

**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

## 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<sup>V600E</sup> 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<sup>V600E</sup> 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 IC<sub>50</sub> 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<sup>V600E</sup> 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 IC<sub>50</sub> 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.

# 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).

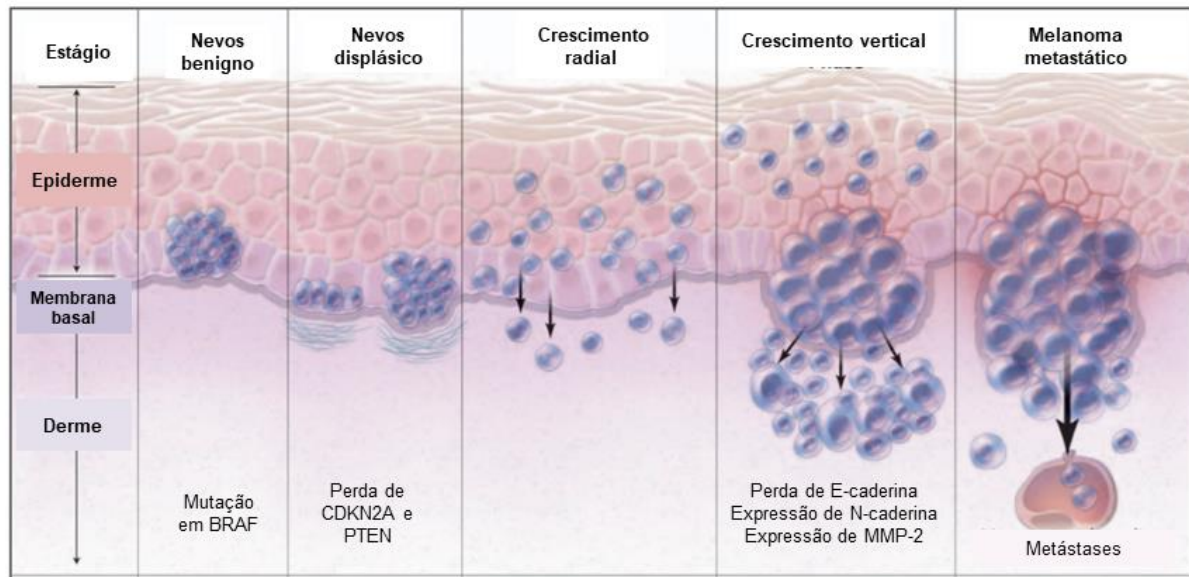
Múltiplas vias de sinalização influenciam a EMT ao induzirem a expressão de fatores de transcrição que favorecem a migração, invasão e metástase. Um exemplo é a via da MAPK (Mitogen-activated protein kinase) que é frequentemente mutada em melanoma e a ativação da proteína BRAF (membro da via MAPK) é 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).



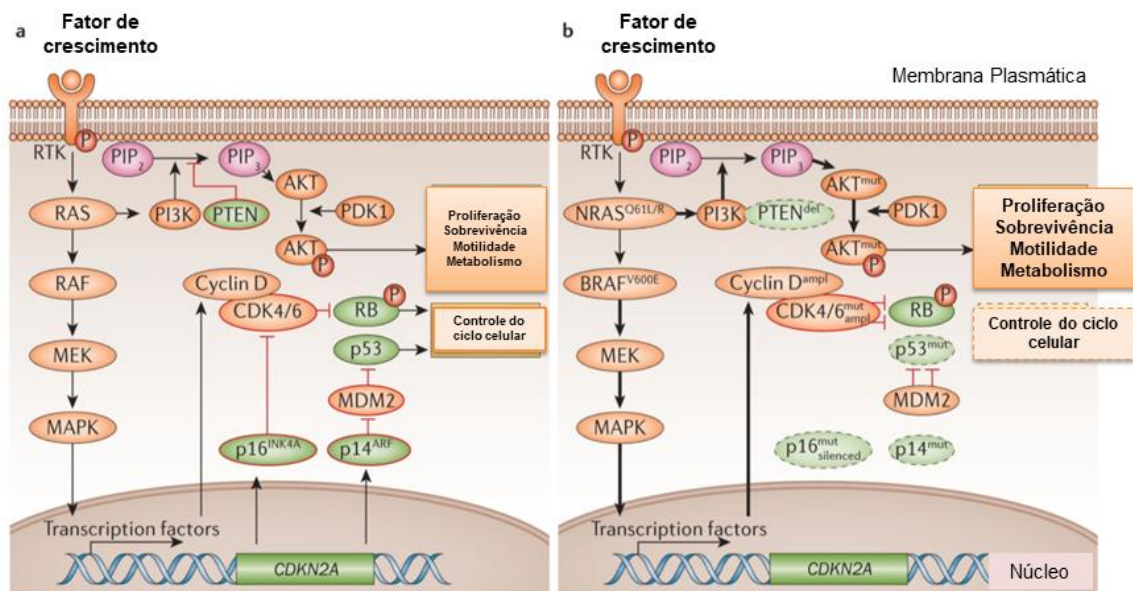
**Figura 1** Modelo de progressão do melanoma de Clark. A progressão do melanoma, pode ocorrer a partir de nevos que possuem inicialmente um crescimento limitado e benigno, esses nevos adquirem mutações levando a atipia dessas células e formação de nevos displásicos. Na fase de crescimento radial, há 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<sup>V600E</sup> (entre 40 e 60% de todos os melanomas), NRAS<sup>Q61L</sup> ou NRAS<sup>Q61R</sup> (~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<sup>V600E</sup> (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<sup>V600E</sup> 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<sup>V600E</sup> 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,

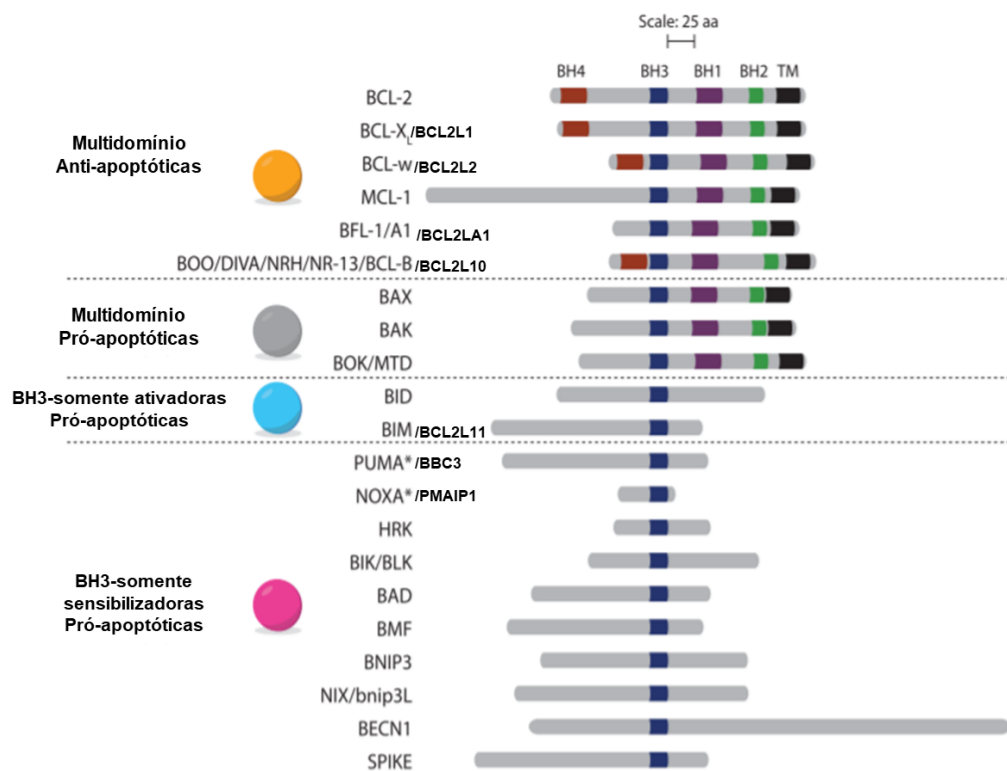
utilizando como alvo terapêutico proteínas mutadas desta via, cujo principal alvo foi BRAF<sup>V600E</sup> (Ribas & Flaherty, 2011). Dos quimioterápicos que possuem BRAF<sup>V600E</sup> como alvo terapêutico, o uso de vemurafenibe e dabrafenibe tem sido associado com a sobrevivência prolongada em pacientes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

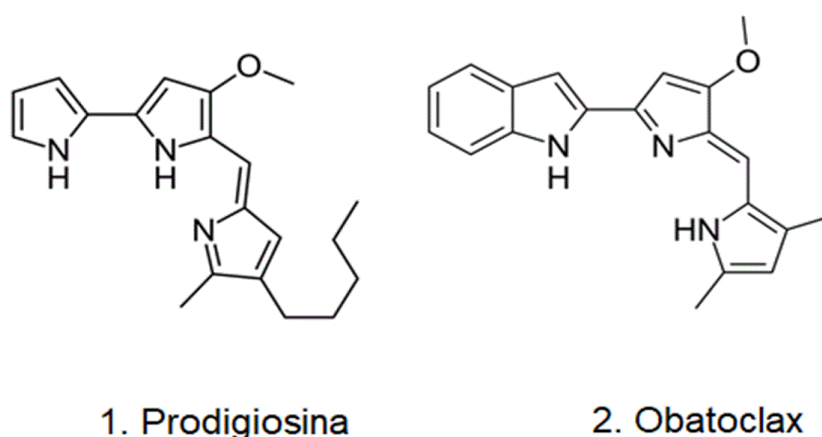
## **1.2 Quimioterapia e produtos naturais**

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).

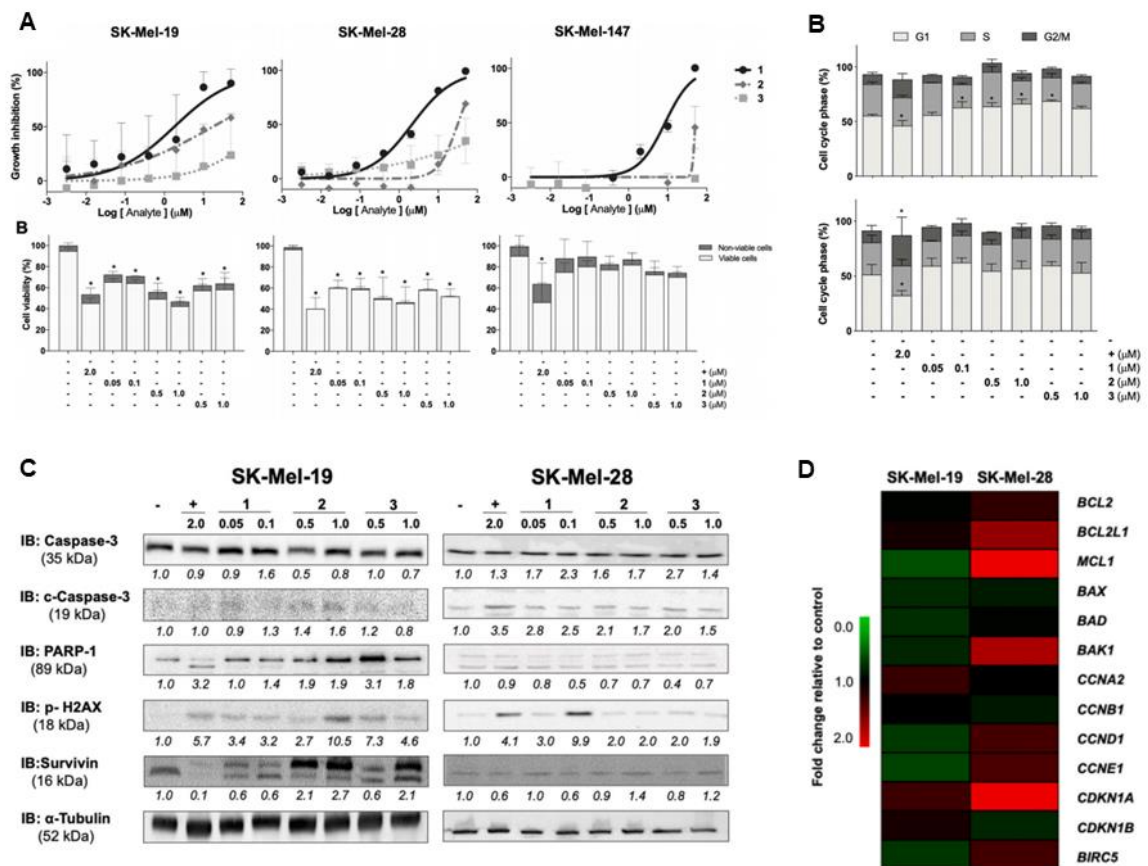
Em estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa, a prodigiosina foi isolada a partir de *Pseudoalteromonas* sp. de sedimentos coletados no litoral do nordeste do Brasil, e apresentou atividade anticâncer em distintas linhagens tumorais apresentando IC<sub>50</sub> entre 0,5 a 3,0 µg/mL. Também foram 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<sup>V600E</sup> e NRAS<sup>Q61R</sup> com IC<sub>50</sub> de 24h em concentrações

micromolares de 0,5-15  $\mu\text{M}$ . 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.



1- Prodigiosina, 2-Ciclononilprodigiosina, 3-Nonilprodigiosina

**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  $\mu$ 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/ $\beta$ -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](http://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 ½	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, prodiginina 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 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- $\kappa$ 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/ $\beta$ -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. Obatoclax 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