromossômica das células de melanoma.

Shin e colaboradores, após tratar células de câncer cervical (HeLa) com nodoconazol e Tricostatin A (TSA), tanto de forma isolada quanto concomitante, avaliaram a regulação do *checkpoint* mitótico e determinaram que a inibição de HDACs pode causar uma inapropriada localização tanto de proteínas do cinetocoro, tais como CENP-C e Mad2, quanto de proteínas do *checkpoint* mitótico, tais como BubR1 e Mad, conduzindo as células a parada mitótica (SHIN et al., 2003). Vários estudos têm indicado que uma parada mitótica prolongada pode induzir uma saída aberrante da mitose para a fase G1, possibilitando que a célula desenvolva ciclos adicionais de replicação de DNA, levando assim a poliploidização e instabilidade cromossômica subsequente (TAYLOR & McKEON, 1997; LENGAUER et al., 1998). Dessa forma, resulta importante explorar as vias que afetam a instabilidade cromossômica e genética causada pela inibição de HDACs em células de melanoma, a fim de encontrar novas abordagens terapêuticas, e descobrir mecanismos genéticos determinantes do fenótipo neoplásico que são dependentes da ação de histonas desacetilases.

Finalmente, todos estes resultados, mostram o potencial antitumoral da molécula 3C, sendo que ensaios celulares-moleculares mais detalhados são importantes a fim de determinar os mecanismos de ação do referido inibidor sobre as linhagens de melanoma investigadas.

9. CONCLUSÃO

- A molécula 3C reduz significativamente a viabilidade celular de células de melanoma WM 1366 e HT 144.
- A sobrevivência clonogênica é significativamente diminuída após a exposição ao composto 3C nas células HT-144 e CHL1, e com eficiência maior nas células de melanoma WM 1366 e SK MEL 147.
- O inibidor 3C causa parada do ciclo celular entre as fases G2 e M ou na fase M das células WM 1366 e HT 144 de melanoma humano.
- O inibidor 3C aumenta significativamente a expressão do gene *CDKN1A* (p21) e reduz a expressão de *Ciclina B1*, *Polo-like quinase 1*, *Aurora quinase A* e *B*, em células de melanoma.

REFERÊNCIAS

- AHN, S.-G. et al. The histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, induces G2/M phase arrest and apoptosis in YD-10B oral squamous carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 27, p. 455–460, 2012.
- ALAM, N. et al. **Structure-Based Identification of HDAC8 Non-histone Substrates**, v. 24, n. 3, p. 458–468, 2016.
- ALOKTA J.M. et al. Targeting histone deacetylase 8 as a therapeutic approach to cancer and neurodegenerative diseases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1609-1634, 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts and figures 2018**. Atlanta, Ga: Disponível em <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/keystatistics.html>>. Acesso March 24, 2018.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Key Statistics for Melanoma Skin Cancer**. Disponível em <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/keystatistics.html>>. Acesso em 21 dezembro 2017.
- ATCC, 2018. Disponível em: <https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Focus_Area/Toxicology/HTB-63.aspx> Acesso em 03 julho 2018.
- BALI, P. et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: A novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 29, p. 26729–26734, 2005.
- BIELIKAUSKAS AV, PFLUM MKH: Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. **Chemical Society Reviews**; v. 37, p.1402-13, 2008.
- BLAGOSKLONNY, M. V. et al. Histone Deacetylase Inhibitors All Induce p21 but Differentially Cause Tubulin Acetylation, Mitotic Arrest, and Cytotoxicity. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.1, p. 937–941, 2002.
- BLAJESKI, A. L. et al. G 1 and G 2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 1, p. 91–99, 2002.
- BONET et al. Aurora B is regulated by the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) signaling pathway and is a valuable potential target in melanoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 35. p. 29887-98, 2012.
- BOYLE GM, MARTYN AC AND PARSONS PG: Histone deacetylase inhibitors and malignant melanoma. **Pigment Cell Research** v. 18, p.160- 166, 2005.
- CAREW, J. S.; GILES, F. J.; NAWROCKI, S. T. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 269, n. 1, p. 7–17, 2008.

CHA, T. L. et al. Dual degradation of aurora A and B kinases by the histone deacetylase inhibitor LBH589 induces G2-M arrest and apoptosis of renal cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 3, p. 840–850, 2009.

CHAKRABARTI, A. et al. HDAC8: A multifaceted target for therapeutic interventions. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 7, p. 481–492, 2015.

CHEN, C. S. et al. Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 46, p. 38879–38887, 2005.

CHOLEWA et al. Small molecule inhibition of polo-like kinase 1 by volasertib (BI 6727) causes significant melanoma growth delay and regression in vivo. **Cancer Letters**, v. 385, p. 179-187, 2017.

COOPER GM. A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA). **The Cell**. Sinauer Associates; 2000.

COSSÍO FP: Estructura de los fármacos epigenéticos. Epigenética e hipermetilación. Madrid: Eds. Médicas EDIMSA, p. 107-37, 2011.

CURTIN, J.A et al., Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 2, p. 2135-47, 2005.

CUTHBERT, G.L., et al., Histone deimination antagonizes arginine methylation. **Cell** v.118, p. 545–553, 2004.

DANEN, E.H., et al., Expression of normal melanocytes through cell-cell. contact E-cadherin expression in human melanoma. **Laboratory Investigation**. v. 2, p. 152-9, 1993.

DRUMMOND DC. et al., Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 45 p. 495-528. PMID 15822187. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095825, 2005.

DUNCAN LM. The classification of cutaneous melanoma. **Hematology and Oncology Clinics of North America**, v. 3, p. 501-13. doi: 10.1016/j.hoc.2009.03.013, 2009.

DURST, K. L. et al. Fusion Protein Associates with Corepressors via a Smooth Muscle Myosin Heavy-Chain Domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 2, p. 607–619, 2003.

ECKERLE MIZE D, et al. Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome, Cancer Syndromes. **National Center for Biotechnology Information** (US); PMID: 21249757. 2009.

FEINBERG AP, VOGELSTEIN. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301(5895), p. 89-92, 1983.

FENSTERLE, J., A trip through the signaling pathways of melanoma. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 3, p. 205-17. 2006.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

FLØRENES VA, SKREDE M, JØRGENSEN K, NESLAND JM. Deacetylase inhibition in malignant melanomas: impact on cell cycle regulation and survival. **Melanoma Research**, v.3, p.173-81, 2004.

FRAGA, M. F. et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nature Genetics**, v. 37, n. 4, p. 391–400, 2005.

FRANKEN, N. A.P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315–2319, 2006.

GAN YH, ZHANG S. PTEN/AKT pathway involved in histone deacetylases inhibitor induced cell growth inhibition and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. **Oral Oncology**, v.10 p.150-4, 2009.

GAVET O, PINES J. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. **The Journal of Cell Biology**, v.189(2), p. 247-59, 2010.

GEISBRECHT BV, GOULD SJ J. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. **Biological Chemistry**, v. 274(43) p. 30527-33, 1999.

GLOBOCAN 2012 v1., **Cancer Incidence and Mortality Worldwide**: IARC CancerBase No. 11. [Internet]. [cited 2018 Mar 17]. Available from: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?mode=population&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default&projection=natural-earth. 2013. <http://globocan.iarc.fr>

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

GRAYSON DR, KUNDAKOVIC M, SHARMA RP: Is there a future for histone deacetylase inhibitors in the pharmacotherapy of psychiatric disorders. **Molecular Pharmacology**, v. 77, p. 126-35, 2010.

GUAN, B.; WANG, T.; SHIH, I. ARID. A factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. **Cancer Research**, v. 49, n. 18, p. 1841–1850, 2009.

GULDBERG P, THOR STRATEN P, BIRCK A, AHRENKIEL V, KIRKIN AF AND ZEUTHEN J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. **Cancer Research**, v. 57, p. 3660–3663. 1997.

GUO SQ, ZHANG YZ. Histone deacetylase inhibition: an important mechanism in the treatment of lymphoma. **Cancer Biology & Medicine**, v. 9(2) p. 85-9, 2012.

HASSA, P.O et al., Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, p. 789–829. 2006.

HOON DS, SPUGNARDI M, KUO C, HUANG SK, MORTON DL, TABACK B. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. **Oncogene**, v. 23, p. 4014-22, 2004.

HORNIG E, HEPPT MV, GRAF SA, RUZICKA T, BERKING C. Inhibition of histone deacetylases in melanoma-a perspective from bench to bedside. **Experimental Dermatology**. 25 p. 831-838, 2016.

HSU, M., et al., Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. **Journal of Cell Science**, v. 113 p. 1535-42. 2000.

HU, E. et al. Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 20, p. 15254 – 15264, 2000.

HUANG WJ, et al., A Novel Histone Deacetylase Inhibitor with Anticancer Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V. 2012, artigo ID 781417, 11 páginas. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/781417>. 2012.

HUBBERT, C. et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 455–458, 2002.

JING, H.; HONGLI, L.; CHEN, Y. Effects of Trichostatin A on HDAC8 Expression, Proliferation and Cell Cycle of Molt-4 Cells. **International Electronic Journal of Elementary Education**, v. 7, n. 3, p. 301–318, 2015.

JOHNSON, J.P., Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 18, p. 345-57. 1999.

KANG, Y. E COLAB. HDAC8 and STAT3 repress BMF gene activity in colon câncer cells. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 10, p. 1–8, 2014.

KAWAGUCHI, Y. et al., The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. **Cell**, v. 115, n. 6, p. 727– 738, 2003.

KEKATPURE, V. D.; DANNENBERG, A. J.; SUBBARAMAIAH, K. HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 12, p. 7436–7445, 2009.

KJERSTI FLATMARK, RAGNHILD V NOME, SIGURD FOLKVORD, ÅSE BRATLAND, HEIDI RASMUSSEN, MALI STRAND ELLEFSEN, ØYSTEIN FODSTAD AND ANNE HANSEN REE. Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition. **Radiation Oncology**. doi:10.1186/1748-717X-1-25. 2006

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, doi 10.1016/j.cell.2007.02.005, 2007.

KOVACS, J. J. et al., HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. **Molecular Cell**, v. 18, n. 5, p. 601–607, 2005.

KRENNHRUBEC, K. et al., Design and evaluation of “Linkerless” hydroxamic acids as selective HDAC8 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 10, p. 2874–2878, 2007.

KUPHAL, S., R. BAUER, AND A.K. BOSSERHOFF, Integrin signaling in malignant melanoma. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 24, p. 195–222. 2005.

LAKSHMAIAH, K. C. et al., Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 469–478, 2014.

LEE, H.; REZAI-ZADEH, N.; SETO, E. Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 2, p. 765–773, 2004.

LENGAUER C, KINZLER K AND VOGELSTEIN B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, 643–649, 1998.

LENTINI et al., Simultaneous Aurora A/STK15 overexpression and centrosome amplification induce chromosomal instability in tumor cells with a MIN phenotype. **BMC Cancer**, v. 7 p. 212, 2007.

LI J, et al., Co-inhibition of polo-like kinase 1 and Aurora kinases promotes mitotic catastrophe. **Oncotarget**, v. 6 p. 9327–40, 2015.

Li, X., et al., Integrin α v β 3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro. **Journal of Cell Science**, v. 114 p. 2665–72. 2001.

LIAN CG, XU Y, CEOL C, WU F, LARSON A, DRESSER K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. **Cell**, v. 150, p. 1135–46. Epub, 2012.

LIU J, GU J, FENG Z, YANG Y, ZHU N, LU W, QI F. Both HDAC5 and HDAC6 are required for the proliferation and metastasis of melanoma cells. **Journal of Translational Medicine** v. 14, p. 7, 2016.

LONGWORTH MS, LAIMINS LA. Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src. **Oncogene** v. 25 p. 4495–500. PMID 16532030. doi: 10.1038/sj.onc.1209473, 2006.

MADHUSOODANAN MOTTAMAL et al., Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Studies as Templates for New Anticancer Agents. **Molecules**, v.20, p. 3898–3941; doi:10.3390/molecules20033898, 2015.

MARKS, P. A. Histone Deacetylase Inhibitors: A Chemical Genetics Approach to Understanding Cellular Functions. **Biochemical Biophys Acta**, v. 1799, p. 717– 725, 2014.

MEIER, F., et al., The RAS/RAF/ MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, p. 2986-3001. 2005.

MENG Z, JIA LF, GAN YH. PTEN activation through K163 acetylation by inhibiting HDAC6 contributes to tumour inhibition. **Oncogene**, v. 35 p. 2333-44, 2016.

MIYAKE, Y. et al., Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 9, p. 748–754, 2016.

MOTTAMAL, M. et al., Review Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Studies as Templates for New Anticancer Agents. **Molecules**, v. 20, p. 3898-3941; doi:10.3390/molecules20033898. 2015.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic cell survival assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 21-28, 2005.

MYKYTA ARTOMOV, RARE VARIANT, Gene-Based Association Study of Hereditary Melanoma Using Whole-Exome Sequencing, **Journal of the National Cancer Institute**, v. 109, Issue 12, dx083, <https://doi.org/10.1093/jnci/djx0832017>.

NATALIE H. MATTHEWS Chapter 1 Epidemiology of Melanoma. Cutaneous melanoma Etiology and Therapy. National Comprehensive Cancer Network **Clinical Practice Guidelines in Oncology**, v.1.2017.

NATHAN, D. et al., Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positiveacting histone modifications. **Genes & Development**, v. 20, p. 966–976, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Trichostatin A (Code C1261). Disponível em <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C1261>. Acesso em 09 de janeiro de 2018.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Trichostatin A. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trichostatin_A>. Acesso em 09 de janeiro de 2018.

National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Melanoma**. <https://www.nccn.org/patients/guidelines/melanoma/files/assets/common/downloads/files/melanoma.pdf> v.1.2017.

NEKRUTENKO A, HILLIS DM, PATTON JC, BRADLEY RD, BAKER RJ. Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 1674-84, 1998.

NELSON, C.J., SANTOS-ROSA, H., AND KOUZARIDES, T. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. **Cell**, v. 126, p. 905–916, 2006.

NOH, E. J. et al. An HDAC inhibitor, trichostatin A, induces a delay at G2/M transition, slippage of spindle checkpoint, and cell death in a transcription-dependent manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 378, n. 3, p. 326–331, 2009.

NOH, E. J.; LEE, J. S. Functional interplay between modulation of histone deacetylase activity and its regulatory role in G2-M transition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, n. 2, p. 267–273, 2003.

NOWAK, S.J., AND CORCES, V.G. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. **Trends in Genetics Journal**, v. 20, p.214–220, 2004.

OCKER, M. Deacetylase inhibitors: focus on non-histone targets and effects. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 55–61, 2010.

OEHME, I. et al., Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 1, p. 91–99, 2009.

OLSON, D. E. et al. An unbiased approach to identify endogenous substrates of “histone” deacetylase 8. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 10, p. 2210–2216, 2014.

PARIS M, et al., Histone deacetylase inhibitors: From bench to clinic. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 1505-29, 2008.

PARSONS DW, et al., **An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme Science**; v. 321, p. 1807-12, 2008.

PATINO WD, SUSAN J. **Epigenetics of cutaneous melanoma. Dermatology**, v. 24, p. 59-70, 2008.

PETITCLERC, E., et al., Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. **Cancer Research**, v. 59, p. 2724-30. 1999.

PICCO ME, FERNANDEZ NB, LÓPEZ BP. Melanoma: Diagnostico, evolución y tratamiento bajo una perspectiva molecular. **Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET)**. 2010

PUIG-BUTILLE et al., AURKA Overexpression Is Driven by FOXM1 and MAPK/ERK Activation in Melanoma Cells Harboring BRAF or NRAS Mutations: Impact on Melanoma Prognosis and Therapy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, p. 1297-1310, 2017.

R.M. MARTÍ, A. SOROLLA Y A. YERAMIAN. Nuevas dianas terapéuticas en el melanoma **Actas Dermosifiliogr**, v. 103, p. 579-590, 2012.

RASTRELLI, M. et al., Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. **In Vivo**, v. 1012, n. 28, p. 1005–1011, 2014.

ROCKLAND **Immunochemicals**. Disponível em: <<https://rockland-inc.com/product.aspx?id=51722>> Acesso em 03 de julho de 2018.

RODRIGUES, D. A. et al., Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel N - Acylhydrazone Derivatives as Potent Histone Deacetylase 6/8 Dual Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 655–670, 2016.

ROQUETTE, R.; PAINHO, M.; NUNES, B. Spatial epidemiology of cancer: A review of data sources, methods and risk factors. **Geospatial Health**, v. 12, n. 1, 2017.

ROTH SY, DENU JM, ALLIS CD. Histone acetyltransferases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 81–120. 2001.

RUIJTER AJ, et al., Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemistry**, v.370 p. 737-49. PMC 1223209. PMID 12429021. doi:10.1042/BJ20021321, 2003.

SCHOLZ SL., et al., NF1 mutations in conjunctival melanoma. **British Journal of Cancer - Nature**. doi: 10.1038/s41416-018-0046-5. 2018.

SENGUPTA N, SETO E. Regulation of histone deacetylase activities. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 93 p. 57-67. PMID 15352162. doi:10.1002/jcb.20179. 2004.

SETO, EDUARD AND MINORU YOSHIDA. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**; v. 6: a018713. Doi:10.1101, 2014.

SHAO, Y. et al., Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 18030–18035, 2004.

SHIBATA T, et al., **Confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation**. V. 178, p.1395-402, 2011.

SHTIVELMAN, EMMA Pathways and therapeutic targets in melanoma. **Oncotarget**, v. 5, No. 7. 2014.

SITUM, M. et al., Melanoma--clinical, dermatoscopic, and histopathological morphological characteristics. **Acta Dermatovenerol Croat**; v. 22, p. 1-12, 2014.

SLINGERLANDA, M, et al., Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. **Anti-Cancer Drugs**, v. 25 p. 140–149, 2014.

SOMOZA, J. R. et al., Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. **Structure**, v. 12, n. 7, p. 1325–1334, 2004.

SONG, S. et al., The inhibition of histone deacetylase 8 suppresses proliferation and inhibits apoptosis in gastric adenocarcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 5, p. 1819–1828, 2015.

SRIRAKSA R, LIMPAIBOON T. Histone Deacetylases and their Inhibitors as Potential Therapeutic Drugs for Cholangiocarcinoma - Cell Line Findings. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14 p. 2503-8, 2013.

STAHL JM, et al., Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer Research**, v. 64 p. 7002-10, 2004.

STAHL, J.M., et al., Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer Research**, v. 64 p.7002-10. 2004.

STRAUME O, SMEDS J, KUMAR R, HEMMINKI K, AKSLEN LA AM J PATHOL. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. **The American Journal of Pathology**, v. 161 p. 229-37; PMC1850679, 2002.

TAYLOR SS AND MCKEON F. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. **Cell**, v. 89, p. 727–735, 1997.

TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, n. 15, p. 1803–1815, 2001.

The Human Protein Atlas, 2018. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147099-HDAC8/pathology/tissue/melanoma>> Acesso em 03 de julho de 2018.

VALENZUELA-FERNÁNDEZ A, et al., HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. **Trends in Cell Biology**, v. 18 p. 291-7. PMID 18472263. doi:10.1016/j.tcb.2008.04.003, 2008.

VALYI-NAGY, I.T., et al., Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. Laboratory Investigation; a **Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 69 p. 152-159. 1993.

VERDEL, A. et al., Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. **Current Biology**, v. 10, n. 12, p. 747–749, 2000.

VIZOSO MIGUEL, et al., Epigenetic activation of a cryptic TBC1D16 transcript enhances melanoma progression by targeting EGFR. **Nature medicine**, v. 21 number 7. 2015

WALTREGNY, D. et al., Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues. **American Journal of Pathology**, v. 165, n. 2, p. 553–564, 2004.

WANG, Y. F. et al., Cooperativity of HOXA5 and STAT3 is critical for HDAC8 inhibition-mediated transcriptional activation of PD-L1 in human melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, p. 922-932. doi: 10.1016/j.jid.2017.11.009.2017.

WARD, W. et al., Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy. **Department of Surgical Oncology**, doi:<http://dx.doi.org/10.15586/codon.cutaneousmelanoma.2017.10.15586/codon.cutaneousmelanoma>. 2017.

WEST A. AND RICKY W. J New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. **Journal of Clinical Investigation**; v. 124 p.30–39. doi:10.1172/JCI69738, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO**. 2018. Available from: <http://www.who.int/uv/publications/artificial-tanning-devices/es/2018>.
<http://www.who.int/topics/cancer/es/>

WILMOTT JS, et al., Expression of the class 1 histone deacetylases HDAC8 and 3 are associated with improved survival of patients with metastatic melanoma. **Modern Pathology – Nature**, v. 28 p. 884-94, 2015

WOAN, K. V. et al., Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation. **Molecular Oncology**, v. 9, n. 7, p. 1447–1457, 2015.

WU, J. et al. The up-regulation of histone deacetylase 8 promotes proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 12, p. 3545–3553, 2013.

YAN, W. et al., Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via histone deacetylase 8. **Oncogene**, v. 32, n. 5, p. 599–609, 2013.

YANG XJ, SETO E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. **Oncogene**, v.26, p.5310-5318. PMID 17694074. doi:10.1038/sj.onc.1210599, 2007.

YOSHIDA, M., KUDO, N., KOSONO, S. ITO A., Chemical and structural biology of protein lysine deacetylases, Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, **Physical and Biological Science**, v. 93, p. 297 - 321. 290 C, 2017.

ZAGNI, C., G. FLORESTA, G. MONCIINO, A. Rescifina, The search for potent, smallmolecule HDACIs in cancer treatment: a decade after vorinostat. **Medicinal Research Reviews**, v. 37, p.1373-1428. 2017.

ZHANG G, GAN YH. Synergistic antitumor effects of the combined treatment with an HDAC6 inhibitor and a COX-2 inhibitor through activation of PTEN. **Oncology Reports**, v. 38 p.2657-2666. 2017

ZHANG, X. D. et al., The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondriaindependent apoptosis of melanoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, p. 425–435, 2004.

ZHANG, Y. et al., HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. **EMBO Journal**, v. 22, n. 5, p. 1168–1179, 2003.

ZHANG, Y., AND REINBERG, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. **Genes & Development**, v. 15, p. 2343–2360. 2006.

ZHAO C., et al., Discovery of meta-sulfamoyl N-hydroxybenzamides as HDAC8 selective inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, P. 282-291. 2018.

ZOPF, S. et al., Differential response of p53 and p21 on HDAC inhibitor-mediated apoptosis in HCT116 colon cancer cells in vitro and in vivo. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 6, p. 1391–1402, 2007.