

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JOÃO MARCOS OLIVEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 6 EM
LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA**

Alfenas/MG

2022

JOÃO MARCOS OLIVEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 6 EM
LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à
Saúde, pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Angel Mauricio Castro Gamero

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Ferro Aissa

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Silva, João Marcos Oliveira da.

Avaliação dos efeitos da inibição da histona desacetilase 6 em linhagens celulares de melanoma / João Marcos Oliveira da Silva. - Alfenas, MG, 2022.
107 f. : il. -

Orientador(a): Angel Mauricio Castro Gamero.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.
Bibliografia.

1. HDAC6. 2. WT-161. 3. Melanoma. 4. Câncer. 5. Quimiorresistência . I.
Gamero, Angel Mauricio Castro, orient. II. Título.

JOÃO MARCOS OLIVEIRA DA SILVA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 6 EM LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA

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

Aprovada em: 29 de dezembro de 2022

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

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Junior
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia
UFU

Prof. Dr. Marcos Vinicios Salles Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Angel Mauricio Castro Gamero, Presidente**, em 29/11/2022, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Vinicios Salles Dias, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2022, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robson José de Oliveira Júnior, Usuário Externo**, em 29/11/2022, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0876359** e o código CRC **81899F23**.

Aos meus pais e irmão, que sempre foram meu apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela graça de me permitir realizar mais um sonho.

Agradeço ao Prof. Dr. Angel Mauricio, orientador, pela confiança e por me dar a oportunidade de fazer parte da sua equipe de pesquisa. Agradeço também pelos conhecimentos e aprendizados transmitidos.

Agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Ferro Aissa, co-orientador, pelos ensinamentos.

Agradeço minha família que sempre foram minha base e meu apoio, os quais tenho orgulho de dividir a felicidade desse momento. De modo especial, agradeço aos meus pais, Marcos Antônio e Débora de Paula, que são meu referencial de determinação e meu alicerce, os quais nunca mediram esforços para me ajudar. Não menos importante, agradeço meu irmão Pedro Augusto, pela companhia incomparável o qual faço questão de dividir cada conquista.

Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Genética Humana, pelos momentos de risada, apoio e auxílio. Agradeço a cada um que me presenteou com a amizade, a qual se estendeu para fora da bancada de serviço, os quais faço questão de citar o nome, Rafael Fernandes, Leilane Sales, Hanna Batistão, Lais, João Vitor, Carlos Expedito. Agradeço também aos amigos que já não estão mais no Laboratório, mas deixaram sua marca nesse trabalho, Kamila Tortozza, Carolina Chiminazo e Rafael Miranda.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. O presente trabalho também foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - Código do Processo APQ-02291-18.

“Estou para realizar minha última viagem, um grande salto no escuro”

Thomas Hobbes (1651)

RESUMO

O melanoma maligno, dentro dos tipos de câncer de pele, possui maioridade de óbitos e uma propensão de rápida progressão. Diversos estudos têm evidenciado que a hiperexpressão de HDAC6 corrobora para o desenvolvimento do melanoma e um pior prognóstico para o paciente. Por essa razão este trabalho tem por objetivo averiguar o impacto da inibição de HDAC6 em linhagens de melanoma. Para isso, foram utilizadas três linhagens celulares de melanoma (CHL-1, WM1366 e SK-MEL-147) para avaliar os efeitos da inibição de HDAC6 com o inibidor WT-161, por meio de ensaios de análise de viabilidade celular, capacidade clonogênica, morte apoptótica, ciclo celular e motilidade celular. Como resposta ao tratamento de WT-161, constatamos diminuição da capacidade proliferativa e clonogênica, diminuição da quimiorresistência, um aumento da população apoptótica, uma diminuição da capacidade migratória/invasiva com um aumento da capacidade de adesão. Acreditamos que por meio da inibição da HDAC6 conseguimos elucidar parte de uma complexa rede que promove e corrobora para a progressão tumoral.

Palavras-chaves: Melanoma; HDAC6; WT-161; progressão tumoral.

ABSTRACT

Malignant melanoma, among the types of skin cancer, has the highest number of deaths and a propensity for rapid progression. Several studies have shown that HDAC6 overexpression contributes to the development of melanoma and a worse prognosis for the patient. For this reason, this work aims to investigate the impact of HDAC6 inhibition in melanoma cell lines. We used three melanoma cell lines (CHL-1, WM1366 and SK-MEL-147) to evaluate the effects of HDAC6 inhibition with the WT-161 inhibitor, using cell viability assays, clonogenic capacity of the cells, apoptotic cell death, cell cycle and cell motility analyzes. As a response to WT-161 treatment, we found a decrease in proliferative and clonogenic capacity, a decrease in chemoresistance, an increase in the apoptotic population, a decrease in migratory/invasive capacity with an increase in adhesion capacity. We believe that by inhibiting HDAC6 we were able to elucidate part of a complex network that promotes and supports tumor progression.

Keywords: Melanoma; HDAC6; WT-161; tumor progression

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 -	Representação da transição melanocítica	18
Figura 02 -	Mutações de maior frequência no melanoma	23
Figura 03 -	Arquitetura dos domínios de HDAC6	27
Figura 04 -	Desenho experimental do projeto desenvolvido.....	33
Figura 05 -	HDAC6 possui relevância em perfis metastático e de mutação em <i>TP53</i>	44
Figura 06 -	WT-161, TMZ e DTIC reduzem a viabilidade celular das linhagens celulares de melanoma	47
Figura 07 -	WT-161 aumenta significativamente a concentração de ∞ -tubulina acetilada e diminui a expressão de β -catenina em CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366	49
Figura 08 -	Efeito da combinação entre TMZ e WT-161 em linhagens celulares de melanoma	53
Figura 09 -	Efeito da combinação entre DTIC e WT-161 em linhagens celulares de melanoma	54
Figura 10 -	Combinação simultânea de TMZ e WT-161 reduz a área dos esferóides de CHL-1	59
Figura 11 -	Combinação simultânea de TMZ e WT-161 reduz a área dos esferóides de WM1366.	60
Figura 12 -	Impacto na formação de colônias na linhagem CHL-1, após o tratamento com WT-161	62
Figura 13 -	Impacto na formação de colônias na linhagem SK-MEL-147, após o tratamento com WT-161	62
Figura 14 -	Impacto na formação de colônias na linhagem WM1366, após o tratamento com WT-16	63
Figura 15 -	WT-161 induz apoptose de maneira dose dependente em linhagens de melanoma	64
Figura 16 -	WT-161 aumenta a concentração de PARP clivado nas linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366	65
Figura 17 -	WT-161 induz parada na fase G0/G1 maneira dose dependente em linhagens de melanoma	66
Figura 18 -	WT-161 inibe a migração na linhagem CHL-1	68

Figura 19 -	WT-161 inibe a migração na linhagem SK-MEL-147	69
Figura 20 -	WT-161 aumenta a adesão celular na linhagem SK-MEL-147	70
Figura 21 -	WT-161 aumenta a adesão celular na linhagem SK-MEL-147	71
Figura 22 -	WT-161 aumenta a adesão celular na linhagem CHL-1	72
Figura 23 -	WT-161 diminui a invasão celular na linhagem CHL-1	73
Figura 24 -	WT-161 aumenta a concentração de E-caderina	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Características celulares das linhagens CHL-1, SK-MEL-147, WM1366	34
Tabela 02 -	IC50 em μM das linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 quando tratadas com TMZ, DTIC e WT-161	48
Tabela 03 -	Demonstração dos valores da razão entre os fármacos DTIC e TMZ e do composto WT-161 para as linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366	52
Tabela 04 -	Exposição dos parâmetros, CI e resposta a dose terapêutica DRI, nos tratamentos de combinação de TMZ + WT-161, TMZ WT-161 e WT-161 TMZ, nas linhagens celulares de CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366	55
Tabela 05 -	IC50 clonogênico das linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 quando tratadas com WT-161	61

LISTA DE SIGLAS

<i>ARID2</i>	Domínio de interação 2 rico em AT, do inglês <i>AT-rich interaction domain</i>
2	
<i>BRAF</i>	<i>B-Raf proto-oncogene</i>
<i>CDKN2A</i>	Ciclina dependente de quinase inibidor 2A
CIN	Instabilidade cromossômica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTIC	Dacarbazina
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
HDAC	Histona desacetilase
HDAC6	Histona desacetilase 6
HMBA	Bisacetamida de hexametileno
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KAT	Lisina acetiltransferases
<i>KIT</i>	<i>KIT proto-oncogene</i>
MC1R	Receptor melanocotina-1
MGMT	<i>O</i> ⁶ -metilguanina metiltransferase
<i>NF1</i>	Neurofibrimina 1
<i>NRAS</i>	<i>NRAS proto-oncogene</i>
<i>PTEN</i>	Fosfatase homóloga à tensina, do inglês <i>phosphatase and tensin homolog</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAHA	Suberoilânida ácido hidrôxamico
<i>TERT</i>	Do inglês, <i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TMZ	Temozolomida
<i>TP53</i>	Do inglês, <i>Tumor protein p53</i>
UV	Radiação ultravioleta
α -MSH	Hormônio alfa estimulador de melanócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	MELANÓCITO	17
1.2	MELANOMA	19
1.2.1	Fatores de risco	20
1.2.2	Tratamento	23
1.3	HISTONAS DESACETILASE (HDAC)	25
1.3.1	Atuação da HDAC6 no câncer.	26
1.3.2	HDAC6 em melanoma	28
1.3.3	Inibidores de HDAC	28
1.3.3.1	WT-161	30
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVOS GERAIS	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	34
4.2	LINHAGEM CELULARES	34
4.3	CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR 2D E 3D	35
4.4	DILUIÇÃO DE FÁRMACO E COMPOSTO	36
4.5	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	36
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMBINAÇÃO DE FÁRMACO E COMPOSTO NA VIABILIDADE CELULAR EM CULTIVO 2D	37
4.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMBINAÇÃO ENTRE FÁRMACO E COMPOSTO NO DESENVOLVIMENTO DOS ESFERÓIDES	37
4.8	ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	38
4.9	ANÁLISE DE MORTE APOPTÓTICA	38
4.10	ANÁLISE DO CICLO CELULAR	39
4.11	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR	39
4.12	AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR	40
4.13	ANÁLISE DA INVASÃO CELULAR	41

4.14	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA	41
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5	RESULTADOS	44
5.1	HDAC6 IMPACTA NA PROGRESSÃO DO MELANOMA	44
5.2	DTIC, TMZ E WT-161 DIMINUEM A VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS DE MELANOMA DE MANEIRA DOSE DEPENDENTE	45
5.3	WT-161 AUMENTA OS NÍVEIS DE ALFA-TUBULINA	48
5.4	A COMBINAÇÃO DE TMZ/DTIC E WT-161 POSSUI UM EFEITO SINÉRGICO	50
5.5	A COMBINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TEMOZOLOMIDA E WT-161 IMPACTA NO DESENVOLVIMENTO DE ESFERÓIDES	58
5.6	A INIBIÇÃO DE HDAC6 IMPACTA NA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	61
5.7	A INIBIÇÃO DE HDAC6 AUMENTA A POPULAÇÃO APOPTÓTICA	63
5.8	WT-161 INDUZ PARADA NO CICLO CELULAR	65
5.9	WT-161 INIBE A MIGRAÇÃO CELULAR	66
5.10	WT-161 AUMENTA A ADESÃO CELULAR	70
5.11	WT-161 INIBE A INVASÃO CELULAR	72
5.12	HDAC6 CORROBORA PARA A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL	73
6	DISCUSSÃO	75
6.1	VIAS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR ESTÃO ASSOCIADAS A HDAC6	76
6.2	INIBIDORES DE HDAC6 APRESENTAM COMPORTAMENTOS SINÉRGICOS EM CULTIVO 2D E 3D	82
6.3	WT-161 ATUA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR	84
6.4	HDAC6 COMUNICA COM COMPONENTES DA VIA APOPTÓTICA	85
6.5	WT-161 ATUA NA PARADA DO CICLO CELULAR ...	88
6.6	ATIVIDADE DE HDAC6 IMPACTA EM PROGRESSÃO TUMORAL	89

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A recente descoberta de que um osteossarcoma foi encontrado em um osso com idade aproximada de 1,7 milhões de anos, pertencente a um homínido na África do Sul, sugeriu que o câncer tem afligido a espécie humana por milhares de gerações. Atualmente, o câncer é a segunda causa de mortalidade no mundo, sendo por isso, um sério problema de saúde global (ODES, *et.al.*, 2016).

De modo geral, o câncer se caracteriza por ser uma perturbação nas relações celulares, decorrente de disfunções dos genes vitais. Esses distúrbios genéticos podem repercutir no ciclo celular resultando em uma proliferação anormal (HASSANPOUR; DEHGHANI, 2017).

A carcinogênese é caracterizada por ser um processo complexo o qual envolve diferentes níveis de regulação, abrangendo as etapas de iniciação, promoção e progressão, as quais resultam em uma transformação de células normais em células malignas com um crescimento anormal (PETERS; GONZALEZ, 2018).

Tais eventos transformacionais estão associados a grandes mudanças biológicas, as quais são compartilhadas pela maioria das células neoplásicas. Além das alterações estruturais nos genes (mutações), a desregulação de mecanismos epigenéticos, a qual inclui a acetilação e desacetilação de histonas, é amplamente aceita como causas subjacentes das características do câncer (LI *et.al.*, 2018).

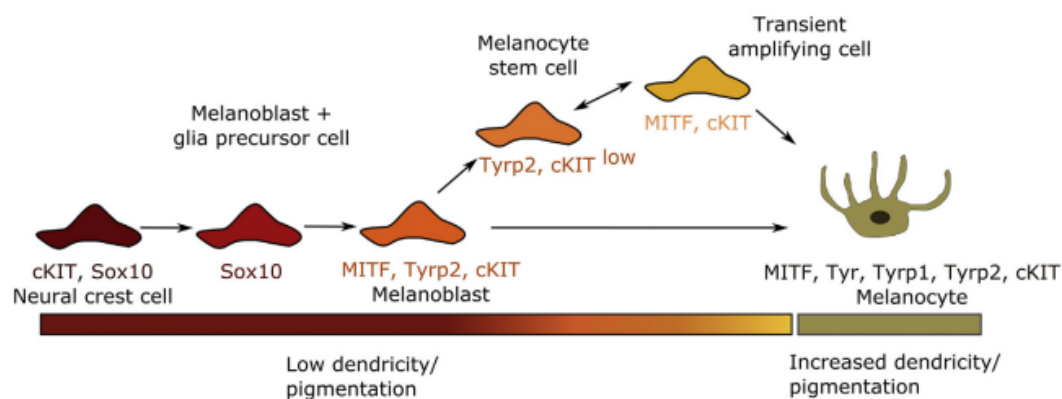
1.1 MELANÓCITO

O melanócito é derivado do mesmo grupo celular que origina o neurônio e as células da glia. Derivado da crista neural, o melanócito surge de uma camada transitória de população de células embrionárias multipotentes, as quais migram ao longo de uma via dorsolateral, entre o dermomiótomo e o ectoderma. Os melanócitos podem ser encontrados na pele, olhos e cóclea (SALEEM, 2019).

O início dessa transição, da população de células embrionárias para melanócitos, ocorre durante a gastrulação (DILSHAT; VU; STEINGRÍMSSON, 2021). A proteína do fator de transcrição da microftalmia (MITF) é importante para a diferenciação, migração, proliferação e sobrevivência dos melanócitos. No entanto, o MITF não é o único que exerce ação sobre o desenvolvimento dos melanócitos, os precursores durante a embriogênese são orquestrados por uma complexa rede regulatória de genes que

incluem *MITF*, *PAX3*, *SOX10*, *EDNRB*, *EDNM*, *KIT* e *SNAI2* (SALEEM, 2019). Fatores de transcrição (*PAX3*, *SOX10*) e vias de sinalização extracelular (*KIT*, *EDNRB*) regulam a expressão de *MITF* (HOU; PAVAN, 2008). A expressão precoce de *PAX3* é fundamental para o desenvolvimento de melanócitos, tecido craniofacial e formação de membros superiores (SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). Como demonstrado na Figura 01 *SOX10* é essencial para o início da diferenciação da célula da crista neural para o melanoblasto. *EDNRB* e *EDN* são necessários para a normal migração normal das células em diferenciação presentes na região da crista neural, região que dará origem à pele e intestino, respectivamente (HEANUE; PACHNIS, 2007). A transição das células da crista neural para melanócitos maduros é demonstrada na Figura 01.

Figura 01: Representação da transição melanocítica.



Fonte: Adaptado de LI; KNAPP; IDEN, 2020.

Legenda: O MITF é o principal fator responsável pela transformação.

Após o término do processo de diferenciação da crista neural, migração e desenvolvimento, o melanócito estará maduro e pronto para desenvolver sua função protetora contra os efeitos nocivos da exposição à radiação ultravioleta (UV), por meio da produção de pigmento, denominado melanina, um complexo derivado da tirosina (DILSHAT; VU; STEINGRÍMSSON, 2021)

Como resultado, a melanina produzida pelo melanócito reduz o risco de danos no DNA (ROBLES-ESPINOZA *et.al.*, 2016). Essa função é consequência da resposta a exposição dos queratinócitos a radiação UV, os quais produzem o hormônio alfa

estimulador de melanócito (alfa-MSH), o qual se liga com o receptor melanocortina-1 (MC1R) (ROBLES-ESPINOZA *et.al.*, 2016; WILLIAMS *et.al.*, 2011).

Há dois fenótipos de melanina produzida pelo melanócito: a pigmentação marrom/preto, eumelanina, e a pigmentação vermelho/amarela, feomelanina. A taxa de eumelanina e feomelanina determinam a cor da pele (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Na pele normal, os melanócitos residem dentro da faixa penetrável da radiação UV na epiderme basilar, constituindo uma fração menor das células da epiderme (TANG *et.al.*, 2020). Histologicamente, o melanócito está situado na epiderme, localizado na lâmina basal (URMACHER, 1990).

1.2 MELANOMA

O melanoma é uma malignidade de pele potencialmente fatal, que tem apresentado, de modo global, um aumento contínuo dos números de casos (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; O'NEIL; SCOGGINS, 2019;). Geralmente o melanoma é considerado uma doença moderna devido ao aumento das taxas de incidência, no entanto, o melanoma é uma malignidade antiga que foi documentada ao longo da história (DAVIS, SHALIN, TACKETT, 2019).

O primeiro caso de melanoma documentado foi no século V por Hipócrates Cos, mas evidências físicas anteriores foram encontradas em ossos de múmias pré-colombianas que se acreditavam terem aproximadamente 2.400 anos de idade (REBECCA; SONDAK; SMALLEY, 2012). O primeiro caso registrado de melanoma na literatura médica ocidental é encontrado nos escritos do ano de 1651 dos Drs. Highmore e Bonet, e nos escritos de 1757 de Henrici e Nothnagel, que descreviam as lesões como tumores negros espalhados pelo corpo de seus pacientes (REBECCA; SONDAK; SMALLEY, 2012; ROBLES-ESPINOZA *et.al.*, 2016).

Atualmente o melanoma é caracterizado por uma atípica e aumentada proliferação de melanócitos na epiderme da pele, podendo apresentar invasão para a derme. Clinicamente se apresenta em forma de mancha com característica assimétrica, bordas irregulares, variação na coloração e diâmetro acima de 6mm. A evolução desta mancha é um importante indicador clínico sugestivo de uma mudança para malignidade (CHOPRA; RAO, 2020). Sua classificação ocorre de acordo com a sua localização, podendo ser cutâneo, quando se encontra na pele, e não cutâneo/extra cutâneo, quando

se encontra em mucosas, olhos e leptomeninge. (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; CHOPRA; RAO, 2020).

A principal característica do melanoma se evidencia na sua heterogeneidade clínica e populacional, ou seja, acomete de modo diferente a populações e grupos humanos, ocorrendo em variados sítios. Outras características que também acompanham o melanoma é a sua capacidade de metástase e de adquirir resistência a fármacos (LUO; SHEN, 2017).

O melanoma cutâneo tem sido descrito como um dos principais cânceres imunogênicos com características clínicas e histológicas heterogênea e um significativo número de mutações, os quais podem explicar a baixa taxa de regressão tumoral, resistência a multidrogas para terapias alvo e uma reduzida taxa de sobrevivência (HU, *et.al.*, 2020)

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foi demonstrado uma estimativa de 8.450 novos casos de melanoma no Brasil, sendo destes novos casos, 4.200 em homens e 4.250 em mulheres. Já o número de mortes no Brasil em 2019, segundo o Atlas de Mortalidade por câncer –SIM, é de 1.975, sendo 1.159 homens e 819 mulheres. Para o respectivo ano, os estados brasileiros que apresentaram a maior taxa de mortalidade por 100.000 habitantes, são: Rio grande do Sul (1,64 mortes), Santa Catarina (1,41 mortes), Paraná (0,64 mortes), Espírito Santo (0,53 mortes), São Paulo (0,52 mortes), e Ceará (0,52 mortes).

1.2.1 Fatores de risco

O melanoma é o terceiro mais comum tipo de câncer de pele. No entanto, é a principal causa de morte dentro da categoria de câncer de pele, correspondendo a cerca de 73% das mortes. O alto número de incidência é vista na população branca quando comparada com os números registrados em população asiática e africana, embora a população branca apresenta um maior número de casos, a mesma apresenta uma baixa taxa de lesões ulceradas e metástase (CHOPRA; RAO, 2020).

Os fatores de riscos associados ao melanoma estão relacionados ao estilo de vida, que também são chamados de fatores modificáveis, os quais compreendem o bronzeamento artificial, exposição à radiação UV e medicamentos; outra categoria de fatores de risco são os denominados de fatores não modificáveis, dentre os quais se

destaca o fator genético, histórico familiar, posição socioeconômica, pintas, raça, idade e sexo (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; SCHADENDORF, *et.al.*, 2018).

Lesões pigmentadas na pele, denominadas de pintas, podem ser congênitas ou adquiridas. As pintas adquiridas estão associadas com um aumento do risco do melanoma, especialmente quando associadas à alta quantidade e atipia na coloração. (CHOPRA; RAO, 2020).

A exposição à UV é um fator de risco de grande importância no melanoma cutâneo (SCHADENDORF, *et.al.*, 2018). Esta exposição ocorre durante a exposição solar, bronzeamento artificial, e soldagem. A exposição ocupacional ao sol por mais de 20 anos colabora para um aumento do risco desenvolvimento do melanoma, no entanto, a exposição ocupacional está ligada a uma maior probabilidade de carcinoma escamoso, já a exposição solar intermitente e queimaduras solares estão intimamente ligadas ao melanoma (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

Psoralen e ultravioleta A (PUVA), são medicamentos utilizados para o tratamento de psoríase, eczema, vitiligo, e estão associadas com o desenvolvimento de câncer de pele, incluindo melanoma. Isso ocorre devido à exposição à radiação UV, que ocorre durante o tratamento com esses medicamentos (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

O diagnóstico do melanoma tende a ocorrer entre jovens e adultos de meia idade, sendo a taxa de maior diagnóstico os 57 anos. Entre os 25 e 50 anos de idade, a incidência de melanoma cresce de modo linear. Da mesma maneira que o diagnóstico de melanoma difere com a idade, o diagnóstico também se difere com o sexo. No período de 25 a 40 anos, mulheres apresentam uma maior probabilidade de diagnóstico de melanoma do que homens, no entanto, homens após os 75 anos possuem 3 vezes mais chances de desenvolver melanoma comparado com mulheres. No geral, homens tem 1,5 vezes a mais em probabilidade de desenvolver melanoma (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

Algumas características fenotípicas, tais como cor da pele, dos olhos e do cabelo associadas à sensibilidade à exposição solar, atuam como fator de risco (O'NEIL; SCOGGINS, 2019). A raça se torna um fator de risco pois indivíduos caucasianos possuem 10 vezes mais probabilidade de desenvolver melanoma cutâneo comparados com indivíduos negros (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). Contudo, o melanoma não cutâneo é mais comum na população negra. Indivíduos que possuem a característica fenotípica de cabelos ruivos/pele clara estão associados a mutação no receptor melanocortina-1 (MC1R), o qual está relacionado com a regulação da produção de

feomelanina e eumelanina (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; O'NEIL; SCOGGINS, 2019).

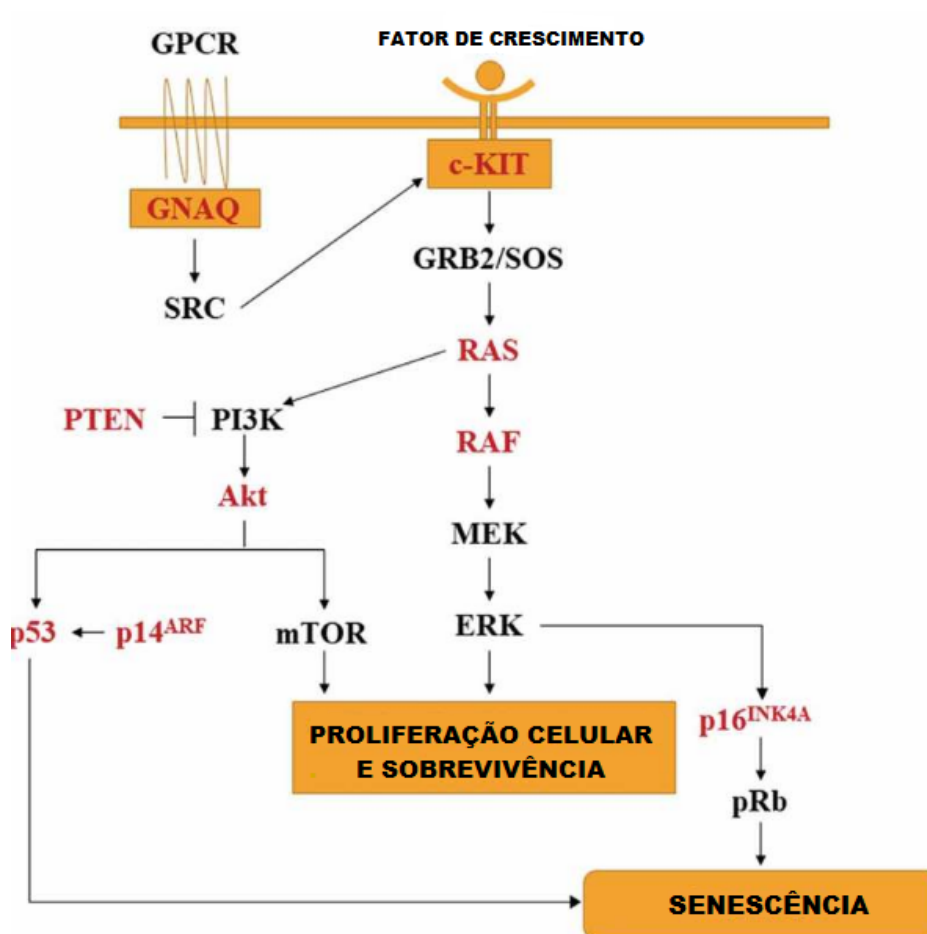
A feomelanina apresenta uma baixa proteção a radiação UV e, como consequência do seu mecanismo de proteção, induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Níveis elevados de ROS estão associados a uma maior taxa de danos no DNA e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de câncer (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

O histórico familiar se destaca por ser o mais importante fator de risco para o melanoma cutâneo, onde ao todo dos pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo, de 8% a 12% deles apresentavam histórico familiar de câncer de pele (O'NEIL; SCOGGINS, 2019).

O melanoma pode apresentar uma complexa rede de mutações em suas vias proliferativas (Figura 02). Nem todas as variantes do melanoma possuem as mesmas frequências mutacionais, no entanto, existem mutações somáticas recorrentes que aparecem com frequência em todos os tipos de melanoma. Mutações motrizes no melanoma tendem a estar em vias de sinalização que regulam a proliferação (*BRAF*, *NRAS* e *NF1*), crescimento e metabolismo (*PTEN* e *KIT*), resistência à apoptose (*TP53*), tempo de vida replicativo (*TERT*), identidade celular (*ARID2*), e controle do ciclo celular (*CDKN2A*) (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

A mutação de linha germinativa mais comum no melanoma é a do gene *CDKN2A*, o qual acarretará em mudanças na função do p16, sendo este responsável por desempenhar uma importante função de regulação negativa na progressão do ciclo celular. Mutação no gene *CDK4* também tem sido identificada em melanomas, e esta mutação possui um resultado similar ao fenótipo da mutação do gene *CDKN2A*. Outras mutações que estão sendo associadas ao aumento da probabilidade de desenvolvimento de melanoma são as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Tem sido também relatadas mutações nos genes supressores de tumor, como *TP53* e *RBI* (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Figura 02: Mutações de maior frequência no melanoma.



Fonte: Adaptado de DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019

Legenda: Mutações em C-KIT e RAS, impactam tanto as vias AKT e MEK/ERK, resultando em perturbações no equilíbrio de proliferação e sobrevivência celular. Encontra-se destacado de vermelhos os componentes das vias proliferativas com maior incidência de mutação no melanoma.

1.2.2 Tratamento

O tratamento inicial do melanoma consiste na sua remoção cirúrgica incluindo tecido saudável que o circunda. Caso o tumor tenha mais de 0,8 mm de espessura, ou uma espessura menor, mas com lesão ulcerativa, é realizada a biópsia do linfonodo sentinela. Em situações em que há positividade para o tumor metastático, o mesmo pode ser removido, no entanto, o tratamento cirúrgico para contextos metastáticos não se

destina a ser curativo e também exigirá outras opções de tratamento (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Além da terapia convencional de cirurgia, a quimioterapia desempenha um papel importante no tratamento antimelanoma (MISHRA *et.al.*, 2018). Para pacientes que apresentam melanoma em metástase somente o tratamento cirúrgico não será suficiente, será necessário o uso de terapia com fármacos para completar o tratamento (O'NEIL; SCOGGINS, 2019). Comumente, agentes que promovem a alquilação do DNA, são usados no tratamento do melanoma, dentre eles estão a dacarbazina (DTIC) e a temozolomida (TMZ) (LUO; SHEN, 2017).

Dacarbazina foi aprovada para o tratamento de melanoma em 1975. Sua eficácia em resposta parcial varia em uma taxa de 15-28%, e uma resposta completa com taxa aproximada de 3-5%. Desde então o FDA aprovou a DTIC como regime padrão de tratamento do melanoma, no qual, propostas de outros fármacos ou compostos devem ser comparados com resposta terapêutica de DTIC, incluindo as recentes triagens clínicas de terapias alvo e imunoterapia, sendo aceitas as propostas com resposta terapêutica igual ou superior ao DTIC (WILSON; SCHUCHTER, 2016).

DTIC é um agente antineoplásico, o qual independe de fase do ciclo celular para exercer sua ação. O DTIC atua como um agente alquilante após a sua ativação pelo fígado. Para que ocorra a ativação, a DTIC é convertida no metabólito ativo 5-(3-metiltrizen-1-il)imidazole-4-carboxamida (MTIC), o qual se decompõe em uma purina, que sofre biossíntese de ácido nucleico, e um íon metil diazônio, o qual é a espécie alquilante ativa. (TEIMOURI; NIKFAR; ABSOLLAHI, 2013).

Outro agente quimioterápico que é usado no tratamento de estágios avançados de melanoma é a TMZ. É um agente alquilante que não necessita do metabolismo hepático para a sua ativação, pois em condições fisiológicas é convertido em MTIC.

O MTIC atua em sítios específicos do DNA (TEIMOURI; NIKFAR; ABSOLLAHI, 2013). Seu mecanismo de ação consiste na da inserção de grupos alquila em diferentes lugares, sendo mais comumente o N^7 -metilguanina, N^7 -metiladenina e O^6 -metilguanina. Dentre todos os eventos de metilação, a alquilação do O^6 -metilguanina é associada com um alto nível de dano no DNA. A alquilação do O^6 -metilguanina pode ser reparada com a ação da enzima O^6 -metilguanina metiltransferase (MGMT) (WILSON; SCHUCHTER, 2016).

O principal sistema de mecanismo de resistência ao TMZ é a hiperexpressão de *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase* (MGMT). A enzima MGMT repara a

lesão do DNA induzida pelo TMZ, tal mecanismo ocorre pela remoção do grupo metil dos resíduos de guanina e citosina (JIANG *et.al.*, 2011).

Dentre as vantagens do uso do TMZ no tratamento do melanoma é que ele pode ser administrado via oral e ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e entrar no sistema nervoso central (SNC). Por isso, o fármaco é tão importante na prevenção e tratamento de metástases cerebrais. (MISHRA *et.al.*, 2018).

1.3 HISTONAS DESACETILASE (HDAC)

As proteínas histonas possuem sua localização no núcleo de células eucariotas, se caracterizando por serem as proteínas de maior predominância na cromatina, possuindo como principal função a modulação da estrutura da cromatina, possibilitando a regulação da atividade da dupla fita de DNA durante os processos de expressão gênica, promovendo a ligação, ou não, dos fatores de transcrição ao DNA. Esta acessibilidade é crucial para a expressão de genes e a reunião de complexos transcripcionais que são influenciados pelas cadeias de resíduos de lisina nas histonas (HIDESHIMA *et.al.*, 2017).

As funções celulares das proteínas nucleares e citoplasmáticas podem ser reguladas por ciclos de acetilação-desacetilação da lisina que fazem parte de mecanismos de regulação epigenética, de sinalização e de metabolismo celular (WANG *et.al.*, 2010). Três tipos de classe de proteínas estão envolvidas na bioquímica do acetiloma: “escritores”, ou lisina acetiltransferases (KAT); “leitores”, isto é, proteínas que contêm bromodomínio, as quais reconhecem de modo específico as porções acetilisina; e os “apagadores” ou histonas desacetilases (HDAC), que também são conhecidas como lisina desacetilase (KDACs) (VERDIN; OTT, 2014). O grupo das HDACs é particularmente notável, pois a atividade regulada positivamente está associada à tumorigênese (HAI, CHRISTIANSON, 2016).

As HDACs são proteínas responsáveis pela desacetilação dos resíduos de lisinas de histonas que impedem o acesso ao fator de transcrição. A família HDAC pode ser organizada em quatro categorias: HDACs de Classe I, que compreende a HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8, que estão localizadas no núcleo e são expressas na maioria dos tecidos. As HDACs de Classe IIa são as que se localizam no citoplasma e no núcleo, classe composta pela HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9. Já as HDACs de

classe IIb, se caracterizam por serem produzidas de maneira específica, as representantes desta classe são as HDAC6 e a HDAC10 (YEON *et.al.*, 2020).

Até o presente momento, as quatro classes de HDAC são organizadas pelas suas propriedades: Classe I (HDAC1 – 3 e 8), Classe II (HDAC4 -7, 9 e 10) e Classe IV (HDAC 11), as quais são dependentes de zinco, sendo somente a Classe III (SIRT 1-7) dependente de NAD^+ . Dentre as HDACs da Classe II, a HDAC6 é a única dependente de zinco que possui dois sítios catalíticos (CD1 e CD2) (ZHAO *et.al.*, 2020).

1.3.1 Atuação da HDAC6 no câncer.

Para que o organismo mantenha uma homeostase, se faz necessário que haja um equilíbrio harmônico entre a acetilação e a desacetilação dos resíduos de lisina. A interrupção desse equilíbrio pode contribuir para o desenvolvimento de doenças (LI *et.al.*, 2018). A acetilação e a desacetilação anormal de histonas desempenham uma importante função na expressão de genes para o desenvolvimento das células cancerosas, sendo assim, a modificação anormal das histonas estão intimamente ligadas ao desenvolvimento e progressão do câncer. Estudos recentes têm apontado que uma alta expressão de HDACs está associada a uma sobrevida baixa em pacientes com câncer (YEON *et.al.*, 2020).

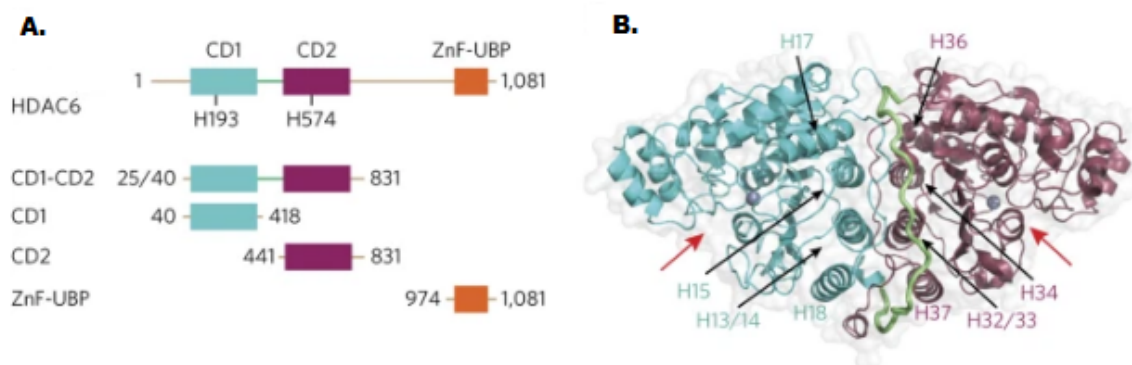
Dentre as HDACs, a HDAC6 tem mostrado um papel importante no desenvolvimento tumoral. O gene *HDAC6* se encontra localizado em Xp11.23, possuindo a informação para a codificação de 1215 aminoácidos, os quais constituem a maior proteína da família das HDACs (LI *et.al.*, 2018). A proteína HDAC6 possui dois domínios de desacetilação, ou também chamados de domínios catalíticos (CD), e um domínio ubiquitina, possuindo como substratos conhecidos a alfa-tubulina (CD-1), Hsp90 (CD-2) e cortactina (Figura 03) (HU *et.al.*, 2020).

Devido à predominante localização de HDAC6 no citoplasma, tem sido bem explorado o papel de HDAC6 na manutenção da divisão celular, migração e angiogênese. Tais mecanismos estão relacionados com a dinâmica do citoesqueleto. Os microtúbulos estáveis sofrem modificações pós-traducionais, como a acetilação da tubulina no resíduo lisina-40. Os níveis de α -tubulina desacetilada são equilibradas pela ação de HDAC6, tal processo gera implicações na estabilização e funcionamento dos

microtúbulos, polaridade e migração celular, transporte e formação de agressomas, bem como formação das fibras do fuso (LIANG, FANG, 2018).

A HDAC6 está envolvida em vários processos celulares, incluindo a proliferação, autofagia, apoptose, e reparo de DNA (ZHAO *et.al.*, 2020). Por essas razões, a inibição da HDAC6 tem se mostrado como uma estratégia terapêutica racional para muitas doenças, como, doenças neurodegenerativas, doenças renais, câncer ovariano e gliomas. Estudos recentes têm demonstrado que HDAC6 tem tido papel importante na proliferação e migração de células do melanoma, atuando também na inibição da apoptose celular (HU *et.al.*, 2020), sendo a HDAC6 crucial para a proliferação celular do tumor, metástase, invasão e mitoses no tumor (ZHAO *et.al.*, 2020).

Figura 03: Arquitetura dos domínios de HDAC6.



Fonte: Adaptado de MIAYKE, *et.al.*, 2016

Legenda:

A - Domínios de HDAC6; sítios catalíticos para α -tubulina (CD1) e HSP90 (CD2) e ubiquitinação (ZnF-UBP)

B - Demonstração das estruturas CD1 (azul), CD2 (vinho), e do ligante interdomínio (verde). Os íons metálicos estão representados por esferas cinzas. As setas vermelhas demonstram para o sítio catalítico dos domínios. As setas pretas indicam as hélices envolvidas na interface CD1-CD2.

Assim, HDAC6 tem emergido como um alvo promissor para o tratamento de várias doenças, dentre as quais se destaca o câncer, devido principalmente ao seu envolvimento na motilidade celular, sobrevivência celular, progressão do ciclo celular e promoção de eventos de resistência terapêutica (LIANG, FANG, 2018).

1.3.2 HDAC6 em melanoma

Como descrito anteriormente, o melanoma apresenta uma elevada probabilidade de metástase, acelerada progressão com piora de prognóstico e alta mortalidade (LIU *et.al.*, 2016).

Como demonstrado no estudo realizado por LUI e colaboradores (2018), quando comparado com células de pele normais (HaCaT), as células de melanoma possuem uma maior expressão de HDAC5 e HDAC6, evidenciada por níveis elevados tanto da proteína quanto de RNA mensageiro. Sob o objetivo de clarificar a função da HDAC5 e HDAC6 na progressão do melanoma, o referido grupo de pesquisa desenvolveu três sequências de shRNA para *knocking down* em HDAC5 e HDAC6, obtendo uma significativa diminuição da proliferação celular ($p < 0,001$) nas linhagens de melanoma. Também foi demonstrado que a HDAC5 induz a proliferação por meio da fosforilação da via Akt, diferente da HDAC6, a qual induz a proliferação por meio da fosforilação da via ERK. Uma análise do crescimento tumoral, demonstrou que um *knock down* de HDAC5 e HDAC6 inibe de modo drástico o crescimento tumoral, de modo especial a HDAC6, a qual a inibição proliferativa pode chegar em até 98 %, indicando que a sua atuação no tumor pode promover uma séria influência positiva para o crescimento tumoral.

Outro estudo, realizado por HU e colaboradores (2020), por meio da análise de 80 amostras tumorais de pacientes e diversas linhagens celulares de melanoma, mostrou que a alta expressão de HDAC6 teve significativa associação com características clínicas desfavoráveis como metástase e menor tempo de sobrevida.

1.3.3 Inibidores de HDAC

As primeiras moléculas descobertas com capacidade de inibir HDACs em células tumorais foram aquelas aplicadas a células de eritroleucemia murina, onde o estudo mostrou que o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) afetou o crescimento e diferenciação celular. Como consequência desta observação iniciou-se a síntese de várias moléculas que se assemelham à estrutura do DMSO, sendo a maioria semelhantes ou derivados de bisacetamida de hexametileno (HMBA). A potência do HMBA era maior que a do DMSO, mas o seu IC50 ainda estava na faixa milimolar; além disso, foi

observado que a ação do HMBA modulava o perfil de expressão gênica das células em que foi testado, onde foi proposto que a consequência de mudança de perfil gênico estava associada a mudança na proliferação celular, contudo, o alvo molecular exato e o mecanismo molecular associado ainda não estava claro. Com o intuito de melhorar os resultados do HMBA, ocorreu a substituição da estrutura bisacetamida por um quelante de metal, melhorando significativamente a ligação com seu alvo molecular, ainda desconhecido. Com intuito de promover um melhoramento da molécula, os dois grupos de ácido bisidroxâmico foram substituídos por vários grupos hidrofóbicos com base na hipótese de que apenas um único grupo quelante de metal era necessário para a potência total do desconhecido alvo, a molécula líder desse raciocínio foi a suberoilânilida ácido hidroxâmico (SAHA; vorinostat, Zolina). Foi sugerido então que vorinostat era um inibidor de HDAC1, o qual foi comprovado posteriormente. Após inúmeros estudos foi estabelecido que vorinostat é um inibidor inespecífico de HDACs (MCCLURE, LI, CHOU, 2018).

Atualmente, há uma vasta variedade de inibidores de HDAC, sendo a maioria dos inibidores construídos estruturalmente dentro do modelo canônico farmacóforo, o qual é composto de três partes principais: um grupo de ligação ao zinco, que é capaz de coordenar o íon zinco catalítico localizado na parte inferior do sítio ativo; uma parte de reconhecimento de superfície, a qual é responsável pela interação com a borda de entrada do sítio ativo; e um vinculador, que conecta o grupo de ligação ao zinco com a parte de reconhecimento de superfície, e também atua na interação com o túnel hidrofóbico do sítio ativo (ZHAO *et.al.*, 2020).

A inibição das HDACs tem apresentado um efeito considerável na prevenção da proliferação e metástase de células de melanoma. Múltiplas moléculas têm emergido como inibidores de HDAC, as quais têm gerado como resultado remodelamento dos cromossomos, arraste do ciclo celular e seletiva toxicidade para células de melanoma, quando comparadas com melanócitos normais. Com o decorrer do tempo, tem-se potencializado as evidências que a inibição das HDACs acarreta em múltiplos efeitos em células tumorais, incluindo indução de apoptose, parada do ciclo celular e consequente queda da proliferação celular, indução de autofagia, entre outros (LIU *et.al.*, 2016).

1.3.3.1 WT-161

A molécula WT-161 (C₂₇H₃₀N₄O₃) é um composto sintetizado que possui a característica de ser um inibidor altamente seletivo para HDAC6, apresentando três elementos principais em sua estrutura, sendo, um domínio de ligação de metal, visto que as enzimas HDAC de classe I, II e IV são hidrolases dependentes de zinco; um elemento de reconhecimento de superfície; e uma estrutura que interligue estas duas partes distintas. Sua especificidade para HDAC6 é demonstrada por meio de ensaios inibitórios bioquímicos, obtendo o resultado de IC₅₀ enzimático de 0,40 nM com um intervalo com 95 % de confiança em 0,28-0,55 (HIDESHIMA *et.al.*, 2016).

Como demonstrado no estudo realizado por HIDESHIMA e colaboradores (2017) a molécula WT161 é capaz de induzir a acetilação de alfa-tubulina e da histona H3 em linhagens celulares de câncer de mama (MCF7, T47D, BT474, MDA-MB231), de forma mais intensa que os pan-inibidores de HDACs, SAHA e LBH589. Também foi avaliado o impacto da molécula WT161 na proliferação celular, demonstrando uma forte resposta dose dependente nas linhagens citadas acima. Adicionalmente, WT161 foi capaz de promover a apoptose, através da clivagem da caspase 7.

Outro estudo realizado por GARCÍA-GUERREIRO (2020) mostrou que o composto WT-161 também possui a capacidade de potencializar a expressão de CD38 em linhagens de células de mieloma múltiplo.

CD38 é uma glicoproteína transmembrana que é amplamente expressa em uma variedade de tecidos e células humanas, especialmente aquelas do sistema imunológico. A proteína CD38 foi anteriormente considerada como um marcador de ativação celular, e hoje os anticorpos monoclonais direcionados ao CD38 testemunharam grandes conquistas no mieloma múltiplo e promoveram pesquisadores a realizar pesquisas em outros tumores (LI *et.al.*, 2020)

As propriedades anticâncer do WT-161 também foram demonstradas por Sun e colaboradores (2021) em células de osteossarcoma U2OS e MG63. Porém inexistem dados relativos ao seu efeito sobre células de melanoma.

2 JUSTIFICATIVA

Demonstrado por diversos estudos epidemiológicos, o melanoma, dentre os tipos câncer de pele, possui o maior índice de mortalidade. Berwick (2006) mostrou que a mortalidade está diretamente relacionada ao seu estágio metastático.

Importantes mecanismos que regulam a promoção e a progressão da carcinogênese, contribuindo para uma metastatização, estão os fatores epigenéticos. Em uma análise de sobrevivência, Hu (2020) evidenciou que pacientes com alta expressão de HDAC6 possuem um menor tempo de sobrevida.

A literatura científica oncológica tem demonstrado e objetivado seus estudos na HDAC6, cuja inibição tem sido considerada uma promissora terapia anticâncer. Contudo, na prática clínica, tem se utilizado inibidores inespecíficos de HDACs. Por isso, considerando a relevância da HDAC6 na biologia tumoral, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas que permitam avaliar de forma específica, as vias de ação molecular da HDAC6 em melanoma.

Este estudo foi proposto para estudar e identificar o papel do inibidor de HDAC6, WT-161 em células de melanoma tratadas isoladamente ou em combinação com TMZ e DTIC.

3 OBJETIVOS

No presente trabalho foram estabelecidos os seguintes objetivos:

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos funcionais da inibição de HDAC6 nas linhagens celulares de melanoma CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366, tanto de maneira isolada, quanto em combinação com TMZ e DTIC.

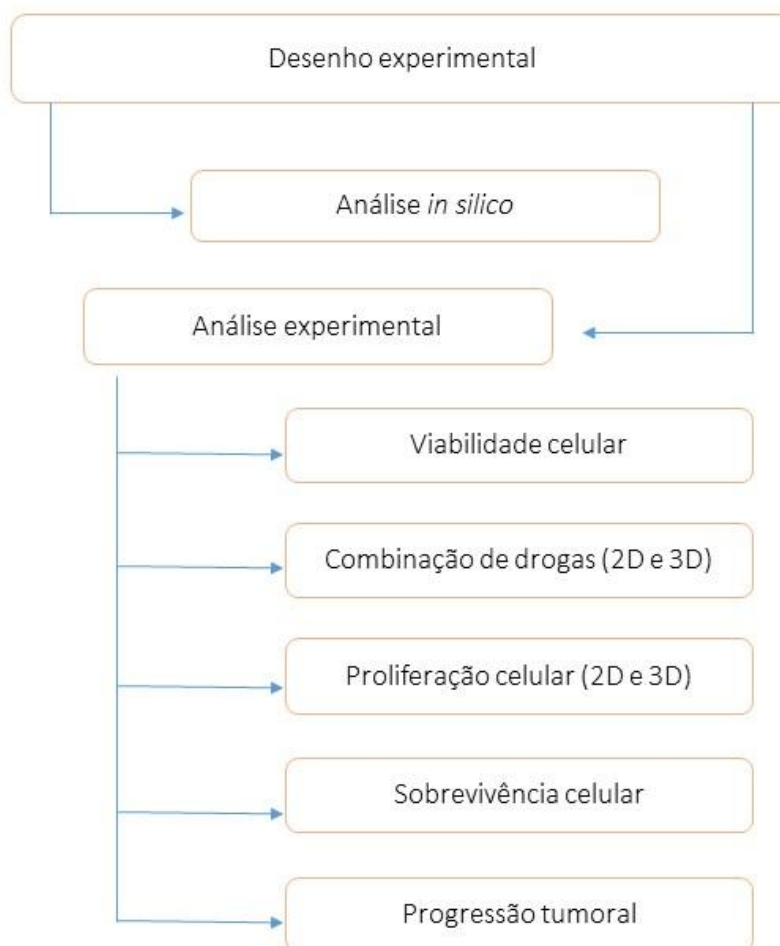
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito de WT-161 de forma isolada ou em combinação com TMZ, DTIC, na viabilidade de células de melanoma cultivadas em monocamadas (2D), por meio de ensaios de MTT;
- b) Analisar o efeito de WT-161, de forma isolada ou em combinação com TMZ ou DTIC, na proliferação de células de melanoma cultivadas em três dimensões (3D) na forma de esferóide multicelulares tumorais;
- c) Estudar o impacto de WT-161, de forma isolada ou em combinação com TMZ e DTIC, na população apoptótica apoptose, por meio da marcação de Anexina V;
- d) Observar o efeito de WT-161 no ciclo celular de células de melanoma, por meio de citometria de fluxo.
- e) Verificar a efeito isolado WT-161 sobre a motilidade celular, por meio de experimentos que avaliam a migração, adesão e invasão celular;
- f) Observar o resultado da expressão proteica de alfa-tubulina, alfa-tubulina acetilada, PARP (*poly-ADP-ribose polymerase1*), E-caderina e β -catenina, frente a inibição da HDAC6 por WT-161, pela técnica de western blot.

4 METODOLOGIA

A metodologia e o desenho experimental utilizados neste trabalho está esquematizada na Figura 04.

Figura 04: Desenho experimental do projeto desenvolvido.



Fonte: Elaborado pelo autor

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Humana da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), e os dados foram obtidos a partir de triplicatas realizadas em três experimentos independentes, os quais foram expressados no valor de média e desvio padrão.

4.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Informações de transcriptomas derivados da base de dados UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>), segundo a metodologia de Chandrasekhar *et.al* 2017, os quais foram obtidos de amostras tumorais de pacientes diagnosticados com melanoma foram coletadas da base de dados *National Cancer Institute – GDC Data Portal* (<https://portal.gdc.cancer.gov>). As informações clínicas e os dados de expressão gênica são referentes a 472 pacientes.

4.2 LINHAGEM CELULARES.

Para realização do estudo foram utilizadas três linhagens celulares de melanoma, CHL-1, cedida gentilmente pela Prof. Dra. Marisa Ionta, do Laboratório de Avaliação de Protótipos Antitumorais (LAPAN) da UNIFAL-MG, e as linhagens SK-MEL-147, WM1366, as quais foram gentilmente cedidas pelo Dr. Tharcísio Citrangulo Tortelli Júnior, do Centro de Investigação Translacional em Oncologia da Faculdade de Medicina da USP-SP. Todas as células foram provenientes do banco de células internacional *American Type Culture Collection (ATCC)*. As características de origem e genéticas destas células são apresentadas na Tabela 01.

Tabela 01 - Características das linhagens CHL-1, SK-MEL-147, WM1366.

(Continua)

Características gerais				
Linhagem celular	Origem	Espécie de origem	Mutação	Referência
CHL-1	Melanoma. Derivada de efusão pleural	<i>Homo sapiens.</i>	<i>TP53</i> <i>MAPK3</i> <i>CDKN2A</i>	BIGNELL, <i>et.al.</i> , 2010
SK-MEL-147	Melanoma Derivada de sítio metastático	<i>Homo sapiens.</i>	<i>NRAS</i>	VOGEL, <i>et.al.</i> , 2015

Tabela 01 - Características das linhagens CHL-1, SK-MEL-147, WM1366.

(Continuação)

Características Gerais				
Linhagem celular	Origem	Espécie de origem	Mutação	Referência
WM1366	Melanoma cutâneo	<i>Homo sapiens.</i>	<i>TP53</i> <i>NRAS</i> <i>CDKN2A</i>	ATEFI, <i>et.al.</i> , 2015

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3 CONDIÇÕES DE CULTURA 2D E 3D

Para o cultivo 2D, as células foram mantidas em garrafas de 25 cm² em meio DMEM (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA) suplementado com 1% de estreptomicina (100 mg/mL) associado com penicilina (60 mg/ml) e 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil; Ph 7,2 – 7,4) em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Com o intuito de promover a manutenção e expansão após confluência, as células foram enzimaticamente desprendidas das garrafas com 0,05% tripsina (Gibco BRL, Life, Technologies, Carlsbad, California, USA), e consecutivamente, a suspensão celular foi subcultivada em novas garrafas de cultivo de 25 cm².

Para o estabelecimento do cultivo celular 3D, foi utilizado o protocolo de formação de esferóide pelo método descrito por Friedrich (2009), com algumas modificações. Para realizar esta metodologia, as linhagens celulares CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 foram cultivadas sob condições 2D em garrafas de 25 cm² até atingirem aproximadamente 90% de confluência. A partir desta confluência, foi preparada uma suspensão celular na concentração de 700 células em 200µL, sendo então, semeadas em placas de 96 poços, previamente revestidas com agarose 1,5%. Estas placas foram mantidas imóveis em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C, durante quatro dias para a formação dos esferóides. Neste procedimento, apenas um esferóide é formado por poço.

A agarose 1,5% que reveste os poços foi preparada em uma concentração de 15 mg de agarose normal (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por mL de meio DMEM

incompleto (Gibco, Carlsbad, CA, EUA). A solução foi autoclavada por 20 minutos a 121 °C e, ao final, o frasco contendo a solução, ainda quente, foi retirado da autoclave e transferido para capela de fluxo laminar. A agarose foi mantida sobre um agitador magnético térmico e sob constante monitoração da temperatura. Cada poço da placa foi inoculado 50 µL desta solução por meio de um pipetador Multipette® M4 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

4.4 DILUIÇÃO DOS FÁRMACOS E COMPOSTO

Os fármacos TMZ (Sigma-Aldrich Brazil, T2577), DTIC (Sigma-Aldrich Brazil, D2390) e o composto WT-161 (MedChemExpress, HY-100871) foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante, onde foram armazenadas em alíquotas a -20 °C (TMZ e DTIC) e - 80°C (WT-161), até o momento do seu uso para cada um dos experimentos propostos.

4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de viabilidade celular foi adaptado de Kumar (2018). Suspensões celulares das linhagens CHL-1 ($7,0 \times 10^3$ células por 100µL), SK-MEL-147 ($4,0 \times 10^3$ células por 100µL), WM1366 ($1,0 \times 10^3$ células por 100µL), foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Após 24 horas do plaqueamento as células foram tratadas com concentrações crescentes de WT-161 (0 - 30µM), TMZ (0 - 2000µM) e DTIC (0 - 1000µM), de maneira isolada. Decorrido o tempo de tratamento com 48 horas, para WT-161 e TMZ, e 72 horas, para WT-161 e DTIC, o meio de cultura com o tratamento foi removido, e posteriormente, foi adicionado 100 µl da solução final de MTT, em uma concentração final de 0.45 mg/ml. As placas foram armazenadas por 4 horas na estufa com atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Decorrido o tempo de 4 horas, tempo necessário para que as células convertam o tetrazolim em formazam, foi retirado a solução de MTT e adicionado 100 µl de DMSO para incubação de 30 minutos, tempo destinado para solubilização dos cristais de formazam depositado no fundo do poço. A coloração correspondente ao produto final foi quantificado a 570nm de absorbância utilizando um leitor de microplacas iMark.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMBINAÇÃO DE FÁRMACO E COMPOSTO NA VIABILIDADE CELULAR EM CULTIVO 2D

A metodologia adotada para a combinação foi a de Chou-Talalay (1984), por meio do programa CalcuSyn®. As linhagens CHL-1, SK-MEL-147, WM1366 foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração estabelecida para o ensaio de viabilidade, e foram incubadas por 24 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

Para o tratamento *in vitro*, foram adotadas três estratégias de combinação entre os fármacos e o composto (TMZ e WT-161) (DTIC e WT-161), sendo uma estratégia simultânea e duas estratégias sequenciais. A avaliação da combinação se baseou na análise de seis pontos de combinação. Estes pontos foram avaliados em três situações distintas: a primeira, o modo simultâneo (TMZ + WT-161) e (DTIC + WT-161), onde ambas ficaram agindo por um período de 48 e 72 horas respectivamente; a segunda, o modo sequencial, onde primeiro se administrou TMZ/DTIC por metade do período do tratamento simultâneo e depois se administrou o WT-161 pelo restante do tempo, (TMZ → WT -161) e (DTIC → WT -161); a terceira, o modo sequencial, onde primeiro se administrou WT-161 por metade do período do tratamento simultâneo e depois se administrou o TMZ/DTIC pelo restante do tempo, (WT-161 → TMZ) e (WT-161 → DTIC). Para todas as estratégias combinatórias foi utilizada a Combinação de Razão constante de pontos de combinação a partir dos valores de IC₅₀ em cada linhagem celular estudada.

Para a análise da interação entre a TMZ/DTIC e o WT-161 foi utilizado o programa Calculusyn®, o qual permite uma análise individual de cada ponto de combinação. Gerando como resultado o índice de combinação (CI), o mesmo que se tiver um valor > 1 indica um efeito aditivo na combinação; se possuir um valor de resultado =1 indica uma ação aditiva na combinação; ou se possuir um resultado com valor < 1 indica uma ação sinérgica na combinação.

4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMBINAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DOS ESFERÓIDES

Seguindo as condições de cultivo 3D detalhadas no tópico 4.3, as células das linhagens CHL-1, SK-MEL e WM1366, foram incubadas durante 96 horas, período

necessário para a formação do esferóide. Após as 96 horas, antes de se iniciar o tratamento, foi capturado imagem dos esferóides, as quais foram obtidas pelo sistema de captura de imagens Axio Cam MRc (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado a microscópio invertido (Opton), utilizando a objetiva de 4x e analisadas pelo software AxioVision 3.1 (Carl Zeiss).

Para o tratamento foi adotado a estratégia de combinação simultânea. A avaliação da combinação se baseou na análise da combinação entre o IC50 do TMZ e do IC50 de WT-161. Para isso os esferóides foram expostos continuamente, por um período de 9 dias, a TMZ e WT-161 de maneira isolada e combinada. A cada três dias era realizada a captura de imagens, seguida pela troca do meio.

4.8. ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

A metodologia utilizada foi de Rafahi (2011), com algumas modificações. Suspensões celulares das linhagens CHL-1, SK-MEL-147, WM1366 foram semeadas nas seguintes concentrações: 500 células/ml para as linhagens CHL-1 e WM1366; e 1000 células/ml para a linhagem SK-MEL-147. Foi inoculado 1 ml de suspensão celular em placas de seis poços, as quais foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C por um período de 24 horas. Com o término da primeira incubação as células foram tratadas com WT-161 e incubadas durante 48 h. Terminando o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS, e meio de cultivo sem o composto foi acrescentado para continuar com a incubação por 5 dias. Decorrido este tempo, as células foram fixadas com metanol absoluto durante 20 minutos e coradas com 1 % Giemsa por 5 minutos. As colônias com pelo menos 50 células foram contabilizadas, a respectiva análise foi feita por meio de estereomicroscópio.

4.9 ANÁLISE DE MORTE APOPTÓTICA

Suspensões celulares das linhagens de CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 foram semeadas em concentração de $5,0 \times 10^4$ células por 1000 μ L em placas de seis poços e incubadas por 24 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Após 24 horas do plaqueamento as células foram tratadas com WT-161, na concentração

correspondente ao IC50 e a metade do IC50 das respectivas linhagens. Para a linhagem SK-MEL e CHL-1 o tratamento ocorreu de forma isolada, já para a linhagem WM1366 o tratamento ocorreu em combinação com TMZ.

Após o tempo de tratamento, 48 horas, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 112 rcf por 5 minutos, lavadas com PBS e ressuspensas em 300µL de Tampão de ligação para anexina V (BD Biosciences Pharmigen, San Jose, California, USA). As células foram então marcadas com 3,5 µL de Anexina-Isoticianato de fluoresceína (FITC) e em 3,5 µL de solução de iodeto de propídio (PI). Após o processamento a amostra foi analisada em um citômetro de fluxo (Guava easyCyte 8HT, Hayward, CA, USA), contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento.

4.10 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Com o objetivo de analisar os potenciais efeitos do WT-161 nas mudanças no ciclo celular de células de melanoma, foram semeadas $1,5 \times 10^5$ células das linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 em placas de seis poços e após 24 h de incubação, as células foram tratadas com WT-161 usando concentrações de IC50 específicas para cada linhagem, por 12 h. As células foram então tripsinizadas, lavadas com 1 X PBS e marcadas com PI. O conteúdo de DNA das células marcadas foi imediatamente analisado usando um citômetro de fluxo (Guava easyCyte 8HT, Hayward, CA, USA) contabilizando um total de 10000 eventos por tratamento.

4.11 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

Suspensões celulares das linhagens de CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 foram semeadas em concentração de $5,0 \times 10^4$ células por 1000µL em placas de vinte quatro poços e incubadas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. O período de incubação foi o tempo necessário para que o inóculo celular atingisse acima de 90% de confluência.

Após o período de incubação, foi retirado o meio de cultivo e a ferida (*scratch*) foi realizada usando uma ponteira de 10µL, e adicionado o meio com 1% de FBS contendo 3µM e 6µM de WT-161. Imediatamente após o tratamento, foram fotografados dois campos por poço, determinando assim o tempo zero (0h).

Posteriormente, as células foram incubadas por 24h em presença do tratamento. Decorrido esse tempo, foram fotografadas as fendas, no local da demarcação.

Cada uma das imagens foi avaliada pelo programa ImageJ® (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos), no qual foi possível avaliar o grau, em área por pixel, da cicatrização da ferida em relação à área analisada.

4.12 AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR

Suspensões celulares das linhagens CHL-1 ($5,0 \times 10^4$ células por $100 \mu\text{L}$) e SK-MEL-147 ($5,0 \times 10^5$ células por $100 \mu\text{L}$) foram semeadas em placas de 96 poços. Para cada linhagem foi aplicada dois análises de adesão celular:

- a) I - Tratamento com WT-161 ($3 \mu\text{M}$ e $6 \mu\text{M}$) na suspensão celular, seguido do seu imediato inóculo na placa de 96;
- b) II - Tratamento com WT-161 ($3 \mu\text{M}$ e $6 \mu\text{M}$) na suspensão celular, seguido do seu imediato inóculo na placa de 96; onde os poços que seriam utilizados já estavam previamente revestidos com $60 \mu\text{L}$ de Geltrex (Life Technologies), estando diluído em 1:5 em meio de cultivo.

Para os dois tipos de tratamento, as células foram incubadas por 6 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 a 37°C . Decorrido o tempo de tratamento com WT-161, o meio de cultura com o tratamento foi removido, e os poços onde estavam as suspensões de células foram lavados 2x com PBS. Após a lavagem, as células que estavam aderidas, no fundo do poço, foram coradas com cristal violeta 1%. Após a coloração foram registradas 3 fotografias por poço, utilizando-se do sistema de captura de imagens Axio Cam MRc (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado a microscópio invertido (Opton), utilizando a objetiva de 4x e analisadas pelo software AxioVision 3.1 (Carl Zeiss). As imagens foram analisadas pelo Programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos)..

Após o registro fotográfico, o corante presente no poço foi diluído em $100 \mu\text{L}$ de SDS a 1%, por um período de 1 hora. A coloração correspondente ao produto final foi quantificado a 570nm de absorbância utilizando um leitor de microplacas iMark.

4.13 ANÁLISE DA INVASÃO CELULAR

Suspensões celulares das linhagens de CHL-1, SK-MEL-147 foram semeadas em concentração de $1,50 \times 10^5$ células por 500 μ L de meio de cultivo sem soro bovino fetal, pré tratadas por 30 minutos com WT-161, em uma Membrana Transwell (Corning Incorporated; Corning, NY, EUA), as quais estavam previamente revestidas com Geltrex (Life Technologies). A câmara inferior foi preenchida com 500ml de meio de crescimento contendo 10% FBS, que serviu como quimioatraente. O experimento foi realizado em placas de vinte quatro poços e incubadas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. O período de incubação foi de 24 horas.

As células que não invadiram e a matriz remanescente no poço superior foram suavemente raspadas. Subsequentemente, as células aderidas na membrana do inserto foram coradas com violeta cristal a 0,4% (Sigma; St. Louis, MO, EUA). Após a coloração foram registradas 3 fotografias por poço, utilizando-se do sistema de captura de imagens Axio Cam MRc (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado a microscópio invertido (Opton), utilizando a objetiva de 4x e analisadas pelo software AxioVision 3.1 (Carl Zeiss).

A mensuração da área invadida foi feita usando o programa de domínio público ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos).

4.14 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA

O inóculo de células foi cultivado em garrafas de 75 cm² e tratado, por 48 h. Como controle negativo, cada linhagem foi cultivada com DMSO, em porcentagem proporcional ao encontrado nas células tratadas. Em seguida, foram lavadas com PBS gelado e homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1,0 %, ácido deoxicolato de sódio 1% em Tris-HCL 50 mM, pH= 7,5) contendo inibidores de proteases (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) e fosfatases (Ortovanadato de sódio 1mM). Após centrifugação a 12000 x g por 10 min o sobrenadante foi coletado e as alíquotas armazenadas a -80° C. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de BCA (Bicinchoninic Acid) com o kit Thermo Scientific™ Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH=6,8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 1% e betamercaptoetanol 1% em água MiliQ) e desnaturadas por 5 minutos (100°C). O fracionamento das proteínas (30 µg) foi realizado em minigel de poliacrilamida 12% (2,5 horas a 100V).

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos) por 2 h a 200 mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol a 20% em água destilada) e coradas em solução de Ponceau 0,5% por 3 min para verificar a eficiência do processo de transferência. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em TBS (Tris-buffered saline) a 0,02 M (10 min cada lavagem). O bloqueio foi realizado com TBS a 0,02 M contendo leite desnatado em pó Molico® (Nestlé, São Paulo, Brasil) a 5% e tween 20 (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a 0,05% por 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação.

Os anticorpos primários alfa-tubulina (2144S) e alfa-tubulina acetilada (5335S), beta-catenina (9562S), PARP (9542S) e E-caderina (3195S), todos da marca Cell Signaling Technology, foram diluídos 1:1000 em solução de bloqueio e as membranas foram incubadas com os anticorpos, durante a noite, a 4°C sob agitação. Após sucessivas lavagens com TBS e T-TBS (Tween20-TBS), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IGG de coelho (7074S), respectivos a cada complemento primário, conjugados a peroxidase e bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência (ECL®, Amersham, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos).

Os resultados foram registrados em filmes radiográficos (Hyperfilm Amersham, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos), e apresentados como a média±DP de três experimentos independentes, realizados em triplicata. A quantificação das bandas foi feita usando o programa de domínio público ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos).

Para as análises com a alfa-tubulina acetilada, beta-catenina e PARP foram utilizadas as linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366. Para as análises com a E-caderina foram utilizadas as linhagens CHL-1 e SK-MEL-147.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística entre duas variáveis foi realizada por meio do Teste *t* de *Student* não pareado. Para a análise estatística entre mais de duas variáveis foi realizado

o teste ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Ambas análises foram feitas com o software GraphPad Prism 5. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0,05$.

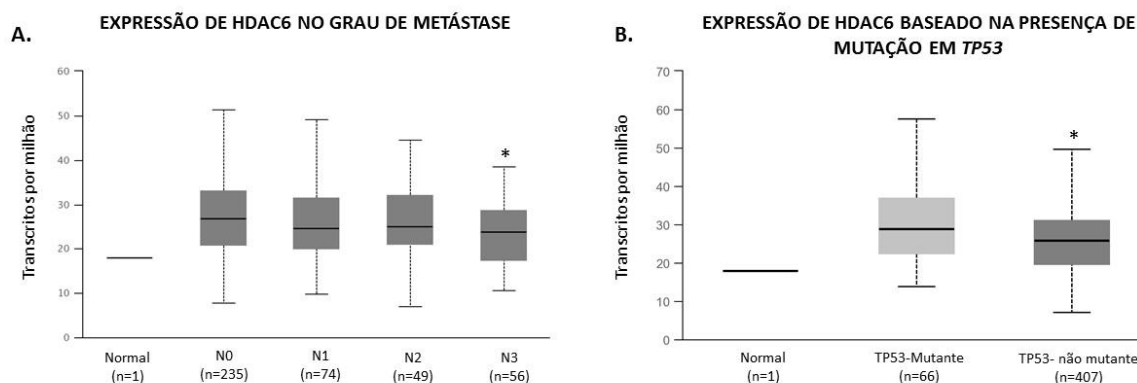
5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO DE HDAC6 ESTÁ AUMENTADA EM METÁSTASE DE MELANOMA

Com o objetivo de verificar se a expressão de HDAC6 está relacionada com metástase em melanoma, dados de expressão gênica/quantificação de transcritos deste gene foram coletados a partir de amostras de melanoma humano, disponíveis na plataforma UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>) (Figura 5).

Foram comparadas amostras classificadas como metastática N3, caracterizada pela presença de metástase em mais de dez linfonodos axilares, com amostras classificadas como metastática N0, caracterizada pela ausência de metástase em linfonodos axilares. A expressão de HDAC6 está aumentada em melanomas N3 em comparação com melanomas N0 (Figura 5A, $p = 0,0369$, $n=415$).

Figura 05: Expressão de HDAC6 de acordo com o perfil metastático e de mutações no gene *TP53*



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: * $p < 0,05$. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

A - Dados referentes a 415 amostras de melanoma para análise do nível de expressão de HDAC6 em *status* de metástase; comparado com N0

B - Dados referentes a 474 amostras de melanoma para análise do nível de expressão de HDAC6 em amostras com mutação em *TP53*; comparado com TP53 mutante.

Uma vez que mutações do gene *TP53* são determinantes na progressão de melanomas, também foi feita a comparação de amostras de melanoma com mutações

em TP53 comparadas com amostras sem mutação. Nesse caso, amostras com mutação no gene TP53 apresentam um aumento de expressão em comparação com amostras não mutantes (Figura 5B, $p = 0,00175$, $n = 474$).

5.2 WT-161, DTIC E TMZ DIMINUEM A VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS DE MELANOMA DE MANEIRA DOSE DEPENDENTE.

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular nas linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 frente ao tratamento com inibidor específico de HDAC-6, WT-161, avaliou-se o impacto do tratamento individual em diferentes concentrações (0 - 30 μM), por um período de 48 e 72 horas (Figura 06 A e B, respectivamente e Tabela 02).

Após o tempo de tratamento com WT-161 com 48 horas (Figura 06 A), obteve-se como resultado os seguintes IC50: $5,94 \pm 0,06$ para a linhagem CHL-1; $11,75 \pm 1,31$ para SK-MEL-147; e $26,38 \pm 2,16$ para WM1366. Para o tratamento com 72 horas (Figura 06 B), obteve-se como IC50 $2,23 \pm 0,21$ para CHL-1; IC50 de $6,54 \pm 0,56$ SK-MEL-147; IC50 de $12,82 \pm 0,9$ para WM1366.

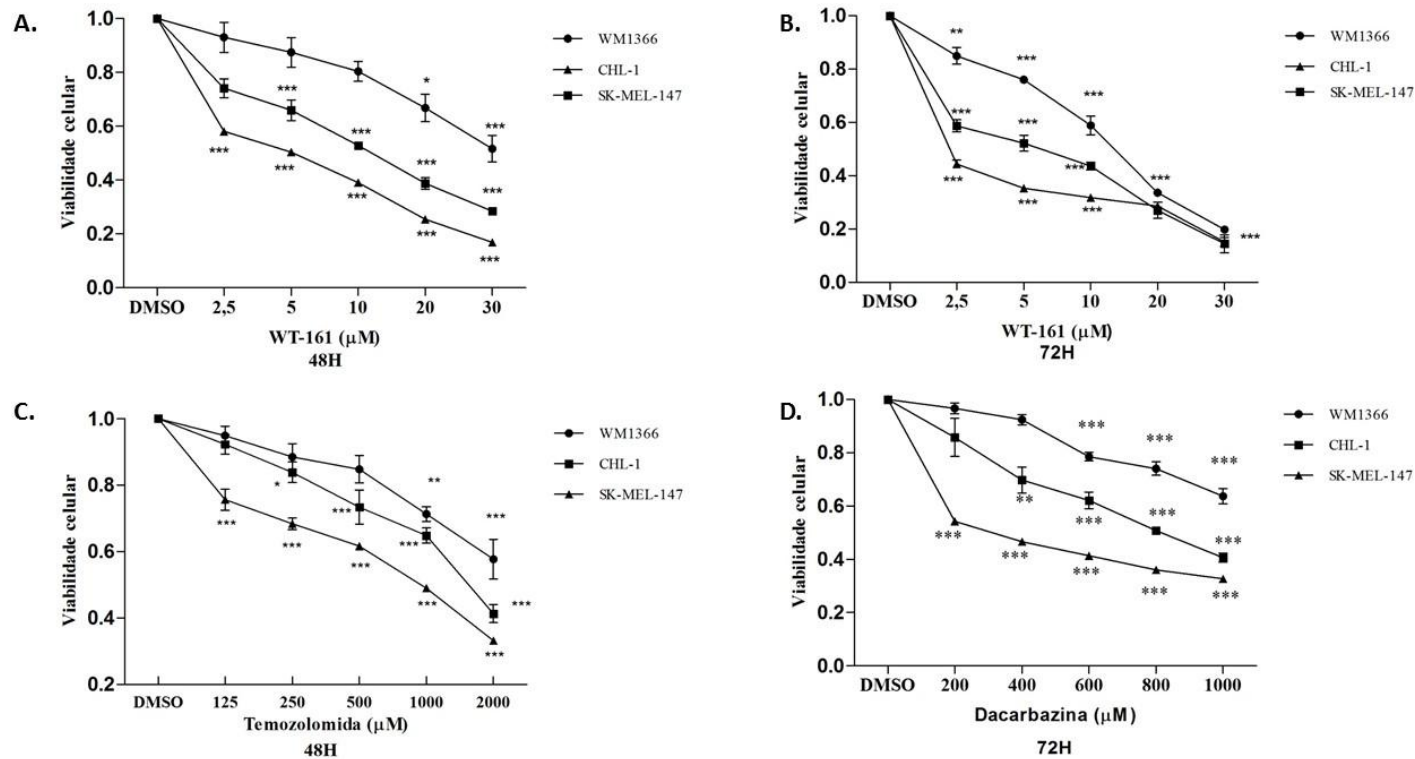
Pela análise estatística realizada nos tempos de 48 e 72 horas, as linhagens tratadas apresentam uma resposta dose e tempo-dependente para as três linhagens estudadas.

Posteriormente, avaliou-se o impacto do tratamento isolado de TMZ em diferentes concentrações (0 - 2000 μM), por um período de 48 horas, sendo os valores de IC50 obtidos de $796,72 \pm 22,85$, $1512,41 \pm 64,97$ e $2299,32 \pm 153,28$ para as linhagens SK-MEL-147, CHL-1 e WM1366, respectivamente (Figura 06 C e Tabela 02). Dentre elas, a linhagem SK-MEL-147 demonstrou-se como a linhagem mais sensível ao TMZ. Diferente de outras linhagens, já na concentração de 125 μM obteve-se uma diminuição significativa na viabilidade celular ($p < 0,0001$) quando comparado com o veículo (DMSO) e um efeito máximo de redução da viabilidade celular de 67% na concentração de 2000 μM . Em contrapartida, a linhagem WM1366 apresentou-se mais resistente ao TMZ, obtendo uma diminuição com diferença significativa da viabilidade celular na concentração de 1000 μM ($p < 0,001$), e um efeito máximo de redução da viabilidade celular de apenas 43% na concentração de 2000 μM .

Para a avaliação do impacto da viabilidade celular no tratamento isolado com DTIC, utilizou-se diferentes concentrações (0 - 1000 μM), por um período de 72 horas. Tais resultados se encontram expressos de forma gráfica na Figura 06 D e abreviados na Tabela 02. Decorrido o tempo de tratamento com DTIC, obteve-se os seguintes resultados IC50: $292,2 \pm 13,09$ para a linhagem SK-MEL-147; $781,71 \pm 21,66$ para a linhagem CHL-1; $1322,28 \pm 91,33$ para a linhagem WM1366.

Assim como no tratamento com TMZ, a linhagem SK-MEL-147 demonstrou-se a linhagem mais sensível ao DTIC. Uma diferença estatística significativa foi observada já na primeira concentração de tratamento ($p < 0,0001$), e um efeito máximo de redução da viabilidade celular de 68% na concentração de 1000 μM .

Figura 06: TMZ, DTIC e WT-161 reduzem a viabilidade celular das linhagens celulares de melanoma.



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: Análise da viabilidade celular por meio da metodologia de MTT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$,

ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

A, B - WT-161 48 horas e 72 horas, respectivamente.

C, D - Temozolomida 48 horas e Dacarbazina 72 horas, respectivamente

Tabela 02: IC50 em μM das linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 quando tratadas com WT-161, TMZ e DTIC.

Fármaco / Composto	Linhagem celular		
	CHL-1	SK-MEL-147	WM1366
WT-161(48H)	5,94 \pm 0,06 μM	11,75 \pm 1,31 μM	26,38 \pm 2,16 μM
WT-161 (72H)	2,23 \pm 0,21 μM	6,54 \pm 0,56 μM	12,82 \pm 0,9 μM
TMZ	1512,41 \pm 64,97 μM	796,72 \pm 22,85 μM	2299,32 \pm 153,28 μM
DTIC	781,71 \pm 21,66 μM	292,2 \pm 13,09 μM	1332,28 \pm 91,33 μM

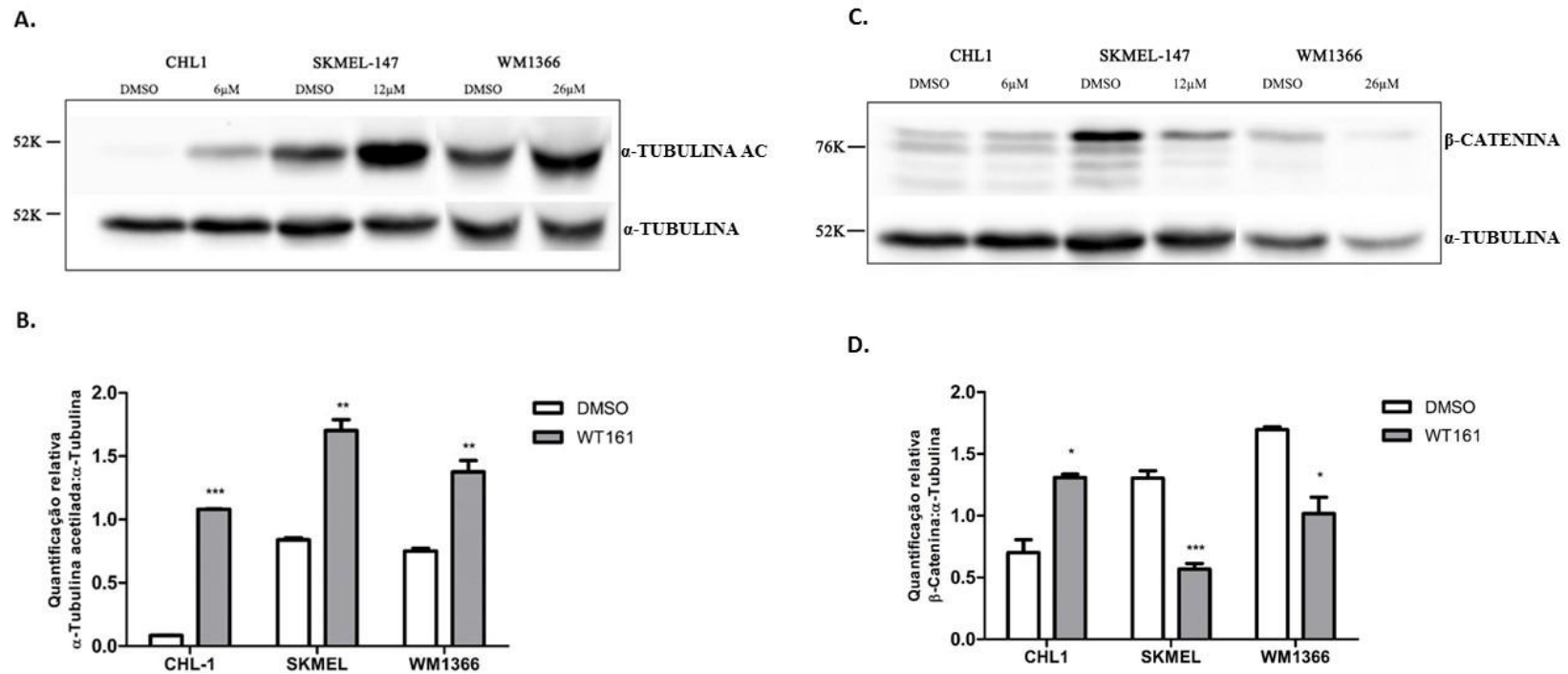
Fonte: Dados da pesquisa (2022)

5.3 WT-161 AUMENTA OS NÍVEIS DE ALFA-TUBULINA E DIMINUI A CONCENTRAÇÃO DE β -CATENINA

Após evidenciar que WT-161 afeta a viabilidade das linhagens celulares de melanoma de maneira dose e tempo-dependente, foi verificada e validada a capacidade de WT-161 como um inibidor seletivo de HDAC6 por meio da análise da expressão protéica de alfa-tubulina acetilada em Lisina-40 (ZHANG et al, 2003). Para isso, CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 foram tratadas com seus respectivos IC50 pelo período de 48 horas e foi observado um aumento significativo da concentração de alfa-tubulina acetilada (Figura 07 A e B).

Simultaneamente, foi verificada os efeitos da inibição de HDAC6 sobre a expressão proteica de β -catenina, observando uma diminuição da expressão nas linhagens SK-MEL-147 e WM1366. De diferente modo, CHL-1 apresentou um aumento nas concentrações de β -catenina total após o tratamento com WT-161 (Figura 07 C e D).

Figura 07: WT-161 aumenta significativamente a concentração de α -tubulina acetilada e diminui a expressão de β -catenina nas linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366.



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$, Teste *t* de Student.

A - Concentração de α -tubulina acetilada-Lys40 (52 kDa) mediante ao tratamento com WT-161

B - Quantificação de de α -tubulina acetilada-Lys40 (52 kDa) mediante ao tratamento com WT-161

C - Concentração de β -catenina (76 kDa) mediante ao tratamento com WT-161

D - Quantificação de β -catenina (76 kDa) mediante ao tratamento com WT-161

5.4 A COMBINAÇÃO DE TMZ/DTIC E WT-161 POSSUI UM EFEITO SINÉRGICO.

Após a avaliação da ação dos fármacos TMZ, DTIC e do composto WT-161 de maneira isolada nas linhagens celulares descritas, foram investigados os efeitos da combinação de TMZ ou DTIC com WT-161 sobre a viabilidade celular, utilizando a metodologia de Chou-Talalay (1984).

A avaliação da combinação de fármaco e composto se baseou na análise de seis pontos de combinação seguindo o delineamento experimental de razão constante utilizando as proporções descritas na Tabela 03 e as estratégias simultâneas e sequenciais detalhadas na Seção Material e Métodos.

Nesta investigação foi avaliado o índice de combinação (CI), índice de resposta terapêutica (DRI) e os níveis de dose-efeito da inibição do crescimento (ED50 – ED95) (Tabela 04).

Para a combinação de TMZ e WT-161, foi observado que para a exposição simultânea (TMZ + WT-161), a linhagem CHL-1 obteve um comportamento sinérgico nos dois últimos pontos de combinação, justamente acima do efeito fracionário ED70 (Figura 08 A). As linhagens SK-MEL-147 e WM1366 obtiveram um sinergismo em todos os pontos de combinação testados (Figura 08 D e G). De maneira semelhante, quando avaliadas ambas as exposições sequenciais (TMZ → WT -161 e WT-161 → TMZ), nas linhagens SK-MEL-147 e WM1366 observou-se um efeito sinérgico (Figura 08 E, F, H e I), enquanto que a linhagem CHL-1 apresentou uma resposta antagônica (Figura 08 B e C).

Para a combinação DTIC e WT-161, foi observado que para a exposição simultânea (DTIC + WT-161), a linhagem CHL-1 obteve um comportamento aditivo no último ponto de combinação, justamente acima do efeito fracionário ED70 (Figura 09 A), as linhagens SK-MEL-147 e WM1366, assim como na combinação de TMZ com WT-161, obtiveram um sinergismo em todos os pontos de combinação testado (Figura 09 D e G). De maneira semelhante, quando avaliadas ambas as exposições sequenciais (DTIC → WT-161 e DTIC → TMZ), nas linhagens SK-MEL-147 e WM1366 observou-se um efeito sinérgico (Figura 09 E, F, H e I), enquanto que a linhagem CHL-1 apresentou uma resposta antagônica (Figura 09 B e C).

Portanto, os resultados demonstraram que a combinação de TMZ/DTIC com WT-161 causaram efeitos sinérgicos nas linhagens de melanoma estudadas,

preferencialmente na administração simultânea de todas as linhagens celulares de melanoma, e nas estratégias sequenciais nas células SK-MEL-147 e WM1366.

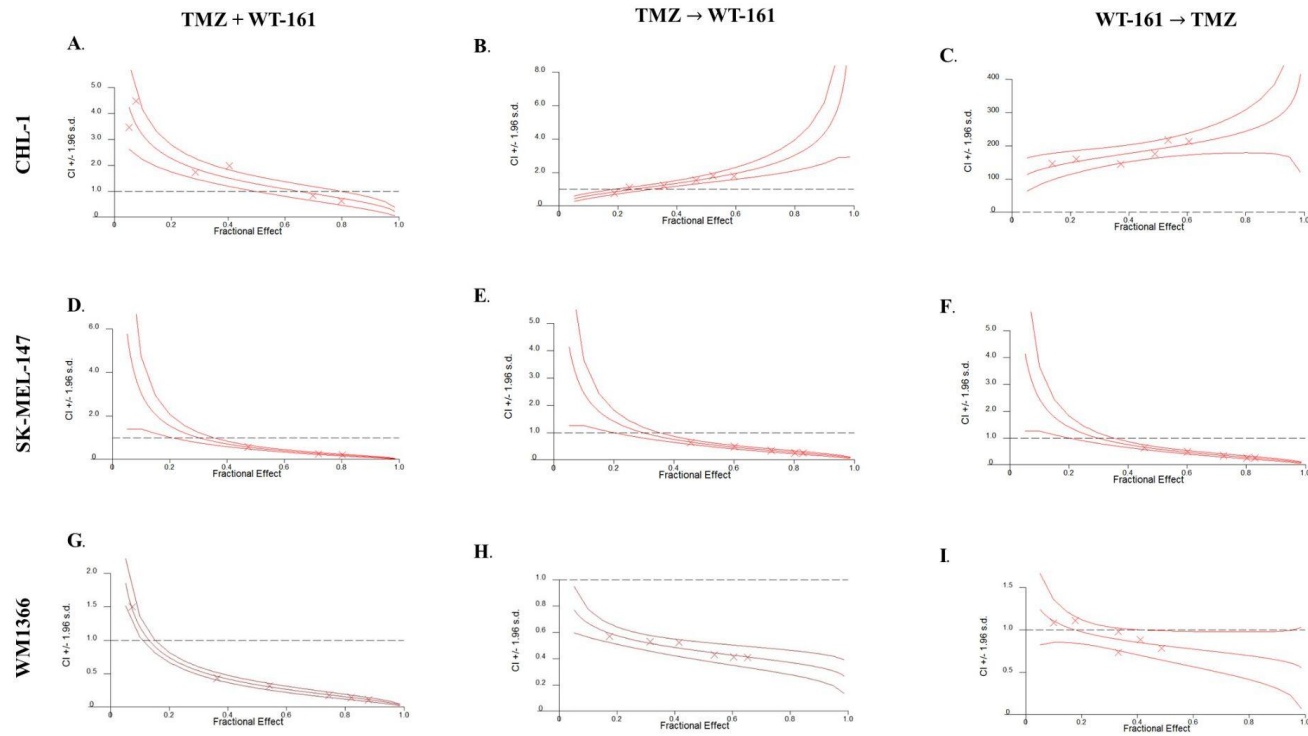
Além dos dados de sinergismo obtidos, foi possível obter importantes índices de redução de dose (DRI) nas estratégias de combinação testadas, desde 2,44 vezes até 70,36 vezes de dosagem reduzida nos tratamentos realizados, como detalhado na Tabela 04.

Tabela 03: Demonstração dos valores da razão entre os fármacos DTIC e TMZ e do composto WT-161 para as linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366.

Linhagem celular	IC50 (μM)				Proporção molar IC50 (WT-161) : IC50 (TMZ)	Proporção molar experimental	Proporção molar IC50 (WT-161) : IC50 (DTIC)	Proporção molar experimental
	WT-161 48h	TMZ 48h	WT-161 72h	DTIC 72h				
CHL-1	5,94	1512,41	2,23	781,71	1:254,61	1:250	1:350,54	1:350
SK-MEL-147	11,75	796,72	6,54	292,2	1:67,80	1:70	1:44,67	1:45
WM1366	26,38	2299,32	12,82	1332,28	1:87,16	1:90	1:103,92	1:105

Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Figura 08: Efeito da combinação entre TMZ e WT-161 em linhagens celulares de melanoma.



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

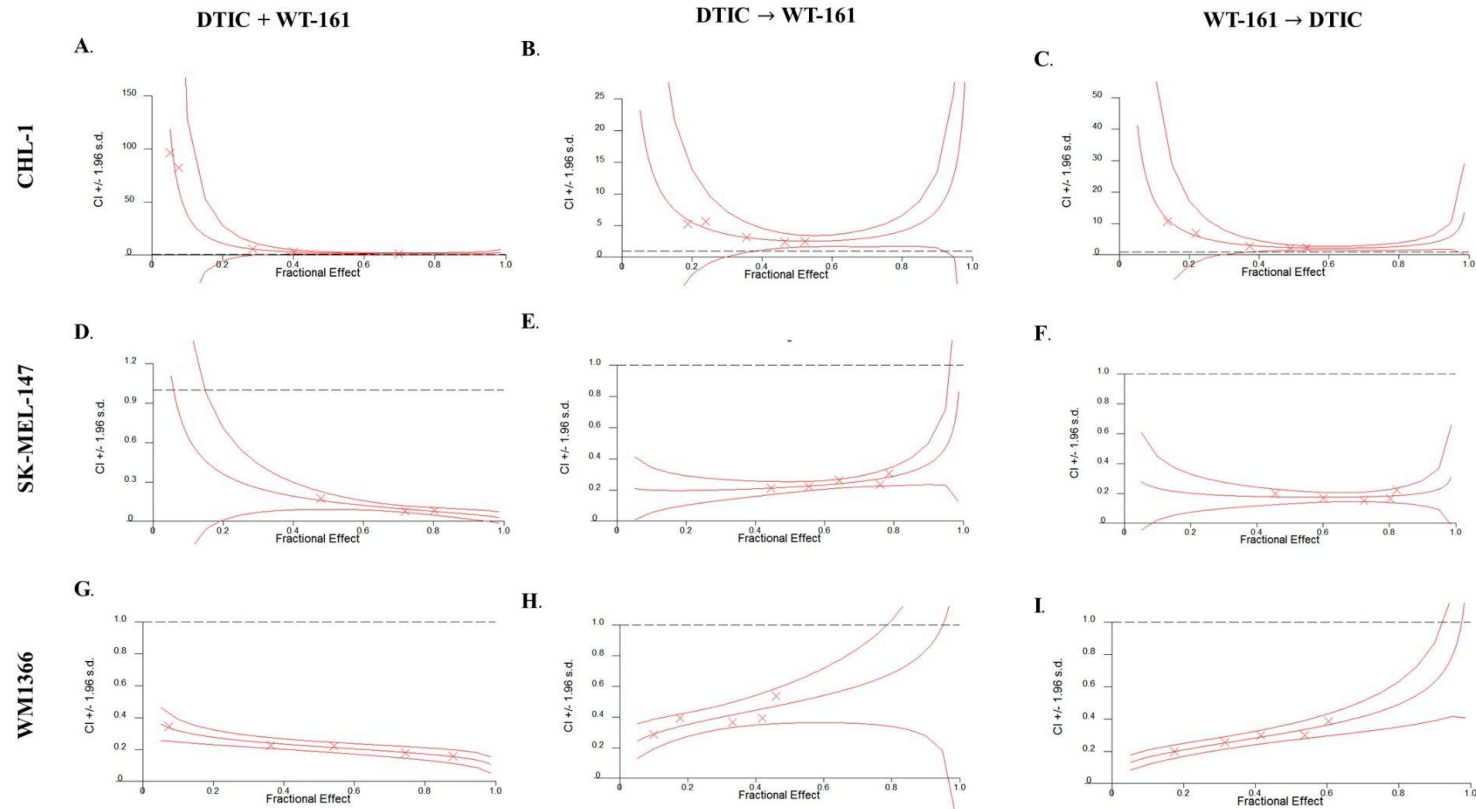
Legenda: Determinação dos índices de combinação (CI) nas linhagens celulares de melanoma

A, D, G - Combinação simultânea para a linhagem CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366, respectivamente.

B, E, F - TMZ → WT-161 para a linhagem CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366, respectivamente

C, F, I - WT-161 → TMZ para a linhagem CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366, respectivamente

Figura 09: Efeito da combinação entre DTIC e WT-161 em linhagens celulares de melanoma



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: Determinação dos índices de combinação (CI) nas linhagens celulares de melanoma expostas ao WT-161 e DTIC nas estratégias de combinação simultânea e sequencial.

A, D, G - Combinação simultânea para a linhagem CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366, respectivamente.

B, E, F - DTIC → WT-161 para a linhagem CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366, respectivamente.

C, F, I - WT-161 → DTIC para a linhagem CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366, respectivamente.

Tabela 04: Exposição dos parâmetros, CI e resposta a dose terapêutica DRI, nos tratamentos de combinação de TMZ + WT-161, TMZ WT-161 e WT-161 TMZ, nas linhagens celulares de CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366

(Continua)

Linhagem Celular	Estratégia de combinação	Drogas e combinações (razão constante)	Parâmetros			Valores de C.I em				Valores de DRI em			
			<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>R</i>	ED50	ED75	ED90	ED95	ED50	ED75	ED90	ED95
CHL-1	TMZ + WT-161	TMZ	1528,9	0,96	0,99					1,58	2,44	3,78	5,09
		WT-161	5,97	0,94	0,99					1,54	2,46	3,92	5,39
		TMZ + WT-161	966,8	1,57	0,98	1,27	0,81	0,51	0,38				
	TMZ→WT-161	TMZ	1528,9	0,96	0,99					1,24	0,74	0,45	0,32
		WT-161	5,97	0,94	0,99					1,21	0,75	0,46	0,33
		TMZ→WT-161	1228,6	0,66	0,99	1,62	2,66	4,35	6,08				
	WT-161→TMZ	TMZ	1528,9	0,96	0,99					1,24	0,74	0,45	0,32
		WT-161	5,97	0,94	0,99					1,21	0,75	0,46	0,33
		WT-161→TMZ	1133,9	0,8	0,99	190,5	231,6	281,4	321,3				
	DTIC + WT-161	DTIC	781,71	3,49	0,96					0,929	0,753	0,611	0,52
		WT-161	2,23	0,48	0,96					0,894	5,18	30,02	99,21
		DTIC+ WT-161	846,19	2,09	0,95	2,19	1,52	1,67	2,59				
	DTIC→WT-161	DTIC	781,71	3,49	0,96					0,8	0,33	0,13	0,07
		WT-161	2,23	0,48	0,96					0,77	2,28	6,76	14,4
		DTIC→WT-161	980,93	0,91	0,98	2,54	3,45	7,42	13,23				
	WT-161→DTIC	DTIC	781,71	3,49	0,96					0,79	0,47	0,25	0,16
		WT-161	2,23	0,48	0,96					0,86	3,29	12,62	31,47
		WT-161→DTIC	879,66	1,17	0,98	2,28	2,39	3,97	5,98				
SK-MEL-147	TMZ + WT-161	TMZ	829,9	0,64	0,98					3,81	11,31	33,57	70,36
		WT-161	11,8	0,96	0,99					3,79	6,43	10,94	15,61
		TMZ + WT-161	217,76	1,79	0,99	0,52	0,24	0,12	0,07				
	TMZ→WT-161	TMZ	829,9	0,64	0,98					3,07	6,8	15,08	25,92
		WT-161	11,8	0,96	0,99					3,06	3,87	4,9	5,75
		TMZ→WT-161	270,1	1,21	0,98	0,65	0,4	0,27	0,21				

Tabela 04: Exposição dos parâmetros, CI e resposta a dose terapêutica DRI, nos tratamentos de combinação de TMZ + WT-161, TMZ WT-161 e WT-161 TMZ, nas linhagens celulares de CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366

(Continuação)

Linhagem Celular	Estratégia de combinação	Drogas e combinações (razão constante)	Parâmetros			Valores de C.I em				Valores de DRI em				
			<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>R</i>	ED50	ED75	ED90	ED95	ED50	ED75	ED90	ED95	
SK-MEL-147	WT-161→TMZ	TMZ	829,9	0,64	0,98					3,38	8,47	21,22	39,62	
		WT-161	11,8	0,96	0,99					3,36	4,81	6,89	8,79	
	DTIC + WT-161	WT-161→TMZ	245,3	1,4	0,99	0,59	0,32	0,19	0,13	3,38	8,47	21,2	39,62	
		DTIC	292,2	0,55	0,99					13,12	34,04	88,29	168,84	
		WT-161	6,54	0,84	0,99					12,19	17,36	22,84	27,53	
		DTIC + WT-161	22,26	1,07	0,97	0,15	0,08	0,05	0,04					
		DTIC→WT-161	DTIC	292,2	0,55	0,99					9,41	10,99	13,25	15,04
			WT-161	6,54	0,84	0,99					9,17	5,6	3,42	2,45
	WT-161→DTIC	DTIC→WT-161	32,02	0,61	0,99	0,21	0,26	0,36	0,47					
		DTIC	292,2	0,55	0,99					5,13	20,1	67,4	91,3	
		WT-161	6,54	0,84	0,99					9,56	7,21	3,24	2,98	
	WM1366	TMZ + WT-161	WT-161→DTIC	312,2	0,71	0,98	0,35	0,67	0,87	0,92				
TMZ			2805,9	0,91	0,99					5,82	12,43	26,55	44,47	
WT-161			33,03	1,19	0,99					5,66	9,9	15,9	22,07	
TMZ→WT-161		TMZ + WT-161	481,62	2,49	0,99	0,33	0,18	0,1	0,06					
		TMZ	2805,9	0,91	0,99					4,27	5,83	7,96	9,84	
		WT-161	33,03	1,19	0,99					4,52	4,65	4,79	4,88	
WT-161→TMZ		TMZ→WT-161	656,6	1,23	0,99	0,45	0,38	0,33	0,3					
		TMZ	2805,9	0,91	0,99					2,39	3,13	4,12	4,95	
		WT-161	33,03	1,19	0,99					2,53	2,5	2,47	2,46	
			WT-161→TMZ	1173,1	1,18	0,98	0,81	0,71	0,64	0,6				

Tabela 04: Exposição dos parâmetros, CI e resposta a dose terapêutica DRI, nos tratamentos de combinação de TMZ + WT-161, TMZ WT-161 e WT-161 TMZ, nas linhagens celulares de CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366

(Continuação)

Linhagem Celular	Estratégia de combinação	Drogas e combinações (razão constante)	Parâmetros			Valores de C.I em				Valores de DRI em			
			<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>R</i>	ED50	ED75	ED90	ED95	ED50	ED75	ED90	ED95
WM1366	DTIC + WT-161	DTIC	1332,2	1,79	0,98					9,6	11,79	14,02	15,75
		WT-161	12,82	1,72	0,97					8,47	10,34	12,62	14,45
		DTIC + WT-161	140	2,5	0,99	0,21	0,18	0,18	0,15				
	DTIC→WT-161	DTIC	1332,2	1,79	0,98					4,2	3,34	2,53	2,09
		WT-161	12,82	1,72	0,97					3,78	2,93	2,28	1,92
		DTIC→WT-161	313,77	1,23	0,98	0,49	0,63	0,83	0,99				
	WT-161→DTIC	DTIC	1332,2	1,79	0,98					6,77	4,76	3,34	2,63
		WT-161	12,82	1,72	0,97					6,15	4,17	3,02	2,41
		DTIC→TMZ	204,84	1,13	0,99	0,32	0,44	0,63	0,79				

Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: Apresenta-se em **negrito** os valores de CI < 1 e valores de DRI > 1, os quais indicam efeito sinérgico com uma consequente redução referida nas frações afetadas ED50, ED75, ED 90 e ED95. Dm, m e r representam a dose de IC50, inclinação da curva obtida (slope) e o coeficiente de correlação linear (conformidade da curva), respectivamente.

5.5 A COMBINAÇÃO SIMULTÂNEA DE TEMOZOLOMIDA E WT-161 IMPACTA NO DESENVOLVIMENTO DE ESFERÓIDES.

Após avaliarmos a combinação de fármaco e composto no cultivo 2D observamos que a combinação de TMZ e WT-161 apresentou pontos de combinação sinérgicos em todas linhagens, por essa razão a análise desta combinação foi avaliada no cultivo 3D.

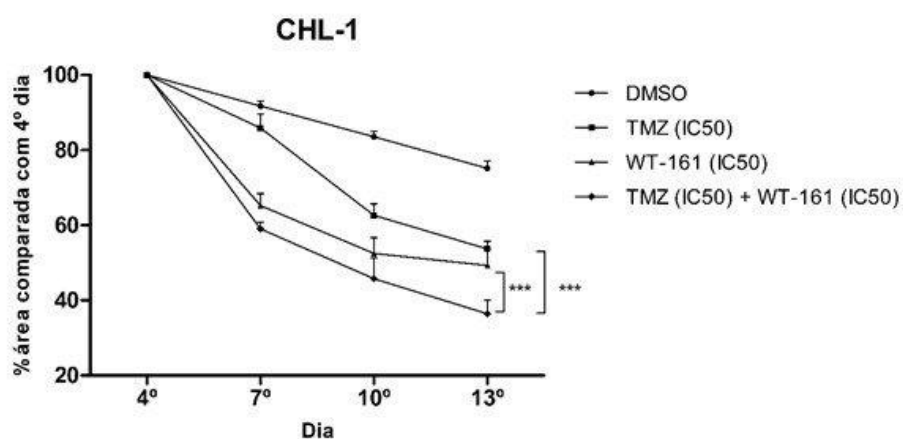
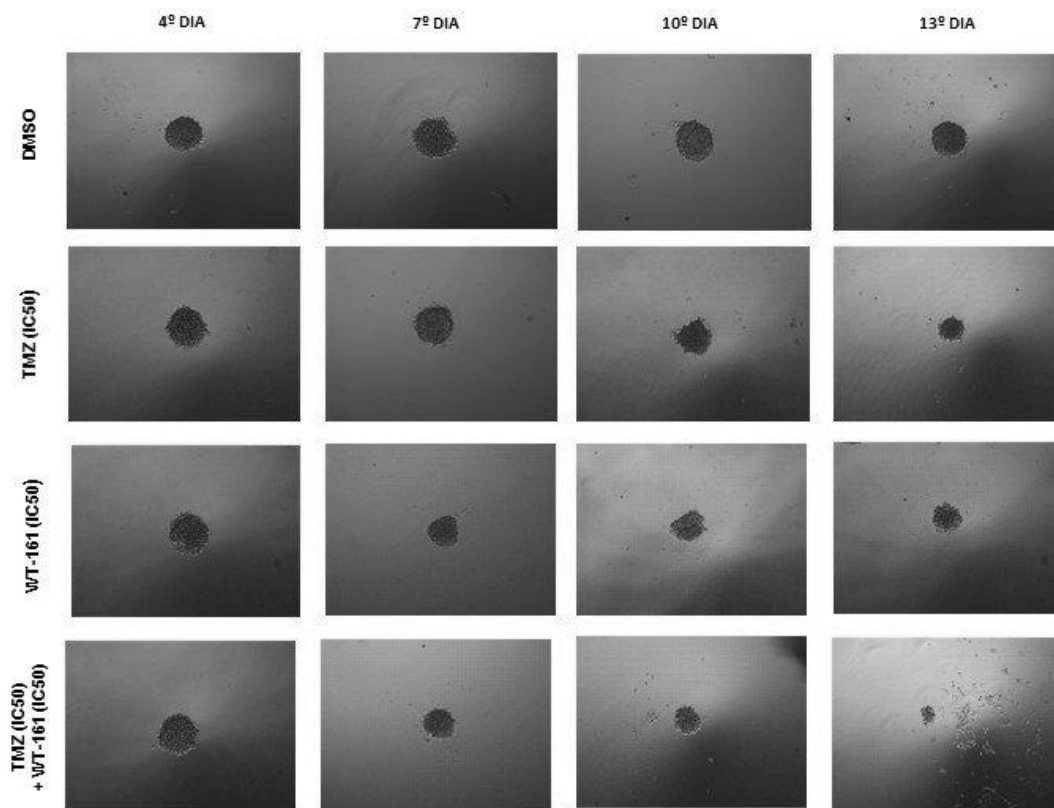
As linhagens CHL-1 (Figura 10) e WM1366 (Figura 11) foram cultivadas seguindo os detalhamentos que estão descritos no tópico materiais e métodos. No quarto dia, com o esferóide formado, foi realizado o tratamento com TMZ e WT-161 de forma isolada e sua combinação simultânea. As dosagens utilizadas para o tratamento foram os IC50 das linhagens estudadas.

Ao término do tratamento, observou-se que as drogas isoladas foram capazes de diminuir a área isolada dos esferóides CHL-1, além disso, a combinação TMZ + WT-161 foi capaz de diminuir o crescimento de maneira significativa ($p > 0,0001$) quando comparado com o tratamento de TMZ e WT-161 isolados.

Por outro lado, os esferóides WM1366 apresentaram um modo de crescimento diferente, pois após o início do tratamento observou-se um aumento do crescimento do esferóide durante todos os dias de observação, tanto no grupo controle (DMSO), quanto no grupo tratado com TMZ, demonstrando assim resistência intrínseca ao fármaco. Já o grupo tratado com WT-161 apresentou um aumento do volume somente até o 6º dia de tratamento, momento no qual o tamanho do esferóide WM1366 diminuiu gradualmente o seu tamanho. No entanto, a área dos esferóides tratados com a combinação TMZ + WT-161 apresentaram uma significativa diminuição do crescimento após o 3º dia de tratamento (7º dia de iniciado o experimento). No 9º dia de tratamento (13º dia de iniciado o experimento) havia uma forte diferença significativa ($p > 0,0001$) entre a combinação de TMZ e WT-161 e sua ação isolada, como evidenciado na Figura 11.

A linhagem SK-MEL-147 não formou esferóides manipuláveis.

Figura 10: Imagens representativas e curvas de crescimento dos esferóides de CHL-1 avaliada durante 9 dias depois do tratamento com DMSO, TMZ e WT-161 sozinho ou em combinação com TMZ

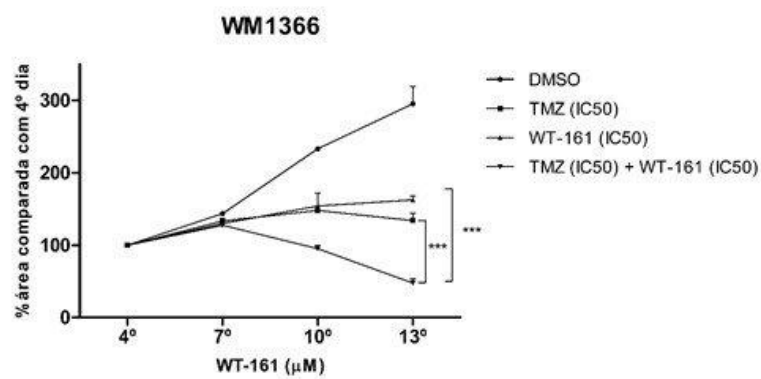
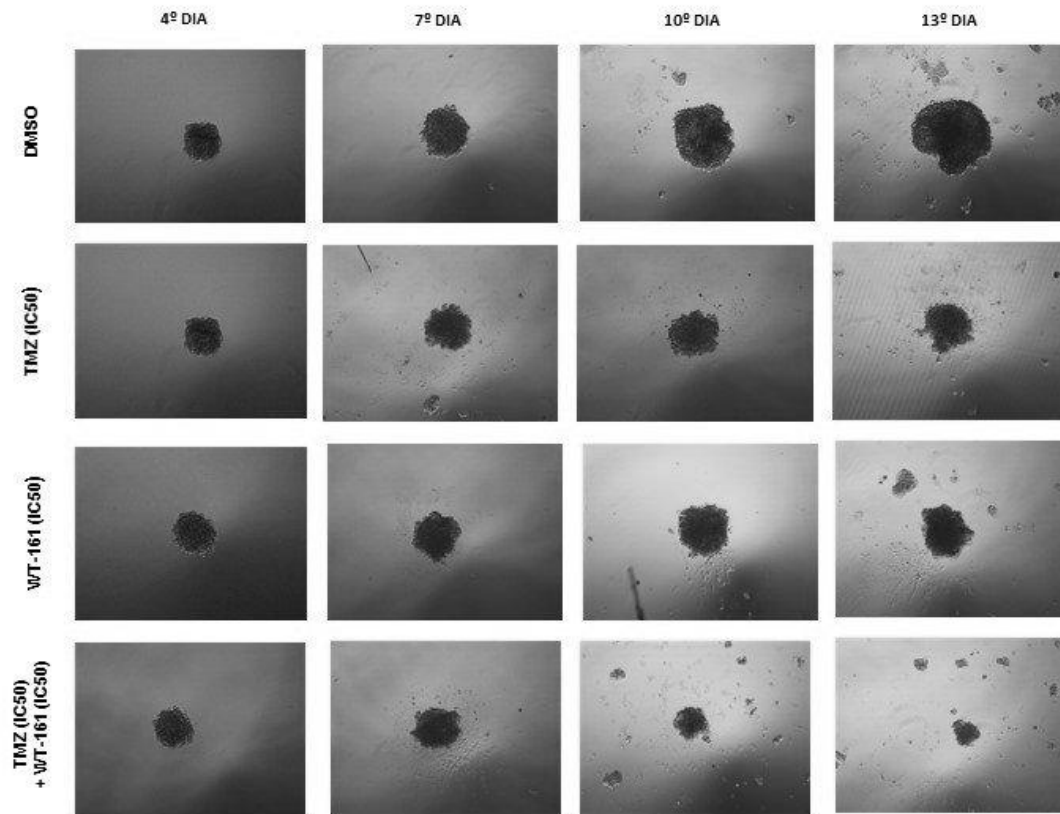


Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: Os pontos representam a média da área coberta pelos esferóides (n=8).

*** $p < 0,0001$, ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

Figura 11: Imagens representativas e curvas de crescimento dos esferóides de WM1366 avaliada durante 9 dias depois do tratamento com DMSO, TMZ e WT-161 sozinho ou em combinação com TMZ



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: Os pontos representam a média da área coberta pelos esferóides (n=8).

*** $p < 0,0001$, ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

5.6 A INIBIÇÃO DE HDAC6 REDUZ A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.

Após avaliar a viabilidade celular e a combinação entre os fármacos com o composto WT-161, foi averiguado se em um contexto de estabelecimento de colônias tumorais, o inibidor WT-161 seria capaz de impedir o desenvolvimento proliferativo e capacidade das linhagens de formar colônias. Sob essa perspectiva as células foram tratadas com concentrações escalares de WT-161 (3, 4, 5, 6 e 7 μM) para as linhagens CHL-1 e WM1366. Para a linhagem SK-MEL-147 as concentrações utilizadas foram menores (1, 2, 3, 4 e 5 μM) devido à sua maior sensibilidade ao WT-161 para estabelecer e formar colônias. Os valores de tratamentos foram estabelecidos por meio de ensaios prévios, onde se objetivou a tratar as linhagens em concentrações em que em todos tratamentos se obteria resultados capazes de serem analisados estatisticamente.

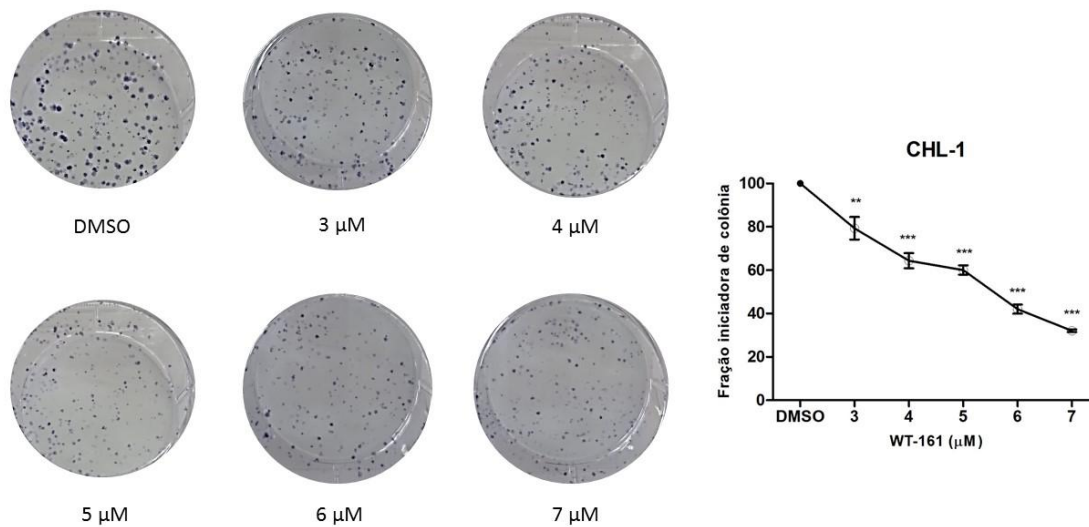
Observou-se que o WT-161 diminui significativamente a capacidade de formação de colônias de todas as células estudadas (Figuras 12, 13 e 14). Sendo a linhagem mais sensível a SK-MEL-147, IC50 clonogênico: $1,93 \pm 0,11$, já a CHL-1, IC50 clonogênico: $5,34 \pm 0,29$, se apresentou como a linhagem mais resistente (Tabela 05).

Tabela 05: IC50 clonogênico das linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 quando tratadas com WT-161.

IC 50 clonogênico WT-161 (μM)		
CHL-1	SK-MEL-147	WM1366
$5,34 \pm 0,29 \mu\text{M}$	$1,93 \pm 0,11 \mu\text{M}$	$3,17 \pm 0,07 \mu\text{M}$

Fonte: Dados da pesquisa (2022).

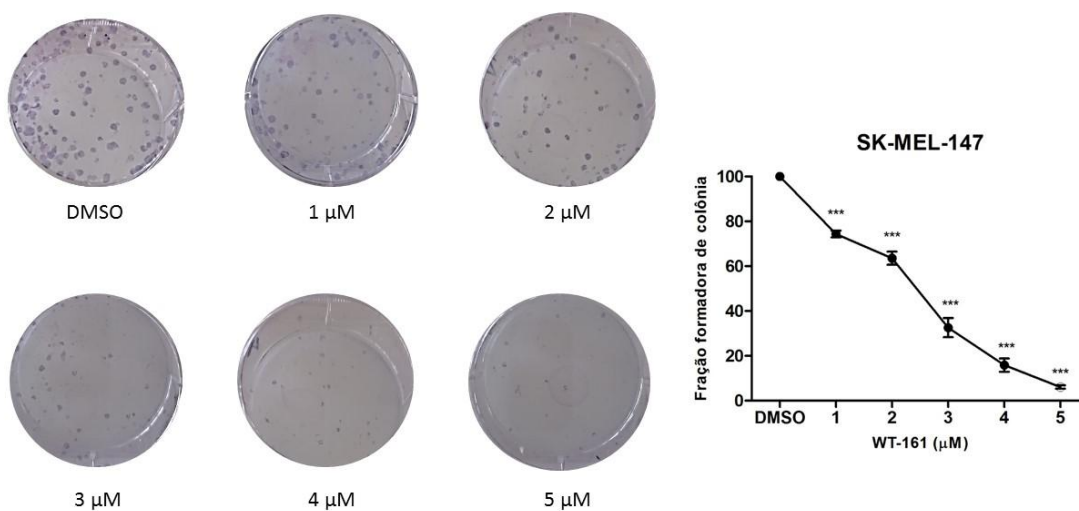
Figura 12: Impacto na formação de colônias na linhagem CHL-1, após o tratamento com WT-161.



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ quando comparados com o controle DMSO. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

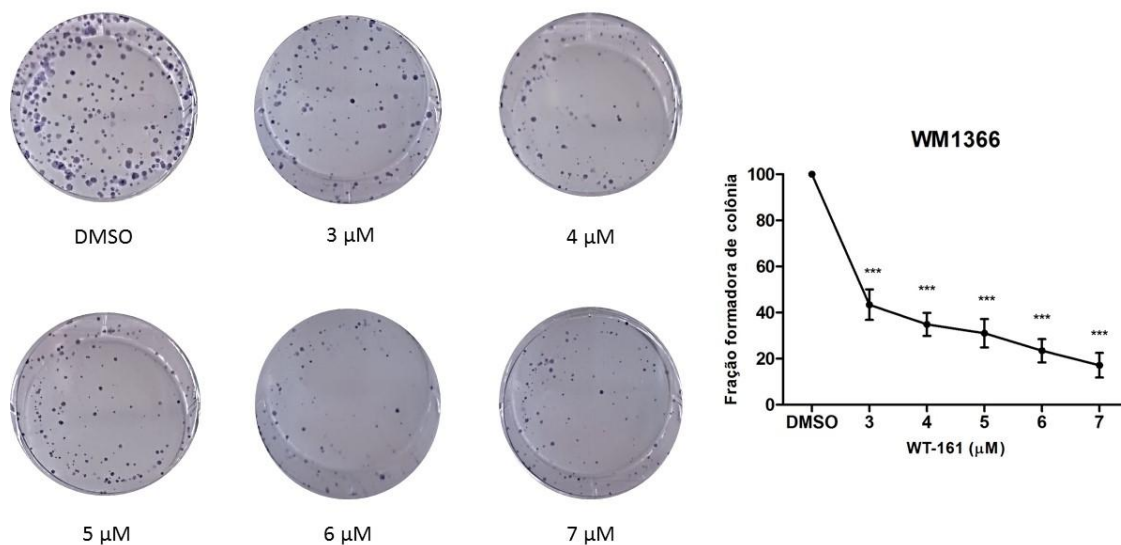
Figura 13: Impacto na formação de colônias na linhagem SK-MEL-147, após o tratamento com WT-161



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: *** $p < 0,0001$ quando comparados com o controle DMSO. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

Figura 14: Impacto na formação de colônias na linhagem WM1366, após o tratamento com WT-161.



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: *** $p < 0,0001$ quando comparados com o controle DMSO. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

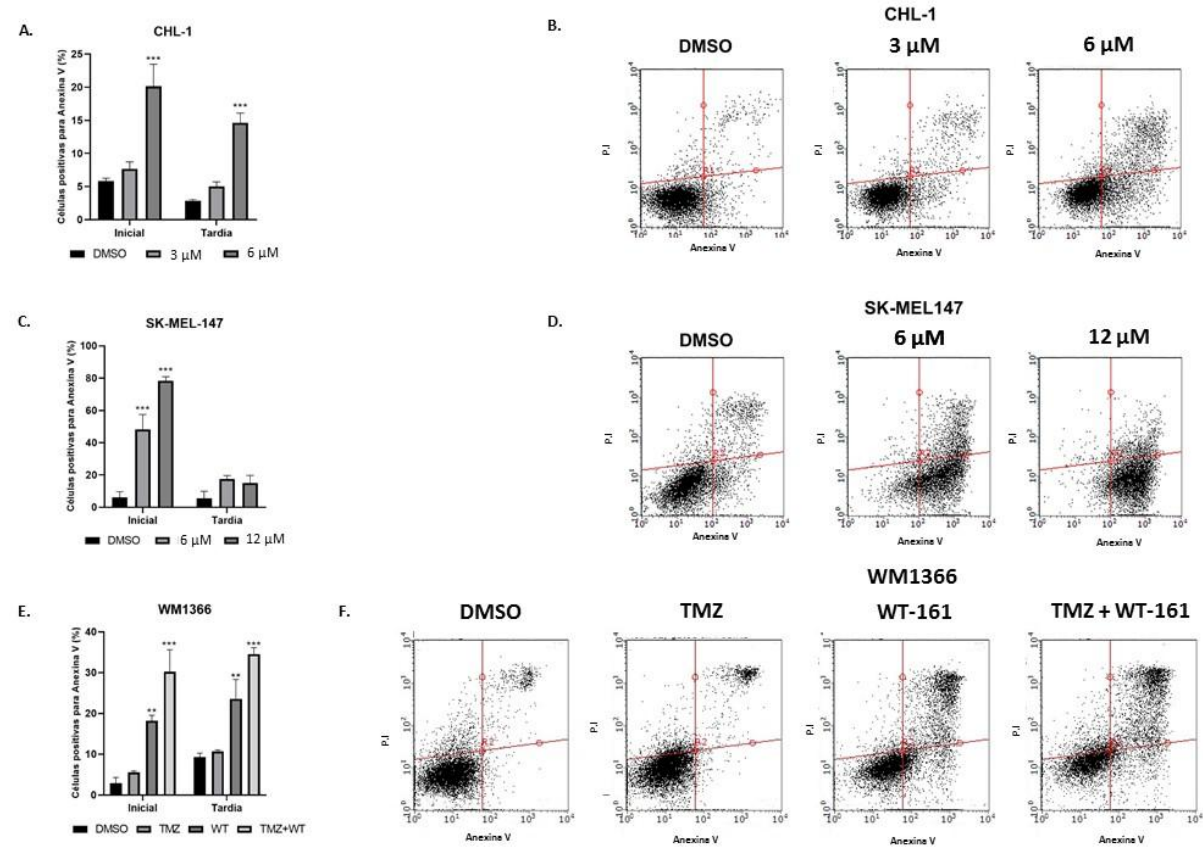
5.7 A INIBIÇÃO DE HDAC6 AUMENTA A POPULAÇÃO APOPTÓTICA

Após se verificar que a viabilidade celular decai de maneira dose-dependente, foi estudado se o WT-161 teria a capacidade de induzir apoptose nas linhagens celulares de melanoma.

Para esse objetivo, primeiro foi avaliado o aumento da externalização da fosfatidilserina por meio da marcação com Anexina V. Visando este objetivo as linhagens celulares CHL-1 e SK-MEL-147 foram tratadas com o WT-161, de modo isolado, na dose do seu respectivo IC50 (6 μM e 12 μM) e metade do seu IC50 (3 μM e 6 μM). A linhagem WM1366, por apresentar um melhor resultado na combinação de TMZ e WT-161, foi avaliada frente a combinação simultânea e ação isolada de TMZ e WT-161, sendo as concentrações de 180 μM de TMZ e 2 μM de WT-161.

Como resultado, foi observado que as linhagens CHL-1 e SK-MEL-147, apresentaram um aumento da população marcada com Anexina V nos tratamentos com WT-161 (Figura 15 A, B, C e D). WM1366 apresentou um aumento da população marcada com Anexina V, quando comparada com os tratamentos isolado e com o controle (Figura 15 E e F).

Figura 15: WT-161 induz apoptose de maneira dose dependente em linhagens de melanoma



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: Células apoptóticas foram identificadas por citometria de fluxo após o tratamento de 48 horas

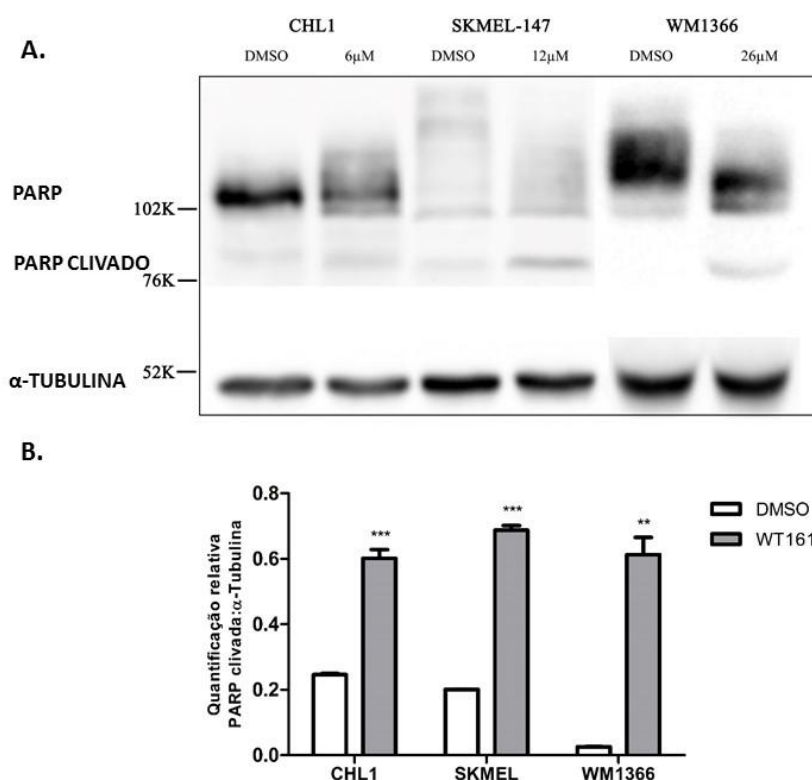
A, C e E - Células apoptóticas nas linhagens CHL1, SK-MEL-147 e WM1366, respectivamente

B, D - Histograma referente ao tratamento com WT-161 na linhagem CHL-1 e SK-MEL-147.

F - Histograma referente à combinação (WT-161 + TMZ) na linhagem WM1366

Após a análise e confirmação do aumento da concentração de população que expressam o fosfatidilserina após o tratamento, foi realizada a análise da concentração de PARP clivado. Após o tratamento com WT-161 as linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366 obtiveram um aumento da concentração de PARP clivado (Figura 16)

Figura 16: WT-161 aumenta significativamente a concentração de PARP clivado nas linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366.



Fonte : Dados da pesquisa (2022)

Legenda: α -Tubulina foi usada como controle endógeno. ** p < 0,001; ***p < 0,0001, Teste *t* de Student.

A - Western blot de PARP clivado (89 kDa)

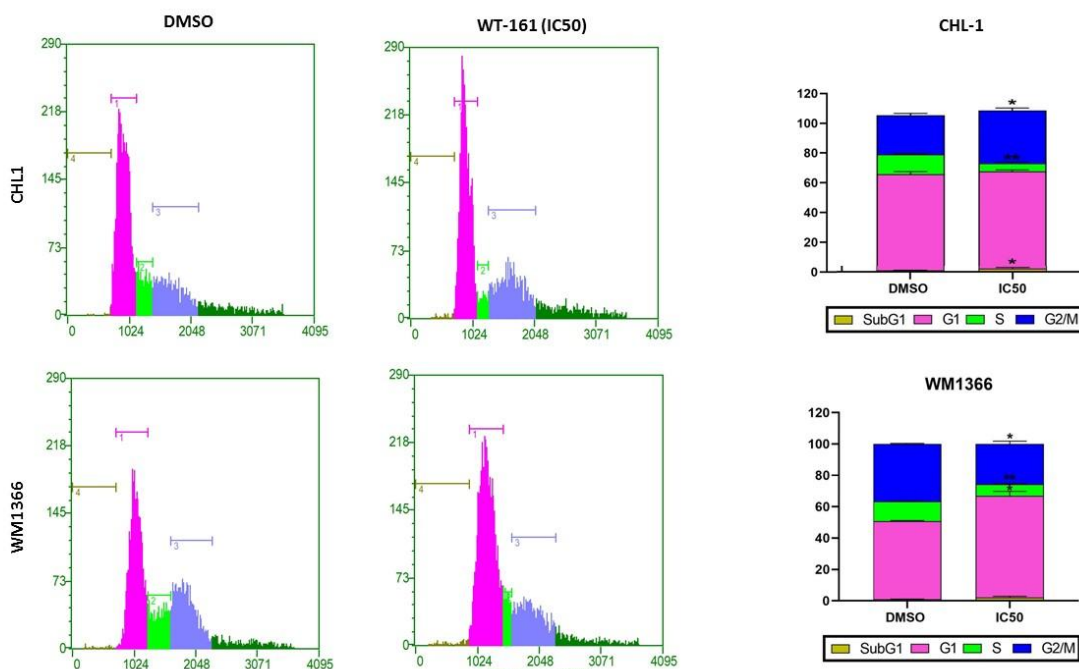
B- . Representação gráfica do resultado do western blot .

5.8 WT-161 INDUZ PARADA NO CICLO CELULAR.

Neste estudo as linhagem celular CHL-1 e WM1366 foram tratadas com WT-161 na dose do seu respectivo IC50 (6 μ M, 26 μ M). Foram avaliados os efeitos de WT-161 sobre o ciclo celular das linhagens de melanoma. Como demonstra a Figura 17,

WT-161 induziu um pequeno, mas significativo, incremento no número de células em fase G1/G0 nas linhagens CHL-1 e WM1366.

Figura 17: WT-161 induz arraste no ciclo G0/G1 maneira dose dependente em linhagens de melanoma.



Fonte : Dados da pesquisa (2022)

Legenda: Células tiveram um aumento na população para no ciclo celular na fase G0/G1.

O gráfico demonstra a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$, ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

5.9 WT-161 INIBE A MIGRAÇÃO CELULAR

Após constatar que WT-161 diminui a viabilidade e a proliferação celular, e aumenta a apoptose, nossa pesquisa foi direcionada para averiguar o impacto de WT-161 nas linhagens de melanoma (CHL-1, SK-MEL-147, WM1366) frente a propriedades associadas a motilidade celular, tais como migração, adesão e invasão celular. Inicialmente, foi avaliado se a inibição específica de HDAC6 era capaz de inibir a migração celular.

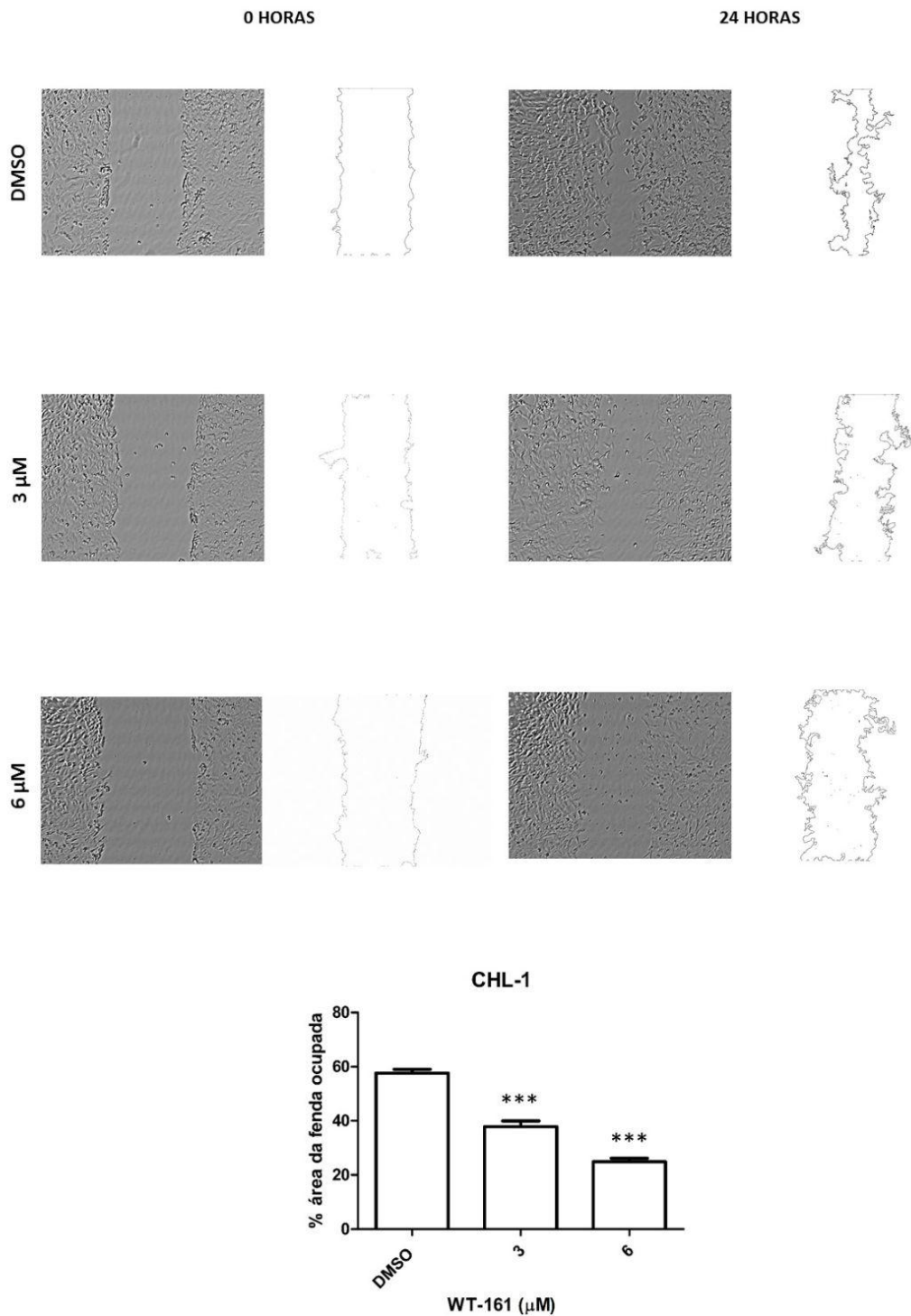
Para esse fim, as linhagens foram cultivadas e submetidas à técnica de migração por cicatrização de ferida ou arranhão para depois serem tratadas com WT-161 nas

concentrações de 3 μM e 6 μM , e avaliadas no período de 0 horas e 24 horas. A análise do ensaio foi feita pela medição da área da ferida.

Observou-se que a linhagem CHL-1 (Figura 18), após 24 horas de tratamento com 6 μM WT-161, teve uma redução de $44,25\% \pm 2,20$ da migração celular. Já a linhagem SK-MEL-147 (Figura 19), apresentou uma redução de até $60,77\% \pm 2,20$.

A linhagem WM1366 não apresentou uma capacidade migratória suficiente nas células controle para a realização de teste de migração celular.

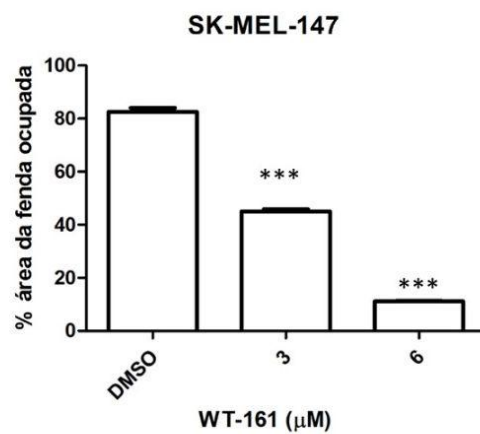
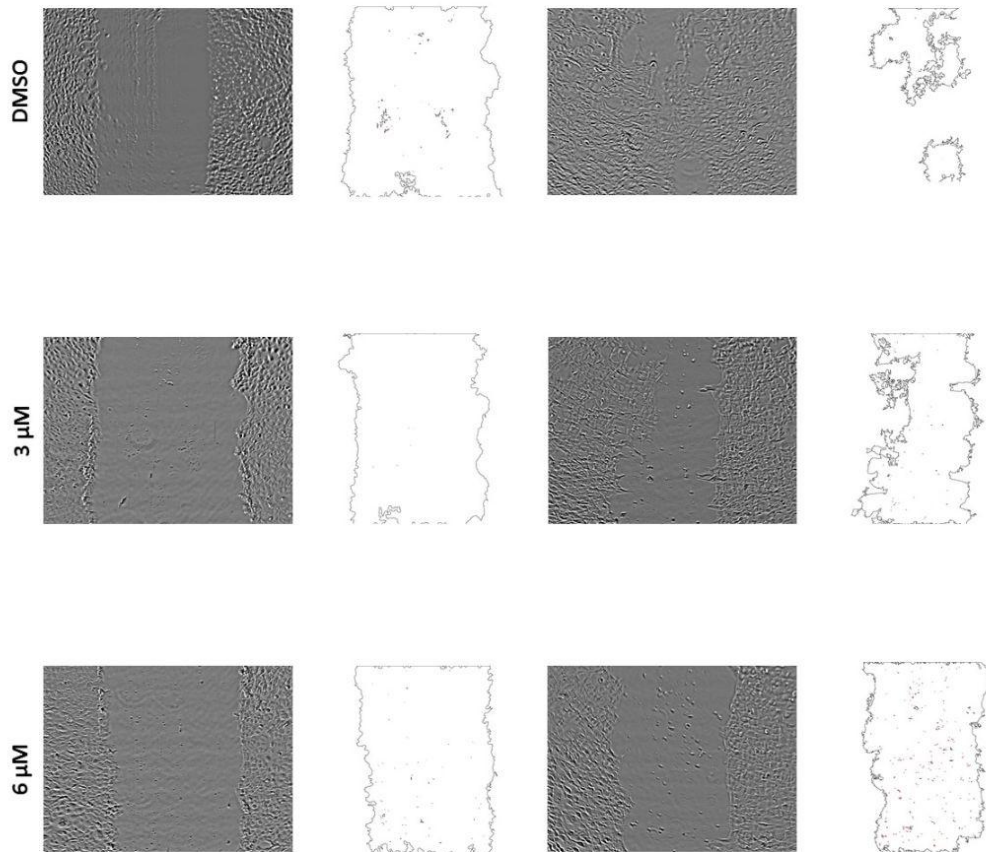
Figura 18: WT-161 inibe a migração na linhagem CHL-1.



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: A capacidade migratória foi mensurada pela área da fenda. *** $p < 0,0001$ quando comparados com o controle DMSO. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

Figura 19: WT-161 inibe a migração na linhagem CHL-1.



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

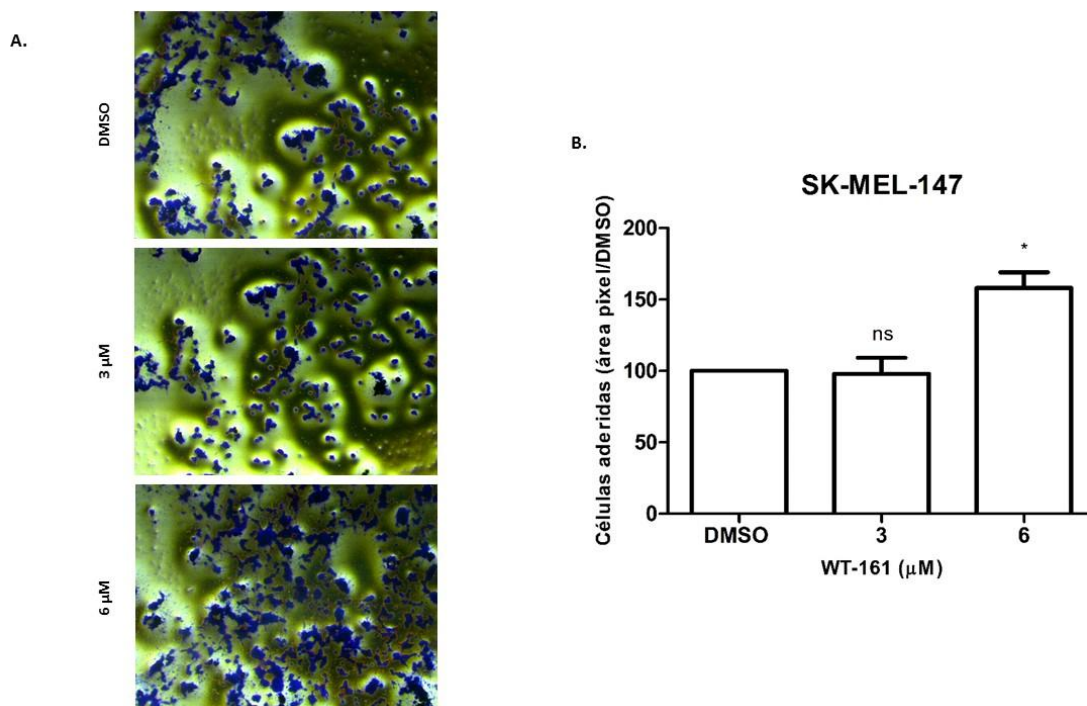
Legenda: A capacidade migratória foi mensurada pela área da fenda. *** $p < 0,0001$ quando comparados com o controle DMSO. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

5.10 WT-161 AUMENTA A ADESÃO CELULAR

Após constatar que WT-161 inibe a migração celular, confirmamos o resultado da migração celular com o ensaio de adesão celular. Para esse objetivo, as células que demonstraram capacidade de migrar dentro da metodologia de cicatrização de ferida, CHL-1 e SK-MEL-147, foram semeadas, junto com o tratamento de WT-161 (3 μM e 6 μM), na concentração de $5,0 \times 10^4$ células por $100 \mu\text{L}$ em placas de 96 poços.

Terminado o tempo de adesão, 6 horas, foi constatado que quando comparado com o controle, a linhagem SK-MEL-147 apresentou um aumento de 51,7 % na adesão celular com tratamento de 6 μM (Figura 20). A linhagem CHL-1 não apresentou aumento significativo de adesão celular no tratamento de WT-161, quando comparado ao controle.

Figura 20: WT-161 aumenta a adesão celular na linhagem SK-MEL-147.



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

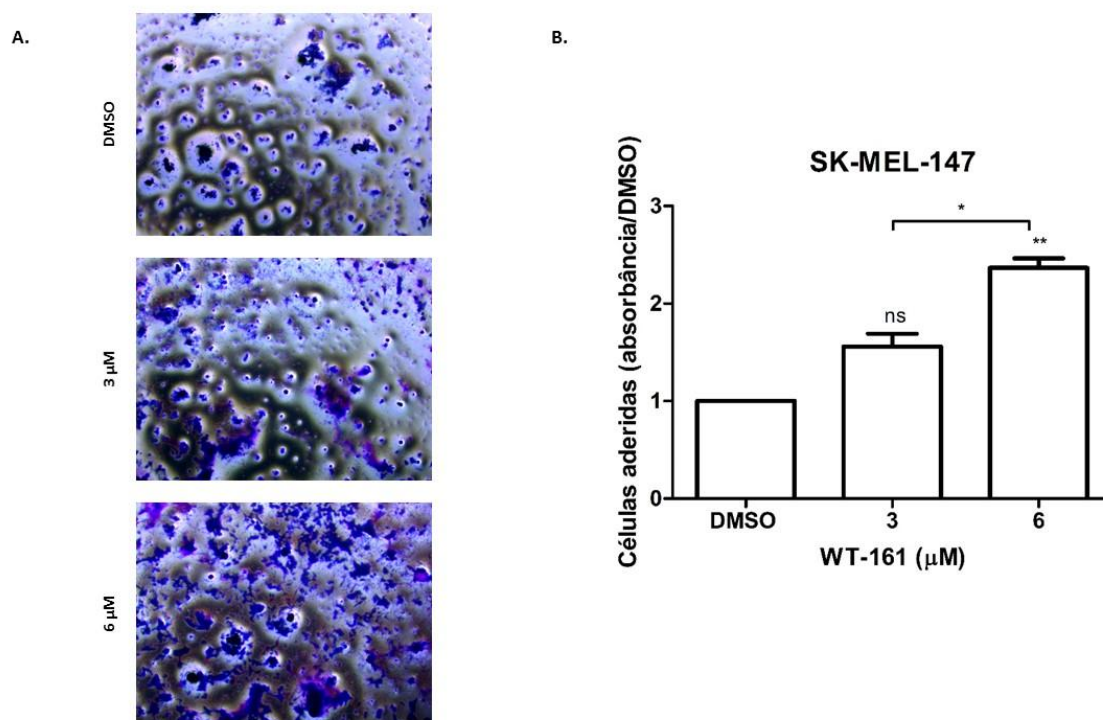
Legenda: O resultado da leitura da absorvância foi similar ao do Pixel. * $p < 0,05$, quando comparados com o controle DMSO. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

A - Representação fotográfica da adesão celular

B - Quantificação (área pixel/DMSO) das células aderidas

Com o intuito de avaliar a adesão com a presença de uma matriz que mimetiza um suporte de ancoragem biológico para a célula, as células foram semeadas sobre uma preparação de matrix basal, Geltrex, como descrito na Seção Material e Métodos. Após o tempo de 6 horas, foi constatado que quando comparado com o controle a linhagem SK-MEL-147 apresentou um aumento de 112,3 % na adesão celular com tratamento de 6 μM (Figura 21). Já a linhagem CHL-1, quando semeada sobre o Geltrex apresentou um aumento de 48,7% na adesão celular no tratamento de WT-161 em 6 μM (Figura 22).

Figura 21: WT-161 aumenta a adesão celular na linhagem SK-MEL-147, semeadas sobre Geltrex



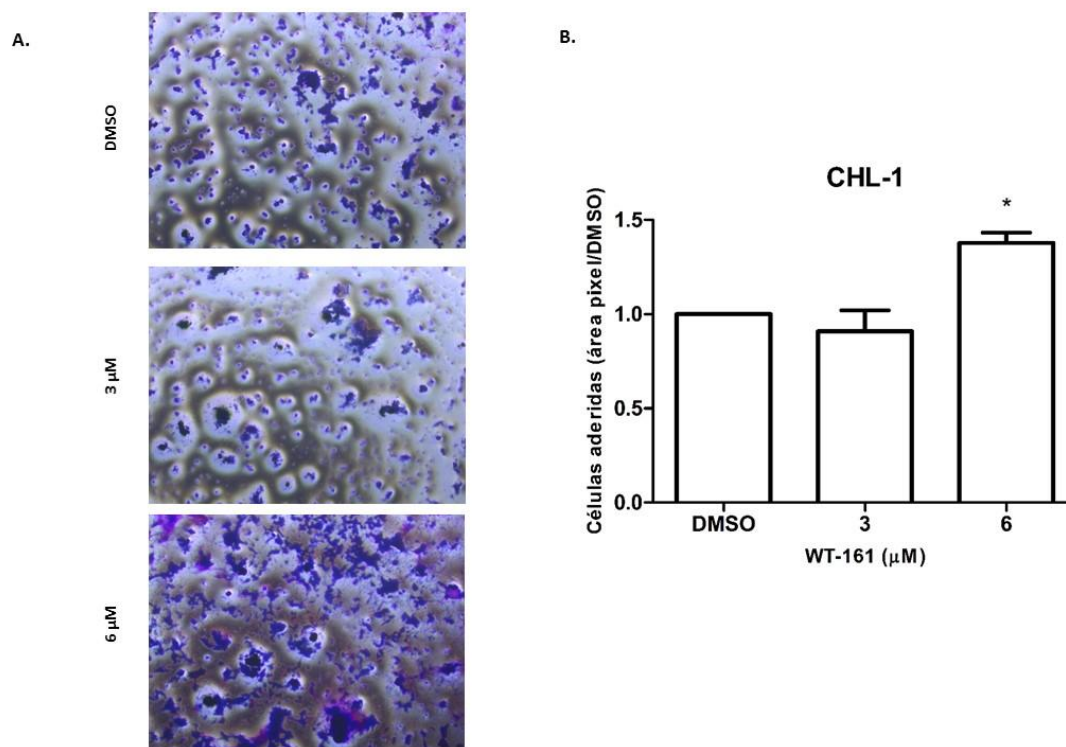
Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: O resultado da leitura da absorbância foi similar ao do Pixel. * $p < 0,05$, quando comparados com o controle DMSO. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

A - Representação fotográfica da adesão celular.

B - Quantificação (área pixel/DMSO) das células aderidas.

Figura 22: WT-161 aumenta a adesão celular na linhagem CHL-1, semeadas sobre Geltrex.



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: O resultado da leitura da absorbância foi similar ao do Pixel. * $p < 0,05$, quando comparados com o controle DMSO. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

A - Representação fotográfica da adesão celular.

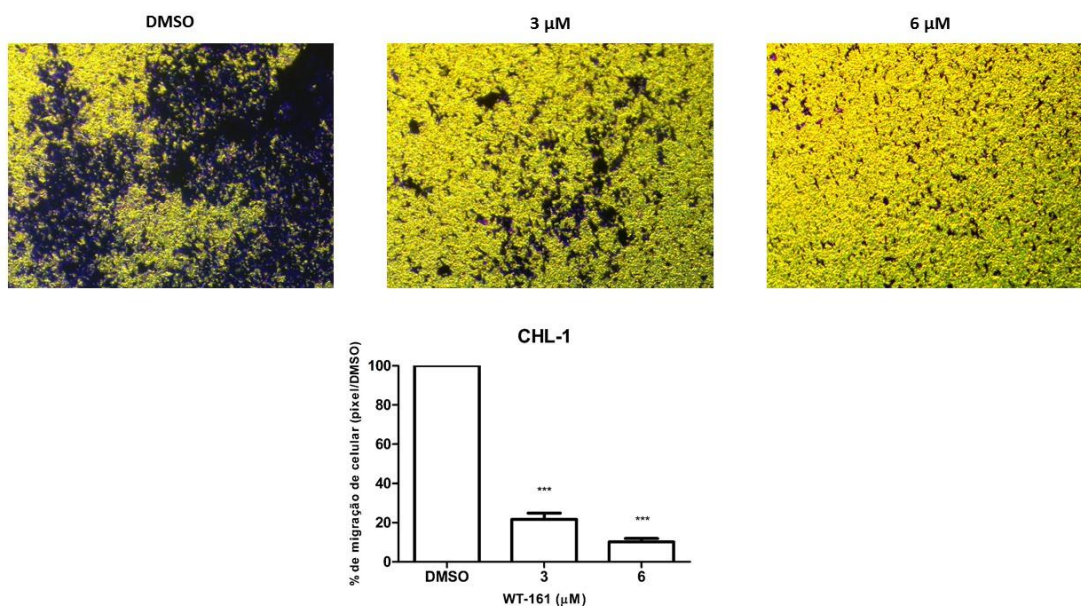
B - Quantificação (área pixel/DMSO) das células aderidas.

5.11 WT-161 INIBE A INVASÃO CELULAR

Depois de demonstrarmos que WT-161 atua inibindo a migração celular e aumentando a adesão celular, o estudo de progressão tumoral foi ampliado para a avaliação da capacidade invasiva.

Para essa finalidade, uma suspensão celular de $1,5 \times 10^5$ da linhagem CHL-1 em meio de cultivo sem soro bovino fetal, pré tratadas por 30 minutos com WT-161 (3 μM e 6 μM), em uma Membrana Transwell, a qual estava previamente revestidas com Geltrex, a câmara inferior foi preenchida com 500ml de meio de crescimento contendo FBS, que serviu como quimioatraente. Foi observado que WT-161 inibiu a migração celular de CHL-1 de maneira dose dependente (Figura 23)

Figura 23: WT-161 diminui a invasão celular na linhagem CHL-1



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

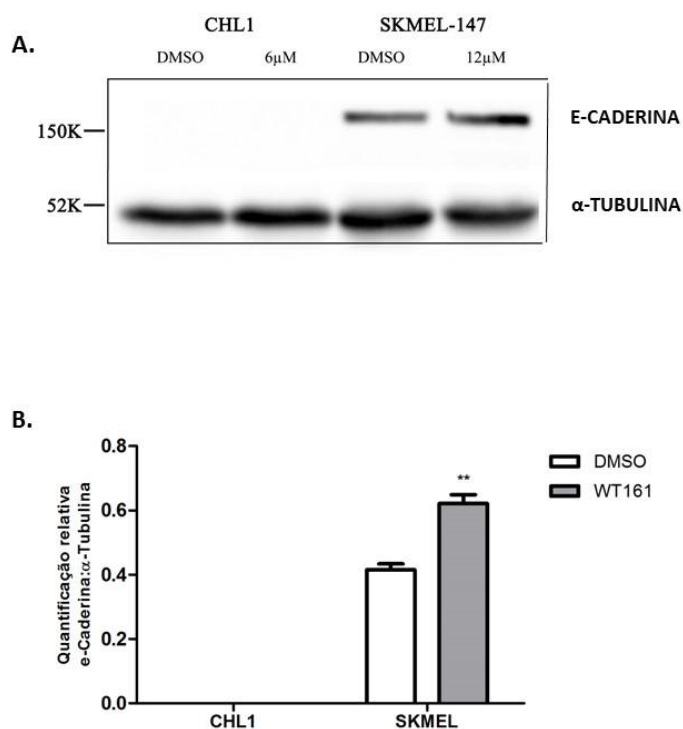
Legenda: *** $p < 0,001$, quando comparados com o controle DMSO. ANOVA seguida por teste de Bonferroni.

5.12 INIBIÇÃO DE HDAC6 AUMENTA A EXPRESSÃO DE E-CADERINA

Após constatarmos que o WT-161 afeta a migração, adesão e invasão celular, foi necessário avaliar as variações da expressão de proteínas de interesse biológico para os processos celulares investigados até aqui, tal como E-caderina. Uma das proteínas de interesse na EMT

Para esse objetivo as linhagens que apresentaram características migratórias e invasivas, CHL-1 e SK-MEL-147, foram tratadas com os respectivos IC50 de WT-161, por um período de 48 horas. Observamos que após o tratamento com WT-161 a linhagem SK-MEL-147 apresentou um aumento de expressão de E-caderina. No entanto, não houve expressão desta proteína na linhagem CHL-1 (Figura 24).

Figura 24: WT-161 aumenta a concentração de E-caderina nas linhagens CHL-1 e SK-MEL-147



Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Legenda: α -Tubulina foi usada como controle endógeno. ** $p < 0,001$, Teste *t* de Student.

A - Western blot de E-caderina (135 kDa)

B - Representação gráfica do resultado do western blot E-caderina.

6 DISCUSSÃO

O melanoma é um tumor que surge dos melanócitos, epidemiologicamente é considerado uma doença rara, contudo, trata-se de uma malignidade com altos índices de mortalidade, correspondendo a 75% dos casos de óbitos por câncer de pele (DAVIS, SAHLIN, SHALIN, TACKETT, 2019). A gênese e a progressão tumoral do melanoma ocorrem a partir de complexos e intrincados caminhos de sinalização, os quais atuam controlando a proliferação celular e a habilidade para evadir de mecanismos de morte celular. As causas deste comportamento podem incluir alterações na sequência de DNA, alterações cromossômicas, modificações na expressão gênica e regulação epigenética (SARKAR *et.al.*, 2015).

Fatores epigenéticos estão envolvidos no processo de desenvolvimento tumoral. Ao analisarmos os dados da plataforma UALCAN, observamos que quanto maior o grau de malignidade, ou seja quanto mais progredido o tumor, maior é a expressão da proteína HDAC6.

O dado obtido é condizente com o que é relatado experimentalmente em literatura. LIU e colaboradores em 2016, ao testar níveis de expressão proteica e níveis de mRNA de HDAC6 em linhagens de melanoma (M257, SK-MEL-28, A375 e A2058), observaram níveis aumentados de mRNA de 30 ± 3 até 78 ± 19 vezes, dependendo da linhagem, quando comparado com os níveis de mRNA de células HaCat. Quanto à análise do nível da expressão protéica, houve um aumento significativo da expressão de HDAC6 em linhagens celulares de melanoma quando comparado com HaCat.

Em outro estudo promovido por Bai e colaboradores em 2015, foi evidenciado que, ao analisar a expressão de HDAC6 em 23 fragmentos de melanoma por meio da técnica de Western blot, foi encontrado que a expressão proteica de HDAC6 é significativamente alta ($p > 0,001$) nos tecidos de melanoma quando comparados com os tecidos adjacentes e com tecidos de câncer de pele não melanômico. Quando os níveis de HDAC6, em expressão proteica e mRNA, foram avaliados em linhagens celulares de melanoma (A375.S2, SK-MEL-28 e HT-144), observou-se uma alta expressão quando comparado com a expressão em células de epitélio normal (HaCat) e melanócitos humanos normais (PIG1), respectivamente. No nosso estudo *in silico*, os altos níveis de expressão gênica de HDAC6 encontrados em amostras metastáticas quando comparadas a melanoma *in situ*, reforçam a importância deste biomarcador

como um elemento importante na intrincada complexidade genética do melanoma, e nos permite apontá-lo como um importante alvo terapêutico relacionado com a progressão neoplásica.

Uma segunda constatação em nossa análise *in silico* é que amostras com mutação no gene TP53 apresentam um aumento de expressão de HDAC6 em comparação com amostras não mutantes.

Em um estudo realizado por Li e colaboradores (2011), foi mostrado que SAHA um inibidor de HDAC exibe preferencial citotoxicidade para células com p53 mutante. O estudo também demonstrou SAHA como um inibidor subjacente para HDAC6, o qual é um importante regulador positivo de HSP90, permitindo assim a liberação de p53 mutado e permite a sua degradação.

Embasados no nosso estudo e com a literatura conduzimos o estudo inédito do inibidor de HDAC6, a molécula WT-161, em linhagens celulares de melanoma.

6.1 WT-161 INIBE SELETIVAMENTE HDAC6 E QUIMIOTERÁPICOS TMZ E DTIC DIMINUEM A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA

Nesta primeira etapa do estudo, fizemos um *screening* das linhagens de melanoma frente ao tratamento isolado do composto WT-161 e fármacos TMZ e DTIC. Esse *screening* inicial serviu de base para elucidar a resposta celular isolada à atividade inibidor seletivo de HDAC6, WT-161, além de avaliar a capacidade citotóxica de TMZ e DTIC, ambos quimioterápicos utilizados convencionalmente no tratamento antimelanoma.

WT-161 reduziu a viabilidade de células de melanoma de maneira tempo e dose-dependente. Outros estudos têm demonstrado o impacto de WT-161 sobre a viabilidade de células cancerosas, tais como osteossarcoma (SUN *et.al.*, 2021), câncer de mama (HIDESHIMA *et.al.*, 2021) retinoblastoma (SUN *et.al.*, 2019), osteossarcoma (YU *et.al.*, 2022) e mieloma múltiplo (GARCÍA-GUERREIRO). Nossos estudos têm demonstrado de forma inédita, os efeitos celulares e moleculares de WT-161 inibindo seletivamente HDAC6, como demonstrado pelo aumento de concentração de alfa-tubulina acetilada (Lisina-40), alvo de acetilação de HDAC6 (ZHANG et al, 2003).

Além disso, observou-se que entre a linhagem celular CHL-1 obteve o menor IC50 entre as linhagens de melanoma estudadas. Cabe destacar que as células CHL-1, a diferença das outras linhagens, possuem mutação no gene *MAPK3*.

Como abordado por WU e colaboradores (2018), MAPK3, também denominada de ERK1, interage diretamente com HDAC6, fosforilando HDAC6 em Ser-1035. Também foi constatado que a inibição de HDAC6 promove um aumento da acetilação de ERK1. A situação de interação entre ambas foi demonstrada tanto *in vitro* e *in vivo*. O respectivo estudo também demonstrou que o aumento da acetilação de ERK1, promovido pela inibição da HDAC6, reduz a atividade enzimática de ERK1.

Os achados evidenciados por Wu (2018) foram previamente evidenciados por Williams (2013), os quais demonstraram que a fosforilação da Ser-1035 na HDAC6 ativa RAS, Raf e MEK.

Considerando essas informações, podemos hipotetizar que a interrupção desta dupla interação, ERK1 (MAPK3) com HDAC6, causa uma redução muito mais significativa sobre a viabilidade celular, do que outros cenários, como observado na comparação das curvas de dose-resposta frente ao fármaco WT-161 sobre as células CHL-1 e as outras células de melanoma testadas.

De um modo concordante, a inibição de HDAC6, realizada através de outros inibidores ou utilizando estratégias de silenciamento gênico, promoveu também um declínio da viabilidade celular em melanoma, como demonstrado pelos estudos de Laino (2019), Liu (2016), Balliu (2015), Bai (2015).

Dando continuidade com a avaliação citotóxica de fármacos importantes na terapia anti-melanoma, foi verificado que a TMZ e a DTIC diminuíram significativamente a viabilidade das células estudadas. Desde há muito anos, estudos clínicos têm demonstrado a alta eficiência terapêutica antimelanoma da TMZ, principalmente em casos metastáticos, devido, principalmente, à sua capacidade de ser um fármaco capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (QUIRT et al 2007). De forma interessante, no nosso estudo, as linhagens de melanoma que apresentaram maior sensibilidade à TMZ foram justamente as células originárias de campo metastático (SK-MEL-147) e de efusão pleural (CHL-1). Em contrapartida, a linhagem celular com maior resistência intrínseca a TMZ foi a linhagem WM1366, que apresentou um valor de IC50 2,9 vezes e 1,5 vezes maior do que as células SK-MEL-147 e CHL-1, respectivamente.

O cenário de resistência à TMZ pode ser compreendido após conhecer o mecanismo de ação deste fármaco. A ação citotóxica de TMZ é mediada principalmente pela metilação dos resíduos O6-guanina (O6-MeG), o qual resulta em uma lesão mutagênica e genotóxica. O O6-MeG inicialmente é reparado pela metilguanina-DNA

metiltransferase (MGMT), a qual remove os grupos metil adicionados, restaurando o grupo guanina. Caso não haja o reparo do O6-MeG haverá um pareamento não canônico da guanina e timina durante a replicação do DNA. Essa situação é reparada pela enzima MMR, a qual reconhece exclusivamente a timina emparelhada na fita filha e promove a sua extirpação, no entanto, O6-MeG persiste na estrutura do DNA (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012).

Nossos resultados de quimiossensibilidade relativa à TMZ, poderiam então ser explicados pelo perfil de origem metastática ou não metastática das nossas células aliado ao *status* dos mecanismos de reparo apontados anteriormente. Se essa hipótese for acertada, nossos resultados poderiam ser concordantes com o estudo de Pepponi e colaboradores (2022), onde através de um screening da atividade de MGMT e MMR em linhagens de melanoma e o seu impacto na resistência a diversos quimioterápicos, incluindo TMZ, foi observado que a atividade de MGMT está diretamente correlacionada ao valor de IC50 de TMZ nas linhagens celulares de melanoma., quanto maiores os níveis de atividade de MGMT, maior será a promoção de resistência ao TMZ nessas células. Para a realização deste estudo foram utilizadas nove linhagens de melanoma, das quais cinco eram provenientes de campos metastáticos (CR-MEL, PR-MEL, GL-MEL, M14 e CN-MEL). Quanto à análise do MGMT foi verificado que as linhagens originárias de campo metastático possuíam nenhuma ou mínima atividade de MGMT, com exceção da linhagem CN-MEL. Quando quantificado em fração molar, a linhagem CR-MEL não apresentou nenhuma atividade de MGMT, a linhagem PR-MEL apresentou uma atividade de 12 frações molares, GL-MEL atividade de 52 frações molares, M14 atividade de 107, CN-MEL atividade de 827 frações molares. Quando analisado o IC50 das linhagens, foi verificado que, maioritariamente, as linhagens com menores atividades de MGMT e MMR, linhagens de campo metastático, obtiveram menores IC50s.

O gene que codifica a enzima MGMT está localizado em 10q26. A inativação epigenética do MGMT por meio de hipermetilação do promotor foi relatada em 34% das amostras de melanoma (HOON, et al., 2004). O melanoma primário e o metastático foram comparados com o intuito de identificar a diferença no *status* de metilação do MGMT, no entanto esta diferença não foi encontrada. Esta situação pode ser explicada, pois em vários tipos de câncer, a dimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9) é comum e essencial para o silenciamento do *MGMT*, independentemente do nível de metilação do DNA nas ilhas CpGs do promotor (ZHAO *et.al.*, 2005). Isso enfatiza que a

caracterização funcional de genes hipermetilados identificados no melanoma é essencial e que o estado de metilação de um gene pode atuar como um marcador adequado para rastrear a progressão do melanoma (SARKAR *et.al.*, 2015).

Além da resistência ao quimioterápico, outros fatores auxiliam na progressão tumoral do melanoma. A predisposição genética é um conhecido fator de risco associado ao melanoma e é responsável por 10% dos casos de melanoma. O gene *CDKN2A* o qual está localizado no cromossomo 9p foi o primeiro *locus* gênico ligado ao melanoma familiar, o qual codifica duas proteínas supressoras de tumor, $p14^{ARF}$ e a $p16^{INK4A}$. A proteína $p14^{ARF}$ atua restringindo a proliferação celular através da estabilização de p53, o qual por sua vez induz o inibidor dependente de ciclina p21 (TOUSSI *et.al.*, 2020).

$p16^{INK4A}$ por outro lado, controla a proliferação celular através da inibição da associação das quinases 4 e 6 dependentes de ciclina (CDK4 / 6) e a ciclina D1. Mutações em *CDKN2A* são os eventos genéticos mais frequentes subjacentes à susceptibilidade ao melanoma familiar (SARKAR *et.al.*, 2015; TOUSSI *et.al.*, 2020).

A estrutura de *CDKN2A* contém dois marcos de leitura, motivo pelo qual mutações neste gene podem afetar uma ou outra, ou ambas as proteínas traduzidas, dependendo de qual éxon é afetado. A herança autossômica dominante de mutações *CDKN2A* da linhagem germinativa tem sido implicada em 20 – 40 % dos melanomas familiares, embora a frequência de mutação varie entre as diferentes regiões do gene (READ, WADT, HAYWARD, 2016)

Como demonstrado em diversos estudos, existe presença de alterações heterozigóticas no éxon 1 de *CDKN2A*. Observou-se também uma transição de G para A, o qual resultou em um códon de parada na posição 149, e a nova transição de T para C na posição 298 resultou na substituição de prolina por leucina (SOTO, *et.al.*, 2005; SOURA, *et.al.*, 2016). Neste estudo realizado por SOTO et al (2005), o grupo ainda identificou mutações no gene *TP53*, o qual correspondeu a uma quantidade de 20,5% das amostras.

O gene *TP53* é o gene com maior frequência de mutação em malignidades humanas. O resultado das terapias anticâncer podem depender do *status* mutacional do gene *TP53*, pois tumores que apresentam p53 mutado ou deletado são menos responsivo às quimioterapias comumente utilizadas. Cerca de 50% dos tumores humanos possuem

TP53 mutado, sendo 90% decorrentes de mutações de sentido trocado (*missense*) (RYU *et.al.*, 2017).

A inativação do *TP53* é a principal força motriz para a tumorigênese. Algumas das mutações *missense* podem acarretar na perda de função da atividade supressora de tumor, bem como permitir que as células ganhem funções malignas, tais como proliferação, invasão, migração, instabilidade genômica e resistência à quimioterapia. Essas propriedades de ganho de função contribuem na agressividade tumoral, alta recorrência e mau prognóstico (RYU *et.al.*, 2018).

Abordado no estudo de Oztric e colaboradores em 2019, diferente de outros tumores, no melanoma metastático o gene *TP53* é raramente mutado, contudo, diversos mecanismos ocorrem para a inativação do *TP53*, sendo o mais comum a mutação na *CDKN2A* e uma superexpressão de MDM2, ativação de inibidores de apoptose ou silenciamento do gene *TP53* por metilação. Em seu estudo foi observada a expressão de isoformas de *TP53*, confirmando a presença de formas similares de p53 de baixo peso molecular em melanomas, os quais desempenham um papel importante na tumorigênese.

De forma interessante, o papel de TP53 foi associado à HDAC6 no nosso estudo *in silico*, na qual tumores com mutação em *TP53* apresentaram um aumento de expressão de HDAC6 em comparação com amostras tumorais não mutantes. Futuros estudos podem ampliar o conhecimento sobre esta relação molecular e seus efeitos na resposta terapêutica ao TMZ.

Adicionalmente, a via de sinalização MAPK está fisiologicamente envolvida na tradução de sinais extracelulares, tais como fatores de crescimento e hormônios comandando a expressão de genes que são os principais promotores da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência. Em adição, tem sido demonstrado que a ativação de MAPK representa um ponto crítico na complexa rede molecular da biologia tumoral, sendo a via mais comumente alterada no melanoma (LEONARDI *et.al.*, 2018). Acima de 90% dos melanomas apresentam uma via de ativação MAPK3 aberrante e esta mutação é o passo central no desenvolvimento do melanoma, afetando o ciclo celular e inibições de apoptose (WANG, *et.al.*, 2007). Dentre os principais agentes que causam aberração na via MAPK3 está a mutação na ativação de NRAS. O NRAS se encontra mutado em 15 – 30 % dos melanomas e, na maioria dos casos, essas mutações são *missense* do códon 12, 13 ou 61 (JAKOB, *et.al.*, 2012).

As mutações nestes códon resultam de um prolongamento do estado ligado ao GTP ativo por NRAS, mantendo assim a sinalização anormal de NRAS por meio das vias MAPK3 e PI3K (FEDORENKO, *et.al.*, 2013). É importante ressaltar que mutações em NRAS e BRAF são consideradas mutações exclusivas; no entanto, raramente podem ocorrer comutações (LEONARDI *et.al.*, 2018).

Considerando estas informações podemos inferir que as linhagens celulares de melanoma CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366, utilizadas neste estudo, apresentam mutações representativas dos tumores melanocíticos.

Dentre as linhagens estudadas no presente estudo, WM1366 apresenta mutações em *NRAS*, *CDKN2A* e *TP53* (ATEFI, *et.al.*, 2015), CHL-1 em *CKN2A*, *MAPK3* e *TP53* (BIGNELL, *et.al.*, 2010). Ambas apresentaram uma maior resistência ao TMZ e DTIC. De diferente modo, a linhagem SK-MEL-147, mutada em *NRAS*, apresentou uma menor resistência tumoral. Por essa razão, podemos inferir que o acúmulo de mutações em genes relacionados à proliferação celular podem estar relacionados a uma predominante e determinante resistência intrínseca, enquanto que células de melanoma com um menor número de mutações nos genes citados, poderiam ser mais susceptíveis ao tratamento com TMZ, como observado no presente estudo. Posteriores estudos podem testar as hipóteses aqui apresentadas.

De forma interessante, nosso estudo verificou que a inibição de HDAC6 mediada por WT-161 causou diminuição na expressão de β -catenina. Como observado na literatura, as células melanocíticas em contexto normal, dependem de β -catenina para a migração das células da crista neural e auxiliam no desenvolvimento da célula precursora ao melanócito (GAJOS-MICHINIEWICZ; CZY, 2020) por meio da sua interação com MITF (MORT *et.al.*, 2015). As células de melanoma se aproveitam convenientemente da sinalização β -catenina para transformação e proliferação celular (WEBSTER *et.al.*, 2015), pois β -catenina não cumpre totalmente a definição de um oncogene neste tipo de câncer (LUCERO *et.al.*, 2010). O papel exato da sinalização de β -catenina na iniciação e progressão do melanoma permanece altamente controverso até o momento, apesar de extensos estudos. Enquanto um nível crescente de β -catenina nuclear durante a progressão do câncer é característico de vários tipos de câncer, incluindo câncer colorretal e carcinoma hepatocelular (KHALAF *et.al.*, 2018; METCALFE *et.al.*, 2010; SILVIA *et.al.*, 2014), o nível de β -catenina nuclear é diminuído no melanoma durante a progressão da doença (ARAZARENA *et.al.*, 2011).

A β -catenina demonstrou desempenhar um papel crítico nos estágios iniciais da transformação dos melanócitos (LARUE *et.al.*, 2007; DELMAS *et.al.*, 2007). A iniciação do melanoma inclui a proliferação aumentada de células juntamente com a supressão da senescência levando ao crescimento anormal de melanócitos (LARUE *et.al.*, 2008).

Em apoio aos dados mostrando que β -catenina está envolvida no processo de proliferação, nós hipotetizamos que um dos mecanismos que poderiam estar envolvidos na resposta proliferativa seja a diminuição da expressão de β -catenina dependente e/ou relacionada com a inibição de HDAC6, quando exposta à TMZ e DTIC.

6.2 INIBIÇÃO DE HDAC6 APRESENTA EFEITO SINERGÍSTICO QUANDO COMBINADO COM QUIMIOTERÁPICOS EM MODELOS DE CULTIVO 2D E 3D

Após a avaliação dos efeitos isolados dos fármacos DTIC, TMZ e do composto WT-161, foi realizada a combinação de fármaco e composto, utilizando a análise de sinergismo proposta por Chou-Talalay.

A combinação de fármacos é amplamente utilizada para o tratamento de doenças, tais como o câncer. Os principais objetivos da proposta da combinação de fármaco e composto é obter efeito terapêutico sinérgico, os quais resultam em uma queda da dose e toxicidade, e minimizam ou retardam a indução de resistência de fármacos (CHOU, 2010).

De modo inédito, nossa pesquisa apresenta o resultado obtido pela combinação de TMZ com WT-161 e DTIC com WT-161. Nossos resultados mostraram que para ambas combinações, na modalidade simultânea, e no cultivo 2D, houve um efeito sinérgico, apenas com a exceção de CHL-1 na combinação DTIC com WT-161, a qual apresentou um comportamento aditivo.

Quando comparado com a literatura, estudos recentes têm mostrado que o composto WT-161 quando combinado de forma simultânea com OTX015 (YU, *at.al.*, 2022), bortezomibe (HIDESHIMA *et.al.*, 2016), carfilzomibe (HIDESHIMA *et.al.*, 2016) ricolinostate (GARCIA-GUERREIRO, *et.,al.*, 2021), e fármacos, como cisplatina (SUN *et.al.*, 2019), 5-FU (SUN *et.,al.* 2021) apresentam efeitos sinérgicos.

De forma ainda mais interessante, a nossa pesquisa demonstrou que WT-161 teve atuação sinérgica também nas células SK-MEL-147 e na linhagem mais resistente à

TMZ, as células WM1366, quando ambas tratadas utilizando as três estratégias diferentes de combinação testadas, a combinação simultânea (TMZ+WT161) e as sequenciais (TMZ-WT161 e WT161-TMZ).

De forma semelhante, outros estudos encontraram também efeitos sinérgicos quando o inibidor JOC1 (AUZMENDI-IRIARTE, 2020) e ACY-1215(KIM, 2019), ambos inibidores de HDAC6, foram combinado com TMZ em células tumorais, tais como glioblastoma

Após estudarmos o efeito da combinação na metodologia de cultivo em 2D, ampliamos os estudos da combinação para o cultivo de células em 3D. A extensão do estudo de combinação nos permitiu avaliar se a resposta terapêutica iria permanecer quando o tratamento fosse realizado em uma estrutura tridimensional de células tumorais .

A metodologia de cultura celular 2D é a estratégia *in vitro* mais amplamente utilizada para obter grandes quantidades de células de um determinado organismo. Ela utiliza a adesão celular a uma superfície plana e sólida para manter o crescimento celular em monocamada, facilitando o manuseio e a geração de altas quantidades de material biológico. Porém, este sistema apresenta divergências com os processos biológicos que, de fato, acontecem *in vivo*; pois durante o desenvolvimento da cultura 2D se descaracteriza completamente o complexo microambiente tecidual, podendo fornecer um fenótipo totalmente diferente, bem como respostas distintas a estímulos externos, como fármacos (CHUNG; LIM; LEE, 2019). Por outro lado, os modelos de pesquisa utilizando animais, maioritariamente realizados utilizando camundongos, também apresentam divergências e distanciamento com os sistemas biológicos humanos (BROHEM *et.al.*, 2013)

Por essa razão, o modelo de cultivo celular em três dimensões (3D) surgiu como uma alternativa atraente para superar as desvantagens tanto do modelo 2D, o qual carece de contexto *in vivo*, quanto do modelo animal, o qual não pode reproduzir fielmente o sistema humano e possui questões éticas sempre desafiadoras. Modelos de cultura de células tridimensionais incluem implantes de tecido, pele artificial e esferoides celulares (COSTA, *at.al.*, 2016).

No presente estudo, padronizamos e estabelecemos uma plataforma *in vitro* para testes farmacológicos utilizando esferóides de células de melanoma, e de forma inédita para o inibidor WT-161 e para as células investigadas, realizamos testes de crescimento e combinação de fármacos. Verificamos assim, que a combinação

simultânea de TMZ com WT-161 reduz drasticamente a área dos esferóides de ambas as linhagens, CHL-1 e WM1366, quando comparado com controle DMSO e com a ação isolada dos dois fármacos. Este resultado não só corrobora o efeito sinérgico que ocorre nas culturas celulares 2D (monocamada), mas também ressalta o papel quimiosensibilizante de WT-161 em condições de cultivo e de microambiente tumoral mais próximas, e mais complexas, do real contexto tumoral *in vivo*. O resultado de efeito sinérgico de WT-161 em cultivo de esferóides também foi evidenciado por Yu e colaboradores (2022) ao combinar WT-161 com OTX05, um inibidor de BDR2, de maneira simultânea em esferóides de osteossarcoma.

Por outro lado, o crescimento de linhagens de células tumorais no formato 3D nos levantou alguns questionamentos importantes. Considerando que esferóides derivados de tumores são únicos porque permitem o enriquecimento de células-tronco cancerígenas (CSCs) ou células com características relacionadas a células-tronco (ISHIGURO et al. 2017), e sabendo que as CSCs representam aproximadamente 1% do volume tumoral *in vivo* (HABNAJAR *et.al.*, 2021), resulta importante a futura proposta de realização de testes de inibição farmacológica de HDAC6, associada ou não com TMZ, para verificar o efeito sobre esta população de CSCs extraídas de tumores *in vivo*. No entanto, considerando que CSCs também têm sido encontradas em inúmeras linhagens celulares imortalizadas (KONDO, 2007), cabe a pergunta se seria possível encontrar um enriquecimento de CSCs de melanoma nos esferóides cultivados no presente estudo que nos permita verificar a inibição de HDAC6 sobre este subgrupo celular específico.

Assim, com base nos nossos resultados de combinação entre TMZ e WT-161, concluímos que a melhor estratégia de combinação foi a simultânea (WT-161+ TMZ) em ambos os modelos celulares testados (2D e 3D).

6.3 WT-161 DIMINUI A CAPACIDADE CLONOGÊNICA DE CÉLULAS DE MELANOMA.

Após a obtenção de resultados da viabilidade celular, foi investigado se WT-161 influencia a proliferação celular mediante a formação de colônias a partir de uma célula. Por essa razão o estudo foi baseado nas observações de Punck e Marcus (1965), os quais evidenciaram uma técnica de cultivo de célula para se analisar a capacidade de formação de clone ou colônia a partir de uma única célula.

Ao analisar o efeito de WT-161 na capacidade proliferativa e clonogênica nas linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366, foi observado que após o tratamento, houve um impacto na capacidade clonogênica das células, de maneira dose dependente. Tais resultados foram evidenciados com a diminuição do número de colônias. Os achados experimentais são condizentes com os resultados demonstrados por Yu e colaboradores em 2022, onde foi averiguado uma queda significativa na capacidade de formação de colônias das linhagens de osteosarcoma quando tratadas com WT-161.

O estudo promovido por Chao e colaboradores em 2017, demonstrou que células FEMX-I, decorrentes de melanoma metastático, ao serem tratadas com diferentes concentrações de TSA, um inibidor de HDAC6, por 24 horas, apresentaram uma redução de sua sobrevivência clonogênica em 23,5% .

Urdiciain e colaboradores (2019) demonstraram que linhagens de glioblastoma (T98G e LN405) ao serem tratadas com Tubastatin A, por 72 horas em colônias 2D e 3D, apresentaram um número significativamente menor de colônias. Outro estudo de Urdiciain, em 2021, também em linhagens de glioblastoma (LN405, T98G, U87MG), demonstrou que o tratamento por meio da metodologia de interferência de RNA (siHDAC6), reduziu de modo significativo a capacidade de formação de colônias nas linhagens estudadas.

Quando estudada em outros tipos de malignidades, como em adenocarcinoma pancreático (KUMAR, et.,al. 2019), carcinoma laríngeo (KIM, et.,al. 2016), câncer renal (SATO, et.,al, 2014), a inibição de HDAC6 também mostrou-se eficaz em promover a diminuição da capacidade da promoção de clones.

Estes estudos corroboram o efeito antiproliferativo através da capacidade clonogênica em células de melanoma encontrados após o tratamento com o inibidor seletivo de HDAC6, WT-161.

6.4 A INIBIÇÃO DE HDAC6 CAUSA AUMENTO DA POPULAÇÃO APOPTÓTICA

A apoptose é o resultado final, esperado a ser obtido, em grande parte das terapias anticancerígenas, abrangendo desde a quimioterapia, radioterapia convencional, até terapia direcionada e imunoterapia (BERTHENET, *et.al.*, 2020).

O WT-161 foi capaz de aumentar significativamente a proporção de células apoptóticas das linhagens CHL-1 e SK-MEL-147, gerando um aumento de 36% e 90%, respectivamente.

Posteriormente, foi possível verificar um efeito apoptótico sinérgico após a combinação TMZ+WT-161 nas células WM1366, encontrando um aumento significativo da população apoptótica quando comparado com os tratamentos isolados.

Adicionalmente foi verificado os níveis de expressão da proteína PARP clivada. Foi evidenciado que o tratamento com WT-161 foi capaz de aumentar a concentração de PARP clivado de modo significativo, quando comparado com o controle, nas linhagens CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366.

Em geral, a apoptose é desencadeada pelo envolvimento de receptor de morte, incluindo o receptor TNF1 (TNFR1) ou o receptor FAZ ou por um sinal de morte intracelular, como dano ao DNA, ativação de supressor tumoral, privação de nutrientes e estresse. É comumente aceito que o ponto de não retorno no processo apoptótico e a permeabilização da membrana mitocondrial externa, seguida pela rápida perda da função mitocondrial, liberação do citocromo c, montagem do apoptossomo e ativação da caspase-9 antes da caspase-3 efetora e caspase-7. Dado o seu papel central no processo apoptótico, a membrana mitocondrial externa é fortemente regulada pelas proteínas da família BCL-2, as quais são antiapoptóticas (BCL-2, BCL-xL, MCL1), pró-apoptóticas (BID, BIM, BAD, PUMA ou NOXA) ou proteínas formadoras de poros efetores (BAX e BAK) (BERTHENET, *et.al.*, 2020).

Similarmente evidenciado nos nossos resultados, LIU em 2016, observou um aumento da população apoptótica após o silenciamento de HDAC6, e constatou um aumento da clivagem de caspases 3, 8 e 9.

Quando avaliado o comportamento apoptótico de linhagens de melanoma (A375) frente ao inibidor de HDAC6, a molécula S-8, foi demonstrado uma correlação dose e tempo dependente para a clivagem de PARP, caspase-9 e citocromo c. Foi observado também que a inibição de HDAC6 promove a desfosforilação de AKT e direciona o aumento dos níveis de BAD. Também foi relatada a dissipação do potencial transmembranar da mitocôndria. Quando observado a análise por citometria de fluxo pela marcação de anexina V/PI, evidenciou um aumento de 40% da população apoptótica (BALLIU, *et.,al.* 2015).

Adicionalmente, Sun e colaboradores (2019) evidenciaram uma relação dose-dependente do composto WT-161 com a clivagem de PARP em células de retinoblastoma. Por outro lado, Yu e colaboradores (2022) verificaram aumento dos níveis de células apoptóticas sob o efeito do inibidor WT-161 em células de osteosarcoma, além da clivagem das caspases 9 e 21. Assim como em nossos

resultados, quando combinado com TMZ e DTIC, WT-161 apresentou um maior índice apoptótico quando comparado com os compostos sozinhos.

Em outro estudo realizado em células de câncer de mama (MCF7) deficiente em caspase 3 (HIDESHIMA, et.,al, 2017), evidenciou-se que WT-161 induziu fortemente a clivagem de caspase-7 e PARP de modo dose dependente. Tal situação não foi observada quando a linhagem foi tratada com outros pan-inibidores de HDAC (SAHA, MS275 e LBH589).

Efeitos funcionais e moleculares de outros inibidores de HDAC6 têm sido apresentados por diversos estudos. Iancelot e colaboradores (2015) encontraram um aumento da concentração de AKT e fosforilação em Ser473 e Thr308, após inibição de HDAC6 pelo agente ACY-1215. Simultaneamente, houve diminuição da ligação de AKT a PIP3 e diminuição de β -catenina fosforilada em Ser552, demonstrando assim, que HDAC6 ativa AKT e β -catenina, em células progenitoras neurais. Assim, um estudo aprofundado entre a inibição de HDAC6 e β -catenina deve ser realizado para melhor entender os mecanismos subjacentes à resposta apoptótica em células de melanoma

Yu e colaboradores (2016) demonstraram que a inibição de HDAC6 com CAY10603 e Tubastatin A, em linhagem celular de pulmão, afeta TNF- α e induz ativação de caspases. TNF- α é um mediador pró-inflamatório, promovendo apoptose em células endoteliais.

Em um estudo realizado por Bai e colaboradores (2015) foi observado que o silenciamento de HDAC6 aumentou a concentração da BAX, fator pró-apoptótico, e reduziu as concentrações de Bcl-2, um fator anti-apoptótico.

Ao relacionar HDAC6 com Ku70 e BAX em linhagens de neuroblastoma, Subramanian (2011) evidenciou por meio de um ensaio de imunoprecipitação que HDAC6 interage com BAX e Ku70. Foi observado também que após o tratamento com inibidor de HDAC6 ocorre a liberação de BAX de Ku70, evidenciando assim que HDAC6 inibe a acetilação de Ku70 e a inibição de HDAC6 aumenta a acetilação de Ku70, desencadeado a liberação de BAX, resultando em morte celular.

Após evidenciarmos que WT-161 foi capaz de aumentar a população marcada com Anexina V e promover o aumento da concentração de PARP clivado concluímos que o inibidor de HDAC6 é capaz de promover o aumento da apoptose nas linhagens de melanoma estudada.

6.5 WT-161 ATUA NA PARADA DO CICLO CELULAR

No presente estudo investigamos o impacto do inibidor WT-161 sobre o ciclo celular. Em nossos resultados observamos que as linhagens estudadas (WM1366 e CHL-1) apresentaram um aumento da população na fase G1.

Nossos resultados estão de acordo com o único trabalho realizado até o momento que estudou WT-161 no ciclo celular. Yu (2020) demonstrou que células de osteossarcoma apresentam um aumento da população na fase G1 quando tratadas com WT-161. Adicionalmente, o grupo de pesquisa também evidenciou que as células tratadas apresentaram um aumento da concentração de p21.

Ao observarmos estudos que promoveram o silenciamento de HDAC6 em melanoma, Liu e colaboradores (2016) mostraram que ao silenciar HDAC6 nas células houve um aumento da população celular em G0/G1. O respectivo trabalho sugeriu que HDAC6 é requerido para regular a expressão gênica de controle do ciclo celular. Em um outro estudo, Bai e colaboradores (2015), utilizando silenciamento de HDAC6, também foi observado um aumento da população celular em G0/G1 em linhagens celulares de melanoma, A375.

Mediante aos dados obtidos em nosso estudo e aos dados de literatura, sobre o efeito de HDAC6 no ciclo celular de linhagens celulares de melanoma, que foram apontados neste tópico. Sugerimos, assim como Liu (2016), que HDAC6 deve estar interligada a regulação gênica de reguladores do ciclo celular.

A progressão do ciclo celular é fortemente regulada pelas atividades coletivas de ciclinas, CDKs e inibidores de CDK (CDKIs). O p27, p21 e p53 são CDKIs importantes que regulam negativamente a progressão do ciclo celular através da inibição da ciclina/CDKs. A p27 participa da parada da fase G1 do ciclo celular, via contato célula-célula e mecanismos dependentes de fatores de crescimento, e em resposta a agentes que inibem a progressão do ciclo celular (LAWAL *et.al.*, 2021; SÁNCHEZ-BEATO *et.al.*, 1997). p21 liga-se e inibe os complexos ciclina/CDK, prevenindo assim a fosforilação de RB e, assim, inibe a proliferação celular (SHERR 2020).

Futuros estudos serão necessários para comprovar a alteração de expressão das ciclinas citadas anteriormente associadas com a parada do ciclo celular na fase G0/G1 observado no presente estudo.

6.6 ATIVIDADE DE HDAC6 IMPACTA NA MOTILIDADE TUMORAL

Um fenômeno importante que contribui com a capacidade migratória de células tumorais é a Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM), evento determinante de plasticidade das células tumorais, permitindo que as células transitem de um estado não móvel (epitélio) para um estado móvel (mesenquimal) (NOVIKOV, *et.al.*, 2021). O estabelecimento da metástase envolve uma série de complexos eventos, onde as células cancerosas devem migrar e invadir a matriz extracelular. O melanoma é altamente metastático, característica que responde a 75% do número de mortes dos tumores cutâneos. Estratégias terapêuticas onde se investiga a deturpação do processo migratório são imprescindíveis para pacientes com melanoma. Com o intuito de avaliar a capacidade migratória da célula, ensaio como o de cicatrização de ferida, tem sido um método indicado para o estudo da migração celular no melanoma, devido à sua alta reprodutibilidade e baixo custo (FREITAS; JOZIC; BEDOGNI. 2021).

Nossos estudos demonstraram que o inibidor de HDAC6, WT-161, foi capaz de inibir a migração celular nas linhagens celulares estudadas. Foi observado uma redução de 44,25% e 60,77% da capacidade migratória nas linhagens CHL-1 e SK-MEL-147, respectivamente. O resultado é uma observação inédita da ação do inibidor WT-161 em linhagens de melanoma. A capacidade do WT-161 de inibir a migração foi observado somente no estudo de Yu (2022), em linhagens de osteossarcoma.

Como demonstrado no estudo de Balliu e colaboradores (2015), ao se analisar a capacidade migratória de células de melanoma (A375), por meio da mesma metodologia que a nossa, observou-se uma significativa redução dose-dependente da capacidade migratória após o tratamento com o inibidor seletivo de HDAC6, S-8. Este evento esteve associado ao aumento de expressão de alfa-tubulina acetilada, importante proteína que quando acetilada está presente em microtúbulos estáveis e encontra-se reduzida em estruturas celulares dinâmicas. Adicionalmente, a inibição de HDAC6 causou diminuição da expressão das proteínas remodeladoras de matriz extracelular, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2.

A significativa redução de moléculas remodeladoras de matriz extracelular após inibição de HDAC6 tem sido corroborado pelo estudo de PAI e col, 2020, chegando a uma redução de MMP-2 e MMP-9 de até 50% da sua expressão protéica (PAI, *et.al.*, 2020)

No estudo promovido por Pai e colaboradores (2020), frente à inibição de HDAC6 em linhagens de carcinoma pulmonar, foi observado dentro do comportamento fenotípico uma diminuição da expressão de MMP-2 e MMP-9, sendo a expressão de MMP-9 diminuída em até 50%.

Estes estudos confirmam os resultados obtidos na migração celular após a inibição de HDAC6, pelo WT-161.

As células tumorais disseminam-se para tecidos adjacentes e distantes através da invasão e migração celular. O processo de migração celular pode ser tipicamente analisado em 5 etapas sucessivas: polarização celular, protrusão da borda de ataque, adesão na borda de ataque, amortecimento na borda de fuga e translocação do corpo celular. Cada etapa pode ser um alvo para limitar a disseminação do tumor (LAUFFENBURGER, 1996).

Com o intuito de confirmar o que foi evidenciado no ensaio de migração, analisamos a adesão celular frente a um tratamento com WT-161. Observamos que ao serem tratadas com WT-161, as linhagens CHL-1 e SK-MEL-147 tiveram um aumento significativo da população de células aderidas. Similarmente, Zhang (2014) observou um aumento significativo de células aderidas ao silenciar a expressão de HDAC6 em células de neuroblastoma.

Ao diminuir o estímulo de HDAC6, o grupo de pesquisa dirigido por Lafarga (2012) mostrou resultados de aumento de adesão celular. Curiosamente o grupo também encontrou modificações na morfologia e volume de área nas células estudadas.

A motilidade celular desempenha um papel fundamental na disseminação do tumor. Esta atuação ocorre por meio da desacetilação de α -tubulina e cortactina, fazendo assim, que HDAC6 desempenhe um papel importante em células dependentes da movimentação de microtúbulos e actina (HIDESHIMA *et.al.*, 2016).

De forma interessante, vários estudos têm correlacionado o status de adesão celular com os mecanismos de progressão do ciclo celular (CRAMER; MITCHISON, 1997; DAO *et.al.*, 2009; MADDOX; BURRIDGE, 2003; YAMAKITA *et.al.*, 1999). Wu e colaboradores (2019) demonstraram que CDK1 e a ciclina A2 promovem a formação do citoesqueleto na interfase, quando ocorre a transição de G1 para S, aumentando consequentemente a adesão celular. Considerando que no presente estudo houve parada do ciclo celular na fase G0/G1 após inibição da HDAC6, e simultaneamente, encontramos um aumento da adesão celular após tratamento com WT-161, podemos propor, que o mecanismo responsável pelo aumento da adesão celular é dependente da

parada do ciclo celular mediado pela inibição de HDAC6. Mais pesquisas são necessárias para comprovar ou destratar esta hipótese.

Por outro lado, sabe-se que HDAC6 regula processos de motilidade e adesão celular por meio de desacetilação dos microtúbulos, através especificamente da desacetilação de alfa-tubulina (LAFARGA, 2012), por esse motivo, é possível supor, que a inibição de HDAC6 e o conseqüente aumento de alfa-tubulina acetilada, mediada por WT-161 no nosso estudo, impeça a movimentação e contração dos microtúbulos, diminuindo assim a motilidade e aumentando a adesão celular, como confirmado em ensaios posteriores.

Para complementar nossos estudos de motilidade celular, verificamos diminuição da capacidade invasiva das células CHL-1 após inibição de HDAC6. Um resultado similar também foi observado por Yu e colaboradores (2020) ao avaliarem a invasão de linhagens de osteosarcoma sob tratamento de WT-161. Diversos estudos têm mostrado que o silenciamento de HDAC6 reduz significativamente a capacidade invasiva de células de carcinoma pulmonar (HAO-CHUANG, 2020), neuroblastoma (ZHANG, 2014) e melanoma (LIU, 2017). Estes resultados reforçam a necessidade de investigar quais moléculas remodeladoras de matrix extracelular foram alteradas após tratamento com o inibidor WT-161, possivelmente MMP-9 e MMP-2.

Finalmente, considerando essas modificações fenotípicas, avaliamos o perfil de expressão da proteína E-caderina, proteína crucial na regulação da TEM, responsável pela manutenção do fenótipo epitelial e na regulação da homeostase tecidual (LOH *et.al.*, 2019). Embora a linhagem CHL-1 não produziu níveis detectáveis de E-caderina nos nossos ensaios, verificamos que WT-161 foi capaz de aumentar a expressão dessa proteína nas linhagens SK-MEL-147 e WM1366. Similarmente, o aumento da concentração de E-caderina foi também encontrada no estudo dirigido por Yu et al (2022) ao tratar células de osteossarcoma com WT-161. Xu et al (2022) também demonstraram aumento da expressão de E-caderina após inibição de HDAC6 em células de hepatocarcinoma.

As ligações homofílicas da E-caderina, ocorrendo entre células próximas, inibem a proliferação celular regulando os níveis de expressão do receptor tirosina quinase (RTK) e tirosina quinase Src. Dessa forma, a perda de E-caderina em células cancerosas leva à disseminação metastática e ativação de vários fatores de transcrição capazes de promover TEM (PERRAIS *et.al.*, 2007).

Entre essas moléculas destaca-se a proteína chave β -catenina, a qual participa, localizada tanto na membrana quanto no citoplasma, da via de sinalização Wnt e ao mesmo tempo interage com E-caderina durante os processos da TEM (COLÁS-ALGORA; MILLÁN, 2019). Estudos têm descrito à β -catenina como parte do complexo E-caderina (GRECO et al, 2016), e esse complexo específico pode se ligar ao citoesqueleto de actina para aprimorar as propriedades de adesão celular, estabilização e integridade e alterar as funções celulares (GRECO et al, 2016). No presente estudo, a inibição de HDAC6 causou diminuição na expressão de β -catenina nas linhagens SK-MEL-147 e WM1366.

As caderinas clássicas, dentre as quais se encontram a E-caderina, cooperam com os membros da família das cateninas através de seus domínios citoplasmáticos para se ligarem ao citoesqueleto de actina subjacente (COLÁS-ALGORA; MILLÁN, 2019). Essa cooperação se dá pela junção das caudas citoplasmáticas de E-caderina com β -catenina (SEDDIKI *et.al.*, 2018).

Como demonstrado por SOLANAS e colaboradores (2008) em células de câncer do colón, a expressão de E-caderina inibe a expressão de genes mesenquimais e é correlacionada com estabilização de β -catenina. Foi demonstrado também que a diminuição de E-caderina levou a um aumento da genes mesenquimais e um aumento da expressão de β -catenina e seu direcionamento ao núcleo. Assim, E-caderina e β -catenina podem ter efeitos opostos (GRECO et al, 2016), como verificado pela relação de expressão proteica inversamente proporcional encontrada no presente estudo após tratamento com o inibidor de HDAC6. Diante dessas evidências, hipotetizamos que HDAC6 possa participar da estabilização do complexo E-caderina/ β -catenina nas células de melanoma, de maneira que após a sua inibição, o fenótipo mesenquimal seja detido pelo aumento de expressão de E-caderina, e simultaneamente, ocorra bloqueio transcricional de genes oncogênicos mediado pela baixa expressão de β -catenina. Futuras pesquisas poderão confirmar ou descartar nossa hipótese.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O inibidor seletivo de HDAC6, WT-161, teve sua atividade inibitória de HDAC6 comprovada através do aumento da concentração de alfa-tubulina acetilada, promovendo uma significativa redução da viabilidade celular nas células de melanoma investigadas.

Adicionalmente, a inibição de HDAC6 causou quimiossensibilização das células de melanoma quando tratadas em combinação simultânea com TMZ e DTIC. Este importante efeito sinérgico foi verificado em todas as linhagens celulares de melanoma investigadas e em ambos os sistemas de cultura celular testados, 2D e 3D.

A inibição de HDAC6 promoveu a parada do ciclo celular na fase G1/G0 e redução da capacidade clonogênica. Adicionalmente, demonstrou-se um aumento significativo da morte apoptótica, tanto de forma isolada quanto combinada com TMZ, associado ao aumento de concentração da proteína PARP clivada.

A inibição de HDAC6 reduziu significativamente, e de maneira dose dependente, a migração e invasão celular das células de melanoma, aumentando de forma significativa a adesão celular. Concomitantemente, houve aumento da expressão de E-caderina e diminuição da expressão de β -catenina após inibição de HDAC6 mediada por WT-161 nas células de melanoma testadas.

Os resultados apresentados nos permitem identificar o papel de HDAC6 como uma proteína nodal em melanoma, responsável pela manutenção de propriedades proliferativas, clonogênicas, quimioresistentes, antiapoptóticas, e principalmente, propriedades migratórias e invasivas em células de melanoma. Eventos estes que, desde nosso ponto de vista, poderiam ser mediados pela sua ativa participação junto ao eixo molecular E-caderina/ β -catenina.

Concluimos assim, que a inibição de HDAC6 em células de melanoma, mediada por WT-161, apresenta-se como uma estratégia anti-melanoma promissora, sendo necessárias pesquisas *in vivo*, que permitam comprovar e ampliar os efeitos anti-câncer encontrados.

REFERÊNCIAS

ALI, A; ZHANG, F; MAGUIRE, A; BYRNE, T; WEINER-GORZEL, K; BRIDGETT, S; O'TOOLE, S; O'LEARY, J; BEGGAN, C; FITZPATRICK, P; MCCANN, A; FURLONG, F. HDAC6 degradation inhibits the growth of high-grade serous ovarian cancer cells. **Cancer (Basel)**. Suíça. n. 12, v. 12, p. 3734 – 3756. 2020.

ATEFI, M; TITZ, B; AVRAMIS, E; NG, C; WONG, D, J, L; LASSEN, A; CERNIGLIA, M; ESCUIN-ORDINAS, H; FOULAD, D; COMIN-ANDUIX, B; GRAEBER, T, G; RIBAS, A. Combination of pan-RAF and MEK inhibitors in NRAS mutant melanoma. **Molecular Cancer**. Reino Unido. v. 14, n. 23. 2015.

AUZMENDI-IRIARTE, J; SAENZ-ANTOÑANZAS, A; MIKELEZ-ALONSO, I; CARRASCO-GARCIA, E; TELLAETXE-ABETE, M; LAWRIE, C, H; SAMPRON, N; CORTAJARENA, A, L; MATHEU, A. Characterization of a new-small-molecule inhibitor of HDAC6 in glioblastoma. **Cell Death Dis**. Reino Unido. n. 6, v. 417. 2020

BAI, J; LEI, Y; AN, G; HE, L. Down-regulation of deacetylase HDAC6 inhibits the melanoma cell line A375.S2 growth through ROS-dependent mitochondrial pathway. **PLoS One**. Estados Unidos da America. n. 10, v. 3. 2015.

BALLIU, M; GUANDALINI, L; ROMANELLI, M, N; DÁMICO, M; PAOLETTI, F. HDAC-inhibitor (S)-8 disrupts HDAC6-PP1 complex prompting A375 melanoma cell growth arrest and apoptosis. **J Cell Mol Med**. Romênia. n. 19, v. 1, p. 143 – 54. 2015.

BIGNELL, G, R; GREENMAN, C, D; DAVIES, H; BUTLES, A, P; EDKINS, S; ANDREWA, J, M; BUCK, G; CHEN, L; BEARE, D; LATIMER, C; WIDAA, S; HINTON, J; FAHEY, C; FU, B; SWAMY, S; DALGLIESH, G, L; THE, B, T; DELOUKAS, P; YANG, F; CAMPBELL, P, J; FUTREAL, P, A; STRATTON, M, R. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. **Nature**. Reino Unido. n. 463, p. 893-898. 2010.

BROHEM, C, A; CARDEAL, L, B, S; TIAGO, M; SOENGAS, M, S; BARROS, S, B, M; MARIA-ENGLER, S, S. Artificial skin in perspective: Concepts and applications. **Pigment Cell Melanoma Res**. Reino Unido. v. 24, n. 1, p. 35 -50. 2011.

CARR, S; SMITH, C; WERNBER, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surg. Clin. North Am**. Estados Unidos da América. v. 100, n. 01, p. 1 – 12. 2020.

CHANDRASHEKAR, D, S; BASHEL, B; BALASUBRAMANYA, S, A, H; CREIGHTON, C, J; RODRIGUEZ, I, P; CHAKRAVARTHI, B, V, S, K; VARAMBALLY, S. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. **Neoplasia**. Estados Unidos da América. v. 19, n. 8, p.649 - 658.2017

CHAO, O, S; CHANG; T, C; BELLA, M, A; ALESSANDRO, R; ANZANELLO, F; RAPPA, G; GOODMAN, O, B; LORICO, A. The HDAC6 inhibitor Tubacin induces releases of CD133+ extracellular vesicles from cancer cells. **J Cell Biochem**. Estados Unidos da América. n. 118, v. 12, p. 4414 – 4424. 2017.

CHOPRA, A; RAO, U, N, M. Pathology of Melanoma. **Surg. Clin. North Am**. Estados Unidos da América. v. 100, n. 01, p. 43 – 59. 2020.

CHOU, T, C; TALALAY, P. Quantitative nalysis of dose-effect relationships: the combined effects of the multiple drugs or enzyme inhibitors. **Adv Enzyme Regul**. Holanda. n. 22, p. 27 – 55. 1984

CHOU, T. Drug combination studies and their synergy qualification using the Chou-Talalay method. **Cancer Res**. Noruega. n. 70, v. 02, p. 440 - 446. 2010.

CHUANG, H; HSU, J; CHANG, H; WANG, P; WEI, P; WU, D; HUANG, M; HSIAO, M; YANG, C. Pin1 coordinates HDAC6 upregulation with cell migration in lung cancer cells. **Int J Med Sci**. Austrália. n. 17, v. 17, p. 2653 – 2643. 2020.

CHUNG, S; LIM, G, J; LEE, J, Y. Quantitative analysis of melanin content in a three-dimensional melanoma cell culture. **Sci Rep**. Estados Unidos da América. n.9, v. 1, p.780 – 803. 2019.

CHUNG, S; LIM, G, J; LEE, J, Y. Quantitative analysis of melanin content in three-dimensional melanoma cell culture. **Comparative Study**. Canadá. n.9, v. 1. 2019.

COLÁS-ALGORA, N; MILLÁN, J. How many cadherins do human endothelial cells express ? **Cell Mol Life Sci**. Suíça. v.76, n. 7, p. 1299 - 1317. 2019

CORSO, G; CARVALHO,J; MARRELLI, D;VINDIGNI, C; CARVALHO, B; SERUCA, R; ROVIELLO, F; OLIVEIRA, C. Somatic mutations and deletion of the E-cadherin gene predicts poor survival of patients with gastric cancer. **Cell Mol Life Sci**. Suíça. n. 31, v. 7, p. 868 - 875. 2013

COSTA, E, C; MOREIRA, A, F; MELO-DIEGO, D; GASPAR, V, M; CARVALHO, M, P; CORREIA, I, J. 3D tumoe spheroids: na overview na the tools and techniques used for the their analysis. **Biotechnol Adv**. Holanda. n. 34, v. 8, p. 1427 – 1441. 2016.

CRAMER, L, P; MITCHISON, T, J. Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding. **Mol Biol Cell**. Estados Unidos da América. v. 8, n. 1, p. 109 - 119. 1997.

DAO, V, T; DUPUY, A, G; GAVET, O; CARON, E; GUNZBURG, J. Dynamic changes in Rap1 activity are required for cell retraction and spreading during mitosis. **J Cell Sci**. Estados Unidos da América. v.122, n. 16, p. 2996 -3004. 2009.

DAVIS, L, E; SHALIN, S, C; TACKETT, A, J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **CANCER BIOLOGY & THERAPY**. Estados Unidos da América. v.20, n.11, p 1366-1379, 2019.

DILASHAT, E; VU, H, N; STEINGRÍMSSON, E. Epigenetic regulation during melanocyte development and homeostasis. **Exp Dermatol**. Reino Unido. n. 30, v. 8, p. 1033 - 1050. 2021

FEDORENKO, I, V; GIBNEY, G, T; SMALLEY, K, S, M. *NRAS* mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. **Oncogene**. Estados Unidos da América. n.32, v. 25, p. 3009 – 3018. 2013

FRANKEN, N, A; RODERMOND, H, M; STAP, J; HAVEAN, J; BREE, C, V. Clonogenic assay of cell *in vitro*. **Nat. Protocol**. Estados Unidos da América. v,1, p. 2315 – 2319. 2006

FREITAS, J, T; JOZIC, I; BEDOGNI, B. Wound healing assay for melanoma cell migration. *In*: HARGADON, K, M. Melanoma: Methods and protocols. Humana New York, NY. **SPRINGER**. Alemanha. 2021. p. 65 -71.

GAJOS-MICHINIEWICZ, A; CZYZ, M. WNT signaling in melanoma. **Int J Mol Sci**. Suíça. n. 21, v. 14. 2020.

GARCÍA-GUERREIRO, E; GOTZ, R; DOOSE, S; SAUER, M; RODRÍGUEZ-GIL, A; NERRETER, T; KORTUM, K, M; PÉREZ-SIMÓN, J; EINSELE, H; HUDECEK, M; DANHOF, S. Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by novel HDAC6 inhibitors is a class effect and augments the efficacy of daratumumab. **LEUKEMIA**. Reino Unido. v. 35, N. 1, P. 201 – 214. 2020.

GRECO A, DE VIRGILIO A, RIZZO MI, PANDOLFI F, ROSATI D, DE VINCENZIIS M. The prognostic role of E-cadherin and β -catenin overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**. Estados Unidos da América. n.126, v. 4. 2016.

HABANJAR, O; DIAB-ASSAF, M; CALDEFIE-CHEZET, F; DELORT, L. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages. **Int J Mol Sci**. Suíça. n. 22, v. 22. 2021

HAI, Y; CHRISTIANSON, D, W. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. **Nat Chem Biol**. Estados Unidos da América. v. 12, n. 9, p. 741 – 747. 2016

HANSSANPOUR, S, H; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **J Cancer Res Pract**. Suíça. v. 4, n. 4, p. 127-129. 2017.

HEANUE, T, A; PACHNIS, V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. **Nat Rev Neurosci**. Estados Unidos da América. n. 8, v. 6, p. 466 - 479. 2007.

HIDESHIMA, T; MAZITSCHEK, R; QI, J; MIMURA, N; TSENG, J; KUNG, A, L; BRANDER, J, E; ANDERSON, K, C. HDAC6 inhibitor WT161 downregulates growth factor receptors in breast cancer. **Oncotarget**. Estados Unidos da América. n.8, v. 46, p. 80109 – 8-123. 2017.

HIDESHIMA, T; QI, J; PARANAL, R, M; GREENBERG, E; WEST, N; COLLING, M, E; ESTIU, G; MAZITSCHEK, R; PERRY, J, A; HIROTO, O; COTTINI, F; MIMURA, N; GORGUN, G; TAI, Y; RICHARDSON, P, G; CARRASCO, R, D; WIEST, O; SCHREIBER, S, L; ANDERSON, K, C; BRANDER, J, F. Discovery of selective small-molecule HDAC6 inhibitor for overcoming proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. **PNAS**. Estados Unidos da América. v. 113, n. 46, p. 13162-13167. 2016.

HOON, D, S, B; SPUGNARDI, M; KUO, C; HUANG, S, K; MORTON, D, L; TABACK, B. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. **Oncogene**. Estados Unidos da América. n. 23, v. 22, p. 4014 – 1022. 2004.

HOU, L; PAVAN, W, J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? **Cell Res**. Reino Unido. n. 18, v. 12, p. 1163 - 1176. 2008.

HU, Z. MI, Y; QIAN, H; GUO, N; YAN, A; ZHANG, Y; GAO, X. A potential mechanism of temozolomide resistance in Glioma-ferroptosis. **Front Oncol**. Suíça. v. 10. 2020.

HU, Z; RONG, Y; LI, S; QU, S; HUANG, S. Upregulated Histone Deacetylase 6 Associates with Malignant Progression of Melanoma and Predicts the Prognosis of Patients. **Cancer Manag Res**. Nova Zelândia. v. 17, n. 12, p. 12993 – 13001. 2020.

IACONELLI, J; LALONDE, J; WATMUFF, B; LIU, B; MAZITSCHEK, R; HAGGARTY, S, J; KARMACHARYA, R. Lysine deacetylation by HDAC6 regulates the kinase activity of AKT in human neural progenitor cells. **ACS Chem Biol**. Estados Unidos da América. n. 12, v.8, p. 2139 – 2148. 2017.

ISHIGURO T, OHATA H, SATO A, YAMAWAKI K, ENOMOTO T, OKAMOTO K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. **Cancer Sci**. Japão. v. 108 n. 3, p. 283-289. 2018

JAKOB, J, A; BASSETT, M, L; NG, C, S; CURRY, J, L; JOSEPH, R, W; ALVARADO, G, C; ROHLFS, M, L; RICHARD, J; GERSHENWALD, J, E; HWU, P; KIM, K, B;

LAZAR, A, J; DAVIES, M, A. *NRAS* mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. **Cancer**. França. n. 118,v. 16, p. 4014 – 4023. 2012.

JIANG, G; WEI, Z; PEI, D; XIN, Y; LUI, Y; ZHENG, J. A novel approach to overcome temozolomida resistance in glioma and melanoma: Inactivation of MGMT by gene therapy. **Biochem Biophys Res Commun**. Estados Unidos da América. n. 406, v. 3, p. 311 – 314.

KALISZCZAK, M; TROUSIL, S; ALI, T; ABOAGYE. AKT activation controls cell survival in response to HDAC6 inhibition. **Cell Death Dis**. Reino Unido. n. 7, v. 6, p. 1 -9. 2016.

KANDARAKOV, O, F; KALASHNIKOVA, M, V; VARTANIAN, A, A; BELYAVSKY, A,V. Homogeneous and heterogeneous 3D melanoma models *in vitro*. **Mol Biol (Mosk)**. Reino Unido. n. 49, v. 6, p. 998 – 1001. 2015.

KAUR *et.al*. sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. **Nature**. Reino Unido. v. 532, n. 7598. p. 250 -254. 2016.

KHALAF, A,M; FUENTES, D; MORSHID, A; BURKE, M, R; KASEB,A, O; HASSAN, M; HAZLE, J, D; ELSAYES, K, M. Role of Wnt/b-catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. **J Hepatocell Carcinoma**. Nova Zelândia. n. 27, v. 5, p. 61 - 73. 2018.

KIM, G, W; LEE, H, D; YEON, S, K; JEON, Y, H; YOO, J; LEE, S, W; KWON, S, H. Temozolomide-resistant Glioblastoma depends on HDAC6 activity through regulation of DNA mismatch Repari. **AntiCancer Research**. Grécia. n.39, v. 12, p.6731 – 6741. 2019.

KIM, J, H; MOON, H, S; NO, M; CHOI, E, J; CHO, B,J; KIM, J, S; KIM, H, I; KIM, A,I. Isotype-specific inhibition of histone deacetylases: identification of optimal targets for radiosensitization. **Cancer Res Treat**. Coreia. n. 48, n. 3, p.1130 -1140. 2016.

KONDO, T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. **Cancer Biomark**. Estados Unidos da América. 2007;3(4-5):245-50. doi: 10.3233/cbm-2007-34-508. PMID: 17917153.

KUMAR, D; SARMA, P; BHADRA, M, P; TANGUTUR, A, D. Impacto f hybrid-polar Histone deacetylase inhibitor m-carbozycinnamic acid bis-hydroxyamide on human pancreatic adenocarcinoma cells. **Anticancer Agents Med Chem**. Suíça. n. 19, v. 6, p. 750 – 759. 2019.

KUMAR, P; NAGARAJAN, A; UCHIL, P, P. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harb Protocol**. Alemanha. v. 1. 2018

LAFARGA, V; AYMERICH, I; TAPIA, O; JR, F, M; PENELA, P. A novel GRK2/HDAC6 interaction modulates cell spreading and motility. **EMBO J**. Alemanha. n. 31, v. 04, p. 856 - 869. 2012.

LAINO, A, S; BETTS, B, C; VEERATHRAN, A; DOLGALEV, I; SARNAIK, A; JONES, S, S; WEBER, J, S; WOODS, D, M. HDAC6 selective inhibition of melanoma patient T-cells augments anti-tumor characteristics. **I Immunother Cancer**. França. n. 6, v. 7. 2019.

LAUFFENBURGER, D, A. Cell motility. Making connections count. **Nature**. Reino Unido. n. 3, v. 383, p. 390 - 391. 1996.

LAWAL, B; KUO, Y; WU, A, T, H; HUANG, H. BC-N102 suppresses breast cancer tumorigenesis by interfering with cell cycle regulatory proteins and hormonal signaling, and induction of time-course arrest of cell cycle at G1/G0 phase. **Int Biol Sci**. Austrália. v. 17, n. 12, p. 3224 - 3238. 2021.

LEI, Y; SCHAFFER, D, V. A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Estados Unidos da América. n. 110, v. 52, p. 5039 - 5048. 2013.

LEONARDI, G, C. FALZONE, L; SALEMI, R; ZANGHI, A; SPANDIDOS, D, A; MCCUBREY, J, A; CANSISO, S; LIBRA, M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **Int J Oncol**. Estados Unidos. v. 54, n. 4, p. 1071 - 1080. 2018

LI, D; MARCHENKO, N, D; MOLL, U, M. SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. **Cell Death Differ**. Reino Unido. n. 18, v.12, p. 1904 - 1913. 2011.

LI, M; KNAPP, S, K; IDEN, S. Mechanisms of melanocyte polarity and differentiation: What can we learn from other neuroectoderm - derived lineages? **Curr Opin Cell Biol**. Reino Unido. v. 67. p. 99 - 108. 2020.

LI, T; ZHANG, C; HASSAN, S; LIU, X; SONG, F; CHEN, K; ZHANG, W; YANG, J. Histone deacetylase 6 in cancer. **J Hematol Oncol**. Reino Unido. v. 11, n. 1 p. 111 - 121. 2018.

LI, Y; YANG, R; CHEN, L; WU, S. CD38 as an immunomodulator in cancer. **Future Oncol**. Inglaterra. v. 16, n. 34, p. 2853 - 2861. 2020

LIANG, T; FANG, H. Structure, functions and selective inhibitors of HDAC6. **Curr Top Med Chem**. India. n.18 , v. 28, p. 2429 - 2447.

LIU, J; GU, J; FENG, Z; YANG, Y; NINGWEN, Z; LU, W; QI, F. Both HDAC5 and HDAC6 are required for the proliferation and metastasis of melanoma cells. **J. Transl Med.** Reino Unido. v. 14, n. 7, p. 1- 13. 2016

LIU, J; LUAN, W; ZHANG, Y; GU, J; SHI, Y; YANG, Y; FENG, Z; QI, F. HDAC6 interacts with PTPN1 to enhance melanoma cells progression. **Biochem Biophys Res Commun.** Estados Unidos. n. 495, v. 04. p. 2630 - 2636. 2018.

LOH, C; CHAI, J, Y; TANG, T, F; WONG, W, F; SETHI, G; SHANMUGAM, M, K; CHONG, P, P; LOOI, C, Y. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. **Cells.** Suíça. n. 8, v. 10. 2010

LUCERO, O , M; DAWSON, D, W; MOON, R, T; CHEIN, A, J. A re-evaluation of the “oncogenic” nature of Wnt/B-catenin signaling in melanoma and other cancer. **Curr Oncol Rep.** Brasil. n. 12, v. 5, p. 314 -318. 2010.

LUO, C; SHEN, J. Research progress in advanced melanoma. **CANCER LETTERS.** Suíça. v.397, p 120-126. 2017.

MCCLURE, J, J; LI, X; CHOU, J. Advances in Cancer Research. Chapter Six – Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics. **Elsevier.** França. v. 138, p 183 – 211. 2018.

METCALFE, C; IBRAHIM, A, E, K; GRAEB, M; ROCHE, M; SCWARZ-ROMOND, T; FIEDLER, M; WINTON, D, J; CORFIELD, A; BIENZ, M. Dvl2 promotes intestinal length and neoplasia in the ApcMin mouse model for colorectal cancer. **Cancer Res.** Noruega. n.70, v. 16, p. 6629- 6638. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. ATLAS *ON-LINE* DE MORTALIDADE (INCA/MS). Câncer de pele melanoma em Representação espacial das taxas brutas por idade pela população mundial de mortalidade por câncer, por 100.000 nas Unidades da Federação. Disponível em <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo06/consultar.xhtml#panelResultado>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA/MS). Câncer de pele melanoma, 2021. Disponível em <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>

MISHRA, H, MISHRA, P, K; EKIELSKI, A; JAGGI, M; IQBAL, Z; TALEGAONKAR, S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **J Cancer Res Clin Oncol.** Alemanha. v. 144, n. 12, p. 2283 – 2302. 2018

MORT, R, L; JACKSON, I, J; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. **Development.** Inglaterra. n. 142, v. 4, p. 620 - 632. 2015.

NORVELL, A; MCMAHON, S, B. Cell biology. Rise of the rival. **Science**. Inglaterra. 327, p. 5968, p. 964 - 965. 2010.

NOVIKOV, N, M; ZOLOTARYOVA, S, Y; GAUTREAU, A, M; DEISOV, E, V. Mutational drives of câncer cell migration and invasion. **Br J Cancer**. Brasil n. 124, v.1, p. 102 – 114. 2021.

O'NEIL, C, H; SCOGGINS, C, R. Melanoma. **J Sug Oncol**. Estados Unidos da América. v.120, n. 05, p. 873-88, 2019.

ODES, E, J; RANDOLPH-QUINNEY, P, S; STEYN, M; THROCKMORTON, Z; SMILG, J, S; ZIPFEL, B; AUGUSTINE, T, N; BEER, F; HOFFMAN, J, W; FRANKLIN, R, D; BERGER, L, R. Earliest hominin cancer: 1,7 – million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. **S Afr J Sci**. África do Sul. v. 112, n. 7/8, p. 1 – 5. 2016.

OZRETIC, P; HANZIC, N; PROUST, B; SABOL, M; TRNSKI, D; RADIC, M; MUSANI, V; CRIBILLI, Y; MILAS, I; PULJIZ, Z; BOSNAR, M, H; LEVANAT, S; SLADE, N. Expression profiles of p53/p73, NME and GLI families in metastatic melanoma tissue and cell line. **SCI REP**. Estados Unidos da América. n. 12470, v. 9. 2019.

PAI, J; HSU, C; HSIEH, Y; TSAI, T; HUA, K; WENG, M. Suppressing migration and invasion of H1299 lung cancer cells by honokiol through disrupting expression of HDAC6-mediated matrix metalloproteinase 9. **Food Sci Nutri**. Estados Unidos da América. N. 8, v. 3, p. 1534 – 1345. 2020.

PENG, J; MA, Y; ZHAO; X; YANG, X; WANG, H. Constitutive β -catenin overexpression represses Lncrna MIR100HG Transcription via HDAC6-mediated histone modification in colorectal cancer. **Mol Cancer Res**. Reino Unido. n. 20, v. 6, p. 949 - 959. 2022.

PEPPONI, R; MARRA, G; FUGGETTA, M, P; FALCINELLI, S; PAGANI, E; BONMASSAR, E; JIRICNY, J; D'ATRI, S. The effect of O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cell to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. **JPET**. Estados Unidos da América. n. 2, v. 304, p. 661 – 668. 2002

PETERS, J, M; GONZALEZ, F, J. The evolution of carcinogenesis. **Toxicol Sci**. Inglaterra. n. 165, v. 2, p. 272 - 276. 2018

PHAM, T; ROBINSON, K; XU, L; PAVLOVA, M, N; SKAPEK, S, X; CHEN, E, Y. HDAC6 promotes growth, migration/invasion, and self-renewal of rhabdomyosarcoma. **Oncogene**. Estados Unidos da América. n. 40, v. 3, p. 578 – 591. 2021.

PUCK, T, T; MARCUS, P, I. Action of x-rays on mammalian cells. **J. Exp. Med.** Estados Unidos da América. v.103, n. 5, p. 653 – 666. 1956.

QUIRT, I; VERMA, S; PETRELLA, T; BAK, K; MANYA CHARETTE. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: A systematic review. **The Oncologist.** Estados Unidos da América. n. 12, v. 9, p. 1114-1123. 2007.

RAFEHI, H; ORLOWSKI, C; GEORGIADIS, G, T; VEVERIS, K; EL-COSTA, A; KARAGIANNIS, T, C. Clonogenic assay: adherent cell. **J Vis Exp.** Estados Unidos da América. n. 13, 49. 2011.

READ, J; WADT, K, A, W; HAYWARD, N, K. Melanoma genetics. **J Med Genet.** Bulgária. n. 53, v. 1, p. 1 – 14. 2016.

REGAD, T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. **Cell Mol Life Sci.** Suíça. n. 70, v. 21, p. 4055 - 4065. 2013.

ROBLES-ESPINOZA, C, D; ROBERTS, N, D; CHEN, S; LEACY, F, P; ALEXANDROV, L, B; PORNPUTTAPONG, N; HALABAN, R; KRAUTHAMMER, M; CUI, R; BISHOP, D, T; ADAMS, J, D. Germline MC1R status influences somatic mutation burden in melanoma. **Nat Commun.** Reino Unido. v. 7. 2016.

RYU, H; SHIN, D; LEE, D, H; CHOI, J; HAN, G; LEE, K, Y; KWON, S, H. HDAC6 deacetylates p53 at lysines 381/382 and differentially coordinates p53-induced apoptosis. **Cancer let.** Suíça. n. 391, p. 162 – 171. 2017

RYU, H; SHIN, D; LEE, D; WON, H; KWON,S. A potente hydroxamic acid-based, small-molecule inhibitor A452 preferentially inhibits HDAC6 activity and induces cytotoxicity toward cancer cells irrespective of p53 status. **Carcinogenesis.** Reino Unido. n. 39, v. 1, p. 71 – 83. 2018.

SALEM, M, D. Biology of human melanocyte development, Piebaldism and Waardenburg syndrome. **Pediatr Dermatol.** Estados Unidos. n. 36, v. 1, p. 72 - 84. 2019.

SARKAR, D; LEUNG, E, Y; BAGULEY, B, C; FINLAY, G, J; ASKARIAN-AMIRI, M, E. Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. **Epigenetic.** Holanda. n. 12, n. 2, p. 103 – 121. 2015.

SATO, A; TAKAKO A; ISONO, M; ITO, K; ASANO, T. Panobinostat synergizes with bortezomib to induce endoplasmic reticulum stress and ubiquitinated protein accumulation in renal cancer cell. **BCM Urol.** Reino Unido. n. 14, v. 71. 2014.

SAUKA-SPRENGLER, T; BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Nat Rev Mol Cell Biol.** Reino Unido. n. 9, v. 7, p. 557 - 568. 2008.

SCHADENDORF, D; AKKOOI, A, C, J; BERKING, C; GRIEWANK, K, G; GUTZMER, R; HAUSCHILD, A. Melanoma. **LANCET**. Reino Unido. v. 392, v. 10151, p. 971 – 984. 2018.

SEDDIKI, R; NARAYANA, G, H, S; STRALE, P; BALCIOGLU, H, E; PEYRET, G; YAO, M; LE, A, P; LIM, C, T; YAN, J; LADOUX, B; MÈGE, E, M. Force-dependent binding of vinculin to α -catenin regulates cell-cell contact stability and collective cell behavior. **Mol Biol Cell**. Estados Unidos da América. v. 29, n. 4, p. 380 -388. 2018.

SHAO, Y; ZHU, F; ZHU, S; BAI, L. HDAC6 suppresses microRNA-199a transcription and augments HPV-positive cervical cancer progression through Wnt5a upregulation. **Int J Biochem Cell Biol**. Reino Unido. n. 136. 2021.

SHERR, C, J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Res**. Noruega. n. 60, v. 14. 2020.

SILVA, A; DAWSON, S, N; ARENDS, M, J; GUTTULA, K; HALL, N; CAMERON, E, A; HUANG, T, H, M; BRENTON, J, D; TAVARÉ, S; BIENZ, M; IBRAHIM, A, E. Boosting WNT activity during colorectal cancer progression through selective hypermethylation of WNT signaling antagonist. **BMC Cancer**. Reino Unido. n. 29, v. 14. 2014

SOARES, C, P; MIDLEJ, V; OLIVEIRA, M, E, W; BENCHIMOL, M; COSTA, M, L; MERMELSTEIN, C. 2D and 3D- organized cardiac cells shows differences in morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. **PLoS One**. Estados Unidos da America. v. 7, v. 5. 2012.

SOLONAS, G; PORTA-DE-LA-RIVA, M; AGUSTÍ, C; CASAGOLDA, D; AGUILERA, F, S; LARRIBA, M, J; PONS, F; PEIRÓ, S; ESCRIVÀ, M; MUÑOZ, A; DUÑACH, M; HERREROS, A, G; BAULIDA, J. E-caderin controls beta-catenin and NF-kappaB transcription activity in mesenchymal gene expression. **J Cell Sci**. Estados Unidos da América. n. 121, v. 13, p. 2224 - 2234. 2008.

SOTO, J, L; CABRERA, C, M; SERRANO, S; LÓPEZ-DIAS, A. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A e CDKN2B. **BMC CANCER**. Reino Unido. n. 5, v. 36, p. 1 – 9. 2005

SOURO, E; ELIADES, P; SHANNON, K; STRATIGOS, A; TSAO, H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management – genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. **J Am Acad Dermatol**. Estados Unidos da América. n. 74, v. 3, p. 395 – 407. 2016

SUBRAMANIAN, C; JARZEMBOWSKI, J, A; OPIPARI, A, W; CASTLE, V, P; KWOK, R, P, S. HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-BAX binding in neuroblastoma. **Neoplasia**. Estados Unidos da América. n. 8, v. 12, p. 726 – 734. 2011.

SUN, J; QIAN, X; ZHANG, F; TANG, X; JU, C; LIU, R; ZHOU, R; ZHANG, Z; LV, X; ZHANG, C; HUANG, G. HDAC6 inhibitor WT-161 induces apoptosis in retinoblastoma cells and synergistically interacts with cisplatin. **Transl Cancer Res.** China v. 08, n. 08, p. 2759 - 2768. 2019.

SUN, J; WU, W; TANG, X; ZHANG, F; JU, C; LIU, R; LIANG, Y; YU, B; LV, B; GUO, Y; ZENG, D; TAO, X; WANG, M; ZHANG, Z; ZHANG, C; LY, Y, B. HDAC6 inhibitor WT161 performs anti-tumor effect on osteosarcoma and synergistically interacts with 5-FU. **Biosci Rep.** Reino Unido. v. 41, n.4. 1-14 2021.

TANG, J; FEWINGS, E; CHANG, D; ZENG, H; LIU, S; JORAPUR, A; BELOTE, R, L; MCNEAL, A, S; TAN, T, M; YEH, I; ARRON, S, T; JUDSON-TORRES, R; BASTIAN, B; SHAIN, A, H. The genomic landscapes of individual melanocytes from human skin. **Nature.** Reino Unido. n. 587, v. 7830, p. 600 - 605. 2020

TEIMOURI, F; NIKFAR, S; ABDOLLAHI. Efficacy and side effects of dacarbazine in comparison with temozolomida in the treatment of malignant melanoma: a meta-analysis consisting of 1314 patients. **Melanoma Res.** Estados Unidos. v. 25, n. 5, p. 381 – 389. 2013.

THIEM, A; HESBACHER, S; KNEITZ, H; PRIMIO, T; HEPPT, M; HERMANN, H, M; GOEBELER, M; MEIERJOHANN, S; HOUBEN, R; SCHRAMA, D. IFN-gamma-induced PD-L1 expression in melanoma depends on p53 expression. **J Exp Clin Cancer Res.** Itália. n. 38, v. 1, p. 397 – 412. 2019.

TOUSSI, A; MANS, N; WELBORN, J; KIURU, M. Germline mutations predisposing to melanoma. **J Cutan Pathol.** Dinamarca. n. 74, v. 7, p. 606 – 616. 2020

URDICIAIN, A; ERAUSQUIN, E; MELENDEZ, B; REY, J, A; IDOATE, M, A; CASTRESANA, J, S. Tubastatin A, an inhibitor of HDAC6, enhances temozolomide-induced apoptosis and reverses the malignant phenotype of glioblastoma cells. **Int J Oncol.** Estados Unidos da América. v. 54, n. 5, p. 1797 – 1808. 2019.

URDICIAIN, A; ERAUSQUIN, E; ZELAYA, M, V; ZAZPE, I; LANCIEGO, J, L; MELÉNDEZ, B; REY, J, A; IDOATE, M, A; GALDO, N, A, R; CASTRESANA, J, S. Silencing of histone deacetylase 6 decreases cellular malignancy and contributes to primary cilium restoration, epithelial-to-mesenchymal transition reversion, and autophagy inhibition in glioblastoma cell lines. **Biology (Basel).** Reino Unido. n. 10, v. 6, p. 467 – 493. 2021.

URMACHER, C. Histology of normal skin. **Am J Surg Pathol.** Estados Unidos da América. v. 14, n. 7, p. 671 - 687. 1990.

VERDIN, E; OTT, M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol.** Reino Unido. v. 16, n. 4. p. 258 - 264. 2015.

VOGEL, C, J; SMIT, M, A; MADDALO, G; POSSIK, P, A; SPARIDANS, R, W; BURG, S, H; VERDEGAAL, E, M; HECK, A, J, R; SAMATAR, A, A; BEIJNEN, J, H; ALTELAAR, M, A, F; PEEPER, D, S. Cooperative induction of apoptosis in NRAS mutante melanoma by inhibition of MEK and ROCK. **Pigment Cell Melanoma Res.** Reino Unido. n. 28, v. 3, p. 307 – 317. 2015.

WAGNER, M; KOYASU, S. A 3D skin melanoma spheroid-based model to assess tumor-immune cell interactions. **Bio Protocol.** Estados Unidos da América. n. 10, v. 23. 2020

WANG, Q; ZHANG, Y; YANG, C; XIONG, H; LIN, Y; YAO, J; XIE, L; ZHAO, W; YAO, Y; NING, Z; ZENG, R; XIONG, Y; GUAN, K; ZHAO, S; ZHAO, G. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. **Science.** Reino Unido. n. 327, v. 5968, p. 1004 - 1007. 2010.

WANG, X; WANG, L; SUN, Y; CHEN, B; XIONG, L; CHEN, J; HUANG, M; WU, J; TAN, X; ZHENG, Y; HUANG, S; LIU, Y. MiR-22-3p inhibits fibrotic cataract through inactivation of HDAC6 and increase of α -tubulin acetylation. **Cell Prolif** . Reino Unido. n. 35, v. 11, 2020.

WANG, Y, F; JIANG, C, C, J; KIEJDA, K, A; GILLESPIE, S; ZHANG, X, D; HERSEY, P. Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. **Clin Cancer Res.** Irã. n. 13, v. 16, p. 4934 – 42. 2007.

WEBSTER, M, R; 3RD, C, H, K; WEERARATNA, A, T. The WNTs of change: How WNT regulates phenotypic switching in melanoma. **Biochim Biophys Acta.** Reino Unido. n. 1856, n. 2, p. 244-51. 2015

WEI, Y; LU, C; ZHOU, P; ZHAO, L; LYU, X; YIN, J; SHI, Z; YOU, Y. EIF4A3 – induced circular RNA ASAP1 promotes tumorigenesis and temozolomida resistance of glioblastoma via NRAS/MEK1/ERK1-1 signaling. **Neuro Oncol.** Estados Unidos da América. n. 23, v. 4, p. 611 – 624. 2021.

WILLIAMS, K, A; ZHANG, M; XIANG, S; WANG, C; BAI, W. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylates histone deacetylase 6 (HDAC6) at Serine 1035 to stimulate cell migration. **Enzymology.** Estados Unidos da América. n. 288, v. 46, p. 33156 – 33170. 2013.

WILLIAMS, P, F; OLSEN, C, M; HAYWARD, N, K; WHITEMAN, D, C. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. **Int J Cancer.** Estados Unidos da América. v. 129, n. 7, p. 1730 -1740. 2011.

WILSON; M, A; SCHUCHTER, L, M. Chemotherapy for melanoma. **Cancer Treat. Res.** Coreia. v. 167, p. 209 – 229. 2016.

WU, H; CHEN, L; ZHU, F; HAN, X; SUN, L; CHEN, K. The cytotoxicity effect of resveratrol: cell cycle arrest and induces apoptosis of breast cancer 4T1 cells . **Toxins (Basel)**. Suíça. n.11, v. 12. 2019.

WU, J; XIANG, S; ZHANG, M; FANG, B; HUANG, H; KWON, O, K; ZHAO, Y; YANG, Z; BAI, W; BEPLER, G; ZHANG, X, M. Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates extracellular signal-regulated (ERK1) and thereby stimulates ERK1 activity. **J Biol Chem**. Estados Unidos da América. n. 293, v. 6, p. 1976 – 1993.

XU, X; DING, P; SHI, L; WU, G; MA, X. LukS-PV inhibits hepatocellular carcinoma cells migration by downregulating HDAC6 expression. **BMC Cancer**. Reino Unido. v. 22, n. 01. 2022.

YAMAKITA, Y; TOTSUKAWA, G; YAMASHIRO, S; FRY, D; ZHANG, X; HANKS, S, K; MATSUMURA, F. Dissociation of FAK/p130cas/c-Src complex during mitosis: role of mitosis -specific serine phosphorylation of FAK. **J Cell Biol**. Alemanha. v. 144, n. 2, p. 315 - 324. 1999.

YAN, X; QU, X; LIU, B; ZHAO, Y; XU, L; YU, S; WANG, J; WANG, L; SU, J. Autophagy-induced HDAC6 activity during hypoxia regulates mitochondrial energy metabolism through the β -catenina/COUP-TFII Axis in hepatocellular carcinoma cells. **Front Oncol**. Suíça. n. 11, v.11. 2021

YEON, M; KIM, Y; JUNG, H, S; JEOUNG, D. Histone Deacetylase Inhibitors to Overcome Resistance to Targeted and Immuno Therapy in Metastatic Melanoma. **Front Cell Dev Biol**. Suíça. v. 8, p. 1 – 16. 2020.

YIN, Z; XU, W; XU, H; ZHENG, J; GU, Y. Overexpression of HDAC6 suppresses tumor cell proliferation and metastasis by inhibition of the canonical Wnt/ β -catenina signaling pathway in hepatocellular carcinoma. **Oncol Lett**. Brasil v. 16, n. 6, p. 7082 - 7090. 2018.

YU, B; LIU, L; CAI, F; PENG, Y; TANG, X; ZENG, D; LI, T; ZHANG, F; LIANG, Y; YUANG, X; LI, J; DAI, Z; LIAO, Q; LV, X, B. The synergistic anticancer effect of the bromodomain inhibitor OTX015 and histone deacetylase 6 inhibitor WT-161 in osteosarcoma. **Cancer Cell Int**. Reino Unido. v. 22, n 64. 2022.

YU, J; MA, M; MA, Z; FU, J. HDAC6 inhibition prevents TNF- α and induces caspase 3 activation in lung endothelial cell and maintains cell-cell junction. **Oncotarget**. Estados Unidos da América. n. 7, v. 34, p. 54714 – 54722. 2016.

ZHANG Y, LI N, CARON C, MATTHIAS G, HESS D, KHOCHBIN S, MATTHIAS P. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. **EMBO J**. Alemanha. v. 22, n. 5, p. 1168 - 1179. 2003

ZHANG, J; STEVENS, M, F, G; BRADSHAW, T, D. Temozolomide: Mechanisms of action, repair and resistance. **Curr Mol Pharmacol**. Holanda. v. 5, n. 1, p. 102 -114. 2012.

ZHANG, L; LIU, N; XIE, S; HE, X; ZHOU, J; LIU, M; LI, D. HDAC6 regulates neuroblastoma cell migration and may play a role in the invasion process. **Cancer Biol Ther**. Estados Unidos da América. n. 15, v. 11, p. 1561 - 1570. 2014.

ZHANG, Z; HAO, C; ZHANG, R; PEI, X; LI, J; WANG, L. A Gil inhibitor GANT61 suppresses cell proliferation, promotes cell apoptosis and induces G1/G0 cycle retardation with a dose- and time-dependent manner through inhibiting Notch pathway in multiple myeloma. **Cell Cycle**. Estados Unidos da América. n. 19, v. 16, p. 2063 - 2073. 2020

ZHAO, C; DONG, H; XU, Q; ZHANG, Y. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in cancer: patent review (2017 – present). **Expert Opin Ther Pat**. Reino Unido. v. 30, n. 4, p. 263 – 274. 2020.

ZHAO, W; SEOJIMA, H; HIGASHIMOTO, K; NAKAGAWACH, T; URANO, T; KUDO, S; MATSUKURA, S; MATSUO, S; JOH, K; MUKAI, T. Theessential role os histone H3 lys 9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island. **J Biochem**. Japão. n. 127, v. 3, p. 431 – 440. 2005.