FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ALYNE FÁVERO GALVÃO MEIRELLES

Papel dos mediadores lipídicos na resistência do melanoma humano ao inibidor de BRAF (Vemurafenibe)

**Ribeirão Preto
2021**

VERSÃO CORRIGIDA

ALYNE FÁVERO GALVÃO MEIRELLES

Papel dos mediadores lipídicos na resistência do melanoma humano ao inibidor de BRAF (Vemurafenibe)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica

Área de Concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

RIBEIRÃO PRETO

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo.

FICHA CATALOGRÁFICA

Meirelles, Alyne Fávero Galvão

Papel dos mediadores lipídicos na resistência do melanoma humano ao inibidor de BRAF (Vemurafenibe). 108 p.: il. 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena

1. Melanoma; 2. Eicosanoides; 3. Metabolôma; 4. Vemurafenibe; 5. Resistência

Nome: MEIRELLES, Alyne Fávero Galvão

Título: **Papel dos mediadores lipídicos na resistência do melanoma humano ao inibidor de BRAF (Vemurafenibe)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica para obtenção do Título de Doutora em Bioquímica

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), Universidade de São Paulo.

Essa tese recebeu apoio financeiro das seguintes agências de Fomento:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2014/07125-6;

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FAEPA – CFMRP/USP).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais que tanto e sempre lutaram para me proporcionar o melhor. Toda minha admiração, orgulho e gratidão.

A minha irmã e melhor amiga, Gabriela. Por tudo que sempre vivemos juntas.

Aos meus amores, meu esposo Franklin e meu filho João Vicente, razões da minha vida.

Agradecimientos

A minha orientadora, Dra. Lúcia Helena Faccioli, pela oportunidade de realizar este trabalho e pelos conhecimentos adquiridos durante todos esses anos.

A minha co-orientadora, Dra. Sylvia Stuchi Maria Engler, que abriu as portas do seu laboratório desde o primeiro contato. Muito obrigada pela oportunidade!

Aos membros da banca de seleção, Prof. Dr. Vitor Faça, Prof. Dr. Adriano Sebollela e Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues, que me deram a oportunidade de ingressar no Programa de Pós Graduação da Bioquímica. Muito obrigada pela confiança.

Aos colaboradores pelo aprendizado e auxílio. Cada um foi fundamental para que este trabalho fosse concluído. Agradeço especialmente ao Dr. Luiz Gustavo Gardinassi pelas análises metabolômicas e tantas outras sugestões; ao Dr. Francisco W.G. Paula-Silva, à Dra. Fabiana Zambuzi e ao meu amigo Dr. Mouzarlem B. dos Reis pela ajuda com os experimentos de Biologia Molecular; e ao Dr. Robson Amaral pelo auxílio com os esferoides.

À profa. Dra. Fabiani Gai Frantz pelo apoio, pela disponibilidade em sempre ajudar e pelas palavras sempre dóceis.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Inflamação das Parasitoses (LIIP) e Laboratório de Imunologia e Epigenética (LIME) pela compreensão e pela convivência diária. Cada um com certeza me deixou muitos aprendizados. Um agradecimento especial à Msc. Caroline Fontanari (Carol) pela amizade e pela colaboração durante todos esses anos. Muito obrigada!

À Maria Ivone, secretária do Programa de Bioquímica, por toda prestatividade e eficiência.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica (FMRP/USP) pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

RESUMO

MEIRELLES, A.F.G. **Papel dos mediadores lipídicos na resistência do melanoma humano ao inibidor de BRAF (Vemurafenibe)**. 2021. 108f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O melanoma é um câncer de pele caracterizado pela alta mortalidade devido à resistência à quimioterapia e à capacidade metastática. Aproximadamente metade dos casos de melanoma maligno apresenta mutações que ativam o gene BRAF, na maioria das vezes envolvendo a substituição V600E. Dessa forma, os inibidores de BRAF, como o Vemurafenibe, têm sido utilizados no tratamento deste tipo de câncer. Apesar da resposta inicial às opções terapêuticas ser satisfatória, a maioria dos pacientes apresenta remissão da doença em um curto período de tempo. Avaliar como mediadores lipídicos interferem nos mecanismos de resistência é uma estratégia para novos tratamentos mais efetivos ao melanoma resistente. Dessa forma, o nosso objetivo foi avaliar o papel dos mediadores lipídicos na resistência das linhagens de células de melanoma humano ao Vemurafenibe. Neste trabalho, demonstramos que as linhagens de melanoma humano (A375, SK-MEL-29, WM35 e WM278) e os melanócitos são capazes de produzir diferentes mediadores lipídicos quando estimulados *in vitro* e que, dentre elas, as linhagens metastáticas (A375 e SK-MEL-29), tanto as parentais (P) quanto as resistentes (R), sintetizam concentrações maiores desses compostos. Além disso, observamos através do ensaio de Azul de tripan e em modelo 3D utilizando esferoides que o tratamento das células metastáticas (A375P e R e SK-MEL-29P e R) com PGD₂ diminuiu a proliferação celular e interferiu na produção das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 de modo independente dos receptores DP₁ e DP₂. Ainda, observamos que a PGJ₂, metabólito da PGD₂, também reduziu *in vitro* a proliferação das células de melanoma A375P e SK-MEL-29 P e R, por uma via independente do receptor PPAR. Dessa forma, investigamos possíveis vias metabólicas que poderiam estar perturbadas nas células A375P e R após o tratamento com PGD₂. Nossas análises mostraram que vias como metabolismo de xenobióticos, metabolismo de cisteína e metionina e a transferência via carnitina foram especificamente perturbadas nesta comparação e, portanto, sugerem que as diferenças fenotípicas após tratamento com PGD₂ sejam resultado de alterações nestas vias metabólicas. Portanto, nossos resultados contribuem para o desenvolvimento de novas terapêuticas que possibilitem a prevenção ou retardamento das metástases e, conseqüentemente, melhor prognóstico da doença.

Palavras-chave: Melanoma, eicosanoides, metabolôma, vemurafenibe, resistência.

ABSTRACT

MEIRELLES, A.F.G. **Role of lipid mediators in the resistance of human melanoma to the BRAF inhibitor (Vemurafenib)**. 2021. 108f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Melanoma is a skin cancer characterized by high mortality due to resistance to chemotherapy and metastatic capacity. Approximately half of the cases of malignant melanoma have mutations that activate the BRAF gene, mainly involving the V600E substitution. Thus, BRAF inhibitors, such as Vemurafenib, have been used to treat this type of cancer. Although the initial response rate is effective, disease progression and tumor resistance rapidly occurs in the majority of patients. Assessing how lipid mediators interfere with resistance mechanisms is a strategy for new, more effective treatments for resistant melanoma. Thus, our objective was to evaluate the role of lipid mediators in the resistance of human melanoma cell lines to Vemurafenib. In this work we demonstrate that human melanoma cell lines (A375, SK-MEL-29, WM35 and WM278) and melanocytes are able to produce different lipid mediators when stimulated in vitro and that, among them, metastatic cells (A375 and SK-MEL-29), both parental (P) and resistant (R), synthesize higher concentrations of these compounds. In addition, we observed through the trypan blue assay and in a 3D model using spheroids that the treatment of metastatic cells (A375P and R and SK-MEL-29P and R) with PGD₂ decreased cell proliferation and interfered with the cytokines production (IL-6, IL-8 and IL-10) independently of DP1 and DP2 receptors. Furthermore, we observed that PGJ₂, a metabolite of PGD₂, also reduced the proliferation of A375P and SK-MEL-29P and R melanoma cells in vitro, via a PPAR receptor-independent pathway. Thus, we investigated possible metabolic pathways that could be disturbed in A375P and R cells after treatment with PGD₂. Our analyzes showed that pathways such as xenobiotic metabolism, cysteine and methionine metabolism and transfer via carnitine were specifically disturbed in this comparison and therefore suggest that phenotypic differences after treatment with PGD₂ are the result of changes in these metabolic pathways. Therefore, our results contribute to the development of new therapies that enable the prevention or delay of metastasis and, consequently, a better prognosis of the disease.

Keywords: Melanoma, eicosanoids, metabolomic, vemurafenib, resistance.

RESUMEN

MEIRELLES, A.F.G. **Papel de los mediadores de lípidos en la resistencia del melanoma humano al inhibidor de BRAF (Vemurafenib)**. 2021. 108f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

El melanoma es un cáncer de piel que se caracteriza por una alta mortalidad debido a la resistencia a la quimioterapia y la capacidad metastásica. Aproximadamente la mitad de los casos de melanoma maligno tienen mutaciones que activan el gen BRAF, que con mayor frecuencia involucran la sustitución V600E. Por tanto, los inhibidores de BRAF, como el vemurafenib, se han utilizado para tratar este tipo de cáncer. Aunque la respuesta inicial a las opciones terapéuticas es satisfactoria, la mayoría de los pacientes experimentan la remisión de la enfermedad en un corto período de tiempo. Evaluar cómo los mediadores de lípidos interfieren con los mecanismos de resistencia es una estrategia para tratamientos nuevos y más efectivos para el melanoma resistente. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar el papel de los mediadores de lípidos en la resistencia de las líneas celulares de melanoma humano a Vemurafenib. En este trabajo demostramos que las cepas de melanoma humano (A375, SK-MEL-29, WM35 y WM278) y los melanocitos son capaces de producir diferentes mediadores lipídicos cuando se estimulan in vitro y que, entre ellas, las cepas metastásicas (A375 y SK-MEL-29), tanto parentales (P) como resistentes (R), sintetizan concentraciones más altas de estos compuestos. Además, observamos a través del ensayo de azul tripán y en un modelo 3D usando esferoides que el tratamiento de células metastásicas (A375P y R y SK-MEL-29P y R) con PGD₂ disminuyó la proliferación celular e interfirió con la producción de citocinas IL 6, IL-8 e IL-10 independientemente de los receptores DP1 y DP2. Además, observamos que PGJ₂, un metabolito de PGD₂, también redujo la proliferación de células de melanoma A375P y SK-MEL-29 P y R in vitro, a través de una vía independiente del receptor PPAR. Por lo tanto, investigamos las posibles vías metabólicas que podrían alterarse en las células A375P y R después del tratamiento con PGD₂. Nuestros análisis mostraron que vías como el metabolismo xenobiótico, el metabolismo de la cisteína y metionina y la transferencia a través de la carnitina se alteraron específicamente en esta comparación y, por lo tanto, sugieren que las diferencias fenotípicas después del tratamiento con PGD₂ son el resultado de cambios en estas vías metabólicas. Por tanto, nuestros resultados contribuyen al desarrollo de nuevas terapias que permitan prevenir o retrasar las metástasis y, en consecuencia, un mejor pronóstico de la enfermedad.

Palabras claves: Melanoma, eicosanoides, metaboloma, vemurafenibe, resistencia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das camadas da pele e produção de melanina.....	1
Figura 2. Via de sinalização de MAPK.....	4
Figura 3. Concentração dos eicosanoides PGD ₂ , PGE ₂ , LTB ₄ , 6-trans-LTB ₄ , 5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 5-oxo-ETE e 11,12-DiHETRE no sobrenadante de melanócitos e linhagens de melanoma humano após estimulação <i>in vitro</i>	26
Figura 4. Expressão gênica de enzimas COX-1, COX-2, e dos receptores de prostaglandinas em melanócitos e linhagens de melanoma humanos.....	28
Figura 5. Expressão gênica das enzimas 5-LO, FLAP e dos receptores de leucotrienos e CD36 em melanócitos e linhagens de melanoma humanos.....	29
Figura 6. Expressão relativa de enzimas do metabolismo do ácido araquidônico e dos receptores de seus metabólitos, na linhagem de melanoma metastático A375 parental e resistente.....	30
Figura 7. Expressão relativa de enzimas do metabolismo do ácido araquidônico e dos receptores de seus metabólitos de melanoma metastático SK-MEL-29 parental e resistente.....	31
Figura 8. Efeito do LTB ₄ e de inibidores do metabolismo do AA na viabilidade de células A375.....	34
Figura 9. Efeito da PGD ₂ na viabilidade das células SK-MEL-29P e SK-MEL-29R.....	35
Figura 10. Efeito da PGE ₂ na viabilidade das células A375P, A375R, SK-MEL-29P e SK-MEL-29R.....	36
Figura 11. Parâmetros avaliados na formação dos esferoides de células de melanoma humano A375P.....	38
Figura 12. Parâmetros avaliados na formação dos esferoides de células de melanoma humano A375R.....	39
Figura 13. Parâmetros avaliados na formação dos esferoides de células de melanoma humano SK-MEL-29P.....	40
Figura 14. Parâmetros avaliados na formação dos esferoides de células de melanoma humano SK-MEL-29R.....	41

Figura 15. PGD ₂ e PGE ₂ reduzem a viabilidade de esferoides de melanoma A375P.....	42
Figura 16. PGD ₂ e PGE ₂ reduzem a viabilidade de esferoides de melanoma A375R.....	43
Figura 17. PGD ₂ e PGE ₂ reduzem a viabilidade de esferoides de melanoma SK-MEL-29P.....	44
Figura 18. PGD ₂ e PGE ₂ reduzem a viabilidade de esferoides de melanoma SK-MEL-29R.....	45
Figura 19. PGD ₂ e PGE ₂ induzem a produção de IL-6 e IL-8 pelas células A375P.....	47
Figura 20. PGD ₂ e PGE ₂ modulam a produção de IL-8 e IL-10 pelas células SK-MEL-29P e SK-MEL-29R.....	48
Figura 21. Inibidor da síntese, antagonistas e agonistas de metabólitos do AA não reverteram o a diminuição da proliferação celular induzida por PGD ₂ , em células A375P.....	50
Figura 22. Inibidor da síntese, antagonistas e agonistas de metabólitos do AA não reverteram o a diminuição da proliferação celular induzida por PGD ₂ , em células A375R.....	51
Figura 23. Tratamento das células A375P e SK-MEL-29P e R com PGJ ₂ diminui a proliferação celular.....	52
Figura 24. Concentração dos eicosanoides PGD ₂ , PGE ₂ , PGJ ₂ e 15-deoxi-PGJ ₂ no sobrenadante das linhagens de melanoma humano A375P e R após tratamento com PGD ₂ ou PGE ₂	53
Figura 25. Volcano Plots.....	56
Figura 26. Análises metabolômicas de sobrenadante de células A375 parental e resistente.....	57
Figura 27. Vias metabólicas enriquecidas do metaboloma das células de melanoma A375 parental (P) e resistente (R) após tratamento com PGD ₂	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados na reação de PCR.....	18
Tabela 2. Tratamentos utilizados no ensaio de viabilidade celular por Azul de Tripan.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: ácido araquidônico	MAPK: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
ACN: acetonitrila	MEK: <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
AKT: proteína quinase	MeOH: methanol
BLT: Receptor de leucotrieno	MITF: <i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
B-RAF: proteína quinase	NF1: gene NF1
COX: ciclo-oxigenase	NFkB: Fator nuclear kappa B
CysLT: Cys leucotrieno	NK: <i>Natural Killer</i>
CYP: citocromo P	NRAS: membros da família de oncogene RAS
D: ácido aspártico	P: parental
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's	PG: prostaglandina
DNA: ácido desoxirribonucleico	PGHS: prostaglandina endoperóxido sintase
DP1/DP2: receptores de prostaglandina D ₂	PGI₂: prostaciclina
DiHETE: dihidroxieicosatrienoico	PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase
E: ácido glutâmico	PTGDS: prostaglandina D sintase
EET: epoxieicosatrienoico	PTEN: <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
EIC: eicosanoide	p53: tumoral protein 53
EP₁-EP₄: receptores de prostaglandina E ₂	RT-qPCR: Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time
ERK 1/2:	R: arginina
EROs: Espécies reativas de oxigênio	R: resistente
FDA: <i>Food and Drug Administration</i>	RAF: proteínas serina/treonina quinase
FP: Receptor de prostaglandina F _{2α}	RAS: <i>rat sarcoma vírus</i>
GPCR: receptor acoplado à proteína G	RNA: ácido ribonucleic
HBSS: solução salina balanceada de Hank	RPMI: Roswell Park Memorial Institute
HETE: hidroxieicosatetraenoico	RTK: Receptor tirosina quinase
IL: interleucina	SPE: solid phase extraction
LT: leucotrieno	STAT: Signal transducer and activator of transcription
LX: lipoxina	TXA₂/B₂: tromboxano A ₂ /B ₂
LOX: lipoxigenase	U.V.: ultravioleta
MDA: metabólitos diferencialmente abundantes	V: valina
MMP: metaloproteinases	

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1. 1. Melanoma.....	01
1.1.1. Via de sinalização de MAPK (do inglês <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>).....	02
1.1.2. Inibidores de BRAF.....	04
1.2. Mediadores lipídicos no câncer.....	06
1.3. Metabolôma.....	09
 2. OBJETIVOS	 13
 3. MATERIAL e MÉTODOS	 15
3.1. <i>Reagentes e Solventes</i>	15
3.2. Cultura celular.....	15
3.3. Estimulação da biossíntese de eicosanoides pelo melanócitos e linhagens de melanomas <i>in vitro</i>	16
3.4. Análises por LC-MS/MS.....	16
3.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa.....	17
3.6. <i>Ensaio de viabilidade celular</i>	18
3.7. Ensaio de toxicidade <i>in vitro</i> em modelo de esferoide 3D.....	20
3.8. Quantificação de citocinas.....	20
3.9. Determinação dos produtos da metabolização das PGD ₂ e PGE ₂	20
3.10. Metabolôma do sobrenadante das linhagens de melanoma humano A375 parental e resistente.....	21
3.11. Análises funcionais do metabolôma.....	21
3.12. Análise estatística.....	22

4. RESULTADOS.....	24
4.1. Avaliação do perfil de produção de eicosanoides pelos melanócitos e pelas linhagens de melanoma humano após estimulação <i>in vitro</i>	24
4.2. Avaliação da expressão de enzimas do metabolismo do ácido araquidônico e dos receptores de seus metabólitos em melanócitos e em linhagens de melanoma humano.....	27
4.3. Determinação da citotoxicidade após tratamento das células com mediador lipídico.....	32
4.3.1. Azul de Tripan.....	32
4.3.2. Avaliação dos efeitos da PGE ₂ e PGD ₂ na viabilidade celular das linhagens de melanoma metastático em modelo de esferoide 3D.....	37
4.4. PGD ₂ e PGE ₂ induzem liberação de citocinas em linhagens A375 e SK-MEL-29.....	46
4.5. Tratamento das células A375P e R com agonista ou antagonistas de receptores de metabólitos do ácido araquidônico, ou com inibidores de síntese	48
4.6. Avaliação do efeito da PGJ ₂ na cultura de melanoma humano.....	52
4.7. Análise dos metabólitos da PGD ₂ no sobrenadante das células A375 parental e resistente.....	52
4.8. Análise do metaboloma do sobrenadante das células A375 parental e resistente através de plataformas de bioinformática.....	53
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamaís voltará ao seu tamanho original.”*
Albert Einstein

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Melanoma

O melanoma é uma neoplasia originada da transformação maligna dos melanócitos, células especializadas responsáveis pela produção de melanina, pigmento que confere a coloração da pele e dos pelos. Os melanócitos originam-se de progenitores da crista neural que migram para a epiderme durante o desenvolvimento embrionário (REGAD, 2013). Na pele, os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme, bem como nos folículos pilosos, e interagem intimamente com os queratinócitos, os quais regulam os processos de diferenciação, sobrevivência, motilidade e proliferação dos melanócitos (GRAY-SCHOPFER & WELLBROCK & MARAIS, 2007). Através da radiação ultravioleta (U.V.) na pele, os melanócitos, estimulados pelos fatores melanogênicos liberados pelos queratinócitos, produzem melanina, protegendo a pele dos efeitos dos raios U.V. e, conseqüentemente, do câncer de pele (LIN & FISHER, 2007).

Figura 1. Esquema das camadas da pele e produção de melanina. Adaptado de Terese Winslow NCI, 2008.

Embora o melanoma represente apenas 3 % das neoplasias malignas de pele (INCA - Instituto Nacional do Câncer), sua elevada capacidade metastática e

resistência à quimioterapia o torna a forma mais agressiva de câncer desse órgão ((GRAY-SCHOPFER & WELLBROCK & MARAIS, 2007).

Estima-se que, no Brasil, para cada ano do triênio 2020/2022 sejam diagnosticados 8450 novos casos, com acometimento de, em média, 4200 homens e 4250 mulheres (INCA). O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom se detectado em sua fase inicial (antes de invadir a derme) de modo que a excisão cirúrgica promove a cura em 99 % dos pacientes. Nos últimos anos, houve grande aumento na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor e à introdução dos novos medicamentos imunoterápicos. Entretanto, nos casos em que a doença está disseminada e avançada, a média de sobrevida é de somente um ano (SLIPICEVIC & HERLYN, 2012).

O desenvolvimento e progressão do melanoma dependem de um conjunto de mutações que modificam a expressão de genes responsáveis pelo controle da proliferação e da adesão celular, tornando os melanócitos mitoticamente ativos, com capacidade de invadir a derme e de penetrar nos sistemas circulatório e linfático para migrarem, invadirem e sobreviverem em um novo microambiente (HAASS et al., 2005). Além disso, os melanócitos modificados também adquirem a capacidade de sintetizar fatores de crescimento autócrinos. Em conjunto, esses eventos promovem a desestabilização de diversas vias de sinalização intracelular e favorecem o escape dos melanócitos neoplásicos das vias de regulação mediadas pelos queratinócitos, o que resulta em taxas elevadas de proliferação (HAASS et al., 2004).

O tumor apresenta, na maioria das vezes, duas fases distintas: a fase inicial, ou de crescimento radial, no qual a lesão ainda é plana, pequena e possui comportamento mais benigno, e a fase de crescimento vertical, com pior prognóstico, apresentando células malignas profundamente localizadas na derme reticular ou mesmo invadindo o tecido subcutâneo (HAFNER et al., 2004).

1.1.1. Via de sinalização de MAPK (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinase*)

Uma das mutações mais frequentes no melanoma (50 % dos casos) envolve a quinase B-RAF, uma proteína quinase serina/treonina que compõe a cascata de sinalização RAS (do inglês, *rat sarcoma vírus*)-RAF-MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*). Além disso, mais de 95 % das mutações acometem a troca

do aminoácido valina (V) por um ácido glutâmico (E) no códon 600 (BRAF^{V600E}). Outras mutações foram identificadas, como as variantes V600K (troca por lisina) e V600D/R (troca por ácido aspártico-D ou arginina-R), mas em proporções muito menores. A mutação em NRAS é a segunda mais observada (15 - 25%) nos melanomas cutâneos (DAVIES, H. et al., 2002; KAKADIA et al., 2018). Recentemente, foi descrito um perfil de alterações genômicas em melanomas cutâneos baseadas na análise dos níveis de RNA, DNA e proteínas dos pacientes, sendo estabelecida uma classificação de acordo com o padrão de alta prevalência de genes mutados, sendo eles: BRAF (52%), NRAS (28%), NF1 (14%) ou triplo selvagem (6%), demonstrando a importância da via MAPK (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015). Outros elementos também podem estar alterados, como é o caso da perda de genes supressores de tumor, como p53 (do inglês *tumoral protein 53*) e PTEN (do inglês *Phosphatase and tensin homolog*), fatores de transcrição (do inglês *Microphthalmia-associated transcription factor* – MITF) e gene regulador do oncogene c-Myc (do inglês *cell myelocytomatosis*), além de alterações em outros fatores envolvidos com crescimento e metabolismo, como AKT (proteína quinase) (FLAHERTY & HODI & FISHER, 2012; SHAIN & BASTIAN, 2016).

Por ser mais prevalente, a via de MAPK é considerada a mais importante na biologia do melanoma. RAS está envolvida na regulação da ativação de ERK1/2 (do inglês *extracellular signal-regulated kinases*) induzido pelo RTK (receptor de tirosina quinase). A sinalização se inicia com o recrutamento de RAF para a membrana plasmática pelo RAS ativado. Por sua vez, RAF ativa MEK (do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase*) e ERK 1/2. ERK ativado pode se deslocar para o núcleo, onde fosforila e regula diversos fatores de transcrição, levando a expressão de vários genes e, com isso, a proliferação celular (ROBERTS & DER, 2007). Além disso, RAS se liga e ativa PI3K (do inglês *phosphoinositide-3 kinase*) ativando a via AKT e inibindo a apoptose (IBRAHIM & HALUSKA, 2009).

BRAF faz parte da família das RAF quinases (ARAF, BRAF e CRAF) e, diferentemente de ARAF e CRAF, BRAF necessita apenas da fosforilação por RAS para ser ativado, o que pode aumentar a suscetibilidade a mutações carcinogênicas (IBRAHIM & HALUSKA, 2009). A aquisição da mutação V600E desestabiliza a conformação inativa da BRAF quinase, tornando-a constitutivamente ativa. Esse evento leva ao descontrole da proliferação celular, imortalização dessas células, aumento da motilidade celular e invasão (modificação do citoesqueleto, expressão

de integrinas e metaloproteinases) (KUDCHADKAR & PARAISO & SMALEY, 2012; GIBNEY et al., 2013). Além disso, as mutações em BRAF fazem com que ocorra a cascata de ativação de RAF/MEK/ERK 1/2 independentemente de RAS (GIBNEY et al., 2013).

Figura 2. Via de sinalização de MAPK. O descontrole da via de sinalização de MAPK promove a proliferação, diferenciação e crescimento exacerbados das células de melanoma. Adaptado de Scheier B. et al., 2011.

1.1.2. Inibidores de BRAF

O melanoma é um tumor extremamente agressivo com elevado potencial metastático e alta resistência aos agentes citotóxicos. Isso ocorre pelo fato dos melanócitos se originarem de células com grande motilidade e com elevada capacidade de sobrevivência. Em comparação com outros tipos celulares tumorais, as células de melanoma apresentam, *in vivo*, baixo índice de apoptose espontânea e *in vitro* são relativamente resistentes à apoptose induzida por fármacos (SOSMAN & PUZANOV, 2006). Considerando que a maioria das drogas quimioterápicas atuam

por indução da apoptose, a resistência à quimioterapia das linhagens de melanoma pode estar relacionada à não ativação dos mecanismos de morte celular, por estas células. Este evento torna-se uma barreira ao sucesso dos tratamentos, uma vez que a terapia direcionada ao melanoma tem sido caracterizada por altas taxas de respostas, mas a resistência ocorre universalmente em poucos meses (MERLINO et al., 2016).

Como mencionado acima, a via de MAPK está intimamente ligada ao descontrole da proliferação e, devido à alta prevalência da mutação em BRAF^{V600E} nos melanomas metastáticos, essa proteína oncogênica se tornou um alvo ideal para a terapia e desenvolvimento de fármacos altamente específicos. Desta maneira, o Vemurafenibe (Zeboraf; PLX 4032; RG7204; Daiichi Sankyo/Roche), aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em 2011, foi o primeiro potente inibidor competitivo de adenosina-trifosfato que, ao se ligar seletivamente à proteína BRAF portadora da mutação V600E, inibe a cascata de fosforilação da via das MAPKs. Como resultado, as células de melanoma param no período G1 do ciclo celular promovendo a regressão tumoral (KUDCHADKAR & PARAISO & SMALLEY, 2012; KUDCHADKAR et al., 2013). O desenvolvimento deste fármaco trouxe uma revolução no tratamento do melanoma metastático devido às elevadas taxas de respostas alcançadas (81% dos pacientes em fase I da triagem clínica), além de resultar em aumento da taxa de sobrevida global (FLAHERTY et al., 2010). Porém, apesar da considerável redução do tumor, em média após 6 meses de tratamento, alguns pacientes podem apresentar recidivas e eventos cutâneos adversos secundários devido à reativação da cascata de sinalização (GIBNEY et al., 2013).

O padrão de resistência aos agentes direcionados pode ser mediado por diversos mecanismos, incluindo mutações secundárias ou alterações epigenéticas no gene alvo, modificações no metabolismo de medicamentos e ativação de vias compensatórias, levando ao aumento da sobrevida das células tumorais. A quimiorresistência ao Vemurafenibe pode ocorrer por diferentes mecanismos: mutação adquirida em NRAS ou super regulação de RTK; ativação da via MEK/ERK1/2 e super-regulação de MEK e MAPK, ou ativação da via PI3K-AKT paralela promovida pela perda da atividade/expressão de PTEN (APLIN & KAPLAN & SHAO, 2011).

No entanto, o tratamento para melanoma metastático apresenta outras opções, como com Dabrafenibe (Tafinlar, GSK2118436, Novartis, aprovado em 2013

pelo FDA), que pode atuar em diferentes genótipos da mutação V600, em pacientes em estágio III e IV, e nos casos de metástase cerebral do melanoma (MENZIES & LONG, 2013). Embora não existam estudos comparando diretamente pacientes que receberam Vemurafenibe ou Dabrafenibe em monoterapia, os efeitos adversos foram mais comuns em pacientes tratados com Vemurafenibe, com necessidade de redução da dose administrada (WELSH et al., 2016). Existem ainda outras modalidades de tratamento, como quimioterapias convencionais (APLIN & KAPLAN & SHAO, 2011), imunoterapia (RODRIGUEZ- CERDEIRA et al., 2017), inibidores de MEK, ERK e AKT (SOLIT et al., 2006), inibidores proteassomais (ROPKE, et al., 2006; LUKE & HODI, 2013), entre outros. Entretanto, embora os inibidores específicos revolucionaram o tratamento do melanoma, ainda há problemas com as recidivas dos tumores (FLAHERTY et al., 2012), fato que justifica a busca por novos compostos e alvos terapêuticos que possam superar ou minimizar a quimiorresistência.

1.2. Mediadores lipídicos no câncer

A pele é rica em lipídeos os quais, além de contribuírem para a formação e manutenção da barreira epidérmica, participam da sinalização celular e interação célula-célula (KENDAL et al., 2015). Os lipídeos são essenciais para algumas funções celulares tais como sobrevivência, proliferação e morte. Esses processos estão extremamente relacionados aos mecanismos de evolução tumoral, particularmente na transformação, progressão e metástase (HUANG & FRETER, 2015; DAS, 2019).

Os mediadores lipídicos bioativos, como os eicosanoides (EICs), são derivados de lipídeos de membrana e são produzidos após estímulo. Eles contribuem tanto para a fisiologia quanto para processos patológicos na pele, com evidências de envolvimento na psoríase, dermatite, acne, cicatrização e resposta à luz U.V. (KENDAL & NICOLAOU, 2013; PILKINGTON et al., 2014; DHALL et al.; 2015; REIS et al., 2017).

Os EICs são metabólitos derivados do ácido araquidônico (AA; 20:4 ω -6) produzidos a partir da ação das enzimas ciclooxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs) e citocromo P450 (CYP). São importantes lipídeos sinalizadores com ação autócrina e/ou parácrina envolvidos na regulação da inflamação e da progressão tumoral (CHIURCHIU & LEUTI & MACCARRONE, 2018). As enzimas, receptores e

metabólitos da via do AA são alvos terapêuticos importantes de múltiplos fármacos para o tratamento de diversos processos patológicos, como asma, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (SONNWEBER et al., 2018; CUMMINGS et al., 2019; GODSON, 2020) .

A enzima COX, chamada também de prostaglandina H sintase (PGHS), existe em duas isoformas: a COX-1 (PGHS-1), que é expressa constitutivamente e por isso está relacionada com a homeostasia do organismo; e a COX-2 (PGHS-2) que embora seja induzida após um estímulo inflamatório, seus produtos podem apresentar atividade anti- ou pró-inflamatória. As COXs catalisam a formação da prostaciclina (PGI_2), tromboxanos (TXA_2 , TXB_2) e das demais prostaglandinas (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) (KORBECKI et al., 2014; DENNIS & NORRIS, 2015) As PGs modulam o comportamento tumoral após ligação e ativação de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Em geral, a ativação dos receptores de PGE_2 (EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4) e PGF (FP) pelas PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$, respectivamente, está relacionada com o crescimento tumoral, angiogênese e metástase (YOSHITAKE et al., 2020), enquanto a ativação de receptores de PGD_2 (DP_1 e DP_2) pela PGD_2 está associada à promoção da citotoxicidade das células tumorais. Jiang e colaboradores (2020) exploraram as funções biológicas e as vias de sinalização que envolve a PTGDS, enzima que converte a PGH_2 a PGD_2 , no câncer de mama triplo negativo. Os resultados obtidos sugeriram que a PTGDS pode atuar na resposta imune, interação de citocinas, sinalização de células T, mediar a citotoxicidade por células NK (do inglês *Natural Killer*), entre outros. Os mesmos autores mostraram através de análises histológicas realizadas em amostras pós-cirúrgicas de 98 pacientes com o referido tumor, que a PTGDS está positivamente relacionada com características clínico-patológicas. Experimentos de colocalização demonstraram maior expressão da PTGDS em células B $\text{CD}19^+$, T $\text{CD}4^+$ e T $\text{CD}8^+$, sugerindo que esse efeito protetor pode ser aumentado pela atividade antitumoral das células B e T, embora o mecanismo específico da PTGDS na maturação e função dessas células permaneça desconhecido.

Em relação à LOX, são três as descritas. A 5-LOX é responsável pela produção de leucotrienos (LTs), e a 12/15-LOX pela formação de lipoxinas (LXs). A 5-LOX, converte o AA em um composto instável, o LTA_4 , que é convertido em LTB_4 por ação da LTA_4 hidrolase, ou em LTC_4 , após adição de glutathione pela LTC_4 sintase. Posteriormente, o LTC_4 é degradado em LTD_4 e LTE_4 , sendo esses três

compostos coletivamente conhecidos como cisteinil-LTs (CysLTs) (LEWIS, AUSTEN, 1984; MASSEY & NICOLAOU, 2011). Vários trabalhos relatam sobre a participação dos LTs no câncer. No estudo de Park e colaboradores (2016) foi demonstrado *in vitro* que ocorre aumento da expressão de BLT₂, receptor de baixa afinidade de LTB₄, em células de linhagem de câncer de ovário SK-OV-3 resistentes à cisplatina, sendo que este receptor apresenta um papel importante na resistência ao referido quimioterápico por ativar STAT-3 (*do inglês Signal transducer and activator of transcription*) e, assim, regular positivamente a produção de interleucina - 6 (IL-6). Esses dados sugerem que o BLT₂ pode ser um alvo para o tratamento no câncer de ovário resistente à cisplatina. Carpagnano et al. (2011) avaliaram o condensado de ar expirado e amostras de sangue de pacientes com câncer de pulmão. Os resultados mostraram maiores concentrações de LTB₄ e IL-8, bem como maior infiltrado de neutrófilos, nos pacientes com o tumor em comparação aos indivíduos saudáveis, sendo as concentrações mais elevadas quanto mais avançado o estágio da doença.

Ainda pela via das LOXs, são geradas a LXA₄ e a LXB₄ que são mediadores anti-inflamatórios endógenos que podem ser sintetizadas por três vias transcelulares. Há trabalhos na literatura que mostram que as LXs podem estar envolvidas na inibição da proliferação celular. Em experimentos realizados por HU e colaboradores (2015), o tratamento de queratinócitos humanos *in vitro* com LXA₄ promoveu a parada da fase G0/G1 do ciclo celular e a supressão da fosforilação de ERK 1/2 e da translocação nuclear de NF-κB-p65 (Fator nuclear kappa B). Com isso, houve inibição da proliferação das células e da produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, sugerindo a LXA₄ como potencial agente terapêutico para patologias da pele. Zong e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento *in vitro* da linhagem de células de câncer pancreático humano Panc-1 com LXA₄, pelo período de 24 h, diminuiu a sua capacidade de invasão e inibiu a expressão da metaloproteinase (MMP)-9 e MMP-2 e ativação da sinalização via ERK devido à redução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS).

Por fim, as CYPs são responsáveis pela conversão do AA em ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DiHETEs) e ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs). A importância desses metabólitos e enzimas no câncer já foi relatada em diversos trabalhos. O papel da CYP2J2 epoxigenase no câncer foi avaliado pela primeira vez no trabalho de Jiang e colaboradores (2005),

onde os autores observaram a super expressão dessa enzima em 77% de tecidos humanos com carcinoma de diferentes linhagens. Além disso, o mesmo trabalho mostrou que a transfecção de células tumorais com a enzima CYP2J2 aumentou a proliferação celular, preveniu as células tumorais da apoptose e aumentou o crescimento tumoral.

Alterações no perfil lipídico frequentemente estão associadas a mudanças no fenótipo metabólico de células tumorais, o que tem sido utilizado como marcador em câncer. Considerando isso, o metabolismo lipídico pode ser explorado para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no tratamento de neoplasias, uma vez que a investigação do papel dos EICs pode auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão e resistência do câncer (FRANKEL et al., 2017; KIM et al., 2017). Muitos estudos relacionam a resistência do melanoma à reativação da via de MAPK, à reativação do RTK e a outras vias sinalizadoras (WINDER & VIRÓS, 2018). No entanto, o papel dos mediadores lipídicos na progressão e resistência do melanoma ainda precisa ser investigado.

Nesse contexto, avaliar a participação dos mediadores lipídicos no microambiente tumoral pode auxiliar na compreensão dos fatores envolvidos na resistência do melanoma aos tratamentos, mais especificamente ao Vemurafenibe (inibidor de BRAF), podendo assim contribuir para o desenvolvimento de novas terapêuticas que possibilitem a prevenção ou retardamento das metástases e, consequentemente, melhor prognóstico da doença.

1.3. Metabolôma

Um aspecto importante do prolongamento da sobrevida do paciente é o seu acompanhamento próximo e adequado, com monitoramento de recorrência ou novo câncer (TROTTER et al., 2013). A detecção precoce de melanoma recorrente é importante pois resulta em melhores chances de sobrevivência (CROMWELL et al.; 2012). Além disso, as técnicas terapêuticas direcionadas mais recentes oferecem alguma promessa, ainda que modesta, de melhorar a sobrevida dos pacientes que antes apresentavam um prognóstico bastante negativo (CHAPMAN et al., 2011; HODI et al., 2010; ROBERT et al., 2015). Desde meados de 1920, com o trabalho de Warburg e colaboradores (1927), é conhecido que os processos metabólicos nas células são importantes na transformação maligna, incluindo o aumento da glicólise

e da respiração aeróbica. Entretanto, muitas outras vias metabólicas são perturbadas na malignidade.

O metaboloma, um método de investigação das vias metabólicas dos sistemas biológicos, se concentra na categorização da multiplicidade de metabólitos individuais presentes em um organismo (ZHANG et al., 2013). O metaboloma é definido como uma coleção completa de metabólitos, moléculas pequenas (< 1500 Dalton) encontradas nas células, tecidos ou fluidos (WISHART et al., 2009). Esses compostos coletivamente representam os substratos e produtos de todas as reações bioquímicas nas células, incluindo aminoácidos, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos, vitaminas e outras moléculas orgânicas. A catalogação do grande número de metabólitos que conectam diferentes vias em um organismo é a modalidade mais próxima da descrição completa de um fenótipo em estados normais ou doentes (BEGGER, 2013). Assim, a busca de biomarcadores para identificar a malignidade dos tumores para possível uso de uma terapia específica seria benéfico e ajudaria a determinar a eficácia de determinado tratamento (TENNANT & DURÁN & GOTTLIEB, 2010). Além disso, novos alvos terapêuticos baseados na alteração de processos metabólicos podem apresentar grande impacto nas modalidades de tratamento. No contexto do melanoma, a compreensão do metaboloma pode oferecer informações sobre a fisiopatologia da doença e, finalmente, identificar alvos adicionais para novas terapias (FISHER et al., 2017).

Existem na literatura alguns estudos que se valem de diferentes ferramentas analíticas para demonstrar alterações metabólicas no melanoma. Kim et al. (2017) investigaram, através de técnicas envolvendo espectrometria de massas, alterações no metabolismo celular e lipidômica relacionados aos eventos de metástase em linhagens de melanócitos humanos normais e em linhagens de melanoma com baixo e com alto potencial metastático. Neste estudo, a análise metabolômica identificou o ácido aminomalônico como um potencial biomarcador entre os diferentes estágios do melanoma metastático. Além disso, a avaliação dos lipídeos demonstrou aumento progressivo das espécies de fosfatidilinositol com cadeias de ácidos graxos saturados e monoinsaturados nas células de melanoma com maior potencial metastático, definindo essas moléculas como possíveis biomarcadores. Ainda neste trabalho, os autores identificaram vias metabólicas e lipídicas envolvidas no aumento da motilidade e do potencial metastático nas células de melanoma que podem ser

utilizadas como alvos terapêuticos. No trabalho de Bayci e colaboradores (2018), amostras de soro de 26 pacientes com melanoma em estágio III ou IV tiveram seus perfis bioquímicos comparados com amostras controle por meio de análise metabolômica. Os resultados mostraram que o metabolismo dos aminoácidos, tais como arginina, prolina, triptofano, glutamina, glutamato, glutathione e ornitina, estava significativamente alterado nos estágios de melanoma avançados.

Embora alguns autores já relataram o efeito da PGD_2 em outros modelos tumorais, até o momento não há estudos relacionados com o melanoma, nem a demonstração das alterações metabólicas que ocorrem após o tratamento dessas linhagens com o referido EIC, incluindo comparações entre células parentais e resistentes, antes e após o tratamento. Assim, em nosso trabalho investigamos o papel da PGD_2 nos mecanismos de proliferação e sobrevivência das linhagens de melanoma.

“É preciso, antes de mais nada, querer.”

Amyr Klink

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel dos mediadores lipídicos na resistência das linhagens de células de melanoma humano ao Vemurafenibe, um inibidor de BRAF.

Para isso atingir nosso objetivo foram utilizadas as seguintes estratégias, utilizando diferentes linhagens de melanoma humano e/ou melanócitos;

- 1) Avaliação do perfil de produção de EICs;
- 2) Avaliação, da expressão de enzimas e receptores que participam da via do AA;
- 3) Determinação da citotoxicidade dos mediadores lipídicos, agonistas, antagonistas e inibidores da via do AA;
- 4) Quantificação da produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias no sobrenadante de cultura após tratamento *in vitro* com mediadores lipídicos;
- 5) Avaliação das vias metabólicas perturbadas e se essas vias são modificadas após o tratamento com PGD₂.

“Você pode não mudar o vento, mas pode ajustar as velas do barco para chegar aonde quer.”

Confúcio

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

Os padrões de EICs (5-HETE, 5-oxo-ETE, ($\pm$) 5,6-DiHETrE, 6-keto-PGF_{1 α} , 6-trans-LTB₄, 11-trans-LTD₄, ($\pm$) 11,12-DiHETrE, 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE, ($\pm$) 14,15-DiHETrE, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, 15-HETE, 15-keto-PGE₂, 15-oxo-ETE, 19-OH-PGB₂, 20-HETE, 20-OH-PGE₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄, LXA₄, Mar-1, PDx, PGB₂, PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PHG₂, PGJ₂, RvD₂, e TXB₂), o AA e os padrões internos (12-epi-LTB₄-d₄, 15-HETE-(d8), TXB₂-(d5), 6-keto-PGF_{1 α} -(d4), PGE₂-(d4), PGF_{2 α} -(d4), LXA₄-(d5), RvD₁-(d5), PGD₂-(d4), LTE₄-(d5), AA-(d8), 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂-(d4), 5-HETE-(d8), e 5-oxo-ETE-(d8), o inibidor HQL-79, o agonista (Rosiglitazone) e os antagonistas (GW 9662, u75302, Bay u3405 e BW A868C) foram comprados da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Os solventes grau HPLC, acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), isopropanol e etanol (EtOH), foram obtidos da JT Baker Merck (Kenilworth, NJ, USA). O dimetil sulfóxido (DMSO) foi comprado da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, NJ, USA). Um sistema de água (H₂O) Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA) foi utilizado. O ionóforo A23187, estreptomicina, penicilina, insulina de pâncreas bovina, meio MCDB153, solução salina balanceada de Hank (HBSS), cloreto de cálcio (CaCl₂), ácido acético e acetato de amônio foram utilizados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM), meio Leibovitz (L-15), meio 254CF, suplemento para crescimento de melanócito humano, soro fetal bovino (SFB), e tripsina foram comprados da Gibco® (Waltham, Massachusetts, USA). Vemurafenibe (PLX 4032) foi obtido da Sellek (Houston, Texas, USA). Os lipídeos foram purificados por extração em fase sólida (*Solid phase extraction* – SPE) usando um Waters® Extraction Manifold (Milford, MA, USA) e cartuchos Sep-Pak C18 (500 mg sorbent, 2.8 mL) da Thermo Scientific (Bellefonte, PA, USA).

3.2. Cultura celular

As linhagens de melanoma A375 parental (P) e resistente (R), SK-MEL-29- P e SK-MEL-29-R, WM35 e WM278 foram gentilmente doadas pela Dra Silvy Stuchi Maria-Engler, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo), quem confirmou as identidades das linhagens celulares através de testes de validação. A célula de melanoma A375 foi cultivada em meio RPMI contendo 5 % de

SFB e antibiótico gentamicina enquanto a célula resistente correspondente foi mantida também com 4,5 μM vemurafenibe. A linhagem de melanoma SK-MEL-29 foi cultivada em DMEM suplementado com SFB 10 % e antibiótico gentamicina sendo a linhagem resistente correspondente mantida com 6,0 μM de vemurafenibe. As linhagens de melanoma WM35 e WM278 foram cultivadas em meio MCDB153/Leibovitz's L-15 (4:1) suplementado com 2 % SFB, insulina (5 $\mu\text{g/mL}$) e CaCl_2 1.6 mM. Os melanócitos primários obtidos de amostras de pele de doadores do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP:943/09; CEP/FCF/USP:534) também foram doados pelo laboratório da Dra Silvyia Stuchi Maria-Engler. Os melanócitos e todas as linhagens de melanoma foram mantidos em incubadora umidificada, a 37 °C, contendo 5 % de CO_2 .

3.3. Estimulação da biossíntese de eicosanoides pelos melanócitos e linhagens de melanomas *in vitro*

Os melanócitos e as células de melanoma foram plaqueadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) para estimulação com AA a 40 μM por 10 minutos. O estímulo foi removido para adição de A23187 (1 μM) diluído em meio HBSS incolor por 20 minutos (min). A reação foi parada com 1 mL de MeOH (4 °C) e o sobrenadante armazenado a -80 °C para purificação por extração em fase sólida conforme descrito em Sorgi et al. (2018). Resumidamente, os cartuchos de extração foram previamente lavados com 4 mL de MeOH e equilibrados com 4 mL de água milli-Q. Em seguida, as amostras foram eluídas e as colunas lavadas com 4 mL de água milli-Q para remoção das impurezas hidrofílicas. Os analitos adsorvidos na coluna foram extraídos com 1 mL de MeOH e estocados a - 80 °C para prevenir a degradação metabólica. O solvente então foi removido à vácuo (Concentrator Plus, Eppendorf, Germany) à temperatura ambiente e amostra ressuspensa em 50 μL de MeOH para análise por LC-MS/MS.

3.4. Análises por LC-MS/MS

Esses ensaios foram realizados em um Cromatógrafo Líquido de Ultra-Eficiência (UHPLC) Nexera acoplado a um *TripleTOF*[®] 5600⁺ da AB Sciex (Foster, CA, USA). Para quantificação dos EICs, foi utilizada uma coluna cromatográfica C18 Ascentis Express (Supelco - St. Louis, MO, USA) com diâmetro interno de 100 $\times$ 4.6 mm e tamanho de partícula de 2.7 μm . Todas as condições cromatográficas e de

espectrometria de massas foram descritas no trabalho de Sorgi et al. (2018). Basicamente, a cromatografia foi realizada em fase reversa em que o gradiente consistiu de uma fase A, H₂O/ACN/ácido acético (69.98:30:0.02, v/v/v), pH 5.8 (ajustado com hidróxido de amônio), e fase B, ACN/isopropanol (70:30, v/v). O gradiente de eluição foi de 25 min a uma vazão de 0.6 mL/min. As condições do gradiente foram: 0 a 2.0 min, 0% B; 2.0 a 5.0 min, 15% B; 5.0 a 8.0 min, 20% B; 8.0 a 11.0 min, 35% B; 11.0 a 15.0 min, 70% B; e 15.0 a 19 min, 100% B. Aos 19.0 min, o gradiente retornou para condição inicial de 0% B, e a coluna foi re-equilibrada até 25 min. Os dados foram analisados através dos softwares PeakView 2.1 e o MultiQuant™ 3.0.2 (Foster, CA, USA).

3.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa

As células de melanoma e melanócitos (1×10^6) tiveram o RNA total extraído através do Kit Purelink (Purelink, Ambion Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA extraído foram avaliadas no equipamento NanoDrop (NanoDrop, ThermoScientific). Dois microgramas do RNA extraído foi usado para obtenção do cDNA através do Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. 100,0 ng do cDNA total foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (qRT-PCR) utilizando *primers* TaqMan (Tabela 1) em um equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *Gapdh* foi utilizado como gene de referência (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Neste sistema, os *primers* e sondas foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). Reações foram realizadas em duplicata e a amplificação foi feita nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 1 segundo (s) para desnaturação do DNA e 60°C por 20 s para anelamento do *primer* e polimerização. Os valores da expressão gênica foram normalizados pelos valores da expressão dos genes de *Gapdh* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) e o método $\Delta\Delta C_t$ foi utilizado na análise dos dados. Os resultados comparando todas as linhagens celulares em estudo foram expressos como *fold regulation* ($\text{Log } 2^{-\Delta\Delta C_t}$) em relação ao grupo controle (melanócitos), cujo valor médio foi considerado 1. Na comparação entre a célula parental e sua correspondente resistente, os valores da

expressão gênica foram normalizados pelos valores da expressão dos genes de *Gapdh*. Para a construção do gráfico, a expressão gênica da linhagem parental foi considerada a amostra referência, sendo o $2^{-\Delta\Delta CT}$ igual a 1.

Tabela 1. Primers utilizados na reação de PCR

Primers - TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems
<i>Gapdh</i> (Hs02758991_g1)
<i>Alox5</i> (Hs00167536_m1)
<i>Alox5ap</i> (Hs00233463_m1)
<i>Ltb4r</i> (Hs00609525_m1)
<i>Ltb4r2</i> (Hs00251973_s1)
<i>Ptgs1</i> (Hs00924803_m1)
<i>Ptgs2</i> (Hs00153133_m1)
<i>Ptger1</i> (Hs00168752_m1)
<i>Ptger2</i> (Hs00168754_m1)
<i>Ptger3</i> (Hs00168755_m1)
<i>Ptger4</i> (Hs00168761_m1)
<i>Ppara</i> (Hs 00947538_m1)

3.6. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de morte celular por Azul de Tripan foi utilizado para monitorar a proliferação das linhagens de melanoma A375P, A375R, SK-MEL-29P e SK-MEL-29R em diferentes condições de tratamento, por determinados períodos de tempo, conforme Tabela 2. No caso dos antagonistas U75302, Bay e BW, eles foram adicionados na cultura por 30 min e, em seguida, foi adicionada uma solução de PGD₂ cuja concentração final no poço foi de 20 µM. Para o GW, por ser um antagonista irreversível, ele foi adicionado à cultura celular e, após 30 min de estimulação, foi retirado para adição de uma solução de PGD₂ a 20 µM. Vale ressaltar ainda que as culturas resistentes apresentavam a concentração necessária de Vemurafenibe, conforme descrito no item 3.2, para manter a resistência.

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços (1×10^4 células/poço), permanecendo *overnight* em estufa a 37°C / 5% CO_2 para adesão. Em seguida, foram adicionados os respectivos tratamentos. Após o tempo determinado, as células foram tripsinizadas e diluídas em solução de Azul de Trypan® 0,4 % para contagem em Câmara de Neubauer através de microscópio ótico (Zeiss), onde as células não viáveis foram identificadas pela coloração azul, enquanto as células viáveis não são permeáveis ao corante. Cada experimento foi realizado em triplicata. Para todos os ensaios, foi utilizado EtOH 0,3% como controle experimental.

Os resultados foram expressos como número absoluto de células vivas ou mortas em relação a cada tratamento.

Tabela 2. Tratamentos utilizados no ensaio de viabilidade celular por Azul de Tripan

Linhagem (s)	Tratamento	Concentração final no poço	Período de tempo
A375P	BAY	1; 10 e 20 μM	24 h
	BW	1; 10 e 20 μM	24 h
	GW	0,05; 0,5 e 5 μM	24 h
	U75302	0,1; 1 e 5 μM	24 h
	HQL	1; 10 e 20 μM	24 h
	ROS	5 e 20 μM	24 h
	PGJ ₂	1; 10 e 20 μM	24 h
A375P, A375R, SK-MEL-29P e SK-MEL-29R	PGE ₂	5; 10 e 20 μM	24 h
A375P e A375R	PGD ₂	0,1; 1 e 10 μM	6 e 18 h
		0,1; 1 e 10 e 20 μM	12 e 24 h
SK-MEL-29P e SK-MEL-29R	PGD ₂	0,1; 1 e 10 μM	6 h
		0,1; 1 e 10 e 20 μM	12 e 24 h
	PGJ ₂	1; 10 e 20 μM	24 h

3.7. Ensaio de toxicidade *in vitro* em modelo de esferoide 3D

Os esferoides das linhagens celulares A375P, A375R, SK-MEL-29P e SK-MEL-29R foram gerados pelo método flutuação forçada em placas de baixa adesão Ultra Low Attachment (ULA) de 96 poços (Corning®, New York, USA), conforme descrito por AMARAL et al. (2017). Resumidamente, várias concentrações de células (5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 e 8×10^4 células/mL) foram plaqueadas (100 μ L/poço). Em seguida, a placa foi centrifugada a 300 g por 10 min e mantida em estufa a 37 °C e 5 % CO₂, por diversos períodos de incubação (24, 48, 72 e 96 h). A formação dos esferoides foi acompanhada diariamente através de fotografia para avaliação da circularidade e diâmetro. Quando determinada a melhor condição de formação dos esferoides, no caso 4×10^4 células incubadas por 72 h, os mesmos foram expostos à PGD₂ ou PGE₂ (5, 10, 50, 100 e 200 μ M) por 24 h. Os esferoides foram analisados pelo ensaio de viabilidade celular baseada em ATP usando o kit Cell-Titer Glo® 3D (PROMEGA®), conforme instruções do fabricante. A luminescência foi avaliada em leitor de microplacas (Biotek®, Suwanee, GA, USA) e a viabilidade celular plotada em gráfico em relação ao tratamento utilizado. O ensaio foi realizado em triplicata e em dois experimentos independentes.

3.8. Quantificação de citocinas

O sobrenadante da cultura celular das linhagens de melanoma A375P e R e SK-MEL-29P e R, pré-tratadas ou não com PGD₂ ou PGE₂, foi utilizado para quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF por ensaio imunoenzimático (ELISA). Foram utilizados anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e proteínas recombinantes, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, MN, e PharMingen, San Diego, CA). As densidades ópticas foram mensuradas a 450 nm em leitora de microplacas (mQuant, Biotek Instruments Inc.). A concentração de citocina ou quimiocina de cada amostra foi obtida através de uma curva padrão estabelecida a partir da proteína recombinante correspondente.

3.9. Determinação dos produtos da metabolização das PGD₂ e PGE₂

Para avaliar os metabólitos das células A375P e R após tratamento com as PGs D₂ ou E₂ (ambas a 20 μ M), as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços (1×10^4 células/poço), permanecendo *overnight* em estufa a 37°C/ 5% CO₂ para adesão. Em seguida, foram adicionados os respectivos tratamentos. Após

24 h, o sobrenadante foi coletado e analisado por LC-MS/MS conforme descrito no item 3.4.

3.10. Metabolôma do sobrenadante das linhagens de melanoma humano A375 parental e resistente

O processamento dos sobrenadantes de cultura foi realizado com ACN (2:1 v/v), contendo uma mistura de padrões internos. As proteínas foram removidas por meio de centrifugação à 400g a 4 °C por 10 min. Após a extração, as amostras foram transferidas para frascos de injeção para realização das análises de LC-MS, conforme descrito no item 3.4.. Os espectros de massa foram adquiridos via ionização por spray elétrico e polarização negativa e a razão massa-carga (m/z) variou de 100 a 1500. O programa Proteowizard foi usado para converter arquivos .wiff em mzXML. A seleção de picos, remoção de ruído, alinhamento do tempo de retenção e m/z e quantificação dos compostos ionizados foi realizada com apLCMS. Três parâmetros definem um composto ionizado: m/z , tempo de retenção e valores de intensidade. Este termo refere-se aos íons detectados, porém sem identificação e que podem ser redundantes para um mesmo composto ou metabólito. Portanto, o termo metabólito será utilizado aqui utilizado de forma a aprimorar o entendimento e didática na descrição dos resultados. Amostras de controle de qualidade (pool de amostras) foram avaliadas ao longo da corrida. Cada amostra foi avaliada em duplicata e todas as amostras apresentaram coeficiente de correlação de Pearson $r > 0.7$. Os dados foram transformados para escala $\log_2$ e metabólitos apresentando coeficiente de variação $> 100\%$ entre as amostras de controle de qualidade foram excluídos. Ainda, metabólitos presentes em ao menos 50% do total de amostras e em ao menos 50% das amostras de um grupo específico foram retidos para análises posteriores.

3.11. Análises funcionais do metabolôma

As análises de dados foram realizadas com pacotes disponíveis para linguagem computacional R. A abundância diferencial entre os metabólitos detectados foi realizada com o pacote *limma*, *heat maps* foram gerados com o pacote *gplots* e o pacote *amaps* foi utilizado para obter o agrupamento hierárquico via distância euclidiana e ligação de Ward. Os gráficos de vulcão e de bolhas foram

obtidos com o pacote *ggplot2*. O programa mummichog (versão 1.0.10) foi usado para análises de enriquecimento em vias metabólicas (precisão da massa < 10ppm).

3.12. Análise estatística

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram analisados por teste ANOVA (Análise de variância) seguido do pós teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Para comparação entre duas amostras não pareadas foi utilizado o teste t Student. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes para $P < 0,05$.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”*

Cora Coralina

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do perfil de produção de eicosanoides pelos melanócitos e pelas linhagens de melanoma humano após estimulação *in vitro*

Primeiramente, avaliamos a capacidade dos melanócitos e das linhagens de melanoma A735 (P e R), SK-MEL-29 (P e R), WM35 e WM278, todas apresentando mutação em B-RAF, em produzir mediadores lipídicos, na presença de AA e ionóforo de cálcio A23187, *in vitro*. A quantificação de EICs foi feita através de UHPLC-MS/MS e os resultados obtidos estão representados na Figura 3.

Em geral, comparando a produção de EICs entre os melanócitos e as linhagens de melanoma, pudemos observar que as principais diferenças estavam nos metabólitos da via das LOXs, como os LTs e HETEs, embora produtos da COXs e CYP, como PGD₂ e PGE₂, e 5-oxo-ETE e 11,12-DiHETRE, respectivamente, também foram diferencialmente liberados pelas diversas células. Observamos que as linhagens de melanoma primário WM35 (crescimento radial) e WM278 (crescimento vertical) produziram concentrações menores de EICs quando comparadas aos melanócitos e às linhagens metastáticas A375 e SK-MEL-29, tanto parentais quanto resistentes, e que a linhagem WM278, dentro dos limites do método de quantificação utilizado, não produziu 6- trans-LTB₄, 5-oxo-ETE e 11,12-DiHETRE. Vimos que os melanócitos são células capazes de produzir concentrações consideráveis de EICs quando estimulados com AA. Embora não demonstrado graficamente, dentre as linhagens avaliadas, somente os melanócitos produziram PGE₂ na ausência de AA ($143,61 \pm 17,76$ ng/10⁶ células). Com relação à produção de PGD₂, observamos que a concentração liberada pelas linhagens metastáticas, tanto as parentais quanto as resistentes, foi significativamente superior quando comparadas à dos melanócitos. Além disso, quando comparamos as linhagens metastáticas, A375 e SK-MEL-29, notamos que há diferenças significativas na liberação de EICs, entre a célula parental e resistente, principalmente para a linhagem A375. Para esta célula, a linhagem resistente (A375R) produziu significativamente mais PGE₂, 6-trans-LTB₄, 5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE, 15-HETE, quando comparada com a parental (A375P), com exceção para o 5-oxo-ETE. As linhagens parental e resistente da célula SK-MEL-29 apresentaram diferença apenas na produção de 5-oxo-ETE, o qual foi liberado em menor concentração pela célula resistente (SK-MEL-29R).

Esses resultados indicam que, quando estimuladas, as células de melanoma são capazes de liberar diversos EICs em diferentes concentrações. Estes dados sugerem que estas células podem produzir diferentes mediadores de acordo com o microambiente tumoral e, assim, apresentar distintos mecanismos de sobrevivência, proliferação, morte e resistência.

Figura 3. Concentração dos eicosanoides PGD₂, PGE₂, LTB₄, 6-trans-LTB₄, 5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 5-oxo-ETE e 11,12-DiHETRE no sobrenadante de melanócitos e linhagens de melanoma humano após estimulação *in vitro*. As células (5 x 10⁵ células/poço) foram estimuladas com AA (40 µM/10') e, após remoção do estímulo, foi adicionado ionóforo de cálcio A23187 (1 µM/20'). Os EICs foram quantificados no sobrenadante das células estimuladas por UHPLC/MS-MS após extração por SPE. Diferença significativa com p < 0,05 (*) quando comparado com melanócitos e p < 0,05 (#) quando comparada a linhagem metastática parental com sua correspondente resistente.

4.2. Avaliação da expressão de enzimas do metabolismo do ácido araquidônico e dos receptores de seus metabólitos em melanócitos e em linhagens de melanoma humano

A próxima etapa foi avaliar se as linhagens de melanoma humano em estudo expressavam receptores (BLT₁, BLT₂, EP-1, EP-2, EP-3, EP-4, PPAR- α) e enzimas (COX-1, COX-2, 5-LO) importantes na via do AA, principalmente os relacionados com os LTs e as PGs, que poderiam estar constitutivamente aumentadas ou diminuídas, quando comparadas aos melanócitos.

Como mostrado nas Figuras 4 e 5, os melanócitos sem estímulo, ou seja, em condições basais, apresentam maior expressão de RNAm dos genes *Alox5*, *Alox5ap*, *Ltb4r*, *Ltb4r2*, *Ptgs1*, *Ptgs1*, *Ptgs2*, *Ptger1*, *Ptger2*, *Ptger3* e *Ppara* quando comparados às células WM35, WM278, A375P e R, e SK-MEL-29P e R, com exceções na expressão de EP₄ e 5-LO na linhagem WM35, expressão de EP₃ na linhagem WM278 e de EP₁ na linhagem A375P. Além disso, apenas a expressão de BLT₁, receptor de alta afinidade para LTB₄, foi maior em todas as linhagens de melanoma. Considerando que as linhagens parentais e resistentes apresentam características morfológicas diferentes e podem responder de forma distinta aos diferentes tratamentos, comparamos a expressão de RNAm desses mesmos genes entre as células parentais e resistentes das linhagens metastáticas A375 e SK-MEL-29. De acordo com os dados apresentados na Figura 6, as células A375R expressaram significativamente mais RNAm da enzima 5-LO, dos receptores BLT₁, EP₄ e PPAR- α , e menos das enzimas COX-1 e COX-2, quando comparada à A375P. Com relação à linhagem SK-MEL-29 (Figura 7), apenas a expressão de EP₃, um dos receptores de PGE₂, apresentou diferença significativa, sendo mais expresso na linhagem resistente (SK-MEL-29R).

Em conjunto, esses dados demonstram que as células de melanoma expressam componentes da cascata do AA e de seus receptores, os quais podem estar envolvidos na progressão do melanoma, incluindo os mecanismos de resistência, sendo assim importantes alvos a serem estudados.

Figura 4. Expressão gênica de enzimas COX-1, COX-2, e dos receptores de prostaglandinas em melanócitos e linhagens de melanoma humanos.

Foi avaliado o RNAm para os genes alvo EP-1 (*Ptgr1*), EP-2 (*Ptgr2*), EP-3 (*Ptgr3*), EP-4 (*Ptgr4*), COX-1 (*Ptgs1*) e COX-2 (*Ptgs2*) nos melanócitos primários e nas linhagens de melanoma humanos, em suas condições basais. Os resultados foram normalizados pela expressão endógena do controle interno *Gapdh*. O método $\Delta\Delta Ct$ foi utilizado para análise e os dados foram expressos como *Fold regulation* ($\text{Log}_2 -\Delta\Delta Ct$) em relação ao controle (melanócito).

Figura 5. Expressão gênica das enzimas 5-LO, FLAP e dos receptores de leucotrienos e PPAR melanócitos e linhagens de melanoma humanos. Foi avaliado o RNAm para os genes alvo FLAP (*Alox5ap*), 5-LO (*Alox5*), BLT1 (*Ltb4r1*), BLT2 (*Ltb4r2*) e PPARa (*PPaRa*) nos melanócitos primários e nas linhagens de melanoma humanos, em suas condições basais. Os resultados foram normalizados pela expressão endógena do controle interno *Gapdh*. O método $\Delta\Delta Ct$ foi utilizado para análise e os dados foram expressos como *Fold regulation* ($\log_2 - \Delta\Delta Ct$) em relação ao controle (melanócito).

Figura 6. Expressão relativa de enzimas do metabolismo do ácido araquidônico e dos receptores de seus metabólitos, na linhagem de melanoma metastático A375P e R. Foi avaliado o RNAm para os genes alvo FLAP (*Alox5ap*), 5-LO (*Alox5*), BLT1 (*Ltb4r1*), BLT2 (*Ltb4r2*), COX-1 (*Ptgs1*), COX-2 (*Ptgs2*), EP-2 (*Ptgr2*), EP-3 (*Ptgr3*), EP-4 (*Ptgr4*) e PPAR- α (*Ppara*) na linhagem metastática de melanoma A375, em suas condições basais. Os dados foram demonstrados em expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em relação ao controle (A375P - linhagem parental). *p < 0.05 quando comparada a expressão na célula resistente em relação à parental.

Figura 7. Expressão relativa de enzimas do metabolismo do ácido araquidônico e dos receptores de seus metabólitos de melanoma metastático SK-MEL-29P e R. Foi avaliado o RNAm para os genes alvo FLAP (*Alox5ap*), BLT1 (*Ltb4r1*), BLT2 (*Ltb4r2*), COX-1 (*Ptgs1*), COX-2 (*Ptgs2*), EP-2 (*Ptgr2*), EP-3 (*Ptgr3*), EP-4 (*Ptgr4*) e PPAR- α (*Ppara*) na linhagem metastática de melanoma SK-MEL-29, em suas condições basais. Os dados foram demonstrados em expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em relação ao controle (SK-MEL-29P - linhagem parental). * $p < 0.05$ quando comparada a expressão na célula resistente em relação à parental.

4.3. Determinação da citotoxicidade após tratamento das células com mediador lipídico

Considerando que as linhagens de melanócitos e de melanoma produzem mediadores lipídicos derivados do AA, e que expressaram constitutivamente os seus receptores e enzimas do metabolismo, nos indagamos sobre o possível papel destas substâncias (ativação/inibição) na sobrevivência, proliferação e morte dessas células. Assim, com foco em diferenças da resposta entre a célula parental e sua correspondente resistente, avaliamos o efeito do tratamento das células de melanoma metastático A375 e SK-MEL-29 com PGD₂ ou PGE₂.

4.3.1. Azul de Tripan

Inicialmente, foram realizados ensaios de citotoxicidade das células A375P empregando o método de exclusão por Azul de Tripan, pelo período de 24 h, com PGD₂ (0,1; 1; 10 e 20 µM) e PGE₂ (5; 10 e 20 µM). Os controles foram tratados com meio de cultura contendo EtOH 0,3 %, que foi a maior concentração utilizada no preparo dos compostos utilizados nesses experimentos. As análises foram realizadas em pelo menos dois experimentos independentes feitos em triplicata.

Considerando que a redução da proliferação da A375P foi significativa após o tratamento com PGD₂ (Figura 8D) e que vários trabalhos científicos ressaltam a importância da via das COXs no controle tumoral, principalmente por PGs, nos experimentos seguintes avaliamos diferentes tempos de tratamento, e se a linhagem A375R apresentaria o mesmo comportamento. Como observado na Figura 8, nos períodos de 6 h, 12 h e 18 h não foi observada diminuição do número de células, em todas as concentrações utilizadas, para ambas as linhagens. Entretanto, após 24 h de tratamento, a linhagem A375R também apresentou diminuição significativa da proliferação após tratamento com 10 e 20 µM de PGD₂. A seguir avaliarmos o efeito da PGD₂ sobre as linhagens metastáticas SK-MEL-29P e SK-MEL-29R. Observamos que, embora sem diferença estatística após tratamento com PGD₂ nas concentrações utilizadas e nos períodos de 6 e 12 h, tanto a célula parental quanto a resistente apresentaram diminuição da proliferação quando tratadas por 24 h com 20 µM deste lipídio (Figura 9). Por fim, tratamos as células A375P, A375R, SK-MEL-29P e A375R com PGE₂, em diferentes concentrações (5, 10 e 20 µM), por 24 h. Embora as células A375P e A375R não apresentaram diminuição da proliferação,

observamos que a SK-MEL-29R teve seu número reduzido significativamente após o referido tratamento com todas as concentrações utilizadas (Figura 10).

Esses dados indicam que metabólitos derivados da via das COXs podem ser importantes para a proliferação das células das linhagens A375 e SK-MEL-29, e que as células resistentes e parentais podem apresentar sensibilidades diferentes aos tratamentos.

Figura 8. Efeito da PGD₂ na viabilidade das células A375P e A375R. A viabilidade celular das linhagens de melanoma metastático A375P e A375R foi avaliada através de ensaio de exclusão por Azul de Tripán após tratamento com PGD₂ (0,1, 1, 10 e 20 μM) nos períodos de 6 h, 12 h, 18 h e 24 h. Controles são células incubadas com meio de cultura acrescido de 0,3% de EtOH. Os tratamentos estão apresentados no eixo x e o número de células absolutas no eixo y. * $p < 0,05$ em comparação ao controle.

Figura 9. Efeito da PGD₂ na viabilidade das células SK-MEL-29P e SK-MEL-29R. A viabilidade celular das linhagens de melanoma metastático SK-MEL-29P e SK-MEL-29R foi avaliada pelo ensaio de exclusão por Azul de tripan após tratamento com PGD₂ (0,1, 1, 10 e 20 μM) pelo período de 6 h, 12 h e 24 h. Controle corresponde a células incubadas com meio de cultura contendo 0,3% de EtOH. Os tratamentos foram apresentados no eixo x e o número de células absolutas no eixo y. * p < 0,05 em comparação com o controle.

Figura 10. Efeito da PGE₂ na viabilidade das células A375P, A375R, SK-MEL-29P e SK-MEL-29R. A viabilidade celular das linhagens de melanoma foi avaliada através de ensaio de exclusão por Azul de Tripán após tratamento com PGE₂ (5, 10 e 20 μM) pelo período de 24 h. O controle corresponde ao meio de cultura contendo 0,3% de EtOH. Os tratamentos foram apresentados no eixo x e o número de células absolutas no eixo y. * $p < 0,05$ em comparação com o controle.

4.3.2. Avaliação dos efeitos da PGE₂ e PGD₂ na viabilidade celular das linhagens de melanoma metastático em modelo de esferoide 3D

Nesta etapa, avaliamos a viabilidade celular das células A375 e SK-MEL-29, parentais e resistentes, em modelo de esferoide, após tratamento com PGD₂ ou PGE₂. Na etapa de padronização da formação de esferoides foram testados diferentes números de células/poço (500, 1000, 2000, 4000 e 8000) e períodos de incubação (48, 72 e 96 h) (Figuras 11, 12, 13 e 14). Após acompanhamento diário da formação dos esferoides por documentação fotográfica, foi determinado que o diâmetro e circularidade mais satisfatórios foram alcançados com 4000 células após 72 h.

Após a formação dos esferoides, as células foram tratadas com diferentes concentrações de PGD₂ ou PGE₂. Iniciamos os ensaios utilizando as concentrações avaliadas no modelo em monocamada, sendo 1, 10 e 20 µM para PGD₂ e 5, 10 e 20 µM para a PGE₂. Conforme esperado, não houve efeito na viabilidade celular. Foram então avaliadas concentrações mais elevadas dos compostos (50, 100 e 200 µM, para ambos), uma vez que no modelo 3D as células estão menos expostas ao ambiente externo. Os resultados apresentados nas Figuras 15 e 16 mostraram a viabilidade das células após os tratamentos com PGD₂ por 24 h. Observamos que a linhagem A375P teve redução da viabilidade nas concentrações de 100 e 200 µM enquanto a A375R foi mais sensível, apresentando também diminuição significativa da viabilidade na concentração de 50 µM. Em relação ao tratamento com PGE₂, ambas as linhagens diminuíram a viabilidade somente com 200 µM. Com relação à célula SK-MEL-29, tanto a parental (Figura 17) quanto a resistente (Figura 18) apresentaram redução da viabilidade celular após o tratamento com PGD₂ nas concentrações de 100 e 200 µM. Em relação à presença de PGE₂, observamos o mesmo efeito na concentração de 200 µM. A célula parental também apresentou viabilidade menor na concentração de 100 µM.

Em conjunto esses dados mostram que a PGD₂ induz a morte de células de melanoma, sendo a A375R mais sensível, uma vez que o efeito significativo foi alcançado com menores concentrações desse mediador lipídico. A resposta a este mediador foi semelhante em ensaios de monocamadas e esferoides.

Figura 11. Parâmetros avaliados na formação dos esferoides de células de melanoma humano A375P. Diferentes concentrações de células de melanoma humano A375P foram cultivadas por 48, 72 e 96 h (A) e o diâmetro (B) e esfericidade (C) foram determinados.

Figura 12. Parâmetros avaliados na formação dos esferoides de células de melanoma humano A375R. Diferentes concentrações de células de melanoma humano A375R foram cultivadas por 48, 72 e 96 h (A) e o diâmetro (B) e esfericidade (C) foram determinados.

Figura 13. Parâmetros avaliados na formação dos esferoides de células de melanoma humano SK-MEL29P. Diferentes concentrações de células de melanoma humano SK-MEL-29P foram cultivadas por 48, 72 e 96 h (A) e o diâmetro (B) e esfericidade (C) foram determinados.

Figura 14. Parâmetros avaliados na formação dos esferoides de células de melanoma humano SK-MEL29R. Diferentes concentrações de células de melanoma humano SK-MEL-29R foram cultivadas por 48, 72 e 96 h (A) e o diâmetro (B) e esfericidade (C) foram determinados.

Figura 15. PGD₂ e PGE₂ reduzem a viabilidade de esferoides de melanoma A375P. Os esferoides da linhagem de melanoma A375P foram tratados com PGD₂ (50, 100 ou 200 μM) ou PGE₂ (50, 100 ou 200 μM) por 24 h. A viabilidade das células após o tratamento foi avaliada pelo ensaio baseado em ATP usando o kit Cell-Titer Glo® 3D (PROMEGA®). As fotomicrografias foram obtidas através de microscópio ótico invertido. Resultados expressos como média ± SEM (n = 3) representativo de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$ comparado com as células incubadas com meio contendo EtOH 0,3 %, utilizando o teste *t* Student.

Figura 16. PGD₂ e PGE₂ reduzem a viabilidade de esferoides de melanoma A375R. Os esferoides da linhagem de melanoma A375 R foram tratados com PGD₂ (50, 100 ou 200 μM) ou PGE₂ (50, 100 ou 200 μM) por 24 h. A viabilidade das células após o tratamento foi avaliada pelo ensaio baseado em ATP usando o kit Cell-Titer Glo® 3D (PROMEGA®). As fotomicrografias foram obtidas através de microscópio ótico invertido. Resultados expressos como média ± SEM (n = 3) representativo de dois experimentos diferentes. **p* < 0,05 comparado com as células incubadas com meio contendo EtOH 0,3 %, utilizando o teste *t* Student.

Figura 17. PGD₂ e PGE₂ reduzem a viabilidade de esferoides de melanoma SK-MEL-29P. Os esferoides da linhagem de melanoma SK-MEL-29P foram tratados com PGD₂ (50, 100 ou 200 µM) ou PGE₂ (50, 100 ou 200 µM) por 24 h. A viabilidade das células após o tratamento foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular baseado em ATP usando o kit Cell-Titer Glo® 3D (PROMEGA®). As fotomicrografias foram obtidas através de microscópio ótico invertido. Resultados expressos como média ± SEM (n = 3) representativo de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$ comparado com as células incubadas com meio contendo EtOH 0,3 %, utilizando o teste t Student.

Figura 18. PGD₂ e PGE₂ reduzem a viabilidade de esferoides de melanoma SK-MEL-29R. Os esferoides da linhagem de melanoma SK-MEL-29R foram tratados com PGD₂ (50, 100 ou 200 µM) ou PGE₂ (50, 100 ou 200 µM) por 24 h. A viabilidade das células após o tratamento foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular baseado em ATP usando o kit Cell-Titer Glo® 3D (PROMEGA®). As fotomicrografias foram obtidas através de microscópio ótico invertido. Resultados expressos como média ± SEM (n = 3) representativo de dois experimentos diferentes. **p* < 0,05 comparado com as células incubadas com meio contendo EtOH 0,3 %, utilizando o teste t Student.

4.4. PGD₂ e PGE₂ induzem liberação de citocinas em linhagens A375 e SK-MEL-29

O sobrenadante das células de melanoma tratadas com PGD₂ (1, 10 e 20 µM) e PGE₂ (5, 10 e 20 µM), pelo período de 24 h, foi coletado para quantificação de citocinas (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF). Nas condições avaliadas e dentro dos limites de quantificação do método utilizado, nenhuma das linhagens produziu IL-1β ou TNF.

Como demonstrado na Figura 19, após tratamento com PGD₂, a linhagem A375P diminuiu a produção de IL-6, na concentração de 1 µM (Figura 19A), e aumentou de IL-8 em todas as concentrações utilizadas (Figura 19B). Já a linhagem resistente (A375R), nas mesmas condições, não mostrou diferença significativa quanto a produção de IL-6 (Figura 19A). Entretanto, houve aumento na produção de IL-8 nas concentrações de 1 e 10 µM (Figura 19B). Também foi observado que a linhagem A375, tanto parental quanto resistente, aumentou a liberação de IL-6 e IL-8 após tratamento com PGE₂, em todas as concentrações utilizadas, em comparação com células incubadas com meio contendo EtOH 0,3 % (Figuras 19C e 19D). Interessante que ambos os estímulos induziram maior produção de IL-8 do que IL-6, principalmente pelas células A375R. Não foi observada liberação de IL-10 por essa linhagem celular em nenhuma das condições.

Com relação à célula SK-MEL-29, os dados mostraram que, na célula parental, apenas PGD₂ 20 µM aumentou significativamente IL-8 (Figura 20A). Já a SK-MEL-29R diminuiu a produção de IL-8 (Figura 20A), quando comparada ao controle, após tratamento com PGD₂ 1 µM, aumentou a liberação da referida citocina, após tratamento nas demais concentrações. Com relação à IL-10 (Figura 20B), a linhagem parental diminuiu a produção desta citocina na presença de PGD₂, em todas as concentrações utilizadas. Já no tratamento com PGE₂, apenas houve diferença significativa na liberação de IL-8, na concentração de 20 µM (Figura 20C), onde a linhagem resistente apresentou maior produção quando comparada à amostra controle. Não foi observada liberação de IL-6 por essa linhagem celular em nenhuma condição avaliada.

Esses resultados demonstram que o tratamento das linhagens de melanoma com PGD₂ ou PGE₂ modula a produção de citocinas, podendo as mesmas serem importantes para sobrevivência, proliferação, morte ou resistência das células no microambiente tumoral.

Figura 19. PGD₂ e PGE₂ induzem a produção de IL-6 e IL-8 pelas células A375P e R. As células de melanoma foram tratadas com PGD₂ ou PGE₂, por 24 h, a 37 °C, 5% CO₂. As concentrações de IL-6 e IL-8 do sobrenadante de cultura foram determinadas por ELISA. Resultados expressos como média ± SEM (n = 3) representativo de três experimentos diferentes. **p* < 0,05 comparado com as células incubadas com meio contendo EtOH 0,3 %, utilizando o teste *t* Student.

Figura 20. PGD₂ e PGE₂ modulam a produção de IL-8 e IL-10 pelas células SK-MEL-29P e SK-MEL-29R. As células de melanoma foram tratadas com PGD₂ ou PGE₂, por 24 h, a 37 °C, 5% CO₂. As concentrações de IL-8 e IL-10 do sobrenadante de cultura foram determinadas por ELISA. Resultados expressos como média ± SEM (n = 3) representativo de três experimentos diferentes. **p* < 0,05 comparado com as células incubadas com meio contendo EtOH 0,3 %, utilizando o teste *t* Student.

4.5. Tratamento das células A375P e R com agonista ou antagonistas de receptores de metabólitos do ácido araquidônico, ou com inibidores de síntese

Para compreender o mecanismo de ação da PGD₂, tratamos as células A375P e R com diferentes antagonistas e agonista de receptores de metabólitos do AA. Empregamos BW (antagonista do receptor DP₁), BAY (antagonista do receptor DP₂), GW (antagonista do receptor PPAR_γ), U75302 (antagonista do receptor BLT₁), Rosiglitazone (ROS, agonista do receptor PPAR_γ). As células também foram tratadas com o inibidor da PGD₂-sintase, o composto HQL, seguido ou não da adição de PGD₂ 20 μM, por 24 h. Em todas as condições a proliferação celular foi avaliada pelo método de exclusão por Azul de Tripán.

As Figuras 21 e 22 demonstraram que ocorre a diminuição da proliferação celular após o tratamento com PGD₂, mas que, tanto na célula A375P quanto na A375R, este efeito não é revertido pelos antagonistas dos receptores DP₁ e DP₂ (Figuras 21A, 21B, 22A e 22B). Esses dados sugerem que o efeito exercido pela

PGD₂ não envolve esses receptores. Além disso, vimos que a inibição da enzima PGD₂-sintase também não apresentou efeito na proliferação das células (Figuras 21E e 22E). Considerando que existem dados do laboratório indicando que a PGD₂ pode atuar via receptor BLT₁, utilizamos o antagonista deste receptor para avaliar se o efeito na proliferação poderia ser via este receptor. Entretanto, o uso do antagonista de BLT₁ seguido do tratamento com PGD₂ também não reverteu o efeito inibitório da proliferação celular (Figuras 21D e 22D) indicando que o receptor BLT₁ não está envolvido neste mecanismo.

De acordo com a literatura, o efeito na diminuição da proliferação celular poderia ser resultado da metabolização da PGD₂ em PGJ₂ ou metabólitos relacionados, ou seja, indiretamente. Dessa forma, utilizamos um agonista de PPAR_γ (receptor de PGJ₂ e metabólitos), para avaliar o aumento na proliferação celular. Também empregamos antagonista de PPAR_γ para avaliar se o efeito na redução da proliferação celular após tratamento com PGD₂ seria revertido. Porém, nenhum efeito foi observado (Figuras 21C, 21F e 22C), indicando que o mecanismo de ação da PGD₂ não está relacionado diretamente com esse receptor.

Figura 21. Inibidor da síntese, antagonistas e agonista de metabólitos do AA não reverteram o a diminuição da proliferação celular induzida por PGD₂, em células A375P. As células de melanoma A375P foram tratadas com Bay (1, 10 e 20 μM), BW (1, 10 e 20 μM), GW (0,05, 0,5 e 5 μM), U75302 (0,1, 1 e 5 μM), HQL (1, 10 e 20 μM) ou ROS (5 e 20 μM), seguido ou não de PGD₂, por 24 h, a 37°C, 5 % CO₂. A proliferação celular foi avaliada pelo teste de exclusão de Azul de Tripán. Resultados expressos como média ± SEM (n = 3) representativo de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$ comparado às células incubadas com meio contendo EtOH 0,3%, utilizando o teste *t* Student.

Figura 22. Inibidor da síntese, antagonistas e agonista de metabólitos do AA não revertem o a diminuição da proliferação celular induzida por PGD₂, em células A375R. As células de melanoma A375R foram tratadas com Bay (1, 10 e 20 μM), BW (1, 10 e 20 μM), GW (0,05, 0,5 e 5 μM), U75302 (0,1, 1 e 5 μM) ou HQL (1, 10 e 20 μM), seguido ou não de PGD₂, por 24 h, a 37 °C, 5 % CO₂. A proliferação celular foi avaliada pelo teste de exclusão de Azul de Tripán. Resultados expressos como média ± SEM (n = 3) representativo de dois experimentos diferentes. **p* < 0,05 comparado às células incubadas com meio contendo EtOH (0,3%), utilizando o teste *t* Student.

4.6. Avaliação do efeito da PGJ₂ na cultura de melanoma humano

Considerando que o efeito na diminuição da proliferação celular após tratamento com PGD₂ poderia ser devido à ação de um dos seus metabólitos, o composto PGJ₂, as linhagens A375P e SK-MEL-29P e R foram incubadas com diferentes concentrações de PGJ₂ (1, 10 e 20 µM), por 24 h. Notamos que após tratamento com 10 e 20 µM de PGJ₂, houve redução no número de células A375P, SK-MEL-29P e SK-MEL-29R viáveis quando comparadas às respectivas células em meio de cultura contendo EtOH 0,3 % (Figura 23). Também observamos que células SK-MEL-29P morreram mais após tratamento com 20 µM de PGJ₂ (Figura 23C). Em conjunto, esses resultados indicam que a morte das células A375P, SK-MEL-29P e SK-MEL-29R pode ser mediada por PGD₂ e seus metabólitos, embora por mecanismo independente dos receptores DP1, DP2 ou PPRA_γ.

Figura 23. Tratamento das células A375P e SK-MEL-29P e R com PGJ₂ diminui a proliferação celular. As células de melanoma A375P e SK-MEL-29P e R foram tratadas com PGJ₂ (1, 10 e 20 µM), por 24 h, a 37 °C, 5 % CO₂. A proliferação celular foi avaliada pelo teste de exclusão de Azul de Tripán. Resultados expressos como média ± SEM (n = 3) representativo de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$ comparado às células em meio com EtOH (0,3%), utilizando o teste t Student.

4.7. Análise dos metabólitos da PGD₂ no sobrenadante das células A375 parental e resistente

A seguir, investigamos se as células de melanoma A375P e R seriam capazes de metabolizar a PGD₂ *in vitro*. Para isso, coletamos o sobrenadante da linhagem A375P e R após 24 h de tratamento com PGD₂ (20 µM) e analisamos alguns de seus metabólitos, PGJ₂ e 15-deoxi^{12,14}-PGJ₂ (15-dPGJ₂), por LC-MS/MS. Para avaliar se a conversão da PGD₂ em seus metabólitos era independente das células adicionamos as mesmas concentrações de PGD₂ nos poços sem células. Os dados apresentados na Figura 24 mostraram que a PGD₂ é convertida a PGE₂, PGJ₂ e 15-dPGJ₂ e que esse fenômeno independe das linhagens celulares

avaliadas, uma vez que o sobrenadante correspondente aos poços sem células (controle) também apresentaram esses compostos (Figura 24A). Entretanto, observamos que na presença das células A375R houve uma menor conversão da PGD_2 a 15-dPGJ_2 ($\pm 0,27 \mu\text{M}$) quando comparado com as células A375P ($\pm 0,40 \mu\text{M}$) e com o controle ($\pm 0,52 \mu\text{M}$).

Também realizamos o mesmo protocolo adicionando PGE_2 (20 μM) ao invés de PGD_2 . Nossos dados mostraram (Figura 24) que após esse tratamento o sobrenadante da linhagem resistente (A375R) não apresentou o composto PGJ_2 , diferentemente do que foi observado no controle (sem células) e no sobrenadante da linhagem parental (A375P).

Esses dados demonstram que as células parentais e resistentes apresentam metabolismo diferente e que isso pode influenciar nos mecanismos de proliferação, sobrevivência, morte e resistência.

Figura 24. Concentração dos eicosanoides PGD_2 , PGE_2 , PGJ_2 e 15-deoxi-PGJ_2 no sobrenadante das linhagens de melanoma humano A375P e R após tratamento com PGD_2 ou PGE_2 . As células A375P e R (5×10^5 células/poço) foram tratadas com PGD_2 (20 μM) ou PGE_2 (20 μM). Após 24 h o sobrenadante foi coletado para quantificação dos metabólitos da via do AA por UHPLC/MS-MS após extração por SPE.

4.8. Análise do metaboloma do sobrenadante das células A375 parental e resistente através de plataformas de bioinformática

Nesta etapa, através de LC-MS e ferramentas de bioinformática, selecionamos a linhagem A375 para avaliar as vias metabólicas que poderiam estar potencialmente envolvidas com o mecanismo de resistência do melanoma humano ao inibidor de BRAF, Vemurafenibe, bem como o efeito do tratamento com PGD_2 no metabolismo dessas células. Para observar as diferenças no metaboloma funcional foi utilizada uma abordagem holística por meio da tecnologia de metabolômica. Após pré-processamento e tratamento dos dados obtidos por LC-MS do sobrenadante das

células, nas diferentes condições, nossa plataforma de metabolômica conseguiu identificar mais de 13.000 compostos ionizados.

A análise de abundância diferencial permite dizer que as células A375P e R apresentam diferenças significativas no metabolismo (681 metabólitos $p < 0.05$), mesmo sem nenhum tratamento Figura 25^a. O tratamento com PGD₂ amplificou as diferenças metabólicas entre as linhagens, com aumento do número de metabólitos diferencialmente abundantes entre elas (1940 metabólitos $p < 0.05$) (Figura 25B). De fato, a PGD₂ tem efeito significativo em ambas as linhagens, visto que o tratamento alterou a abundância de 553 metabólitos ($p < 0.05$) nas células A375P (Figura 25C) e 551 metabólitos ($p < 0.05$) em A375R (Figura 25D). Em conjunto, esses dados indicam que as células apresentam um perfil metabólico distinto e que o tratamento com PGD₂ ampliou ainda mais essas diferenças.

Avaliando os *heat maps* na Figura 26, observamos que em estado basal (células somente em meio de cultura), as células parentais apresentam um número maior de metabólitos regulados positivamente quando comparadas a células resistentes (Figura 26 B). Embora PGD₂ induza número semelhante de metabólitos diferencialmente abundantes tanto em A375P e A375R, o padrão de alteração é diferente, com formação de clusters de metabólitos diferentes (Figura 26^a). No último *heat map* (Figura 26B) fica notável a diferença metabólica entre as linhagens tratadas com PGD₂.

A sobreposição de metabólitos diferencialmente abundantes (MDA) entre células parentais ou resistentes comparadas a seus respectivos controles (células cultivadas apenas com meio) demonstrou que apenas 41 destes MDA foram comuns entre as linhagens (Figura 26C). Isso sugere que embora o número de MDA seja semelhante (553 parental vs 551 resistente), PGD₂ induz a modulação do metabolismo de forma diferente nas duas linhagens. De fato, grande parte dos MDA (391) que diferem entre as linhagens no estado basal também são afetados após tratamento com PGD₂ (Figura 26D), porém induz uma reprogramação metabólica que difere significativamente entre as células parentais e resistentes.

Para entender o significado biológico destas alterações, foi realizada uma análise de predição da atividade de vias metabólicas, conforme Figura 27. Observamos que, comparado ao estado basal (células cultivadas apenas com meio), o tratamento de células parentais com PGD₂ induziu perturbação significativa de vias como metabolismo de vitamina E, formação de PG, metabolismo de LT,

metabolismo de histidina, e metabolismo de arginina e prolina (Figura 27 – 1º coluna). Ainda comparado ao estado basal, o tratamento de células resistentes com PGD₂ afetou vias comuns a células parentais, como metabolismo de LT e de histidina, mas também perturbou o metabolismo de ácido siálico, biossíntese de N-glicana e metabolismo de glicoesfingolípido (Figura 27 – 2º coluna). As análises sugerem que diversas vias metabólicas possuem atividade diferente entre células parentais e resistentes em estado basal, incluindo metabolismo de vitamina E, metabolismo de triptofano, metabolismo de leucotrieno, visto que as mais significativas foram a biossíntese de N-glicana (Figura 27 – 3º coluna). Ainda, a comparação entre células parentais e resistentes tratadas com PGD₂ demonstrou perturbação de vias como metabolismo de vitamina E e metabolismo de triptofano que já estavam afetadas no estado basal (Figura 27 – 3º coluna). Vias como metabolismo de xenobióticos, metabolismo de cisteína e metionina e a transferência via carnitina foram especificamente perturbadas nesta comparação e, portanto, sugerem que as diferenças fenotípicas após tratamento com PGD₂ sejam resultado de alterações nestas vias metabólicas.

Esses resultados indicam diferenças significativas no metabolismo funcional das células avaliadas, e após o tratamento com PGD₂, provendo grande potencial para caracterização de compostos biomarcadores e alvos terapêuticos.

Figura 25. Volcano Plots. Cada ponto representa um pico de m/z sendo que os pontos em vermelho representam metabólitos diferencialmente abundantes ($P < 0.05$) entre as células A375P e A375R (A e B) ou compara o efeito do tratamento com PGD₂ em relação ao meio (C e D).

Figura 26. Análises metabolômicas de sobrenadante de células A375 parental e resistente. Heat maps dos metabólitos das células A375P e R após o tratamento com PGD₂ (20 μ M) em comparação ao meio (A) e (B). Diagrama de Venn comparando a sobreposição e não sobreposição dos metabólitos abundantes diferencialmente nas células A375P e R após tratamento com PGD₂ (20 μ M) em comparação com o meio (C) e entre elas antes e após as mesmas condições (D).

Figura 27. Vias metabólicas enriquecidas do metabolôma das células de melanoma A375P e R após tratamento com PGD₂. A circunferência colorida é proporcional ao score enriquecido e o tamanho à significância, conforme indicado no eixo x.

*“A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita, torna-se realidade”*
Buda

5. DISCUSSÃO

Os EICs são metabólitos do AA e medeiam processos fisiológicos e patológicos. Nosso grupo de pesquisa tem contribuído para o entendimento do papel desses mediadores em diferentes situações como no envenenamento (REIS et al., 2020^a; ZOCCAL et al., 2018; ZOCCAL et al., 2016), no estresse (LOCACHEVIC et al., 2019), em infecções virais (TRINDADE et al., 2012), bacterianas (SORGI et al., 2019; PRADO et al., 2017) e fúngicas (PEREIRA et al., 2018; MEDEIROS et al., 2004), na anemia falciforme (GALVÃO et al., 2016), em parasitoses (SOUZA et al., 2019; MACHADO et al., 2011), na sepse (PEREIRA et al., 2020), entre outros (REIS et al., 2020^b; ABREU-FILHO, et al., 2019; REIS et al., 2017).

Apesar de vários trabalhos da literatura demonstrar que os metabólitos do AA apresentam papel importante na malignidade de alguns cânceres (CHATTERJEE et al., 2018; XU et al., 2015, KIM et al., 2015), não existe nenhum estudo comparando a produção desses metabólitos entre linhagens celulares parentais e resistentes de melanoma. Sabe-se ainda que metabólitos da CYP450 (20-HETE, 11,12-EET e 14,15-EET) promovem o crescimento celular e angiogênese, aumentam a proliferação e diminuem a apoptose celular no feocromocitoma (CECILIA et al., 2020). Outros trabalhos mostraram que a apoptose de células de carcinoma hepático induzida pela quimioterapia pode alterar o microambiente tumoral pela ativação da via da LOX-5, liberando LTB₄, o qual estimula a adesão e migração das células tumorais remanescentes após o tratamento (ZHAO et al., 2020). Ainda, em modelo xenográfico utilizando células de câncer colorretal humano, o tratamento com PGE₂ e LTD₄ aumentou o crescimento tumoral em camundongos e promoveu o aumento de infiltrado de neutrófilos e macrófagos do padrão M2 e das citocinas IL-1β, IL-2, IL-6, TNF e CXCL1/KC/GRO no plasma (BELLAMKONDA et al., 2016). Estes dados sugerem papéis relevantes dos mediadores lipídicos na tumorigênese. O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo, sendo responsável por aproximadamente 80% das mortes causadas por tumores nesse órgão (SHORE et al., 2011). Sua alta mortalidade está relacionada à sua capacidade metastática e alta resistência à quimioterapia convencional. O estudo de Zhang e colaboradores (2018) mostrou que adipócitos aumentam a proliferação e invasão de células de melanoma adjacentes pela transferência direta de lipídeos através de transportadores FATP (do inglês *fatty acid transporter proteins*) altamente expressos nas células do referido tumor. Dessa forma, a compreensão da contribuição dos metabólitos do AA na patogênese do melanoma pode auxiliar na identificação de uma terapia mais segura

e eficaz. Em modelo de melanoma, estudos já mostraram que enquanto os derivados do ômega-6, como a PGE_2 e o LTB_4 , participam da formação, crescimento e metástase tumoral, os metabólitos do ômega-3 apresentam efeito supressor (XIA et al., 2006). Entretanto, no melanoma humano, o papel desses lipídeos ainda precisa ser investigado.

Aproximadamente metade dos pacientes acometidos pelo melanoma metastático apresenta substituição valina-glutamina no códon 600 da quinase serina/treonina BRAF. O vemurafenibe é um dos inibidores de BRAF utilizados no tratamento, por induzir uma excelente taxa de resposta. Porém, a reincidência ocorre e a doença se torna mais agressiva. Inúmeros pesquisadores buscam compreender os mecanismos de resistência dos inibidores de BRAF e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Nossos resultados mostraram que no sobrenadante das linhagens resistentes, principalmente nos da A375, foram encontradas concentrações mais elevadas de EICs, semelhante ao demonstrado na literatura em outros tipos de tumores. Zhang e colaboradores (2020) avaliaram a participação dos EICs na quimiorresistência e metástase do câncer de ovário em estudos *in vitro* com as linhagens SKOV3 e SKOV3-R. Eles demonstraram que no sobrenadante de células resistentes há maiores concentrações de LTB_4 , 12-HETE, TXB_2 , 5,6-EET, 14,15-EET, 14,15-DHET, 11-HETE e 11,12-DHET. Os autores ainda mostraram que as enzimas 12-LOX, COX-1 e CYP2J2, envolvidas na biossíntese desses mediadores lipídicos estavam *up-reguladas* na linhagem resistente. Além disso, a inibição da enzima 12-LOX tornou as células SKOV3-R sensíveis ao tratamento com cisplatina e reduziu metástase em camundongos (*in vivo*). Carter e colaboradores (2019) também avaliaram o papel da PGE_2 na leucemia mieloide aguda (LMA). Células mesenquimais do estroma quando em co-cultura com células de pacientes com LMA apresentaram aumento da expressão de COX-2 e da produção de PGE_2 de modo dependente da caspase repressora de apoptose (CRA)/IL-1 β . Eles demonstraram ainda que a PGE_2 induziu o aumento de β -catenina, que regula a CRA, que por sua vez induz aumento da quimiorresistência das células LMA, devido seu efeito antiapoptótico. Portanto, a produção desses mediadores no microambiente tumoral pode alterar os mecanismos de progressão e resistência do melanoma, justificando os estudos sobre o papel desses lipídeos. Nossos resultados mostraram que após estimulação *in vitro* de melanócitos com

ionóforo de cálcio ocorre liberação de altas concentrações dos metabólitos do AA, fato que pode estar relacionado com a resistência dessas células.

Há na literatura a descrição que enzimas e receptores envolvidos no metabolismo do AA e no reconhecimento dos metabólitos participam da biologia de diferentes carcinomas, pois aumentam a proliferação celular, inibem a apoptose e as células do sistema imune, e estimulam a angiogênese. Neste contexto, Cecilia e colaboradores (2020) observaram a expressão de mRNA e de proteína de CYP mono-oxigenases, que metaboliza o AA, em amostras de feocromocitoma humano. Estudos de Lin e colaboradores (2019) mostraram um novo mecanismo molecular sobre a participação da COX-2 (*Ptgs2*) na resistência induzida pela cisplatina em células de câncer gástrico (CG). Eles demonstraram que a cisplatina induz a *Ptgs2*, via ROS/NF- κ B, a qual induz a expressão de BCL2 e, consequentemente, a resistência à apoptose, por mecanismo dependente da via PGE₂/EP₄/MAPKs (ERK1/2, p38). Esses resultados sugerem que a *Ptgs2* pode ser um alvo molecular importante na terapia adjuvante do CG resistente à cisplatina, e que sua inibição pode auxiliar a resposta aos agentes terapêuticos clássicos. Em relação ao melanoma, vários artigos da literatura descrevem que existe uma relação entre enzimas e receptores relacionados ao metabolismo e metabólitos do AA, com a progressão tumoral. Por exemplo, sabe-se que no melanoma a 12-LOX induz sinais de sobrevivência e que esta enzima pode estar envolvida no controle do fenótipo metastático (RASÓ et al., 2004). Também, o aumento da expressão de COX-2, de PGE₂ e seus receptores (EP₂ e EP₄) promoveram a migração de células de melanoma B16-F10 e metástase em camundongos (KIM et al., 2016). Denkert e colaboradores (2001) avaliaram a expressão de COX-2 por imunohistoquímica em 32 mostras de câncer de pele, e observaram que 93 % dos melanomas expressaram COX-2, enquanto o *nevus* benigno e epitélio normal foram negativos. Os mesmos autores também demonstraram que as linhagens de melanoma A375, MeWo, SK-Mel-13, SK-Mel-28 e IGR-37 expressaram constitutivamente COX-2 (mRNA e proteína) e que, quando em cultura e na presença de AA, liberaram PGE₂. Ainda, o uso de um inibidor de COX-2, NS-398, inibiu a produção de PGE₂ e que, embora sem efeito sobre a proliferação das células de melanoma, o composto reduziu a capacidade invasiva das células tumorais avaliada pelo ensaio em mistura proteica gelatinosa (Matrigel®).

Nossos resultados mostraram que as células de melanoma em estudo apresentaram expressão constitutiva de diferentes enzimas do metabolismo do AA, e de seus receptores. Não havia na literatura a comparação da expressão desses componentes entre as linhagens parental e resistente estudadas neste trabalho. Observamos diferenças significativas quanto a expressão do RNAm de alguns intermediários do AA, quando comparamos a célula parental com sua correspondente resistente, principalmente na A375. A célula A375R apresentou maior expressão de *ALOX5AP*, *LTB4R₁* e *PPAR α* , enquanto a expressão de *Ptgs1* e *Ptgs2* estava diminuída. Ainda, nossos resultados demonstraram que a linhagem SK-MEL-29R expressaram mais EP₃ quando comparada à parental correspondente. Artigos da literatura, também relatam diferenças na expressão dessas enzimas e de receptores quando compararam amostras de tumores com tecidos normais. Luo et al. (2020) já indicaram que os receptores ativados por proliferador de peroxissoma α (PPAR- α) apresentam papel importante na regulação da autofagia, na homeostase e na tumorigênese. Empregando ferramentas de bioinformática, identificaram a proteína ALOX5AP como marcador no prognóstico de metástase no osteosarcoma (GUAN & GUAN & SONG, 2020). Ainda sobre esta proteína, Shi e colaboradores (2019), utilizando informações disponíveis em banco de dados, concluíram que a ALOX5AP está mais expressa em câncer de cólon retal em comparação com cólons normais, e que a mesma está envolvida na tumorigênese, e pode contribuir para a infiltração de neutrófilos e células dendríticas no microambiente tumoral. O papel da PGE₂ no câncer é extensamente discutido na literatura. Estudos *in vitro* mostraram que o tratamento de células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C-33^a) com sulpostrone, um agonista de EP₃, aumentou a migração e proliferação celular, enquanto o silenciamento desse receptor inibiu esses processos, através de mecanismos envolvendo a fosforilação de ERK1/2 (YE et al., 2020). Por outro lado, Kashiwagi e colaboradores (2013) encontraram baixa expressão de PTGRE₃ (EP₃) em câncer de próstata humano quando comparado com próstatas normais, mostraram que a baixa expressão desse receptor contribui para a carcinogênese e progressão desse tipo de câncer, de modo dependente de andrógenos.

Considerando nossos resultados mostrando a diferença na produção de EICs e na expressão de componentes da via do AA entre as linhagens de melanoma humano A375P e R, SK-MEL-29P e R, WM35 e WM278, realizamos um *screening* com diferentes tratamentos utilizando as células A375P. De acordo com os

resultados obtidos e, considerando que na literatura não há trabalhos avaliando o efeito do tratamento com a PGD₂ em células de linhagem de melanoma humano, bem como diferenças na resposta entre a célula parental e sua correspondente resistente, decidimos explorar o potencial da PGD₂ em inibir a proliferação de células de melanoma em diferentes tempos, focando nas metastáticas (A375 e SK-MEL-29). Também estudamos o possível mecanismo de ação da PGD₂, e avaliamos se esta molécula estaria envolvida na resistência ao tratamento com o inibidor de BRAF, o Vemurafenibe. Nossos resultados demonstraram que após 24 h de tratamento com PGD₂, as linhagens metastáticas A375 e SK-MEL-29, tanto parentais quanto resistentes, apresentaram redução na proliferação celular, quando avaliados por ensaio de Azul de tripan e menor viabilidade celular em modelo de esferoides. Esses dados estão de acordo com trabalhos da literatura que demonstram a capacidade da PGD₂ em inibir a progressão tumoral. Elhassanny e colaboradores (2019), utilizando células de linhagem murinas de carcinoma escamoso (JWF2), mostraram que a PGD₂-etanolamida, produto da metabolização do araquidonoil-etanolamida pela COX-2, inibe a apoptose de células do referido câncer de pele. Também, Zhang e colaboradores (2018) mostraram que a sinalização induzida pelo PTGDR₂ após ligação de PGD₂, restringe a auto renovação de células de câncer gástrico (CG) *in vitro*, e suprime o crescimento tumoral e metástase *in vivo*.

Com relação aos ensaios de viabilidade celular em modelo 3D, era esperado que fossem necessárias concentrações superiores às utilizadas em modelo de citotoxicidade em monocamada. Isso ocorreu pois muitas evidências têm mostrado que células organizadas em esferoides, principalmente as dispostas no interior desses agregados, apresentam maior resistência à agentes citotóxicos quando comparadas com células em monocamada. Essa diferença não está relacionada apenas com a difusão de drogas no interior do esferoide, mas também a alterações de pH, hipóxia e diferentes taxas de proliferação celular (JAASKELAINEN et al., 1989). Além disso, a cultura 3D se destaca por restabelecer características morfológicas e funcionais de seu equivalente tecido *in vivo*. Um dos fatores responsáveis por isto é a produção de componentes de matriz extracelular que permite a formação de uma rede tridimensional complexa que protagoniza inúmeras interações célula-célula e célula-matriz. Desta forma, os ensaios com esferoides *in vitro* puderam mimetizar de alguma forma a complexidade tumoral (LIN et al., 2008).

Considerando que a PGE_2 é bastante descrita na literatura como indutora da proliferação celular, tratamos as células de melanoma com esse composto a fim de avaliar paralelamente o comportamento das mesmas. Entretanto, ao contrário do esperado, em modelo de monocamada, enquanto as linhagens A375P e R e a SK-MEL-29P não apresentaram diferença significativa no número de células, a linhagem SK-MEL-29R teve redução na proliferação celular. Ainda, quando o tratamento foi feito em esferoides, todas as linhagens apresentaram sensibilidade à PGE_2 na maior concentração. Apesar deste resultado, fizemos a dosagem de algumas citocinas no sobrenadante dessas células e dados interessantes foram obtidos, conforme discutido a seguir.

O microambiente tumoral (MAT) pode ser definido como um tecido biologicamente complexo que apresenta distorções importantes da homeostase do tecido original, no qual células não neoplásicas, que frequentemente não apresentam taxas de proliferação desreguladas ou instabilidade genética aumentada, são reprogramadas para agir de acordo com essa nova dinâmica tecidual, ditada principalmente pelas células neoplásicas. O MAT é constituído pelas células neoplásicas e pelos elementos não neoplásicos do tumor que interagem de forma autócrina e parácrina para controlar, delinear e remodelar o crescimento. Este é impulsionado por um mecanismo dinâmico de produção de citocinas, fatores de crescimento e enzimas remodeladoras da matriz extracelular (FIGUEIREDO, 2019). O perfil de expressão de citocinas e quimiocinas do MAT pode ser mais relevante do que seu as células imunológicas nele presentes. Diferentes citocinas podem promover ou inibir o desenvolvimento e progressão do tumor, independentemente de sua origem (LIN & KARIN, 2017). Inada e colaboradores (2015) mostraram que células de melanoma B16 influenciaram diretamente células estromais do hospedeiro a produzir PGE_2 e assim sinalizar para proliferação tumoral.

A migração de clones de células neoplásicas até o interior dos vasos requer proteólise extensa da matriz extracelular. Nesse sentido, as enzimas que degradam a matriz extracelular (metaloproteinases- MMP) tornando-a mais frouxa são fundamentais para facilitar a migração das células tumorais até os capilares (GRIVENNIKOV et al., 2010). Uma vez que a IL-6 promove a expressão de MMPs, avaliamos a produção dessa citocina no sobrenadante das células de melanoma após tratamento com PGD_2 ou PGE_2 . Observamos que a célula A375P apresentou

redução da produção de IL-6 após tratamento com PGD₂ na menor concentração tratada. Provavelmente as concentrações de tratamento mais altas não apresentaram o mesmo efeito devido à redução do número de células. Interessantemente, embora o tratamento com PGE₂ não interferiu na proliferação das células A375P e A375R, houve um aumento da concentração de IL-6 no sobrenadante após o tratamento, o que é compatível com os dados da literatura que relacionam a PGE₂ com a progressão tumoral (INADA et al., 2015; LI et al., 2012).

Um dos processos que facilita a metástase e a progressão tumoral é a angiogênese, a qual é estimulada por diversos fatores, entre eles a IL-8. Estudos *in vitro* já demonstraram que esta citocina foi produzida por células de humano SK-MEL-13 e SK-MEL-23 (SCHADENDORF et al., 1993). Elevadas concentrações de IL-8 foram observadas em amostras de soro de pacientes com melanoma metastático (SCHEIBENBOGEN et al., 1995). Nossos dados mostraram que embora o tratamento com PGD₂ reduziu a proliferação celular, houve aumento da produção da citocina IL-8 no sobrenadante das células, tanto parental quanto resistente. Esse aumento pode estar relacionado ao estresse celular desencadeado pelo tratamento, uma vez que a expressão de IL-8 é influenciada por diversos estímulos, como por exemplo, produção de espécies reativas de oxigênio, depleção de nutrientes, hipóxia e secreção de fatores próinflamatórios.

Com relação à citocina IL-10, observamos uma redução da concentração no sobrenadante da linhagem SK-MEL-29R após o tratamento com PGD₂. Esse resultado também foi bastante satisfatório uma vez que a IL-10 inibe a produção de IFN- γ , uma citocina antitumoral (ITO et al., 1999). Além disso, a elevada produção de IL-10 está associada ao perfil de macrófagos M2, adaptados a suprimir a resposta imune contra o tumor (MANTOVANI et al., 2004).

Considerando os nossos resultados com relação aos efeitos do tratamento da PGD₂ na proliferação celular e na produção de citocinas pelas linhagens de melanoma, fomos investigar qual o mecanismo de ação envolvido. Existem duas enzimas responsáveis pela produção de PGD₂ a partir da PGH₂: A PGD sintase-tipo lipocaina (L-PGDS), expressa principalmente no sistema nervoso central, e a PGD sintase hematopoiética (H-PGD), expressa nos leucócitos. No nosso trabalho, utilizamos o inibidor da H-PGD para avaliar se havia produção de PGD₂ pela células de melanoma. Entretanto, nenhum efeito foi observado na proliferação celular.

A PGD_2 apresenta os receptores prostanoídeos D (DP) e o receptor quimioatraente homólogo à molécula expressa nas células Th2 (CRTH2). Enquanto os receptores DP são expressos nas células endoteliais, células epiteliais e células do sistema imunológico, os receptores CRTH2 são expressos em células T, em basófilos e em eosinófilos. O tratamento das células de melanoma com os antagonistas dos receptores DP_1 e DP_2 não reverteram o efeito de diminuição da proliferação celular promovido pelo tratamento com PGD_2 , mostrando que, neste caso, o mecanismo de ação independe da ativação desses receptores. Esse resultado vai ao encontro de outros trabalhos na literatura que mostraram que os receptores desse mediador podem não estar envolvidos na via de sinalização, de modo que o efeito na proliferação pode estar relacionado ao estresse oxidativo provocado pelo tratamento (LADIN et al., 2017; ELHASSANNY et al., 2019). O estresse oxidativo, definido como o excesso da concentração de EROs quando comparada à de antioxidantes, está associado a diversas patologias, entre elas o câncer (SIES, 2015). As células apresentam diferentes mecanismos bioquímicos e genéticos para manter o balanço entre esses componentes de modo que perturbações nessas vias podem levar a consequências patofisiológicas. As células cancerosas exibem aberrações na homeostase redox e as concentrações de EROs influenciam a evolução do câncer de forma aparentemente controversa podendo ser pró-tumorigênicos, apoiando a proliferação e a transformação celular, ou citotóxicos, causando a morte celular (RECZEK et al., 2017). Interessantemente, foi demonstrado que o vemurafenibe pode induzir a produção de EROs e assim desencadear a apoptose e inibir o crescimento das células de melanoma B-RAF^{600E} (YU et al., 2014).

A PGD_2 produzida *in vivo* é rapidamente metabolizada à PGJ_2 e à 15-deoxi-12,14- PGJ_2 (15d- PGJ_2) por desidratação não enzimática (SCHER & PILLINGER, 2005). Diversos trabalhos na literatura demonstraram o papel dos metabólitos da PGD_2 em inibir da progressão tumoral (YAMAMOTO et al., 2011; KIM et al., 2015; LADIN et al., 2017). Por isso, avaliamos o efeito do tratamento das linhagens de melanoma A375P, SK-MEL29P e SK-MEL29R com PGJ_2 . Os resultados demonstraram que este composto foi capaz de reduzir a proliferação das células. Para a linhagem SK-MEL-29P foi observada maior citotoxicidade do tratamento com PGJ_2 na maior concentração utilizada (20 μM), uma vez que foi contabilizado um número significativo de células mortas quando feita a contagem com Azul de tripan.

Os metabólitos da PGD₂ não tem alta afinidade pelos receptores DP e CRTH2, mas ativam diretamente PPAR γ . A sinalização mediada pela ativação desse receptor é bem conhecida por estimular a diferenciação de adipócitos e o metabolismo de glicose, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Embora a maioria dos estudos iniciais envolvendo PPAR γ focaram nesses papéis metabólicos, várias evidências o associaram aos mecanismos de carcinogênese. Entretanto, a relação entre PPAR γ e o tumor é controversa (PAULITSCHKE et al., 2011; PICH et al., 2018). Para avaliar se o receptor PPAR γ estava envolvido na proliferação das células de melanoma, utilizamos um antagonista irreversível (GW) previamente ao tratamento com PGD₂. Porém, não foi observada reversão do efeito na proliferação celular. Existem trabalhos na literatura demonstrando que agonistas de PPAR γ inibem a proliferação celular de células tumorais (WU et al., 2016; GOU et al., 2017). Por isso, utilizamos um agonista desse receptor (ROS) a fim de avaliar se sua ativação poderia promover a diminuição do número de células *in vitro*, mas não houve alteração neste parâmetro avaliado.

Por fim, dados do nosso laboratório (ainda não publicados) demonstraram que a PGD₂ pode atuar via receptor de LTB₄. Assim, utilizamos um antagonista desse receptor (U75302) e, em seguida, tratamos as células de melanoma com PGD₂. Após a contagem do número de células, não foram observadas diferenças em relação ao controle, evidenciando que o referido receptor também não estava envolvido no mecanismo de ação.

Nossos resultados demonstraram que a PGD₂ e/ou seus metabólitos apresentam a habilidade de inibir o crescimento celular sendo importantes alvos no tratamento antitumoral, mas ainda ficaram lacunas à respeito do mecanismo de ação envolvido. Considerando que nossos dados não demonstraram ativação dos receptores avaliados, fomos investigar possíveis alterações nas vias metabólicas, e para isso utilizamos a linhagem A735.

Desde o trabalho de Warburg em meados de 1920, é conhecido que mudanças nos processos metabólicos nas células, que inclui a metabolização da glicólise e da respiração aeróbica, são marcadores da transformação maligna. Entretanto, outros processos metabólicos também são perturbados na tumorigênese.

A metabolômica é uma abordagem promissora que permite explorar o fenótipo celular a partir da caracterização de pequenas moléculas endógenas,

referidas como metabólitos, que são produtos das reações bioquímicas, revelando conexões entre diferentes vias que operam dentro de uma célula viva (WANG et al., 2011). Mais especificamente, a capacidade de descobrir e avaliar diferenças bioquímicas entre condições saudáveis e doentes que possam ser alvos para intervenções terapêuticas (WANG et al., 2012^a).

O metaboloma celular consiste no conjunto de todos os metabólitos presentes nas células e tem sido amplamente utilizado na pesquisa de doenças para a compreensão do mecanismo molecular de progressão da doença, resposta e resistência à terapêutica. As aplicações em modelos celulares são mais simples de controlar, menos caras e mais fáceis de interpretar do que a análise de modelos animais e voluntários humanos. Como tal, representa um recurso para identificação de biomarcadores metabólicos específicos que ajudam a distinguir os estados normais e anormais, bem como resposta a drogas ou agentes de estresse. Estudos metabolômicos têm mostrado que as redes metabólicas celulares são robustas e que o comportamento dinâmico das vias bioquímicas é governado por um sistema regulatório altamente interconectado (CHEN et al., 2012; FINLEY et al., 2012; ZHANG et al., 2011)

O metabolismo de lipídeos (anabolismo e catabolismo) gera uma variedade de intermediários biológicos, sendo muitos deles moléculas biologicamente ativas, dentre elas os EICs, que podem regular diferentes vias de sinalização. Ele se conecta com outras vias de sinalização através da regulação do crescimento, proliferação, diferenciação, motilidade e homeostase das membranas.

Em nosso trabalho, as análises metabolômicas indicaram que as células A375P e R apresentam um perfil metabólico distinto e que o tratamento com PGD₂ ampliou ainda mais essas diferenças. Outros trabalhos demonstraram através de ferramentas de metaboloma divergências entre células de melanoma com diferentes potencial metastático (KIM et al., 2017), mas nenhum estudo comparou o metabolismo entre a célula parental e sua correspondente resistente, bem como as alterações decorrentes do tratamento com PGD₂.

Nossos dados também sugeriram que a PGD₂ induz uma reprogramação metabólica que difere significativamente entre as células parentais e resistentes. Para entender o significado biológico destas alterações, a análise de predição da atividade de vias metabólicas indicou que o tratamento de células parentais com PGD₂, quando comparado ao estado basal, induziu perturbação significativa de vias

como metabolismo de vitamina E, formação de PG, metabolismo de LT, metabolismo de histidina, e metabolismo de arginina e prolina. Os melanomas não são capazes de sintetizar arginina devido à falta de expressão da enzima arginina sintase, dependendo de fontes externas de arginina oriundas do microambiente tumoral. O fornecimento limitado de arginina impacta diretamente a síntese de prolina em células de melanoma, pois torna as células amplamente dependentes da glutamina para a síntese daquele aminoácido. As células de melanoma sintetizam prolina em uma extensão significativamente maior que os melanócitos, mantendo os níveis de NAD⁺ necessários para glicólise e preservando NADPH para o balanço das reações metabólicas e do estresse oxidativo (FISHER et al., 2017).

Ainda comparado ao estado basal, o tratamento de células resistentes com PGD₂ afetou vias comuns a células parentais, como metabolismo de LT e de histidina, mas também perturbou o metabolismo de ácido siálico, biossíntese de N-glicana e metabolismo de glicoesfingolípido. Nossas análises ainda sugeriram que diversas vias metabólicas possuem atividade diferente entre células parentais e resistentes em estado basal, incluindo metabolismo de vitamina E, metabolismo de triptofano, metabolismo de leucotrieno, visto que as mais significativas foram a biossíntese de N-glicana. Entre as alterações comumente associadas ao câncer está o aumento da ramificação de N-glicanas. As glicanas das superfícies das células tumorais são conhecidas por promover a progressão tumoral ao interferir no crescimento e na capacidade de invasão do tumor, bem como por regular negativamente a resposta imune (HAUSELMAN & BORSIG, 2014; VASCONCELOS et al., 2015)

Ademais, quando comparamos as células parentais e resistentes tratadas com PGD₂ foi observada perturbação de vias como metabolismo de vitamina E e metabolismo de triptofano que já estavam afetadas no estado basal. Especificamente, a hiperproliferação de células tumorais é acompanhada de alta produção de EROs, uma vez que as células são adaptadas para aumentar a carga de antioxidantes. As células apresentam metabólitos antioxidantes, como a vitamina E, e enzimas que atuam na prevenção do dano oxidativo e na morte celular (HEGEDUS et al., 2018). Já o metabolismo do triptofano tem sido relacionado com a função imunológica: os linfócitos T são sensíveis à concentração de triptofano de modo que a deficiência compromete suas função e proliferação podendo oferecer vantagens para progressão tumoral (MELLOR & MUNN, 1999).

Nossos dados mostraram que vias como metabolismo de xenobióticos, metabolismo de cisteína e metionina e a transferência via carnitina foram especificamente perturbadas nesta comparação e, portanto, sugerem que as diferenças fenotípicas após tratamento com PGD₂ sejam resultado de alterações nestas vias metabólicas. O metabolismo de xenobióticos é essencial para conferir resistência a drogas por metabolizá-las, tornando-as inativas (KAUR et al., 2020) e é possível que PGD₂ suprima atividade dessa via e deixe as células parentais mais suscetíveis ao próprio vemurafenibe. Outra hipótese é de que PGD₂ diminua atividade de vias relacionadas a mecanismos antioxidantes como metionina e cisteína. Em curto prazo, as células se adaptam ao estresse oxidativo se reprogramando metabolicamente. A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidantes. Diversas células tumorais são dependentes da cisteína devido à sua propriedade antioxidante, tornando este aminoácido extremamente importante na regulação da homeostase redox das células cancerosas. Além disso, a glutathione, molécula com maior potencial antioxidante nas células tumorais, é biossintetizada pela via de transulfuração, a qual está conectada ao metabolismo da metionina, indicando a importância deste aminoácido nos mecanismos de desintoxicação de EROs celulares (JAUNE-PONS & VASSEUR, 2020).

Portanto, as alterações encontradas nas vias metabólicas entre as células A375P e R podem estar relacionadas às diferenças entre seus potenciais metastáticos. Além disso, as alterações observadas após o tratamento podem auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na redução da proliferação celular após tratamento com PGD₂ bem como na maior sensibilidade da célula resistente a este lipídeo.

*“Tudo o que é seu encontrará uma
maneira de chegar até você”*

Chico Xavier

6. CONCLUSÕES

Neste estudo demonstramos que os melanócitos e as linhagens de melanoma humano A375, SK-MEL-29, WM35 e WM278, podem produzir diferentes mediadores lipídicos, uma vez que, quando estimulados *in vitro* com AA e ionóforo de cálcio, apresentaram perfis diferentes de produção de EICs, sendo que as linhagens metastáticas (A375 e SK-MEL-29) liberaram concentrações maiores dos compostos avaliados. Além disso, as células de melanoma tiveram um perfil de produção de EICs diferente dos melanócitos.

Com relação à expressão de RNAm de enzimas e receptores envolvidos na cascata do AA, também foram notadas diferenças estatisticamente significativas entre as células avaliadas, inclusive entre as células parentais e as resistentes correspondentes das linhagens metastáticas, mostrando que a progressão do melanoma, bem como a resistência à quimioterapia, podem estar relacionadas com a diferença da expressão desses componentes.

Após o tratamento das linhagens A375 e SK-MEL-29, parentais e resistentes, com PGD₂, mostramos que a diminuição da proliferação celular foi independente da ativação de receptores DP1 e DP2, e que houve mudanças na produção de citocinas (IL-6, IL-8 e IL-10), revelando que o tratamento com PGD₂ pode alterar o microambiente tumoral e, assim, interferir nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e resistência das células de melanoma.

Ainda, mostramos que a PGJ₂, metabólito da PGD₂, também reduziu *in vitro* a proliferação das células de melanoma A375P e SK-MEL-29P e R, por uma via independente do receptor PPAR.

Além disso, com a finalidade de entender o mecanismo envolvido na diminuição da proliferação celular e alteração na produção de citocinas provocadas pelo tratamento com PGD₂, através de ferramentas de bioinformática, revelamos que há diferenças significativas no metabolôma funcional entre as células A375P e A375R e que, após o tratamento com PGD₂, vias como metabolismo de xenobióticos, metabolismo de cisteína e metionina e a transferência via carnitina foram especificamente perturbadas nesta comparação. Esses dados, em conjunto, proveem grande potencial para a caracterização de compostos biomarcadores e alvos terapêuticos, e auxilia na compreensão da diferença na sensibilidade das células aos diferentes tratamentos.

Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.”

Steve Jobs

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-FILHO, P.G.; TARRAGÔ, A.M.; COSTA, A.G.; MONTEIRO, W. M.; MEIRELLES, A.F.G.; COSTA, T.C.C.; SILVA, J.S.; FACCIOLI, L.H.; MALHEIRO, A. Plasma eicosanoid profile in *Plasmodium vivax* Malaria: clinical analysis and impacts of self medication, **Frontiers Immunology**, 10:2141, 2019.

AMARAL, R.L.F.; MIRANDA, M.; MARCATO, P.D.; et al. Comparative analysis of 3D bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. **Frontiers in Physiology**, 8:605, 2017.

APLIN, A.E.; KAPLAN, F.M.; SHAO, Y. Mechanisms of resistance of RAF inhibitor in melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, 131(9):1817-20, 2011.

BAYCI, A.W.L.; BAKER, D.A.; SOMERSET, A.E. et al. Metabolomic identification of diagnostic serum-based biomarkers for advanced stage melanoma. **Metabolomics**, 14(8):105, 2018.

BEGER, R.D. A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. **Metabolites**, 3: 552–74, 2013.

BELLAMKONDA, K.; CHANDRASHEKAR, N.K.; OSMAN, J; SELVANESAN, B.C.; SAVARI, S.; SJOLANDER, A. The eicosanoids leukotriene D₄ and prostaglandin E₂ promote the tumorigenicity of colon cancer-initiating cells in a xenograft mouse model. **BMC Cancer**, 16:425, 2016.

CARPAGNANO, G.E.; PALLADINO, G.P.; LACEDONIA, D. Neutrophilic airways inflammation in lung cancer: the role of exhaled LTB₄ and IL-8. **BMC Cancer**, 11:226, 2011.

CARTER, B.Z.; MAK, P.Y.; WANG, X.; et al. An ARC-regulated IL1b/COX-2/b-catenin/ARC circuit controls leukemia-microenvironment interactions and confers drug resistance in AML. **Cancer research**, 79(6):1165-77, 2019.

CECILIA, C.; SOFIA, C.; MARCELA, V.; AYELEN, M.; PATRICIA, P.; MARTA, B. SUSANA, N. Cytochrome 450 metabolites of arachidonic acid (20-HETE, 11,12-EET and 14,15-EET) promote pheochromocytoma cell growth and tumor associated angiogenesis. **Biochimie**, 171:147-57, 2020.

CHAPMAN, P.B.; HAUSCHILD, A.; ROBERT, C.; et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **The New England Journal of Medicine**, 364(26):2507-16, 2011.

CHATTERJEE, A.; DEBARSHI, R.; GUEVARA, P.; PAL, R.; MAHESH, N.; ROYCHOWDHURY, S.; DAS, S. Arachidonic acid induces the migration of MDA-MB-231 cells by activating raft-associated leukotriene B4 receptors. **Clinical Cancer Drugs**, 5(1):28-41, 2018.

CHEN, R.; MIAS, G.I.; LI-POOK-THAN, J.; et al. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. **Cell**, 148:1293-1307, 2012.

CHIURCHIO, V.; LEUTI, A.; MACCARRONE, M. Bioactive lipids and chronic inflammation: managing the fire within. **Frontiers in Immunology**, 9:38-49, 2018.

CROMWELL, K.D.; ROSS, M.I.; XING, Y.; et al. Variability in melanoma post-treatment surveillance practices by country and physician specialty: a systematic review. **Melanoma Research**, 22:376-85, 2012.

CUMMINGS, M.; MASSEY, K.A.; MAPPA, G.; et al. Integrated eicosanoid lipidomics and gene expression reveal decreased prostaglandin catabolism and increased 5-lipoxygenase expression in aggressive subtypes of endometrial cancer. **The Journal of Pathology**, 247(1):21-34, 2019.

DAS, U.N. Can bioactive lipid(s) augment anti-cancer action of immunotherapy and prevent cytokine storm? **Archives of Medical Research**, 50: 342-49, 2019.

DAVIES, H. et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, 417(6892):949-54, 2002.

DENNIS, E.A.; NORRIS, P.C. Eicosanoid storm and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, 15(8):511-23, 2015.

DENKERT, C.; KOBEL, M.; BERGER, S.; et al. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. **Cancer research**, 61:303-8, 2001.

DHALL, S.; WIJESINGHE, D.S.; KARIN, Z.A.; et al. Arachidonic acid-derived signaling lipids and functions in impaired healing. **Wound Repair and Regeneration**, 23(5):644-56, 2015.

ELHASSANNY, A.E.M.; LADIN, D.A.; SOLIMAN, E.; et al. Prostaglandin D2-ethanolamide induces skin cancer apoptosis by suppressing the activity of cellular antioxidants. **Prostaglandins and other lipid mediators**, 142:9-23, 2019.

FIGUEIREDO, C.R.L.V. O intrigante paradox da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 55(3):321-32, 2019.

FINLEY, L.W.; LEE, J.; SOUZA, A.; et al. Skeletal muscle transcriptional coactivator PGC-1 α mediates mitochondrial, but not metabolic, changes during calorie restriction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 10:2931-36, 2012.

FISHER, G.M.; VASHISHT, Y.N.G.; McQUADE, J.L.; et al. Metabolic strategies of melanoma cells: mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. **Pigment Cell Melanoma Research**, 31(1):11-30, 2017.

FLAHERTY, K.T.; PUZZANOV, I.; KEVIN, B.K.; et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, 363:809-19, 2010.

FLAHERTY, K.T.; INFANTE, J.R.; DAUD, A.; et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAFV600 mutations. **The New England Journal of Medicine**, 367:1694-1703, 2012.

FLAHERTY, K.T.; HODI, F.S.; FISHER, D.E. From genes to drugs: target strategies for melanoma. **Nature Reviews Cancer**, 12:349-361, 2012.

FRANKEL, A.E.; COUGHLIN, L.A.; KIM, J.K.; et al. Metagenomic shotgun sequencing and unbiased metabolomic profiling identify specific human gut microbiota and metabolites associated with immune checkpoint therapy efficacy in melanoma patients. **Neoplasia**, 19:848-55, 2017.

GALVÃO, A.F.; PETTA, T.; FLAMAND, N.; et al. Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 408(13):3613-23, 2016.

GIBNEY, G.T.; MESSINA, J.L.; FEDORENKO, I.V.; et al. Paradoxical oncogenesis-the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 10:390-99, 2013.

GODSON, C. Balancing the effect of leukotrienes in asthma. **The New England Journal of Medicine**, 382(15):1472-1475, 2020.

GOMES, R.N.; SOUZA, F.C.; COLQUHOUN, A. Eicosanoids and cancer. **Clinics (São Paulo)**, 73(supl 1):e530s, 2018.

GOU, Q.; GONG, X.; JIN, J.H.; SHI, J.J.; HOU, Y.Z. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are potential drug targets for cancer therapy. **Oncotarget**, 8(36): 60704–709, 2017.

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

GUAN, X.; GUAN, Z.; SONG, C. Expression profile analysis identifies key genes as prognostic markers for metastasis of osteosarcoma. **Cancer Cell International**, 20:104, 2020.

HAASS, N.K.; SMALLEY, K.S.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **Journal of Molecular Histology**, 35(3):309-18, 2004.

HAASS, N.K.; SMALLEY, K.S.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**, 18(3), 309-18, 2005.

HAFNER, J.; SCHMID, M.H.; KEMPF, W.; BURG, G.; KUNZI, W.; MEULI-SIMMEN, C.; NEFF, P.; MEYER, V.; MIHIC, D.; GARZOLI, E.; JUNGIUS, K.P., SEIFERT, B.;

DUMMER, R.; STEINERT, H. Baseline staging in cutaneous malignant melanoma. **Brazilian Journal of Dermatology**, 150:677-86, 2004.

HAUSELMANN, I.; BORSIG, L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. **Frontiers in Oncology**, 4:28, 2014.

HEGEDUS, C.; KÓVACS, K.; POLGAS, Z.; et al. Redox control of cancer cell destruction. **Redox Biology**, 16:59-74, 2018.

HODI, F.S.; O'DAY, S.J.; MCDERMOTT, D.F.; et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, 363(8):711-23, 2010.

HU, F.; LIU, X.X.; WANG, X. Lipoxin A₄ inhibits proliferation and inflammatory cytokine/chemokine production of human epidermal keratinocytes associated with ERK 1/2 and NF-κB pathways. **Journal of Dermatological Sciences**, 78:181-88, 2015.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, 16:924-49, 2015.

IBRAHIM, N.; HALUSKA, F.G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Annual Review Pathologic Mechanism Disease**, 4:551-79, 2009.

INADA, M.; TAKITA, M.; YOKOYAMA, S.; et al. Direct melanoma cell contact induces stromal cell autocrine prostaglandin EP2-EP4 receptor signaling that drives tumor growth, angiogenesis and metastasis. **The Journal of Biological Chemistry**, 290(29):781-29, 2015.

INCA (Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva). **Tipos de câncer. Pele Melanoma**. Disponível em www.inca.gov.br. Acesso em: 08.05.2020.

ITO, S.; ANSARI, P.; SAKATSUME, M.; et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha-and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. **Blood**, 93(5):1456-63, 1999.

JAASKELAINEN, J.; KALLIOMAKI, P.; PAETAU, A.; TIMONEN, T. Effect of LAK cells against three-dimensional tumor tissue. In vitro study using multi-cellular human glioma spheroids as targets. **The Journal of Immunology**, 142 (3): 1036-45, 1989.

JAUNE-POS, E.; VASSEUR, S. Role of amino acids in regulation of ROS balance in cancer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 689:108438, 2020.

JIANG, J. G., CHEN, C. L., CARD, J. W., et al. Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. **Cancer Research**, 65:4707–15, 2005.

JIANG, J.; PAN, W.; YAZHANG, X.; et al. Tumor-infiltrating immune cell-based subtyping and signature gene analysis in breast cancer based gene expression profiles. **Journal of cancer**, 11(6):1568-83, 2020.

KAKADIA, S.; YARLAGADDA, N.; AWAD, R.; KUNDRANDA, M.; NIU, J.; NARAEV, B.; MINA, L.; DRAGOVICH, T.; GIMBEL, M.; MAHMOUD, F. Mechanisms of resistance of BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. **Onco Targets Therapy**, 11:7095-7107, 2018.

KASHIWAGI, E.; SHIOTA, M.; YOKOMIZO, A.; et al. Prostaglandin receptor EP3 mediates growth inhibitory effect of aspirin through androgen receptor and contributes to castration resistance in prostate cancer cells. **Endocrine related Cancer**, 20(3):431-41, 2013.

KAUR, G.; GUPTA, S.K.; SINGH, P.; et al. Drug-metabolizing enzymes: role in drug resistance in cancer. **Clinical and Translational Oncology**, 22(10):1667-80, 2020.

KENDALL, A.C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in lipid research**, 52(1):141-64, 2013.

KENDALL, A.C.; PILKINGTON, S.M.; MASSEY, K.A. Distribution of bioactive lipid mediators in human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, 135:1510-20, 2015.

KIM, K.R.; KIM, H.J.; LEE, S.K.; MA, G.T.; PARK, K.K.; CHUNG, W.Y. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 inhibits osteolytic breast cancer bone metastasis and estrogen deficiency-induced bone loss. **Plos One**, 1-18, 2015.

KIM, K.M.; IM, A.R.; KIM, S.H.; et al. Timosaponin AIII inhibits melanoma cell migration by suppressing COX-2 and in vivo tumor metastasis. **Cancer Science**, 107(2):181-8, 2016.

KIM, H.Y.; LEE, H.; KIM, S.H.; et al. Discovery of potential biomarkers in human melanoma cells with different metastatic potential by metabolic and lipidomic profiling. **Scientific Reports**, 7: 8864, 2017.

KORBECKI, J.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; et al. Cyclooxygenase pathways. **Acta Biochimica Polonica**, 61(4):639-49, 2014.

KUDCHADKAR, R.R.; PARAISO, K.H.T.; SMALLEY, K.S.M. Targeting mutant BRAF in melanoma: current status and future development of combination therapy strategies. **Cancer Journal**, 18:124-31, 2012.

KUDCHADKAR, R.R.; SMALLEY, K.S.M.; GLASS, L.F.; et al. Target therapy in melanoma. **Clinics in Dermatology**, 31:200-8, 2013.

LADIN, D.A.; SOLIMAN, E.; ESCOBEDO, R.; FITZGERALD, T.L.; YANG, L.V.; BURNS, C.; DROSS, R.V. Synthesis and evaluation of the novel prostamide, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostamide J_2 , as a selective antitumor therapeutic. **Molecular Cancer Therapeutics**, 16(5):838-849, 2017.

LEWIS, R.A.; AUSTEN, K.F. The Biologically Active Leukotrienes: Biosynthesis, Metabolism, Receptors, Functions, and Pharmacology. **Journal of Clinical Investigation**, 73(4):889-97, 1984.

LIN, W.W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, 117:1175–1183, 2007.

LIN, J.Y.; FISHER, D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, 445:843-850, 2007.

LIN, X.; SONG, L.; ZHOU, C.; et al. Cisplatin induces chemoresistance through the PTGS2-mediated anti-apoptosis in gastric cancer. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 116:105610, 2019.

LIN, R.Z.; CHANG, H.Y. Recent advances in the three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, v. 3 (9-10), p.1172-84, 2008.

LOCACHEVIC, G.A.; PRADO, M.K.B.; ZOCCAL, K.F.; PEREIR, P.A.T.; SORGI, C.A.; BORTLANZA, M.; PETI, A.P.F.; GUIMARAES, F.S.; DEL BEL, E.; FACCIOLI, L.H. Paradoxical effect of LTB4 on the regulation of stress-induced corticosterone production. **Frontiers in Behavioral Neurosciences**, v.13, 2019.

LUKE, J.J.; HODI, F.S. Ipilimumab, Vemurafenib, Dabrafenib, and Trametinib: synergistic competitors in the clinical management of BRAF mutant malignant melanoma. **The Oncologist**, 18:717-25, 2013.

LUO, X.; ZHONG, L.; YU, L. TRIB3 destabilizes tumor suppressor PPAR α expression through ubiquitin-mediated proteasome degradation in acute myeloid leukemia. **Life Sciences**, 257:118021, 2020.

MACHADO, E.R.; CARLOS, D.; SORGI, C.A.; RAMOS, S.G.; SOUZA, D.I.; SOARES, E.G.; COSTA-CRUZ, J.M.; UETA, M.T.; ARONOFF, D.M.; FACCIOLI, L.H. Dexamethasone effects in the *Strongyloides venezuelensis* infection in a murine model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 84(6):957-66, 2011.

MANTOVANI, A.; TAKITA, M.; YOKOYAMA, S.; et al. Direct melanoma cell contact induces stromal cell autocrine prostaglandin EP2-EP4 receptor signaling that drives tumor growth, angiogenesis and metastasis. **Trends Immunology**, 25(12):677-86, 2004.

MASSEY, A.K.; NICOLAOU, A. Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites. **Biochemical Society Transactions**, 39:1240-46, 2011.

MEDEIROS, A.I.; SÁ-NUNES, A.; SOARES, E.G.; PERES C.M.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infect Immun.** 72(3):1637-44, 2004.

MELLOR, A.L.; MUNN, D.H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunology Today**, 20:469–473, 1999.

MENZIES, A.M.; LONG, G.V. Recent advances in melanoma systemic therapy. BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond. **European Journal of Cancer**, 49(15):3229-4, 2013.

MERLINO, G.; HERLYN, M.; FISHER, D.E.; et al. The state of melanoma: challenges and opportunities. **Pigment Cell Melanoma Research**, 29(4):404-16, 2016.

PARK, J.; PARK, S.Y.; KIM, J.H. Leukotriene B4 receptor-2 contributes to chemoresistance of SK-OV-3 ovarian cancer cells through activation of signal transducer and activator of transcription-3-linked cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1863:236-43, 2016.

PILKINGTON, S.M.; THODES, L.E., AL-AASSWAD, N.M.I.; MASSEY, K.A. Impact of EPA ingestion on COX- and LOX- mediated eicosanoid synthesis in skin with and without a pro-inflammatory UVR challenge – Report of a randomized controlled study in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, 58:580-90, 2014.

REGAD, T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. **Cellular and Molecular Life Science**, 21:4055-65, 2013.

REIS, M.B.; PEREIRA, P.A.T.; CAETANO, G.F.; LEITE, M.N.; GALVÃO, A.F.; PAULA-SILVA, F.W.G.; FRADE, M.A.C.; FACCIOLI, L.H. Lipoxin A4 encapsulated in PLGA microparticles accelerates wound healing of skin ulcers. **Plos One**, 12(7):e0182381, 2017.

REIS, M.B.; RODRIGUES, F.L.; LAUTHERBACH, N.; KANASHIRO, A.; SORGI, C.A.; MEIRELLES, A.F.G.; SILVA, C.A.A.; ZOCCAL, K.F.; SOUZ, C.O.S.; RAMOS, S.G.; MATSUNO, A.K.; ROCHA, L.B.; SALGADO, H.C.; NAVEGANTES, L.C.C.; KETTELHUT, I.C.; CUPO, P.; GARDINASSI, L.G.; FACCIOLI, L.H. Interleukin-1 receptor-induced

PGE₂ production controls acetylcholine-mediated cardiac dysfunction and mortality during scorpion envenomation. **Nature Communications**, 11(1):5433, 2020a.

REIS, M.B.; ELIAS-OLIVEIRA, J.; RAMOS, S.G.; PASTORE, M.R.; GARDINASSI, L.G.; FACCIOLI, L.H. Interleukin-1 Receptor-Induced Nitric Oxide Production in the Pancreas Controls Hyperglycemia Caused by Scorpion Envenomation. **Toxins**, 5;12(3):163, 2020b.

ROBERT, C.; SCHACHTER, J.; LONG, G.V.; et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in advanced melanoma. **The New England Journal of Medicine**, 372:2521-2532, 2015.

ROBERTS, P.J.; DER, C.J. Targeting the RAF-MEK-ERK mitogen activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, 26:3291-3310, 2007.

RODRIGUEZ-CERDEIRA, C.; GREGORIO, C.M.; LÓPEZ-BARCENAS, A.; et al. Advances in immunotherapy for melanoma: a comprehensive review. **Mediators of inflammation**, 2017:3264217, 2017.

ROPKE, C.D.; DA SILVA, V.V.; KERA, C.Z. In vitro and in vivo inhibition of skin matrix metalloproteinases by photomorphe umbellata root extract. **Photochemistry and Photobiology**, 82(2):439-42, 2006.

SCHADENDORF, D.; MOLLER, A.; ALGERMISSEN, B.; WORM, M.; STICHERLING, M.; CZARNETZKI, B.M. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. **Journal of Immunology**, 151 (5): 2667-2675, 1993

SCHEIBENBOGEN, C.; MOHLER, T.; HAEFELE, J.; HUNSTEIN, W.; KEILHOLZ, U. Serum interleukin-8 (IL-8) is elevated in patients with metastatic melanoma and correlates with tumor load. **Melanoma Research**, 5(3):179-81, 1995.

SCHEIER, B.; AMARIA, R.; LEWIS, K.; GONZALE, R. Novel therapies in melanoma. **Immunotherapy**, 12:1461-9, 2011.

SCHER, J.U.; PILLINGER, M.H. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? **Clinical Immunology**, 114(2):100-9, 2005.

SHAIN, A.H.; BASTIAN, B.C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, 16:345-358, 2016.

SLIPICEVIC, A.; HERLYN, M. Narrowing the knowledge gaps for melanoma. **Upsala Journal of Medical Sciences**, 117(2):337-43, 2012.

SOLIT, D.B.; GARRAWAY, L.A.; PRATILA, C.A.; et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. **Nature**, 439:358-62, 2006.

SONNWEBER, T.; PIZZINI, A.; NAIRZ, M. et al. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 19(11):E3285, 2018.

SORGI, C.A.; PETI, A.P.F.; PETTA, T.; et al. Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays. **Scientific Data**, 5:180167, 2018.

SOSMAN, J.A. PUZANOV, I. Molecular targets in melanoma from angiogenesis to apoptosis. **Clinical Cancer Research**, 12:2376s–2383s, 2006.

SOUZA, C.O.S.; ESPINDOLA, M.S.; FONTANARI, C.; PRADO, M.BK.B.; FRANTZ, F.G.; RODRIGUES, V.; GARDINASSI, L.G.; FACCIOLI, L.H. CD18 regulates monocyte hematopoiesis and promotes resistance to experimental schistosomiasis. **Frontiers Immunology**, 9:1970, 2018.

TENNANT, D.A.; DURÁN, R.V.; GOTTLIEB, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. **Nature Reviews. Cancer**, 10(4):267-77, 2010.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Genomic classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, 161:1681-1696, 2015.

TRINDADE, B.C.; SORGI, C.A.; NICOLETE, L.D.; MALTA, T.M.; PINTO, M.T.; TAKAYANAGUI, O.M.; COVAS, D.T.; MARTINS FILHO, O.A.; KASHIMA, S.; FACCIOLI, L.H. **Plos One**, v. 7(12):e51873, 2012.

TROTTER, S.C.; SROA, N.; WINKELMANN, R.R.; et al. A global review of melanoma follow-up guidelines. **Journal of Clinical Aesthet Dermatology**, 6(9):18-26, 2013.

VASCONCELOS, A.S.; OLIVEIRA, I.A.; LUCENA, M.C.; et al. Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: promising targets for developing of drugs against cancer. **Frontiers in Oncology**; 5:138, 2015.

XIA, S.; LU, Y.; WANG, J.; HE, C.; HONG, S.; SERHAN, C.N.; KANG, J.X. Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **PNAS**, 103(33):12499-50, 2006.

XU, H.B.; SHEN, F.M.; LV, Q.Z. Celecoxib enhanced the cytotoxic effect of cisplatin in drug-resistant human gastric cancer cells by inhibition of cyclooxygenase-2. **European Journal of Pharmacology**, 769:1-7, 2015.

ZHANG, Y.; FILIOU, M.D.; RECKOW, S.; et al. Proteomic and metabolomic profiling of a trait anxiety mouse model implicate affected pathways. **Molecular & Cellular Proteomics**, 10 (12) M111.008110, 2011.

ZHANG, B.; BIE, Q.; WU, P.; ZHANG, J.; YOU, B.; SHI, H.; QIAN, H.; XU, W. PGD2/PTGDR2 signaling restricts the self-renewal and tumorigenesis of gastric cancer. **Stem Cells**, 36(7):990-1003, 2018.

ZHANG, A.; SUN, H.; XU, H.; et al. Cell metabolomics. **OMICS: a journal of integrative biology**, 17(10):495-501, 2013.

ZHANG, M.; MARTINO, J.S.; BOWMAN, R.L. et al. Adipocyte-derived lipids mediate melanoma progression via FATP proteins. **Cancer discovery**, 8(8):1006-1025, 2018.

ZHANG, Q.; YAN, G.; LEI, J.; et al. The SP1-12LOX axis promotes chemoresistance and metastasis of ovarian cancer. **Molecular Medicine**, 26:39, 2020.

ZHAO, Y.; HE, K.; ZHENG, H.; SUN, M.; SHI, T.; ZHENG, X.; SHAO, D.; ZHANG, H.; GUAN, F.; LI, J.; CHEN, L. Berberine Inhibits the Apoptosis-Induced Metastasis by Suppressing the iPLA2/LOX-5/LTB4 Pathway in Hepatocellular Carcinoma. **Oncotargets Therapy**, 13:5223-30, 2020.

ZOCCAL, K.F.; SORGI, C.A.; HORI, J.I.; PAULA-SILVA, F.W.; ARANTES, E.C.; SEREZANI, C.H.; ZAMBONI, D.S.; FACCIOLI, L.H. Opposing roles of LTB₄ and PGE₂ in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communication**, 7: 10760, 2016.

ZOCCAL, K.F.; GARDINASSI, L.G.; SORGI, C.A.; MEIRELLES, A.F.G.; BORDON, K.C.F.; GLEZER, I.; CUPO, P.; MATSUNO, A.K.; BOLLELA, V.R.; ARANTES, E.C.; GUIMARAES, F.S.; FACCIOLI, L.H. CD36 shunts eicosanoid metabolism to repress CD14 licensed interleukin-1b release and inflammation. **Frontiers Immunology**, 9: 890, 2018.

ZONG, L.; LI, J.; CHEN, X.; et al. Lipoxin A4 attenuates cell invasion by inhibiting ROS/ERK/MMP pathway in pancreatic cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016:6815727, 2016.

WANG, T.J.; LARSON, M.G.; VASAN, R.S.; et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. **Nature Medicine**, 17:448-53, 2011.

WANG, X.; ZHANG, A.; HAN, Y. Urine metabolomics analysis for biomarker discovery and detection of jaundice syndrome in patients with liver disease. . **Molecular & Cellular Proteomics**, 11:370-80, 2012a.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. The metabolism of tumors in the body. **Journal of General Physiology**, 8(6): 519–30, 1927.

WELSH, S.J.; RIZOS, H.; SCOLYER, R.A.; et al. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: where to next? **European Journal of Cancer**, 62:76-85, 2016.

WINDER, M.; VIRÓS, A. Mechanisms of drug resistance in melanoma. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 249:91-108, 2018.

WISHART, D.S.; KNOX, C.; GUO, A.C.; et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. **Nucleic Acids Research**, 37:D603-10, 2009.

WU, K.; YANG, Y.; LIU, D. et al. Activation of PPARgamma suppresses proliferation and induces apoptosis of esophageal cancer cells by inhibiting TLR4-dependent MAPK pathway. *Oncotarget*, 7(28): 44572-82, 2016.

YAMAMOTO, Y.; FUJITA, M.; KOMA, H.; et al. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandin J2 enhanced the anti-tumor activity of camptothecin against renal cell carcinoma independently of topoisomerase-II and PPAR γ pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 410:563-67, 2011.

YE, Y.; PENG, L.; VATTAL, A.; et al. Prostaglandin E2 receptor 3 (EP3) signaling promotes migration of cervical cancer via urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR). **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 146:2189-203, 2020.

YOSHITAKE, R.; SAEKI, K.; SHINADA, M.; et al. Aberrant expression of the COX2/PGE2 axis is induced by activation of the RAP/MEK/ERK pathway in BRAF^{V595E} canine urothelial carcinoma. **Scientific Report**, 10(1):7826, 2020.

YU, L.; GAO, L.X.; MA, Q.X.; et al. Involvement of superoxide and nitric oxide in BRAF(V600E) inhibitor PLX4032-induced growth inhibition of melanoma cells. **Integrative Biology**, 6(12):12117, 2014.