

CRISTINE ARAUJO DE PONTES

**Efeito de prodigininas na migração e no potencial invasivo
de linhagens de melanoma sensíveis e resistentes ao
vemurafenibe**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2021

CRISTINE ARAUJO DE PONTES

**Efeito de prodigininas na migração e no potencial invasivo
de linhagens de melanoma sensíveis e resistentes ao
vemurafenibe**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Sharon Prince

Versão corrigida

São Paulo
2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Araujo de Pontes, Cristine
Efeito de prodigininas na migração e no
potencial invasivo de linhagens de melanoma
sensíveis e resistentes ao vemurafenibe / Cristine
Araujo de Pontes; orientadora Leticia Veras Costa-
Lotufo; coorientadora Sharon Prince. -- São Paulo,
2021.
78 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Melanoma. 2. Metástase. 3. Resistência. 4.
Prodiginosina. 5. Obatoclax. I. Veras Costa-Lotufo,
Leticia, orientador. II. Prince, Sharon,
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristine Araujo de Pontes

Titulo da Dissertação: **Efeito de prodigininas na migração e no potencial invasivo de linhagens de melanoma sensíveis e resistentes ao vemurafenibe**

Orientador: Leticia Veras Costa-Lotufo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:




Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1018/2019** referente ao projeto intitulado: "**Efeito de prodigininas em linhagens de Melanoma sensíveis e resistentes ao vemurafenibe (PLX4032)**" sob a responsabilidade de **Cristine Araújo de Pontes** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Letícia Veras Costa Lotufo**, do Departamento de **Farmacologia**, foi analisado pela **CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais** e pelo **CEPSH - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos**, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 11 de março de 2019.

Luciane Valéria Sita
Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP


Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP.09.2021

DECLARAÇÃO

Em adendo ao **Certificado de Isenção CEP nº 1018/2019**, aprovado em 11/03/2019, e por solicitação da orientadora, **Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo**, do Departamento de Farmacologia - ICB USP, informamos que o título do projeto da aluna: **Cristine Araújo de Pontes** foi alterado para: **"Efeito de prodigininas na migração e no potencial invasivo de linhagens de melanoma sensíveis e resistentes ao vemurafenibe"**, visto melhor adequação do título ao estudo desenvolvido, e resultados obtidos.

São Paulo, 25 de agosto de 2021.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarizoni Dale**
Coordenadora CEP SH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus por ter me mantido na trilha certa com saúde e equilíbrio para chegar até o final desta etapa.

Sou grata à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida, desde meus avós, tios, padrinhos que muitas vezes durante a graduação me socorreram financeiramente, nestes momentos vemos que não estamos sozinhos. Meu pai e meus irmãos Cristian e Cristofer que estiveram sempre comigo. Em especial, agradeço a minha mãe, Eliane de Cássia, que é minha rocha e meu amor maior, mesmo não entendendo completamente, sempre perguntava “-E suas células, como estão?”, obrigada por ouvir tantos comentários de experimentos e me ensinar a nunca desistir.

Agradeço a oportunidade de ter feito parte da vida de dois jovens Lucas e Guilherme que lutaram bravamente contra o câncer, mas que tão abruptamente nos deixaram, a vida de vocês é uma inspiração e me incentivaram a deixar alguma contribuição nesta área que tanto carece de nossos esforços em pesquisa.

Sou muito grata a meus amigos (Leuri, Ninha, Gabi, Carol, Laris, Gui, Ed, Pá, Rafa), que sempre me ouviram com todas minhas dúvidas e preocupações me acalmando neste mundo de jovem adulto, agradeço ao meu namorado Lucas, que é meu grande amigo e incentivador.

Sou grata, aos amigos de laboratório (Laris, Paula, Lu, Bia, Bru, Cath, Amanda, Jaime, Charles, Nicola, Diego, Helô, Simone, Eveline, Karen), essa grande família Lafarmar, vocês mais do qualquer um entendiam os anseios pelos quais passamos nesta jornada e foram ótimos momentos juntos, desde discussões e apresentação de artigo às nossas festinhas, nada surpresa, de aniversário. Neste grupo aprendi muito com cada um de vocês, uma história, uma conversa que me ajudaram e instruíram nesse processo. Especialmente a Dra. Paola Cristina Branco, minha co-orientadora de iniciação científica, que muito me ensinou nos primeiros passos desse mundo científico, é difícil descrever todas as situações vividas juntas nestes anos, desde dificuldades nos experimentos a alegria da publicação do artigo, você é uma grande inspiração para mim. Só tenho a agradecer por você ter estado no meu caminho.

Além destes, agradeço aos colegas de outros laboratórios (Jean, Jorge, Keli, Giovana, Alexsandra, Anali), que ao utilizar equipamentos, aprender técnicas, trocar experiências me ajudaram na realização deste projeto, vemos que a cooperação, a troca ajudam no aperfeiçoamento, em especial aos colegas do laboratório de biologia do câncer e antineoplásicos, do prof Dr. João Agostinho Machado-Neto, ao laboratório de Biologia Celular da profa. Dra. Glaucia Santelli, ao laboratório redox da profa. Dra. Lucia Lopes e ao laboratório de Nanofármacos da Profa. Dra. Luciana Lopes.

Gratidão às meninas da secretaria, Mônica e Camila, que com muita paciência, ajudam os alunos com todos os trâmites da pós-graduação, a todos os colegas e professores do curso de graduação e pós-graduação.

Agradeço a profa. Sharon Prince da Universidade de Cape Town, em aceitar ser minha co-orientadora de mestrado. O período que estivemos juntas foi de grande

aprendizado. Com toda sua gentileza e profissionalismo, me mostrou que eu podia superar meus limites e alçar voos mais altos. Com seu carisma e humildade, pude extrair o melhor do que é ser um pesquisador. Um fortúnio ter cruzado com alguém tão especial.

Ao Professor João Agostinho, especialmente, agradeço as muitas dicas de western blots, ideias e discussões, cada conversa foi extremamente enriquecedora para meu desenvolvimento científico e pessoal. Um agradecimento também a Professora Paula Jimenez (Paulinha) e Diego Wilke por todo apoio, discussão e colaboração nesse desafio de desvendar as prodigininas.

Deixo um agradecimento mais que especial a minha orientadora Letícia Veras Costa-Lotufo pelo incentivo e pela dedicação do seu tempo ao meu projeto de pesquisa. Obrigada por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa. Obrigada por me manter motivada durante todo o processo, lembro-me quando chegava ao laboratório e perguntava “-Então Cris, já descobriu a cura para o câncer?” me sentia tão especial. A professora Letícia é uma pessoa incrível, a qual eu tenho imensa admiração, uma verdadeira musa inspiradora. Ela costuma brincar que é uma otimista quase patológica, eu só tenho a agradecer por me contagiar com todo esse otimismo, sua forma de ver a vida, seriedade, profissionalismo, carisma são realmente maravilhosos. Esses anos em seu laboratório foram de extremo crescimento em todos os âmbitos da minha vida, isso foi possível graças ao ambiente que a professora formulou de respeito, responsabilidade, criatividade e conhecimento.

O tópico de agradecimentos é difícil de ser escrito, pois cada pessoa que passa pela nossa vida deixa uma marca, um ensinamento, dispendo um pouco de si e lavando um pouco de nós, por isso agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para meu projeto.

Agradeço as agências de fomento CAPES (nº do processo: 88882.377611/2019-01) e FAPESP. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Pontes CA. Efeito de prodigininas na migração e no potencial invasivo de linhagens de melanoma sensíveis e resistentes ao vemurafenibe. Orientadora: Leticia Veras Costa Lotufo [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021.

O melanoma é um tipo de câncer de pele que apesar de sua baixa incidência, está associado a maior capacidade de metastização e quimiorresistência, atingindo um alto percentual de mortalidade. A metástase é um dos fatores mais importantes relacionados ao pior prognóstico e responsável por grande parte da morbidade relacionada aos tumores sólidos. A mutação BRAF^{V600E} está presente em aproximadamente 50% dos pacientes com melanoma, por isso a terapia atual tem se dado pelo uso do vemurafenibe, um inibidor seletivo desta quinase. Ainda que este tenha demonstrado resultados positivos, muitos pacientes desenvolvem resistência em menos de um ano e apresentam recidiva do tumor. Por isso, o desenvolvimento de novas opções de tratamento para o melanoma faz-se necessário, incorporando também fármacos “anti-metastáticos”. Estudos prévios mostraram que a prodigiosina, uma substância da classe das prodigininas, apresenta efeitos citostáticos em linhagens de melanoma associados à inibição da proteína survivina, parte da família das IAP's (*inhibitor of apoptosis proteins*). Neste projeto buscou se investigar se a prodigiosina possui efeito inibitório sobre a migração e invasão de células de melanoma com mutação BRAF^{V600E} sensíveis e resistentes ao vemurafenibe. Além disso, também estudamos o obatoclax, uma prodiginina sintética descrita como inibidora da proteína Bcl2 atualmente em estudos clínicos cujos efeitos são pouco descritos em melanoma. A prodigiosina e o obatoclax causaram inibição da migração de melanomas, analisado pelo experimento de ferida, com inibição de em média de 30% para as linhagens, inclusive aquelas resistentes ao vemurafenibe, assim como uma modesta diminuição na capacidade invasiva. O obatoclax teve alta citotoxicidade em todas as linhagens testadas com IC₅₀ de 72h de 1nM para as linhagens mais sensíveis, visto pelo ensaio de MTT. O tratamento diminuiu também a capacidade clonogênica nas linhagens de melanoma. Foi observado que a resistência ao vemurafenibe tanto em pacientes quanto na linhagem SK-Mel-28 envolvem um remodelamento das vias de apoptose da célula, o que motivou ao estudo do efeito do obatoclax em associação com o vemurafenibe nas células sensíveis e resistentes. O obatoclax foi capaz de reverter a resistência ao vemurafenibe na linhagem SkMel-28R em concentrações da ordem de nanomolar. Os mecanismos envolvidos nos efeitos destas prodigininas carecem de uma avaliação mais aprofundada, mas os dados obtidos reforçam o potencial dessas substâncias no tratamento do melanoma, incluindo aqueles com resistência ao inibidor de BRAF.

Palavras-chaves: Melanoma, metástase, resistência, prodigiosina, obatoclax.

ABSTRACT

Pontes CA. Effect of prodiginines on migration and invasive potential in melanoma cell lines sensitive and resistant to vemurafenib. Supervisor: Leticia Veras Costa Lotufo. [Master thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021.

Melanoma is a type of skin cancer that despite its low incidence is associated with greater capacity for metastasis and chemoresistance, reaching a high percentage of mortality. Metastasis is one of the most important factors related to the worst prognosis and is responsible for a large part of the morbidity related to solid tumors. The BRAF^{V600E} mutation is present in approximately 50% of these tumors, so current therapy has been given by the use of vemurafenib, a selective inhibitor of this kinase. Although this has shown positive results, many patients develop resistance in less than one year and have tumor recurrence. For this reason, the development of new treatment options for melanoma is necessary, also incorporating “anti-metastatic” drugs. Previous studies have shown that prodigiosin, a substance of the prodiginines class, has cytostatic effects in melanoma cell lines associated with the inhibition of the survivin protein, part of the family of IAP’s (inhibitor of apoptosis proteins). In this project we sought to investigate whether prodigiosin has an inhibitory effect on the migration and invasion of melanoma cells. In addition, obatoclax, a synthetic prodiginine, described as Bcl2 protein inhibitor currently in clinical studies for hematological tumors and small cell lung cancer, whose effects are poorly described in melanoma, is also being studied. Prodigiosin and obatoclax caused inhibition of melanoma migration, analyzed by the wound healing assay, with an average inhibition of 30% for the melanoma cell lines, including resistant to vemurafenib cell lines as well as a modest decrease in invasive capacity. Obatoclax showed high cytotoxicity in all cell lines tested with IC₅₀ of 72h of 1nM for the most sensitive cell line, as seen by the MTT assay. The treatment also decreased the clonogenic capacity in the melanoma cells. It was observed vemurafenib resistance both in patients and in the SK-Mel-28 cell line involves a remodeling of cell apoptosis pathways, which motivated the study of the effect of obatoclax in association with vemurafenib on sensitive and resistant cells. Obatoclax was able to reverse the resistance to vemurafenib in the SkMel-28R cell line at nanomolar concentrations. The mechanisms involved in the effects of these prodiginines need further evaluation, but the data obtained reinforce the potential of these substances in the treatment of melanoma, including those with resistance to the BRAF inhibitor.

Keywords: Melanoma, metastasis, resistance, prodigiosin, obatoclax.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Progressão do melanoma (modelo de Clark)	17
Figura 2	Via da MAPK e PI3K-AKT sob condições normais e no melanoma.....	18
Figura 3	Membros da família BCL-2.....	20
Figura 4	Estrutura da prodigiosina (1) e obatoclax (2).....	23
Figura 5	Atividade da prodigiosina e derivados em melanoma (Branco et al, 2020).....	24
Figura 6	Representação simplificada das metodologias utilizadas no projeto	33
Figura 7	Curva dose resposta para o tratamento com prodigiosina e obatoclax	43
Figura 8	Gráfico da exclusão por azul de tripan após 24h com obatoclax e prodigiosina. ...	45
Figura 9	Formação de colônias após tratamento com obatoclax.....	46
Figura 10	Gráfico da quantificação do número de colônias, área e intensidade	46
Figura 11	Formação de colônia após tratamento com prodigiosina.....	48
Figura 12	Ensaio de ferida nas linhagens tratadas com prodigiosina	50
Figura 13	Gráficos da quantificação do ensaio de ferida com prodigiosina	51
Figura 14	Ensaio de ferida nas linhagens tratadas com obatoclax	53
Figura 15	Gráficos de quantificação do ensaio de ferida com obatoclax	54
Figura 16	Ensaio de invasão de matrigel em SK-MEL-28	55
Figura 17	Ensaio de invasão de matrigel em SK-MEL-28 Resistente.....	55
Figura 18	Gráfico de quantificação do ensaio de invasão de matrigel.....	56
Figura 19	Western blot e gráfico dos marcadores EMT.....	58
Figura 20	25 Mapa de calor da expressão gênica da família BCL2	59
Figura 21	Análise da expressão dos membros BCL2 entre nevus normal e melanoma.....	60
Figura 22	Mapa de calor do ensaio de sinergismo em SK-MEL-19 e SK-MEL-19R.	61
Figura 23	Mapa de calor do ensaio de sinergismo em SK-MEL-28	62
Figura 24	Mapa de calor do ensaio de sinergismo em SK-MEL-28R	63
Figura 25	Western blotting de marcadores apoptóticos.....	64
Figura 26	Quantificação dos marcadores apoptóticos.....	65
Tabela 1	Ensaio clínico com resultados publicados com Obatoclax	27
Tabela 2	Doses de obatoclax e prodigiosina utilizadas no ensaio clonogênico	36
Tabela 3	Doses de obatoclax e prodigiosina utilizadas no ensaio de ferida	36
Tabela 4	Sequência de primers e concentrações utilizadas para a PCR quantitativa	38
Tabela 5	Anticorpos utilizados	40
Tabela 6	Citotoxicidade do obatoclax e da prodigiosina	44
Tabela 7	Citotoxicidade da doxorubicina e do vemurafenibe.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Câncer	13
1.2	Quimioterapia e produtos naturais	22
1.3	Limitações das técnicas utilizadas	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Obtenção das substâncias	33
3.2	Cultura de células	34
3.3	Avaliação da citotoxicidade	34
a.	Ensaio do MTT	34
b.	Ensaio clonogênico	35
c.	Ensaio de viabilidade por azul de Trypan	36
3.4	Avaliação da capacidade de Migração	36
a.	Ensaio de Ferida	36
3.5	Avaliação da capacidade de Invasão	37
a.	Ensaio de Invasão <i>Transwell</i>	37
3.6	Caracterização da expressão dos genes da família BCL2 em pacientes de melanoma	37
3.7	Caracterização da expressão dos genes da família BCL2 nas células SK-Mel 28 sensíveis e resistentes ao Vemurafenibe	38
3.8	Tratamento combinado do obatoclax e vemurafenibe	39
3.9	Detecção de proteínas por <i>western blotting</i>	40
3.10	Análise estatística	41
4	RESULTADOS	42
4.1	<i>Citotoxicidade das prodigininas, prodigiosina e obatoclax, em células de melanoma sensíveis e resistentes ao vemurafenibe</i>	42
4.2	<i>Prodigiosina e obatoclax apresentam efeito sobre a migração celular nas linhagens de melanoma</i>	49
4.3	<i>O tratamento com prodigiosina e obatoclax diminuíram a invasão nas linhagens testadas</i>	54
4.4	<i>O tratamento com as prodigininas altera a expressão de marcadores EMT nas linhagens de melanoma</i>	56
4.5	<i>Comparação dos genes membros da família BCL-2 nas linhagens SkMel-28 sensível e resistente e comparação desses genes em dados de expressão de amostras de nevus melanocítico e melanoma</i>	58
4.6	<i>Ensaio de combinação entre vemurafenibe e obatoclax</i>	60

4.7. O tratamento combinado de vemurafenibe e obatoclax altera marcadores moleculares de dano em DNA e apoptose	63
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS*	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é a segunda maior causa de mortes no mundo, de acordo com as estimativas da organização mundial da saúde foi responsável por 10 milhões de óbitos em 2020. Dentre os tipos de câncer registrados no Brasil, 30% são de pele, e a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer, sendo o câncer de pele não melanoma apontado como o mais incidente com 177 mil casos (INCA 2020). Os cânceres de pele podem ser divididos em não melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma epidermóide, derivados de queratinócitos), melanoma, além de outros tipos de tumores de pele como o carcinoma de células de Merkel (Brandt & Moore, 2019). Entre os tumores de importância dermatológica, o melanoma destaca-se pela alta taxa de mortalidade. Embora com representatividade de cerca de 4% de todas as neoplasias malignas da pele, o melanoma é o câncer de pele mais letal e é responsável por cerca de 80% de todas as mortes por tumores de pele (Geller *et al.*, 2013). A idade média dos afetados é de 52 anos e a sobrevida média após o início de metástases é de 6 a 9 meses. A *American Cancer Society* (ACS) estima que 106.110 novos casos de melanoma sejam diagnosticados e 7.180 morrerão pela doença nos Estados Unidos em 2021. Enquanto no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 8.450 novos casos, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres em 2020.

A metástase é o fator preditivo mais importante no prognóstico do paciente (Anderson *et al.*, 2019), sendo majoritariamente responsável pela morbidade e mortalidade associadas ao câncer. O melanoma, por sua vez, tem uma tendência de metastização no início da progressão da doença, que pode ocorrer mesmo em tumores primários pequenos (Bedrosian *et al.*, 2000). Por isso, há um grande esforço direcionado ao rastreamento e determinação da presença de metástases. Esse tumor é capaz de metastizar para locais regionais e distantes. Os locais mais comuns de metástase regional são pele próxima, tecido subcutâneo e linfonodos. As metástases para a pele são denominadas lesões satélites (se forem relativamente próximas do tumor primário) ou metástases em trânsito (se forem mais distantes). As metástases mais comuns ocorrem na pele, pulmão, cérebro, fígado, osso e intestino. No entanto, em autópsias de pacientes com melanoma, metástases são

encontradas por todo corpo, como coração, pâncreas, glândulas supra-renais, baço, estômago, esôfago, glândula tireóide, rins, órgãos genitais e vasos sanguíneos (Damsky *et al.*, 2010).

A transição epitélio mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial mesenchymal transition*) é um processo que ocorre nas células tumorais. Este processo está relacionado ao câncer e às metástases, onde observa-se um aumento da capacidade migratória e de invasão, elevada resistência a apoptose e produção aumentada de componentes da matriz extracelular por parte das células que passam por este processo comparado a células epiteliais normais (Kalluri & Weinberg, 2009).

A EMT foi identificada primeiramente no desenvolvimento embrionário no qual células perdiam suas características epiteliais e adquiriam um fenótipo mesenquimal crucial para os estágios do desenvolvimento embrionário. Porém, cada vez mais tem sido mostrada a relação da EMT com o câncer, em diversos estágios, desde iniciação, crescimento primário, invasão, metástase e até na resistência à terapia. Os marcadores desse processo podem ser arbitrariamente divididos em epiteliais e mesenquimais. A aquisição de características mesenquimais por células epiteliais, ocorre durante alguns processos biológicos e podem ser classificados em três tipos: o primeiro relacionado ao desenvolvimento embrionário, o segundo associado com a regeneração tecidual e o terceiro tipo à progressão tumoral (Zeisberg & Neilson, 2009). Os marcadores epiteliais mais conhecidos e estudados são a E-caderina, laminina e citoqueratina, já os marcadores mesenquimais são vimentina, N-caderina, fibronectina e metaloproteinases. Embora o termo EMT não possa ser utilizado em sua totalidade para se referir ao melanoma, visto que não é um câncer derivado do epitélio, as alterações da EMT também foram observadas neste tumor (Tang *et al.*, 2020). No melanoma, observa-se que a expressão do fator de transcrição MITF (*Melanocyte Inducing Transcription Factor*), que é um dos principais reguladores do desenvolvimento de melanócitos, regula o fenótipo dessas células, sua alta expressão mantém o status diferenciado dos melanócitos, a expressão intermediária sustenta a proliferação, enquanto baixos níveis de expressão de MITF geram células com perfil mais invasivo e proliferação lenta (Hoek & Goding, 2010).

A E-caderina é uma proteína cálcio dependente responsável pela adesão célula-célula. A perda na função dessa proteína está associada à progressão do

câncer, invasão e metástase (Lamouille, 2014). Esta proteína é frequentemente usada como um marcador de EMT. A N-caderina também é um membro da família das caderinas, porém é expressa em células neurais e musculares estriadas, mas não em células epiteliais. Quando células epiteliais passam a expressar N-caderina e deixam de expressar E-caderina, fenômeno é conhecido como “*cadherin switch*”, essas células tornam-se mais invasivas.

Além desses marcadores, alteração na expressão dos fatores de transcrição Snail, Slug, Zeb1 e Twist1 estão correlacionados a maior migração e invasão no melanoma. A indução da expressão desses fatores também origina células com fenótipos semelhantes a células-tronco malignas que são mais resistentes aos tratamentos. Slug é uma exceção dessas, pois é expressa em melanócitos normais (seu papel é atribuído na migração dos melanócitos embrionários da crista neural para epiderme), mas também tem uma função importante na invasão e metástase (Gupta *et al.*, 2005).

Múltiplas vias de sinalização influenciam a EMT ao induzirem a expressão de fatores de transcrição que favorecem a migração, invasão e metástase. Um exemplo é a via da MAPK (Mitogen-activated protein kinase) que é frequentemente mutada em melanoma e a ativação da proteína BRAF (membro da via MAPK) é associada ao aumento da expressão de Twist1 e Zeb1, resultando em maior invasão do melanoma (Caramel *et al.*, 2013). Mutações em BRAF também potencializam a via NFκB, que promove expressão de metaloproteinases e Snail, dois importantes *drivers* para aumento da capacidade metastática (Lin *et al.*, 2010). Outra via relevante é a da Wnt/β-catenina, a ativação de Wnt induz a regulação positiva de Snail e negativa da expressão de E-caderina. A perda de E-caderina libera β-catenina ligada à caderina; β-catenina livre pode então migrar para o núcleo e induzir a transcrição de fatores pró-invasivos (Schmalhofer *et al.*, 2009).

Parece também existir um fenótipo híbrido em que as células tumorais expressam tanto marcadores epiteliais quanto mesenquimais e exibem características morfológicas, transcricionais e epigenéticas intermediárias entre as células epiteliais e mesenquimais, denominado transição epitélio-mesenquimal parcial ou incompleta. Acredita-se que esse processo aumenta as propriedades invasivas destas células, gera células tumorais circulantes e células-tronco cancerosas e promove resistência aos quimioterápicos (Saitoh, 2018). Em alguns

modelos, como o câncer de ovário, um fenótipo híbrido EMT está associado ao aumento do tumor, enquanto fenótipos totalmente epiteliais ou totalmente mesenquimais foram associados com a perda de marcadores de células-tronco e tumorigenicidade (Pastushenko & Blanpain, 2018).

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele originado pela transformação maligna de melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele) que ocorre em decorrência de complexas interações entre fatores genéticos e ambientais. Tal transformação dos melanócitos em melanoma requer uma sequência complexa e coordenada de eventos endógenos e exógenos, abrangendo diferentes etapas de iniciação do tumor, sua progressão, invasão e metástase (Leonardi *et al*, 2018).

O modelo de Clark (figura 1) para a progressão do melanoma engloba uma série de alterações histopatológicas, e, atualmente, sabe-se que estas estão interligadas a mecanismos moleculares, começando do nevo melanocítico benigno ao melanoma via nevo displásico. O processo inicia-se com um nevo melanocítico benigno que possui proliferação controlada de melanócitos normais, depois ocorre um crescimento anormal de melanócitos no nevo pré-existente ou num novo local, com células atípicas, bordas irregulares e pigmentação variada, o chamado nevo atípico ou displásico. As células começam a proliferar-se horizontalmente na epiderme, o chamado crescimento radial, denominado melanoma *in situ*. A perda de E-caderina e ganho de N-caderina faz com que estas células consigam invadir a membrana basal e proliferar verticalmente na derme, sendo a fase de crescimento vertical, por fim quando esses melanócitos malignos espalham-se para outras áreas do corpo, normalmente primeiro para linfonodos, depois para o tecido subcutâneo podendo atingir outros órgãos ao adentrar nos vasos sanguíneos (Clark *et al.*, 1984). Esse processo para formação do tumor primário muitas vezes não ocorre de maneira linear como descrito, mas pode seguir por caminhos complexos em que nem todas as etapas ocorrem (Damsky *et al.*, 2014). Além disso, estudos sugerem que muitos melanomas, incluindo melanomas acrais e mucosos surgem de novo, isto é, não derivado de um nevo melanocítico (Takata *et al.*, 2010).

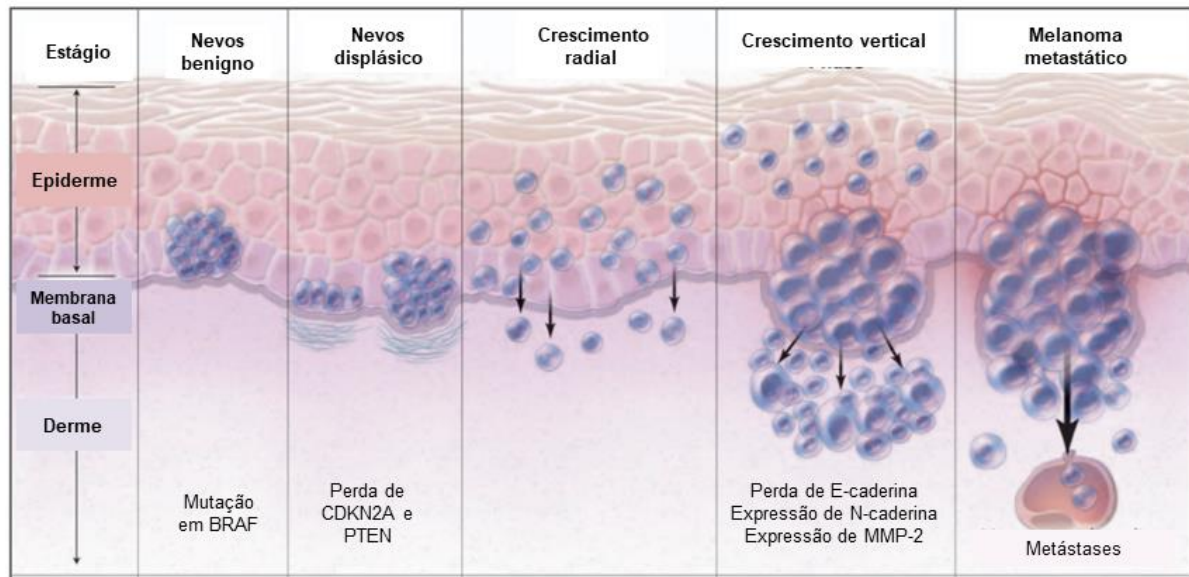


Figura 1 Modelo de progressão do melanoma de Clark. A progressão do melanoma, pode ocorrer a partir de nevos que possuem inicialmente um crescimento limitado e benigno, esses nevos adquirem mutações levando a atipia dessas células e formação de nevos displásicos. Na fase de crescimento radial, há diminuição da diferenciação, hiperplasia ilimitada e proliferação clonal. No crescimento vertical essas células são capazes de atravessar a membrana basal, observa-se diminuição de moléculas de adesão. Por último, essas células dissociam-se do tumor primário e ocorre a formação de metástases próximas e distantes (Adaptado de Miller & Mihm, 2006).

O processo de formação de metástases envolve uma série de eventos sucessivos e interconectados. Após a formação de um tumor primário, algumas células podem entrar nos vasos linfáticos, atravessar o linfonodo e, atingir a circulação sistêmica. Depois essas células devem ser capazes de aderir à microvasculatura de um órgão alvo, extravasar e proliferar no novo sítio. Muitos fatores estão envolvidos como citocinas e quimiocinas, o microambiente e a capacidade de migração dessas células (Ju *et al.*, 2018). Esses processos são controlados por diversos mecanismos. Dentre eles, pode-se citar a regulação pelas proteínas GTPases RhoA/Rac1 importantes na adesão e remodelamento de actina, com isso influenciando na forma e movimento da célula (Sahai e Marshall, 2002). As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas envolvidas na migração celular, cicatrização, remodelação tecidual durante a embriogênese e desenvolvimento dentário. Elas realizam a degradação da matriz extracelular assim são relacionadas com a invasividade do tumor e promoção das metástases.

Dentre as vias oncogênicas mais relevantes no melanoma, a via de Ras / RAF / MEK / ERK, conhecida como via da MAPK (proteínas-quinases ativadas por mitógeno) foi relatada por apresentar-se ativada em mais de 80% de todos os melanomas cutâneos (figura 2). Esta via de sinalização é regulada por receptores

tirosina-quinases, citocinas e receptores acoplados à proteína G. As proteínas RAS (HRAS, KRAS, e NRAS em seres humanos) ativam RAF (ARAF, BRAF e CRAF em humanos), seguido pela ativação sequencial de MEK e ERK, que culminam na transcrição de genes relacionados a proliferação celular (Fecher *et al.*, 2007). Mutações BRAF e NRAS são normalmente encontradas em melanomas cutâneos. Mutações comuns incluem BRAF^{V600E} (entre 40 e 60% de todos os melanomas), NRAS^{Q61L} ou NRAS^{Q61R} (~15-20 % dos melanomas), e em menor proporção mutações em HRAS e mutações em KRAS. A mutação BRAF é a mais comum dentre as observadas em pacientes com melanoma. Dentre essas a mutação BRAF^{V600E} (mais de 90% é uma única mutação nucleotídica que resulta da troca de valina por ácido glutâmico) ocorre no início da melanomagenese e é encontrada em uma alta porcentagem de nevos melanocíticos (lesão pré-neoplásica). Existem outras mutações na posição V600, conduzindo a substituições de aminoácidos alternativos (V600K, V600D, V600R). A mutação BRAF^{V600E} confere a esta quinase, a capacidade para ativar MEK independente da RAS (Ascierto *et al.*, 2012), levando a uma ativação constitutiva da via MAPK. O efeito do estado mutacional do BRAF^{V600E} na capacidade metastática do melanoma ainda é incerto, embora existam alguns dados (Damsky *et al.*, 2010).

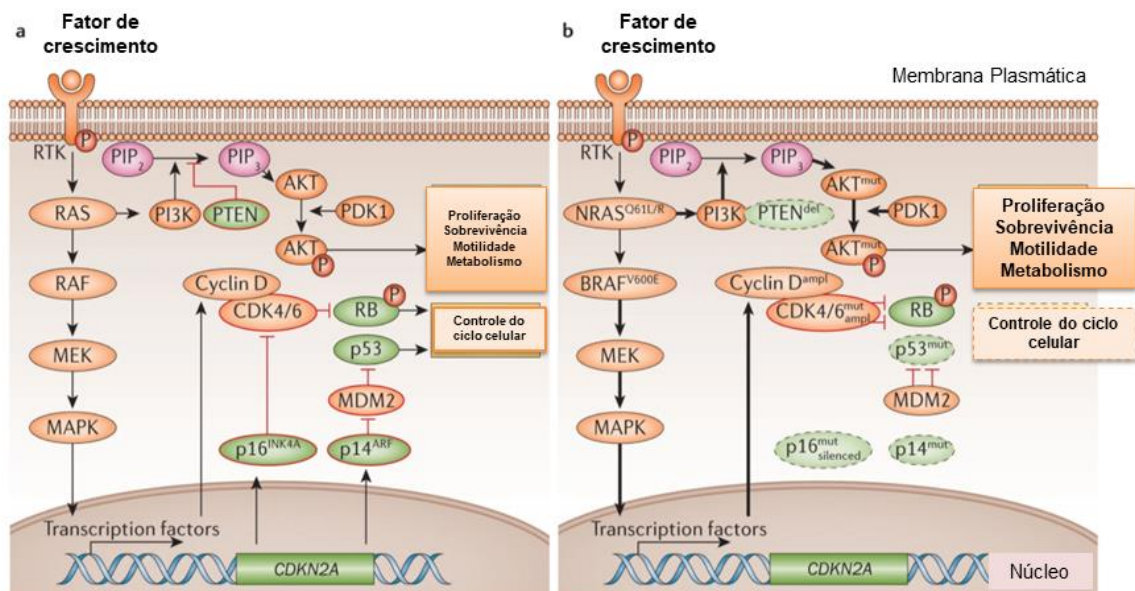


Figura 2 Via da MAPK e PI3K-AKT sob condições normais (a) e no melanoma (b) com mutações em BRAF, NRAS e PTEN, essas alterações levam a ativação constitutiva dessa via e perda da homeostase celular (Adaptado de Schandendorf *et al.*, 2015)

Devido à importância e à frequência desta mutação, a pesquisa por diferentes agentes farmacológicos com o intuito de inibir a via da MAPK se intensificou,

utilizando como alvo terapêutico proteínas mutadas desta via, cujo principal alvo foi BRAF^{V600E} (Ribas & Flaherty, 2011). Dos quimioterápicos que possuem BRAF^{V600E} como alvo terapêutico, o uso de vemurafenibe e dabrafenibe tem sido associado com a sobrevivência prolongada em pacientes com melanoma não tratados previamente (Bollag *et al.*, 2010). O vemurafenibe (PLX4032) é um potente inibidor do BRAF^{V600E}, e ensaios clínicos de fase I e fase II mostraram taxas de resposta em mais de 50% dos pacientes com a mutação BRAF^{V600E} (Chapman *et al.*, 2011). Ele se liga seletivamente ao sítio de ligação do ATP da kinase BRAF^{V600E} e inibe sua atividade levando à inibição da fosforilação de ERK e da proliferação nas células com esta mutação.

Embora os resultados com o tratamento envolvendo vemurafenibe sejam bastante positivos, os pacientes desenvolvem resistência farmacológica ao composto em menos de um ano (Nazarian *et al.*, 2010). Esta resistência pode se dar devido a mutações em NRAS, amplificação de BRAF, mutações em MEK grande parte delas levam a reativação de MAPK, ativação da via PI3K-Akt via perda de PTEN pode contribuir para resistência de inibidores de BRAF. Outros fatores de resistência encontrados foram as alterações como superexpressão de NRAS ou KRAS selvagem, expressão de *splicing* variantes de BRAF^{V600E} e amplificação de AKT, dentre outros fatores descritos (Kakadia *et al.*, 2018).

A resistência ao vemurafenibe também parece aumentar a capacidade invasiva das células de melanoma. Em estudo com a linhagem de melanoma SKMEL-28 resistente ao vemurafenibe, a atividade e a expressão de metaloproteinases, MMP-2 e MMP-9, foram maiores do que na linhagem sensível. Diversos estudos demonstram que as metaloproteinases tem uma função importante na invasão tumoral. Além disso, a linhagem resistente teve maior capacidade de invasão da matriz extracelular comparada a linhagem normal num modelo tridimensional de invasão (Maria-Engler *et al.*, 2016).

Uma das características do câncer é sua capacidade de suprimir a apoptose através de mecanismos de evasão, no melanoma essa resistência a apoptose é associada à quimiorresistência (Soengas & Lowe, 2003). A apoptose, ou morte celular programada, é essencial tanto para o desenvolvimento quanto para manutenção dos tecidos e a família de proteínas BCL2 são uma das principais reguladoras da apoptose, além das caspases e da família das IAP's. A BCL2 é a

proteína protótipo dessa família de proteínas caracterizadas por possuírem ao menos uma região de homologia BCL2, conhecido como domínio BH, existem quatro domínios (BH1-BH4). Estas proteínas podem ser divididas em anti-apoptóticas multi-domínios, pró-apoptóticas multi-domínios, pró-apoptóticas ativadoras BH3-somente e sensibilizadoras pró-apoptóticas BH3 somente (Figura 3). Diferentes combinações de proteínas da família BCL2 são expressas num tipo celular a depender do seu estado, da quantidade dessas proteínas e suas interações, são fatores que determinam a propensão das células de sucumbirem a apoptoses diante dos diferentes indutores (Levine *et al.*, 2008).

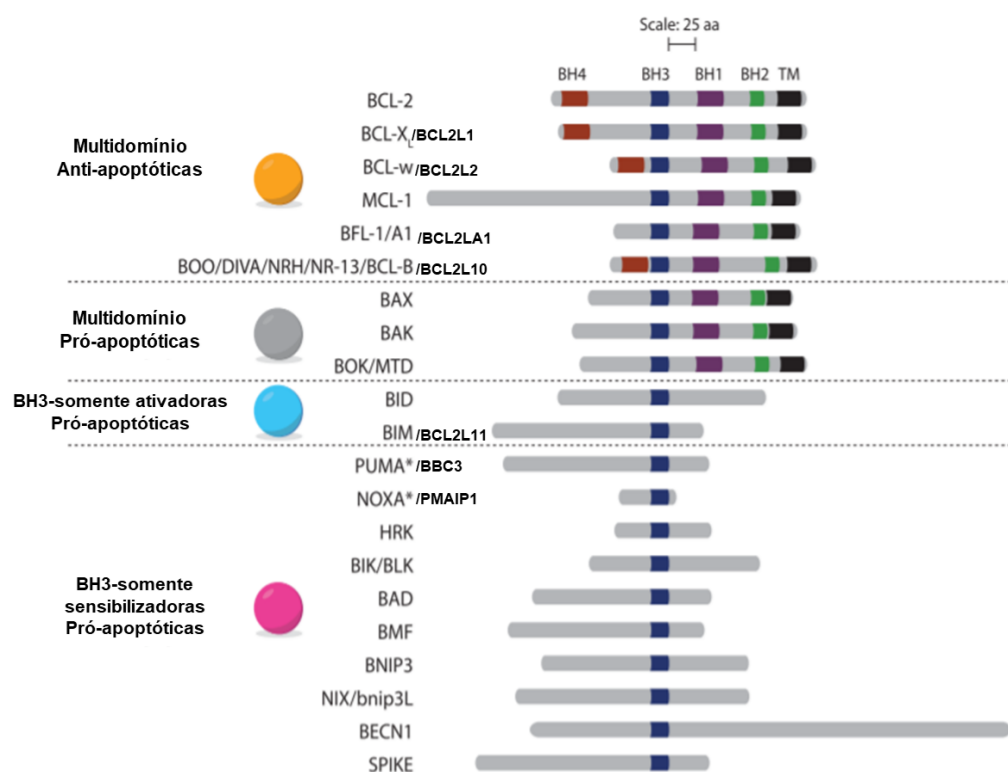


Figura 3 Membros da família BCL2 e sua classificação pela capacidade em ativar ou inibir a apoptose. Domínios conservados de homologia BCL-2 (BH 1-4) e domínio transmembrana (TM) (Adaptado de Gross & Katz, 2017).

Os mecanismos pelos quais agem essas proteínas não estão totalmente elucidados, mas sua ação está associada a sua capacidade de modular a liberação de proteínas do espaço intermembranar da mitocôndria. Sob condições apoptóticas as proteínas do BCL2 regulam a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, e este evento é sempre acompanhado de fissão mitocondrial e ativação da via intrínseca da apoptose (Gross & Katz, 2017). Muitas dessas proteínas residem ou estão em movimento dinâmico para dentro ou fora da membrana

mitocondrial externa como BCL2, BCL2L1, BCL2L2 e MCL1 enquanto BAX, por exemplo, reside no citosol de células saudáveis.

Os membros BH3-somente são um dos principais sensores e mediadores do stress celular e uma vez ativados, inativam os membros anti-apoptóticos da família BCL2 e ativam os membros pró-apoptóticos dessa família, esses dois eventos parecem ocorrer simultaneamente podendo resultar na permeabilização da membrana externa mitocondrial, liberação de citocromo C, ativação da caspase e apoptose. Essas proteínas interagem tanto para prevenir quanto para induzir a apoptose. As proteínas ativadoras (BIM/BCL2L11, BID, PUMA/BBC3) interagem diretamente com as efetoras (BAX e/ou BAK) induzindo mudanças conformacionais que levam à montagem de poros na membrana mitocondrial. Os membros da família BCL2 antiapoptóticos (BCL2, BCL2L1, MCL1) inibem a apoptose sequestrando os ativadores do BAX e BAK. Enquanto as BH3 sensibilizadoras (BAD, NOXA/PMAIP1) ligam-se às anti-apoptóticas, inibindo-as e induzindo a apoptose, deslocando as ativadoras que ficam livres para ativar BAX e BAK (Hata *et al.*, 2015)

Os membros da família BCL-2 também contribuem em outras funções celulares como regulação da morfologia e metabolismo mitocondrial, regulação da homeostase do cálcio no retículo endoplasmático, regulação de resposta a proteínas mal dobradas, autofagia, regulação de resposta ao dano em DNA entre outras atividades (Gross & Katz, 2017).

A superexpressão de proteínas anti-apoptóticas da família BCL2 é observada em muitos cânceres, devido a translocação cromossomal, amplificação gênica, transcrição aumentada do gene ou processamento pós-traducional alterado. Superexpressão de BCL2 foi observada em linfomas, alguns tumores de mama e próstata. MCL1 e BCL2L1 estão superexpressos em diversos tipos tumorais, assim como expressão diminuída de proteínas pró-apoptóticas do BCL2 facilitou a formação e progressão de tumores (Kelly & Strasser, 2011). Com isso foram desenvolvidos vários moduladores com domínio de ligação BH3 de proteínas anti-apoptóticas BCL2 como alvo, os miméticos de BH3 como o GX15-070 (Obatoclax, Figura 4) inibidor de todas as proteínas anti-apoptóticas da família BCL2, o ABT-263 (Navitoclax) que inibe BCL2, BCL2L1 e BCL2L2, o ABT-199 (Venetoclax) que inibe

somente BCL2. Existe também um inibidor específico de MCL1, o S63845 (Kale *et al.*, 2018).

No melanoma os membros anti-apoptóticos estão aumentados contribuindo para a sobrevivência do tumor. ERK1/2 pode promover a sobrevivência celular nas células BRAF ou KRAS mutadas, aumentando a expressão de proteínas BCL-2 pró-sobrevivência (Sale *et al.*, 2019). Estudos recentes apontam que BCL2L1 e MCL1 são as proteínas mais relevantes para o melanoma, os autores observaram através de um painel de células estabelecidas e células primárias nas quais foram testados BH3-miméticos sozinhos ou em combinação, isoladamente os agentes não tiveram atividade significativa, mas combinações com alvo MCL1 somado a BCL2L1 e em menor grau BCL2 demonstraram alta atividade (Lee *et al.*, 2019).

1.2 Quimioterapia e produtos naturais

Sabe-se que existe uma abundância de recursos naturais para uso medicinal em todo o mundo, muitos dos quais ainda não foram explorados para possível aplicação na indústria farmacêutica. Mais de 50 % de todos os medicamentos disponíveis no mercado são originados a partir de fontes naturais, dos quais mais de 70% de agentes anticâncer tem a sua origem em fontes naturais. As fontes naturais incluem plantas, animais, microrganismos e vida marinha (Chinembiri *et al.*, 2014). As formas de vida marinha são uma importante fonte de metabólitos secundários ativos que apresentam esqueletos carbônicos distintos com alta atividade biológica, vários dos quais tem inspirado o desenvolvimento de novas classes de agentes terapêuticos (Geerwick e Moore, 2012).

No que se refere ao desenvolvimento de fármacos anticâncer obtidos a partir de produtos naturais marinhos, existem 15 fármacos em uso clínico relacionados aos produtos naturais marinhos, sendo que destes, 10 são utilizados no tratamento do câncer (<https://www.marinepharmacology.org/approved>). Além disso, existem diversas substâncias que já se encontram em fases de testes pré-clínico e clínico (Simmons *et al.*, 2005; Newman e Cragg, 2014; Jimenez *et al.*, 2018). A prodigiosina (Figura 4, PG) é um pigmento vermelho da classe das prodigininas que apresenta propriedades antimicrobianas (Castro, 1967; Berg, 2000) e anticâncer (Williamson *et al.*, 2007). A prodigiosina é um metabólito secundário bioativo produzido por microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos. Caracterizada por um esqueleto carbônico contendo um grupo pirrolilpirrometano, o seu papel biológico nos

organismos produtores é ainda pouco estudado, mas sabe-se que ela aparece no estágio final do crescimento bacteriano (Harris et al., 2004). No entanto tem-se conhecimento que a PG e seus derivados sintéticos são eficazes agentes pró-apoptóticos contra várias linhagens celulares de câncer, com múltiplos alvos celulares, incluindo células resistentes a múltiplas drogas com pouca ou nenhuma toxicidade contra as linhagens de células normais (Darshan e Manonmani, 2015). No trabalho realizado por Zhang e colaboradores (2005), foi observado o efeito da prodigiosina na inibição da capacidade invasiva em linhagens metastáticas de carcinoma de pulmão e melanoma murino. E ainda, demonstrou-se que a prodigiosina em concentrações sub-tóxicas inibe a motilidade de patógenos, o que pode ser devido à perda de flagelos ou à perda de capacidade invasiva (Darshan e Manonmani, 2016).

Em estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa, a prodigiosina foi isolada a partir de *Pseudoalteromonas* sp. de sedimentos coletados no litoral do nordeste do Brasil, e apresentou atividade anticâncer em distintas linhagens tumorais apresentando IC₅₀ entre 0,5 a 3,0 µg/mL. Também foram isolados a partir de uma cepa de *Actinomadura* sp. de sedimentos coletados no Arquipélago de São Pedro e São Paulo, outras prodigininas que também apresentaram atividade citotóxica em algumas linhagens tumorais, com seletividade pelo melanoma (Silva *et al.*, 2017).

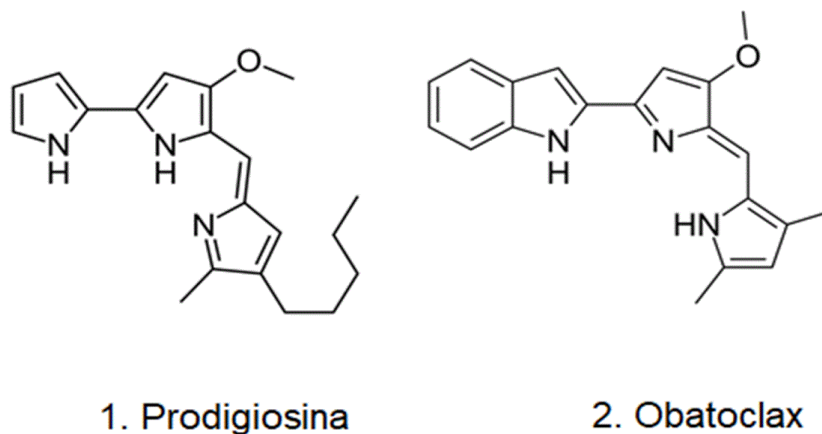


Figura 4 Estrutura da prodigiosina (1) e obatoclax (2)

Estudos com essas prodigininas: prodigiosina (PG), ciclononilprodigiosina (CNP) e nonilprodigiosina (NP) em linhagens de melanoma foram desenvolvidos visando à compreensão do mecanismo de ação dessas substâncias. Neste trabalho vimos que as prodigininas tem potente atividade contra as linhagens de melanoma com mutações BRAF^{V600E} e NRAS^{Q61R} com IC₅₀ de 24h em concentrações

micromolares de 0,5-15 μ M. As três substâncias diminuíram o crescimento e viabilidade celular. O mecanismo de ação destas substâncias é vasto, causando dano ao DNA, como observado pelo aumento de histona fosforilada H2AX, indução de apoptose, parada no ciclo celular, com aumento de população G1 e tendência a diminuição da expressão de survivina (uma proteína com alta expressão em melanomas). A survivina (BIRC5) é uma proteína ausente nos tecidos normais adultos, enquanto em tumores tem alta expressão, como no melanoma. Na maioria dos tumores sólidos, altos níveis da survivina foram preditivos de progressão tumoral e tiveram impacto na sobrevida livre de doença e sobrevida global (Zaraffoni *et al*, 2005). O *knockdown* de survivina aumentou a citotoxicidade a longo prazo da prodigiosina nas células de melanoma. Simulações computacionais de *docking* sugerem que a prodigiosina e a ciclononilprodigiosina podem se ligar no domínio BIR da survivina. O efeito do tratamento com as prodigininas foi em suma mais citostático do que citotóxico. Esses resultados estão ilustrados na figura 5.

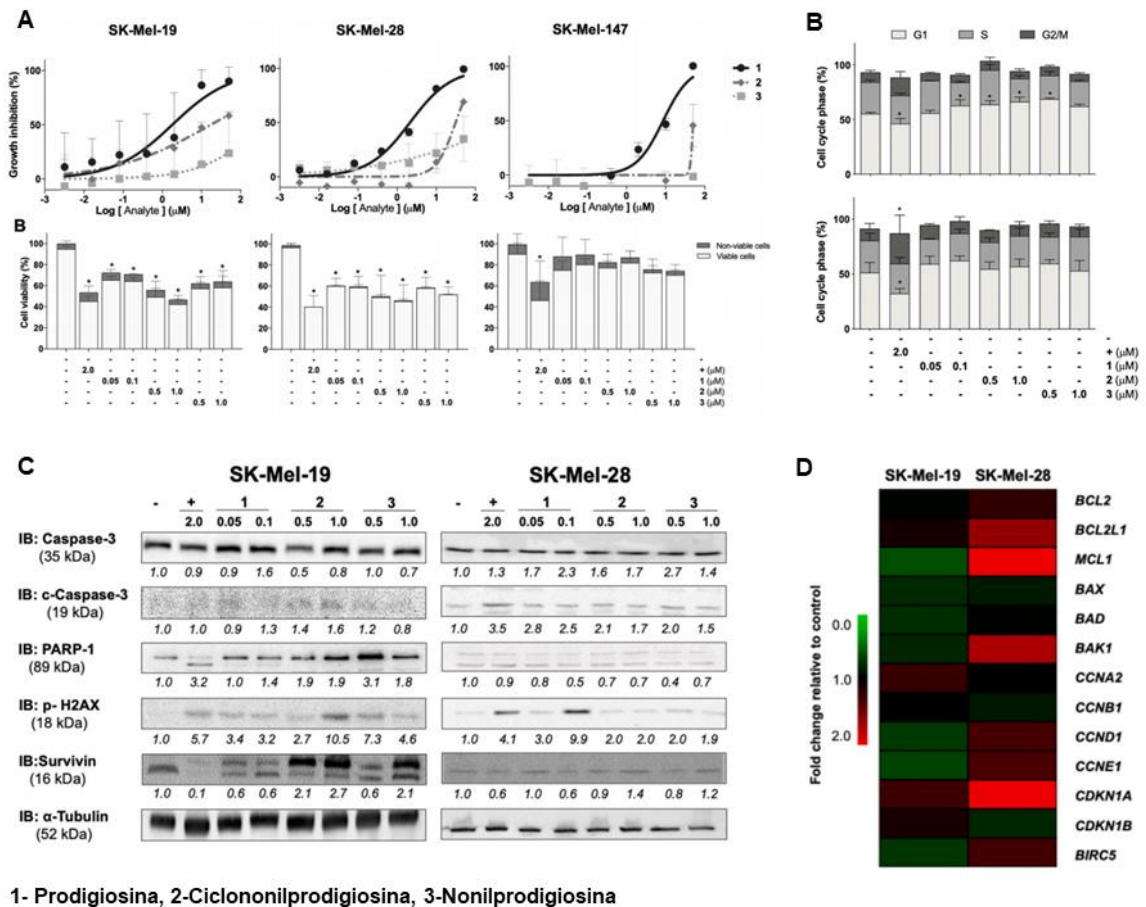


Figura 5 Resultados obtidos com a prodigiosina em linhagens de melanoma. Substâncias- 1: Prodigiosina, 2:Ciclononilprodigiosina, 3:Nonilprodigiosina, +: controle positivo com doxorrubicina. A:

Curva dose resposta de 72h e viabilidade de 24h nas linhagens de melanoma tratadas com as prodigininas. B: Histograma com as fases do ciclo celular nas linhagens SkMel-19 e SkMel-28 tratadas com as prodigininas. C: imagem representativa dos western blots de 24h de tratamento. D: Mapa de calor da qPCR após tratamento de 24h com prodiginina 0,1 μ M, em vermelho estão os genes regulados para cima (Adaptado de: Branco *et al.*, 2020).

O fármaco obatoclax também faz parte da família das prodigininas, sendo a única substância dessa família em ensaios clínicos. O obatoclax é uma substância sintética desenvolvida pela GemniX Pharmaceuticals. Essa molécula tem sido testada no tratamento de leucemia mielóide aguda, mielofibrose, linfoma de Hodgkin e tumores sólidos, devido à sua atividade pró-apoptótica por antagonismo seletivo da ligação das proteínas da família BCL2 a BH3, causando a inibição dessas proteínas BCL2 antiapoptóticas e consequente apoptose dependente de BAX/BAK (Goard & Schimmer, 2013). Existem, ainda, evidências de citotoxicidade do obatoclax independente do BAX e BAK por indução de autofagia (Koehler *et al.*, 2015). O obatoclax também mostrou a capacidade de retardar a progressão do ciclo celular da fase G1 e diminuir os níveis de ciclina D1 na linha celular colorretal humana HT-29 (Or *et al.*, 2017). Estudos recentes desse mesmo grupo mostraram novos possíveis mecanismos pró-apoptóticos do obatoclax através da regulação negativa da survivina como consequência da ação desse fármaco como um antagonista da sinalização WNT/ β -catenina no câncer colorretal (Or *et al.*, 2020). Em outro estudo também com células de carcinoma colorretal foi demonstrado que o obatoclax inibiu a migração e a invasão em doses subletais. Além desses mecanismos, foi relatado que o obatoclax bloqueia o fluxo autofágico, induzindo à alcalinização e desestabilização de lisossomos (Champa *et al.*, 2016).

Estudos têm mostrado o uso de obatoclax em combinação com outros fármacos pode ajudar a superar a resistência a estes. Em ensaios com células de tireóide resistentes ao vemurafenibe, o tratamento com obatoclax transpôs essa resistência e suprimiu o crescimento de células tireoidianas diferenciadas tanto em modelos *in vitro*, como *in vivo* (Wei *et al.*, 2017). O obatoclax também melhorou a resposta à quimioterapia com cisplatina, promovendo a apoptose, aumentando significativamente a eficácia da cisplatina em células tumorais de bexiga (Steele *et al.*, 2019). A resistência ao paclitaxel também foi superada nas células uroteliais quando o paclitaxel foi combinado com obatoclax, levando à indução de apoptose (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2018).

O obatoclax tem sido usado como único agente ou em combinação com diferentes agentes quimioterápicos para o tratamento de um subconjunto diferente de tumores, incluindo leucemia, câncer de pulmão, melanoma e linfoma. Do total de 20 ensaios clínicos relatados até o momento (tabela 1), a maioria deles atingiu a fase I ou II. Existe um estudo clínico de fase 3 descrito, avaliando a combinação de obatoclax com carboplatina e etoposídeo no câncer de pulmão de pequenas células.

Tabela 1. Ensaios clínicos com resultados publicados com Obatoclax (GX15-070) registrados em: www.clinicaltrials.gov

Tipo de Câncer	Intervenção	Principais resultados	Status	Patrocinador/ Colaborador	Referência	Título oficial
Leucemia Mielóide aguda	Mesilato de obatoclax	Resposta completa não foi alcançada em nenhum paciente. Os eventos adversos neurológicos e psiquiátricos foram os mais comuns e geralmente transitórios e reversíveis.	Fase 2	Teva Pharmaceutical Industries (Gemin X)	Schimmer et al, 2014 NCT00684918	Um estudo multicêntrico, aberto, de 2 estágios, de Fase II do mesilato de obatoclax de agente único administrado por três dias consecutivos a cada 2 semanas para pacientes idosos com leucemia mielóide aguda (LMA) não tratada previamente
Leucemia linfocítica crônica	Obatoclax em vários esquemas de doses e tempo em pacientes com pré-tratamento	Demonstrou atividade biológica, mas modesta atividade como agente único em pacientes pré-tratados com LLC avançada. As reações limitantes da dose foram neurológicas (sonolência, euforia, ataxia).	Fase 1/2	Gemin X	O'Brien et al, 2009 NCT00600964	Um estudo multicêntrico, aberto, de fase I / II de agente único GX15-070MS administrado a cada 2 a 3 semanas para pacientes com leucemia linfocítica crônica previamente tratada (LLC)
Câncer de pulmão de pequenas células	Obatoclax com carboplatina / etoposídeo	Obatoclax foi bem tolerado quando adicionado à carboplatina / etoposídeo no tratamento de primeira linha de ES-SCLC, mas não conseguiu melhorar significativamente as taxas de resposta geral, sobrevida livre de progressão ou sobrevida geral (resultado). A sonolência e a euforia foram de grau 1/2, transitórias e não exigiram a descontinuação do tratamento.	Fase 1/2	Gemin X/Cephalon	Langer et al, 2014 NCT00682981	Um estudo de fase I seguido por um estudo randomizado de fase II de carboplatina e etoposídeo com ou sem obatoclax administrado a cada 3 semanas para pacientes com câncer de pulmão de pequenas células em estágio extenso (ES-SCLC)
Mastocitose Sistêmica	Mesilato de obatoclax	Estudo realizado com três participantes, não houve efeitos adversos graves, mas surgiram distúrbios gastrointestinais e fadiga.	Fase 2	M.D. Anderson Cancer Center/ Gemin X	NCT00918931	Avaliação do mesilato de Obatoclax como terapia para pacientes com mastocitose sistêmica
Linfoma de	Mesilato de obatoclax	Não houve resposta objetiva	Fase 2	Gemin X	NCT003598	Um estudo multicêntrico de fase II de rótulo

Hodking		observada. As toxicidades consideradas definitivas ou provavelmente relacionadas ao medicamento em estudo foram tontura, euforia e hipotensão, todas de grau 1.			92 Oki et al, 2012	aberto de agente único GX15-070 administrado como uma infusão de 24 horas a cada 2 semanas para pacientes com linfoma de Hodgkin recidivante ou refratário
Síndromes mielodisplásicas	Mesilato de obatoclax	A taxa de resposta foi de 8% (2 pacientes; melhora hematológica). A estabilização / resposta da doença foi mantida \geq 12 semanas em 50% (12 pacientes). Os eventos adversos (qualquer grau) incluíram humor eufórico (63%; 15 pacientes), náusea (38%; 9 pacientes) e diarreia (25%; 6 pacientes).	Fase 2	Gemin X	NCT00413114 Arellano et al, 2014	Um estudo de fase II do mesilato de Obatoclax (GX15-070MS) em pacientes com síndromes mielodisplásicas (SMD) não tratadas previamente com anemia e / ou trombocitopenia
Câncer de pulmão de células pequenas	Mesilato de Obatoclax com cloridrato de topotecano	O mesilato de obatoclax adicionado ao topotecano não excede a taxa de resposta histórica observada com o topotecano sozinho. Não houve respostas parciais ou completas. Os eventos adversos de grau 3 ou 4 mais comuns incluíram trombocitopenia (22%), anemia (11%), neutropenia (11%) e ataxia (11%).	Fase 1/2	National Cancer Institute (NCI)	NCT00521144 Paik et al, 2011	Estudo de Fase I / II de Mesilato de Obatoclax (GX15-070MS), um Antagonista de Bcl-2, além de Topotecano em Carcinoma de Pulmão de Pequenas Células Recidivantes
Mieloma Múltiplo Refratário	Mesilato de obatoclax com bortezomib	Foram observados eventos como neuropatia sensorial periférica, diminuição da hemoglobina e contagem de leucócitos.	Fase 1/2	National Cancer Institute (NCI)	NCT00719901	Um ensaio de fase I / II de mesilato de Obatoclax (GX15-070MS) em combinação com bortezomibe para o tratamento de mieloma múltiplo recidivante
Tumor Sólido Linfoma Leucemia	Mesilato de obatoclax com, cloridrato de dexrazoxano/cloridrato de doxorubicina / sulfato de vincristina	Metade das concentrações efetivas máximas (EC50s) foram inferiores a 176 nM. O mecanismo de morte envolve apoptose, necroptose e autofagia observada em experimentos	Fase 1	National Cancer Institute (NCI)	NCT00933985 Urtishak et al, 2013	Um estudo de fase I de Obatoclax (inibidor de moléculas pequenas da família BCL-2 antiapoptótica Pan), em combinação com vincristina / doxorubicina / dexrazoxano, em crianças com leucemia ou tumores sólidos

	lipossomal	em MLL-AF4 LLA e linhas celulares LML-R e MLL-G infantis primárias LLA				refratários / recidivantes
Mielofibrose	Mesilato de obatoclax	Nenhum paciente obteve resposta completa ou parcial. Os eventos adversos mais comuns incluíram ataxia de baixo grau e fadiga em 50% dos pacientes.	Fase 2	Gemin X	NCT00360035 Parikh et al, 2010	Um estudo de fase II multicêntrico, aberto, de agente único GX15-070MS administrado como uma infusão de 24 horas a cada 2 semanas para pacientes com mielofibrose com metaplasia mioelóide (MF)

1.3 Limitações das técnicas utilizadas

O estudo dos fenômenos envolvendo a metástase é complexo e o padrão é o modelo animal para se compreender todas as etapas do processo metastático, no entanto há diversas questões relacionadas à ética e ao desconforto animal, além disso, alguns estudos são realizados em animais com o sistema imune comprometido o que também limita a mimetização das interações normalmente presentes nos tumores. Neste cenário, os estudos *in vitro* podem ajudar a entender processos relacionados a metástases e fornecer valiosas informações sobre os mecanismos para a compreensão de processos como a migração e invasão.

As culturas em duas dimensões (2D) são uma forma conveniente, pois são uma forma rápida de se estudar determinados processos envolvidos na metástase, como adesão, migração, invasão e angiogênese, porém nestes experimentos há falta da estrutura e a complexidade celular dos tumores *in vivo*, pois estas células crescem sob condições simplificadas não compreendendo bem a realidade do microambiente tumoral, como formato, comunicação célula-célula, sinais mecânicos e bioquímicos, porém ainda são bastante utilizados devido sua simplicidade e baixo custo (Yamada & Cukierman, 2008). No entanto, vêm crescendo cada vez mais o uso de culturas em três dimensões (3D), e elas surgem como uma opção mais versátil do que a cultura em monocamada, apresentando-se mais dinâmicas para o estudo de diversos processos celulares e muitas vezes como uma substituição ao uso de animais, pois reduz as diferenças dos modelos *in vitro* para o *in vivo*.

Alguma das vantagens da cultura 3D em relação a 2D são que as células preservam seu formato natural podendo crescer em formatos agregados ou esferoides, tendo estes últimos camadas, o que para o estudo de tumores é de grande importância. A presença de camadas cria uma diferença na exposição dessas células ao meio de cultura e outras substâncias como fármacos que podem estar presentes. Há também maior diferenciação nessas células, bem como pode haver a junção de outros tipos celulares através da co-cultura e com isso há formação de estruturas mais complexas. Nessas culturas as junções celulares são preservadas, o que permite a comunicação célula-célula e célula-matriz. Essas diferenças estão correlacionadas com a ativação de vias de sinalização que tem um papel chave na progressão do câncer e metástase *in vivo* e resistência a fármacos (Pouliot *et al.*, 2013). Para a formação de uma cultura 3D podem ser utilizados meios

de suporte para formação dessas estruturas sendo hidrogéis e polímeros, como matrigel, matriz rica em laminina, géis de colágeno ou matrizes derivadas de fibroblastos. Os hidrogéis podem mimetizar a matriz extracelular e permitir a passagem de fatores solúveis como citocinas e fatores de crescimento (Jensen & Teng, 2020).

Na descoberta e ensaios pré-clínicos de novos fármacos para o câncer, as culturas 3D podem ajudar diminuindo o uso de animais, sendo mais fidedignas por utilizarem células humanas (Langhans, 2018). No campo do estudo da formação de metástases, os esferoides podem fornecer informações mais concretas deste fenômeno, foi observado que muitos tumores inclusive o melanoma, frequentemente migram não apenas como célula única, mas num conjunto de células, um grupo de 5 a mais de 100 células (Hegerfeldt *et al.*, 2002), essa migração em grupo não é bem visualizada pelos ensaios usuais em monocamada. Uma das desvantagens da cultura 3D é seu alto-custo e a dificuldade de interpretar e replicar alguns experimentos, mas hoje elas já representam uma nova fronteira nos estudos com células.

No presente trabalho, a atividade destas duas prodigininas, prodiginosina e obatoclax, foram avaliadas em células de melanoma, visando não só uma melhor compreensão dos seus mecanismos nesses modelos, mas também caracterizar seus efeitos nos processos envolvidos na metastização de células de melanoma, incluindo aquelas apresentando resistência ao vemurafenibe

2 OBJETIVOS

Caracterizar o efeito das prodigininas (prodigiosina e obatoclax) nas linhagens de melanoma SK-MEL-19 e SK-MEL-28 sensíveis e resistentes ao vemurafenibe (PLX4032).

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar o efeito citotóxico da prodigiosina e do obatoclax nas linhagens de melanoma sensíveis e resistentes ao vemurafenibe;
- Caracterizar o efeito da prodigiosina e obatoclax na inibição da migração e invasão nas linhagens de melanoma;
- Avaliar a expressão de genes anti e pró-apoptóticos da família BCL2 em pacientes de melanoma e em células SK-MEL-28 e SK-MEL-28R, buscando compreender o papel da apoptose na fisiopatologia e na resistência ao vemurafenibe;
- Caracterizar o efeito citotóxico do obatoclax sozinho ou em associação ao vemurafenibe frente às linhagens resistentes ao vemurafenibe.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto seguiu o desenho experimental descrito na figura 6. Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade das prodigininas nas células utilizando o ensaio do MTT e o ensaio clonogênico. A partir dos valores de IC_{50} observados, determinou-se as concentrações para utilização nos ensaios de migração e invasão, bem como na avaliação da expressão de proteínas envolvidas nesses processos. Considerando a diferença de sensibilidade às prodigininas entre as células sensíveis e resistentes ao vemurafenibe, avaliamos a expressão de genes da família BCL2 em pacientes usando dados públicos e nas células SK-MEL-28 sensíveis e resistentes ao vemurafenibe. Por fim, avaliou-se o sinergismo entre o obatoclax e o vemurafenibe nas linhagens sensíveis e resistentes, tanto para a citotoxicidade, incluindo o estudo das vias de indução de morte celular, quanto para o efeito na migração e invasão, e vias envolvidas.

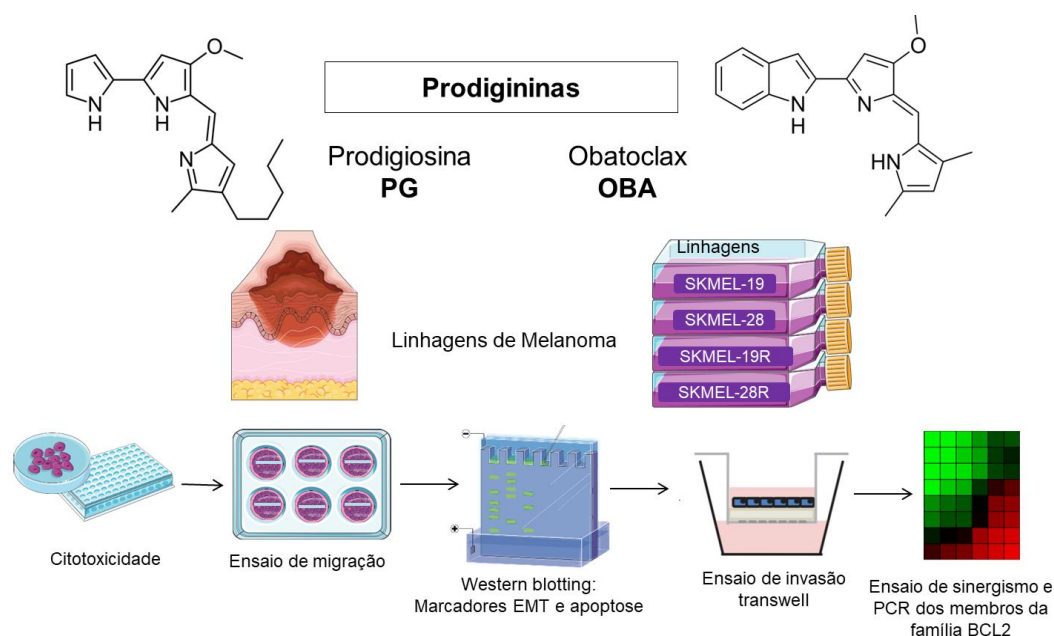


Figura 6 Representação esquemática simplificada das metodologias utilizadas no projeto. (Imagens: Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>)

3.1 Obtenção das substâncias

A prodigiosina utilizada em parte desse trabalho foi isolada como descrito no trabalho de Arthaud *et al.*, (2012). Devido à alta demanda de prodigiosina para os experimentos, essa substância foi também obtida pela Cayman Chemical Company. O obatoclax (GX15-070) foi obtido pela MCE MedChemExpress. O vemurafenibe

(PLX4032) foi obtido pela Selleck Chemicals e a Doxorubicina da Sigma-Aldrich. As substâncias foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) da Synth.

3.2 Cultura de células

As células de melanoma foram crescidas no meio *Dulbecco's modified Eagle's medium F-12* (DMEM/F-12) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 U/ml de penicilina e 50 g/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em estufas de 5% de CO₂ a 37°C. As linhagens celulares utilizadas incluem: SKMEL-19 (mutação BRAF^{V600E}), SKMEL-28 (mutação BRAF^{V600E}, EGFR^{P753S}) e as linhagens resistentes ao vemurafenibe SKMEL-19R e SKMEL-28R estabelecidas pela Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Ao meio de cultura da linhagem resistente foi acrescido vemurafenibe (PLX4032) na concentração de 1,5 µM para SkMel-19 resistente e 3 µM para SkMel-28 resistente. As linhagens utilizadas no laboratório foram autenticadas por análise e comparação de marcadores STR (Short Tandem Repeats) em ensaios realizados pelo laboratório LIM-FMUSP.

3.3 Avaliação da citotoxicidade

a. Ensaio do MTT

Para o ensaio de citotoxicidade foi utilizado o método colorimétrico do MTT. Esse ensaio consiste em quantificar indiretamente as células viáveis baseada na metabolização do sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Sigma®). Esse sal apresenta coloração amarelada e após sofrer redução ao sal formazan pelos metabólitos NADH₂, NADPH e succinato nas mitocôndrias, este adquire coloração púrpura.

As células foram semeadas na concentração de 5x10⁴ células/mL em uma placa de 96 poços, 200 µL por poço, e incubadas a 37°C em incubadora a 5% de CO₂, durante 24 h. Decorrido esse período, a prodigiosina ou obatoclax foram adicionados na concentração inicial de 50 µM e foi feita diluição seriada de cinco vezes até 0,000032 µM. O experimento foi incubado por 24h e 72h, após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e foi adicionado o corante MTT (0,5mg/mL, Sigma ®) diluído em meio DMEM/F12 e as células foram novamente

incubadas por 3 h. Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionaram-se 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma $\text{\textcircled{R}}$) para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas durante 45 segundos e a absorbância correspondente a cada amostra será medida em espectrofotômetro de placas a 560 nm. A absorbância obtida das células controle, tratadas com o veículo (DMSO), foi considerada como 100% de viabilidade celular.

Os resultados foram analisados de acordo com média e erro-padrão obtidos. O gráfico foi construído com os valores normalizados em relação ao controle versus a concentração com intuito de se obter a concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (IC_{50}) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95) realizado a partir da regressão não linear com auxílio do programa GraphPad Prism.

b. Ensaio clonogênico

Este ensaio detecta se uma única célula mantém sua capacidade reprodutiva após um tratamento e é capaz de formar colônia. No câncer, a perda dessa capacidade ilimitada de multiplicação é desejada para a prevenção de recorrências. As células foram primeiramente tratadas por 24h com as doses listadas abaixo, e depois re-semeadas numa concentração de 1×10^3 células/por poço em dois mL em placas de 35 mm com meio livre de droga. As placas foram observadas sob o microscópio diariamente e após uma semana, essas placas foram coradas com a mistura de Cristal violeta 0,5% e etanol. As placas foram fotografadas com o equipamento G-BOX Chemi XX6/XX9 e quantificadas pelo plugin Colony Area do ImageJ. Com intuito de padronizar as doses para melhor avaliar a resposta, selecionamos as seguintes doses de PG (tabela 2), estas doses foram selecionadas tendo em vista que os valores de citotoxicidade em 24h variaram de 0,2 a 2,3 μ M para as linhagens sensíveis. As doses escolhidas do obatoclax basearam-se na IC_{50} e metade da IC_{50} destas linhagens, para a linhagem SK-MEL-28R também utilizou-se as doses testadas nas outras linhagens para uma melhor comparação.

Tabela 2 Doses de obatoclax e prodigiosina utilizadas no ensaio clonogênico

	Obatoclax		Prodigiosina	
SK-MEL-19	25 nM	50 nM	100 nM	500 nM
SK-MEL-28	25 nM	50 nM	100 nM	500 nM
SK-MEL-19 R	25 nM	50 nM	100 nM	500 nM
SK-MEL-28 R	0.75 μ M	1.5 μ M	100 nM	500 nM

c. Ensaio de viabilidade por azul de Trypan

Para acessar a viabilidade dessas células 5×10^4 cels./ml foram semeadas em 1 mL na placa de 24 poços, depois de 24h após adesão, as culturas foram tratadas com as mesmas doses do ensaio clonogênico (tabela 2). Após 24h de incubação, as células viáveis e inviáveis foram avaliadas na câmara de Neubauer usando o corante azul de Trypan (0,4% em PBS).

3.4 Avaliação da capacidade de Migração

a. Ensaio de Ferida

O ensaio da ferida é um método de se estudar *in vitro* a migração celular ao mimetizar uma condição similar à cicatrização de feridas *in vivo*. As células foram semeadas em placas de 24 poços com 1 mL de meio de cultura, no dia seguinte com uma ponteira de 10 μ L fez-se um risco no centro do poço cujas células já formavam uma monocamada confluyente, neste momento o meio de cultura usado é substituído por um meio com 1% de soro fetal bovino. As células foram tratadas com a prodigiosina na concentração de 0,05 e 0,1 μ M (baseada nas IC₅₀ de 72h das linhagens de melanoma, tabela 3). Para o obatoclax, foram utilizadas as doses: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 e 7.0 nM (baseadas na IC₅₀ e ½ da IC₅₀ de 72h, tabela 3). De tempos em tempos, os poços foram fotografados no microscópio Evos e as imagens do tamanho da ferida quantificadas pelo programa ImageJ.

Tabela 3 Doses de obatoclax e prodigiosina utilizadas no ensaio de ferida

Linhagem	SkMel-19	SkMel-19R	SkMel-28	SkMel-28R
PG (μ M)	0,05; 0,1	0,05; 0,1	0,05; 0,1	0,05; 0,1
Oba (nM)	0,5; 1,0; 2,0	0,5; 1,0; 2,0	1,0; 2,0; 3,0	1,0; 2,0; 3,0; 7,0

3.5 Avaliação da capacidade de Invasão

a. Ensaio de Invasão *Transwell*

O ensaio de invasão transwell avalia a capacidade de invasão e quimiotaxia das células através da matriz-extracelular, simulada pelo matrigel. Para o ensaio de invasão *transwell* foi utilizado o matrigel (BD Biosciences) para simular a matriz extracelular, para isso o matrigel foi descongelado e liquefeito em gelo, e então 50 µL de matrigel foram adicionados ao inserto *transwell* de 8 µm (NEST) e solidificado na incubadora a 37°C por 1 hora para formar uma fina camada de gel. Depois uma solução de 200 µL de células a $2,5 \times 10^5$ células/mL com meio livre de soro foi semeada sobre revestimento de matrigel do inserto *transwell* incubando-se por 10 minutos a 37 °C e 5% CO₂ para que as células possam aderir. Esse inserto foi colocado sobre o poço com 500 µL de meio com 10% de soro fetal bovino de modo com que estes fiquem em contato. O tratamento com PG 50 nM e OBA 1 nM foi adicionado na tanto na câmara superior quanto na inferior. Após 24h o meio foi removido e com um cotonete as células que não migraram da parte superior da membrana sem danificá-la. Depois o inserto foi colocado num poço para fixação com etanol 70% por 10 minutos, este foi deixado secar por 10 a 15 minutos, e depois corado com cristal violeta e lavado. Depois o inserto foi observado em microscópio invertido e a quantidade de células analisada pelo programa ImageJ com o *plugin Cell counter notice*.

3.6. Caracterização da expressão dos genes da família BCL2 em pacientes de melanoma

Os dados de expressão de mRNA de 19 genes da família BCL2 em amostras de nevo adquirido comum (n = 27) e melanoma maligno primário (n = 51) foram gerados pela plataforma Illumina HiSeq 2500, depositada por Badal et al. (2017) (acesso GEO: GSE98394) e obtido da Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Os conjuntos de dados foram cruzados usando números de identificação específicos para cada amostra. Para comparação entre os grupos, o teste Mann-Whitney foi utilizado. Para análise de correção o software RStudio (versão 1.4.1717, RStudio, PBC) e o plugin Corrplot foram utilizados. A análise de correção foi realizada pelo teste de Spearman.

3.7. Caracterização da expressão dos genes da família BCL2 nas células SK-Mel 28 sensíveis e resistentes ao Vemurafenibe

Para se analisar a expressão gênica as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R foram semeadas em placas de 60 mm a uma confluência de 80% e a amostra coletada com 1 mL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e o RNA total foi extraído conforme o protocolo sugerido pelo fabricante, seguindo uma etapa de adição de clorofórmio, depois precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Após secagem a temperatura ambiente, o RNA foi ressuspensão com água RNase-free e a concentração e integridade das amostras obtidas a partir de medições 260/280 no aparelho NanoDrop. Depois foi realizada síntese do cDNA de 1 µg de RNA utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (ThermoFisher Scientific). A PCR quantitativa foi realizada no ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com um volume de reação de 12 µL com os primers específicos (descritos na tabela 4 abaixo). HPRT1 e ACTB foram usados como genes de referência. A expressão relativa do gene foi calculada usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$. Três amostras independentes foram coletadas para cada linhagem celular e a expressão de umas das amostras da linhagem SK-MEL-28 foi dada como 1 (amostra calibradora) e a expressão nas demais amostras foi comparada a esta. O gráfico de calor (heatmap) foi feito utilizando o *multiple experiment viewer* (MeV) 4.9.0 software.

Tabela 4 Sequência de primers e concentrações utilizadas para a PCR quantitativa

Gene ¹	Sequência	Concentração
<i>BCL2</i>	FW: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA RV: ACAGTTCCACAAAGGCATCC	300 nM
<i>BCL2L1</i>	FW: CTTGGATGGCCACTTACCTGAA RV: GCTGCTGCATTGTTCCATA	300 nM
<i>BCL2L2</i>	FW: GCGGAGTTCACAGCTCTATAC RV: AAAAGGCCCTACAGTTACCA	300 nM
<i>MCL1</i>	FW: GTAATAACACCAGTACGGACGG RV: TCCCGAAGGTACCGAGAGAT	300 nM
<i>BCL2A1</i>	FW: TTACAGGCTGGCTCAGGACT RV: AGCACTCTGGACGTTTTGCT	300 nM
<i>BCL2L10</i>	FW: GCCTTCATTTATCTCTGGACAC RV: AAGGTGCTTTCCCTCAGTTC	300 nM
<i>BAX</i>	FW: GAGCTGCAGAGGATGATTGC RV: CAGCTGCCACTCGGAAAA	300 nM
<i>BAK1</i>	FW: TGAGTACTTCACCAAGATTGCCA	300 nM

<i>BOK</i>	RV: AGTCAGGCCATGCTGGTAGAC FW: GCGATGAGCTGGAGATGATCC	300 nM
<i>BID</i>	RV: CTGCAGAGAAGATGTGGCCA FW: ATGGACCGTAGCATCCCTCC	300 nM
<i>BCL2L11</i>	RV: GTAGGTGCGTAGGTTCTGGT FW: ATGTCTGACTCTGACTCTCG	300 nM
<i>BBC3</i>	RV: CCTTGTGGCTCTGTCTGTAG FW: GACCTCAACGCACAGTACGAG	300 nM
<i>PMAIP1</i>	RV: AGGAGTCCCATGATGAGATTGT FW: CGCGCAAGAACGCTCAACC	300 nM
<i>BIK</i>	RV: CACACTCGACTTCCAGCTCTGCT FW: TCTGAAGAGGACCTGGACCCT	300 nM
<i>BAD</i>	RV: GGCTCACGTCCATCTCGTC FW: CACCAGCAGGAGCAGCCAAC	300 nM
<i>BMF</i>	RV: CGACTCCGGATCTCCACAGC FW: CCTCCTTCCCAATCGAGTCTG	300 nM
<i>BNIP3</i>	RV: TCCATCTCTCCTGGGTGACT FW: ATATGGGATTGGTCAAGTCGG	300 nM
<i>BNIP3L</i>	RV: CGCTCGTGTTCCCTCATGCT FW: ACACCAGCAGGGACCATAGC	300 nM
<i>BECN1</i>	RV: TTTCTTCAAAGCCTCGACTTCC FW: TCTGAAGAGGACCTGGACCCT	300 nM
<i>HPRT1</i>	RV: GGCTCACGTCCATCTCGTC FW: GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA	150 nM
<i>ACTB</i>	RV: TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT FW: AGGCCAACC GCGAGAAG	150 nM
	RV: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	

¹Os genes são relatados de acordo com o Comitê de Nomenclatura do Gene da Organização do Genoma Humano (HUGO) (HGNC).
Abreviações: FW- para a frente; RV- reverso.

3.8. Tratamento combinado do obatoclax e vemurafenibe

Escolheu-se o obatoclax para avaliação da possível ação sinérgica com o vemurafenibe. Optou-se por esta substância, devido sua maior potência comparada a prodigiosina, observada nas linhagens testadas pelo ensaio de MTT e ainda por já se encontrar em ensaios clínicos de fase II. Para o ensaio, as células foram tratadas com concentrações graduadas de vemurafenibe (PLX4032) e obatoclax (OBA) separadamente e em combinação por 72 horas e a citotoxicidade foi avaliada por MTT, como anteriormente descrito. Os dados foram ilustrados utilizando o software de visualização de múltiplos experimentos (MeV) 4.9.0 (<http://www.tm4.org/mev/>). Para as linhagens SkMel-19 e SkMel-19R foram utilizadas as doses PLX (0.008, 0.016, 0.08, 0.4, 2 e 10 μ M) e OBA (0.0016, 0.008, 0.2, 1.0, 5 e 10 nM), para a linhagem SkMel-28 foram utilizou-se PLX (0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005 e 0.001 μ M) e OBA (5.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.2, 0.05 e 0.02 nM), enquanto que para

linhagem SKMel-28R PLX (20, 15, 10, 5, 3, 2, 1 e 0.5 μ M) e OBA (14, 7, 5, 4, 2, 1, 0.5 e 0.25 nM).

3.9. Detecção de proteínas por *western blotting*

As proteínas após o tratamento com as substâncias foram detectadas pelo western blotting. As células foram lavadas duas vezes com PBS e em seguida foi adicionado tampão de extração na presença de inibidores de proteases e inibidores de fosfatase (EDTA, solução de Tris pH 7,5, pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio, ortovanadato de sódio, triton e PMSF). A separação foi feita em gel de poliacrilamida 10%. Em cada poço foi adicionado 50 μ g do extrato proteico total de cada tratamento. A corrida foi feita a 70V por 30 min durante o gel de empilhamento e a 100V por 2 horas durante o gel de separação. A transferência para membrana de nitrocelulose foi realizada a 4°C com tensão de 120V durante 2h com tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8.3, 20% metanol). As membranas foram incubadas com anticorpos da tabela 5, como controle de carregamento o anticorpo contra proteína GAPDH ou α -tubulina. Após incubação com anticorpo secundário foram reveladas com kit ECL (Chemiluminescent Peroxidase Substrate-1) no equipamento G:BOX(Chemi XRQ (Syngene, Cambridge, UK).

Tabela 5 Anticorpos utilizados

Anticorpos (cell signalig)	Diluição
GAPDH (D16H11)	1:2000
α -Tubulin (DM1A)	1:2000
E-Cadherin (24E10)	1:1000
N-Cadherin (13A9)	1:1000
Vimentin (D21H3)	1:1000
MMP-2 (D4M2N)	1:1000
Non-P-(active) beta-catenin (D2U8Y)	1:1000
PARP (46D11)	1:1000
PARP-clivada (D64E10)	1:1000
Caspase-3 (D3R6Y)	1:1000
Caspase-3 clivada (5A1E)	1:0000
Fosfo-histona H2A.X (20E3)	1:1000

3.10. Análise estatística

Os dados foram avaliados utilizando o método estatístico de Análise de Variância One-way (ANOVA one-way) ou teste-t e o teste posterior de Dunnett ou Newman-Keuls do programa GraphPad Prism 5.0. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade das prodigininas, prodigiosina e obatoclax, em células de melanoma sensíveis e resistentes ao vemurafenibe

A citotoxicidade das prodigininas foi avaliada inicialmente através do ensaio do MTT com dois tempos de incubação, 24 e 72 horas (figura 7). A tabela 6 mostra os valores de IC_{50} destas substâncias. Após 72h de incubação, os valores de IC_{50} variaram de 1 nM a 14 nM para o obatoclax, e de 40 nM a 14400 nM para a prodigiosina, indicando, portanto, uma potência, 80 a 230 vezes maior para o obatoclax. Para ambas as substâncias, a linhagem SK-MEL-19 foi a linhagem mais sensível, seguido das linhagens SK-MEL-28, SK-MEL-19R e por fim, SK-MEL-28R. Na linhagem menos sensível, o valor da IC_{50} foi catorze vezes maior quando comparada ao seu par sensível ao PLX4032 para o obatoclax, e 360 vezes maior para a prodigiosina.

A IC_{50} de 24h foi consistentemente maior do que a de 72 horas para ambas as substâncias em todas as linhagens avaliadas, mostrando que a atividade aumenta com o tempo. O controle positivo doxorrubicina tem IC_{50} semelhante entre as linhagens, o que evidencia que o mecanismo de resistência das linhagens resistentes é seletivo para o vemurafenibe visto que elas mantiveram a sensibilidade a doxorrubicina (tabela 7).

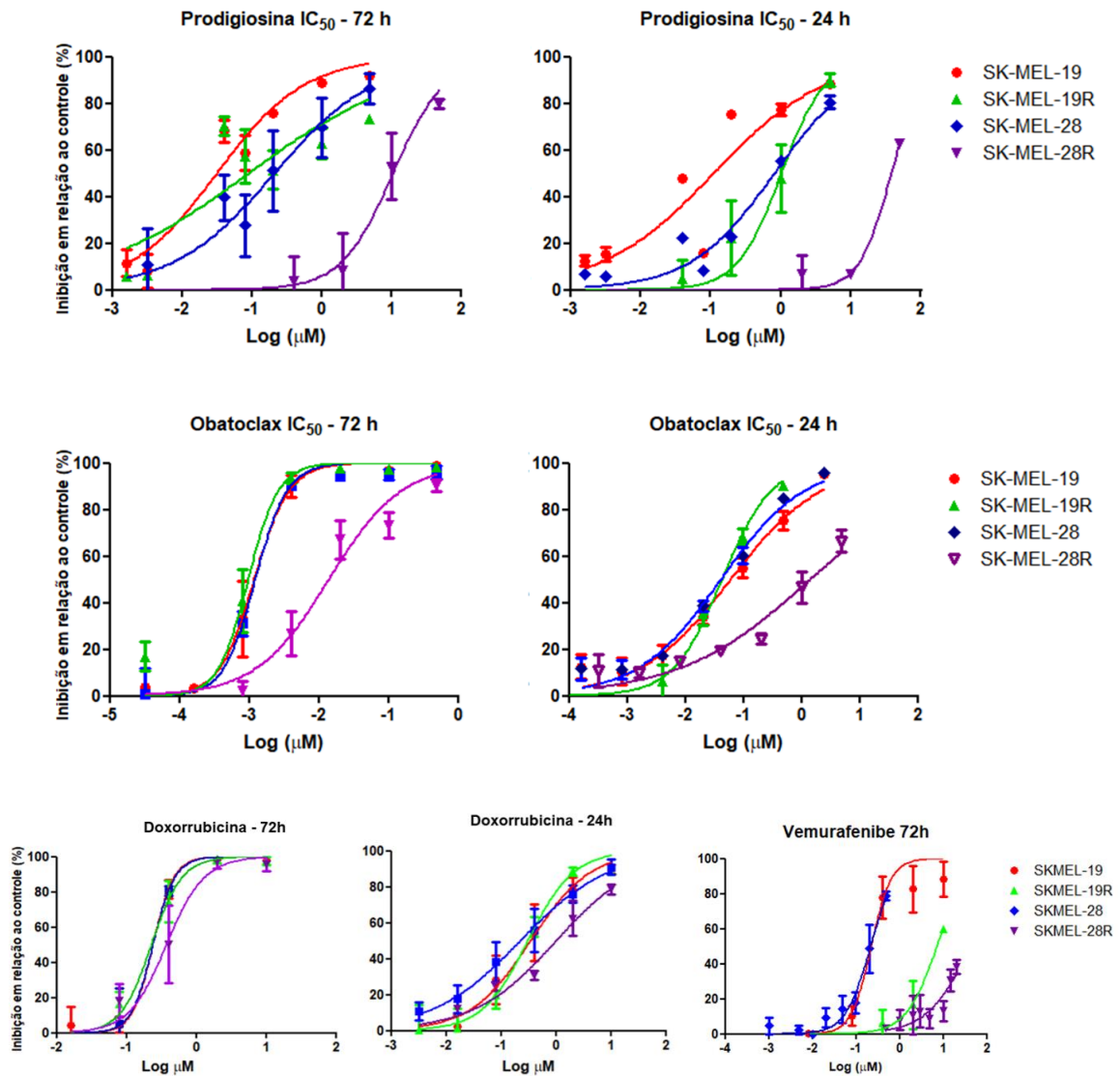


Figura 7 Curva dose resposta do ensaio de MTT. Tratamento com prodigiosina e obatoclox em 24 e 72h de incubação nas quatro linhagens de melanoma e curva da doxorubicina e vemurafenibe, usada como controle positivo. Os valores são expressos em termos da média e erro padrão da média (média \pm SEM). As IC_{50} s (tabela 6) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram obtidos a partir de regressão não linear de ao menos três experimentos independentes em duplicata.

Tabela 6. Citotoxicidade do obatoclax e da prodigiosina por ensaio de MTT em linhagens celulares de melanoma sensíveis e resistentes ao vemurafenibe em 24 e 72h de incubação.

Linhagens/ Tempo de exposição	Obatoclax		Prodigiosina*	
	IC ₅₀ (nM) 72 h	IC ₅₀ (nM) 24 h	IC ₅₀ (nM) 72 h	IC ₅₀ (nM) 24 h
SK-MEL-19	1 (0,9 – 1,5)	60 (4 - 80)	40 (10 - 120)	240 (160 - 710)
SK-MEL-19 Resistente	1 (0,7 – 1,3)	40 (3 - 70)	440 (210 - 850)	1160 (430 - 3700)
SK-MEL-28	1,2 (0,9 – 1,6)	40 (32 - 53)	200 (140 - 400)	2320 (1820 - 2960)
SK-MEL-28 Resistente	14 (8 - 23)	1400 (770 - 2500)	14400 (5390 - 38600)	35500 (N.D.)

Tabela 7. Citotoxicidade da doxorubicina e do vemurafenibe por ensaio de MTT em linhagens celulares de melanoma sensíveis e resistentes ao vemurafenibe.

Linhagens/ Tempo de exposição	Doxorrubicina		Vemurafenibe
	IC ₅₀ (nM) 72 h	IC ₅₀ (nM) 24 h	IC ₅₀ (nM) 72 h
SK-MEL-19	240 (160 - 360)	340 (170 – 670)	220 (130 - 370)
SK-MEL-19 Resistente	230 (150 - 340)	310 (190 – 490)	7200 (4400 - 11800)
SK-MEL-28	240 (140 - 420)	220 (120 – 420)	220 (170 - 270)
SK-MEL-28 Resistente	370 (200 – 670)	1000 (530 – 1800)	>50000 (N.D.)

N.D. = não determinado

Em seguida, a citotoxicidade das substâncias foi avaliada pela técnica de exclusão do azul de Trypan após 24h de incubação (Figura 8). O obatoclax foi testado em concentrações de 25 e 50 nM nas quatro linhagens, reduzindo significativamente o número de células viáveis em todas as linhagens, sem causar um aumento de células não viáveis. De um modo geral, as células sensíveis ao vemurafenibe também foram mais sensíveis ao obatoclax. Com a prodigiosina

testada nas doses de 50 e 100 nM também há redução das células viáveis, sem aumento das não viáveis.

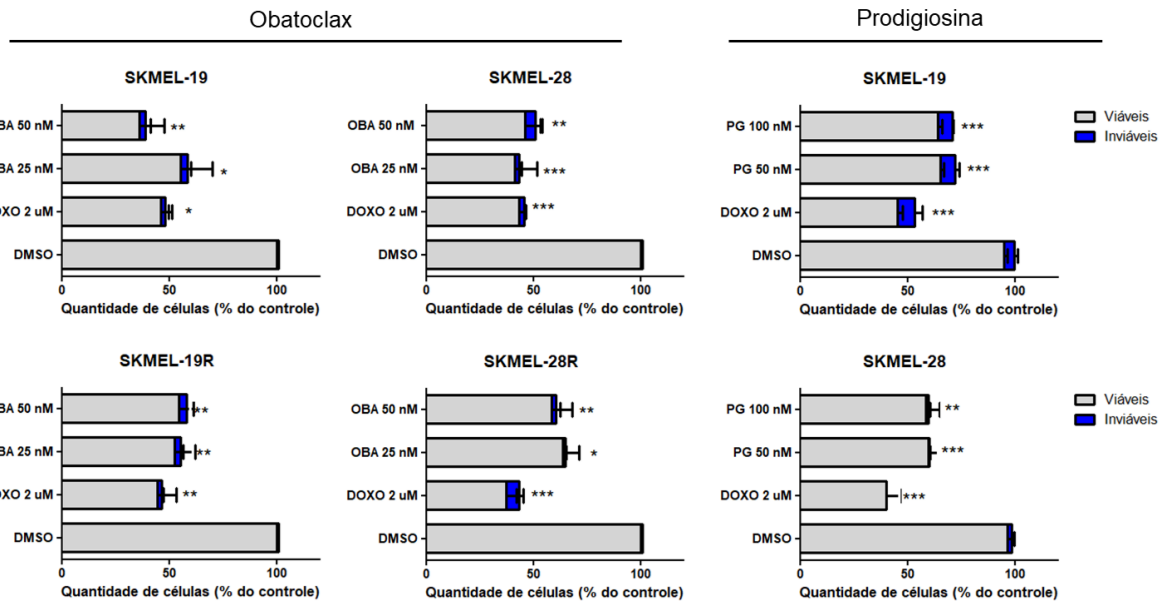


Figura 8 Ensaio de exclusão por azul de tripan. Após 24h de tratamento com o obatoclox e a prodigiosina, DMSO como controle negativo e doxorubicina como controle positivo. Análise de três experimentos independentes com ANOVA seguido dos pós-teste de Dunnet da quantidade de células normalizado pelo controle negativo. Os valores são expressos em termos da média e erro padrão da média (média \pm SEM). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Em seguida, a citotoxicidade das substâncias foi avaliada no ensaio de colônia que mostra a redução da capacidade clonogênica das células por um período maior após o tratamento. Neste ensaio, as células foram tratadas por 24h com concentrações equivalentes a IC_{50} , e então, lavadas e ressemeadas num meio livre de fármaco, sendo acompanhadas por um período de 7 dias. As duas substâncias reduziram a capacidade de formação de colônias nas linhagens de melanoma (Figuras 9 a 11).

Foi observada uma diminuição do número, área e intensidade de colônias tratadas com obatoclox, indicando que as doses de $\frac{1}{2} IC_{50}$ e IC_{50} de 24h mantém um efeito sobre estas células mesmo após a substância ser retirada do meio, evidenciando seu efeito em longo prazo (Figura 9). Para a linhagem SK-MEL-28R que tem uma IC_{50} maior, foram testadas também as doses de 25 e 50 nM (utilizadas nas demais linhagens) para uma melhor comparação, mesmo sendo uma dose bem inferior à sua IC_{50} , houve diminuição da capacidade clonogênica.

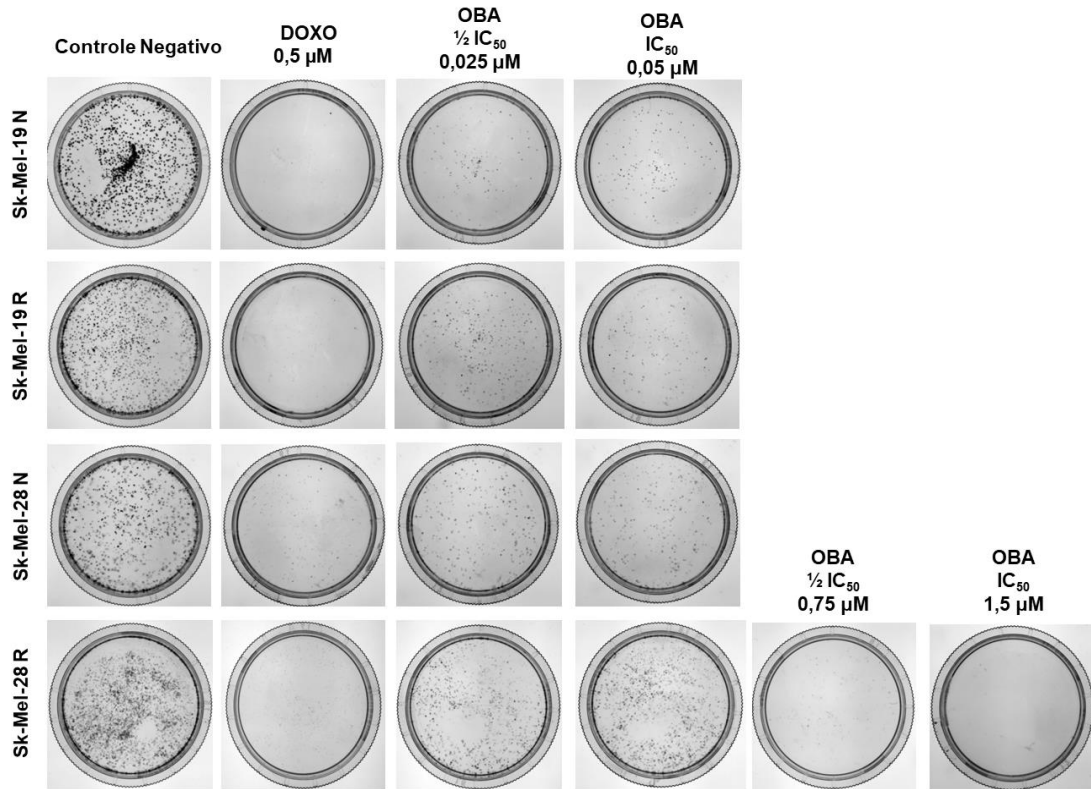


Figura 9 Ensaio clonogênico com obatoclax. Formação de colônias após tratamento de 24 horas de obatoclax. Células em meio livre de droga após sete dias (imagens representativas das colônias). Colônias coradas com cristal violeta.

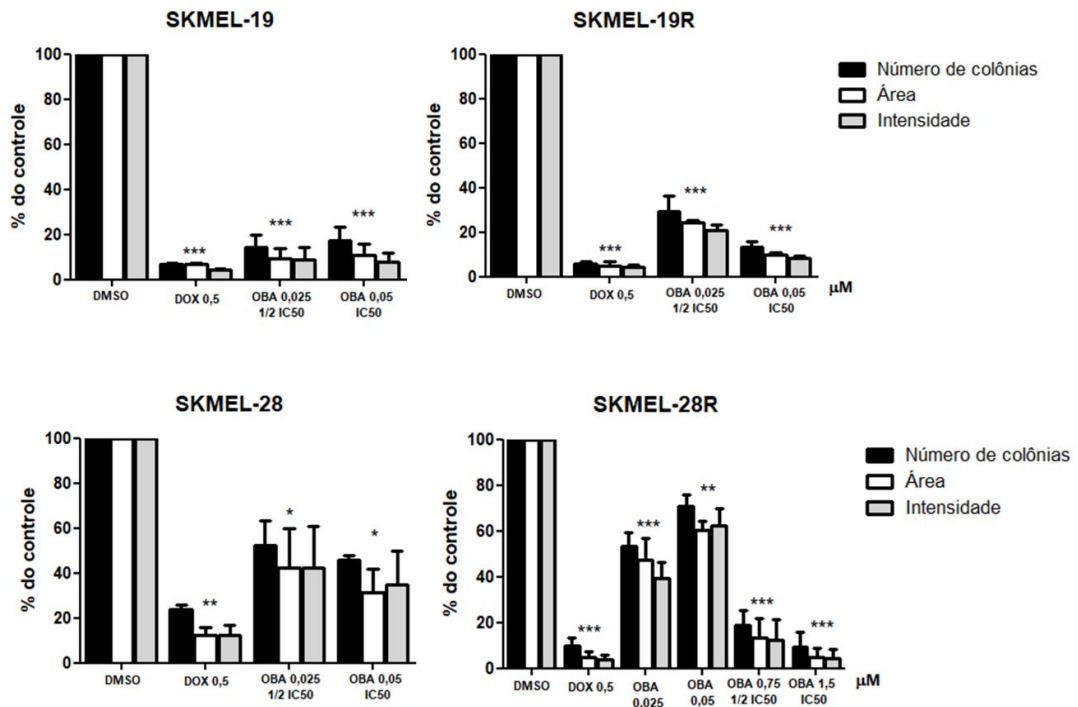
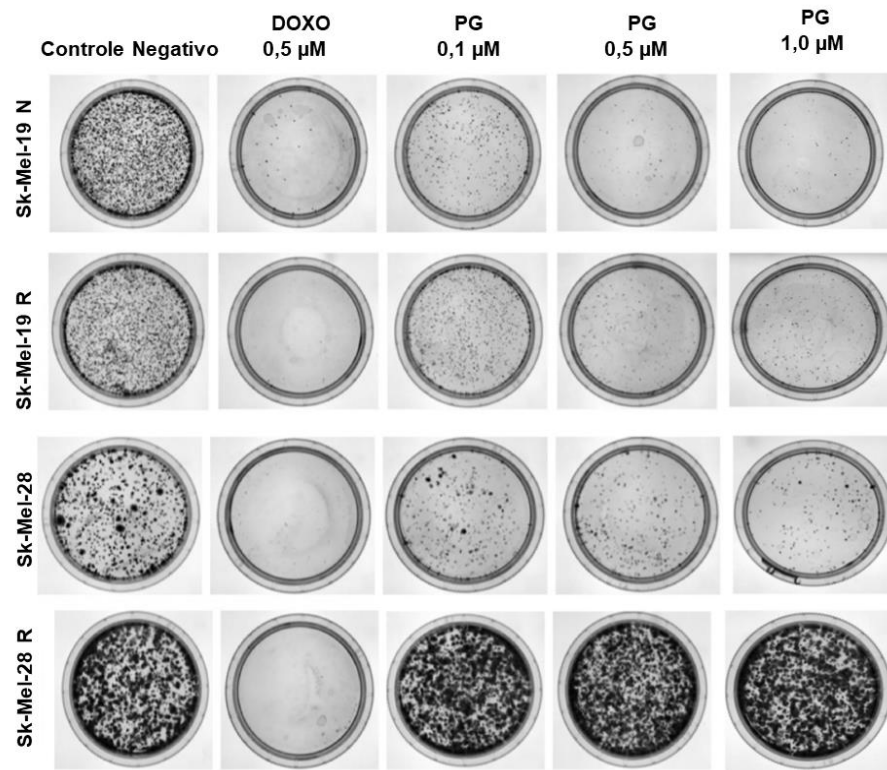


Figura 10 Quantificação do número de colônias, área e intensidade das colônias após tratamento com obatoclax de três experimentos independentes em duplicata. Os valores são expressos em

termos da média e erro padrão da média (média \pm SEM). Análise com ANOVA seguido dos pós-teste de Dunnet. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A prodigiosina foi testada nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1 μM , apresentando. Nas três linhagens mais sensíveis houve uma grande redução do número de colônias, enquanto na linhagem SK-MEL-28-R não houve uma diminuição do número de colônias. Há que se ressaltar que nesta linhagem, os valores de IC_{50} obtidos no MTT foram equivalentes a 35,5 μM e 14,4 μM para 24 e 72h de incubação, respectivamente, portanto bem superiores às concentrações testadas. Por outro lado, o obatoclax já se mostrou ativo na inibição da formação de colônias (25nM) mesmo em concentrações bem inferiores aos valores de IC_{50} (1,4 μM após 24h de tratamento).

A



B

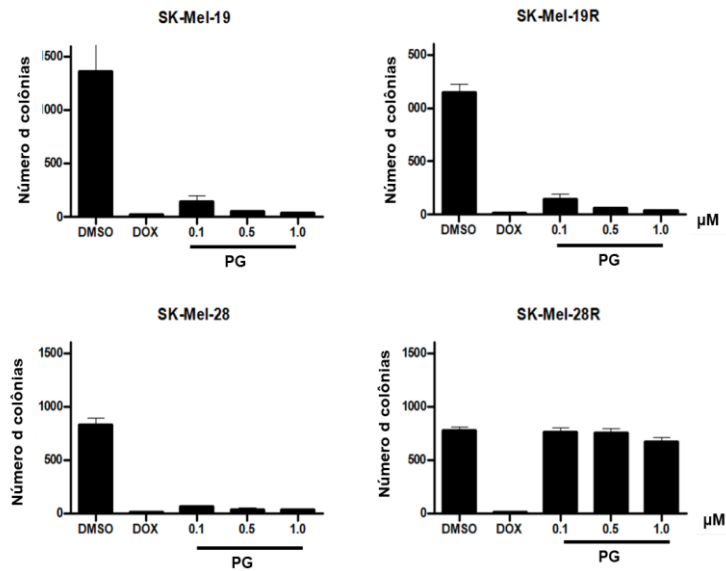


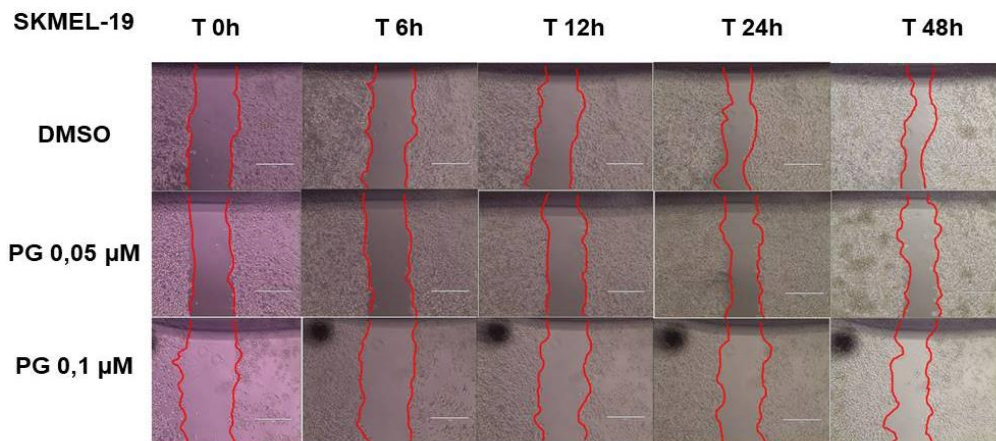
Figura 11 A: Ensaio clonogênico com prodigiosina. Capacidade clonal após tratamento de 24 horas com prodigiosina. Células em meio livre de droga após catorze dias. **B-** Quantificação do número de colônias. Os valores são expressos em termos da média e erro padrão da média (média \pm SEM). *Figuras gentilmente cedidas pela Dra. Paola Branco

4.2 Prodigiosina e obatoclox apresentam efeito sobre a migração celular nas linhagens de melanoma

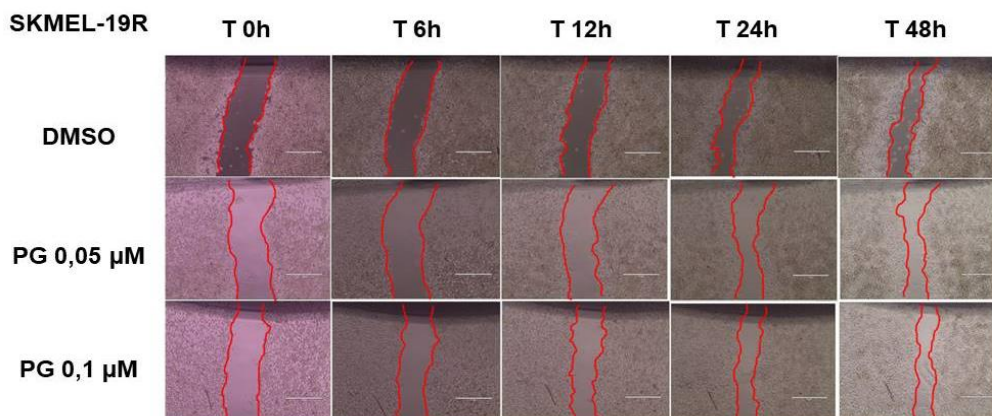
O ensaio de ferida foi utilizado para investigar o efeito das prodigininas na migração de células. As células foram incubadas com as substâncias durante todo o experimento. A quantificação das imagens foi feita comparando o tamanho das feridas no tempo zero com seu tamanho ao final do experimento.

A prodigiosina teve efeito moderado na migração de células, pois o tratamento não causou grande inibição no fechamento da ferida. Na linhagem SK-MEL-28 o poço controle teve sua ferida completamente fechada, enquanto nas outras linhagens a ferida não se fechou totalmente.

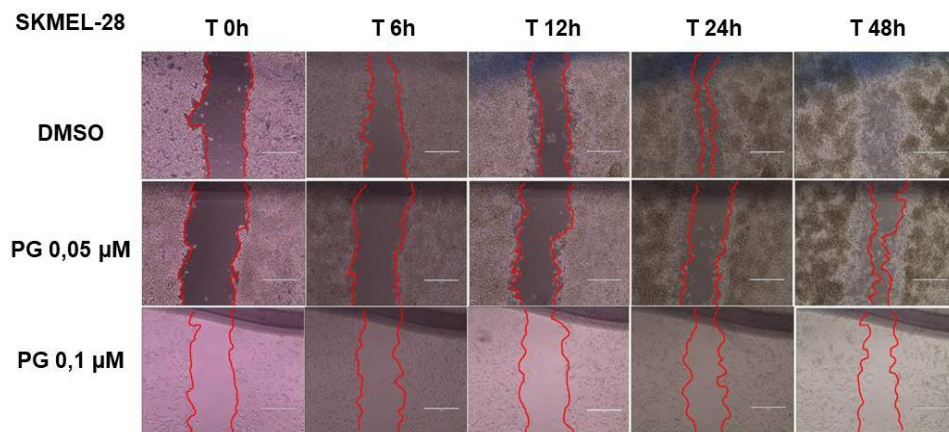
A



B



C



D

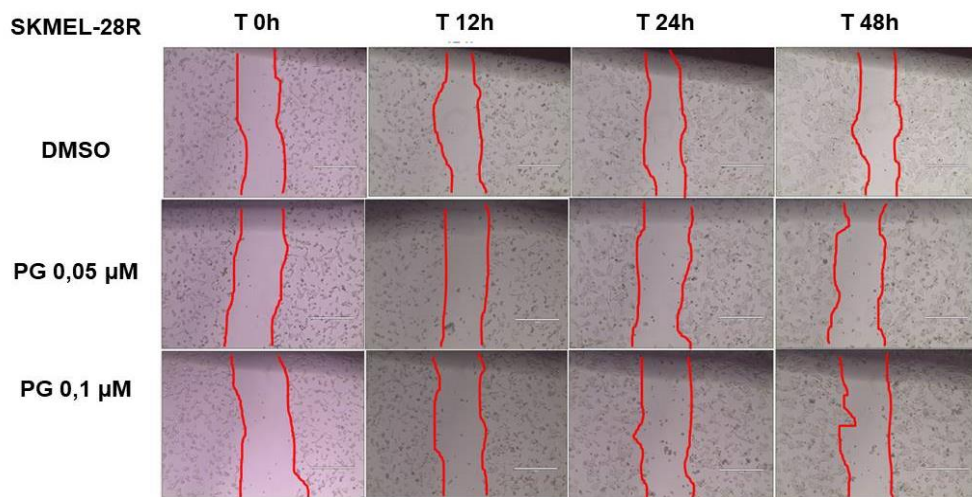


Figura 12 Ensaio de ferida nas linhagens de melanoma tratadas com prodigiosina. A- SKMEL-19, B- SKMEL-19R, C- SKMEL-28, D- SKMEL-28R. As células foram mantidas com 1% de soro fetal bovino. As barras correspondem a 200 μm .

Cada uma das linhagens tinha uma velocidade de migração, por isso na figura 12, o tempo das medições variou para cada linhagem. A linhagem SK-MEL-28 é a que possui a maior velocidade de migração, em média em apenas 24h era capaz de fechar a ferida. A linhagem SKMEL-28R, por sua vez, teve a motilidade mais baixa entre estas linhagens no experimento da ferida. No entanto é possível observar uma inibição da migração de em média 20-30%, sendo a linhagem SkMel-28 a mais sensível, com uma inibição da migração de 40% para a maior concentração de PG.

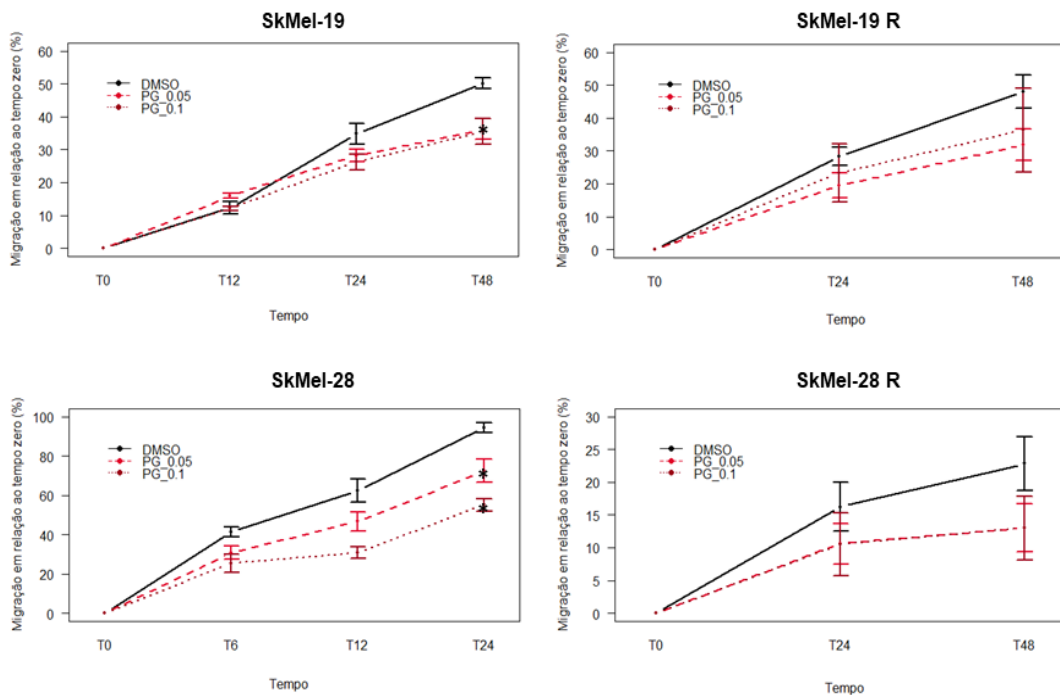
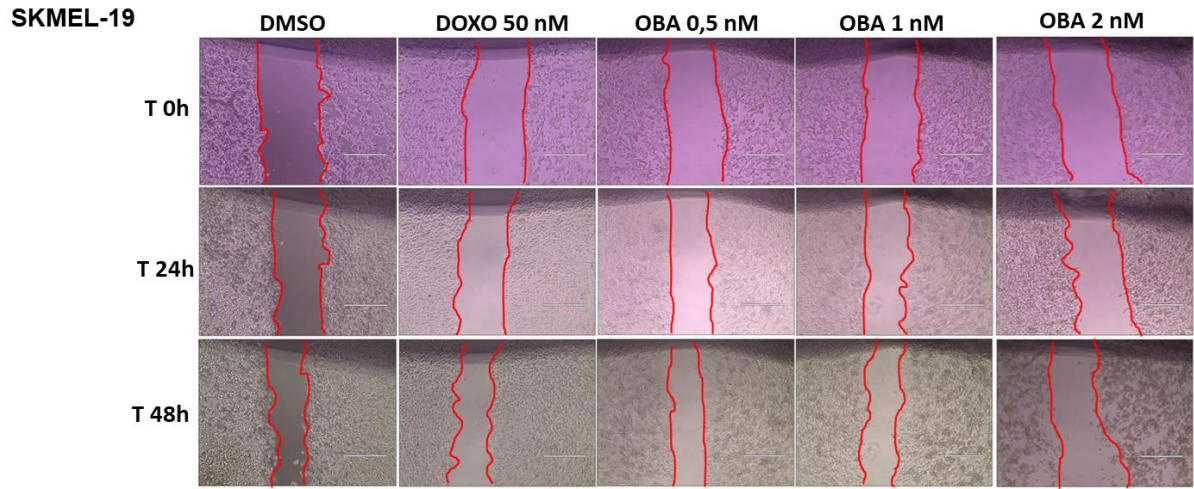


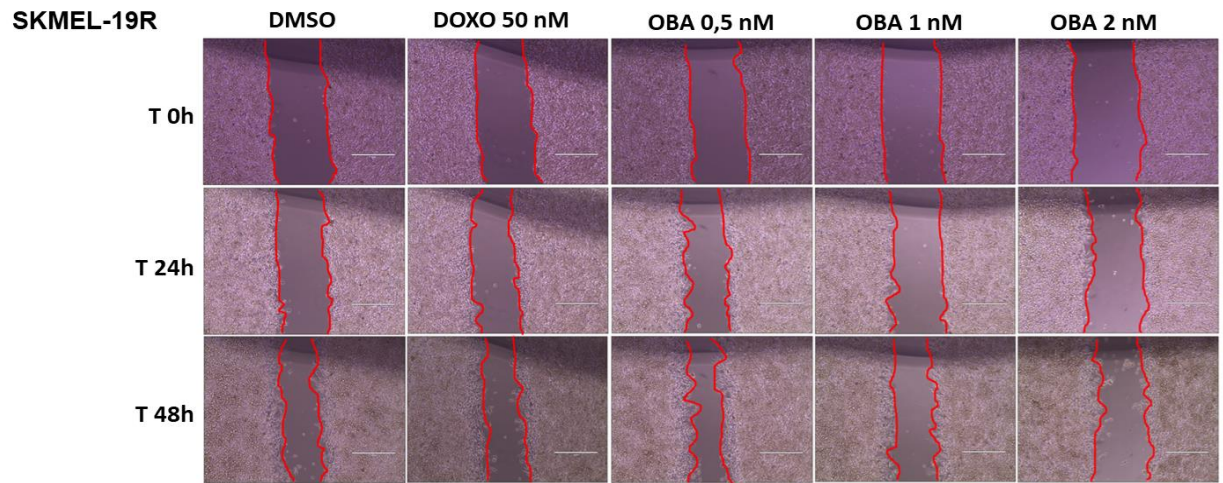
Figura 13 Os gráficos expressam a média e erro padrão da média (média \pm SEM) de ao menos três experimentos independentes demonstrando a migração em relação ao tempo zero no controle negativo (DMSO) e nos tratamentos com a prodigiosina nas linhagens de melanoma. Análise com ANOVA seguido dos pós-teste de Dunnet * $P < 0,05$. Valores expressos em μ M.

O obatoclax, assim como visto para a prodigiosina, teve um efeito moderado na inibição da migração nas linhagens de melanoma. Não foi possível obter as imagens no tempo de 12 horas, com isso na linhagem SK-MEL-28 cuja ferida se fecha em 24h foi perdido o tamanho intermediário da ferida. Nesses ensaios com o OBA também foi avaliada a doxorrubicina (controle positivo) na dose de 50 nM (1/5 IC_{50} de 72h) para comparação (figura 14).

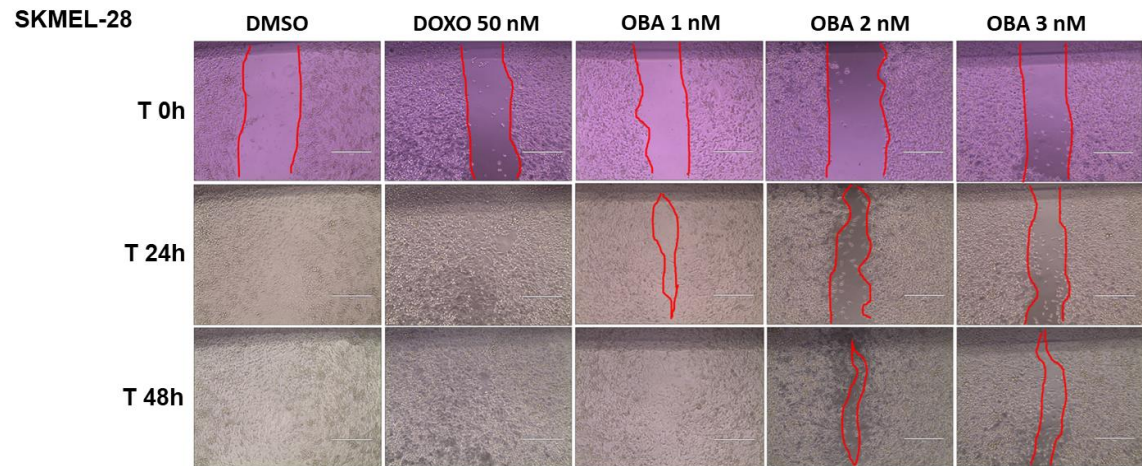
A



B



C



D

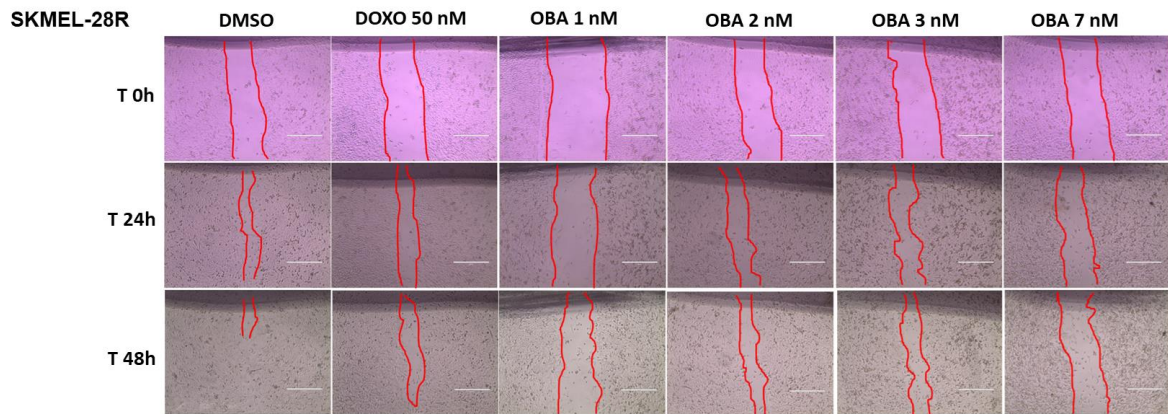


Figura 14 Ensaio de ferida nas linhagens de melanoma tratadas com obatoclax e doxorubicina. A- SKMEL-19, B- SKMEL-19R, C- SKMEL-28, D- SKMEL-28R. As células foram mantidas com 1% de soro fetal bovino. As barras correspondem a 200 μm .

O obatoclax apresentou um efeito sobre a migração das linhagens a partir da concentração de 2 nM, com uma inibição da migração de em média 30% entre as linhagens. Assim como ocorreu com a prodigiosina, a linhagem SK-MEL-28 foi a linhagem que apresentou significância estatística neste ensaio. Concentrações que foram estatisticamente significativas em inibir a migração em 24h perdem seu efeito em 48h na linhagem SK-MEL-28, isso ocorre pois neste tempo as células começam a proliferar e acabam por fechar a ferida. Também foi observada significância estatística na maior concentração testada (7nM) na linhagem SK-MEL-28R (figura 15).

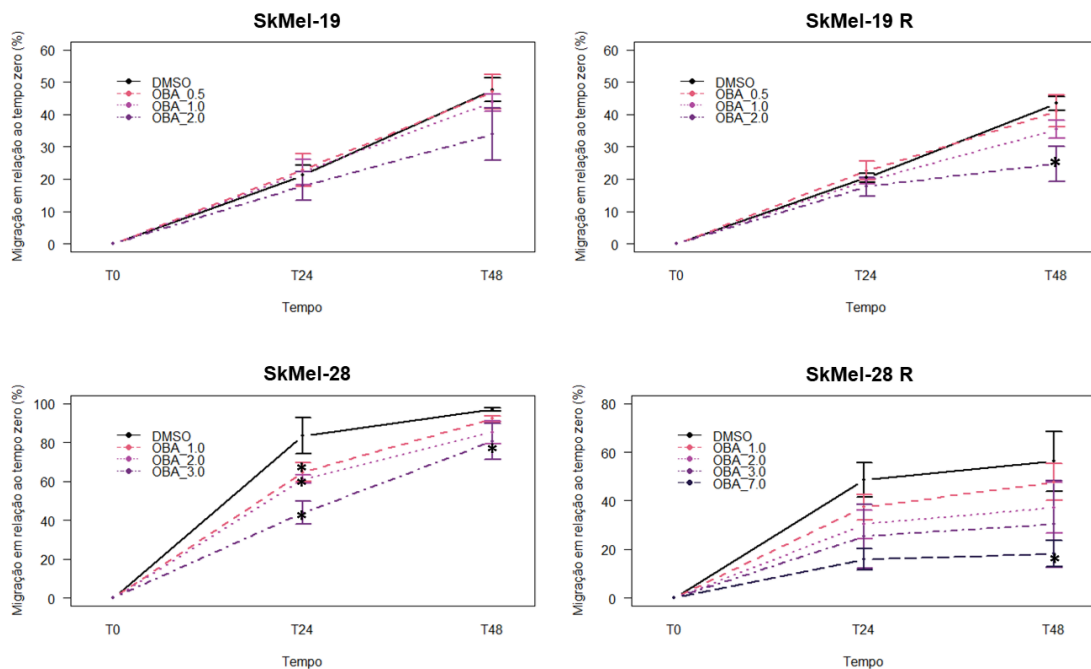


Figura 15 Os gráficos expressam a média e erro padrão da média (média \pm SEM) de ao menos três experimentos independentes demonstrando a migração em relação ao tempo zero no controle negativo (DMSO) e nos tratamentos com o obatoclast nas linhagens de melanoma. Análise com ANOVA seguido dos pós-teste de Dunnet * $p < 0,05$. Valores expressos em nM.

4.3 O tratamento com prodiginosina e obatoclast diminuíram a invasão nas linhagens testadas

O ensaio de invasão dos insertos revestidos com matrigel foi utilizado para medir a invasão *in vitro*. Após 24h do tempo de semeadura e contato com as substâncias, os insertos foram processados, corados e observados no microscópio. Houve uma redução na quantidade de células que invadiram com o tratamento de mais de 50%, no entanto, as linhagens de melanoma estudadas são pouco invasivas, sendo um obstáculo para se afirmar sobre o papel das prodigininas sobre a invasão. Nas figuras representativas (Figura 16 e 17) do experimento, podemos observar as diferenças com o tratamento, também nota-se que a linhagem SK-MEL-28R é mais invasiva que a linhagem sensível.

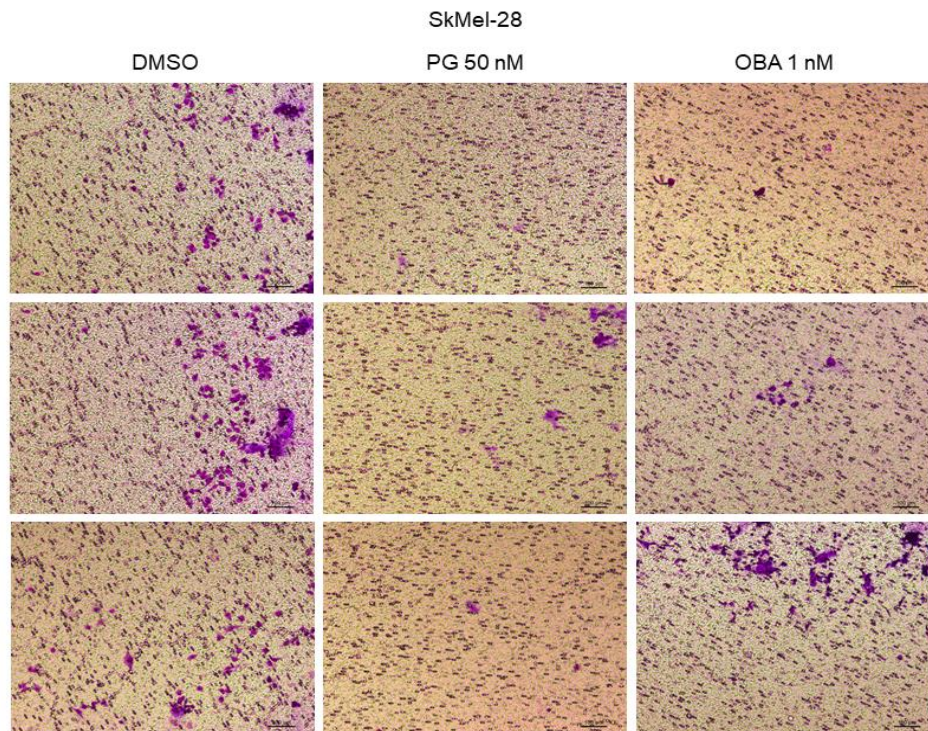


Figura 16 Invasão em insertos recobertos com matrigel em SKMEL-28. Imagens representativas de três experimentos independentes do ensaio de invasão transwell com matrigel após 24 horas de incubação com as prodigininas e coloração com cristal violeta. Barra= 100 μ m

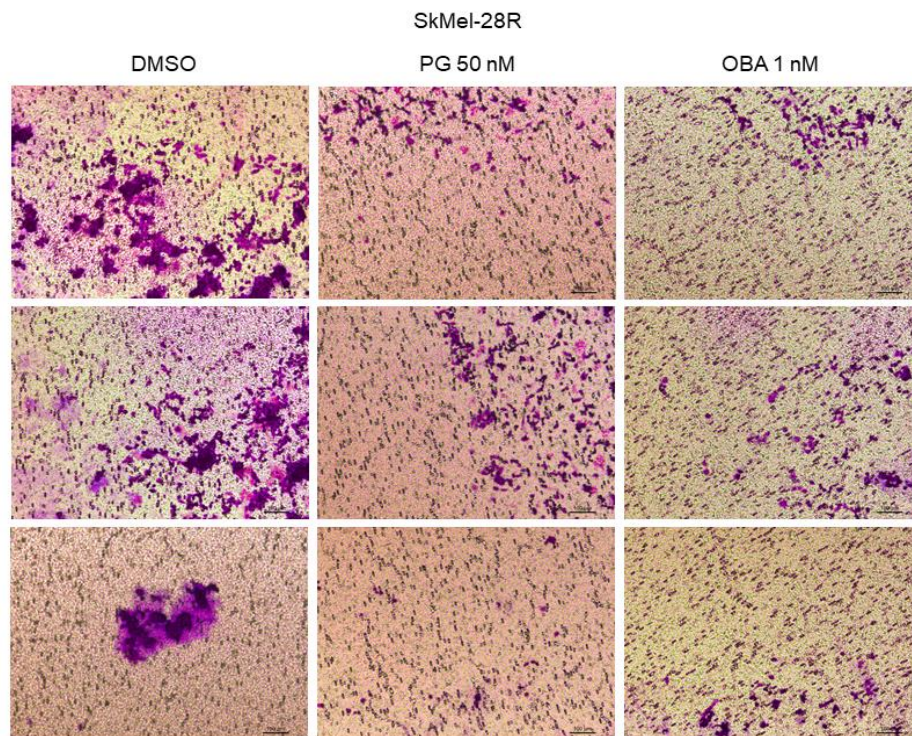


Figura 17 Invasão em insertos recobertos com matrigel em SKMEL-28 Resistente. Imagens representativas de três experimentos independentes do ensaio de invasão transwell com matrigel após 24 horas de incubação com as prodigininas e coloração com cristal violeta. Barra= 100 μ m

As duas linhagens tiveram uma diminuição da invasão e não parece haver diferenças significativas entre a ação das substâncias, observando-se uma diminuição da invasão de mais de 60% em ambas as linhagens incubadas com prodigiosina e obatoclax.

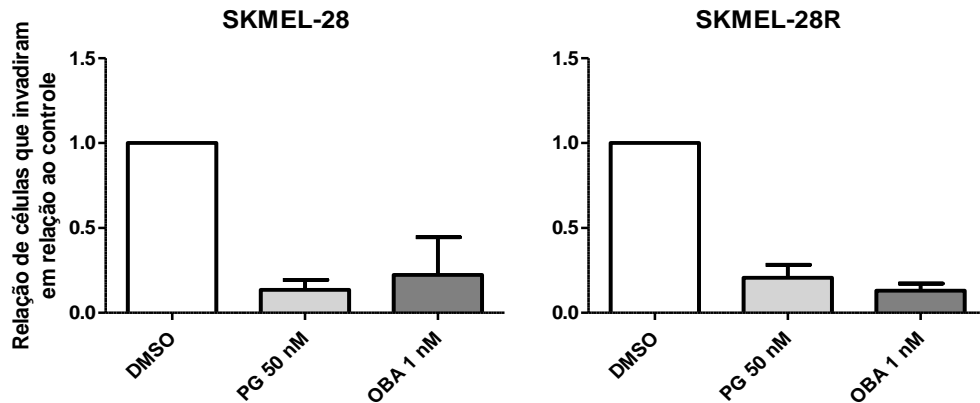


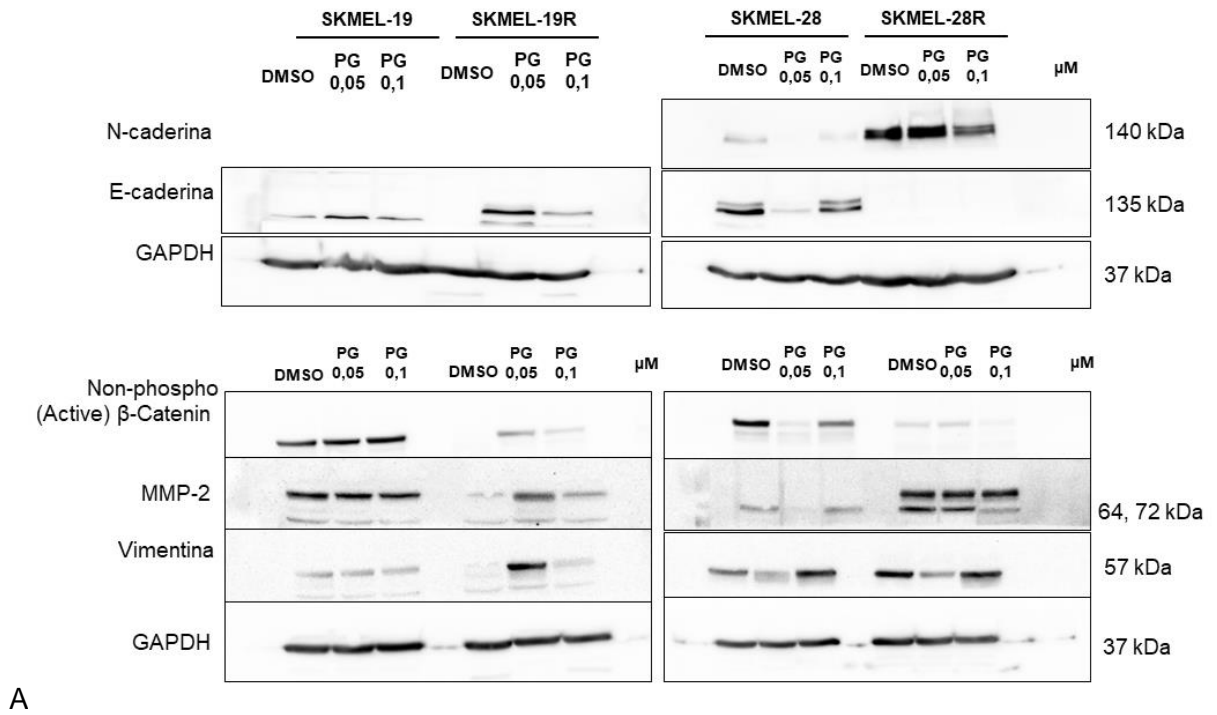
Figura 18 Quantificação do ensaio de invasão pela contagem de células em quatro campos. As colunas representam a média e erro padrão da média (média \pm SEM) do número de células em relação ao controle (DMSO) dos campos contados da média de três experimentos independentes.

4.4 O tratamento com as prodigininas altera a expressão de marcadores EMT nas linhagens de melanoma

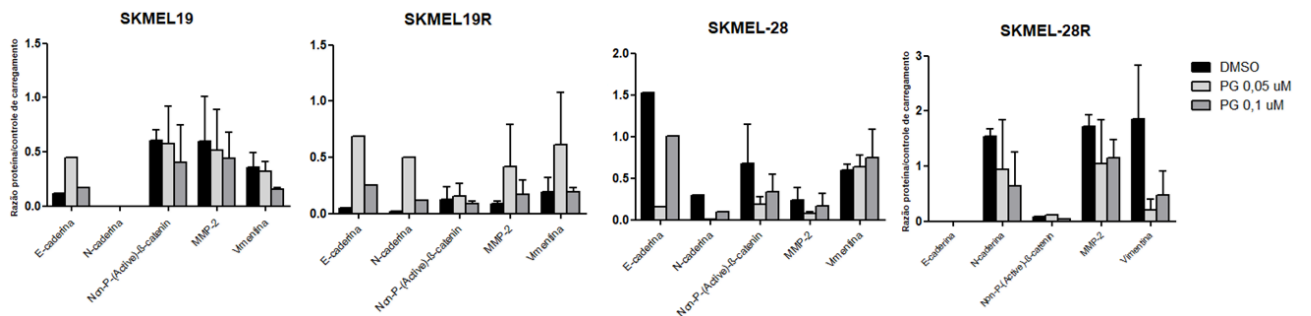
A fim de se entender o efeito das prodigininas nos marcadores de transição epitélio mesenquimal foi feito o *western blotting* com as proteínas extraídas após o tratamento com prodigiosina ou obatoclax por 48h nas linhagens de melanoma. Para isso, as células foram coletadas do próprio experimento da ferida ou de uma placa que mimetizava as condições daquele experimento (ferida central, 1% de soro, tempo de 48h com a substância).

Como se pode observar na imagem e nos gráficos da figura 19 há uma diferença nos marcadores EMT, porém não se chegou a um entendimento conclusivo da ação da prodigiosina sobre esses marcadores, devido a grande variabilidade entre os experimentos, assim como no tratamento com o obatoclax. Em muitos casos, ocorre uma diminuição dos marcadores EMT e depois um aumento como vimentina após o tratamento com prodigiosina. Um dos marcadores em que se observa uma tendência de diminuição foi a do efetor da via da Wnt/ β -catenina, em

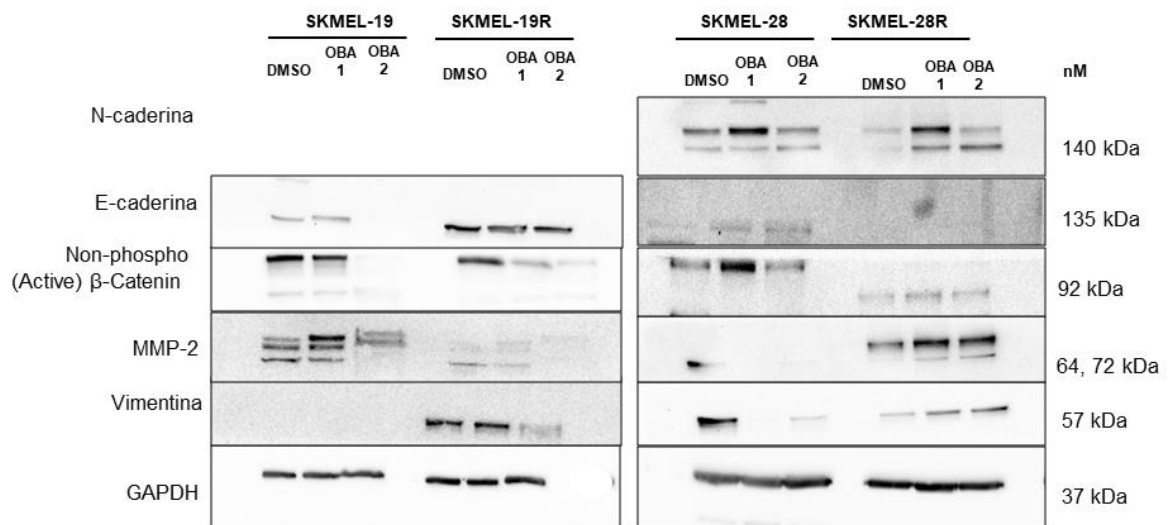
todas as linhagens tratadas com PG e OBA (com exceção da SK-MEL-28R) há uma diminuição desta proteína.



A



B



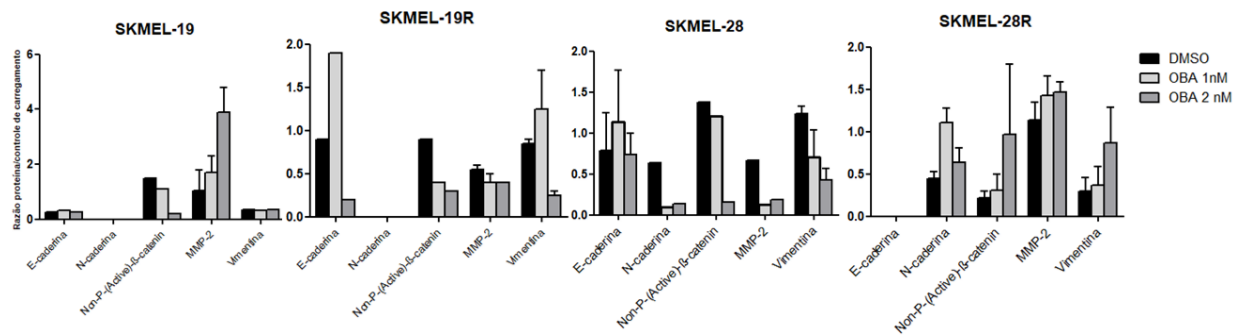


Figura 19 Western blot e gráfico de marcadores EMT. GAPH foi usado como controle de carregamento nas linhagens de melanoma SK-MEL-19 e SK-MEL-28 sensível e resistente ao vemurafenibe. A: tratamento com PG. B: tratamento com OBA. No eixo Y dos gráficos está a média e erro padrão da média (média \pm SEM) das razões da quantificação proteína pelo controle de carregamento.

4.5 Comparação dos genes membros da família BCL-2 nas linhagens SkMel-28 sensível e resistente e comparação desses genes em dados de expressão de amostras de nevos melanocítico e melanoma

Considerando que os alvos moleculares propostos para a prodigiosina e para o obatoclax, estão intimamente relacionados ao processo de apoptose, verificou-se a expressão gênica de 19 genes da família BCL2 nas linhagens SK-MEL-28 sensível e resistente ao vemurafenibe. Na figura 20, podemos ver que há muitas diferenças de expressão nos genes da família BCL2 entres as linhagens sensível e resistente, mostrando que a resistência conferiu alterações nessa linhagem. Dentre os genes anti-apoptóticos houve uma expressiva diminuição do BCL2, BCL2L2 e BCL2A1, no entanto, na linhagem resistente, os genes BCL2L1 e MCL1 estão aumentados. Já entre os pró-apoptóticos há um aumento de BAX, diminuição do BOK e BCL2L11. Ocorre também um aumento nas sensibilizadoras pró-apoptóticas PAMIP1 e BNIP3 e diminuição em outras: BBC3, BIK e BECN1. Evidenciando que a linhagem resistente tem um perfil de genes anti e pró-apoptóticos diferente da linhagem sensível.

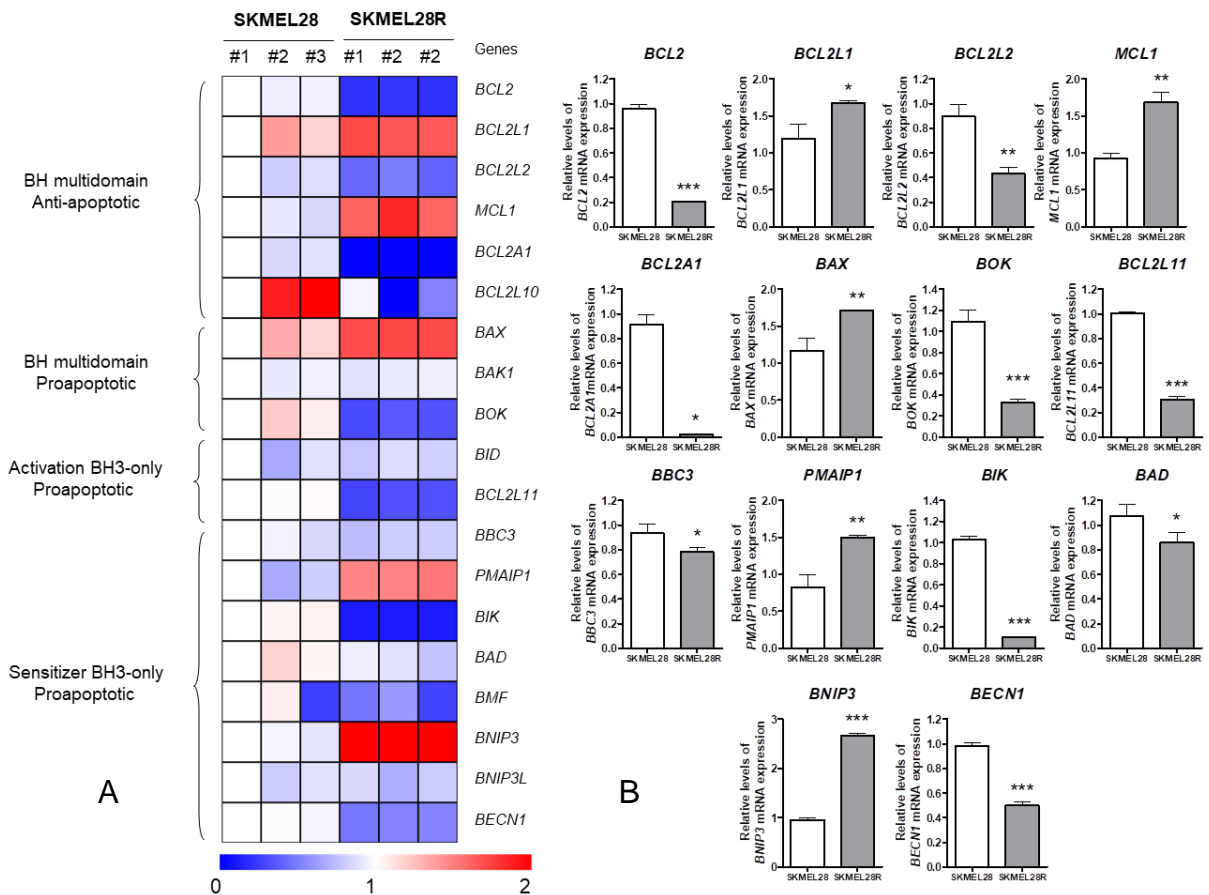


Figura 20 A: Mapa de calor da análise da PCR quantitativa para 19 genes da família BCL2 em SK-MEL-28 sensível e resistente. Os níveis de mRNA foram normalizados por uma amostra de SK-MEL-28 sensível e três amostras independentes de cada linhagem celular foram usadas para análise. Os genes HPRT1 e ACTB foram utilizados como genes de referência. A cor azul indica menores níveis de mRNA e vermelho indica níveis elevados de expressão. B: Gráficos dos 14 genes que tiveram diferença de expressão estatisticamente significativa entre a linhagem sensível e resistente pelo teste-t. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$;

Os genes da família BCL2 também foram analisados a partir de dados de expressão de nevos adquirido comum (n=27) e melanoma primário maligno (n=51) gerados pela plataforma Illumina HiSeq 2500 e depositados por Badal *et al.* (2017) (GEO Acesso: GSE98394)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

As expressões dos genes pró apoptóticas MCL1, BCL2L1, BCL2A1 estão aumentados e de BCL2L10 está diminuído em melanoma comparado a nevos. Dentre os pró-apoptóticos BAX, BAK, BOK, BID e BCL2L11, todos estão aumentados nas amostras de melanoma. Os genes das proteínas sensibilizadoras pró-apoptóticas também estão aumentados: BBC3, PMAIP1, BIK, BAD, BNIP e BNIP3L. De forma geral vemos que a maioria dos genes da família BCL2 estão

aumentados no melanoma, o que é interessante visto que tanto pró quanto anti-apoptóticos estão aumentados.

Na figura 21 de correlação podemos observar o gene anti-apoptótico BCL2L10 em melanoma está negativamente correlacionado com diversos genes, sendo um dos únicos diminuídos em melanoma. Quanto às correlações em nevos comum, elas são mais aparentes e há mais correlações positivas, sugerindo que o ajuste fino a regulação entre os genes está mais bem preservado.

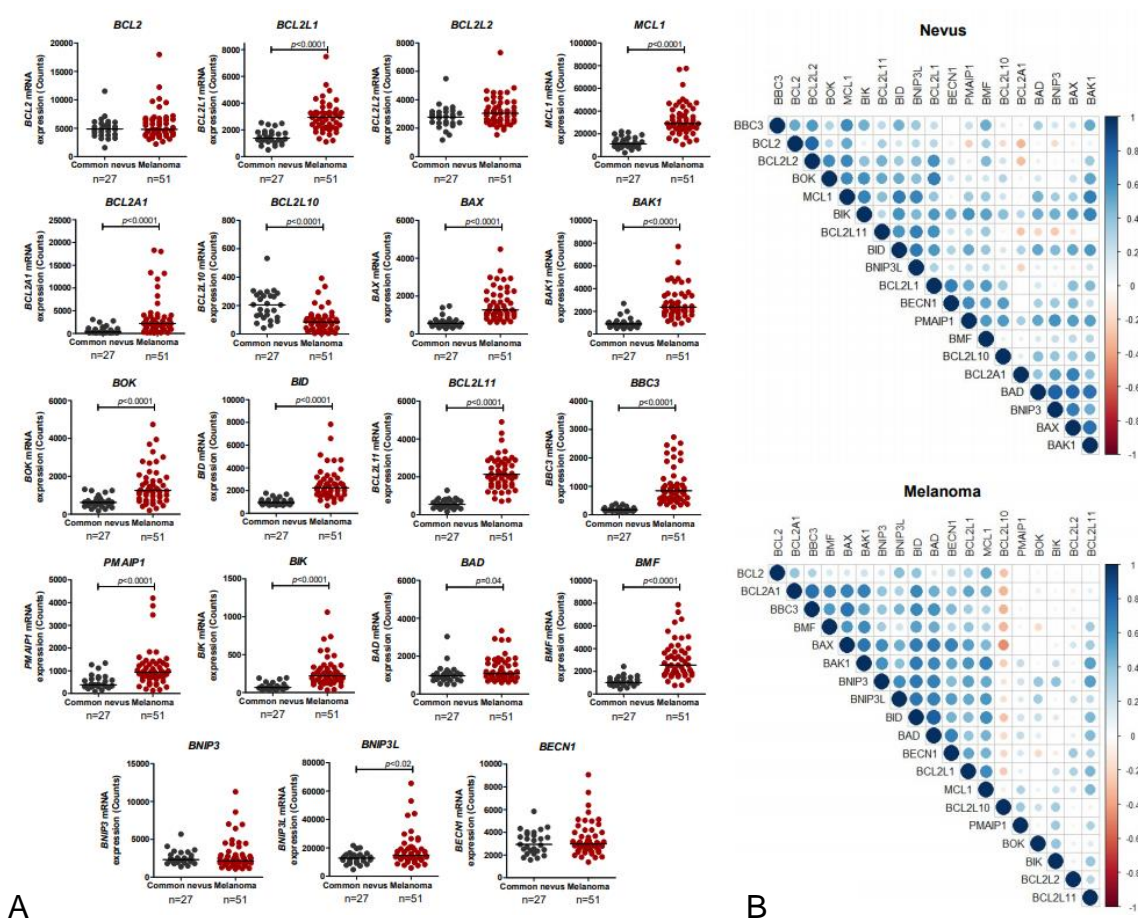


Figura 21 A: Análise da expressão dos membros BCL2 entre nevus normal (n= 27) e melanoma maligno primário (n=51). (GEO acesso: [GSE98394](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE98394)) B: Análise de correlação entre os genes em nevus normal e melanoma feito no R studio com auxílio do *plugin* corplot, em vermelho estão os genes negativamente correlacionados, em azul os correlacionados positivamente.

4.6. Ensaio de combinação entre vemurafenibe e obatoclax

Considerando o mecanismo de ação do obatoclax, que é um pan-inibidor de proteínas anti-apoptóticas da família BCL2, e o papel dessas proteínas na resistência ao vemurafenibe sugerido pela expressão diferencial observada,

procedeu-se com a avaliação dos possíveis efeitos sinérgicos do obatoclax e do vemurafenibe nas linhagens sensíveis e resistentes ao vemurafenibe.

Nas linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-19R, o obatoclax não teve efeito sinérgico com o vemurafenibe, como pode ser visualizado na figura 22, a combinação entre os dois fármacos nas doses utilizadas não causou efeito superior ao dos fármacos isolados.

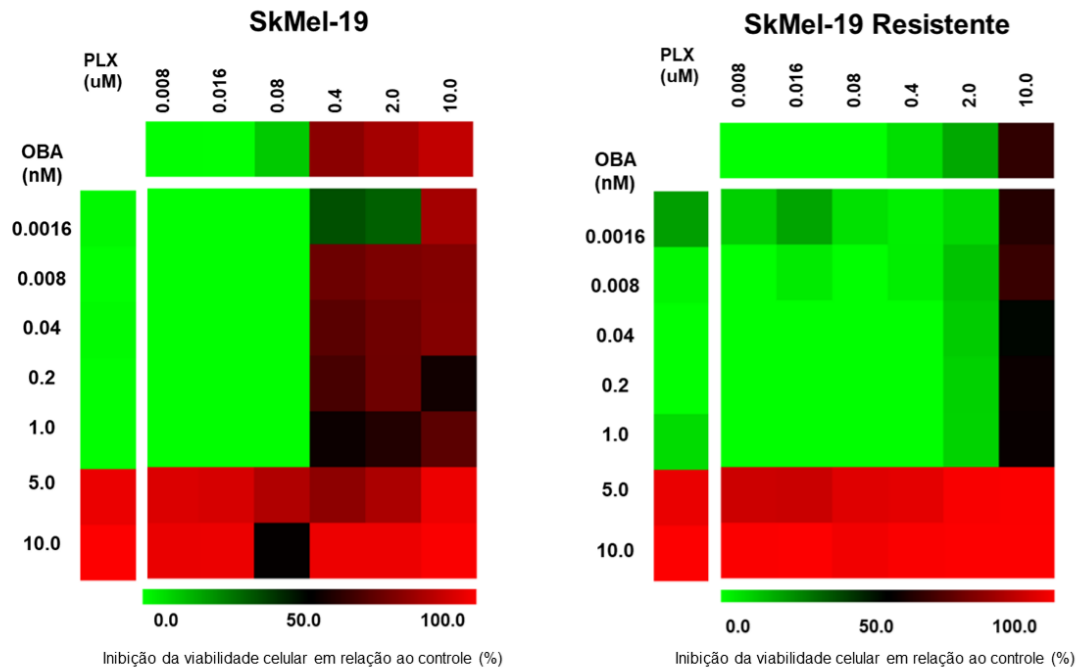


Figura 22 Mapa de calor do ensaio de sinergismo de 72h entre obatoclax e vemurafenibe na linhagem SkMel-19 sensível e resistente. Nele estão representadas as inibições da viabilidade celular nas extremidades das substâncias isoladas e no centro a combinação entre estas.

O ensaio de sinergismo também foi realizado com as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-28R, sendo que nelas foi observada uma ação sinérgica entre as substâncias. Na SK-MEL-28 foi observado um efeito moderado de sinergismo. Na figura 23A, podemos observar que a dose de 0,1 uM de PLX e 1 nM de OBA sozinhas não possuem citotoxicidade, mas juntas podemos ver uma inibição maior que 50%. Analisando as curvas dose-resposta do PLX com 1nM fixo de OBA, observa-se uma redução da IC_{50} do vemurafenibe (figura 23B),

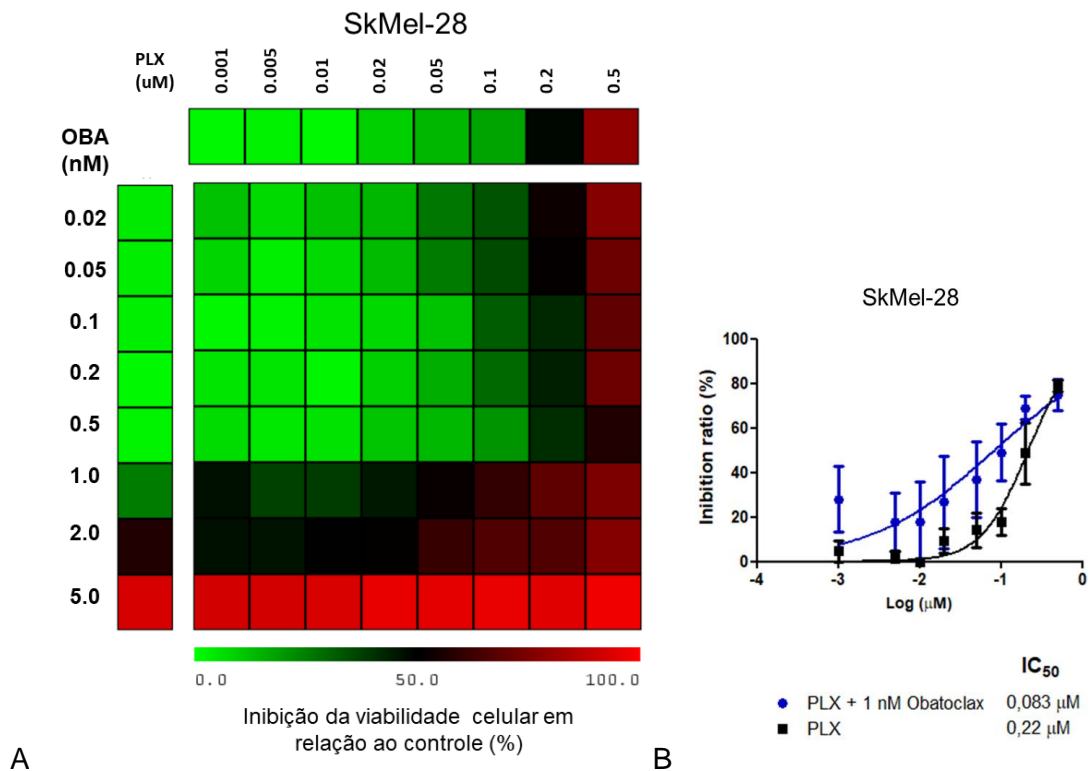


Figura 23 A: Mapa de calor do ensaio de sinergismo de 72h entre obatoclox e vemurafenibe na linhagem SK-MEL-28. Nele estão representadas as inibições da viabilidade celular nas extremidades das substâncias isoladas e no centro a combinação entre estas. **B:** Curva dose resposta do vemurafenibe isolado e em combinação com 1 nM de obatoclox.

Diferentemente da linhagem SK-MEL-28, o sinergismo na linhagem SK-MEL-28R foi bastante evidente. Podemos observar que as substâncias isoladamente nas concentrações testadas não possuem nenhuma citotoxicidade (figura 24A), exceto 14 nm de OBA que é a IC₅₀ de 72h para esta linhagem, mas em combinação é possível ver um efeito de inibição de 100% em certas doses. Com doses fixas de obatoclox, é possível obter a IC₅₀ do vemurafenibe (figura 24B) que até então não estava determinada para esta linhagem devido a sua resistência. Desta maneira, concentrações de obatoclox da ordem de nano molar foram capazes de restabelecer a sensibilidade da linhagem SK-MEL-28 resistente ao vemurafenibe.

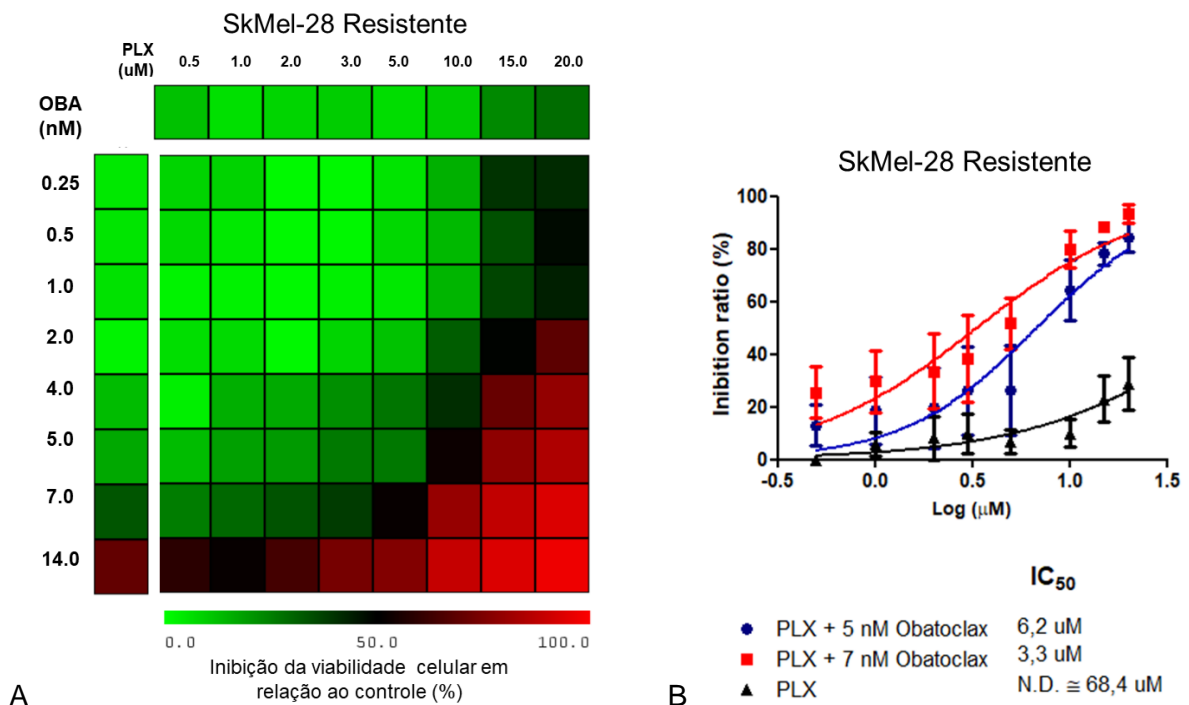


Figura 24 A: Mapa de calor do ensaio de sinergismo de 72h entre obatoclox e vemurafenibe na linhagem SK-MEL-28R. Nele estão representadas as inibições da viabilidade celular nas extremidades das substâncias isoladas e no centro a combinação entre estas. **B:** Curva dose resposta do vemurafenibe isolado e em combinação com 5 ou 7 nM de obatoclox.

4.7. O tratamento combinado de vemurafenibe e obatoclox altera marcadores moleculares de dano em DNA e apoptose

Para melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no sinergismo entre PLX e OBA, foram avaliadas algumas proteínas envolvidas na apoptose (Figura 25). Foi visto um aumento de histona fosforilada H2AX que é um marcador de dano em DNA, e há um aumento em caspase-3 clivada e PARP-clivada que são marcadores apoptóticos.

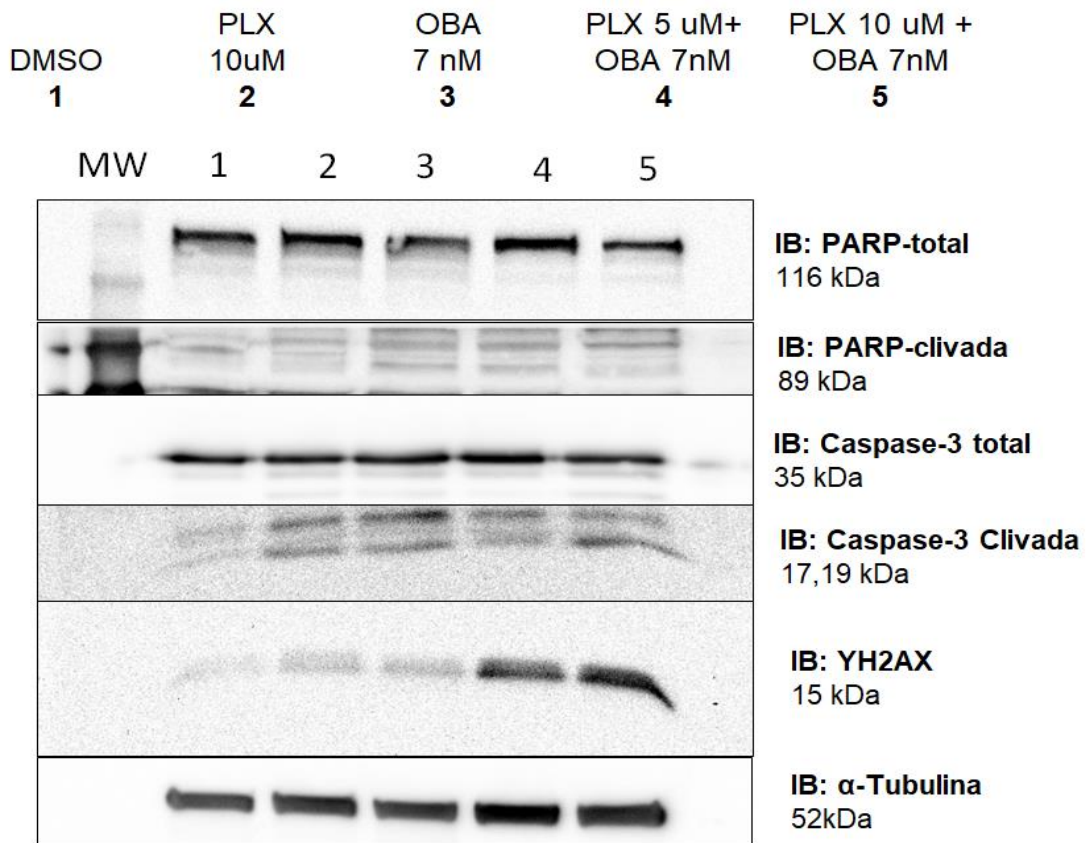


Figura 25 Expressão de proteínas PARP total e clivada, Caspase-3 total e clivada, H2A.X fosforilada e α -tubulina como controle de carregamento após 24h de tratamento com DMSO (0,003%), PLX 10 μ M, OBA 7 nM, PLX 5 μ M+OBA 7 nM e PLX 10 μ M+OBA 7 nM.

O aumento em histona fosforilada H2A.X em relação ao controle já é observado no tratamento com as substâncias individualmente, mas em combinação esse aumento é muito mais expressivo e dependente da concentração (Figura 26E).

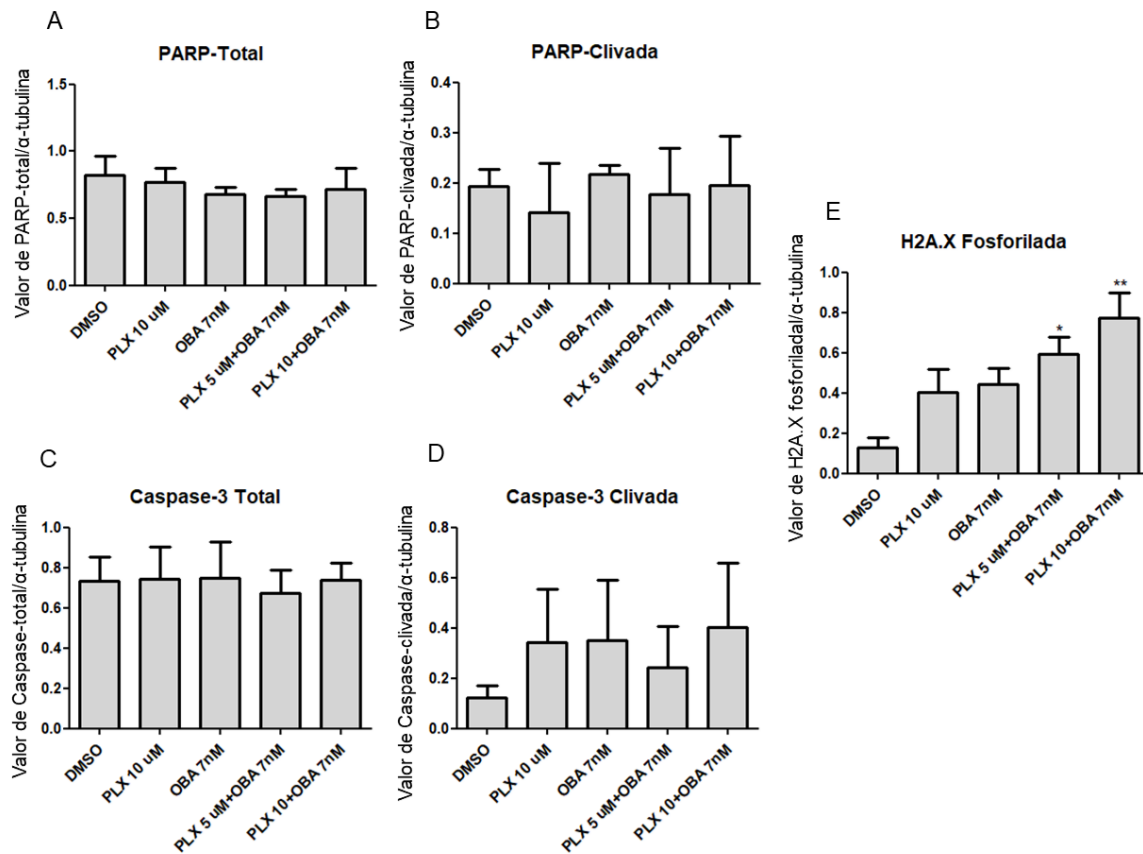


Figura 26 Quantificação da média e erro padrão da média (média \pm SEM) dos pixels das imagens de western blotting de: (A) PARP total, (B) PARP clivada, (C) Caspase-3 total, (D) caspase-3 clivada (E) H2A.X fosforilada normalizada pelo controle de carregamento. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison Test de três experimentos independentes. * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

A identificação de outros agentes quimioterápicos para o tratamento do melanoma é de grande necessidade. A metástase é a principal causa de mortalidade por câncer, que é um processo complexo e de várias etapas; a migração destas células tumorais é uma etapa fundamental no processo metastático. Com isso, ter como alvo a inibição da migração celular pode ser uma abordagem na identificação de fármacos “anti-metastáticos”. No melanoma, outra limitação é a resistência aos inibidores de BRAF e MEK, os pacientes que desenvolvem essa resistência ficam com poucas opções de tratamento.

As prodigininas, prodigiosina e obatoclax, possuem atividade citotóxica em 72h e 24h, com citotoxicidade tempo dependente, observado pelas menores IC_{50} em 72h. O obatoclax possui citotoxicidade nas linhagens de melanoma na ordem de nanomolar, o que mostra sua alta potência, porém a linhagem SK-MEL-28 resistente, assim como acontece no tratamento com prodigiosina, teve uma IC_{50} mais elevada. Essa menor sensibilidade da linhagem SK-MEL-28 resistente pode estar relacionada ao modo de ação das prodigininas, visto que a IC_{50} para doxorubicina nesta linhagem é semelhante a das outras linhagens.

O obatoclax também possui citotoxicidade em longo prazo, visto pela diminuição da capacidade de formação de colônia, assim como a prodigiosina, diferentemente do observado com a prodigiosina as doses que inibem a capacidade clonogênica nas linhagens mais sensíveis também foi capaz de diminuir a formação de colônias na linhagem SK-MEL-28 resistente (figura 09). Apesar do efeito em longo prazo do obatoclax, ele não causou um aumento de células inviáveis no tempo de tratamento de 24h (figura 08), indicando o efeito moderado do obatoclax isoladamente nessas doses.

A prodigiosina apresentou efeito sobre a migração das linhagens de melanoma SK-MEL-19 e SK-MEL-28 sensível e resistente ao vemurafenibe. O maior efeito na inibição da migração foi observado na linhagem SK-MEL-28, o que pode indicar que o efeito de inibição da migração pela prodigiosina independe do efeito de citotoxicidade, visto que a linhagem SK-MEL-19 é mais sensível a prodigiosina (Branco *et al.*, 2020). A diferença de fenótipo dessas linhagens pode ser observada pelos marcadores vistos no western blotting (figura 19), pode-se dizer que a linhagem SK-MEL-28 resistente tem um perfil mais mesenquimal pela ausência de

E-caderina e alta expressão de N-caderina, enquanto a linhagem SK-MEL-19 apresentou um perfil mais epitelial.

O obatoclax também apresentou um efeito de inibição da migração observado pelo ensaio de ferida muito semelhante à ação da prodigiosina, de em média 30% de inibição da migração. Todas as linhagens apresentaram uma diminuição da migração com o tratamento com OBA. Interessantemente a linhagem SK-MEL-28 resistente, que é menos sensível ao OBA, com a dose de 2 nM já é possível observar a inibição da migração, mostrando que a atividade antimigratória pode não estar relacionada com a atividade citotóxica (visto que a IC_{50} de 72h desta linhagem é 14 nM). Um único estudo encontrado mostra o efeito do obatoclax na inibição da migração celular em linhagens de câncer colorretal numa concentração de 0,25 μ M (Koehler *et al.*, 2014). Neste estudo também foi observado que a superexpressão das proteínas antiapoptóticas BCL2 (proteínas alvo do OBA) restaurou a migração das células de câncer colorretal, indicando que essas proteínas são relevantes no processo metastático nessas células.

No ensaio de invasão transwell, também foi visto a diminuição da invasão celular através do inserto revestido com matrigel nas linhagens SK-MEL-28 sensível e resistente. Assim como a migração no ensaio de ferida não foi tão evidente, a invasão também foi um evento de difícil observação com estas linhagens, em ensaios prévios com a linhagem SK-MEL-19 não se observou nenhum evento, por isso as linhagens SkMel-28 foram usadas neste ensaio. A linhagem SkMel-28 resistente é um pouco mais invasiva, mas no geral o número de eventos contados foi baixo nas duas linhagens, no entanto os tratamentos com prodigiosina e obatoclax diminuíram ainda mais esta ocorrência, tornando-se rara a observação de células invasivas com o tratamento.

Pesquisas têm demonstrado o efeito antineoplásico de pequenas moléculas e fitoquímicos na modulação da EMT, reduzindo a progressão do melanoma metastático (Pearlman *et al.*, 2017). As alterações em relação aos marcadores EMT não parecem ser dose dependente, em alguns casos a maior dose reverteu marcadores da transição epitélio-mesenquimal. Apesar de se observar o aumento de E-caderina com o tratamento de PG 50 nM nas linhagens SK-MEL-19 sensível e resistente, esse aumento não foi significativo, as caderinas são importantes reguladoras da ligação celular, essa alteração poderia representar uma mudança molecular de volta para um fenótipo menos invasivo. O obatoclax causou diminuição

de vimentina na linhagem SK-MEL-28. Em SK-MEL-28R, a resistência ao vemurafenibe conferiu maior invasividade para estas células com o aumento da expressão de MMP-2 na linhagem SK-MEL-28R comparado a célula sensível (Sandri *et al*, 2016), o tratamento com a PG causou uma diminuição da expressão da metaloproteinase-2 nas linhagens estudadas, exceto em SK-MEL-19R (figura 19A), o mesmo não foi visto com obatoclax. Apesar de algumas diferenças observadas não foi possível chegar a conclusões sobre o efeito das prodigininas sobre estes marcadores.

A despeito dos efeitos moderados da prodiginosina e obatoclax sobre a migração e invasão nas linhagens de melanoma, esse efeito pode somar-se ao efeito citotóxico descrito dessas substâncias, conferindo outra via de ação sobre as características (*hallmarks*) do câncer independente da ação tóxica, visto que nos ensaios foram usadas concentrações sub-tóxicas dessas substâncias.

As terapias combinatórias no melanoma têm se mostrado as mais eficazes como vemurafenibe e trametinibe (Daud *et al.*, 2015) ou ainda a imunoterapia de nivolumbe com ipilimumabe (Wolchok *et al.*, 2017) aumentando o tempo de sobrevivência dos pacientes. Por isso foi realizado o ensaio de sinergismo entre o vemurafenibe e obatoclax. Nas linhagens SK-MEL-19 sensível e resistente, não foram observados efeitos sinérgicos no tratamento de 72h com o vemurafenibe na presença do obatoclax. Porém nas linhagens SK-MEL-28 sensível e resistente há uma ação sinérgica, esta bastante acentuada na linhagem SK-MEL-28 resistente, doses baixíssimas de obatoclax somado ao vemurafenibe restabeleceram a sensibilidade nestas células (figura 24). A combinação de 5/10 μM de PLX com 7 nM de OBA por 24h causou um dano em DNA, visto pelo aumento em de histona H2A.X fosforilada. O dano em DNA precede a apoptose, que parece estar iminente devido ao aumento em caspase-3 clivada. Acredita-se que em um tratamento com um tempo maior os marcadores apoptóticos PARP e caspase-3 estariam mais acumulados e visíveis no western blotting.

A análise da expressão dos genes da família BCL2 trouxe diversas informações que demonstram as diferenças em SK-MEL-28 sensível e resistente e ainda a comparação com o banco de dados traz uma análise mais global do perfil do melanoma.

Comparando amostras de nevos comum adquirido e melanoma, os genes anti-apoptóticos da família BCL2, como BCL2L1, MCL1, BCL2A1, estão aumentados. Paradoxalmente muitos genes pró-apoptóticos como BAX, BAK1, BOK, BID, BCL2L11, BBC3, PMAIP1, BIK, BAD, BMF e BNIP3L também estão aumentados no melanoma. Esses achados indicam que no melanoma, por mais que haja diversos genes pró-apoptóticos expressos, o balanço entre os genes anti- e pró-apoptóticos mantem o tumor viável em uma linha tênue. Nesse cenário molecular, a inibição com os BH-3 miméticos (como obatoclax) pode ser opção de tratamento eficaz, já que esse arsenal apoptótico está pronto para ser ativado. Estudos adicionais poderão indicar se essa desregulação das proteínas BCL2 no melanoma poderia representar um potencial mecanismo de letalidade à BH3-miméticos.

A linhagem SK-MEL-28R tem um aumento da expressão de MCL1 e BCL2L1/BCL2X_L, essas são as mais relevantes proteínas pró-sobrevivência em tumores sólidos (Sale *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019), o que pode estar contribuindo tanto para a resistência dessa linhagem, quanto para sua maior sensibilidade aos ensaios combinados, visto que obatoclax é um pan-inibidor das proteínas pró-apoptóticas da família BCL2 inibindo: BCL2, BCL2L1 e MCL1. O vemurafenibe isoladamente acaba tendo efeitos mais citostáticos, devido à atividade das proteínas pró-apoptóticas que estão elevadas nesta linhagem. A resistência ocorre devido à reativação de ERK1/2, essa proteína pode promover a sobrevivência em células BRAF mutadas através do aumento da expressão de proteínas pró-sobrevivência, ERK1/2 também estabiliza MCL1 e ainda ERK1/2 inibe as proteínas pró-apoptóticas BCL2L11/BIM, BMF, BBC3/PUMA e BAD (Cook *et al.*, 2017; Domina *et al.*, 2004), na figura 20 podemos observar que estas pró-apoptóticas estão diminuídas na linhagem SK-MEL-28R. Dessa forma, muito provavelmente no sinergismo a inibição das pró-apoptóticas pelo obatoclax somada à inibição da via da ERK1/2 pelo vemurafenibe, deve levar ao aumento dessas pró-apoptóticas sensibilizadoras que estão diminuídas, acrescido de BAX (elevado em SK-MEL-28R) que permite despolarização e liberação do conteúdo da membrana mitocondrial, incluindo a liberação de citocromo C e formação de poros na membrana mitocondrial externa (Carpenter & Brady, 2021), tudo isso levando a uma resposta eficaz nessas células.

6 CONCLUSÕES

Prodigiosina e obatoclax têm efeitos citotóxicos sobre as células de melanoma, sendo o obatoclax mais potente que a prodigiosina. Essas substâncias em doses sub-tóxicas são capazes de diminuir a migração celular em linhagens sensíveis e resistentes ao vemurafenibe. O obatoclax aliado ao vemurafenibe na linhagem SK-MEL-28 resistente ao vemurafenibe, superaram a resistência dessas células de forma sinérgica. Os achados descritos reforçam a relevância das prodigininas como opções de tratamento para o melanoma.

REFERÊNCIAS

- Amaral JB, Rezende-Teixeira P, Freitas VM, Machado-Santelli GM (2011). MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. *Tissue Eng Part C Methods* 17(11):1097-1107.
- American Cancer Society. [acesso em 2019 Feb 12]. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skincancer-key-statistics>
- Anderson RL, Balasas T, Callaghan J, Coombes RC, Evans J, Hall JA, Kinrade S, Jones D, Jones PS, Jones R, Marshall JF, Panico MB, Shaw JA, Steeg PS, Sullivan M, Tong W, Westwell AD, Ritchie JWA (2019). A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nature Rev. Clin. Oncol.* 16: 185- 204.
- Arthaud, I. D., Rodrigues, F. A., Jimenez, P. C., Montenegro, R. C., Angelim, A. L., Maciel, V. M., Silveira, E. R., Freitas, H. P., Sousa, T. S., Pessoa, O. D., Lotufo, T. M. and Costa-Lotufo, L. V. (2012), Studies on the Secondary Metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. Isolated from Sediments Collected at the Northeastern Coast of Brazil. *Chemistry & Biodiversity*, 9: 418-427.
- Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, et al. (2012) The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med.* 10: 85. doi:10.1186/1479-5876-10-85
- Badal B, Solovyov A, Di Cecilia S, et al. Transcriptional dissection of melanoma identifies a high-risk subtype underlying TP53 family genes and epigenome deregulation. *JCI Insight.* 2017;2(9):e92102. Published 2017 May 4. doi:10.1172/jci.insight.92102
- Beck D, Niessner H, Smalley KSM, et al. (2013) Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells. *Science signaling.* 6(260):ra7. doi:10.1126/scisignal.2003057.
- Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, et al. (2006) Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 24: 4738-4745.
- Bedrosian I., Faries M.B., Guerry D.t., Elenitsas R., Schuchter L., Mick R., Spitz F.R., Bucky L.P., Alavi A., Elder D.E., Fraker D.L., Czerniecki B.J. (2000) Incidence of sentinel node metastasis in patients with thin primary melanoma (< or = 1 mm) with vertical growth phase. *Ann. Surg. Oncol.* 7: 262–267.
- Berg, G. (2000) Diversity of antifungal and plant-associated *Serratia plymuthica* strains. *J. Appl. Microbiol.* 88, 952–960.
- Bollag G, Hirth P, Tsai J, et al. (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma *Nature*, 467: 596–599
- Branco PC, Pontes CA, Rezende-Teixeira P, Amengual-Rigo P, Alves-Fernandes DK, Maria-Engler SS, da Silva AB, Pessoa ODL, Jimenez PC, Mollasalehi N, Chapman E, Guallar V, Machado-Neto JA, Costa-Lotufo LV. Survivin modulation in the antimelanoma activity of prodiginines. *Eur J Pharmacol.* 2020 Dec;888 173465. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173465. PMID: 32814079.

Brandt MG, Moore CC. Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2019 Feb;27(1):1-13. doi: 10.1016/j.fsc.2018.08.001. PMID: 30420063.

Brohem, C. A., Sawada, T. C. H., Massaro, R. R., Almeida, R. L., Rivelli, D. P., Ropke, C. D., ... Maria-Engler, S. S. (2009). Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicology in Vitro*, 23(1), 111–119. doi:10.1016/j.tiv.2008.11.004

Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, Saldanha G, Osborne J, Hutchinson P, Tse G, Lachuer J, Puisieux A, Pringle JH, Ansieau S, Tulchinsky E. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell.* 2013 Oct 14;24(4):466-80. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.018. Epub 2013 Sep 26. PMID: 24075834.

Carpenter R, Brady MF. BAX Gene. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; February 9, 2021.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507-16.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984 Dec;15(12):1147-65. doi: 10.1016/s0046-8177(84)80310-x. PMID: 6500548.

Cook, S. J., Stuart, K., Gilley, R. & Sale, M. J. Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling. *FEBS J.* 284, 4177–4195 (2017).

Damsky WE, Rosenbaum LE, Bosenberg M. Decoding melanoma metastasis. *Cancers (Basel).* 2010;3(1):126-63. Published 2010 Dec 30. doi:10.3390/cancers3010126

Damsky WE, Theodosakis N, Bosenberg M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene.* 2014 May 8;33(19):2413-22. doi: 10.1038/onc.2013.194. Epub 2013 Jun 3. PMID: 23728340.

Darshan, N., and H. K. Manonmani. "Prodigiosin and its potential applications." *Journal of food science and technology* 52.9 (2015): 5393-5407.

Daud A, Gill J, Kamra S, Chen L, Ahuja A. Indirect treatment comparison of dabrafenib plus trametinib versus vemurafenib plus cobimetinib in previously untreated metastatic melanoma patients. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):3. Published 2017 Jan 4. doi:10.1186/s13045-016-0369-8

Domina, A. M., Vrana, J. A., Gregory, M. A., Hann, S. R. & Craig, R. W. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23, 5301–5315 (2004).

Elkholi R, Floros KV, Chipuk JE. The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. *Genes Cancer.* 2011 May;2(5):523-37. doi: 10.1177/1947601911417177. PMID: 21901166; PMCID: PMC3161420.

Erdei, E., & Torres, S. M. (2010). A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 10(11), 1811–1823. <http://doi.org/10.1586/era.10.170>.

Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, et al. Toward a molecular classification of melanoma J Clin Oncol, 25 (2007): 1606–1620.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat Rev Cancer. 2003 Jun;3(6):453-8. doi: 10.1038/nrc1098. PMID: 12778135.

Francisco, Roser & Pérez-Tomás, Ricardo & Giménez-Bonafé, Pepita & Soto-Cerrato, Vanessa & Giménez-Xavier, Pol & Ambrosio, Santiago. (2007). Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. European journal of pharmacology. 572. 111-9. 10.1016/j.ejphar.2007.06.054.

Gandalovičová A, Rosel D, Fernandes M, et al. (2017) Migrastatics-Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. *Trends Cancer* 3(6): 391-406.

Geller A., Clapp R., Sober A., Gonsalves L., Mueller L., Christiansen C., et al. (2013) Melanoma epidemic: an analysis of six decades of data from the Connecticut Tumor Registry. J 4172-4178.

Gerwick, William H., and Bradley S. Moore. "Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology." *Chemistry & biology* 19.1 (2012): 85-98.

Gross A, Katz SG. Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. Cell Death Differ. 2017 Aug;24(8):1348-1358. doi: 10.1038/cdd.2017.22. Epub 2017 Feb 24. PMID: 28234359; PMCID: PMC5520452.

Gupta N, Liu JR, Patel B, Solomon DE, Vaidya B, Gupta V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. Bioeng Transl Med. 2016;1(1):63-81. Published 2016 Jul 5. doi:10.1002/btm2.10013

Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW, Naber SP, Weinberg RA. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. Nat Genet. 2005 Oct;37(10):1047-54. doi: 10.1038/ng1634. Epub 2005 Sep 4. PMID: 16142232; PMCID: PMC1694635.

Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144:646–674

Hata AN, Engelman JA, Faber AC. The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. Cancer Discov. 2015 May;5(5):475-87. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0011. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25895919; PMCID: PMC4727530.

Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker EB, Friedl P. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. Cancer Res. 2002;62:2125–30.)

Hoek K.S., Goding C.R. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment. Cell Melanoma Res.* 2010;23:746–759. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil – Rio de Janeiro : INCA, 2019.

Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?. *Front Mol Biosci.* 2020;7:33. Published 2020 Mar 6. doi:10.3389/fmolb.2020.00033

Jimenez PC, Wilke DV, Costa-Lotufo LV (2018) Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics* 73:e482s.

Ju RJ, Stehbens SJ, Haass NK. The Role of Melanoma Cell-Stroma Interaction in Cell Motility, Invasion, and Metastasis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:307. Published 2018 Nov 6. doi:10.3389/fmed.2018.00307

Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp*. 2014;(88):51046. Published 2014 Jun 1. doi:10.3791/51046

Kakadia S, Yarlagadda N, Awad R, et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *Onco Targets Ther*. 2018;11:7095-7107. Published 2018 Oct 17. doi:10.2147/OTT.S182721

Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):65-80. doi:10.1038/cdd.2017.186

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition [published correction appears in *J Clin Invest*. 2010 May 3;120(5):1786]. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104. Erratum in: *J Clin Invest*. 2010 May 3;120(5):1786. PMID: 19487818; PMCID: PMC2689101

Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ*. 2011 Sep;18(9):1414-24. doi: 10.1038/cdd.2011.17. Epub 2011 Mar 18. PMID: 21415859; PMCID: PMC3149740.

Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng*. 2003;83(2):173–180.

Koehler BC, Scherr AL, Lorenz S, et al. Pan-Bcl-2 inhibitor obatoclax delays cell cycle progression and blocks migration of colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(9):e106571. Published 2014 Sep 5. doi:10.1371/journal.pone.0106571

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Mar;15(3):178-96. doi: 10.1038/nrm3758. PMID: 24556840; PMCID: PMC4240281.

Langhans S. A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol*. 9:6. 10.3389/fphar.2018.00006

Lee, E.F., Harris, T.J., Tran, S. et al. BCL-XL and MCL-1 are the key BCL-2 family proteins in melanoma cell survival. *Cell Death Dis* **10**, 342 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41427-019-0548-4>

Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*. 2008;4(5):600-606.

Lima K, Vicari HP, Carlos JAEG, da Silva JCL, Figueiredo-Pontes LL, Rego EM, Machado-Neto JA. Obatoclax reduces cell viability of acute myeloid leukemia cell lines independently

of their sensitivity to venetoclax. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2021 Mar 13:S2531-1379(21)00026-2. doi: 10.1016/j.htct.2021.01.004. Epub ahead of print. PMID: 33753045.

Lin K, Baritaki S, Militello L, Malaponte G, Bevelacqua Y, Bonavida B. The Role of B-RAF Mutations in Melanoma and the Induction of EMT via Dysregulation of the NF- κ B/Snail/RKIP/PTEN Circuit. *Genes Cancer.* 2010 May;1(5):409-420. doi: 10.1177/1947601910373795. PMID: 20827424; PMCID: PMC2933925.

M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen.* 2006;11(8):922–932

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006;355(1):51-65. doi:10.1056/NEJMra052166

Newman, David J., and Gordon M. Cragg. "Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development." *Marine drugs* 12.1 (2014): 255-278.

Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* 2019 Mar;29(3):212-226. doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.001. Epub 2018 Dec 26. PMID: 30594349.

Pearlman RL, Montes de Oca MK, Pal HC, Afaq F. Potential therapeutic targets of epithelial-mesenchymal transition in melanoma. *Cancer Lett.* 2017 Apr 10;391:125-140. doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.029. Epub 2017 Jan 25. PMID: 28131904; PMCID: PMC5371401.

Pouliot N, Pearson HB, Burrows A. Investigating Metastasis Using In Vitro Platforms. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet].* Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100379/>

Ribas A, Flaherty KT. BRAF targeted therapy changes the treatment paradigm in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8:426–433

Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol.* 2020;13(6):100773. doi:10.1016/j.tranon.2020.100773

Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer [published correction appears in *Cancers (Basel)*. 2018 Mar 19;10(3):]. *Cancers (Basel)*. 2018;10(2):52. Published 2018 Feb 16. doi:10.3390/cancers10020052

Rödel F, Hoffmann J, Distel L, Herrmann M, Noisternig T, Papadopoulos T, Sauer R, Rödel C: Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res* 2005,65:4881-7.

Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem.* 2018 Oct 1;164(4):257-264. doi: 10.1093/jb/mvy047. PMID: 29726955.

Sale, M.J., Minihane, E., Monks, N.R. *et al.* Targeting melanoma's MCL1 bias unleashes the apoptotic potential of BRAF and ERK1/2 pathway inhibitors. *Nat Commun* 10, 5167 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12409-w>

Sam MR, Ghoreishi S. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* inhibits expression of MMP-9 and survivin and promotes caspase-3 activation with induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells. *J Appl Microbiol.* 2018;125(4):1017-1029. doi:10.1111/jam.13949

Sandri S, Faião-Flores F, Tiago M, Pennacchi PC, Massaro RR, Alves-Fernandes DK, Berardinelli GN, Evangelista AF, de Lima Vazquez V, Reis RM, Maria-Engler SS. *Pharmacol Res.* 2016 Sep;111:523-533. doi: 10.1016/j.phrs.2016.07.017. Epub 2016 Jul 18.

Schadendorf D., Hodi F., Robert C., Weber J., Margolin K., Hamid O., et al. (2015) Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol.*

Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun;28(1-2):151-66. doi: 10.1007/s10555-008-9179-y. PMID: 19153669.

Schneider MR, Dahlhoff M, Horst D, Hirschi B, Trülzsch K, Müller-Höcker J, Vogelmann R, Allgäuer M, Gerhard M, Steininger S, Wolf E, Kolligs FT *PLoS One.* 2010 Dec 14; 5(12):e14325.

Sharma, A., Shah, S.R., Illum, H. et al. *Vemurafenib Drugs* (2012) 72: 2207. <https://doi.org/10.2165/11640870-000000000-00000>

Shtivelman E, Davies MQ, Hwu P et al. (2014) Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget* 5:1701–1752

Silva, A.E.T., Guimarães, L.A., Ferreira, E.G., Torres, M.C.M., Silva, A.B., Branco, P.C., Oliveira, F.A.S., Silva, G.G.Z., Wilke, D.V., Silveira, E.R., Pessoa, O.D.L., Jimenez, P.C., & Costa-Lotuf, L.V. (2017). Bioprospecting Anticancer Compounds from the Marine-Derived Actinobacteria *Actinomadura* sp. Collected at the Saint Peter and Saint Paul Archipelago (Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(3), 465-474. <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160297>

Simmons, T. Luke, et al. "Marine natural products as anticancer drugs." *Molecular Cancer Therapeutics* 4.2 (2005): 333-342.

Sleeman J., Steeg P.S. Cancer metastasis as a therapeutic target. *Eur. J. Cancer.* 2010;46:1177–1180.

Soengas, M., Lowe, S. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138–3151 (2003). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206454>

Speth PA, Linssen PC, Boezeman JB, Wessels HM, Haanen C: Cellular and plasma adriamycin concentrations in long-term infusion therapy of leukemia patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987, 20:305-310.

Takata M, Murata H, Saida T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 Feb;23(1):64-71. doi: 10.1111/j.1755-148X.2009.00645.x. Epub 2009 Sep 25. PMID: 19788535.

Tang, Y., Durand, S., Dalle, S., & Caramel, J. (2020). EMT-Inducing Transcription Factors, Drivers of Melanoma Phenotype Switching, and Resistance to Treatment. *Cancers*, 12(8), 2154. <https://doi.org/10.3390/cancers12082154>

Testori, F.M. Marincola, N. Mozzillo The role of BRAF V600 mutation in melanoma *J. Transl. Med.*, 10 (2012), p. 85

Tronnier M, Mitteldorf C. Treating advanced melanoma: current insights and opportunities. *Cancer Management and Research*. 2014;6:349-356. doi:10.2147/CMAR.S49494.

Wang Z, Li B, Zhou L, et al. Prodigiosin inhibits Wnt/ β -catenin signaling and exerts anticancer activity in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(46):13150-13155. doi:10.1073/pnas.1616336113

Wei WJ, Sun ZK, Shen CT, Song HJ, Zhang XY, Qiu ZL, Luo QY. Obatoclox and LY3009120 Efficiently Overcome Vemurafenib Resistance in Differentiated Thyroid Cancer. *Theranostics*. 2017 Feb 23;7(4):987-1001. doi: 10.7150/thno.17322. PMID: 28382170; PMCID: PMC5381260.

Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU: Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003, 17:271-273.

Williamson NR, Fineran PC, Gristwood T, Chawrai SR, Leeper FJ, Salmond GP (2007). "Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines". *Future Microbiol*. 2 (6): 605–618.

Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma [published correction appears in *N Engl J Med*. 2018 Nov 29;379(22):2185]. *N Engl J Med*. 2017;377(14):1345-1356. doi:10.1056/NEJMoa1709684

Yamada K.M., Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130:601–610. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.006

Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med*. 2005;9(2):360-372. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00361.x

Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1429-1437. doi:10.1172/JCI36183

Zhang J, Shen Y, Liu J, Wei D. Antimetastatic effect of prodigiosin through inhibition of tumor invasion. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(3):407-414. doi:10.1016/j.bcp.2004.08.037