



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EVELLINE ARAÚJO EDSON

**TARTROLON D/E INDUZ ALTERAÇÕES TÍPICAS DE MORTE CELULAR
IMUNOGÊNICA EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO**

FORTALEZA – CE

2021

EVELLINE ARAÚJO EDSON

**TARTROLON D/E INDUZ ALTERAÇÕES TÍPICAS DE MORTE CELULAR
IMUNOGÊNICA EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

FORTALEZA – CE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- E1t Edson, Evelline Araújo.
Tartrolon D/E induz alterações típicas de morte celular imunogênica em células de melanoma metastático / Evelline Araújo Edson. – 2021.
66 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke .
1. Morte Celular Imunogênica . 2. Melanoma . 3. Neoplasias Cutâneas. I. Título.

CDD 615.1

EVELLINE ARAÚJO EDSON

**TARTROLON D/E INDUZ ALTERAÇÕES TÍPICAS DE MORTE CELULAR
IMUNOGÊNICA EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Veras Wilke

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

À minha família,

AGRADECIMENTOS

Sou muito grata a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse possível. Primeiramente, agradeço à Deus que me ilumina em todos aspectos da minha vida e que me deu forças e esperança nos dias mais difíceis dessa caminhada.

À minha querida mãe, Zelma (*in memorian*), pelo amor incondicional, por ser o meu maior exemplo na vida, por ensinar os melhores valores que eu tenho e por ser minha maior inspiração para trabalhar com câncer. Esse trabalho é em sua homenagem, Mãe!

Ao meu maravilhoso pai, Heriberto, por nunca medir os esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida e por todo cuidado, apoio, torcida e amor que você me oferta todo dia, mesmo que a distância.

À minha irmã, Emília, que é meu apoio e minha fortaleza diariamente. Obrigada por todo amor de sempre e por fazer tanto por mim. Você foi essencial nessa caminhada!

Ao meu irmão, Egberto, pela preocupação, cuidado e amor à distância, por acreditar no meu potencial e por torcer por todas minhas conquistas. Aproveito para agradecer a minha cunhada, Júlia, por sempre me ajudar quando preciso e a minha sobrinha, Melissa, que é meu ponto de paz e felicidade.

Ao meu orientador, Dr. Diego Veras Wilke, por ter me recebido tão bem no LABBMAR, por sempre tentar me entusiasmar quando os resultados não eram bons, por estar sempre disposto a ajudar e por todos os ensinamentos e orientação durante essa jornada, que me fizeram crescer como pesquisadora.

Aos queridos professores Dr. Roberto César e Dr. Eduardo Filippi-Chiela, por aceitarem fazer parte da banca de mestrado e por todas as considerações e contribuições para melhoria desse trabalho.

À irmã que a vida me deu, Manoela, por se fazer presente em todos os momentos que eu preciso, por todo carinho e compreensão, por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho (que foi muita) e por ser a melhor amiga que eu poderia ter.

Aos meus companheiros do LABBMAR, Aléxia, Felipe, Elthon, Erlânia, Thaís, Kayanne, Laura, Keilla e Clara, por tudo que me ensinaram, por sempre estarem dispostos a me ajudar, por todo apoio e pelos bons momentos que compartilhamos juntos no laboratório;

À Kath e a Maísa, em especial, que se tornaram grandes amigas, por serem meu braço direito no desenvolvimento desse trabalho, por compartilharem minha alegria nos resultados

positivos, por escutarem minhas reclamações e por tornarem os dias de trabalho mais leves e divertidos.

À Larice, amiga que o mestrado me presenteou, pelas conversas, risadas, apoio e pelos bons momentos que passamos juntas. Obrigada também por sempre ser solícita a tudo que eu preciso.

Às amigas, Lorena, Sarah e Naiara, que estão sempre me acompanhando e torcendo pelo meu sucesso.

Aos demais familiares e amigos que me apoiaram e torceram pelas minhas conquistas em todas as etapas da minha vida, principalmente na acadêmica.

À professora Margo Haygood e professor Amaro Silva, por disponibilizarem a molécula teste utilizada nesse estudo.

À Unidade Multiusuário do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará pelo suporte técnico.

Ao CNPq, à CAPES e ao INCT-BioNat (processo No 2014/50926-0), pelo apoio financeiro e por viabilizar esse estudo.

Todo dia eu peço a Deus
saúde para trabalhar,
que me dê sabedoria
e coragem pra lutar
e que eu perceba, sim,
que só vem até mim
aquilo que eu for buscar.

RESUMO

TARTROLON D/E INDUZ ALTERAÇÕES TÍPICAS DE MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO

Defesa de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará defendida em 2021. Aluna: Evelline Araújo Edson. Orientador: Prof. Diego Veras Wilke.

O melanoma metastático é o tipo mais grave de câncer de pele e se destaca devido à alta mortalidade, devido a ausência de um tratamento efetivo para maioria dos casos. A morte celular imunogênica (MCI) é uma interessante estratégia para o desenvolvimento de quimioterápicos para o melanoma metastático, pois é capaz de potencializar a citotoxicidade necessária em um tratamento para câncer a partir da ativação do sistema imune adaptativo contra as células neoplásicas. Esse efeito se deve aos DAMPs (do inglês *Damage-associated molecular patterns*) que são liberados durante a MCI, como o ATP, HMGB1, CRT, entre outros. Os tartrolons são compostos com interessantes propriedades biológicas, como atividade antiproliferativa e antimicrobiana, demonstrando-se promissores para aplicação na área da farmacológica. Assim, nesse estudo avaliou-se a liberação de marcadores indutores de MCI pelo tartrolon D/E (TRL) em melanoma metastático murino (linhagem B16-F10). O teste da sulforrodamina B (SRB) e o ensaio clonogênico foram realizados para avaliar o efeito antiproliferativo e a sobrevivência de células B16-F10 expostas ao TRL. Em seguida, foram avaliados os mecanismos de morte celular e a detecção dos DAMPs por citometria de fluxo e por detecção de luminescência. Em relação ao efeito antiproliferativo pelo SRB, o TRL foi testado nas concentrações de 0,46 a 60 μM , nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação. Observamos efeito citostático demonstrado pela concentração inibitória média (CI_{50}) de 7,7 μM , 1,3 μM e 0,4 μM em 24, 48h e 72 horas, respectivamente. O efeito citotóxico, medido através da concentração letal média (CL_{50}) foi de 24,5 μM após 48h e foi 20,4 μM após 72h. O teste de sobrevivência por ensaio clonogênico foi realizado com duas concentrações de TRL, 12 μM e 25 μM , em 24 e 48 horas de incubação. Foi visto que a inibição da proliferação teve efeito dose-tempo dependente. Com os ensaios de citometria, foi possível verificar que o composto na concentração de 12 μM incubado 24 horas foi capaz de alterar a morfologia celular, aumentando as células granulosas e as células murchas, ocasionando também a ruptura da membrana plasmática e a fragmentação do DNA. Nos ensaios com marcadores específicos para os DAMPs, foi verificado a externalização da Hsp70 e da CRT na superfície da membrana plasmática de células viáveis e a liberação do HMGB1 nuclear. Em relação ao ATP, foi possível verificar um aumento de ATP extracelular em relação ao grupo controle negativo. Porém, esse resultado corresponde a único experimento, precisando ser repetido para confirmação dos resultados. O TRL é um composto que provoca morte celular e, também, induz liberação sinais imunogênicos envolvidos na MCI. São necessários estudos adicionais para confirmar se o TRL é um indutor autêntico de MCI. Todavia, os resultados obtidos com TRL já sugerem um perfil de atividade promissora como agente antitumoral em melanoma metastático.

Palavras chave: Melanoma metastático, morte celular imunogênica, citotoxicidade, tartrolon D/E.

ABSTRACT

TARTROLON D/E INDUCES IMMUNOGENIC CELL DEATH ALTERATIONS IN METASTATIC MELANOMA CELLS

Metastatic melanoma is the most serious type of skin cancer due to its high mortality rate and the lack of effective treatment in most cases. Immunogenic cell death (ICD) is an interesting strategy when developing chemotherapeutic treatments for metastatic melanoma because of its capability in potentializing the necessary cytotoxicity for a cancer treatment by activating the adaptive immune system against neoplastic cells. This effect is caused by damage-associated molecular patterns molecules (DAMPs), released during ICD, such as ATP, HMGB1, CRT, among others. Tartrolons are promising bioactive compounds with diverse biological properties, such as antiproliferative, antimicrobial and antiprotozoan. The current study aimed to evaluate the markers ICD induction by tartrolon D/E (TRL) on murine metastatic melanoma (B16-F10 cell lineage). In order to evaluate the antiproliferative effect and the survival cell rate of the B16-F10 cells exposed to TRL, sulforhodamine B (SRB) test and clonogenic assays were performed. Moreover, the cell death mechanisms and DAMPs detection were observed by flow cytometry and luminescence detection. The antiproliferative effect of TRL was tested in concentrations ranging from 0.46 to 60 μM after 24, 48 and 72 h by SRB assay. A cytostatic effect demonstrated by the average inhibitory concentration (IC_{50}) of 7.7 μM , 1.3 μM and 0.4 μM at 24, 48 and 72 h respectively. The cytotoxic effect, determined by the average lethal concentration LC_{50} , was of 24.5 μM after 48 h and 20.4 μM after 72 h incubation. The survival evaluation was performed by clonogenic assay at two concentrations of TRL (12 μM and 25 μM) after exposure of 24 and 48 h. We also noticed proliferation inhibition in a time and concentration dependent fashion with complete absence of colonies in the group at 25 μM exposed by 48 h. The flow cytometry assays were carried out after 24 hours. TRL at 12 μM induced morphological changes, increasing of high granularity and cell shrinkage as well as plasmatic membrane rupture and DNA fragmentation. Additionally Hsp70 and CRT externalization were detected along with and HMGB1 releasing. Preliminary data depicted an increase in the extracellular ATP levels measured in the supernatant. In summary TRL induced cell death and immunogenic signals related to ICD. Additional studies are necessary to confirm if TRL is a bonafide ICD inducer. Nevertheless, the results obtained already suggest a promising profile as an antitumor agent against metastatic melanoma.

Keywords: metastatic melanoma, immunogenic death cell, cytotoxicity, tartrolon D/E.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características adquiridas por células neoplásicas para o desenvolvimento e progressão tumoral.	17
Figura 2: Requisitos diferenciais para a imunogenicidade da morte celular.....	21
Figura 3: Mecanismos envolvidos na morte celular imunogênica (MCI).....	24
Figura 4: Estrutura química do tartrolon D e E.	27
Figura 5: Planejamento experimental.....	31
Figura 6: Estratégia de gates para citometria de fluxo.....	36
Figura 7: Estratégia de gates para análise da morfologia celular.	37
Figura 8: Estratégia de gates para análise da integridade de membrana celular.	38
Figura 9: Estratégia de gates para análise da fragmentação de DNA.....	39
Figura 10: Estratégia de gates para análise da externalização da Hsp70.....	40
Figura 11: Estratégia de gates para análise da externalização da CRT.....	41
Figura 12: Estratégia de gates para análise da liberação do HMGB1..	42
Figura 13: Efeito antiproliferativo do tartrolon D/E em células da linhagem B16-F10.....	44
Figura 14: Avaliação de sobrevivência de células tumorais in vitro através do ensaio clonogênico.....	46
Figura 15: Avaliação da morfologia celular de células da linhagem B16-F10.	47
Figura 16: Avaliação da integridade de membrana celular de células da linhagem B16-F10 .	48
Figura 17: Avaliação da fragmentação de DNA de células da linhagem B16-F10.....	49
Figura 18: Avaliação da externalização de Hsp70 na membrana de células da linhagem B16-F10.....	50
Figura 19: Avaliação da externalização da CRT na membrana de células da linhagem B16-F10.....	51
Figura 20: Avaliação da liberação do HMGB1 em células B16-F10.....	52
Figura 21: Avaliação do ATP extracelular liberado por células da linhagem B16-F10.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito antiproliferativo do tartrolon D/E em células da linhagem B16-F10 em cultura avaliado pelo ensaio do SRB.....	45
--	----

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Reação da enzima luciferase.....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
ANXA1	Anexina A1
ATP	Adenosina trifosfato
CO ₂	Gás carbônico
CDs	Células dendríticas
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CIT	Concentração inibitória total
CL ₅₀	Concentração letal média
CRT	Calreticulina
CTLA-4	Linfócitos T citotóxicos associado a proteína 4 (do inglês <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>)
CXCL10	CXC-quimiocina
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo (do inglês <i>danger-associated molecular patterns</i>)
DAPI	4-6-diamidino-2- fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina

EIF2A	Fator de iniciação de tradução em eucariotos 2A (do inglês <i>eukaryotic translation initiation fator 2A</i>)
FSC	Desvio frontal (do inglês <i>Forward scatter</i>)
HMGB1	Proteína nuclear não histona (do inglês <i>high mobility group box protein 1</i>)
HO 33342	Hoechst 33342
HSP	Proteínas do choque térmico
IFN-1	Interferons do tipo I
IFN- γ	Interferon gama
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IL-1 β	Interleucina-1 β
LAMP1	Proteína de membrana de lisossomo 1 (do inglês <i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>)
LRP1	Proteína 1 relacionada ao receptor proteico de baixa densidade (do inglês <i>low density protein receptor-related protein 1</i>)
MAT	Microambiente tumoral
MCI	Morte celular imunogênica
MFI	Intensidade mediana de fluorescência (do inglês <i>median fluorescence intensity</i>)
mM	Milimolar
MTX	Mitoxantrona
NLRP3	Receptores NOD do tipo 3
nm	Nanômetro
PANX1	Panexina 1
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)

PDIA3	Proteína dissulfeto-isomerase A3 (do inglês <i>protein disulfide isomerase family A member 3</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês <i>phycoerythrin</i>)
PS	Fosfatidilserina (do inglês <i>phosphatidylserine</i>)
RAGE	Receptor específico de glicosilação avançada de produto final (do inglês <i>receptor for advanced glycation endproducts</i>)
RE	Retículo endoplasmático
SNAP25	Proteína de 25 KDa associada ao sinaptossoma (do inglês <i>synaptosomal-associated protein, 25 KDa</i>)
SRB	Sulforodamina B
SSC	Desvio lateral (do inglês <i>Side Scatter</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TRL	Tartrolon D/E
TRL-2	Receptor semelhante ao toll tipo 2 (do inglês <i>toll-like receptor</i>)
TRL-4	Receptor semelhante ao toll tipo 4 (do inglês <i>toll-like receptor</i>)
VAMP1	Proteína associada a vesículas de membrana 1 (do inglês <i>vesicle-associated membrana protein 1</i>)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Câncer	17
1.1.1. <i>Melanoma metastático</i>	18
1.2. Morte celular imunogênica	19
1.3. Produtos naturais marinhos	24
1.3.1. <i>Tartrolon D/E</i>	26
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Planejamento Experimental	31
4.2 Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i>	32
4.2.1 <i>Cultivo das células</i>	32
4.2.2 <i>Ensaio da Sulforodamina B</i>	32
4.2.3 <i>Estudo de sobrevivência por ensaio clonogênico</i>	34
4.3 Estudo dos efeitos do tartrolon D/E por citometria de fluxo	35
4.3.1 <i>Preparação das células</i>	35
4.3.2 <i>Estratégias de gates e análise dos dados</i>	35
4.3.3 <i>Avaliação da morfologia celular</i>	36
4.3.4 <i>Avaliação da perda da integridade de membrana</i>	37
4.3.5 <i>Avaliação da fragmentação de DNA</i>	38
4.3.6 <i>Avaliação da externalização da HSP70 na superfície da membrana plasmática</i> ..	39
4.3.7 <i>Avaliação da externalização da CRT na superfície da membrana plasmática</i>	40
4.3.8 <i>Avaliação da liberação do HMGB1</i>	41
4.4 Quantificação de ATP por kit de luminescência	42
5 RESULTADOS	44
5.1 Efeito antiproliferativo do tartrolon D/E	44
5.2 Avaliação de sobrevivência através do ensaio clonogênico	45

5.3	Avaliação dos efeitos do tartrolon D/E em células tumorais de melanoma metastático murino (B16-F10)	46
5.3.1	<i>Alterações na morfologia celular</i>	47
5.3.2	<i>Avaliação da integridade de membrana celular</i>	48
5.3.3	<i>Avaliação da fragmentação do DNA</i>	48
5.3.4	<i>Avaliação da externalização da HSP70 na superfície da membrana plasmática</i> ..	49
5.3.5	<i>Avaliação da externalização da CRT na superfície da membrana plasmática</i>	50
5.3.6	<i>Avaliação da liberação do HMGB1</i>	51
5.3.7	<i>Quantificação do ATP liberado</i>	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

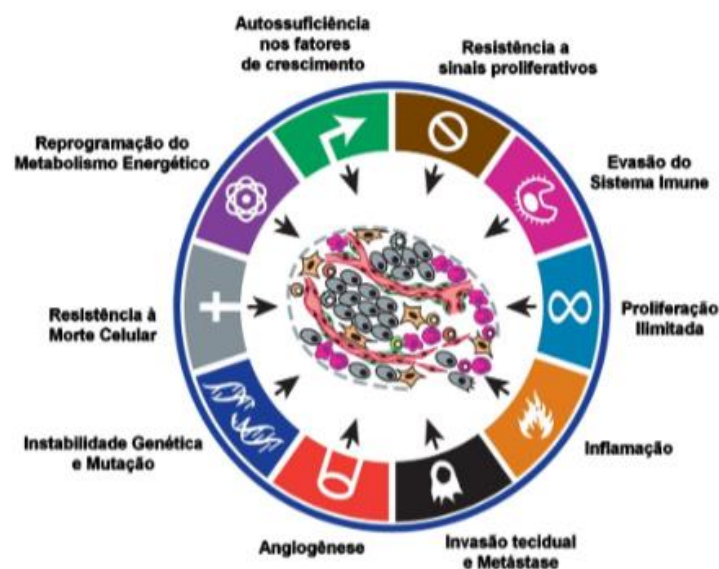
1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer, também conhecido por neoplasia ou tumores malignos, é uma doença que afeta a saúde pública em proporções mundiais devido à sua alta incidência e mortalidade, sendo a segunda maior causa de morte em todo o mundo. Pode ser caracterizado pelo crescimento e proliferação desordenada de células e pela capacidade que essas possuem de disseminar-se entre os tecidos e órgãos adjacentes, podendo ocorrer em qualquer parte do organismo (WHO, 2018).

Considera-se que as neoplasias possuem fatores que as permitem tal capacidade de crescimento tumoral e disseminação metastática, tais como: resistência à morte celular; autossuficiência proliferativa; evasão dos supressores de crescimento e do sistema imune; invasão tecidual e metástase; entre outros (Figura 1). Além disso, os tumores são compostos por tipos celulares diferentes que interagem entre si e formam um microambiente tumoral (MAT). O MAT apresenta células não tumorais como células do estroma, infiltrado leucocitário e vasos sanguíneos em expansão, os quais desempenham papel determinante no resultado da malignidade do tumor. Esses fatores fazem do câncer uma doença complexa e dificultam seu tratamento (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1: Características adquiridas por células neoplásicas para o desenvolvimento e progressão tumoral.



Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

O tratamento e cura do câncer podem ser influenciados pelo diagnóstico da doença, local de desenvolvimento dos tumores e tipos de tratamentos disponíveis para cada caso específico.

Ao longo das últimas duas décadas, a utilização de métodos convencionais como cirurgia, quimioterapia e radioterapia promoveu uma redução no índice de mortalidades (MILLER et al., 2016). Entretanto, o número de tumores que não respondem aos tratamentos disponíveis ainda é considerável, assim como os efeitos adversos que esses tratamentos podem ocasionar no organismo devido à alta toxicidade desses medicamentos, diminuindo a qualidade de vida do paciente. Além dos tratamentos convencionais, outras formas de tratamento englobam a terapia gênica e a utilização de imunobiológicos, contudo, o acesso da população a esses medicamentos ainda permanece limitado por serem de alto custo. Apesar dos inúmeros avanços na área da oncologia, é grande o interesse por novas estratégias terapêuticas que solucionem os problemas relatados e que possibilitem o tratamento de pacientes com câncer (SUI et al., 2013).

1.1.1. *Melanoma metastático*

O melanoma metastático é o tipo mais grave de câncer de pele, que se destaca devido ao grande aumento da sua incidência nas últimas décadas. Por muitos anos, a quimioterapia e cirurgia eram os tratamentos padrões para esse câncer e a falta de fármacos que explorassem as características imunogênicas desses tipos de tumores geraram respostas clínicas de baixa duração com uma sobrevida estimada de 6 meses a 1 ano nos pacientes tratados. Felizmente, esse cenário está sendo alterado com a inclusão de terapias alvo direcionadas e imunoterapias no tratamento de pacientes diagnosticados com melanoma metastático, mas os índices de mortalidade ainda permanecem altos, chegando a 1.791 casos em 2018, que correspondeu a 1,67% do total de mortes por câncer no Brasil (KOPPOLU; VASIGALA, 2018; QUEIROLO et al., 2019; INCA, 2020).

Entre os quimioterápicos disponíveis para o tratamento do melanoma, a dacarbazina e a temozolomida são os mais utilizados. Entretanto, as respostas terapêuticas não são eficientes, já que a resposta da dacarbazina geralmente é menor que 10% com sobrevida mediana inferior a 6 meses e, a temozolomida em muitos casos tem um efeito temporário. Outros tratamentos, que modulam o sistema imunológico, também eram amplamente utilizados no combate ao melanoma, como terapias com altas doses de interleucina-2 (IL-2), que eram responsáveis por 5-10% dos sobreviventes mais longos, porém sua toxicidade é muito alta (TEIMOURI; NIKFAR; ABDOLLAHI, 2013; LUKE et al., 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Recentes avanços na compreensão das vias de sinalização imunológicas dos tumores, permitiram o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, como os fármacos inibidores de *checkpoint* imunológico. Exemplo desse tipo de fármaco é o ipilimumabe, um anticorpo monoclonal bloqueador de CTLA-4, que é um receptor expresso em linfócitos T que quando

ativado regula negativamente a ativação dos linfócitos T e a inibe a secreção de IL-2. O bloqueio do receptor CTLA-4 pelo anticorpo monoclonal, permite a ação de células T e quebra a tolerância a antígenos tumorais, provocando uma resposta imunológica. O nivolumabe também é um inibidor de *checkpoint* imunológico que age bloqueando o receptor da morte programada (PD-1) e impedindo a ligação com o ligante de morte programada 1 (PD-L1) encontrado nas células cancerígenas, isso ocasiona a ativação de linfócitos T expostos ao antígenos e, conseqüentemente, uma potente resposta imune específica ao tumor. Em termos gerais, tais medicamentos agem inibindo a imunossupressão, assim, pode-se inferir que o sistema imunológico é capaz de eliminar células neoplásicas quando não está mais suprimido. Estudos comprovaram que pacientes que fizeram uso desses fármacos em monoterapia ou terapia combinada tiveram uma melhora considerável no tempo de sobrevivência, com um aumento superior a 50% em relação à média anterior de 5% (LARKIN et al., 2015; MAVERAKIS et al., 2015; QUEIROLO et al., 2019).

Outro fármaco amplamente utilizado atualmente é o vemurafenibe que é considerado uma terapia alvo-direcionada que bloqueia a função da tirosina quinase da $BRAF^{V600}$. Este tem sido bastante utilizado em pacientes com melanoma que possuem a mutações na $BRAF^{V600}$, estudos de fase III comprovam um benefício significativo na sobrevivência livre de progressão. Apesar de promover uma boa resposta, esse tratamento possui uma desvantagem em relação as imunoterapias por se limitar a pacientes que tenham esse tipo mutação específica, enquanto os inibidores de *checkpoint* imunológico são eficazes independentemente do *status* mutacional do BRAF (ROBERT et al., 2015; WONG; RIBAS, 2015; MILLER et al., 2016).

Devido a isso, as pesquisas por novas terapias para o melanoma metastático procuram focar em estratégias que estimulem a imunogenicidade característica desse tipo de tumor. Assim, acredita-se que imunoterapias agindo combinadas com quimioterapias ou como monoterapias podem aumentar a eficácia do tratamento de melanoma.

1.2. Morte celular imunogênica

Após as terapias anticâncer, as células em processo de morte podem ser reconhecidas como imunogênicas ou tolerogênicas pelo sistema imune. A maioria dos tratamentos atuais promove a morte das células através da ativação da via apoptótica. Esse tipo de morte é silenciosa para o sistema imunológico, ou seja, causa uma tolerância imunológica, sendo incapaz de produzir resposta específica para os antígenos das células mortas. A morte celular imunogênica foi notada nos últimos anos a partir da ação de alguns quimioterápicos de primeira linha, como antraciclina, oxaliplatina e bortezomib, e algumas formas de radioterapia, que

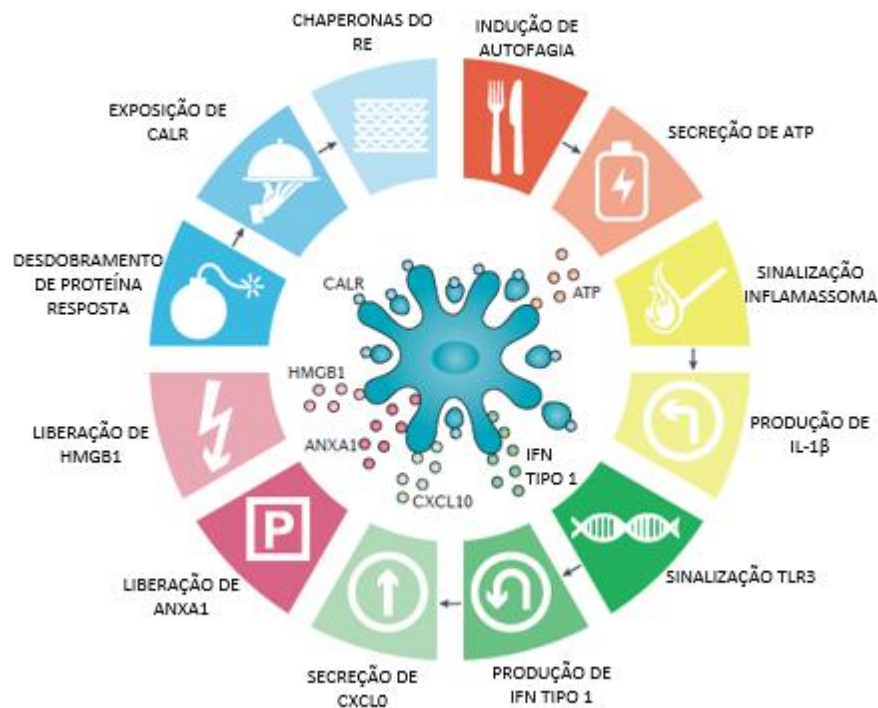
além de ter efeito citotóxico podem induzir o desenvolvimento da imunidade antitumoral, determinando uma maior eficácia terapêutica (GARG et al., 2013).

A morte celular imunogênica (MCI) é um subtipo de morte celular regulada que é caracterizada pela ativação do sistema imunológico adaptativo na presença de antígenos de morte celular, principalmente quando tais antígenos derivam de células cancerígenas. Isso é possível devido à liberação de sinais de perigo (DAMPs do inglês, *Damage-associated molecular patterns*) que são responsáveis pelo desbloqueio de uma sequência de eventos que levam a uma resposta imune tumor-específica, ocasionando um efeito melhor e mais duradouro em pacientes e promovem a vacinação contra tumores em modelos experimentais. Vale ressaltar que para tal tipo de morte celular ocorrer é necessário a plena indução de DAMPs pelas células cancerígenas além do funcionamento intacto do sistema imune para percepção dos efetores imunológicos (VANMEERBEEK et al., 2020).

Análises bioquímicas revelaram que os principais DAMPs presentes na MCI são a exposição de calreticulina (CRT) na superfície celular, a secreção de adenosina trifosfato (ATP) e a liberação de e uma proteína nuclear não histona, o HMGB1 (do inglês, *high mobility group box protein 1*) (DIEDERICH, 2019). É importante ressaltar que a indução de citotoxicidade e detecção desses três parâmetros são suficientes para fazer previsões sobre a capacidade dos medicamentos em induzir a MCI. Porém, outros DAMPs também estão relacionados a esse processo de morte celular, como as proteínas do choque térmico (HSP), interferons (IFN) do tipo I, anexina A1 (ANXA1), entre outros (Figura 2) (KEEP et al., 2014; GOMEZ-CADENA et al., 2016). Ensaio específicos podem ser realizados com células tumorais *in vitro* para verificar a presença dos DAMPs.

Os DAMPs não são moléculas funcionais ao sistema imune quando o organismo se encontra em homeostase, porém são liberados para o meio extracelular ou expostos na superfície da membrana em resposta a algum estresse celular, como o estresse de retículo endoplasmático (RE), a autofagia e a cadeia de apoptose, processos que podem ser visualizados na MCI (KROEMER et al., 2013; GALLUZZI et al., 2020).

Figura 2: Requisitos diferenciais para a imunogenicidade da morte celular. Vários processos foram vinculados à imunogenicidade da morte celular, incluindo a resposta à proteínas desdobradas e consequente exposição à calreticulina (CRT) e outras chaperonas do retículo endoplasmático (ER) na superfície celular; a ativação da autofagia e consequente secreção de adenosina trifosfato (ATP); a liberação de interleucina-1 β (IL-1 β) na sinalização do inflamassoma; a ativação do receptor Toll-like 3 (TLR3), resultante numa resposta de interferon do tipo I (IFN) que estimula a produção do ligante 10 da CXC-quimiocina (CXCL10); assim como o liberação da proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) e da anexina A1 (ANXA1).



Fonte: adaptado de GALLUZZI et al., 2016.

A exposição da CRT na superfície externa da membrana plasmática é ocasionada em resposta ao estresse de RE e é um evento pré-apoptótico, ou seja, precoce da MCI, ocorrendo antes da externalização da fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*). Os mecanismos para esse evento parecem envolver 3 módulos de sinalização diferentes, como: 1- o módulo apoptótico que envolve a ativação de caspase 8 e clivagem seguida de ativação da proteínas pró-apoptóticas da família do Bcl-2, Bax e Bak; 2- a fosforilação do fator de iniciação de tradução em eucariotos 2A (EIF2A, do inglês *eukaryotic translation initiation fator 2A*) e síntese de proteínas represada no RE; e 3- módulo de exocitose onde são requeridos componentes do citoesqueleto incluindo actina, proteína associada a vesículas de membrana 1 (VAMP1, do inglês *vesicle-associated membrane protein 1*) e a proteína de 25 KDa associada ao sinaptossoma (SNAP25, do inglês *synaptosomal-associated protein, 25 KDa*), ambas relacionadas ao tráfego de vesículas intracelulares (KEEP et al., 2014).

A CRT co-expressa com a ERp57 (também conhecido como PDIA3, do inglês *protein disulfide isomerase family A member 3*) na superfície da membrana plasmática funciona como um sinal “coma-me” para células fagocíticas, ou seja, torna os fagócitos sensíveis a ativação e maturação após ligação com seu receptor, o CD91 (também conhecido por LRP1, do inglês *low density protein receptor-related protein 1*) (GALLUZZI et al., 2016). Outras chaperonas como a Hsp70 e Hsp90 estão localizadas no meio intracelular e quando são expressas na membrana plasmática tem função semelhante a CRT, ou seja, funcionam como um sinal imunogênico facilitando a ativação das CDs ou atuam como veículo para exposição ao antígeno (LI, 2018).

Outro DAMP necessário na MCI é o ATP, cuja liberação para o meio extracelular é facilitada pelo processo de apoptose e autofagia. Pelo processo autofágico ocorre a realocação do ATP vesicular dos lisossomos para autolisossomos, seguido da redistribuição da proteína de membrana de lisossomo 1 (LAMP1, do inglês *lysosomal-associated membrane protein 1*). A liberação propriamente dita do ATP, ocorre com a formação de *blebbings* mediados por ROCK1 e miosina-II, bem como pela abertura de canais de panexina 1 (PANX1) (KEEP et al., 2014). Os canais de PANX1 também têm um papel fundamental na liberação do ATP em células apoptóticas. Assim, os níveis extracelulares de ATP são significativamente mais altos quando a autofagia e apoptose acontecem simultaneamente (MARTINS et al., 2014; LI 2018).

Quando fora da célula, o ATP constitui um sinal “encontre-me” e pró-inflamatório através da interação com os receptores purinérgicos P2YR2 e P2XR7 das células dendríticas. O P2YR2 exerce função quimioatraente para o recrutamento de células apresentadoras de antígenos, assim como na diferenciação destas. O ATP, via receptores purinérgicos P2XR7, também promove a ativação de inflamassoma formado por receptores NOD (NLR) do tipo 3 (NLRP3) citoplasmáticos. A ativação deste tipo de inflamassoma estimula a liberação de IL-1 β e IL-18 pelas células apresentadoras de antígenos, importantes para a resposta imune inicial (MARTINS et al., 2014; GALLUZZI et al., 2016).

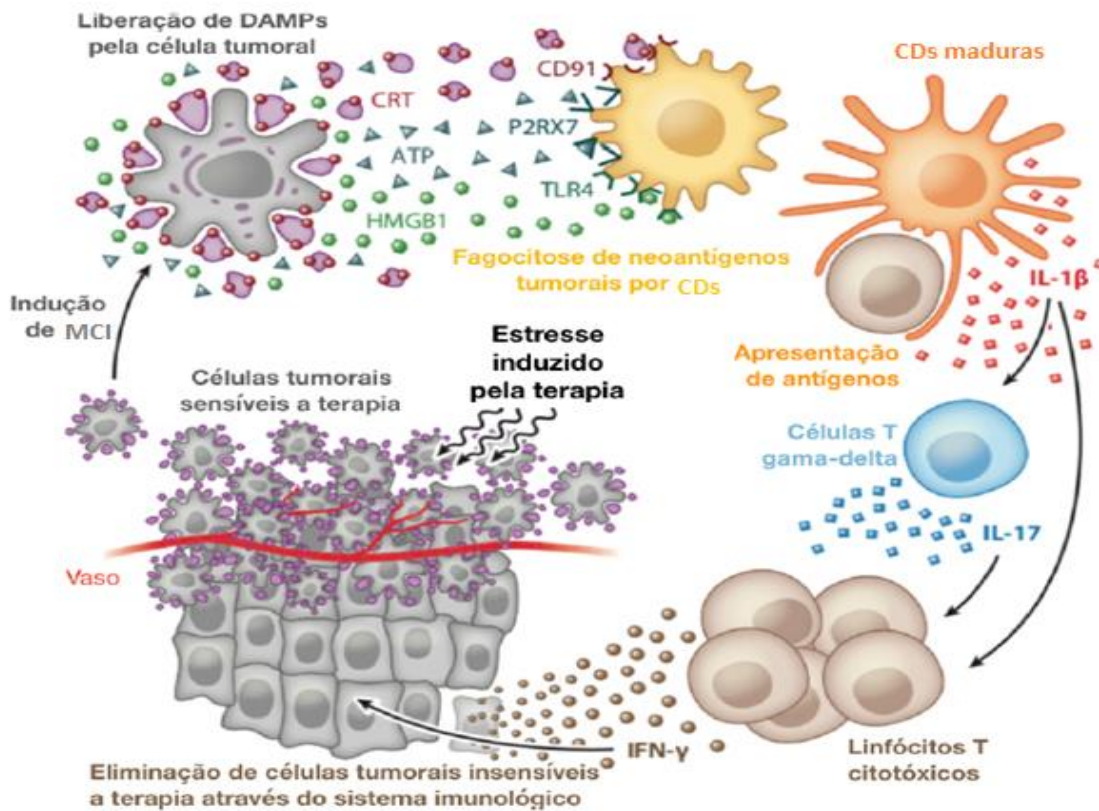
Além dos DAMPs já citados, o HMGB1 no meio extracelular atua como um potente indutor pró-inflamatório. A liberação de HMGB1 por células em processo de morte requer, principalmente, a permeabilização das membranas nucleares, já que o HMGB1 está localizado no núcleo, e membrana plasmática das células, sendo, portanto, um evento que ocorre na fase tardia de morte celular, quando as células sofrem necrose secundária (WANG et al., 2018). Sua resposta inflamatória é gerada a partir da ligação ao receptor semelhante ao toll (TLR, do inglês *toll-like receptor*) tipo 2 (TLR-2) e ao tipo 4 (TLR-4), bem como ao receptor específico de glicosilação avançada de produto final (RAGE, do inglês *receptor for advanced glycation endproducts*). Para uma resposta imune é requerida a ligação ao TLR-4, pois estudos revelam

que a vacinação foi abolida em modelo *knockout* para TLR-4, mas os resultados permaneceram na ausência dos demais receptores (APETOH et al., 2007; GALLUZI 2018). Ademais, o HMGB1 também exerce atividade quimiotática formando um complexo com a quimiocina CXCL12 com sinalização através do receptor CXCR4 (KEPP et al., 2014).

A liberação dos DAMPs durante a MCI deve ocorrer em uma sequência espaço temporal definida de forma que primeiramente ativem as células dendríticas (CDs) que são responsáveis por englobar, processar e apresentar os antígenos de células tumorais para os linfócitos T (CD8+). As CDs ativadas também realizam apresentação de antígenos cruzada para células T $\alpha\beta$. Além disso, secretam interleucina (IL) 1 β (IL-1 β) que ativa células T $\gamma\delta$, essas secretam IL-17, contribuindo para o processo de ativação das células T citotóxicas $\alpha\beta$. Tanto as células T $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$ produzem interferon gama (IFN- γ), granzima e perforina, que são responsáveis pela eliminação das células tumorais (Figura 3). O resultado desses processos ocasiona a ativação do sistema imune, onde algumas células adquirem o fenótipo de memória, conferindo proteção imunológica de longa duração (KEEP et al., 2014).

Além dos testes *in vitro* para a detecção de DAMPs, a avaliação da ativação de células apresentadoras, em cultura, co-cultivadas com células mortas por alguma molécula indutora dos DAMPs, também pode ser utilizada neste contexto para a melhor caracterização fenotípica dos estudos. Porém, os ensaios *in vivo* ainda são os únicos testes válidos para demonstrar e comprovar de fato a indução de MCI experimentalmente. Estes incluem experimentos de vacinação, bem como de avaliação de resposta terapêutica em animais imunocompetentes e imunodeficientes (VANMEERBEEK et al., 2020).

Figura 3: Mecanismos envolvidos na morte celular imunogênica (MCI). Liberação dos sinais de perigo associados a danos (DAMPs do inglês, *danger-associated molecular patterns*): calreticulina (CRT), adenosina trifosfato (ATP) e proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) que ligam-se respectivamente aos receptores CD91, P2XR7 e TLR4 das células dendríticas (CDs). Isto facilita o recrutamento de CDs para o tumor, estimulado pelo ATP (via P2YR2, não representado na figura), a fagocitose dos antígenos pelas CDs, estimulada pela CRT, e a otimização da apresentação de antígenos para células T, estimulada pelo HMGB1. Esses processos resultam em uma resposta imune adaptativa de células T citotóxicas $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ produtoras de interferon gama (IFN- γ), dependente de interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 17 (IL-17).



Fonte: adaptado de KROEMER et al., 2013.

1.3. Produtos naturais marinhos

Os produtos naturais são substâncias produzidas ou derivadas de algum ser vivo que possuem alguma atividade biológica. O papel dos produtos naturais como fonte de novos medicamentos tem sido reconhecido desde os tempos mais antigos e ainda se tem muitas pesquisas relacionadas a atividade biológica, a fim de encontrar aplicação para as moléculas isoladas de fontes naturais através do seu uso na indústria farmacêutica, podendo levar a descoberta de inovadoras terapias para os mais diversos tipos de doença (SHINDE; BENERJEE; MANDHARE, 2019).

Os avanços provenientes da biotecnologia juntamente com o emprego de técnicas modernas de bioquímica facilita a obtenção de novos protótipos bioativos. Avalia-se que 60%

dos fármacos em uso são produtos naturais ou derivados da natureza. Cragg e colaboradores (2018) indicaram que os fármacos já descobertos com esse perfil terapêutico são utilizados, principalmente, para tratamento de doenças infecciosas e neoplásicas. Nesse seguimento, o habitat marinho pode ser considerado uma fonte natural interessante para prospecção de biomoléculas com potencial farmacológico, já que a maior parte da superfície terrestre é coberta por mares e oceanos, correspondendo a um dos maiores reservatórios de biodiversidade (GUERRA, 2015).

A partir do estudo dos produtos naturais marinhos foi possível verificar uma diversidade de alvos moleculares, indicando o potencial farmacológico e terapêutico dessas moléculas, podendo ser aplicado principalmente no tratamento de neoplasias, de forma que já são disponibilizadas fármacos no setor farmacêutico para uso clínico em diversos tipos de câncer (JIMENEZ et al., 2019). Dentre esses medicamentos destacam-se arabinonucleosídeo isolado da esponja *Tethya crypta*, Ara-C (Cytosar®), o alcalóide trabectedina (Yondelis®), isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, o mesilato de eribulina (Halaven®), isolado da esponja *Halichondria okadai*, e o anticorpo anti-CD30 conjugado a um derivado de uma dolastatina, o mesilato de eribulina (Acetris®), família química descoberta em estudos com o molusco *Dolabella auricularia* (JIMENEZ, WILKE, COSTA-LOTUFO, 2018; WILKE et al., 2020).

Os microrganismos marinhos tem se mostrado interessantes fontes para busca por moléculas com aplicação farmacológica devido à variedade de compostos que podem possuir. Além disso, o uso de microrganismos apresenta uma perspectiva de sustentabilidade, pois esses seres podem fornecer uma grande quantidade de material a partir da sua fermentação, o que é interessante para produção suficiente de moléculas para os testes pré-clínicos e clínicos (JIMENEZ et al., 2019). Os actinomicetos são bactérias Gram positivas notórias por produzirem diversos metabólitos secundários. A salinosporamida A, isolada do actinomiceto marinho *Salinispora tropica*, foi o composto que chegou à fase de testes pré-clínicos rapidamente, já que todo o processo desde a descoberta até o início dos testes clínicos durou apenas três anos. Esse feito deve, dentre outros, ao fato desse composto ter sido suprido pela fermentação bacteriana, comprovando que essa técnica é eficiente para obtenção dos compostos, além de possuir o melhor custo-benefício quando comparada a outras técnicas desenvolvidas (FENICAL et al., 2008).

Estudos na área marinha favorecem a exploração e aplicação da rica biodiversidade marinha, que ainda é pouco conhecida, além de ser clara a importância das substâncias produzidas por organismos marinhos e da consequente aplicação no desenvolvimento de novos fármacos para a terapia do câncer.

1.3.1. *Tartrolon D/E*

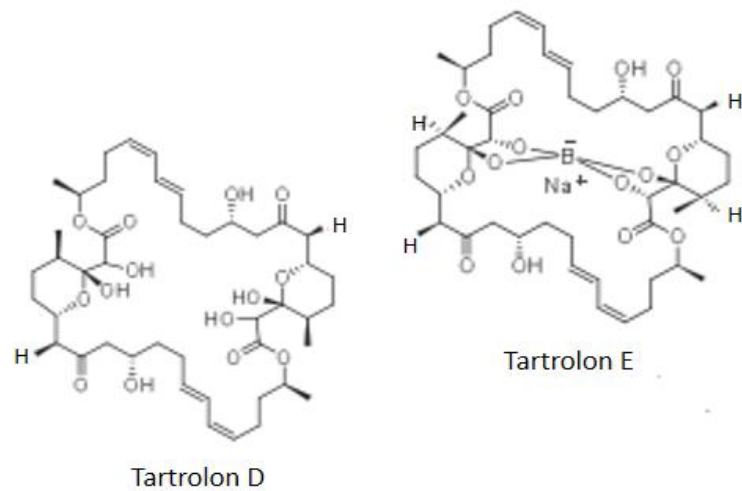
Os tartrolons são uma classe de macrolídeos simétricos, dímeros ou pseudo-dímeros que consistem em duas cadeias policetídeos unidas como diésteres. Esses compostos são interessantes por possuírem propriedades biológicas relevantes, como antimicrobiana, inseticida e citotóxica.

Os primeiros tartrolons isolados foram o A e o B em 1994 por Reichenbach et al., (1995), a partir de uma cultura da bactérias *Sorangium cellulosum* e, posteriormente, foi verificado a atividade antimicrobiana desses compostos. Em 2003, outro composto da família, o tartrolon C, foi isolado de uma espécie de *Streptomyces* e a partir desse composto foi verificado uma nova atividade biológica, a inseticida.

O tartrolon D foi isolado inicialmente em 2009 por um membro da empresa farmacêutica PharmaMAR a partir actinomiceto *Streptomyces sp.* MDG-04-17-069, isolado de um sedimento marinho localizado a 30 metros de profundidade e recolhido na leste costa de Madagascar. Sua fórmula molecular foi definida com $C_{44}H_{68}O_{14}$ (Figura 4) (PÉREZ et al., 2009).

Em 2013, Elshahawi e colaboradores conseguiram isolar o tartrolon D e seu derivado, o tartrolon E, de culturas de uma linhagem da bactéria *T. turnerae* (T7901), endossimbionte de teredinídeos de diversas espécies. A diferença na estrutura química desses compostos é a presença do boro no tartrolon E (figura 4) e ambos demonstraram ação inibitória contra bactérias. Além da atividade antimicrobiana já conhecida, o tartrolon D também apresentou potencial citotóxico contra algumas linhagens de células tumorais (PÉREZ et al., 2009). Em relação ao tartrolon E, O'Connor e colaboradores (2020) recentemente publicaram um estudo mostrando uma atividade antiparasitária contra alguns protozoários do grupo Apicomplexa, como *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium*.

Figura 4: Estrutura química do tartrolon D e E.



Fonte: Adaptado de Elshahawi et al., 2013.

Em um trabalho desenvolvido recentemente pelo nosso grupo, o potencial citotóxico do tartrolon D/E foi testado em células tumorais de carcinoma colorretal (linhagem HCT116) e foi verificado que durante o processo de morte celular esse composto é capaz de aumentar consideravelmente a granulosidade das células, supondo, então, que o tartrolon D/E pode provocar algum tipo de estresse celular (BRITO, 2018). Além disso, não há estudos publicados em artigos sobre o mecanismo de ação da atividade citotóxica de tartrolons até o momento.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das maiores enfermidades atuais em todo o mundo e apesar das inúmeras drogas utilizadas para o seu tratamento e do sucesso terapêutico de muitas delas, ainda existem alguns tipos de câncer que carecem de uma terapia eficaz ou de melhores opções terapêuticas.

A quimioterapia e, mais recentemente, a imunoterapia têm se constituído importantes estratégias para o tratamento contra o câncer. A quimioterapia é, dentre as modalidades de tratamento, a que possui maior incidência de cura de muitos tumores, assim como a que mais aumenta a sobrevida dos portadores de câncer, embora ocasione diversos efeitos colaterais. Os imunoterápicos representam atualmente o maior número de moléculas em desenvolvimento para a composição de novos fármacos. A imunoterapia consiste de diferentes estratégias que tenham a finalidade em comum de ativar uma resposta imunológica antitumoral. Esse tipo de terapia vem ganhando destaque por produzir respostas potentes e eficientes, além de diminuir os efeitos colaterais. Entretanto, apesar de vantajosa, ainda se encontra com uso limitado devido ao seu alto custo e, portanto, diminui a taxa de pessoas que se beneficiam com esse tratamento em relação ao uso de quimioterápicos. Baseado nisso, novas estratégias de imunoterapia, assim como a elucidação de efeitos imunogênicos da quimioterapia têm sido estudados, tentando obter respostas melhores e mais duradouras nos pacientes com câncer (CHEN; CHANG; CHENG, 2017; YU et al., 2019).

Adicionando a este cenário o fato que os pacientes com melanoma metastático respondem melhor a imunoterapia, a indução de MCI apresenta-se como uma estratégia para o desenvolvimento de quimioterápicos para estes tumores, pois é capaz de combinar a citotoxicidade necessária em um tratamento para câncer com a ativação do sistema imunológico contra as células neoplásicas. Assim, a identificação de moléculas que induzam MCI configuram uma estratégia importante para aumentar o poder de translação de estudos pré-clínicos, além de apresentar alto potencial de melhora das respostas em tratamentos associados com imunoterápicos.

Na busca por fármacos para a terapia do câncer, os produtos naturais marinhos se mostram uma interessante fonte de moléculas terapêuticas, como já é comprovado pelos fármacos em uso clínico, como a citarabina e a trabectedina, e pelas moléculas que vem sendo isoladas e testadas, como é o caso do composto tartrolon D/E que apresenta citotoxicidade como atividade biológica (BRITO, 2018; JIMENEZ et al., 2019; WILKE et al., 2020). Dessa forma, estudos que analisem a possível indução de MCI como aplicação das moléculas derivadas de organismos marinhos podem ser bastante promissores.

Devido a dificuldade de correlação entre alvo, estrutura-atividade e ferramentas *in silico* confiáveis, esses estudos, requerem testes através de ensaios fenotípicos com os marcadores celulares para MCI *in vitro* e ensaio de vacinação *in vivo*. Devido a questões, sobretudo, éticas o protocolo de estudo desse tipo de morte celular é verificar os DAMPs envolvidos no mecanismo de morte celular em modelos *in vitro*. Posteriormente pode-se realizar a confirmação da indução de MCI realizando ensaio de vacinação *in vivo* com as células tratadas pelo composto selecionado por abordagem *in vitro*. Baseando-se nisso e nos resultados preliminares de Brito, 2018, a pergunta de partida para o presente estudo foi se o tartrolon D/E induz a liberação de DAMPs envolvidos na morte celular imunogênica em melanoma metastático.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a indução dos características associadas à morte celular imunogênica pelo tartrolon D/E em linhagem de melanoma metastático.

3.2. Objetivos específicos

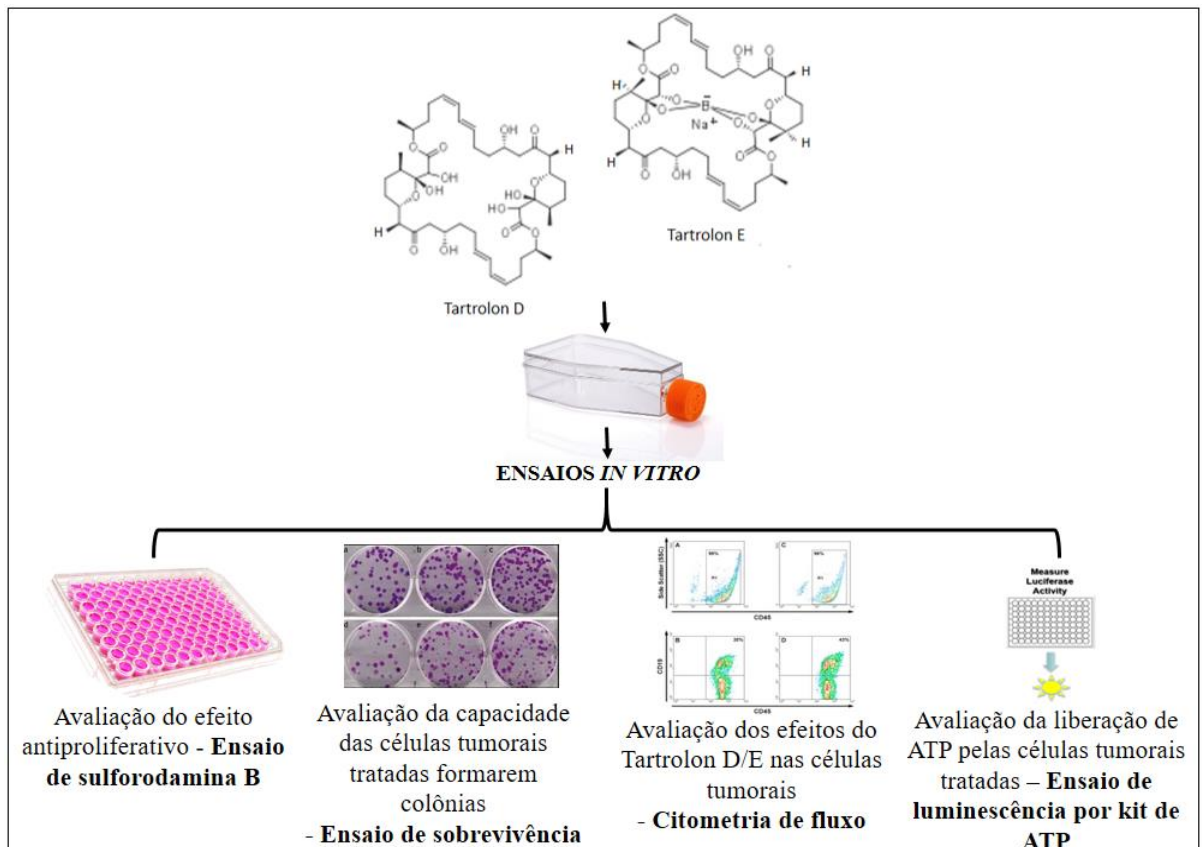
- Avaliar o efeito antiproliferativo *in vitro* do tartrolon D/E sobre células de melanoma metastático murino;
- Analisar as alterações morfológicas, integridade da membrana e a fragmentação do DNA *in vitro* em células da linhagem B16-F10 incubadas com o tartrolon D/E;
- Avaliar a exposição dos marcadores de morte celular imunogênica externalizados na membrana plasmática CRT e Hsp70 *in vitro* em linhagem de células B16-F10 tratadas com tartrolon D/E;
- Avaliar a liberação os marcadores de morte celular imunogênica HMGB1 e ATP *in vitro* em células da linhagem B16-F10 tratadas com o tartrolon D/E.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planejamento Experimental

O composto tartrolon D/E utilizado nesse estudo foi produzido pela cepa bacteriana *Teredinibacter turner* T7901 no Departamento de Farmacologia da Universidade de Utah nos EUA e cedido pela profa. Margo Haygood. A atividade antiproliferativa desse composto foi avaliada utilizando o ensaio da sulforodamina B e o ensaio de sobrevivência em linhagem de células tumorais melanoma metastático murinho (B16-F10). Após a identificação da atividade antiproliferativa do tartrolon D/E, foi realizado o estudo dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade por citometria de fluxo. Para tal, analisaram-se alterações na morfologia, na integridade da membrana e a fragmentação do DNA em células tumorais da linhagem B16-F10 incubadas com a amostra por 24 horas. Também foi utilizado citometria de fluxo para análise de marcadores de MCI como liberação dos DAMPs HMGB1, CRT e HSP-70 e ensaio de luminescência para detecção de ATP.

Figura 5: Planejamento experimental. Ensaios *in vitro* que foram realizados a fim de verificar os efeitos do tartrolon D/E em células tumorais de melanoma metastático murino linhagem B16-F10.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

4.2.1 *Cultivo das células*

O melanoma metastático murino (linhagem B16-F10) foi o tipo de célula cancerígena utilizada nos experimentos de avaliação da atividade citotóxica, assim como nos demais experimentos necessários para realização desse trabalho. Tal linhagem celular foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura DMEM (Lonza) complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100 µg/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) (Gibco).

As culturas foram manuseadas em câmaras de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2; VECO, modelo Biosafe 12 classe II) e mantidas em incubadoras de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (SAYNO, modelo MCO-19AIC; NUAIRE, modelo TS Autoflow). O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM 400; Nikon, modelo Diaphot) e o repique para meio de cultura novo foi feito quando necessário. Para o desprendimento das células aderidas utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em tampão fosfato salino (PBS) (do inglês phosphate buffered saline) (FRESHNEY, 2005).

4.2.2 *Ensaio da Sulforodamina B*

Princípio do método:

A Sulforodamina B (SRB) é uma aminoxantina de cor rosa brilhante, que possui dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos, sobretudo básicos, das células que foram fixadas em condições ácidas. Assim, o corante SRB é utilizado como um indicador quantitativo do conteúdo proteico das células, de forma que a diminuição ou aumento do número de células resulta numa alteração proporcional da quantidade de corante, que é medido através de absorvância e permite inferir a citotoxicidade causada pelo compostos nas células incubadas com o mesmo (SKEHAN *et al.*, 1990).

Procedimento experimental:

Para a realização desse ensaio, as células foram plaqueadas 24 horas antes da adição da amostra teste em placas de 96 poços na densidade de 3×10^4 céls/mL. Em uma análise inicial, o tartrolon D/E foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,4%, e testado quanto ao seu efeito

antiproliferativo em células B16-F10 em concentrações de 1,5 μM a 60 μM (fator de diluição 2), e foram incubadas com as células em volume final de 200 μL durante 24, 48 e 72 h, em estufa a 5% de CO_2 a 37°C. Ademais, o quimioterápico doxorubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo na concentração inicial de 10 μM com fator de diluição 5, e as células do controle negativo foram tratadas apenas com o veículo (DMSO 0,4%).

No momento em que as células foram tratadas, a placa tempo zero (não tratada) foi fixada com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, e a placa foi reservada a uma temperatura de 4 °C por no mínimo 1h, para que em seguida realização da coloração com SRB.

Após o tempo de incubação, 24, 48 e 72 horas, o sobrenadante das células foi retirado e as mesmas foram também fixadas com TCA a 10%, sendo então guardadas a uma temperatura de 4°C por no mínimo 1 hora. Após o período de fixação, as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada e em seguida esperou-se a secagem dos poços até que não houvesse umidade aparente. Em seguida adicionaram-se 100 μL da solução de SRB a 0,4%, e as placas então foram mantidas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C por 30 minutos. Ao término do tempo de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes usando ácido acético a 1% para remover o excesso de SRB que não ficou ligado aos aminoácidos celulares. Já as paredes dos poços foram limpas cuidadosamente para remover qualquer excesso de SRB que pudesse falsear o teste.

Para realizar a leitura das placas, o SRB que estava ligado aos aminoácidos fixados, foi solubilizado em 200 μL de tampão tris base 10 mM a 4°C, e homogeneizadas em mesa agitadora por pelo menos 10 minutos, em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em leitor de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 570 nm.

Análise dos dados:

Primeiramente, foi feita uma normalização dos dados no programa excel considerando se o efeito obtido em cada dado era citostático ou citotóxico a partir das seguintes equações:

Se $T \geq T_0$ e $< \text{CN}$, o efeito é citostático:

$$\text{Fórmula: \% proliferação celular} = 100 \times (T - T_0) / (\text{CN} - T_0)$$

Se $T < T_0$, o efeito é citotóxico:

$$\text{Fórmula: \% proliferação celular} = 100 \times (T - T_0) / T_0$$

Onde: T: Absorbância das células incubadas com a amostra, T_0 : Absorbância das células da placa tempo zero, CN: Absorbância das células do controle negativo (DMSO).

Para análise de inibição de proliferação celular, os dados normalizados foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios-padrão. Para a análise das amostras testadas em diluição seriada, em triplicatas, um gráfico de absorbância x concentração foi plotado para

determinação da inibição do crescimento celular em 50% (CI₅₀) com seu efeito citostático, a inibição do crescimento total (CIT) e seu efeito citotóxico com a concentração letal média (CL₅₀) a partir de interpolação de regressão não-linear no GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0).

4.2.3 Estudo de sobrevivência por ensaio clonogênico

Princípio do método:

A perda de capacidade reprodutora e a incapacidade de células proliferarem indefinidamente podem ser observados no ensaio clonogênico. Isso o torna o método mais confiável para a avaliação da toxicidade *in vitro*, pois difere de outros testes de viabilidade que mensuram um efeito biológico específico. Trata-se de um ensaio *in vitro* baseado na capacidade de uma única célula se dividir e formar uma colônia. Assim, esse ensaio determina a capacidade de uma célula proliferar indefinidamente, retendo assim a sua capacidade de reprodução para formar uma colônia. O crescimento de uma única célula formando uma colônia corada com cristal violeta, que pode ser visualizada inclusive a olho nu, comprova a sua capacidade de se reproduzir (MELCHIOR et al., 2016).

Procedimento experimental:

Para a realização desse teste, foram semeadas 500 células B16-F10 por poço em placas de 6 poços, contendo 3 mL de meio DMEM completo por poço. Após 24h do plaqueamento, as células foram incubadas com tartrolon D/E nas concentrações de 12 e 25 µM por um período de 24 e 48h. Dois quimioterápicos foram utilizados nesse teste como controles positivos, a doxorrubicina a 0,6 µM e a mitoxantrona a 4 µM, enquanto o controle negativo foram células expostas apenas com o veículo (DMSO 0,4%). Após os períodos de exposição às substâncias, o meio de cada poço foi trocado por um meio completo apenas. As placas ficaram em observação por cerca de 6 dias, quando pelo menos um dos poços do controle negativo atingiu a confluência necessária, o meio de cultura foi removido, os poços lavados 2X com PBS e adicionou-se o corante cristal de violeta (0,5% cristal de violeta em metanol 50% e água destilada) sob agitação por 1h. Em seguida foram feitas 3-5 lavagens com água destilada até total remoção do corante, as placas em seguida foram deixadas em temperatura ambiente por cerca de 1h para secagem total.

Análise de dados:

As colônias foram contadas com o auxílio de microscópio estereoscópio, considerando uma colônia a partir de 30 células. Os dados obtidos foram colocados no programa GraphPad Prism para verificar a diferença entre os grupos.

4.3 Estudo dos efeitos do tartrolon D/E por citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo permite a avaliação de múltiplas características de células individuais simultaneamente. O citômetro emite um feixe de luz (*laser*) direcionado a um meio líquido em fluxo que incide sobre as células individualmente, permitindo a detecção dos sinais desviados por cada célula. Os detectores são capazes de registrar desvios na dispersão linear (FSC, do inglês *Forward Scatter*) ou lateral (SSC, do inglês *Side Scatter*) da luz, além de captar a fluorescência emitida pelos marcadores utilizados, classificando as células de partículas com cada evento (GIVAN, 2004). O citômetro de fluxo utilizado nos testes foi o FACSVersé (BD Biosciences).

4.3.1 Preparação das células

Para os testes de citometria de fluxo as células B16-F10 foram incubadas com o tartrolon D/E na concentração de 12 μM por um período de 24 horas. O controle negativo constituiu-se de células tratadas com DMSO 0,4% e controle positivo consistiu por células tratadas com doxorrubicina a 0,6 μM , também com 24 horas de tratamento. Em alguns testes, como de avaliação do DNA fragmentado, foi utilizado o quimioterápico mitoxantrona na concentração de 4 μM como controle positivo.

Sobre a preparação das amostras, inicialmente as células aderidas em uma placa de 24 poços foram incubadas com 100 μL de tripsina 0,05% por poço para desaderirem da placa e, posteriormente, foram transferidas para um microtubo identificado que contém meio de cultura, tentando recuperar o máximo possível de células. Após a centrifugação dos microtubos por 5 minutos a 1500 rpm, remove-se o sobrenadante e ressuspende-se o *pellet* de células em tampão FACS (solução salina contendo 2% de SBF), adicionando-se o fluocromo. Os detalhes dos protocolos de cada teste estão descritos nos itens abaixo.

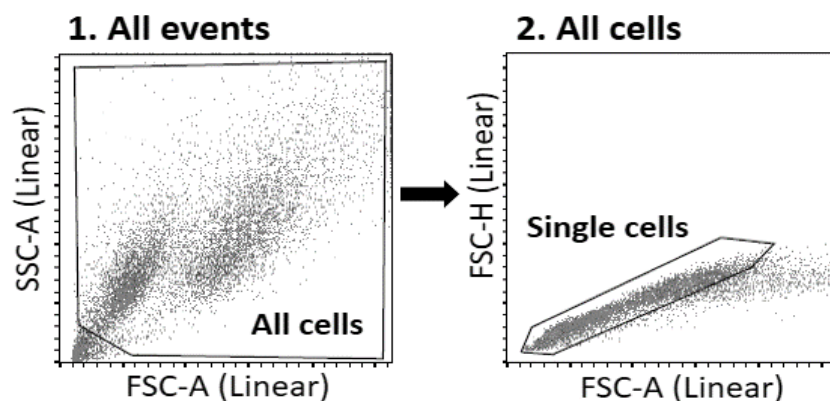
4.3.2 Estratégias de gates e análise dos dados

Após a marcação adequada, 10 mil eventos (sem *debris* e *doublets*) foram adquiridos no citômetro de fluxo para avaliação dos testes citados abaixo. Inicialmente foi criado um gráfico

de pontos (*dot plot*) com parâmetros de morfologia (FSC vs SSC) contendo todos os eventos adquiridos pelo citômetro (*all events*) onde foi criada uma região de seleção (*gate*) contendo todas as células adquiridas (*all cells*) de forma a excluir os *debris e outliers*. Em um novo gráfico contendo apenas a população de *all cells* criou-se um *gate* para selecionar os eventos simples (*single cells*) através da plotagem de 2 medidas do parâmetro FSC (Figura 6). Esses gráficos e *gates* (*all cells e single cells*) são comuns pra todos os testes de citometria e a partir de *single cells* que são criados os específicos de cada experimento. Ademais, os dez mil eventos celulares adquiridos foram referentes à população de *single cells* e foram contados de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise.

Os resultados de todos os testes foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star Inc), sendo, então, obtidos os valores em % das populações ou em intensidade mediana de fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*), dependendo do teste em questão. Esses valores foram analisados estatisticamente no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0), onde inicialmente foi realizado o teste de normalidade Shapiro-wilk para verificar se os dados de cada teste eram paramétricos ou não-paramétricos. Para verificação da ocorrência de diferenças estatísticas entre os diferentes grupos, os dados paramétricos foram analisados por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnet, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Figura 6: Estratégia de *gates* para citometria de fluxo. Gráficos em formato *dot plot* contendo os *gates* de *all cells* e *single cells* que são comuns de todos os testes realizados por citometria de fluxo e que foram obtidos a partir de parâmetros de morfologia.

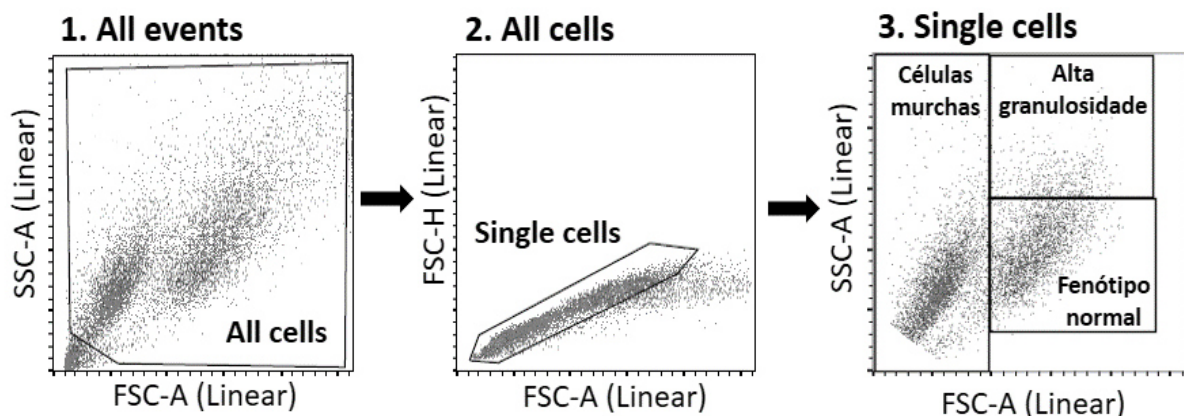


Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.3 Avaliação da morfologia celular

A avaliação da morfologia celular indica os possíveis efeitos que uma molécula pode provocar nas células. As células tumorais B16-F10 incubadas com tartrolon D/E foram desaderidas da placa por tripsinização e repassadas para um microtubo para que a avaliação de alterações morfológicas pudesse ser realizada utilizando o citômetro. Para essa análise não é necessário a utilização de fluorocromos, o que é considerado é a dispersão frontal (FSC), que indica o tamanho ou volume celular, e a dispersão lateral (SSC), correlacionada com a complexidade interna ou granulosidade. Os dados obtidos na citometria de fluxo foram analisados no programa FlowJo como mostrado na figura 7 e a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism obedecendo os testes descritos acima (item 4.3.2).

Figura 7: Estratégia de *gates* para análise da morfologia celular. A partir do *gate* de *single cells* é criado um novo gráfico *dot plot* selecionando os parâmetros de morfologia (FSC vs SSC). Nesse gráfico é feito os *gates* para seleção das populações de células murchas, granulosas e normais. Esses *gates* indicam a % de cada população, que são os valores analisados estatisticamente.



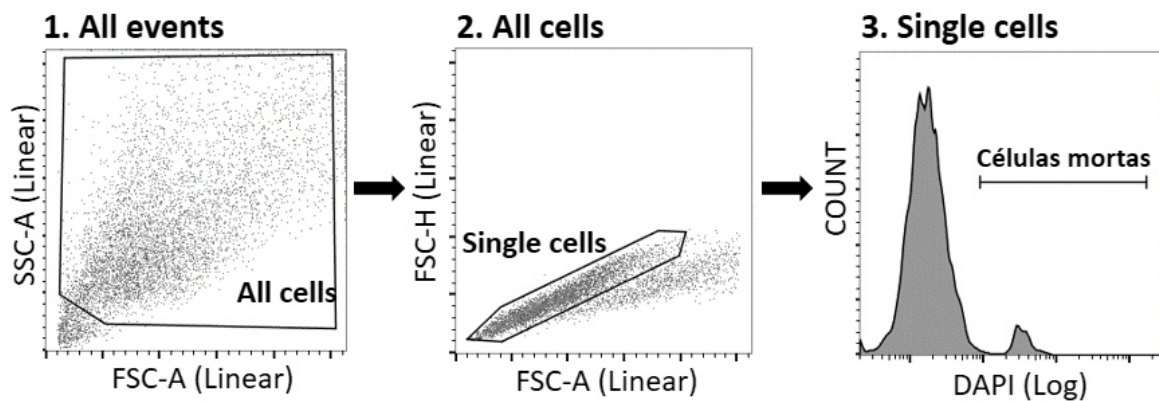
Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.4 Avaliação da perda da integridade de membrana

As células mortas perdem integridade da membrana plasmática tanto por necrose como por necrose secundária a apoptose em modelos *in vitro*. Para a avaliação da integridade da membrana plasmática foi utilizado o fluorocromo DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) que possui fluorescência violeta com excitação aproximada de 355 nm e emissão a cerca de 457 nm. Esse fluorocromo se liga seletivamente ao DNA de fita dupla e forma complexos DNA-DAPI fortemente fluorescentes com alta especificidade, mas só consegue penetrar células que já estejam com a membrana plasmática rompida, assim, as células cujas membranas estão íntegras não emitem fluorescência. Desta forma, é possível a identificação de células mortas pela detecção da fluorescência (HAMADA, FUGITA, 1983).

Após a preparação das células, o *pellet* obtido foi ressuspensão em 300 μL de uma solução de DAPI a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluído em PBS. Após 10 minutos de incubação, as amostras foram lavadas com PBS para retirar o excesso de DAPI e, em seguida, foram analisadas em citômetro de fluxo. A intensidade de emissão de fluorescência correlaciona com a quantidade de células que já estão com a membrana rompida. Posteriormente, os dados obtidos na citometria foram analisados no programa FlowJo (Figura 8) e a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como indicado anteriormente (item 4.3.2).

Figura 8: Estratégia de *gates* para análise da integridade da membrana celular. A partir do *gate* de *single cells* é criado um novo gráfico de histograma selecionando o filtro correspondente a fluorescência do DAPI. Nesse gráfico é feito o *gate* para seleção da população de células mortas ou com a membrana rompida. Esse *gate* indica a % de células mortas, que é o valor analisado estatisticamente.



Fonte: Elaborado pela autora

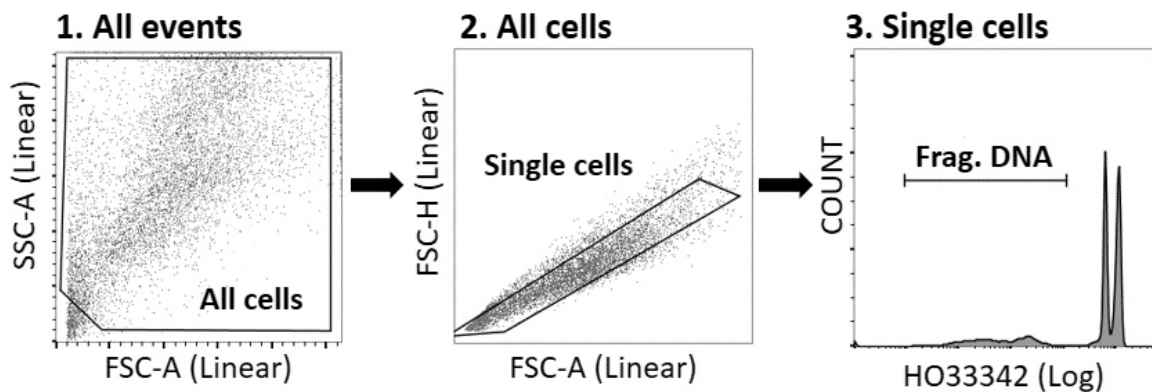
4.3.5 Avaliação da fragmentação de DNA

A fragmentação do DNA pode indicar uma das últimas etapas de morte celular por apoptose. Para esse teste foi utilizado o corante Hoechst 33342. Os corantes Hoechst são permeáveis às células e podem se ligar ao DNA em células vivas ou fixadas. O Hoechst 33342 (Ho33342) possui afinidade pela fenda menor da dupla fita de DNA com preferência por sequências ricas em adenina e timina. A fluorescência emitida é proporcional a quantidade de DNA, desse modo, é possível a discriminação de células em diferentes fases do ciclo celular e também identificar a fragmentação de DNA. Possui excitação máxima em cerca de 350 nm no laser ultravioleta e emite luz fluorescente azul em torno de um espectro de emissão máximo a 461 nm (SHAPIRO, 1981).

O protocolo experimental desse teste inicia ainda na placa de 24 poços, antes do desprendimento das células. Aos poços que iriam receber a marcação foi adicionado à solução

de Hoechst 33342 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por poço de células, sendo homogeneizado por pipetagem. Após a adição desses dois corantes a placa foi incubada em estufa incubadora de CO_2 (5% de CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$) por 60 minutos. No final desse período de incubação, as células foram soltas com tripsina, lavadas em PBS e centrifugadas. O *pellet* obtido foi ressuspendido em 300 μL de tampão FACS e, então, as amostras foram analisadas no citômetro. Os resultados obtidos foram analisados no programa Flowjo (Figura 9) e a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como descrito anteriormente (item 4.3.2).

Figura 9: Estratégia de *gates* para análise da fragmentação de DNA. A partir do *gate* de *single cells* é criado um novo gráfico de histograma selecionando o filtro correspondente a fluorescência da Ho33342. Nesse gráfico é feito o *gate* para seleção da população de células com o DNA fragmentado. Esse *gate* indica a % de células com fragmentação de DNA, que é o valor analisado estatisticamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.6 Avaliação da externalização da Hsp70 na superfície da membrana plasmática

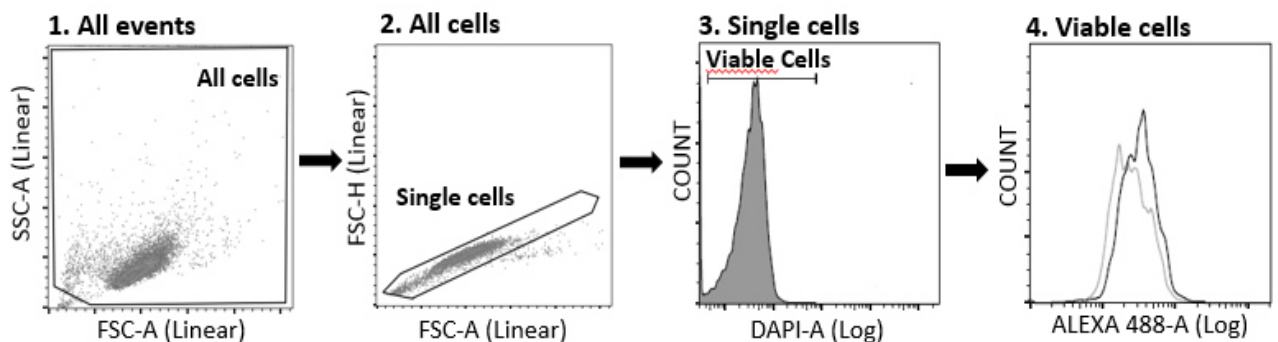
Esse teste ocorre com a utilização de anticorpos marcados com fluorocromos específicos para o antígeno celular que permite caracterizar a população das células de interesse. O fluorocromo ligado ao anticorpo absorve a energia do laser e rapidamente emite essa energia em forma de luz, em comprimentos de ondas específicos de acordo com o fluorocromo empregado (AOKI et al., 2010). No caso da Hsp70 foi utilizado o anticorpo anti-Hsp70 conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor 488, que emite fluorescência verde a 499-520 nm (Alexa Fluor 488 anti-Hsp70, Biolegend).

Além desse anticorpo, foi utilizado o fluorocromo DAPI que possui fluorescência violeta a cerca de 457 nm e, como citado acima, é utilizado para avaliação da integridade da membrana plasmática. Essa informação é válida para esse teste pois a intenção é verificar

apenas o Hsp70 que foi externalizado na membrana plasmática como efeito da MCI, ou seja, apenas em células que ainda estão com a membrana íntegra (GARG et al., 2014).

Então, para esse teste as células foram fixadas em paraformaldeído 0,25% por 5 minutos, lavadas com PBS e incubadas com o Alexa Fluor 488 anti-Hsp70 (diluição 1:100) por 40 minutos, no escuro e em gelo. Nos 5 minutos finais de incubação foi adicionado o DAPI em uma concentração de 2 μ M/mL. Posteriormente, essas células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão FACs para aquisição por citometria de fluxo. Os dados obtidos foram analisados no software flowjo (Figura 10) e, posteriormente, a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como descrito acima (item 4.3.2). No caso desse experimento, a estatística foi realizada utilizando os valores de MFI do Alexa Fluor 488.

Figura 10: Estratégia de *gates* para análise da externalização da Hsp70. Foi criado um gráfico de histograma a partir do *gate* de *single cells* para verificar as células viáveis a partir da fluorescência do DAPI, selecionando essa população a partir do *gate* de *viable cells*. Novamente um novo gráfico de histograma foi criado a partir do *gate* de *viable cells* para verificar a externalização da Hsp70 a partir da fluorescência do fluorocromo Alexa Fluor 488. O MFI obtido nesse último gráfico corresponde aos valores analisados no Prisma para a comparação de diferenças entre os grupos.



Fonte: Elaborado pela autora.

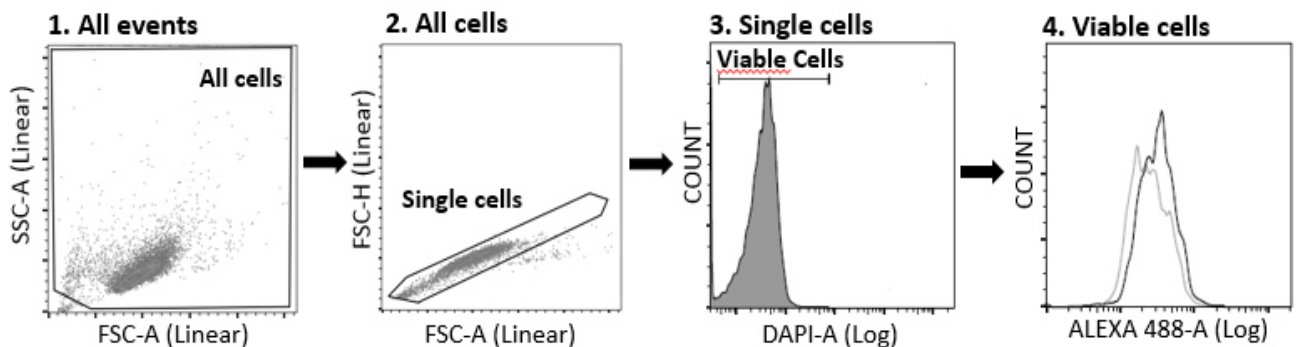
4.3.7 Avaliação da externalização da CRT na superfície da membrana plasmática

Assim como na externalização da Hsp70, a verificação da externalização da CRT foi realizada utilizando um anticorpo específico para essa proteína, o anti-CRT (Calreticulin (D3E6) XP Rabbit mAb, Cell Signaling). Esse anticorpo não é conjugado, de forma que se usou um anticorpo secundário, o Alexa Fluor 488 que emite fluorescência verde a 499-520 nm, para ser possível a visualização da ligação do anticorpo com a CRT. Também foi utilizado o fluorocromo DAPI que possui fluorescência violeta a cerca de 457 nm e, como citado anteriormente, é utilizado para avaliação da integridade da membrana plasmática. Tal função é

necessária para esse teste pois a intenção é verificar apenas a CRT que foi externalizada na membrana plasmática, ou seja, apenas em células que ainda estão com a membrana íntegra.

Para esse teste as células foram fixadas em paraformaldeído 0,25% por 5 minutos, lavadas com PBS e incubadas primeiramente com o anti-CRT (diluição 1:800) por 40 minutos, no escuro e em gelo. Posteriormente, essas células foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (diluição 1:400) por 40 minutos, no escuro e no gelo. Nos 5 minutos finais de incubação foi adicionado o DAPI em uma concentração de 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$. Essas células, então, foram centrifugadas e ressuspensas em tampão FACs para aquisição por citometria de fluxo. Os dados obtidos foram analisados no software flowjo (Figura 11) e, posteriormente, a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como descrito acima (item 4.3.2). No caso desse experimento, a estatística foi realizada utilizando os valores de MFI do Alexa Fluor 488.

Figura 11: Estratégia de *gates* para análise da externalização da CRT. Foi criado um gráfico de histograma a partir do *gate* de *single cells* para verificar as células viáveis a partir da fluorescência do DAPI, selecionando essa população a partir do *gate* de *viable cells*. Novamente um novo gráfico de histograma foi criado a partir do *gate* de *viable cells* para verificar a externalização da CRT a partir da fluorescência do fluorocromo Alexa Fluor 488. O MFI obtido nesse último gráfico corresponde aos valores analisados no Prisma para a comparação de diferenças entre os grupos.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.8 Avaliação da liberação do HMGB1

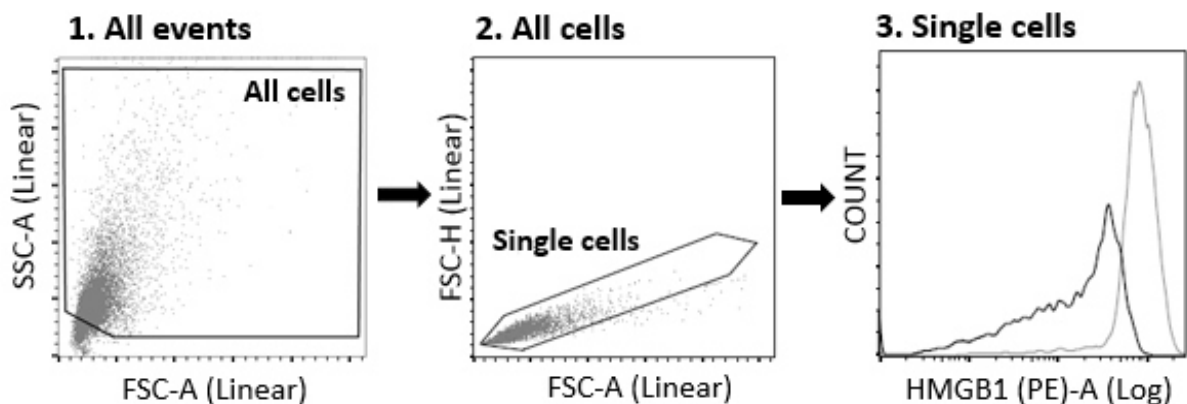
O teste para verificação do HMGB1 também consiste do princípio de um anticorpo que se liga a essa proteína e é conjugado com o fluorocromo ficoeritrina (PE, do inglês *phycoerythrin*) (PE anti-HMGB1; Biolegend), que tem fluorescência amarela com espectro de excitação de 564 nm e emissão máxima cerca de 574 nm e floresce quando ocorre a ligação do anticorpo com essa proteína. O HMGB1 é um proteína nuclear, logo, se encontra no núcleo.

Para ser possível a verificação da sua liberação por citometria de fluxo é necessário permeabilizar a membrana, para permitir entrada e ligação do anticorpo com o HMGB1.

Se o HMGB1 estiver sendo liberado, evento necessário na MCI, o anticorpo já não possui tanto substrato para se ligar e, dessa forma, a fluorescência do PE conjugado ao anticorpo tende a não tão intensa. Em termos de citometria de fluxo, se o tartrolon D/E for capaz de causar a liberação do HMGB1 a fluorescência do PE nesse grupo deve ser menor do que no grupo do controle negativo (KEEP et al., 2014).

Inicialmente as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o *pellet* obtido foi ressuspendido e submetido a fixação em uma solução de paraformoldeído 0,25%. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com o detergente Triton-X 100 0,1% por 5 minutos. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas e incubadas com o PE anti-HMGB1 (diluição 1:100) por 40 min, no escuro e em gelo. Após todo esse processo, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 300 μ L de tampão FACs para serem adquiridas no citômetro. Os dados obtidos são analisados no programa Flowjo (Figura 12) e, posteriormente, a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como descrito acima (item 4.3.2). No caso desse experimento, assim como no teste para verificação da externalização da HSP-70 e da CRT, os testes estatísticos para comparação entre os grupos foram realizados utilizando os valores de MFI do PE.

Figura 12: Estratégia de *gates* para análise da liberação do HMGB1. A partir de *single cells* foi criado um gráfico de histograma selecionando o filtro para fluorescência do PE para verificar a liberação do HMGB1, de modo, que a diminuição da intensidade da fluorescência do grupo teste comparado ao grupo controle representa a liberação do HMGB1. O MFI da fluorescência do PE obtido nesse último gráfico corresponde aos valores analisados no prisma para a comparação de diferenças entre os grupos.

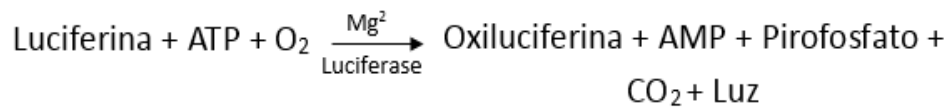


Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Quantificação de ATP por kit de luminescência

O ATP é a fonte de energia mais importante para metabolismo celular e quando liberado no meio extracelular age como um padrão molecular associado a dano (DAMP, do inglês *damage associated molecular pattern*) ligando-se a receptores purinérgicos para atrair e ativar células da imunidade inata (KROEMER et al., 2013). Nesse contexto, a detecção de ATP no sobrenadante de cultura de células tumorais tratadas com o tartrolon D/E pode indicar um efeito imunogênico induzido por essa substância. O kit de ensaio de detecção indireta de ATP por luminescência permite a determinação quantitativa de níveis totais de ATP através da produção de luz. O ensaio é baseado na necessidade da presença de ATP para a produção de luz pela enzima luciferase, sendo a luminescência emitida proporcional à concentração de ATP presente no meio reacional (emissão máxima ~ 560 nm em pH 7.8), como demonstrado abaixo:

Equação 1. Reação da enzima luciferase. As luciferases são enzimas que catalisam a oxidação do substrato luciferina por oxigênio, ativada por Mg e ATP. Na primeira etapa da catálise enzimática, a luciferase atua como adenil-transferase, adenilando a luciferina a partir de ATP e liberando pirofosfato. Em seguida, a luciferase atua como oxigenase, removendo o próton do carbono alfa a carbonila, com a produção do intermediário dioxetanônico, cuja clivagem produz dióxido de carbono e oxiluciferina excitada. Este processo é acompanhado por emissão de luz.



Fonte: Adaptado do kit de determinação de ATP (A22066).

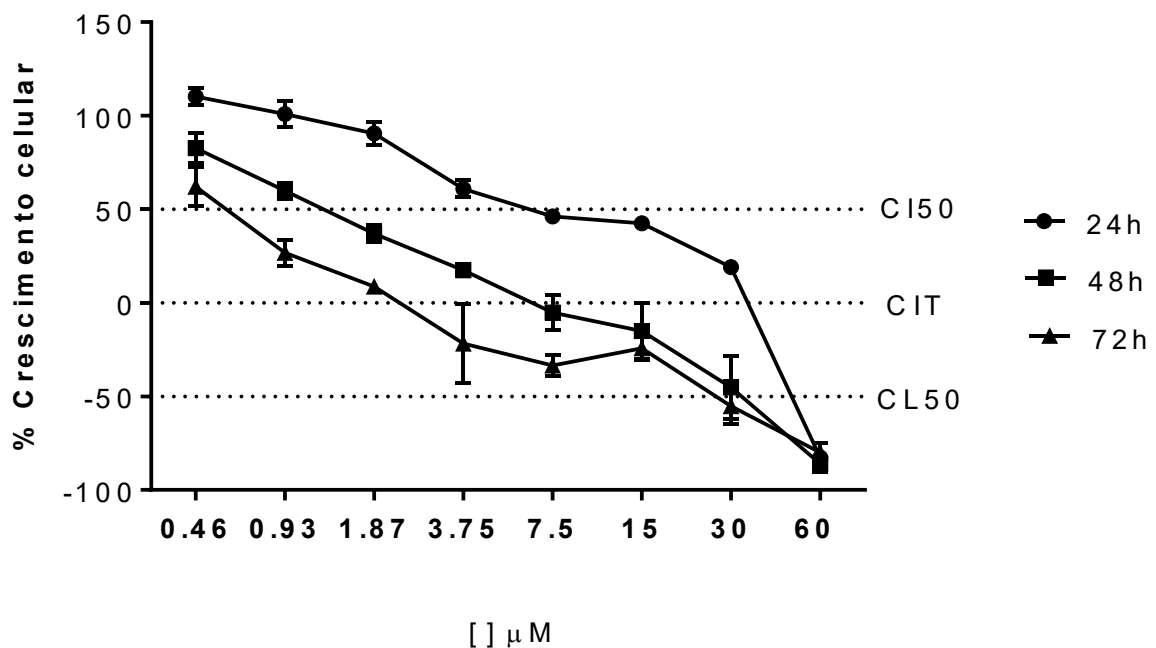
O teste foi realizado seguindo o protocolo proposto pelo fabricante (ThermoFisher Scientific). Para detecção da luminescência foi utilizado o equipamento Cytation (Cytation 3, Biotek). Os dados de luminescência das triplicatas do experimento foram normalizados para concentração de ATP em nM por interpolação de regressão linear no programa GraphPad Prism.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito antiproliferativo do tartrolon D/E

O tartrolon D/E foi incubado em células tumorais de linhagem B16-F10 em uma concentração de $0,46 \mu\text{M}$ a $60 \mu\text{M}$ (fator de diluição 2) durante um período de 24, 48 e 72 horas para realização de uma análise temporal da atividade antiproliferativa do composto (Figura 13). A partir desses experimentos, foi possível obter os valores de concentração inibitória média (CI_{50}), concentração inibitória total (CIT), e concentração letal média (CL_{50}) para os 3 tempos testados que foram estimados a partir de interpolação de regressão não-linear dos dados normalizados para percentual de crescimento em relação ao controle negativo (DMSO) (Tabela 1).

Figura 13: Efeito antiproliferativo do tartrolon D/E em células da linhagem B16-F10. Curvas concentração-efeito do tartrolon D/E em células da linhagem B16-F10 nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas. Os dados que foram calculados através de uma curva de interpolação não linear estão apresentados como os valores da média \pm desvio-padrão obtidos de um experimento realizado em triplicata.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1. Efeito antiproliferativo do tartrolon D/E em células da linhagem B16-F10 em cultura avaliado pelo ensaio do SRB. Valores estimados de concentração inibitória média (CI_{50}), concentração inibitória total (CIT) e concentração letal média (CL_{50}) em células tumorais da linhagem B16-F10 incubadas com o composto tartrolon D/E durante um período de 24, 48 e 72 horas.

TRL	24h	48h	72h
CI_{50}	7,70 μ M	1,33 μ M	0,43 μ M
CIT	70,81 μ M	5,72 μ M	2,97 μ M
CL_{50}	> 60 μ M	24,49 μ M	20,32 μ M

Fonte: Elaborado pela autora.

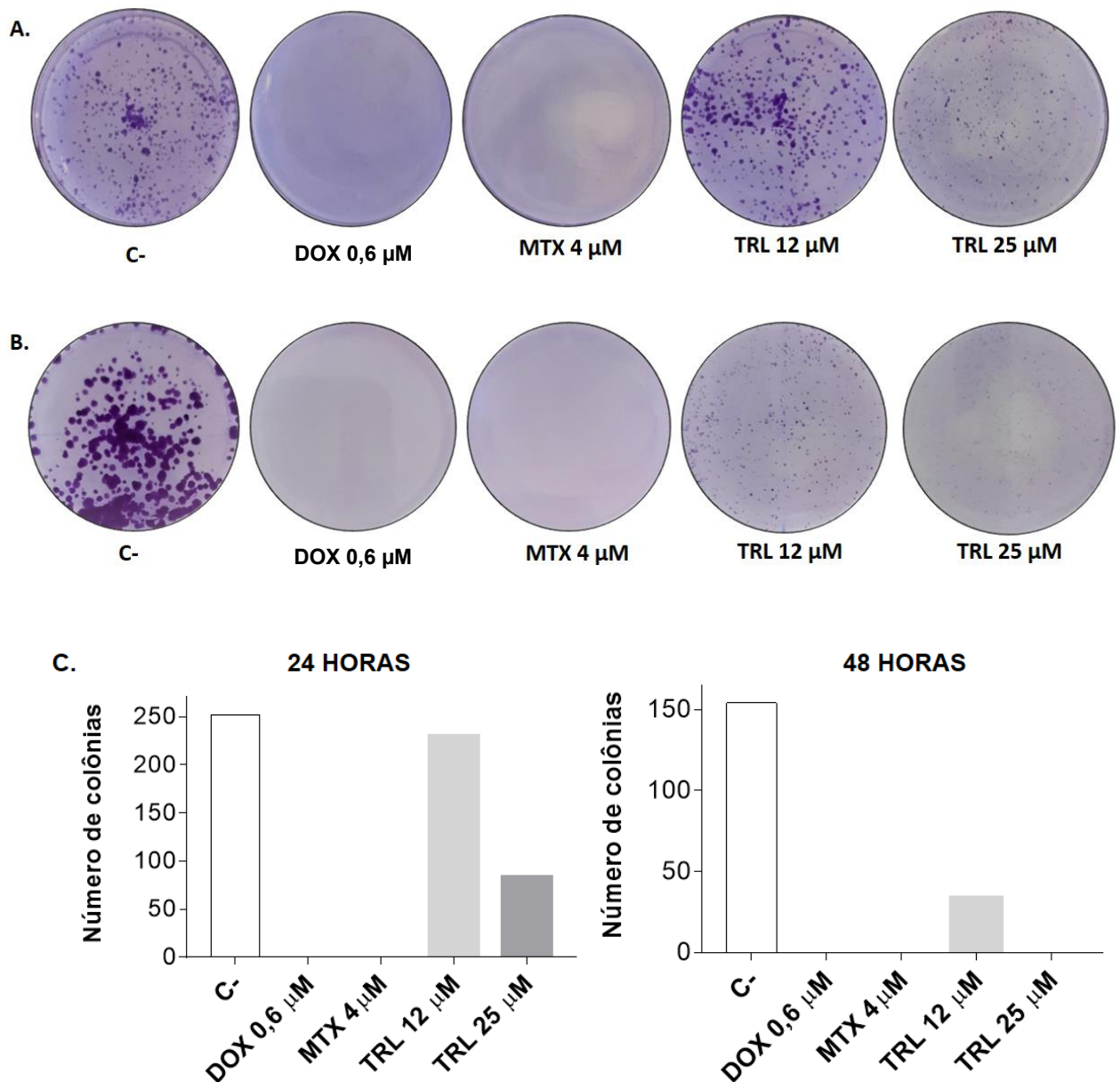
O tartrolon D/E causou efeito citostático e citotóxico de maneira tempo e concentração dependente. A CI_{50} foi 17 vezes menor em 72h de incubação (0,43 μ M) em relação a 24h (7,7 μ M). Quanto a citotoxicidade, a partir de 48h foi possível calcular a CL_{50} , de 24 μ M.

Após a avaliação do perfil antiproliferativo do tartrolon D/E em diferentes concentrações e tempos através do ensaio do SRB, o estudo dos possíveis mecanismos de ação do composto seguiram-se com as concentrações de 12 μ M e 25 μ M do composto, por 24 e 48 horas, sendo determinadas de acordo com o teste em questão.

5.2 Avaliação de sobrevivência através do ensaio clonogênico

Os resultados obtidos no ensaio de sobrevivência são mostrados na figura 14. Observou-se que no tempo de 24 horas de incubação não houve crescimento de colônias nos dois grupos de controle positivo (DOX e MTX) e houve uma redução do número de colônias no grupo TRL 25 μ M comparando-se ao controle negativo (DMSO 0,4%), porém o grupo do TRL 12 μ M apresentou um número de colônias praticamente igual ao do controle negativo. Já no período de 48 horas é possível verificar uma grande redução do número de colônias no grupo TRL 12 μ M comparado ao grupo controle negativo, e ausência de crescimento de colônias nos grupos controle positivos e TRL 25 μ M.

Figura 14: Avaliação da sobrevivência de células tumorais *in vitro* através do ensaio clonogênico. Poços de placa de cultura com células B16-F10 incubadas por 24 (A) e 48 horas (B) com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-), doxorubicina a 0,6 μM (DOX) e mitoxantrona a 4 μM (MTX) como controles positivos, e tartrolon D/E A 12 e 24 μM (TRL) C. Gráficos com o número de colônias relativo aos poços com células tratadas com s grupos teste por 24 e 48 horas. Esse resultado é referente a uma única triplicata, sendo, portanto, um resultado preliminar que não foi analisado estatisticamente.



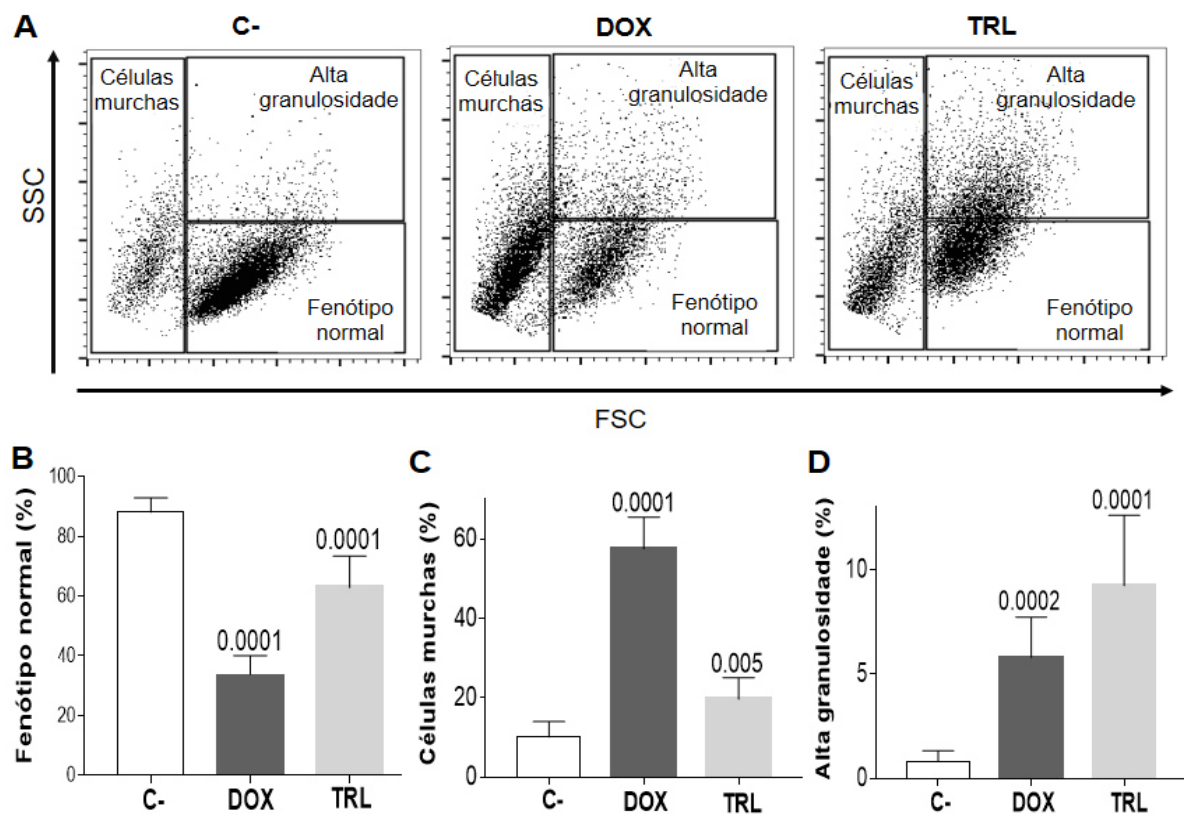
Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Avaliação dos efeitos do tartrolon D/E em células tumorais de melanoma metastático murino (B16-F10)

5.3.1 Alterações na morfologia celular

O tartrolon D/E, na concentração de 12 μM , provoca alterações morfológicas como diminuição de tamanho celular e aumento de granulosidade, nas células B16-F10 incubadas com a amostra por 24 horas quando comparado ao controle negativo. O controle positivo também provocou as mesmas alterações celulares, aumentando a granulosidade e reduzindo o tamanho celular (Figura 15).

Figura 15: Avaliação da morfologia celular de células da linhagem B16-F10. **A.** Morfologia das células B16-F10 incubadas por 24h com tartrolon D/E a 12 μM (TRL), doxorrubicina a 0,6 μM (DOX) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-). **B.** Percentual de células com fenótipo normal. **C.** Percentual de células murchas. **D.** Percentual de células com alta granulosidade. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste. (TRL), doxorrubicina (DOX) como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO 0,4%) como controle negativo.

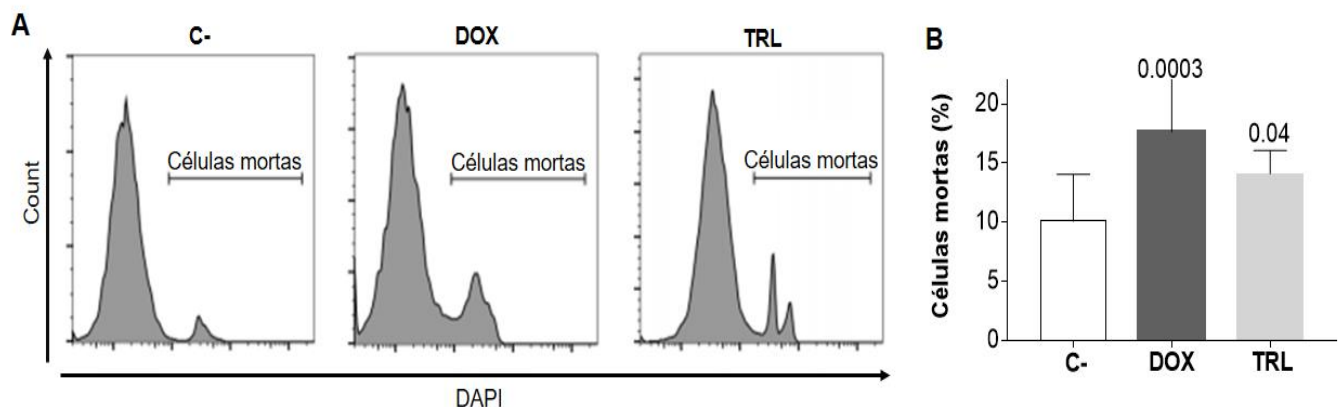


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.2 Avaliação da integridade de membrana celular

Em relação a integridade da membrana plasmática, que permite a informação sobre as células que estão viáveis ou mortas, pode-se observar um aumento no número de células mortas que foram tratadas com o TRL a 12 μM , e com a DOX a 0,6 μM quando comparado com o controle negativo depois de 24h de incubação.

Figura 16: Avaliação da integridade de membrana de células da linhagem B16-F10. **A.** Integridade de membrana das células B16-F10 incubadas por 24h com tartrolon D/E a 12 μM (TRL), doxorubicina a 0,6 μM (DOX) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-). **B.** Percentual de células com a membrana rompida. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste. (TRL), doxorubicina (DOX) como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO 0,4%) como controle negativo.

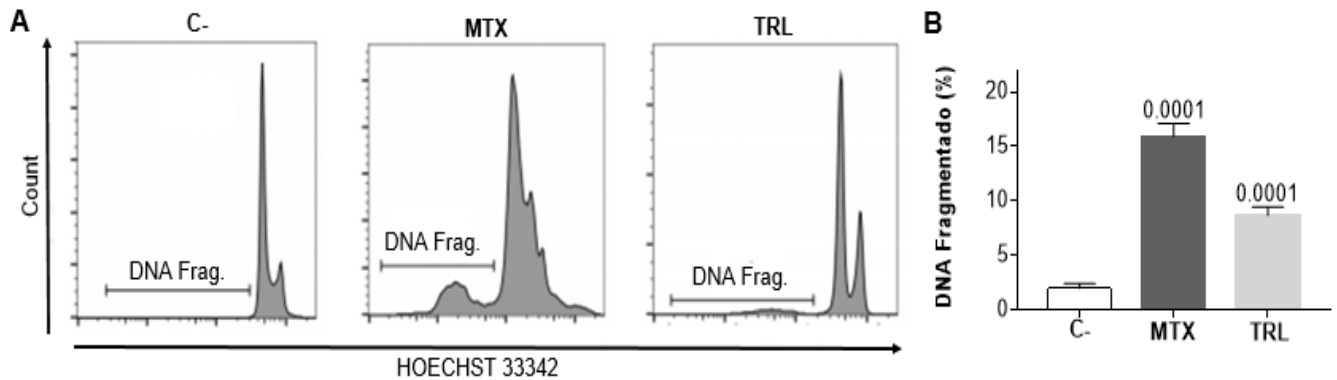


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.3 Avaliação da fragmentação do DNA

Comparando os grupos de células incubadas com o tartrolon D/E a 12 μM e com a mitoxantrona (MTX) a 0,4 μM por 24h em relação ao grupo controle negativo é possível verificar o grande aumento de DNA fragmentado em ambos os grupos (Figura 17).

Figura 17: Avaliação da fragmentação de DNA de células da linhagem B16-F10. **A.** Fragmentação de DNA em células B16-F10 incubadas por 24h com tartrolon D/E a 12 μM (TRL), mitoxantrona a 0,4 μM (MTX) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-). **B.** Percentual de células com o DNA fragmentado. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste.

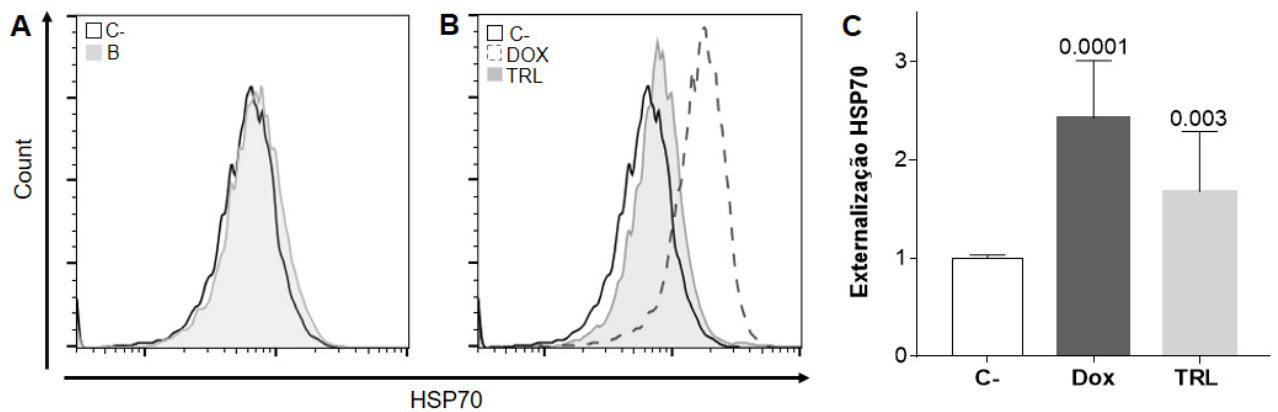


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.4 Avaliação da externalização da HSP70 na superfície da membrana plasmática

As células incubadas com o TRL 12 μM e a DOX 0.6 μM por 24h aumentaram consideravelmente a externalização da HSP70 quando comparados ao grupo controle negativo, células tratadas apenas com o DMSO 0,4% (Figura 18).

Figura 18: Avaliação da externalização da Hsp70 na membrana de células da linhagem B16-F10. **A.** Intensidade de fluorescência de um grupo de células B16-F10 não marcadas como o anticorpo (B) e do grupo de células B16-F10 tratadas com dimetilsulfóxido 0,4% (DMSO) como controle negativo e marcadas com o anticorpo anti-Hsp70 associado ao fluorocromo Alexa Fluor 488. **B.** Intensidade de fluorescência relacionada a externalização da CRT na membrana de células B16-F10 viáveis tratadas por 24h com tartrolon D/E a 12 μM (TRL), doxorubicina a 0,6 μM (DOX) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% (DMSO) como controle negativo. **C.** Valores normalizados da intensidade de fluorescência mediana do fluorocromo Alexa 488, conjugado ao anticorpo Hsp70, em células B16-F10 incubadas com os grupos-teste. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste.

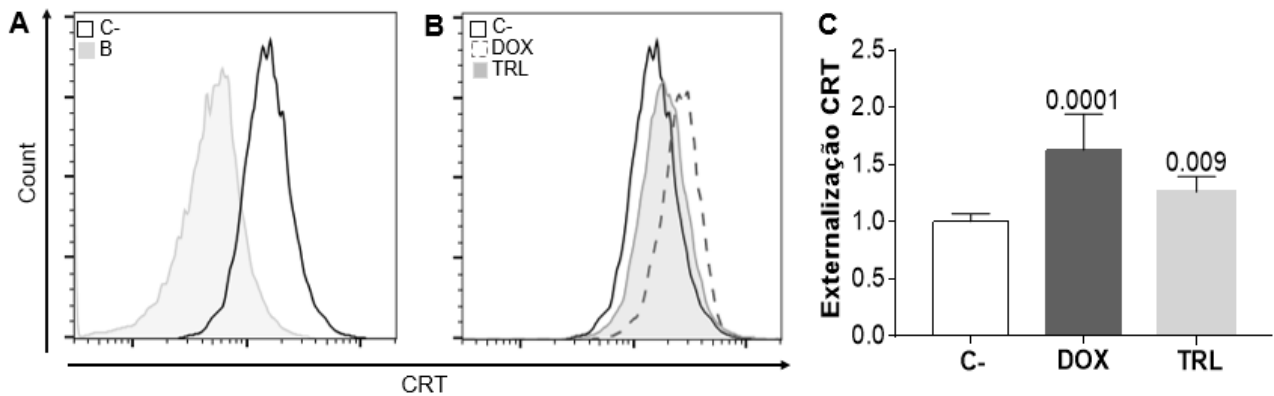


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.5 Avaliação da externalização da CRT na superfície da membrana plasmática

As células incubadas com o TRL 12 μM e a DOX 0.6 μM por 24h aumentaram a externalização da CRT quando comparados ao grupo controle negativo, células tratadas apenas com o DMSO 0,4% (Figura 19).

Figura 19: Avaliação da externalização da CRT na membrana de células da linhagem B16-F10. **A.** Intensidade de fluorescência de um grupo de células B16-F10 não marcadas como o anticorpo (B) e do grupo de células B16-F10 tratadas com dimetilsulfóxido 0,4% (DMSO) como controle negativo e marcadas com o anticorpo anti-CRT associado ao fluorocromo Alexa Fluor 488. **B.** Intensidade de fluorescência relacionada a externalização da CRT na membrana de B16-F10 viáveis tratadas por 24h com tartrolon D/E a 12 μ M (TRL), doxorubicina a 0,6 μ M (DOX) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% (DMSO) como controle negativo. **C.** Valores normalizados da intensidade de fluorescência mediana do fluorocromo Alexa Fluor 488, que está conjugado ao anticorpo CRT, em células B16-F10 incubadas com os grupos-teste. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste.

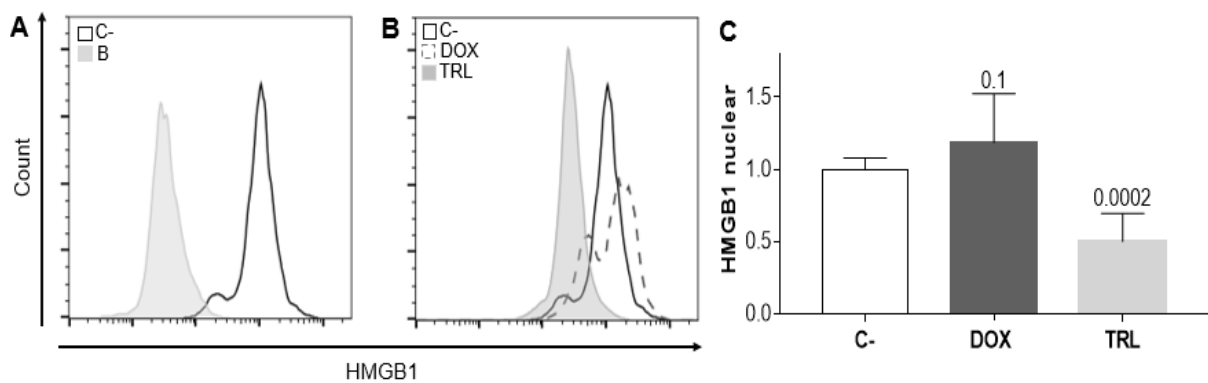


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.6 Avaliação da liberação do HMGB1

A liberação do HMGB1 do núcleo para o meio extracelular pode ser indicado com a diminuição da fluorescência do PE, fluorocromo que está acoplado ao anticorpo HMGB1, no grupo de células tratadas com a molécula em relação a fluorescência das células do controle negativo que devem armazenar o HMGB1 nuclear normalmente. Assim, foi verificado uma diminuição da fluorescência do fluorocromo PE no grupo de células incubadas com o tartrolon D/E a 12 μ M por 24h em comparação ao grupo de células do controle negativo, enquanto o grupo controle positivo não apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo controle negativo (Figura 20).

Figura 20: Avaliação da liberação do HMGB1 em células B16-F10. **A.** Intensidade de fluorescência de um grupo de células B16-F10 não marcadas como o anticorpo (B) e do grupo de células B16-F10 tratadas com dimetilsulfóxido 0,4 % (DMSO), como controle negativo, e marcadas com o anticorpo anti-HMGB1 conjugado ao fluorocromo PE. **B.** Intensidade de fluorescência relacionada a liberação de HMGB1 nuclear em células B16-F10 tratadas por 24h com tartrolon D/E a 12 μ M (TRL), doxorubicina a 0,6 μ M (dox) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% (DMSO) como controle negativo. **C.** Valores normalizados da intensidade de fluorescência mediana do fluorocromo PE, que está conjugado ao anticorpo HMGB1, em células B16-F10 tratadas com os grupos-teste. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste.

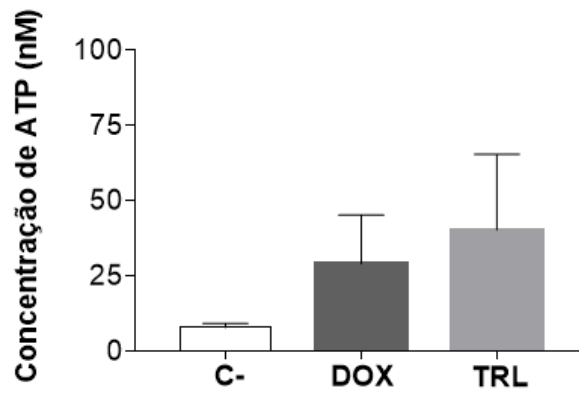


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.7 Quantificação do ATP liberado

O ATP liberado no meio extracelular funciona com um DAMP, ajudando na ativação do sistema imune. O teste para quantificação do ATP liberado foi realizado utilizando o sobrenadante de células B16-F10 em cultura, já que a intenção é verificar o ATP que foi liberado da célula. Comparado os grupos TRL 12 μ M e DOX 0,6 μ M com o controle negativo pode ser visto um aumento das quantidades de ATP.

Figura 21: Avaliação do ATP extracelular liberado por células da linhagem B16-F10. Concentração de ATP em nM nos grupos dimetilsulfóxido 0,4% (DMSO) utilizado como controle negativo, doxorrubicina a 0,6 μ M (DOX) como controle positivo e o tartrolon D/E a 12 μ M (TRL). Os dados são provenientes de um único experimento em triplicata, sendo um resultado preliminar e, portanto, não analisado estatisticamente.



Fonte: Elaborado pelo autora.

6 DISCUSSÃO

Esse estudo foi realizado a fim de verificar o potencial do tartrolon D/E como indutor de morte celular imunogênica (MCI). Esse tipo de morte celular foi descrito em 2005 (Casares et al). A indução de MCI é muito interessante na perspectiva de terapia anticâncer, já que a morte provocada na célula resulta na ativação do sistema imunológico, podendo tornar o tratamento mais eficaz e duradouro. Uma abordagem para identificação desse tipo de morte pode ser realizada através de testes *in vitro* para detecção de DAMPs como a CRT, HSPs, HMGB1, ATP, entre outros, que em conjunto são responsáveis por favorecer uma resposta imune adaptativa no organismo (GALLUZZI et al., 2020).

Os tartrolons são pertencentes à classe dos macrolídeos isolados de bactérias. Tais compostos se destacam devido às suas diversas atividades biológicas citotóxica, antimicrobiana, antiprotozoário e inseticida (PÉREZ et al., 2009; ELSHAHAWI et al., 2013; O'CONNOR et al., 2020). O tartrolon utilizado nesse trabalho foi considerado como tartrolon D/E pois o TRL D pode sequestrar o Boro (B) da parede de vidro utilizado nos processos de obtenção do TRL. Desta forma devemos considerar a presença de TRL D e TRL E. Em um trabalho anterior desenvolvido no nosso grupo alguns efeitos desse composto em linhagem de células tumorais de colo retal humano (HCT 116) chamaram atenção (BRITO, 2018). Entre os efeitos encontrados, foi visto que o TRL, além de ser citotóxico, provocava um grande aumento de células com granulosidade aumentada. Esse aumento de granulosidade foi associado a um indicativo de estresse, que embora de valor bastante preliminar, sabe-se que a indução de morte associada ao estresse, se relaciona com morte celular imunogênica.

Nesse estudo foi decidido seguir os testes com o TRL em células tumorais de melanoma metastático murino (linhagem B16-F10), pois esse tipo de câncer tem altas taxas de incidência e mortalidade, além da ausência de um tratamento efetivo. Ademais, a imunoterapia atualmente é a melhor opção de tratamento para esse tipo de câncer, isso indica que o desenvolvimento de estratégias que ativem o sistema imune são as mais indicadas para o tratamento do melanoma metastático (HODI et al., 2010). Diante dessas informações, a identificação de compostos indutores de MCI pode trazer melhores resultados para esse tipo de tumor, assim como ocorre em outros exemplos. De fato um pequeno grupo de quimioterápicos de primeira linha, ou grande relevância clínica, utilizados amplamente na clínica como antraciclinas, alguns derivados de platina e taxol são indutores de MCI. A doxorubicina, indicada no tratamento de muitos tipos de câncer, aqui utilizada como controle positivo neste trabalho, é um desses exemplos. Um estudo realizado por Casares e colaboradores (2005) a linhagem celular CT26

(câncer de cólon) exposta à doxorubicina, demonstrou pela primeira vez e estabeleceu diversas características importantes da MCI em modelos *in vitro* e *in vivo*. A cisplatina, que é um quimioterápico para o tratamento de adenocarcinoma de pulmão, vastamente utilizado na clínica, também apresentou uma alta indução de DAMPs envolvidos na MCI quando foi testado na linhagem celular A549 (células de adenocarcinoma de pulmão humano) como foi demonstrado no trabalho de Solari et al (2020). Além desses exemplos, o estudo de Lau e colaboradores (2020) fez uso do paclitaxel em câncer de ovário, verificando os principais DAMPs envolvidos na MCI *in vitro* e provocando respostas antitumorais significativas no ensaio de vacinação *in vivo*.

O efeito antiproliferativo do TRL na linhagem B16-F10 foi avaliado por meio do ensaio de SRB após 24, 48 e 72 horas de incubação com o composto. Ao avaliar as curvas concentração-efeito, constatou-se que o TRL foi capaz de inibir a proliferação celular e de provocar a morte celular na linhagem testada de modo tempo-concentração dependente. Após um período de 24 horas de incubação com o composto, já foi possível perceber um efeito citostático na proliferação celular da linhagem B16-F10 e no período de 72 horas foi visto que o efeito citostático foi provocado em uma concentração baixa (0,43 μM). Ao analisar o efeito provocado pelas maiores concentrações de tartrolon D/E, constata-se que aproximadamente a partir da concentração de 5,72 μM o efeito torna-se citotóxico no período de 48 horas enquanto no período de 72 horas a citotoxicidade foi encontrada com cerca de metade dessa concentração (2,97 μM). A concentração letal média no tempo de 24 horas foi estimada em acima de 60 μM , o que é considerado uma concentração alta. Já nos demais tempos, as concentrações não alteraram muito, sendo em média de 20-25 μM .

Estudos anteriores demonstraram que o composto tartrolon A produz efeito citotóxico contra a linhagem de fibroblastos murinos (L929) com um valor de CI_{50} de 0,07 mg/mL. O composto tartrolon D apresentou atividade citotóxica através do ensaio do SRB no estudo de Pérez et al., (2009), que provou a capacidade do tartrolon D de inibir a proliferação celular nas linhagens de MDA-MB-231 (câncer de mama), A549 (câncer de pulmão) e HTB-38 (câncer de cólon e reto), suas concentrações inibitórias médias foram estimadas em 0,70 μM , 0,16 μM e 0,31 μM , respectivamente. Em relação ao tartrolon E, até o momento só foram descritos atividades antimicrobiana e antiparasitária.

Além do ensaio de SRB, a avaliação da atividade citotóxica do tartrolon D/E foi aqui investigada pelo ensaio clonogênico para avaliar a sobrevivência celular. Através desse ensaio foi possível observar que o TRL na concentração de 25 μM incubado por 48 horas inibiu totalmente a formação de colônias das células B16-F10. Portanto, o ensaio clonogênico permite

observar em qual concentração as células cancerígenas são incapazes de proliferar formando colônias.

Tendo em vista a citotoxicidade observada pelo tartrolon D/E, foram realizados testes em citometria de fluxo a fim de investigar os efeitos desse composto em células B16-F10 tratadas com uma concentração de 12 μM . Através dessa ferramenta foi possível verificar que o número de células da linhagem B16-F10 reduz, quando comparados ao controle negativo (DMSO). É possível, portanto, que o composto esteja inibindo a proliferação celular como também provocando a morte, corroborando com os resultados previamente descritos no ensaio da SRB, onde o TRL foi capaz de provocar um efeito citostático e citotóxico nas linhagens avaliadas.

Os resultados da análise morfológica, por citometria de fluxo, demonstraram um aumento de granulosidade celular e uma redução do volume das células, quando incubadas com 12 μM do tartrolon D/E por 24 horas. Adicionalmente, as células tratadas com 0,6 μM de DOX também apresentaram as mesmas alterações. Esses dados confirmam os resultados encontrados anteriormente pelo nosso grupo, quando o TRL foi utilizado nas células HCT-116 (BRITO, 2018) e refletem o estresse celular causado pelo composto TRL.

Ao avaliarmos alterações na integridade da membrana celular, observa-se um aumento do número de células com a membrana rompida em comparação ao grupo controle negativo. A fragmentação do DNA também foi avaliada. Células com o núcleo íntegro emitem alta fluorescência, e aquelas que apresentam núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos o fluorocromo e por isso emitem menor fluorescência. Os resultados obtidos demonstraram que as células B16-F10 possuem seus percentuais de fragmentação do DNA elevados quando incubadas com o composto por 24 horas na concentração de 12 μM , apresentando diferença estatística quando comparado ao controle negativo. Esses resultados confirmam a identificação de condições de estresse e de morte celular induzidos em B16-F10 pelo TRL, considerados adequados para avaliação subsequente de marcadores de MCI.

A partir desse ponto, os testes que seguiram objetivaram a identificação de DAMPs, bem como de alterações fenotípicas que podem ser correlacionadas com a MCI. Primeiramente, foi avaliada a externalização das chaperonas Hsp70 e da calreticulina (CRT), que ocorrem primariamente, e que quando se ligam aos seus receptores são sinais de fagocitose, tornando as células apresentadoras de antígenos passíveis de serem ativadas e processar adequadamente os antígenos tumorais na presença dos demais DAMPs envolvidos na MCI (GARG et al., 2013). A externalização desses DAMPs é de extrema importância para ativação do sistema imune,

diferindo de outros sinais de fagocitose, como a fosfatidilserina na morte celular por apoptose, que apesar de induzir a fagocitose são incapazes de provocar uma resposta imunogênica. Os resultados obtidos indicaram um aumento significativo na externalização da Hsp70 e CRT os grupos de células incubadas com o TRL e com a DOX quando comparadas ao grupo controle negativo.

O mesmo resultado favorável na busca dos DAMPs foi visto para o HMGB1, que teve uma diminuição considerável do conteúdo nuclear no grupo do TRL quando comparado ao controle negativo, indicando indiretamente que a liberação do HMGB1 para o meio extracelular está ocorrendo em células tratadas com a molécula. Esse fenômeno é essencial na MCI, visto que o HMGB1 quando liberado se liga ao receptor TRL4 favorecendo o direcionamento do conteúdo fagocitado para o processamento e apresentação de antígenos pelas células apresentadoras (VANMEERBEEK et al., 2020).

Son e colaboradores (2017) realizaram um estudo testando um composto heterocíclico derivado de quinona (R2016) a fim de verificar o potencial indutor de MCI também em células B16-F10. Entre os testes que foram realizados, foi visto uma alta indução de HSPs na superfície das células durante a morte celular apoptótica induzida por R2016. Esse efeito é considerado um mecanismo que corrobora positivamente com o aumento da imunogenicidade das células tumorais apoptóticas (KROEMER et al., 2013). Além disso, o HMGB1 também foi liberado no momento da morte celular induzida por R2016, contribuindo para ativação imunológica.

Nesse estudo também foi realizado um ensaio para avaliação de vesículas autofágicas (AVOs), por ser um método simples que tem boa correlação com autofagia, que por sua vez está relacionada com a liberação de ATP na MCI. Porém, o TRL interferiu na fluorescência do ensaio impedindo a obter resultados conclusivos. Dessa forma, seguimos para avaliação direta do ATP, que é o DAMP de interesse para o objetivo principal do trabalho.

A liberação do ATP para o meio extracelular é um DAMP extremamente importante para ativação do sistema imunológico, pois tanto possui um papel quimioatraente como ativador das células apresentadoras de antígenos (GALLUZI et al., 2016). Assim, foi realizado um teste de determinação de ATP por kit de luminescência. Os dados obtidos nesse teste, apesar de preliminares, mostraram um aumento da concentração de ATP no sobrenadante dos grupos de células tratadas com a DOX e com o TRL quando comparados ao controle negativo. Martins e colaboradores (2013) consideram em seu estudo uma boa liberação de ATP a partir de 35 nM. Nesse estudo, o grupo de células incubadas com TRL provocou uma liberação do ATP em cerca de 50 nM. Dessa forma, em relação a dados descritos na literatura, podemos considerar que a quantidade de ATP detectada é capaz de provocar uma resposta biologicamente ativa,

contribuindo na imunogenicidade provocada pelo TRL, sendo necessário as repetições do experimento para confirmação dos resultados encontrados.

Os resultados encontrados até o momento demonstram que o composto tartrolon D/E possui um mecanismo de morte celular que possivelmente seja a MCI. Essa interpretação é baseada na identificação de morte celular e detecção de DAMPs responsáveis pela ativação e apresentação de antígenos que desencadeiam na ativação do sistema imunológico. Quando comparados a quimioterápicos cujo o mecanismo de ação é a apoptose, a utilização de fármacos indutores de MCI é mais interessante para o tratamento do câncer. Isso se deve ao fato da morte celular por apoptose ser tolerogênica ao sistema imunológico, ou seja, é incapaz de provocar a ativação do sistema imune e, assim, quimioterápicos que provocam esse tipo de morte celular limitam seu efeito apenas a citotoxicidade provocada na célula.

Além dos resultados apresentados, é necessário a comprovação da indução dos outros DAMPs envolvidos na MCI e, principalmente, a avaliação da capacidade de vacinar camundongos com as células B16-F10 mortas pelo composto TRL para considerá-lo como um indutor genuíno de MCI. De todo modo pode-se afirmar que o tartrolon D/E é um composto que causa morte celular e induz alguns fatores imunogênicos como a externalização de CRT e Hsp70 e liberação de HMGB1, sendo promissor quando se pensa em termos de estratégias para ativação do sistema imune na associação com outros quimioterápicos utilizados na terapia do câncer.

7 CONCLUSÕES

O tartrolon D/E induz morte celular, sendo comprovado a partir dos efeitos nas células tumorais de melanoma metastático, como alterações morfológicas, ruptura da membrana plasmática e fragmentação de DNA. Ademais, também houve a liberação de DAMPs típicos de morte celular imunogênica, observando a externalização de CRT e da Hsp70 na superfície da membrana plasmática e a liberação do HMGB1 do núcleo. Mais estudos são necessários para confirmar se o TRL é um indutor genuíno de MCI, através da avaliação de outros marcadores, bem como da realização do ensaio de vacinação *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CANCER SOCIETY <www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/chemotherapy.html> Acessado em outubro de 2019.

AOKI, V. et al. Imunofluorescência direta e indireta. **An Bras Dermatol**, v. 85, p. 490-500, 2010.

APETOH, L. et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nat. Med**, v. 13, p. 1050–1059, 2007.

BRITO, Thais Lima. **Prospecção metagenômica e cultivo-dependente de substâncias bioativas produzidas por bactérias associadas aos moluscos da família Teredinidae e estudo da citotoxicidade do tartrolon D**. 2018. Dissertação – Farmacologia, Fortaleza, 2019.

CASARES, N. et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1691–1701, 2005.

CHALMIN, F. et al. Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. **Immunity**, v. 36, n. 3, p.362-373, 2012.

CHEN, Y.L.; CHANG, M.C.; CHENG, W.F. Metronomic chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. **Cancer Letters**, v. 400, p. 282-292, 2017.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural Products as Sources of Anticancer Agents: Current Approaches and Perspectives. **Natural Products As Source Of Molecules With Therapeutic Potential**, p.309-331, 2018.

DIEDERICH, M. Natural compound inducers of immunogenic cell death. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, p. 629–645, 2019.

ELSHAHAWI, S. I. et al. Boronated tartrolon antibiotic produced by symbiotic cellulose-degrading bacteria in shipworm gills. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 4, p. E295-304, 2013.

FENICAL, W. et al. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI- 0052). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2175–80, 2008.

GALLUZZI, L. et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 2, p.97-111, 2016.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, p. 486–541, 2018.

GALLUZZI L. et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, 2020.

GARG, A. D. et al. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 1, p.26-38, 2013.

GIVAN, A. L. Flow Cytometry: An Introduction. **Flow Cytometry Protocols**, p.001-032, 2004.

GOMEZ-CADENA, A. et al. Immune-system-dependent anti-tumor activity of a plant-derived polyphenol rich fraction in a melanoma mouse model. **Cell Death and Disease**, v. 7, p. 1-12, 2016.

GREEN, D. R., REED, C. Mitochondria and Apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p.1309-1312, 1998.

GUERRA, Daniela Filipa Andrade. **Novos quimioterápicos obtidos a partir de organismos marinhos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2015.

HAMADA, S.; FUGITA, S. DAPI Staining Improved for Quantitative Cytofluorometry. **Histochemistry**, v. 79, p. 219 226, 1983.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p.646-674, 2011.

HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p.377-387, ago. 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>> Acessado em fevereiro de 2021.

JIMENEZ, P. C. et al. Enriching Cancer Pharmacology with Drugs of Marine Origin. **British Journal Of Pharmacology**, 2019.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; COSTA-LOTUFO, L. V. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. **Clinics**, v. 73, n. 1, p.1-7, 9 out. 2018.

KEEP, O. et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. **OncoImmunology**, v. 3, n. 9, 2014.

KOPPOLU, V., VASIGALA, V. K. R. Checkpoint immunotherapy by nivolumab for treatment of metastatic melanoma. **J Cancer Res Therapy**, v. 14, p. 1167-1175, 2018.

KROEMER, G. et al. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. **Annual Review Of Immunology**, v. 31, n. 1, p.51-72, 2013.

LARKIN, J. et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. **New England Journal Of Medicine**, v. 373, n. 1, p.23-34, 2015.

LAU, T. et al. Paclitaxel induces immunogenic cell death in ovarian cancer via TLR4/IKK2/SNAREdependent exocytosis. **Cancer immunorelres**, 2020.

LI, X. The inducers of immunogenic cell death for tumor immunotherapy. **Tumori Journal**, v. 104, p. 1-8, 2018.

LUKE, J.J. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. **Clinical oncology**, v. 14, p. 463-482, 2017.

MARINHA DO BRASIL < <https://www.marinha.mil.br/>>, Acessado em setembro de 2019.

MARTINS, I. et al. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 1, p.79-91, 2014.

MAVERAKIS, E. et al. Metastatic Melanoma – A Review of Current and Future Treatment Options. **Acta Derm Venereol**, v. 95, p. 516–524, 2015.

MELCHIOR, K. et al. Avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade do polímero poli-ε-caprolactona (PCL) e poli-ε-caprolactona funcionalizada com fibroína, vidro bioativo e incorporada oxipatita dopada com lantânio. **Rev Ciên Farm Básica Apl.**, v. 37, 2016

MILLER, L.D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, p.271-289, 2016.

O'CONNOR, R. M. et al. A symbiotic bacterium of shipworms produces a compound with broad spectrum anti-apicomplexan activity. **PLoS Pathog**, v. 16, p. 1-21, 2020.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.

PÉREZ, M. et al. Tartrolon D, a cytotoxic macrodiolide from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. MDG-04-17-069. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 12, p. 2192–2194, 2009.

QUEIROLO, P. et al. Immune-checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic melanoma: a model of cancer immunotherapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 59, p. 290-297, 2019.

REICHENBACH, H. et al. The Tartrolons, NewBoron-containing Antibiotics from a Myxobacterium, *Sorangium cellulosum*. *The Journal of antibiotics*, n. 60, p. 26–30, 1995.

ROBERT, C. et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. **New England Journal Of Medicine**, v. 372, n. 26, p.2521-2532, 2015.

RUBINSTEIN, L. V. et al. Comparison of In Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p.1113-1117, 1990.

SHAPIRO, H. M. Flow Cytometric Estimation of DNA and RNA Content in Intact Cells Stained with Hoechst 33342 and Pyronin Y1. **The Society for Analytical Cytology**, v. 2, p. 143-150, 1981.

SHINDE, P., BANERJEE, P., MANDHARE, A. Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015-2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, p. 283-309, 2019.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anti-Cancer Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.

SOLARI, J. I. G. et al. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) related to immunogenic cell death are differentially triggered by clinically relevant chemotherapeutics in lung adenocarcinoma cells. **BMC Cancer**, v. 20, n. 474, 2020.

SON, K. et al. Induction of immunogenic cell death of tumors by newly synthesized heterocyclic quinone derivative. **Plos One**, v. 12, n. 3, p.1-14, 2017.

SUI, X et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. **Cell Death And Disease**, v. 4, p.838-850, 2013.

TEIMOURIA, F., NIKFARA, S., ABDOLLAHIB, M. Efficacy and side effects of dacarbazine in comparison with temozolomide in the treatment of malignant melanoma: a meta-analysis consisting of 1314 patients. **Melanoma Research**, v.23, p. 381–389, 2013.

VANMEERBEEG, I. et al. Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology. **Oncoimmunology**, v. 9, 2020.

VIEGAS, C. JR., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, Vol. 29, p. 326-337, 2006.

WANG, Q. et al. Immunogenic cell death in anticancer chemotherapy and its impact on clinical studies. **Cancer letters**, v. 438, p. 17-23, 2018.

WHO. **World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: [s.n.].

WILKE, D. V. et al. Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Med**, 2020.

WONG, D. J. L.; RIBAS, A. Targeted Therapy for Melanoma. **Melanoma**, p.251-262, 2015.

WRANGLE, J. M. et al. IL-2 and Beyond in Cancer Immunotherapy. **Journal Of Interferon & Cytokine Research**, v. 38, n. 2, p.45-68, 2018.

YU, W.D. et al. Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. **Cancer letters**, v. 452, p. 66-70, 2019.

ZITVOGEL, L. et al. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. **Immunity**, v. 39, n. 1, p.74-88, 2013.

ANEXO 1

Avaliação de vesículas autofágicas. **A.** Vesículas autofágicas (AVOs) das células B16-F10 incubadas por 24h com com tartrolon D/E a 12 μM (TRL), doxorubicina a 0,6 μM (DOX) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-) com condições normais de cultivo celular - utilizando 10% de soro fetal bovino (SFB) no meio DMEM. **B.** Vesículas autofágicas (AVOs) das células B16-F10 incubadas por 24h com com tartrolon D/E a 12 μM (TRL), doxorubicina a 0,6 μM (DOX) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-) com condições de *starvation* no cultivo celular - utilizando 1% de soro fetal bovino (SFB) no meio DMEM. **C.** Vesículas autofágicas (AVOs) das células B16-F10 incubadas com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-), com tartrolon D/E a 12 μM (TRL) por 10 minutos e por 1 hora em com condições normais de cultivo celular - utilizando 10% de soro fetal bovino (SFB) no meio DMEM. **D.** Vesículas autofágicas (AVOs) das células B16-F10 incubadas com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-), com tartrolon D/E a 12 μM (TRL) por 10 minutos e por 1 hora em condições de *starvation* de cultivo celular - utilizando 1% de soro fetal bovino (SFB) no meio DMEM. Ref: THOME M.P. et al. Ratiometric analysis of acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. Journal of Cell Science, v. 129, n. 24, p. 4622, 2016.

