

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
CURSO DE MEDICINA**

**GABRIEL MILAN EBERS
MARCOS DIAS WORDELL**

**OS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS DO ÉSTER FENETIL DO ÁCIDO
CAFEICO NO MELANOMA:
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ESTUDOS DE BASE**

**CHAPECÓ
2021**

**GABRIEL MILAN EBERS
MARCOS DIAS WORDELL**

**OS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS DO ÉSTER FENETIL DO ÁCIDO
CAFEICO NO MELANOMA:
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ESTUDOS DE BASE**

Trabalho de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Médico(a).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini

**CHAPECÓ
2021**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Ebers, Gabriel Milan

Os potenciais terapêuticos do éster fenetil do ácido cafeico no melanoma: uma revisão sistemática de estudos de base / Gabriel Milan Ebers, Marcos Dias Wordell.-- 2021.

30 f.:il.

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Dulce Bagatini

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em
Medicina, Chapecó, SC, 2021.

1. Melanoma. 2. CAPE. 3. Quimioterapia. 4. Mecanismo de ação. 5.
Composto fenólico. I. Bagatini, Margarete Dulce, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

GABRIEL MILAN EBERS
MARCOS DIAS WORDELL

**OS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS DO ÉSTER FENETIL DO ÁCIDO
CAFEICO NO MELANOMA:
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ESTUDOS DE BASE**

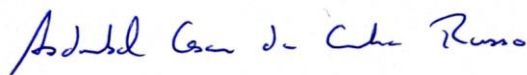
Trabalho de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da
Fronteira Sul (UFFS), como requisito parcial para obtenção do grau médico.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 15/10/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Margarete Dulce Bagatini – UFFS
Orientadora



Prof. Esp. Asdrubal Cesar da Cunha Russo – UFFS
Avaliador



Prof.ª Dr.ª Daniela Zanini – UFFS
Avaliadora

**OS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS DO ÉSTER FENETIL DO ÁCIDO
CAFEICO NO MELANOMA:
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ESTUDOS DE BASE**

Gabriel Milan Ebers¹. Marcos Dias Wordell². Margarete Dulce Bagatini³.

1. Departamento de Medicina. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: gab.mil.eb.s@outlook.com.

2. Departamento de Medicina. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: marcosdwordell@gmail.com

3. Departamento de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: margarete.bagatini@uffs.edu.br. ID ORCID: 0000-0001-9263-4980.

Autor Correspondente: Departamento de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: margarete.bagatini@uffs.edu.br. ID ORCID: 0000-0001-9263-4980.

Resumo

O desenvolvimento do câncer de pele do tipo melanoma é extremamente agressivo e aumentou nas últimas décadas, chegando à posição de 19º câncer mais incidente no mundo em 2018, segundo a Globocan, sendo que a mortalidade estimada foi de 60.712. Com o objetivo de aprimorar o tratamento, sobrevida e bem-estar de pacientes com esse tipo de câncer, novas moléculas atuantes estão sendo estudadas, sendo que o éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) é um candidato promissor e o foco dessa revisão sistemática. A partir disso, uma busca nas bases de dados PubMed, Science Direct, SciELO e LILACS foi efetuada, resultando em 68 registros, dos quais foram avaliados pelos dois primeiros autores e cujas dúvidas foram sanadas pelo pesquisador sênior, restando apenas 11 artigos. Foram excluídos artigos que não trabalharam com o CAPE isoladamente, que eram literatura cinza ou estavam em fase clínica. Os resultados mostraram que há uma ação do CAPE contra o melanoma, de maneira dose-dependente, com quatro artigos apontando IC50 de 15 µM, enquanto outro mais recente apontando valores mais altos. A via de ação também foi estudada, mostrando que o CAPE possivelmente atua na depleção de GSH e inibição de GST. Também provavelmente inibe a ação da XIAP, proteína anti-apoptótica, e o evento de afrouxamento de VE-Caderinas, presente na neoangiogênese, mediado pela via ativada por VEGF no receptor VEGFR-2. Por fim, mostrou efeito inibitório na via de proliferação celular do PI3K/AKT/mTOR. A partir disso, é possível concluir que o CAPE é um potencial coadjuvante antitumoral contra o melanoma.

Palavras-chave: Melanoma, CAPE, mecanismo de ação, composto fenólico, quimioterapia

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de câncer de pele tipo melanoma aumentou nas últimas décadas, chegando à posição de 19º câncer mais incidente no mundo em 2018, segundo a Globocan, com números estimados em 287.723 novos casos para aquele ano, e uma prevalência de 965.623 em 5 anos. Na América Latina e Caribe, os dados da Globocan apontam que em 2018 a ocorrência do melanoma cutâneo foi de 18.212 e o número de pessoas com a doença em 5 anos foi de 53.440 segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) [1]. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) [2] estimou um total de 8.450 novos casos de câncer de pele tipo melanoma, sendo 4.200 casos em homens e 4.250 em mulheres, para o ano de 2020.

O surgimento da doença é influenciado por múltiplos fatores, como idade, gênero, etnia e tipo/tempo de exposição a agentes carcinogênicos. As populações caucasianas, por exemplo, tiveram um aumento mais significativo desse tipo de neoplasia desde 1960 (REF). Com relação ao gênero, os homens são cerca de 1,5 vezes mais suscetíveis que as mulheres, de maneira geral; entretanto, até por volta dos 40 anos de idade as mulheres são o gênero mais afetado (REF). Quanto aos fatores de risco mutáveis, o principal é a exposição a raios solares UV, devido a sua capacidade genotóxica. Segundo Whiteman et al (ano) [3], o aumento visto e previsto para os casos de melanoma no mundo se dá principalmente em razão do aumento da expectativa de vida das populações e a incidência significativamente maior de câncer nos idosos (REF).

É fato que há diferenças na epidemiologia do melanoma para homens e mulheres. Diversas hipóteses são formuladas, mas um artigo de Belenghi et al. (ano) [4] pesquisou mecanismos patogênicos por trás disso, apontando que a regulação do cromossomo X talvez esteja envolvido nessa diferença. Isso ocorreria devido ao fato de que, quando ocorre a inativação aleatória de um dos X, partes deste cromossomo podem escapar da inativação e permanecer em atividade, promovendo efeitos protetivos devido a codificação de alguns miRNAs (REF).

A mortalidade por melanoma cresceu nos EUA em 1,4% ao ano entre 1977 e 1990. Entre 1990 e 2002 a mortalidade foi reduzida em 0,3% ao ano [5], voltando a crescer em seguida. Em 2018, a mortalidade estimada pelo Globocan foi de 60.712 no mundo, e 5.287 na América Latina e Caribe, enquanto no Brasil, dados do INCA[2] mostraram 1.791 mortes, sendo 1.038 homens e 753 mulheres. Os custos de

tratamento da doença nos EUA, em 2011, foram de 457 milhões de dólares, e as projeções indicaram aumento de 252,4% nos custos até o ano de 2030, caso não fossem tomadas medidas de prevenção [6].

Com o objetivo de aprimorar o tratamento antitumoral, reduzir custos e melhorar a qualidade de sobrevivência de pacientes com melanoma, diversos compostos têm sido estudados pela comunidade científica, sendo que o éster de fenetil do ácido cafeico (CAPE) se mostrou um composto natural de alto potencial biológico em diversos estudos (aqui podem colocar referências que abordem o CAPE e o melanoma).

O CAPE é um composto fenólico encontrado em diversas plantas, sendo um dos principais componentes do própolis. Uma revisão por Lv et al. [7] mostrou que este composto possui propriedades antitumorais para as seguintes neoplasias: leucemias das linhagens linfóide e mielóide, neoplasias de mama, do sistema digestório, da próstata, de ovário e útero e de cabeça e pescoço. Também mostrou propriedades neuroprotetoras contra Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, concussões encefálicas, dor neuropática e isquemia transiente (REF). Age com efeito protetivo contra injúria cardiopulmonar e hepática. Por fim, também aparenta ter propriedades antifúngicas e antibacterianas, com destaque para *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, dois patógenos extremamente comuns.

Apresenta-se como uma molécula com capacidade de prevenir danos no DNA de células saudáveis, tanto por radicais livres, quanto por exposição à radiação ultravioleta, bem como parece possuir potencial citotóxico em células tumorais melanocíticas [8].

OBJETIVOS

Essa revisão visa prover informações compiladas de diversos estudos em questões que envolvam o potencial terapêutico ou não do CAPE em células melanocíticas *in vitro* e *in vivo*, por seus diversos métodos possíveis de aplicação, bem como os seus mecanismos de ação nessas células, seja como controle de crescimento tumoral por mecanismos anti reprodução celular ou mesmo por potencial citotóxico, que pode ou não ser específico as células neoplásicas.

METODOLOGIA

A pergunta norteadora da pesquisa inicial foi: o uso de ácido cafeico e/ou seus derivados têm potencial terapêutico no melanoma? Assim, desenvolvemos a bússola da revisão através do acrônimo PICOT: P - população; I - intervenção; C - controle e comparação; O - desfecho; T - tipo de estudo.

P: células melanocíticas *in vitro* ou animais *in vivo* com melanoma

I: Ácido cafeico e/ou seus derivados

C: Outro tratamento já estabelecido, evolução natural

O: Área/Volume do tumor, % viabilidade celular

T: Qualquer tempo de intervenção

Para recuperação da evidência, em 2020, no mês de novembro, foram realizadas buscas sistemáticas aplicadas nas seguintes bases de dados eletrônicas, com restrição a artigos em inglês, português e espanhol: *PubMed*, *Science Direct*, *SciELO*, e *LILACS*, partindo dos termos e combinações desenvolvidas no Pubmed e adaptadas para as demais plataformas de busca, as quais são: (((((((("chlorogenic acid"[MeSH Terms] OR ("chlorogenic"[All Fields] AND "acid"[All Fields])) OR "chlorogenic acid"[All Fields]) OR ("caffeic acid"[Supplementary Concept] OR "caffeic acid"[All Fields])) OR ("caffeic acid phenethyl ester"[Supplementary Concept] OR "caffeic acid phenethyl ester"[All Fields])) OR ((("caffeic acid"[Supplementary Concept] OR "caffeic acid"[All Fields]) AND (((((((((((((((("analogs and derivatives"[MeSH Subheading] OR ("analogs"[All Fields] AND "derivatives"[All Fields])) OR "analogs and derivatives"[All Fields]) OR "derivatives"[All Fields]) OR "derivable"[All Fields]) OR "derivant"[All Fields]) OR "derivants"[All Fields]) OR "derivate"[All Fields]) OR "derivated"[All Fields]) OR "derivates"[All Fields]) OR "derivation"[All Fields]) OR "derivations"[All Fields]) OR "derivative"[All Fields]) OR "derive"[All Fields]) OR "derived"[All Fields]) OR "derives"[All Fields]) OR "deriving"[All Fields]))) OR ("rosmarinic acid"[Supplementary Concept] OR "rosmarinic acid"[All Fields])) AND (((("melanoma"[MeSH Terms] OR "melanoma"[All Fields]) OR ("cutaneous"[All Fields] AND "melanoma"[All Fields])) OR "cutaneous melanoma"[All Fields]))

Meninos, aqui poderiam dizer que foram considerados os trabalhos que se enquadram nos critérios de inclusão publicados até XXX de 2020 ou 2021 – para pontuar o momento temporal que a revisão aborda.

Os critérios de inclusão foram: 1) estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*; 2) estudos que associam ácido cafeico (e derivados) e melanoma; 3) estudos que demonstram o mecanismo de ação do ácido cafeico (e derivados) no melanoma; e 4) estudos que avaliam a efetividade e/ou segurança do uso dos compostos para o melanoma. Já os critérios de exclusão foram: 1) trabalhos da literatura cinzenta (incluem, mas não se restringem apenas a: teses, informes técnicos, sem controle editorial, resumos etc); 2) trabalhos que não analisaram o uso do ácido cafeico ou derivados; 3) trabalhos em fase clínica; e 4) trabalhos que não são em uma dessas três línguas: inglês, português ou espanhol.

A avaliação por títulos, resumos e pelos textos integrais foi conduzida por dois pesquisadores independentes (GME; MDW), com amparo de um orientador sênior, para diminuir dúvidas e estabelecer consenso (MDB).

A extração de dados levou em conta o autor, local de desenvolvimento e ano do estudo, amostra utilizada, qual tipo de ação foi realizada, qual composto foi utilizado, a dose, por quanto tempo, eficácia e segurança.

Após análise dos artigos e de seus compostos, optou-se por focar no composto CAPE para a realização desta revisão sistemática. Os trabalhos que tratavam de outros compostos, como o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico e outros foram excluídos devido ao baixo número de estudos ou dados.

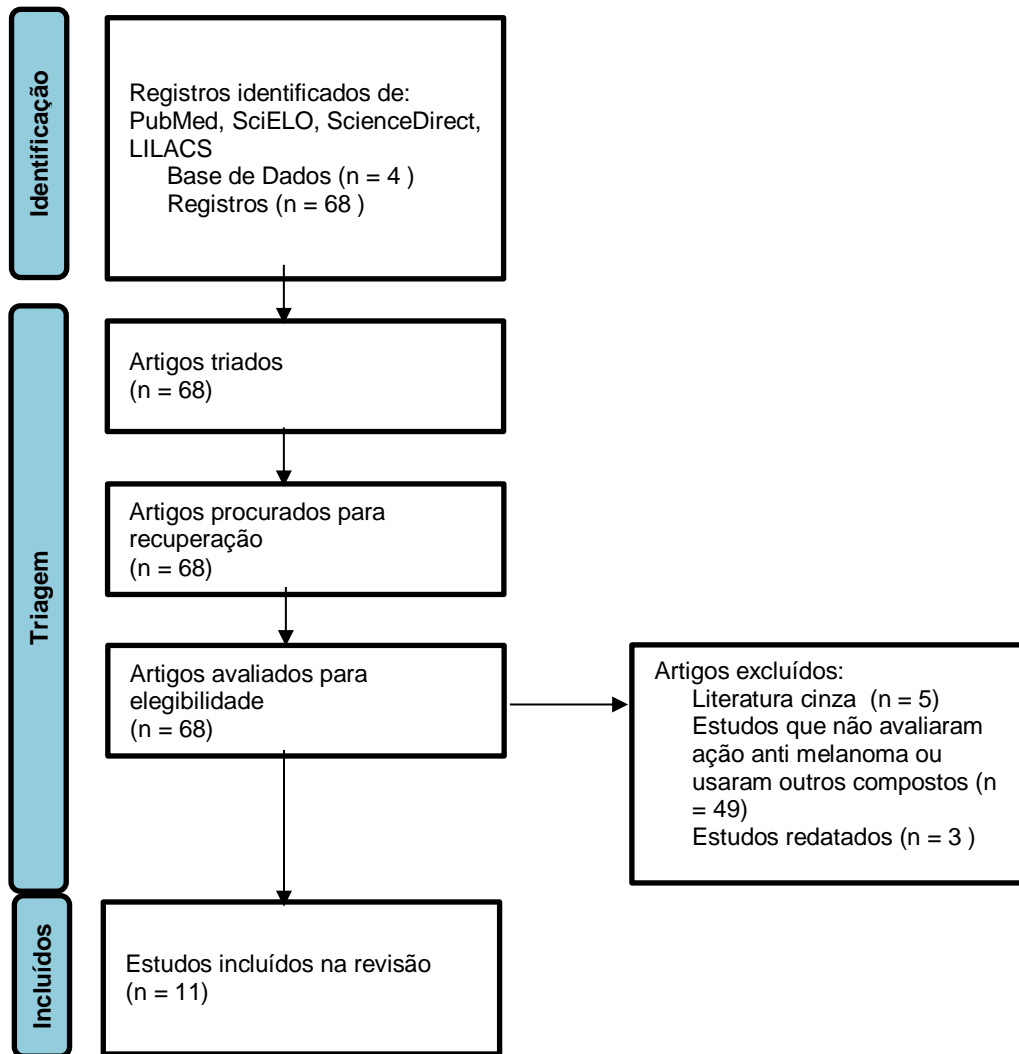
E por fim, as referências foram primariamente construídas e manejadas com auxílio do programa gratuito Zotero e também do site de referências MORE oferecido pela UFSC.

RESULTADOS

A busca resultou em um total de 68 registros, os quais foram avaliados pelos dois primeiros autores e cujas dúvidas foram sanadas pelo pesquisador sênior, chegando ao número final de 11 artigos.

Figura 1 - Fluxograma da seleção dos artigos para o trabalho

Identificação de estudos por bases de dados e registros

Tabela 1 – Resultados da ação do CAPE *in vitro*

População / Controle	Dose	Viabilidade celular (%)	IC50	Referências
Me45 e MeWo / Me45 e MeWo não tratadas	1µM, 5µM, 10µM, 25µM, 50µM	Me45: 39% sem EP e 18% com; MeWo: 60% sem EP e 39% com.	Respectivamente, 86µM e 106µM sem EP e 28µM e 70.7µM com EP	Choromanska, Saczko e Kublacka (2014)
MV3, melanoma primário, melanoma metastático / mesmas células tratadas com	50 µM	Redução significativa scrambled SiRNA de E2F1 e nocaute ABCB5	-	El-Khattouti et al (2014)

scrambled siRNA de E2F1 e ABCB5				
B16F10 / -	0,1 μ M, 1 μ M, 2 μ M 5 μ M;	Redução significativa com 5 μ M;	-	Lee et al (2013)
B16F0 e SK- MEL-28 / B16F0 e SK-MEL-28 não tratadas	10 μ M, 20 μ M e 30 μ M	Redução significativa	-	Pramanik (2013)
B16-F0, B16- F10, SK-MEL-5, e MeWo para o CAPE	15 μ M, 30 μ M, 50 μ M e 100 μ M	48% com 15 μ M	15 μ M	Kudugunti (2011)
B16F0, B16F10, SK-MEL-28, SK-MEL-5 e MeWo. Para o papel da Tirosina: SK- MEL-28 (100% expressão e 50%) / solução salina DMSO e controle sem intervenção	15 μ M	58 \pm 6 %, 60 \pm 4 %, 57 \pm 3 %, e 51 \pm 6 % / controle 81 \pm 7% e 86 \pm 4 respectivamente. SK- MEL-28: 43+-6 (normal)e 87,5+ (50% diminuída)	15 μ M	Kudugunti (2010)
B16-F0, B16F10, SK- MEL-28, SK- MEL-5 e MeWo / Solução salina DMSO a 50%	15 e 30 μ M	50% com 15	15 μ M	Kudugunti (2009)
HO-1 / mesmas células tratadas com uso de mezerein, ácido micofenólico e ácido retinóico	-	Inibição significativa do melanoma	-	Guarini (1992)

SK-MEL-28 e SK-MEL-170 / -	5 µg/mL e 10 µg/mL	Inibiu a incorporação da [³ H]-Thymidine no DNA, indicando diminuição da síntese de DNA e proliferação celular	-	Grunberger (1988)
----------------------------	--------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---	-------------------

Tabela 2 – Resultados da ação do CAPE *in vivo*

Modelo / Controle	Método	Dose	Volume Tumoral / Peso	N / Nº Grupo	Referências
Camundongos C57BL/6 inoculados com melanoma B16F10 / Recebeu apenas o veículo	Injeção intraperitoneal	0,1mg/kg/dia e 1,0mg/kg/dia por 12 dias	Redução acentuada	3	Chung et al (2013)
Camundongos C57BL/6 inoculados com melanoma B16F0 / Recebeu apenas o veículo	Injeção intraperitoneal	10mg/kg/dia por 5 dias	41+-32 mm ³ e controle 100+35mm ³ / Redução de 43%	12 / 2	Pramanik et al (2013)
Camundongos C57BL/6 inoculados com melanoma B16F10 / Recebeu apenas o veículo	Injeção intravenosa das soluções lipossomais	4 doses de 40mg/Kg num espaço de tempo de 10 dias	Não houve redução significativa	7	Coimbra (2011)
Camundongos C57BL/6 inoculados com melanoma	Injeção intraperitoneal	10, 20 ou 30 mg/kg/dia por 5 dias	61+-33%, 46+-36%, 43+-18% respectivamente e controle 100+-	12 / 4	Kudugunti (2009)

B16F0 / Recebeu apenas o veículo	26% / Não avaliou
-------------------------------------------	----------------------

Choromanska, Saczko e Kublacka [9] compararam a eficácia do CAPE introduzido nas células Me45 e MeWo com eletroporação e sem eletroporação (EP). As primeiras se mostraram mais sensíveis do que as últimas à ação do CAPE, e em ambas as linhagens a ação do composto se mostrou dose dependente e a utilização da EP aprimorou a atividade antitumoral significativamente. O valor IC50 com EP para as linhagens Me45 e MeWo foi de 28 μM e 70,7 μM respectivamente, enquanto que sem a técnica estudada os valores foram de 86 μM e 106 μM respectivamente. Também ocorreu uma redução significativa da razão GSH/GSSG. Finalmente, com exceção das células MeWo a 1 μM de CAPE em 24 horas, todas as outras linhagens, métodos e concentrações foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular. Além disso, com 11 dias de incubação a 50 μM , a viabilidade celular na linhagem Me45 chegou a 39% sem EP e a 18% com EP, enquanto na MeWo esses valores foram de 60% e 39%, respectivamente.

O artigo de El-Khattouti et al. [10] procurou elucidar os mecanismos de resistência à apoptose induzida pelo CAPE/ERF1, em subpopulações de melanoma CD133+. Para isso utilizaram 3 linhagens de melanoma *in vitro* (MV3, *primary melanoma e metastatic melanoma*), tanto CD133+ quanto CD133-. Foi constatado que o uso de 50 μM CAPE obteve redução da viabilidade celular de forma significativa nas populações CD133-, mas não nas populações CD133+ e nos controles não tratados. Foi testado, então, se o CAPE dependia da via do E2F1 para a indução da apoptose nas populações CD133- através do nocaute do E2F1 com o seu SiRNA e com controle negativo onde a sequência de aminoácidos do SiRNA foi bagunçada para prevenir sua ação. Os resultados mostraram que em populações sem o *nocaute* de E2F1 houve importante redução da viabilidade celular em comparação com as populações em que o E2F1 foi nocauteado. Por fim, como foi observado elevada expressão da bomba de efluxo ABCB5 nas populações CD133+, testou-se o *nocaute* deste transportador e a influência disso na resistência ao CAPE. Foi possível registrar que nas populações com *nocaute* de ABCB5 o CAPE promoveu redução significativa da viabilidade celular, enquanto que nas populações com o SiRNA embaralhado, ou seja, sem efeito de nocaute, não houve redução da viabilidade celular.

Lee et al. [11] testaram o uso de CAPE para inibição da síntese de melanina em células B16F10, e utilizando o ensaio MTT obteve que a viabilidade celular da linhagem estudada não foi afetada pelas doses de 0,1, 1 e 2 μM , enquanto que a concentração utilizada de 5 μM obteve redução significativa da viabilidade celular.

Através da inoculação de células melanocíticas B16F10 no subcutâneo do dorso de camundongos C57BL/6, Chung et al. [12] observaram que a administração de CAPE intraperitoneal em concentrações de 0,1 e 1 mg/kg/dia gerou redução acentuada de peso, volume e tamanho de maneira dose dependente, quando comparado ao controle que recebeu apenas PBS. Através do marcador de microvasos CD31, também constataram que houve diminuição na imunocoloração do marcador e na densidade de microvasos nas seções de tumores tratadas com CAPE em comparação com PBS.

No estudo Pramanik et al. [13], células de melanoma B16F0 foram injetadas no subcutâneo dos flancos direitos de camundongos C57BL/6, que após 7 dias, com aproximadamente 70mm³ de volume tumoral, foram divididos em 2 grupos com 12 indivíduos cada. O grupo tratado recebeu CAPE intraperitoneal na dose de 10mg/kg de peso corporal todos os dias, e o controle recebeu apenas o veículo. No dia 13 de tratamento, o volume do tumor tinha atingido valores de 41 \pm 32mm³ nos modelos tratados, enquanto no grupo controle o volume medido foi de 100 \pm 35mm³, representando uma redução de 59% de volume e de 43% de peso. Além da diminuição tumoral, as avaliações mostraram que não houve mudança significativa no peso dos camundongos, indicando que nessa dose pode haver pouca toxicidade.

Com o uso de camundongos machos C57BL/6 pesando entre 20 e 25 gramas e inoculados com melanoma B16F10 no subcutâneo dos flancos, Coimbra et al. [14] deixaram os tumores crescer por 7 dias, até que estivessem em tamanhos palpáveis, quando então foram divididos para um dos grupos de tratamento. Num período de 10 dias, 7 animais receberam 4 injeções intravenosas de solução de CAPE lipossomal (40mg/Kg), 7 controles receberam solução de PBS (veículo) lipossomal (dose equivalente às demais) e 7 receberam solução lipossomal de fosfato de prednisolona (20mg/Kg), além de outros modelos que receberam diferentes drogas e não serão abordadas no presente trabalho. Os resultados demonstraram que a solução lipossomal de CAPE não foi efetiva e não gerou redução significativa do volume tumoral quando comparado ao controle PBS lipossomal ou a solução lipossomal de prednisolona.

No seu estudo mais recente, Kudugunti et al. [15] buscaram esclarecer o mecanismo bioquímico por trás da inibição da Glutathione S-Transferase (GST) pelo CAPE, mediado pela enzima tirosinase, assim como a interferência de proteínas associadas à resistência a múltiplos medicamentos na IC50 do CAPE. Eles testaram o CAPE em concentrações de 0, 15, 25, 50 e 100 μM para inibição de GST em células SK-MEL-28, assim como o ácido cafeico e os controles L-tirosina e 4-hidroxianisol (4-HA). Observaram que houve inibição da GST com as concentrações testadas que variaram de 61 a 86% com CAPE. Com ácido cafeico (CA), a inibição foi menor, de 21-53%, enquanto que com os controles tirosina e 4-HA não houve inibição significativa. Para a citotoxicidade, utilizaram 0, 15, 30, 50 e 100 μM , testando com os mesmos compostos utilizados para a inibição da GST. Demonstraram que 15 μM de CAPE obteve 48% de toxicidade contra as células, enquanto o uso de CA, 4-HA e tirosina em 30 μM demonstrou toxicidade variando de 2 a 27%. O IC50 do CAPE foi de 15 μM , enquanto que o de 4-HA foi de 60 μM . Já o CA e a tirosina obtiveram valores de 2.3 mM e maior que 5 mM respectivamente. A toxicidade do também CAPE foi avaliada com o uso de moduladores, o MK-571, probenecida e ácido etacrínico. Os dois primeiros diminuíram a IC50 do CAPE (15 μM) nas células SK-MEL-28 em 13 e 21% respectivamente, enquanto que com o CAPE em concentração de 30 μM foi obtido diminuição da IC50 em 12 e 9% respectivamente. O ácido etacrínico, inibidor de GST, não mostrou mudança significativa na IC50 do CAPE em ambas as concentrações. Já o papel da tirosinase foi estudado em placentas humanas, onde foram separadas em dois grupos: com tirosinase e sem tirosinase. Foi identificado no grupo com a enzima que CAPE-quinona, que era formada a partir da presença da ação da tirosinase, diminuiu a ação da GST placentária em 70% e 93% com concentrações de 10 e 50 μM respectivamente, diferente do controle sem tirosina.

Kudugunti et al [16] também avaliaram a toxicidade seletiva do CAPE em linhagens de melanoma B16-F0, B16-F10, SK-MEL-5 e MeWo, obtendo os valores de viabilidade celular de $58\pm 6\%$, $60\pm 4\%$, $57\pm 3\%$, e $51\pm 6\%$ respectivamente, com 15 μM de concentração, já nas células amelanóticas SK-Mel-24 e C32, a mesma concentração produziu viabilidade celular de $81\pm 7\%$ e $86\pm 4\%$ respectivamente, todas as linhagens sendo incubadas com o composto por 48h. A IC50 em 48h de células SK-MEL-28 foi de 15 μM , e em comparação com o ácido cafeico, o CAPE produziu citotoxicidade 153 vezes maior. Também constataram que há um aumento na produção de H_2O_2 após exposição de células SK-MEL-28 ao CAPE com

concentrações variando de 15 μM a 300 μM , sendo dose dependente. Para avaliar o papel da enzima Tirosinase, trataram células SK-MEL-28 normais e outra linhagem com 50% a menos de expressão da enzima em questão. A partir disso, foi observado que houve uma significativa redução na toxicidade do CAPE. A viabilidade celular da linhagem normal comparado com a de tirosinase diminuída foi de $43\pm 6\%$ e $87\pm 5\%$ respectivamente. Por fim, foi observado que ocorreu depleção de GSH significativamente após incubação de 1-3h apenas, sem mudanças significativas em viabilidade celular.

Kudugunti et al [17], estudaram a eficácia do CAPE em camundongos machos C57BL/6 entre a 6^a e a 8^a semanas de idade, portadores de melanoma B16F0 injetado no subcutâneo nos flancos laterais direitos. Os espécimes foram randomizados em grupos de 12 indivíduos, e os seus grupos foram randomizados para controle ou terapias. Iniciou-se no 7^o dia após a inoculação, injeções intraperitoneais de CAPE em doses diárias de 10, 20 ou 30 mg/Kg de massa corporal com 150 μL de solvente tipo solução salina/ DMSO a 50% no grupo de intervenção, até o 13^o dia, enquanto o grupo controle (n=12) recebeu apenas o veículo, sendo todos os modelos sacrificados 2 horas após a última injeção da droga. O trabalho encontrou redução dose-dependente significativa no tamanho do tumor nos grupos tratados com qualquer posologia, quando comparado ao grupo controle (o tamanho do tumor no grupo controle foi de $100\pm 26\%$, no grupo 10mg/Kg/dia foi de $61\pm 33\%$, no grupo 20mg/Kg/dia foi de $46\pm 36\%$ e no grupo 30mg/Kg/dia foi de $43\pm 18\%$), e não houve mudança considerável no peso dos animais. Apesar disso, o estudo demonstrou aumento significativo nos níveis de marcadores de toxicidade, como ALT, tióis livres e peroxidação lipídica renal e hepática, quando utilizadas doses de 20 e 30mg/Kg/dia. Outrossim, experimentaram os efeitos do CAPE *in vitro*, nas linhagens de melanoma B16F0, B16F10, SK-MEL-28, SK-MEL-5 e MeWo, chegando a uma IC50 de 15 μM . A incubação das linhagens celulares por 48 horas com CAPE em IC50, demonstrou inibição de 50% da viabilidade celular de todas as linhagens de melanoma testadas, quando comparadas com o controle que recebeu apenas o veículo (solução salina DMSO) ou do controle sem intervenção.

Um dos estudos mais antigos, escrito por Guarani et al [18], testou o efeito do CAPE na linhagem melanocítica HO-1 e em linhagem de glioblastoma multiforme GBM-18. Como controle, utilizaram mezerein, ácido micofenólico, e ácido retinóico. Os resultados mostraram inibição de ambas as linhagens tumorais, sendo que a

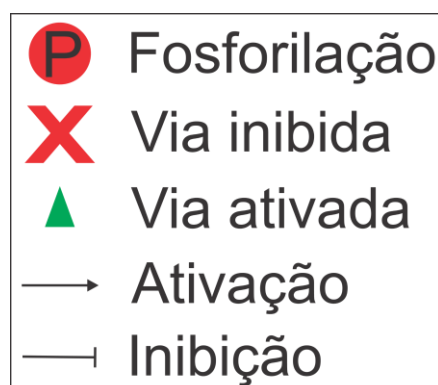
linhagem do melanoma foi a mais sensível aos efeitos do CAPE. Por fim, o uso de mezerein pareceu aumentar o efeito antiproliferativo do CAPE.

Já o primeiro artigo identificado na base de dados PubMed observou a incorporação de [³H]-Thymidine, um marcador utilizado no século XX para avaliar as taxas de síntese de DNA e proliferação celular. Este estudo, produzido por Grunberger et al. [19], mostrou que, em linhagens celulares de melanoma SK-MEL-28 e SK-MEL-170. Em concentração de 5 µg/mL, o CAPE foi capaz de bloquear quase totalmente a incorporação do marcador, enquanto que em concentração de 10 µg/mL, a incorporação foi totalmente inibida.

DISCUSSÃO

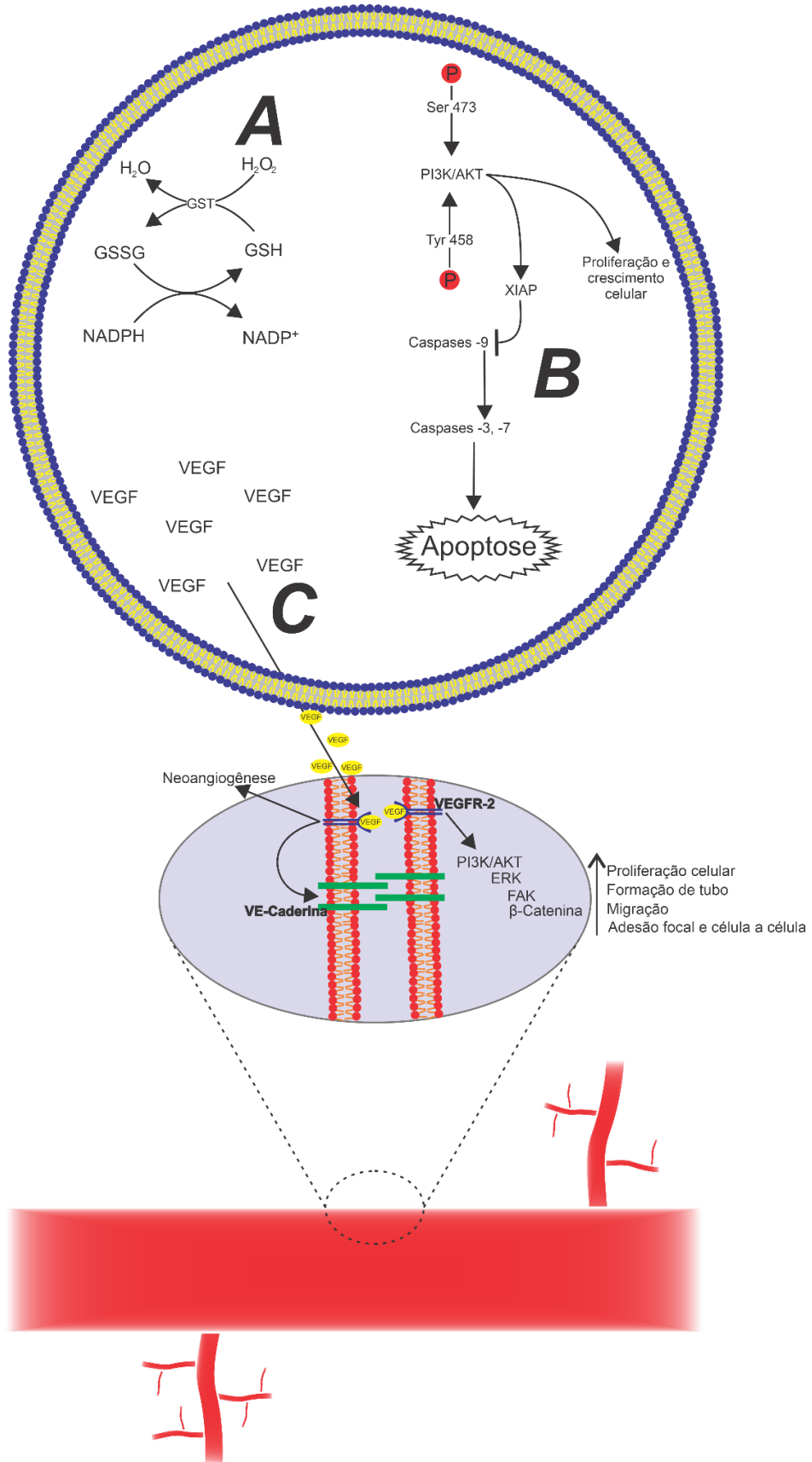
Dentro do aparato de sobrevivência e reprodução celular do melanoma há diversos locais onde descobriu-se que o CAPE atua, como mostrado na Figura 3 onde a via “**A**” representa o mecanismo pelo qual a GST gera uma interação entre a GSH e o peróxido de hidrogênio, protegendo a célula de radicais livres de oxigênio. A via “**B**”, onde a fosforilação dos aminoácidos Tyr 458 e Ser 473 fazem a ativação da via PI3K/AKT, dando início a mecanismos de proliferação celular e estimulando a proteína XIAP a se ligar com a caspase -9, o que ocasiona o bloqueio de uma via de apoptose. Na via “**C**” o tecido tumoral libera VEGF, estimulando a neoangiogênese pela ligação aos receptores VEGFR-2 no epitélio dos vasos sanguíneos, o que leva a ativação das vias PI3K/AKT, ERK, FAK e β-catenina, também gerando afrouxamento da adesão célula a célula através das VE-caderinas, além de aumento da proliferação celular, formação de tubo e migração.

Figura 2 - Legenda para leitura das figuras abaixo



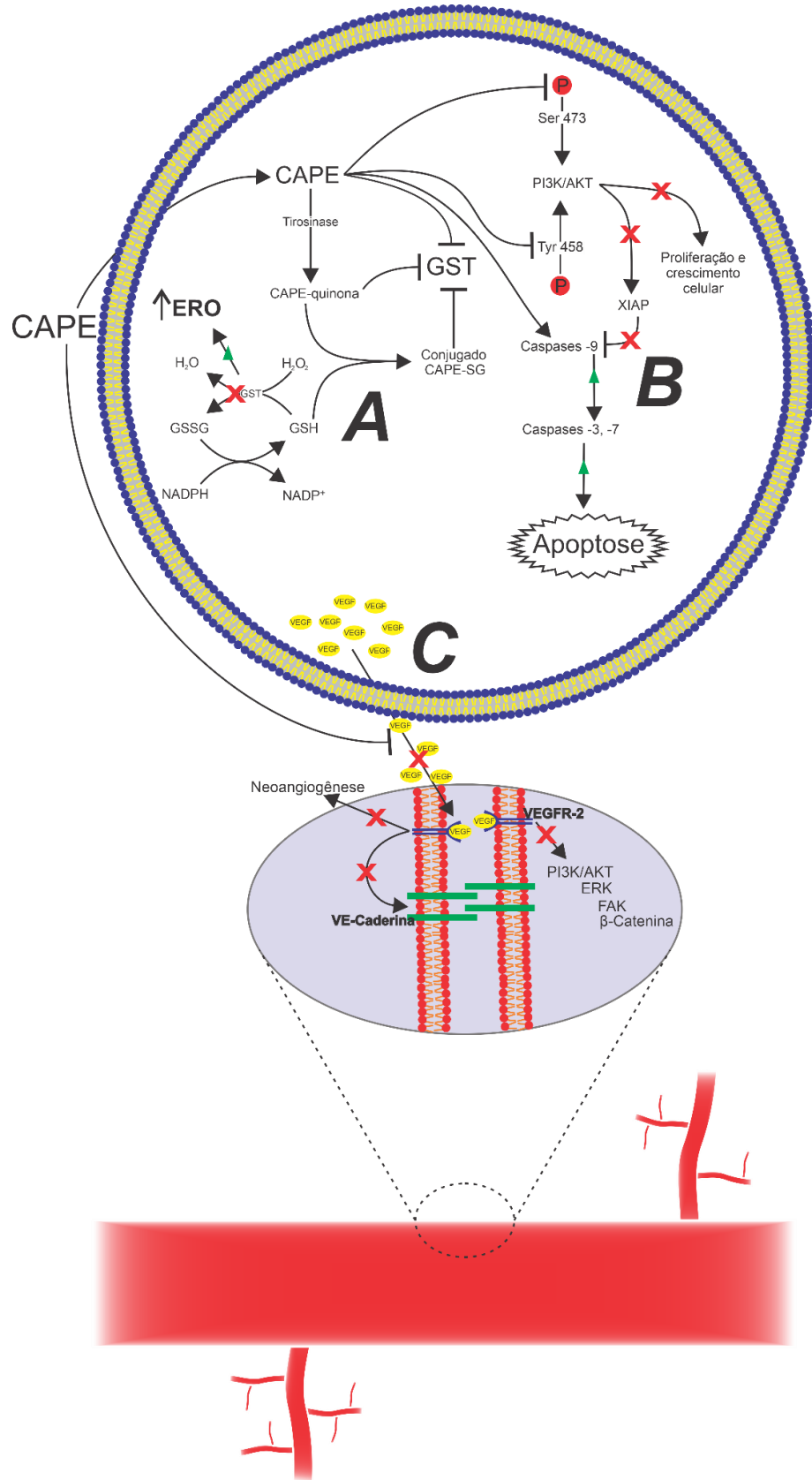
Fonte: Autores do trabalho

Figura 3 - Mecanismos celulares mais ativos no melanoma



Fonte: Autores do trabalho

Figura 4 - Interação do CAPE com mecanismos celulares no melanoma



Fonte: Autores do trabalho

A revisão dos artigos mostrou que a menor dose de CAPE utilizada nos estudos *in vitro* foi de 0,1 μM , e a maior foi de 100 μM . O estudo de Grunberger et al. [19] utilizou unidades de concentração diferentes dos estudos mais recentes. A dose com maior destaque nos resultados foi de 15 μM , sendo discutida em três estudos: Kudugunti et al. [15-17].

Em relação a IC50 do CAPE, Choromanska, Saczko e Kublacka [9] encontraram os valores de 86 μM e 106 μM nas linhagens Me45 e MeWo respectivamente, sem a técnica de eletroporação (EP) e 28 μM e 70.7 μM respectivamente, com EP, enquanto que Kudugunti et al. [15-17] obtiveram valores menores, concluindo que 15 μM era a IC50 do CAPE nas linhagens B16F-10, B16F0, SK-MEL-5, SK-MEL-28 e MeWo.

Os achados demonstraram que a maioria das doses produziu uma redução significativa das linhagens celulares testadas, com exceção dos valores de 0,1, 1 e 2 μM testados por Lee et al. [11] em células B16F10. Em contrapartida, Choromanska, Saczko e Kublacka [9] encontraram que uma dose de 1 μM era capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular da linhagem Me45 em apenas 24h, porém não obteve o mesmo achado significativo para a linhagem MeWo. Grunberger et al. [19], por ser mais antigo, utilizou um método de baixa confiança para avaliar a síntese de DNA das células SK-MEL-28 e SK-MEL170 ao aplicar as concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, encontrando redução quase completa da incorporação da timidina no DNA com a primeira e inibição completa com a segunda dose, o que demonstraria uma inibição da proliferação celular.

Vale notar que Guarini et al. [18], Kudugunti et al. [15] e Choromanska, Saczko e Kublacka [9] testaram moduladores que afetaram as prováveis vias de ação do CAPE. Os primeiros verificaram que o uso de Mezerein, um ativador da PKC, aumentava o efeito antiproliferativo. Os segundos, por sua vez, observaram que o uso de MK571 diminuiu a IC50 do CAPE em 13%, enquanto a combinação com Probenecida reduziu a IC50 em 21%. Por fim, os últimos utilizaram a técnica de EP para testar se a eficácia do composto aumentava, e constataram que o uso de EP tinha significativo efeito na ação do CAPE, ao permitir maior entrada do composto nas células de melanoma.

Além disso, os estudos mostraram que ao mesmo tempo há uma depleção de GSH, diminuição da razão GSH/GSSG e um aumento na concentração de EROS citoplasmáticos após administração do CAPE, além do efeito inibitório que os

metabólitos do CAPE mostraram quando este foi bioativado pela tirosinase, levando a crer, como demonstra o “**A**” da Figura 4, que um dos mecanismos da eficácia do composto contra as células tumorais de melanoma seja através da inibição da ação catalítica da enzima GST, além de seus efeitos na GSH, promovendo aumento do estresse oxidativo e por fim morte celular [15].

Kudugunti et al. [16] observaram que uma possível via de ação do CAPE contra o melanoma se daria através da ação da enzima Tirosinase, pois ela metabolizaria o CAPE intracelular em o-quinona, que por sua vez seria conjugado com a glutatona a CAPE-SG, e inibiria a ação catalítica da enzima Glutationa-S-transferase (GST) na glutatona reduzida (GSH). Também depletaria esta última, levando a um aumento nas EROS intracelulares e diminuindo a capacidade das células tumorais de reduzi-los. A GSH também está implicada na resistência aos tratamentos antitumorais quimioterápicos, pois é um dos compostos responsáveis por detoxificar o organismo de componentes xenobióticos. Devido ao fato da Tirosinase e GST estarem elevadas em células de melanoma, ocorre maior metabolização do CAPE e, portanto, maior inibição da GST.

Chung et al. [12] esclareceram as propriedades anti-angiogênicas do CAPE através da inibição do VEGF que atua em várias vias celulares, como a PI-3K/AKT, ERK, VE-caderina, B-catenina e FAK, assim como aparece no “**C**” da figura 4. Para verificar isso utilizaram células endoteliais venosas de cordão umbilical humano (HUVECS). Observaram que o CAPE inibiu fortemente a proliferação induzida por VEGF nas HUVECS, a formação de redes de capilares, de maneira dose-dependente, e também a migração estimulada por VEGF. O CAPE parece ser capaz de reorganizar o citoesqueleto das HUVECS através da inibição da formação de fibras de estresse de actina assim como é capaz de regular diferentemente a distribuição de proteínas de adesão focal. Outro efeito anti-angiogênico proporcionado pelo CAPE se deu através do bloqueio da retirada da VE-caderina, que acontece no processo de migração celular através do afrouxamento das adesões célula-a-célula. Este afrouxamento se dá normalmente através da retirada de caderinas fosforiladas em tirosina através da ativação do VEGFR-2 pelo VEGF em células endoteliais. Por fim, para testar os efeitos *in vivo*, utilizaram um método chamado *matrigel plug assay*, que detecta novos vasos em tecido transplantado para camundongos. Os pesquisadores observaram três grupos: o ensaio com apenas o transplante, o transplante somado à VEGF e o transplante mais VEGF e CAPE. A partir da análise com imunocoloração,

puderam observar que as amostras com o matrigel e o VEGF tinham coloração vermelho-escura e novos vasos, assim como maiores níveis de hemoglobina, em comparação com as amostras sem VEGF. Já as amostras com VEGF e CAPE resultaram em coloração mais vermelho-claro e amarelada e menor conteúdo de hemoglobina em dose dependência, indicando o potencial anti-neoangiogênico do composto.

Chung et al. [12] também hipotetizaram que o CAPE age inibindo tanto a angiogênese estimulada por VEGF quanto o crescimento dos tumores devido aos resultados obtidos por ele com os testes em camundongos e *in vitro*.

Por sua vez, como ilustra o “**B**” da Figura 4, o estudo de Pramanik et al. [13] detectou que o CAPE suprime a fosforilação da via de proliferação e crescimento celular PI3K/AKT/mTOR pelos aminoácidos Tyr 458, Ser 473 e Ser 2448, respectivamente, além de reduzir os níveis de XIAP, inibidora da morte celular programada pela ligação às caspases-3, -7 e -9, em linhagens B16F0 e SK-MEL-28, nas 2 primeiras horas de tratamento e de maneira dose-dependente. Ademais, após 16 horas de terapia foram observadas as clivagens da caspase-3 e PARP, indicando um dos possíveis mecanismos de apoptose.

CONCLUSÃO

A partir de todos os dados observados, é possível concluir que o CAPE se apresenta como um potencial candidato ao tratamento adjuvante do melanoma. No entanto, devido à escassez de artigos que avaliam o perfil de biossegurança, mostra-se necessária a realização de um maior número de estudos pré-clínicos *in vivo* para avaliar de forma mais precisa sua eficiência e toxicidade, para que então uma possível estruturação de estudos clínicos seja possível. Além disso, a via de ação contra o melanoma está cada vez mais perto de ser melhor elucidada, sendo que seus efeitos mais proeminentes se localizam no sistema de proteção contra oxidação encabeçado pela GSH e GST. O CAPE também parece ter ação na via do VEGF e na proliferação celular pela via PI3K/AKT. Por fim, apesar de promissor, não foi possível realizar uma meta análise pela disparidade dos dados encontrados, assim como a escassez de artigos.

REFERÊNCIAS

- [1] Organização Mundial da Saúde. International Agency for Research on Cancer [homepage na internet]. Melanoma of Skin [acesso em 08 set 2020]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/16-Melanoma-of-skin-fact-sheet.pdf>
- [2] Instituto Nacional de Câncer [homepage na internet]. Câncer de pele melanoma [acesso em 06 set 2020]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>
- [3] WHITEMAN DC, GREEN AC, OLSEN CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. 2016;136(6):1161-1171.
- [4] BELLENGHI M, PUGLISI R, PONTECORVI G, FEO A, CARÈ A, MATTIA G. Sex and Gender Disparities in Melanoma. *Cancers*. 2020;12(7):1819.
- [5] RASTRELLI M, TROPEA S, ROSSI CR, ALAIBAC M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *International Journal Of Experimental And Clinical Pathophysiology And Drug Research*. 2014;28(6):1005-1012.
- [6] JUNIOR GPG. Vital Signs: Melanoma Incidence and Mortality Trends and Projections — United States, 1982–2030. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2015;64(21):591-596.
- [7] LILI LV, CUI H, MA Z. Recent progresses in the pharmacological activities of caffeic acid phenethyl ester. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2021;394(7):1327-1339.
- [8] National Center For Biotechnology Information [homepage na internet]. Caffeic Acid [acesso em 12 jul 2020]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-acid>
- [9] CHOROMANSKA A, SACZKO J, KULBACKA J. Caffeic Acid Phenethyl Ester Assisted by Reversible Electroporation—In Vitro Study on Human Melanoma Cells. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):478.
- [10] EL-KHATTOUTI A, SHEEHAN NT, MONICO J, et al. CD133⁺ melanoma subpopulation acquired resistance to caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis is attributed to the elevated expression of ABCB5: significance for melanoma treatment. *Cancer Letters*. 2014;357(1):83-104.
- [11] LEE JY, CHOI HJ, CHUNG TW, KIM CH, JEONG HS, HA KT. Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone-Induced Melanin Synthesis through Suppressing Transactivation Activity of Microphthalmia-Associated Transcription Factor. *Journal of Natural Products*. 2013;76(8):1399-1405.

- [12] CHUNG TW, KIM SJ, CHOI HJ, KWAK CH, SONG KH, SUH S, KIM KJ, HA KT, PARK YG, CHANG YC. CAPE suppresses VEGFR-2 activation, and tumor neovascularization and growth. *Journal of Molecular Medicine*. 2012;91(2):271-282.
- [13] PRAMANIK KC, KUDUGUNTI SK, FOFARIA NM, MORIDANI MY, SRIVASTAVA SK. Caffeic acid phenethyl ester suppresses melanoma tumor growth by inhibiting PI3K/AKT/XIAP pathway. *Carcinogenesis*. 2013;34(9):2061-2070.
- [14] COIMBRA M, CRIELAARD BJ, STORM G, SCHIFFELERS RM. Critical factors in the development of tumor-targeted anti-inflammatory nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. 2012;160(2):232-238.
- [15] KUDUGUNTI SK, THORSHEIM H, YOUSEF MS, GUAN L, MORIDANI MY. The metabolic bioactivation of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) mediated by tyrosinase selectively inhibits glutathione S-transferase. *Chemico-Biological*. 2011;192(3):243-256.
- [16] KUDUGUNTI SK, VAD NM, WHITESIDE MJ, NAIK BU, YUSUF MA, SRIVENUGOPAL KS, MORIDANI MY. Biochemical [mechanism of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) selective toxicity towards melanoma cell lines. *Chemico-Biological Interactions*. 2010;188(1):1-14.
- [17] KUDUGUNTI SK, VAD NK, EKOGBO E, MORIDANI MY. Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in skin B16-F0 melanoma tumor bearing C57BL/6 mice. *Investigational New Drugs*. 2009;29(1):52-56.
- [18] GUARINI L, SU ZZ, ZUCKER S, LIN J, GRUNBERGER D, FISHER PB. Growth inhibition and modulation of antigenic phenotype in human melanoma and glioblastoma multiforme cells by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Molecular and Cellular Biology*. 1992;38(5):513-527.
- [19] GRUNBERGER D, BANERJEE R, EISINGER K, OLTZ EM, EFROS L, CALDWELL M, ESTEVEZ V, NAKANISHI K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 1988;44(3):230-232.