



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

KEILLA SANTANA DA SILVA FERNANDES

**VACINAÇÃO COM CÉLULAS DE MELANOMA B16-F10 EXPOSTAS À
CROMOMICINA A₅ INDUZ ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE ANTITUMORAL**

FORTALEZA

2024

KEILLA SANTANA DA SILVA FERNANDES

VACINAÇÃO COM CÉLULAS DE MELANOMA B16-F10 EXPOSTAS À
CROMOMICINA A₅ INDUZ ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE ANTITUMORAL

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, da
Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia
de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras
Wilke

FORTALEZA

2024

KEILLA SANTANA DA SILVA FERNANDES

VACINAÇÃO COM CÉLULAS DE MELANOMA B16-F10 EXPOSTAS À
CROMOMICINA A₅ INDUZ ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE ANTITUMORAL

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, da
Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia
de Produtos Naturais.

Aprovada em 27/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dra. Dayane Alves Costa
FIOCRUZ/CE

Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F399v Fernandes, Keilla Santana da Silva.

Vacinação com células de melanoma B16-F10 expostas à Cromomicina A5 induz
ativação da imunidade antitumoral / Keilla Santana da Silva Fernandes. – 2024.
78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

1. cromomicina A5. 2. morte celular imunogênica. 3. melanoma. 4. vacinação. 5. linfócitos
T e células dendríticas. I. Título.

CDD 615.1

A Deus, digno de toda honra e glória.
Ao meu marido, Davi, e aos meus
pais, Alisio e Helena, por todo amor,
apoio e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor Deus, fonte de todo saber e criador de todas as coisas. Sou grata por ter, com mão poderosa, sustentado a minha vida até aqui e por tamanha graça e misericórdia que me alcançaram. Agradeço por ser fonte de toda benção e rendo louvores por tudo que foi feito neste trabalho.

Ao meu marido, **Davi Paz Fernandes**, por ser meu melhor amigo, amor, companhia e incentivo. Obrigada por me ajudar em tantas coisas, por sempre acreditar em mim e por não me deixar desanimar e desistir. Amo muito você, meu amor.

Aos meus pais, **Helena Duarte** e **Alisio Santana**, pelo enorme esforço e alegria com que sempre me ajudaram e me apoiaram. Sou grata pelas orações, pelo amor incondicional e por toda ajuda que me deram nas mais diferentes áreas. Amo vocês demais.

A minha tia querida, **Cilene Santana**, por sempre acreditar e se orgulhar de mim. Obrigada por me ajudar em tudo, desde sempre.

Ao Prof. Dr **Diego Veras Wilke**, por toda orientação prestada a mim durante esses anos, por todo apoio e entusiasmo, bem como pelas ideias e pela ajuda prática durante parte dos experimentos.

Às queridas doutoras **Dayane Costa** e **Juliana Ueda** por aceitarem fazer parte da minha banca de mestrado e por todas as considerações e contribuições feitas para melhoria desse trabalho.

Ao querido Dr. **João Paulo Mesquita Luiz**, pela enorme paciência e disposição com que me ajudou na realização dos experimentos na USP-Ribeirão Preto, bem como pela gentileza em tirar minhas dúvidas sempre que necessário e pela grata surpresa de nossa amizade formada ali.

A todos os membros do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (**LaBBMar**), por todos esses anos de amizade, apoio e contribuição na área científica. Sou muito grata por tudo que pude viver com vocês nesse período. Muito obrigada, **Thaís Brito**, **Katharine Gurgel**, **Maísa Viana**, **Mariana**

Dantas, Andréa Oliveira, Clara Norões, Yuri Silva, Eduardo Soeiro, Taisa, Marcelo Fernandes, Marcelo e Talita.

Um agradecimento especial à Dra. **Alexia Assef** e ao Me. **Felipe Barros**, pela grande amizade, companheirismo e orientação. Muito obrigada pelo apoio e por todo conhecimento que, paciente e diariamente, sempre deram a mim.

A minha querida amiga **Rebecca Lima**, por toda amizade, incentivo, orações e longas conversas que me ajudam tanto. Amo você, amiga.

À **Unidade Multiusuário** do NPDM, agradeço pelo suporte técnico, que contribuiu grandemente para o meu trabalho.

Ao **INCT-BioNat**, pelo apoio financeiro durante a mobilidade acadêmica feita para USP-Ribeirão Preto.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

VACINAÇÃO COM CÉLULAS DE MELANOMA B16-F10 EXPOSTAS À CROMOMICINA A₅ INDUZ ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE ANTITUMORAL. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. 2024. Aluna: Keilla Santana da Silva Fernandes. Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

RESUMO

O câncer é um termo dado a um conjunto de doenças de biologia complexa e a segunda causa de morte no mundo. O melanoma metastático é um tipo de câncer que possui alta agressividade, e as terapias mais eficazes ainda apresentam resposta limitada em menos da metade dos pacientes. Alguns quimioterápicos citotóxicos de primeira linha, como a doxorrubicina e o paclitaxel, induzem a ativação do sistema imunológico do paciente por meio da indução de morte celular imunogênica (ICD, do inglês "*immunogenic cell death*"), que é um tipo raro de morte celular regulada, cuja indução desencadeia respostas mais eficazes e duradouras contra o câncer. As células tumorais, quando são submetidas a esse tipo de morte, funcionam como uma vacina, liberando sinais de perigo, que são os padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês "*damage associated molecular patterns*"), bem como antígenos tumorais, que podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico. As cromomicinas (CAs) são moléculas produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces* que possuem atividades biológicas importantes, como citotoxicidade contra células tumorais, sendo consideradas promissoras para aplicação na área farmacológica. Dessa forma, nesse estudo avaliou-se a ativação da imunidade celular antitumoral através da vacinação de camundongos *Mus musculus* fêmeas da linhagem Black C57BL/6 com células de melanoma B16-F10 pré-expostas à cromomicina A₅ (CA₅). A vacinação dos animais foi a etapa inicial dos experimentos de imunofenotipagem de células dendríticas (DCs, do inglês "*dendritic cells*") e linfócitos, bem como do ensaio de citotoxicidade de esplenócitos de animais vacinados contra células de melanoma B16-F10. Estes experimentos culminaram em análise de citometria de fluxo. Além desses experimentos, foram feitas dosagens de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) tanto do soro dos animais vacinados quanto de

esplenócitos *naïve* em co-cultura com células B16-F10 expostas à CA₅. Foi observado que a exposição à CA₅ induz liberação de citocinas pró-inflamatórias. A estimulação de esplenócitos *in vitro* com células B16-F10 expostas à CA₅ induz liberação de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a análise do soro de animais vacinados mostrou a liberação de interleucina-12/23 (IL-12/IL-23). Foi visto também que a vacinação com células B16-F10 expostas à CA₅ ativa DCs e linfócitos T. A ativação de DCs foi evidenciada, além da produção de citocinas, pelo aumento da população de DCs convencionais do tipo-2 (cDC2, do inglês “*type-2 Conventional Dendritic Cells*”) (CD11b⁺CD11c⁺) e a expressão dos marcadores de ativação CD80, CD86 e MHC-II na superfície dessas células. A vacinação também ativou a população de cDCs do tipo-1 (CD11b⁻CD11c⁺), o que foi visto pelo aumento da expressão de CD80 e CD86. A ativação de linfócitos T foi evidenciada pelo aumento da expressão dos marcadores CD69, CD25 e CD44^{high} em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Todos os resultados supracitados tiveram $p < 0,05$. O presente estudo mostrou ativação imunológica antitumoral em animais vacinados com células B16-F10 expostas à CA₅. Esses resultados estimulam a realização de estudos adicionais de desenvolvimento pré-clínico da CA₅ como possível fármaco anticâncer.

Palavras-chave: cromomicina A₅; morte celular imunogênica; melanoma; vacinação; linfócitos T; células dendríticas.

VACCINATION WITH B16-F10 MELANOMA CELLS EXPOSED TO CHROMOMICIN A5 INDUCES ACTIVATION OF ANTITUMORAL IMMUNITY. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. 2024. Aluna: Keilla Santana da Silva Fernandes. Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

ABSTRACT

Cancer is a set of diseases with complex biology posing the second cause of death in the world. Metastatic melanoma is a type of cancer highly aggressive, and the most effective therapies still show limited responses in less than half of patients. Some first-line cytotoxic chemotherapy drugs, such as doxorubicin and paclitaxel, induce the activation of the patient's immune system by inducing immunogenic cell death (ICD), which is a rare type of regulated cell death. ICD inducers produce more effective and long-lasting responses against cancer. Tumor cells, when subjected to this type of death, function as a vaccine, releasing danger signals, which are damage-associated molecular patterns (DAMPs), as well as tumor antigens, which can be recognized by the immune system. Chromomycins (CAs) are molecules produced by bacteria of the genus *Streptomyces* that have important biological activities, such as cytotoxicity against tumor cells, and are considered promising for application in the pharmacological area. Therefore, in this study, the activation of antitumor cellular immunity was evaluated through the vaccination of female *Mus musculus* mice of the Black C57BL/6 lineage with B16-F10 melanoma cells pre-exposed to chromomycin A₅ (CA₅). Vaccination of the animals was the initial stage of the immunophenotyping experiments of dendritic cells (DCs) and lymphocytes, as well as the cytotoxicity test of splenocytes from animals vaccinated against B16-F10 melanoma cells. These experiments culminated in flow cytometry analysis. In addition to these experiments, cytokine levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in both serum from vaccinated animals and naïve splenocytes in co-culture with B16-F10 cells exposed to CA₅. It was observed that exposure to CA₅ induces the release of pro-inflammatory cytokines. Stimulation of splenocytes in vitro with B16-F10 cells exposed to CA₅

induces releasing of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and analysis of serum from vaccinated animals showed the release of interleukin-12/23 (IL- 12/IL-23). It was also seen that vaccination with B16-F10 cells exposed to CA5 activates DCs and T lymphocytes. The activation of DCs was evidenced, in addition to the production of cytokines, by the increase in the population of type-2 conventional DCs (cDC2) (CD11b⁺CD11c⁺) and the expression of the activation markers CD80, CD86 and MHC-II on the surface of these cells. Vaccination also activated the type-1 cDC population (CD11b⁻CD11c⁺), which was seen by increased expression of CD80 and CD86. The activation of T lymphocytes was evidenced by the increased expression of the markers CD69, CD25 and CD44^{high} on CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes. All aforementioned results showed $p < 0.05$. The present study showed antitumor immune activation in animals vaccinated with B16-F10 cells exposed to CA₅. These results encourage additional studies on the preclinical development of CA₅ as a possible anticancer drug.

Keywords: chromomycin A₅; immunogenic cell death; melanoma; vaccination; T lymphocytes; dendritic cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características adquiridas por células malignas, necessárias ao desenvolvimento de câncer.....	19
Figura 2 – Células do Microambiente Tumoral (TME).....	20
Figura 3 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	21
Figura 4 – Número estimado de novos casos de todos os cânceres entre 2022 e 2050, para ambos os sexos (idade entre 0-85+).....	22
Figura 5 – Progressão tumoral do melanoma baseada no modelo Clark.....	23
Figura 6 – Principais sub-rotinas de morte celular regulada.....	26
Figura 7 – Principais características da Morte Celular Imunogênica (ICD).....	28
Figura 8 – Mapa mundial com destaque para o Brasil e a Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil.....	30
Figura 9 – Bactérias ambientais coletadas no litoral brasileiro.....	33
Figura 10 – Planejamento experimental.....	40
Figura 11 - Estrutura molecular representativa da cromomicina A ₅ (CA ₅) isolada de <i>Streptomyces</i> sp.....	43
Figura 12 - Estratégia de <i>gates</i> para citometria de fluxo.....	47
Figura 13 – Estratégia de <i>gates</i> utilizando controle FMO.....	49
Figura 14 - Estratégia de <i>gates</i> para análise da população de células dendríticas.....	49
Figura 15 - Estratégia de <i>gates</i> para análise da ativação de células dendríticas.....	50
Figura 16 - Estratégia de <i>gates</i> para análise da ativação de linfócitos T.....	51

Figura 17 - Estratégia de <i>gates</i> para análise da ativação de linfócitos T.....	52
Figura 18 - Análise da citotoxicidade de esplenócitos contra células B16-F10.....	55
Figura 19 - Esplenócitos <i>naïve</i> produzem TNF- α quando tratados com B16-F10 exposta à CA ₅	56
Figura 20 - Vacinação aumenta produção de IL-12/IL-23.....	57
Figura 21 - Vacinação com células de melanoma expostas à CA ₅ aumenta expressão de CD80 e CD86 na população cDC1 (<i>in vivo</i>).....	58
Figura 22 - Vacinação com células de melanoma expostas à CA ₅ aumenta população cDC2 (<i>in vivo</i>).....	59
Figura 23 – Vacinação com células de melanoma expostas à CA ₅ ativa cDC2 (<i>in vivo</i>).....	60
Figura 24 - Células B16-F10 expostas à cromomicina A ₅ (CA ₅) induzem a ativação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8.....	62
Figura 25 - Vacinação com células de melanoma expostas à CA ₅ aumenta expressão de células T duplo-marcadas.....	63
Figura 26 - Melanoma exposto à CA ₅ ativa Linfócitos T em linfonodos drenantes.....	64
Figura 27 - Esplenócitos reestimulados têm atividade citotóxica contra células tumorais.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Painel utilizado na citometria para imunofenotipagem de células dendríticas e linfócitos.....	48
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

ACS	American Cancer Society
ANOVA	Análise de variância
ANXA1	Anexina A1
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAs	Cromomicinas
cDC1	Células Dendríticas convencionais do tipo-1, do inglês “ <i>type-1 conventional Dendritic Cells</i> ”)
cDC2	Células Dendríticas convencionais do tipo-2, do inglês “ <i>type-2 conventional Dendritic Cells</i> ”)
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRT	Calreticulina
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
DAMP	Padrão Molecular Associado ao Dano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ”
eIF2a	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERp57	Proteína 57 residente no retículo endoplasmático, do inglês “ <i>endoplasmic reticulum - resident protein 57</i> ”
FSC	Desvio frontal, do inglês “ <i>Forward scatter</i> ”

GBM	Grupo Brasileiro de Melanoma
HMGB1	High Mobility Group Box Protein 1
HSP	Proteínas do choque térmico, do inglês <i>“heat shock protein”</i>
IARC	Agência Internacional para Pesquisas em Câncer
IC50	Concentração inibitória média
ICD	Morte celular imunogênica, do inglês <i>“Immunogenic Cell Death”</i>
IFN	Interferon gama
IL-2	Interleucina 12
IL-23	Interleucina 23
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LaBBMar	Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha
LAFIPLAM	Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais
MFI	Intensidade média de fluorescência, do inglês <i>“Mean Fluorescence Intensity”</i>
MHC-II	Major histocompatibility complex II
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina
NCI	National Institute of Cancer
nM	Nanômetro
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PMTs	Fotomultiplicadores
PNMs	Produtos Naturais Marinhos
PNs	Produtos Naturais

RCD	Morte celular regulada, do inglês " <i>regulated cell death</i> "
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Desvio lateral, do inglês " <i>Side Scatter</i> "
TBX2	T-box transcription factor 2"
TME	Microambiente tumoral, do inglês " <i>Tumor microenvironment</i> "
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Universidade Federal do Ceará
uM	Micromolar
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization
ZEE	Zona Econômica Exclusiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Câncer	18
1.2	Melanoma	22
1.3	Morte Celular Imunogênica	25
1.4	Produtos Naturais Marinhos	29
1.5	Microrganismos como fonte de Produtos Naturais	31
1.6	Cromomicinas	33
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	35
3	OBJETIVOS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Planejamento Experimental	39
4.2	Material biológico	41
4.2.1	Bactérias	41
4.2.2	Células	41
4.2.3	Animais	42
4.2.4	Cromomicina A ₅	42
4.3	Vacinação de camundongos C57BL/6	43
4.4	Obtenção e plaqueamento de esplenócitos e linfonodos drenantes	44
4.4.1	Esplenócitos	44
4.4.2	Linfonodos	45

4.5	Avaliação da produção de citocinas inflamatórias.....	45
4.5.1	Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	45
4.6	Citometria de fluxo.....	46
4.6.1	Estratégia de <i>gates</i> e análise dos dados.....	46
4.7	Imunofenotipagem de células dendríticas e linfócitos T.....	47
4.8	Avaliação da citotoxicidade de esplenócitos contra células tumorais.....	53
5	RESULTADOS	55
5.1	Ativação de células dendríticas (DCs) por células B16-F10 expostas à CA5	55
5.2	Ativação de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ por vacinação com células B16- F10 expostas à CA5.....	60
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um termo dado a um conjunto heterogêneo de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal de células, que podem invadir e colonizar tecidos vizinhos e se espalhar para outros órgãos através da metástase (TORRE et al., 2015; INCA, 2015). O câncer pode começar em todas as partes do corpo, pois o processo de proliferação e divisão celular é natural para as células normais. Quando essas células envelhecem ou se apresentam danificadas, elas são direcionadas a algum tipo de morte, e novas células são geradas. No entanto, quando as células ganham habilidades de evasão do controle celular, o câncer pode se desenvolver (NCI, 2015).

No câncer, há perda de controle de lise celular, falha no reparo de DNA, bloqueio de checagem e inúmeros outros fatores que levam ao desenvolvimento do câncer. Desse modo, o câncer é uma manifestação de, pelo menos, 14 importantes alterações fisiológicas que ocasionam defeitos nos circuitos regulatórios responsáveis por proliferação celular normal e homeostase. Hanahan & Weinberg (2022) abordam essas características do câncer juntas como um princípio organizador que possibilita a compreensão da vasta diversidade de cânceres (Figura 1). À medida que as células normais se tornam progressivamente neoplásicas, elas adquirem características distintivas em um processo de várias etapas. Ao passo que essas células adquirem essas características, elas vão se tornando tumorigênicas e, em último caso, malignas. Em suma, essas características são capacidades distintas e complementares que permitem o crescimento de tumores e a disseminação metastática. Essas alterações conferem capacidade às células malignas para que elas evadam ao sistema imune e consigam se estabelecer em diversos órgãos e tecidos (HANAHAN & WEINBERG, 2022).

Figura 1 - Características adquiridas por células neoplásicas, necessárias ao desenvolvimento de tumores malignos



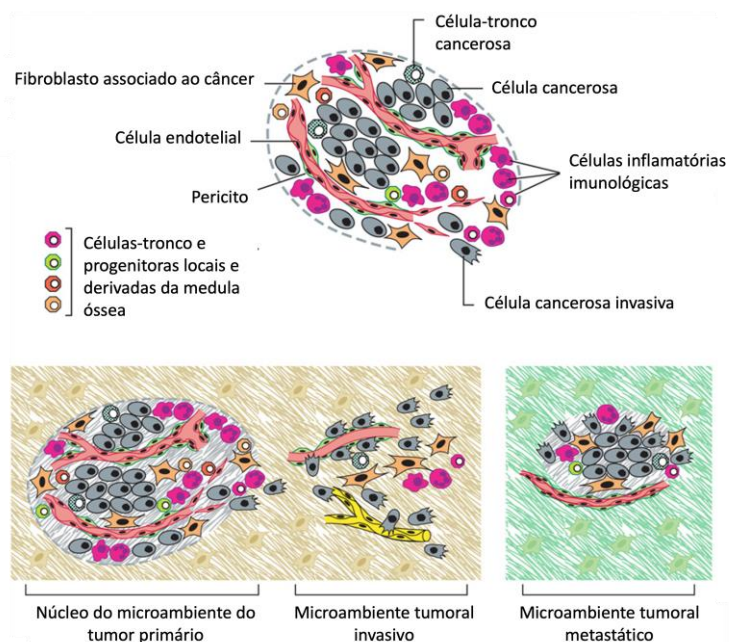
Fonte: Traduzida de Hanahan & Weinberg (2022).

Alguns mecanismos são adquiridos, devido às mutações, para que as células se tornem malignas. Os tumores são formados por células malignas e células do estroma, que formam um microambiente tumoral (TME, do inglês “*tumor microenvironment*”), que contribui para o aumento da agressividade da doença (HANAHAN & WEINBERG, 2022). Há interação entre células geneticamente alteradas, células normais, vasos e substâncias produzidas localmente ou que provêm da irrigação sanguínea. As principais células normais são fibroblastos, células imunes e células endoteliais que podem ter participação crucial em diversos processos da progressão tumoral (Figura 2). Essas células são levadas a funcionar em uma nova dinâmica tecidual, subvertidas principalmente pelas próprias células malignas (ONUCHIC & CHAMMAS, 2010).

Apesar de as células normais do TME poderem influenciar em processos como angiogênese, metástase e proliferação celular, elas normalmente não apresentam taxas desreguladas de proliferação ou

instabilidade genética aumentada. Elas têm sido estudadas como alvos de novas possibilidades terapêuticas, principalmente no que se diz respeito às células imunes e seus produtos no microambiente tumoral. Essas células imunes migram do macroambiente, onde o câncer está inserido, e passam a compor o estroma tumoral ou podem estar presentes antes do tumor e contribuir para o processo carcinogênico (ONUCHIC & CHAMMAS, 2010). Os tumores são semelhantes a órgãos, devido à natureza complexa. Justamente por causa disso, a biologia do câncer só pode ser devidamente compreendida através do estudo do microambiente tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Figura 2 - Células do Microambiente Tumoral (TME)





Fonte: Traduzida de Hanahan & Weinberg (2011).

O câncer é considerado o principal problema de saúde pública do mundo, estando entre as quatro principais causas de mortes em jovens e adultos na maioria dos países. Com a melhoria do saneamento e o desenvolvimento de vacinas e antibióticos, a mortalidade por doenças infecciosas declinou extraordinariamente, assim como houve mudança em relação às doenças cardiovasculares. Dessa maneira, o câncer passou a ser a primeira ou a segunda causa de mortes de adultos, entre 30 a 69 anos, em 134 dos 183 países e ocupa

o terceiro ou o quarto lugar em mais 45 países (IARC, 2020). O câncer continua crescendo e exercendo forte pressão física, emocional e financeira em indivíduos, famílias, comunidades e sistemas de saúde (WHO, 2020). Isso é observado especialmente nos países em desenvolvimento, sendo estes acometidos por 80% dos 20 milhões de casos novos da doença estimados para 2025.

A última estimativa realizada pelo INCA (2022) aponta para o triênio 2023-2025 a ocorrência de 704 mil novos casos de câncer no Brasil, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente, seguido pelos cânceres de mama e próstata, cólon e reto, pulmão e estômago. Os tipos mais incidentes em homens serão próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral, enquanto em mulheres serão mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide (Figura 3). O câncer de pele não melanoma representará, em média, 31,3% de todos os casos de câncer em homens e mulheres, com 220 mil novos casos.

Figura 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%		
Próstata	71.730	30,0%	Homens		Mama feminina	73.610	30,1%		
Cólon e reto	21.970	9,2%			Mulheres		Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%		
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%		
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%		
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%		
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%		
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%		
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%		
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%		

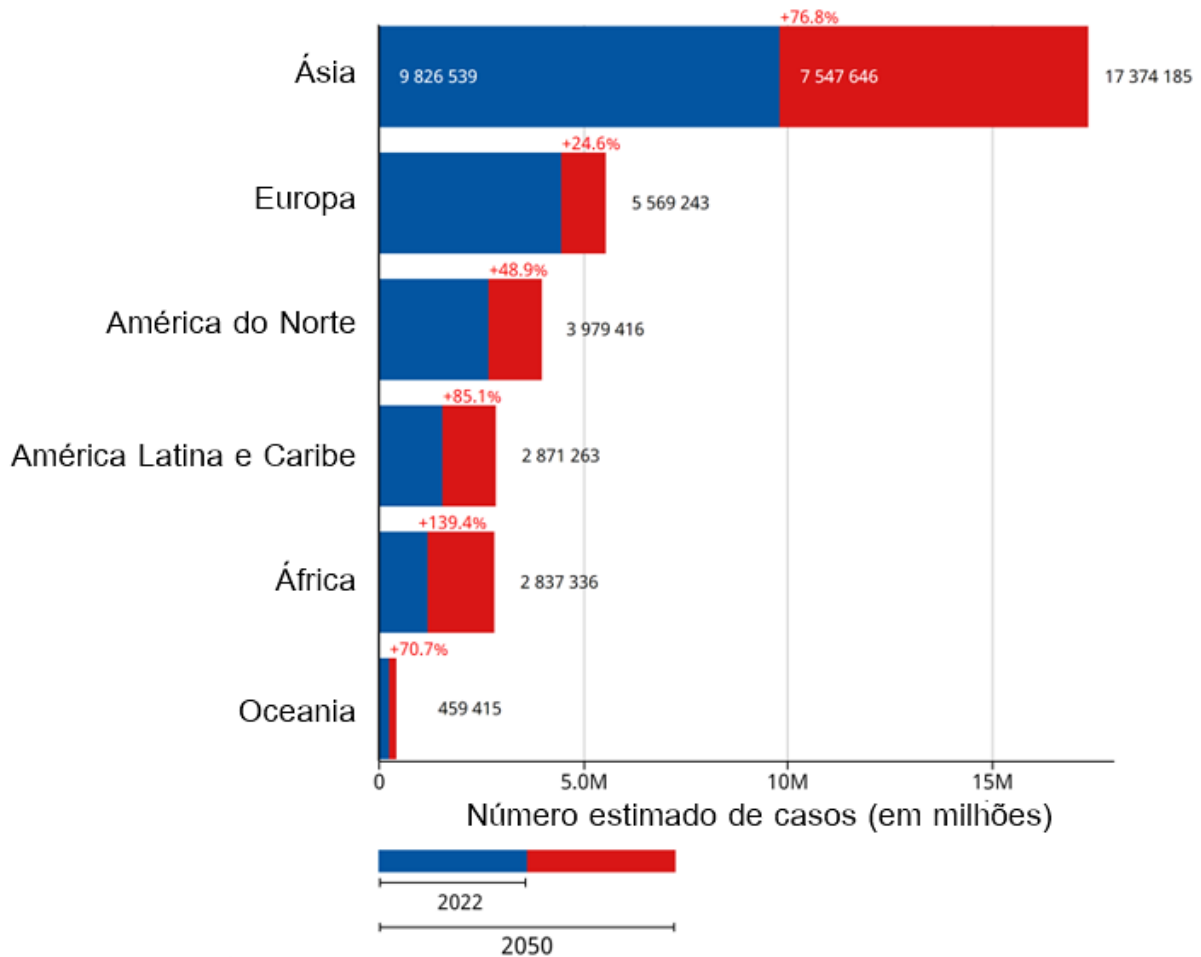
*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2022).

A partir de 2022, segundo a Agência Internacional para Pesquisas em Câncer (IARC, 2022), haverá um incremento de 85% em relação ao ano de 2022 na América Latina. A previsão global de câncer é de 33+ milhões de novos casos até o ano de 2050 (Figura 4). Os aumentos estimados na incidência de câncer de 2022 a 2040, usando alterações demográficas, ocorrerão em todos os países, mas os aumentos previstos são maiores nos países com Índice

de Desenvolvimento Humano (IDH) mais baixo.

Figura 4 - Número estimado de novos casos de todos os cânceres entre 2022 e 2050, para ambos os sexos (idade entre 0-85+)



Fonte: Traduzida de IARC (2022).

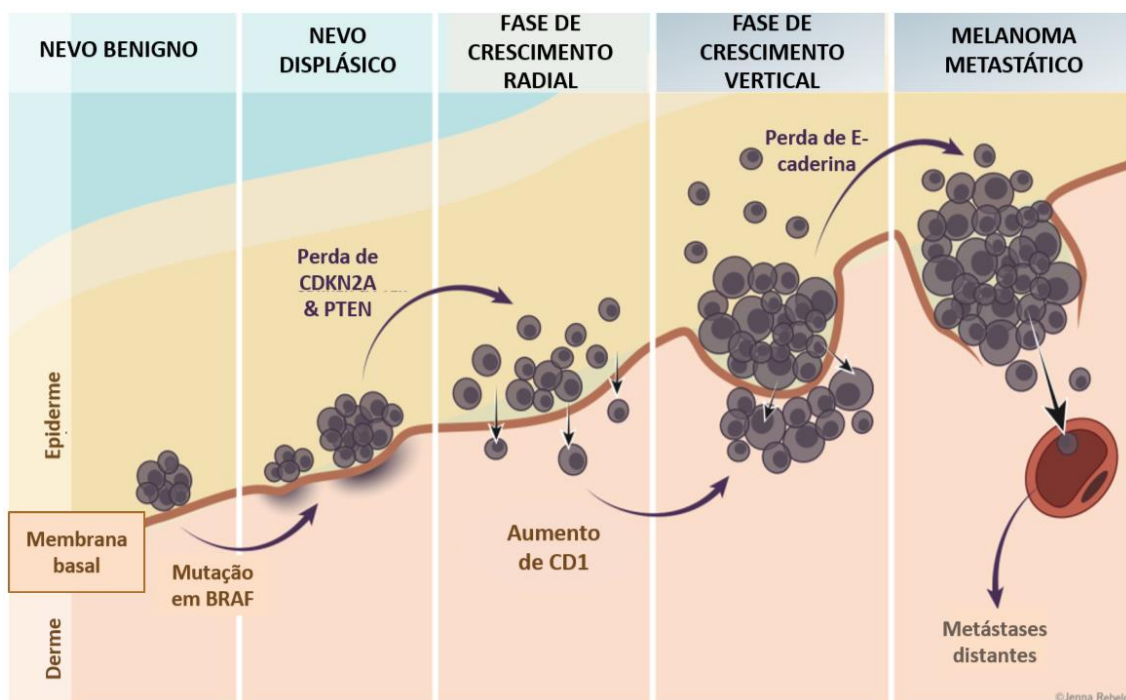
1.2 Melanoma

Há diferentes tipos de câncer que podem começar na pele. Os principais tipos de câncer de pele são carcinoma espinocelular, carcinoma basocelular e melanoma (NCI, 2020). O INCA (2022) estimou 8.980 novos casos de câncer melanoma para o triênio 2023-2025. Apesar de ser o tipo de câncer de pele menos incidente, é o mais agressivo devido sua capacidade de metástase. O melanoma é uma doença que se caracteriza pela formação de

células malignas a partir dos melanócitos, células que produzem melanina e são encontradas na parte mais profunda da epiderme. O melanoma é potencialmente agressivo porque pode invadir tecidos próximos e migrar para outras partes do corpo, como pulmão, fígado, osso e/ou cérebro. A maioria das mortes por câncer de pele é causada por melanoma (ACS, 2019; NCI, 2020).

Os melanócitos são responsáveis por produzir pigmentos que são importantes na proteção contra danos no DNA induzidos por UV. Quando há a perda de controle, os melanócitos começam a crescer de maneira descontrolada e adquirem a capacidade de migrar para fora da pele, processo inicial do que pode ser o melanoma (Figura 5). As alterações na pele podem resultar do excesso de radiação solar, predisposição genética, contato com substâncias cancerígenas etc. De uma forma geral, os melanócitos mudam gradualmente para células malignas como consequência de alterações aberrantes nos níveis moleculares e bioquímicos (CORICOVAC et al., 2018).

Figura 5 - Progressão tumoral do melanoma baseada no modelo Clark



Fonte: Traduzida de Seuradge & Wong (2006).

A maioria, cerca de 95%, consiste em tumores que surgem nas superfícies da pele expostas ao sol, podendo também ocorrer no olho, nas meninges e nas mucosas do trato gastrointestinal e genital. No Brasil, o número

de casos novos estimados para o triênio 2023-2025 será de 4.640 em homens e de 4.340 em mulheres (INCA, 2023). Ele representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão, mas é considerado o tumor cutâneo de maior importância, pois, se diagnosticado tardiamente, pode levar a 80% das mortes causadas por câncer de pele (BANDERCHI et al, 2013; GBM, 2020). Portanto, é o tipo de câncer de pele mais fatal, devido a sua agressividade e alta taxa de mortalidade (OLIVEIRA, 2011; CORICOVAC et al., 2018).

É importante ressaltar que esse tipo de câncer é dividido em melanoma não metastático e metastático. O metastático é o mais preocupante, pois existem poucas opções de tratamento eficazes quando o estágio é avançado. Quando o melanoma é diagnosticado em estágio inicial, sendo removido cirurgicamente, é considerado uma patologia com bom prognóstico; o mesmo não acontece para o melanoma metastático, considerado avançado. Por conta disso, os esforços nas últimas décadas têm sido principalmente em relação à prevenção e diagnóstico precoce do melanoma (CORICOVAC et al., 2018).

A dacarbazina e a temozolomida são dois dos fármacos mais utilizados para o tratamento do melanoma. Apesar disso, a eficácia é considerada baixa, com uma taxa de sobrevida reduzida (TEIMOURI et al., 2012; LUKE et al., 2017). A imunoterapia e a terapia direcionada também têm sido utilizadas nos últimos anos, principalmente quando o estágio do melanoma é muito avançado. A imunoterapia pode ser utilizada de forma isolada ou em associação a outras formas de tratamento, como a terapia alvo-direcionada. O princípio da imunoterapia é se valer do próprio sistema imunológico do paciente para combater o câncer (NCI, 2020).

Novas estratégias de tratamento foram desenvolvidas, como os fármacos inibidores de *checkpoint* imunológico. Dentre esses tipos de fármacos, destaca-se o ipilimumabe, que atua bloqueando o CTLA-4, um receptor expresso em linfócitos T. O CTLA-4 atua regulando negativamente a ativação dos linfócitos T, impedindo uma resposta imunológica dependente de células T (LARKIN et al, 2015). Outro importante inibidor de *checkpoint* imunológico é o nivolumabe, que age bloqueando o receptor da morte programada (PD-1), impedindo a ligação com o ligante de morte programada 1 (PD-L1)

(MAVERAKIS et al., 2015; QUEIROLO et al., 2019). Alguns estudos demonstraram que pacientes que utilizaram esses medicamentos em monoterapia ou em terapia combinada obtiveram um aumento considerável no tempo de sobrevida (LARKIN et al., 2015; QUEIROLO et al., 2019).

1.3 Morte Celular Imunogênica

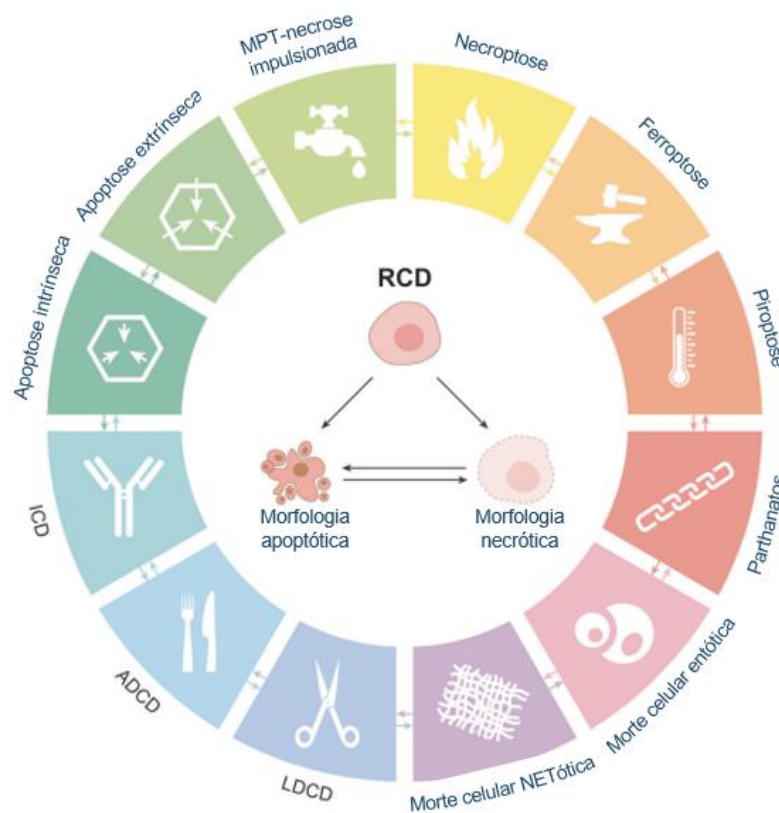
A morte celular regulada (RCD, do inglês “*regulated cell death*”) é um conjunto de mecanismos geneticamente codificados que agem para a eliminação direcionada de células supérfluas, irreversivelmente danificadas ou potencialmente prejudiciais. Ao contrário da morte celular, a RCD depende de um maquinário molecular complexo, que pode ser modulado por fármacos ou intervenções genéticas, de forma que seja retardado ou acelerado. Células de mamíferos, quando expostas a perturbações irreversíveis do microambiente intracelular ou extracelular, podem ativar uma das cascatas de transdução de sinal, levando-as à morte. Existem 12 tipos diferentes de RCD, sendo cada uma iniciada e propagada por mecanismos moleculares interconectados, podendo manifestar-se com um espectro de características morfológicas (Figura 6). Essas características variam de totalmente necróticas a totalmente apoptóticas, com um perfil imunomodulador que varia de anti-inflamatório e tolerogênico a pró-inflamatório e imunogênico. Desse modo, as alterações morfológicas e bioquímicas permitem distinguir os tipos de morte em estudos experimentais (GALLUZZI et al., 2018).

Em algumas circunstâncias, a RCD induzida por estresse celular pode desencadear uma resposta inflamatória que pode culminar na ativação da imunidade adaptativa, impulsionada com o estabelecimento de memória imunológica de longo prazo (GALLUZZI et al., 2020). Essa forma rara de RCD é denominada morte celular imunogênica (ICD, do inglês “*Immunogenic Cell Death*”), desencadeada na presença de antígenos de células em processo de morte, principalmente células tumorais (BEZU et al., 2018).

Isso acontece devido à liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês “*Damage Associated Molecular Patterns*”), que são sinais de perigo, também chamados “alarminas” (GALLUZZI et al., 2018). Os

DAMPs são liberados em estresse de retículo endoplasmático, autofagia, apoptose e necrose secundária e são responsáveis pela ativação de uma cascata de eventos que culmina numa resposta imune antitumoral específica. Para que a ICD ocorra, é necessário haver a plena indução de liberação de DAMPs pelas células tumorais, além de um sistema imune eficiente para a percepção dos efetores imunológicos (HUMEAU et al., 2020; VANMEERBEEK et al., 2020). A capacidade da RCD de impulsionar a imunidade adaptativa depende de dois parâmetros principais: antigenicidade e adjuvantividade (GALLUZZI et al., 2020).

Figura 6 - Principais sub-rotinas de morte celular regulada



Fonte: Traduzida de GALLUZZI et al., 2018.

A antigenicidade está relacionada à expressão e apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos (APCs) para linfócitos T *naïve*. Em condições normais, as células são limitadas em sua capacidade de induzir ICD, pela tolerância central, que impede que os antígenos normais sejam reconhecidos pelos linfócitos. No entanto, as células infectadas, ou malignas, apresentam antigenicidade suficiente para impulsionar respostas imunes, pois

expressam uma série de antígenos para os quais os linfócitos normalmente estão disponíveis (GALLUZZI et al., 2020).

A adjuvanticidade acontece através da liberação ou exposição a DAMPs, necessários para o recrutamento e maturação de APCs. Embora a maioria das células contenha DAMPs em níveis suficientes para induzir uma forte estimulação de APCs, a sua liberação vai depender de respostas intracelulares impulsionadas pelo estressor inicial. Além disso, as condições do microambiente também têm uma forte influência na propensão de células infectadas ou malignas iniciarem a resposta imune adaptativa ou ficarem suscetíveis à lise por linfócitos T citotóxicos (CTLs). Por exemplo, células tumorais murinas podem ser irradiadas *in vitro* e utilizadas para imunizar camundongos contra um desafio de células viáveis da mesma linhagem. Esse procedimento é semelhante a uma vacinação, podendo demonstrar a geração de memória imunológica. No entanto, em condições terapêuticas, o microambiente tumoral costuma ser imunossupressor, o que limita a imunidade induzida pela ICD. Dessa forma, a irradiação de uma lesão neoplásica estabelecida em camundongos geralmente não consegue gerar uma resposta imune com força suficiente para erradicar uma lesão distante e não irradiada (efeito abscopal), excetose houver o tratamento adicional com moléculas imunoestimulantes (GALLUZZI et al., 2020).

Em estudos pré-clínicos, foi observado que as antraciclinas e alguns outros quimioterápicos possuem maior eficiência no controle do crescimento tumoral em camundongos imunocompetentes do que em imunodeficientes, o que foi posteriormente validado em pacientes oncológicos (KROEMER et al., 2015; GALLUZZI et al., 2020). Um dos principais mecanismos envolvidos nessa resposta é a capacidade desses medicamentos de induzirem a ICD, o que significa que as células tumorais, em processo de morte, ficam visíveis e reconhecíveis pelo sistema imunológico (GALLUZZI et al., 2020).

Alguns dos principais DAMPs relacionados à ICD são: a exposição de calreticulina (CRT) e da ERp57 (do inglês, Endoplasmic Reticulum - Resident Protein 57) na superfície celular, a liberação de uma proteína nuclear não histona, o HMGB1 (do inglês, High Mobility Group Box Protein 1), a liberação de adenosina trifosfato (ATP) e fosforilação do fator de iniciação da tradução

eucariótica 2 α (eIF2 α) (BEZU et al., 2018; RADOGNA et al., 2019). A detecção desses DAMPs é importante para fazer previsões sobre a capacidade dos fármacos quanto à indução de ICD. Outros DAMPs também são importantes para a ICD, como as proteínas do choque térmico (HSP, do inglês “*heat shock protein*”), interferons (IFN) do tipo I, anexina A1 (ANXA1), entre outros (Figura 7) (KEPP et al., 2014; GOMEZ-CADENA et al., 2016).

Figura 7 - Principais características da Morte Celular Imunogênica (ICD)



Fonte: Traduzida de GALLUZZI et al., 2020.

Para validar a indução de ICD por um fármaco ou molécula é necessário realizar alguns testes *in vitro*, para: detecção de DAMPs, caracterização fenotípica das células tumorais expostas a alguma molécula indutora de ICD, avaliação de células imunológicas em co-cultura com células em processo de morte após serem expostas a mesma molécula. No entanto, os ensaios *in vivo* são considerados o padrão-ouro e únicos testes válidos para a confirmação da indução de ICD pela molécula em questão. A vacinação é um dos experimentos *in vivo* que podem ser realizados para essa finalidade (GOMEZ-CADENA et al., 2016; HUMEAU et al., 2019; VANMEERBEEK et al., 2020).

1.4 Produtos Naturais Marinhos

A busca por novos fármacos, em relação ao tratamento do câncer, tem tido uma grande demanda nas últimas décadas, dando um caráter de urgência à prospecção de novas moléculas. Nesse contexto, sabe-se que os produtos naturais (PNs) são a fonte de diversidade química mais importante para descobertas de novos fármacos. O interesse pela descoberta de medicamentos derivados de PNs aumentou no mundo em desenvolvimento, principalmente após a adoção da Convenção sobre Diversidade Biológica, de 1993 (KINGSTON, 2011).

Durante muitos anos, os PNs forneceram a única fonte de produtos farmacêuticos, dando enormes contribuições à saúde humana por meio de compostos como quitina, morfina, aspirina, antibióticos, dentre outros. Durante os anos 1950, o potencial dos PNs como agentes antineoplásicos foi reconhecido, e diversos estudos foram realizados pelo National Cancer Institute (NCI) (CRAGG & NEWMAN, 2018). Em comparação aos medicamentos quimicamente sintetizados, eles possuem diversas vantagens em termos de novidade de estruturas, biocompatibilidade e diversidade funcional, decorrentes de processos evolutivos (CHEN et al., 2020).

Na oncologia, a pesquisa de PNs aumentou no século XX, possibilitando a descoberta de diversas novas substâncias. Cerca de 60% dos fármacos anticâncer são originados de PNs, especialmente de plantas e microrganismos. A morbidade relacionada aos quimioterápicos é um dos maiores inconvenientes associados à quimioterapia clássica, tornando imprescindível a contínua busca por novos fármacos antineoplásicos que sejam de fácil administração e que possuam mínimos efeitos colaterais (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Há um imenso potencial de descoberta de novas moléculas derivadas de organismos marinhos e microrganismos, dada a diversidade metabólica existente e pouco explorada até o momento (Figura 8). À medida que o conhecimento sobre alvos terapêuticos cresce, aumenta também a necessidade e possibilidade de descoberta de novas drogas com potencial terapêutico

(COSTA-LOTUFO et al., 2010). O ambiente marinho é o maior representante da biodiversidade do planeta, cobrindo cerca de 70% da superfície da terra e apresentando 34 dos 36 filos conhecidos (KONIG et al., 1994). O estudo de produtos naturais marinhos (PNMs) trouxe uma diversidade de moléculas peculiares, com estruturas complexas nunca descritas, além de potentes atividades biológicas e interações com diversos alvos celulares (CRAGG & NEWMAN, 2018). Os PNs estão relacionados com complexas interações ecológicas e em processos fisiológicos. No caso particular dos PNM, a diversidade estrutural destes compostos é resultante de vias biossintéticas peculiares com características próprias, bastante distintas daquelas encontradas nos organismos terrestres (BLUNT et al., 2017).

Figura 8 - Mapa mundial com destaque para o Brasil e a Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil



Fonte: Traduzida de Wilke et al. (2020). Legenda: A inserção do gráfico de barras representa uma visão geral numérica de produtos naturais marinhos (PNMs) com potencial anticâncer no Brasil, ademais como esses PNM têm sido estudados.

No ambiente marinho, os invertebrados são fortes candidatos quanto à prospecção de novas moléculas. Os cnidários são animais aquáticos que podem viver tanto em colônias quanto de forma solitária. O estudo químico com cnidários tem crescido no Brasil desde a década de 1960, principalmente a partir da descoberta das prostaglandinas. Desde então, percebeu-se o potencial destes organismos como produtores de compostos de grande interesse

farmacológico. Dentre os cnidários, podem ser destacados os zoantídeos, que são exclusivamente marinhos e habitantes de regiões costeiras, pois grande parte dos metabólitos secundários isolados dentre os invertebrados marinhos foi desse grupo. *Palythoa* é um gênero de zoantídeo colonial, e suas espécies são conhecidas pelo hábito de incorporarem grãos de sedimento nas paredes de seus corpos; suas colônias se estendem formando grandes “tapetes” em regiões rochosas submersas (SOARES et al., 2006).

O *Palythoa caribaeorum* é uma espécie conhecida popularmente como “baba de boi”. Esses animais secretam uma substância tóxica chamada palitoxina, que está relacionada ao seu mecanismo de defesa, bem como à dominância do espaço em que vivem (BORGES, 2014). A literatura mostra uma série de relações ecológicas entre eles e outros táxons, como endossimbiose, comensalismo e parasitismo. Costa-Lotufo et al. (2017) avaliaram dois zoantídeos do gênero *Palythoa*, o *P. caribaeorum* e o *P. Variabilis*, coletados em diferentes faixas do litoral brasileiro. Eles foram submetidos a testes metabômicos, a fim de relacionar a localização geográfica e a composição química dos metabólitos produzidos por eles. Dentre outros achados, a pesquisa mostrou que há uma forte relação entre o hospedeiro e sua microbiota associada, bem como uma variação na produção química a depender do local de coleta.

Estes estudos se mostram estratégicos, uma vez que envolvem, de forma sustentável, a exploração da nossa biodiversidade, dado que os microrganismos são cultivados em laboratório. Além disso, contribuem para a ampliação do atual conhecimento da biodiversidade brasileira para atuar na prospecção de produtos naturais com potencial farmacológico (WILKE, 2009).

1.5 Microrganismos como fonte de Produtos Naturais

Devido à imensa diversidade genética e metabólica, os microrganismos reservam imensurável potencial biotecnológico, além de incorporarem sustentabilidade à produção das moléculas biológicas por fermentação. Apesar disso, os estudos ainda são escassos devido ao reduzido número de grupos de pesquisa comprometidos com a bioprospecção de forma

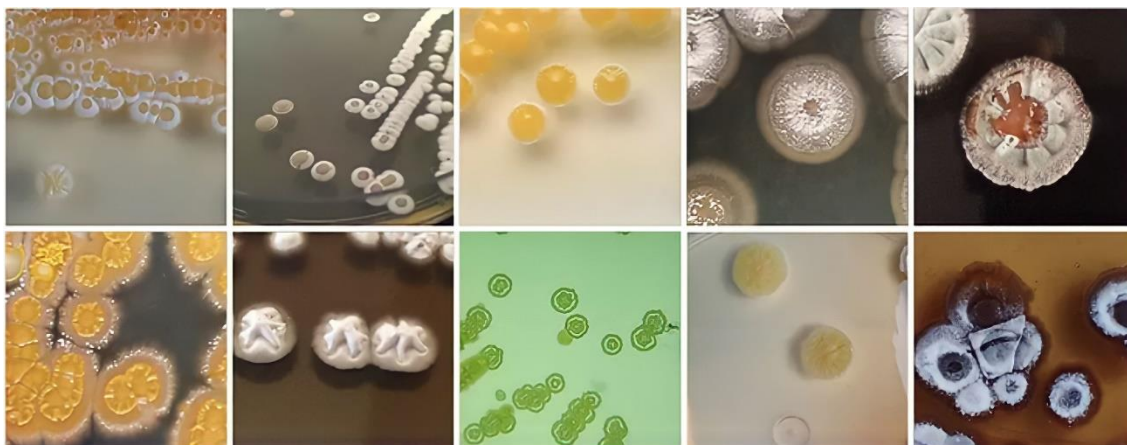
sistemática (WILKE et al., 2020).

Durante muito tempo, acreditou-se que as moléculas bioativas isoladas de invertebrados marinhos eram produzidas somente por eles. No entanto, uma parte considerável dessas moléculas é produzida por microrganismos simbiotes associados a esses animais. Eles têm um metabolismo evolutivamente diversificado e possuem diversas estratégias de adaptação, características que os tornam uma fonte promissora de prospecção de moléculas com potencial farmacológico (HUG et al., 2020).

Dentre os microrganismos mais promissores, estão os pertencentes ao filo Actinobacteria. Os metabólitos produzidos por eles são codificados por genes relacionados à resistência, transporte e regulação (KORMANEC et al., 2020). O desenvolvimento do sequenciamento genômico revelou o potencial dos metabólitos secundários dos estreptomicetos, do gênero *Streptomyces*, em que cada cepa contém 18 a 54 agrupamentos de genes direcionados à biossíntese de inúmeros metabólitos secundários, dos quais apenas uma minoria foi produzida em condições de laboratório. Uma pesquisa relatou mais de 80 compostos bioativos isolados desse filo, principalmente do gênero *Streptomyces*, o que evidencia a importância de estudos relacionados a esses microrganismos e a produtos naturais marinhos (PNMs) de uma forma geral (RODRIGUES; SILVA, 2016).

As mitramicinas, por exemplos, são PNM importantes isolados de *Streptomyces* spp. Elas são ácidos aureólicos policetídeos, assim como as cromomicinas e olivomicinas, pertencentes ao grupo dos policetídeos aromáticos (LOMBÓ et al., 2006). Desde a sua descoberta, em 1953, a mitramicina passou por vários estudos, sendo aprovada em 1970 para uso contra diversos tipos de câncer, como leucemia mielóide e câncer de testículo (WOHLERT et al., 1999; KORMANEC et al., 2020).

Figura 9 - Bactérias ambientais coletadas no litoral brasileiro



Fonte: MicroMarin (Universidade Federal do Ceará - UFC). Link de acesso: <https://www.labmar.ufc.br/micromarinbr>

1.6 Cromomicinas

As cromomicinas, assim como as mitramicinas, são policetídeos tricíclicos glicosilados pertencentes aos ácidos aureólicos. Elas possuem atividade antimicrobiana e antitumoral e são produzidas e secretadas por actinobactérias do gênero *Streptomyces*. A cromomicina A₃ (CA₃) possui atividade antitumoral ligando-se reversivelmente às fendas menores de DNA através da interação com as regiões de DNA ricas em citosina e guanina (C-G), na presença de íons metálicos como o Mg²⁺, impedindo a replicação e a transcrição (CHAKRABARTI et al., 2000).

Estudos realizados por Guimarães et al. (2014) mostraram que a cromomicina A₂ (CA₂) foi capaz de induzir autofagia em células de melanoma metastático humano (MALME-3M). No mesmo trabalho, um painel contendo sete linhagens celulares, sendo seis linhagens tumorais e uma linhagem não tumoral, foi submetido ao tratamento com CA₂ em tempos diferentes (24, 48 e 72 horas) pelo método de MTT. Os resultados mostraram que a CA₂ foi capaz de inibir a proliferação e causar morte das células a nível de nM.

Pinto et al. (2020) selecionaram a cepa de *Streptomyces* sp. (BRA-384) para identificação de compostos químicos com potencial antitumoral. Eles identificaram quatro entidades químicas, da classe das cromomicinas (CA₅, CA₆,

CA₇ e CA₈), as quais foram testadas quanto a sua citotoxicidade contra cinco linhagens de células tumorais. Todas elas foram altamente potentes, apresentando valores de concentração inibitória média (IC₅₀) entre 0,2 e 133 nM.

O trabalho de Sahm et al. (2020) mostrou pela primeira vez que as cromomicinas CA₅ e CA₆ possuem afinidade pelo fator de transcrição TBX2 (do inglês "*T-box transcription factor 2*"). Este fator pode ser considerado um novo alvo da terapia anticâncer por estar superexpresso em alguns tipos de câncer, como de mama e próstata. O trabalho mostrou que tanto a CA₅ quanto a CA₆ exibiram uma ligação a resina testada, porém a CA₅ foi recuperada em maior quantidade quando a resina estava ligada ao TBX2.

Florêncio et al. (2022) também estudaram as cromomicinas A₅₋₈, e mostraram que elas exibiram características de ICD, como autofagia, apoptose, externalização de calreticulina e liberação de HMGB1. Além disso, a CA₅ apresentou o melhor perfil, tendo também induzido a liberação de ATP, externalização de ERp57, fosforilação de eIF2 α , bem como alteração de genes relacionados à autofagia, estresse de retículo endoplasmático e apoptose.

Todos esses resultados reforçam o grande potencial que as cromomicinas possuem. Novos experimentos podem elucidar ainda mais seu mecanismo de ação e trazer novas perspectivas para o seu uso clínico como um fármaco ou adjuvante anticâncer, assim como ratificar a importância dos estudos da biodiversidade marinha brasileira.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O câncer é um importante problema de saúde pública mundial, especialmente nos países em desenvolvimento. Estes países serão acometidos por 80% dos 20 milhões de novos casos de câncer estimados para 2025. O câncer representa a segunda causa de morte no mundo, ficando abaixo apenas de doenças cardiovasculares (WHO, 2015). A cada ano, milhões de pessoas morrem por algum dos 100 tipos de cânceres existentes (INCA, 2022).

O tratamento do câncer é baseado em protocolos de intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal, transplante de células-tronco, medicina de precisão e testes de biomarcadores (NCI, 2015). A quimioterapia é empregada na maior parte dos casos, seja utilizada de forma exclusiva ou em combinação com outras formas de tratamento. A maioria dos quimioterápicos antineoplásicos apresenta citotoxicidade, que elimina ou controla o crescimento tumoral. Embora a quimioterapia tenha se aprimorado ao longo das três últimas décadas, ocorrem diversos efeitos tóxicos também em tecidos saudáveis, que diminuem a qualidade de vida do paciente (VANNEMAN & DRANOFF, 2012). Os efeitos colaterais gerados dependem do tipo e do tempo de utilização da droga, do estado e metabolismo do paciente, dentre outros fatores (OLIVEIRA, 2011).

A imunoterapia visa aumentar a eficácia do tratamento oncológico, porém com menor citotoxicidade (NCI, 2015; INCA, 2022). Dessa forma, tanto a quimioterapia quanto a imunoterapia são estratégias importantes para o tratamento de diversos cânceres. A quimioterapia, apesar dos inúmeros efeitos colaterais, é a modalidade de tratamento mais utilizada, por ser mais acessível e, por vezes, conferir um aumento da sobrevida dos pacientes e uma maior chance de cura (GALLUZZI et al, 2020). Os imunoterápicos atuam mediante diferentes estratégias, que têm em comum a capacidade de gerar uma resposta imune antitumoral. Apesar de suas vantagens, o acesso ao uso de imunoterápicos ainda é muito limitado, devido ao seu alto custo. Sendo assim, é de extrema relevância a busca por novos compostos e fármacos quimioterápicos que tenham efeitos imunogênicos antitumorais, visando um tratamento com menos efeitos colaterais, com respostas mais eficazes e

duradouras (CHEN et al., 2017; YU et al., 2019).

O câncer de pele do tipo melanoma, caso seja diagnosticado tardiamente, pode levar a 80% das mortes causadas por câncer de pele (GBM, 2020). A imunoterapia tem sido a forma mais eficaz de tratamento para pacientes com melanoma avançado. Sendo assim, a indução de ICD é uma estratégia importante para o desenvolvimento de quimioterápicos para esses tumores, pois combina citotoxicidade contra células tumorais e liberação de sinais de ativação imunológica contra estas células (QUEIROLO et al., 2019; INCA, 2020).

Os inibidores de checkpoints imunológicos, apesar do sucesso terapêutico em tumores mais imunogênicos, como é o melanoma, ainda são ineficazes em uma parcela de pacientes com tumores que não possuem infiltração de células imunes, que são denominados tumores “frios”. Sendo assim, a combinação desses inibidores com compostos capazes de induzir melhores condições imunológicas no microambiente tumoral, pode aumentar a resposta imune antitumoral mesmo em tumores refratários às quimioterapias (HEINHUIS et al., 2019). Pode-se dizer, então, que o melanoma avançado carece de uma opção terapêutica para converter tumores “frios” em tumores “quentes”, dificultando a resposta clínica dos pacientes refratários (BONAVENTURA et al., 2019). Sendo assim, a identificação de compostos que sejam capazes de induzir ICD é uma estratégia promissora para aumentar o poder translacional de estudos pré-clínicos (GALON et al., 2019; QUEIROLO et al., 2019).

Na busca por novos compostos para serem utilizados na terapia contra o câncer, os produtos naturais marinhos se mostram como uma fonte promissora de moléculas com potencial farmacológico. A diversidade estrutural destes compostos é resultante de vias biossintéticas peculiares com características próprias, muito diferentes daquelas encontradas em organismos terrestres (FONTANA, 2006; BLUNT et al., 2011; LANE & MOORE, 2011). Na clínica, alguns fármacos já estão em fase de testes ou em uso, como é o caso da trabectedina e da citarabina. Além disso, muitas moléculas estão sendo isoladas e testadas em estudos pré-clínicos, como as cromomicinas, cuja

atividade biológica é a citotoxicidade contra linhagens tumorais (GUIMARÃES et al., 2014; JIMENEZ et al., 2019; PINTO et al., 2019; WILKE et al., 2020). Tendo isso em vista, estudos que investiguem a possível indução de ICD por PNMs podem ser muito exitosos.

Como dito anteriormente, resultados do grupo mostraram que a cromomicina A₅ (CA₅) é uma molécula indutora de ICD, gerando um efeito vacinal em camundongos C57BL/6 (FLORÊNCIO et al., 2022). Esses resultados geraram a seguinte pergunta de partida: os DAMPs liberados pelas células B16-F10 expostas à CA₅ geram ativação de células dendríticas e linfócitos contra essas células tumorais viáveis?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a ativação imunológica em animais vacinados com células B16-F10 pré-expostas à CA₅.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar ativação de esplenócitos naïve *in vitro* com células de melanoma pré-expostas à CA₅;
- Avaliar produção de citocinas no soro de animais vacinados com células de melanoma pré-expostas à CA₅;
- Realizar imunofenotipagem de linfócitos e células dendríticas do baço e de linfonodos drenantes de animais vacinados com células de melanoma pré-expostas à CA₅;
- Avaliar citotoxicidade de esplenócitos de camundongos vacinados com células de melanoma pré-expostas à CA₅ contra células da mesma linhagem viáveis em co-cultura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

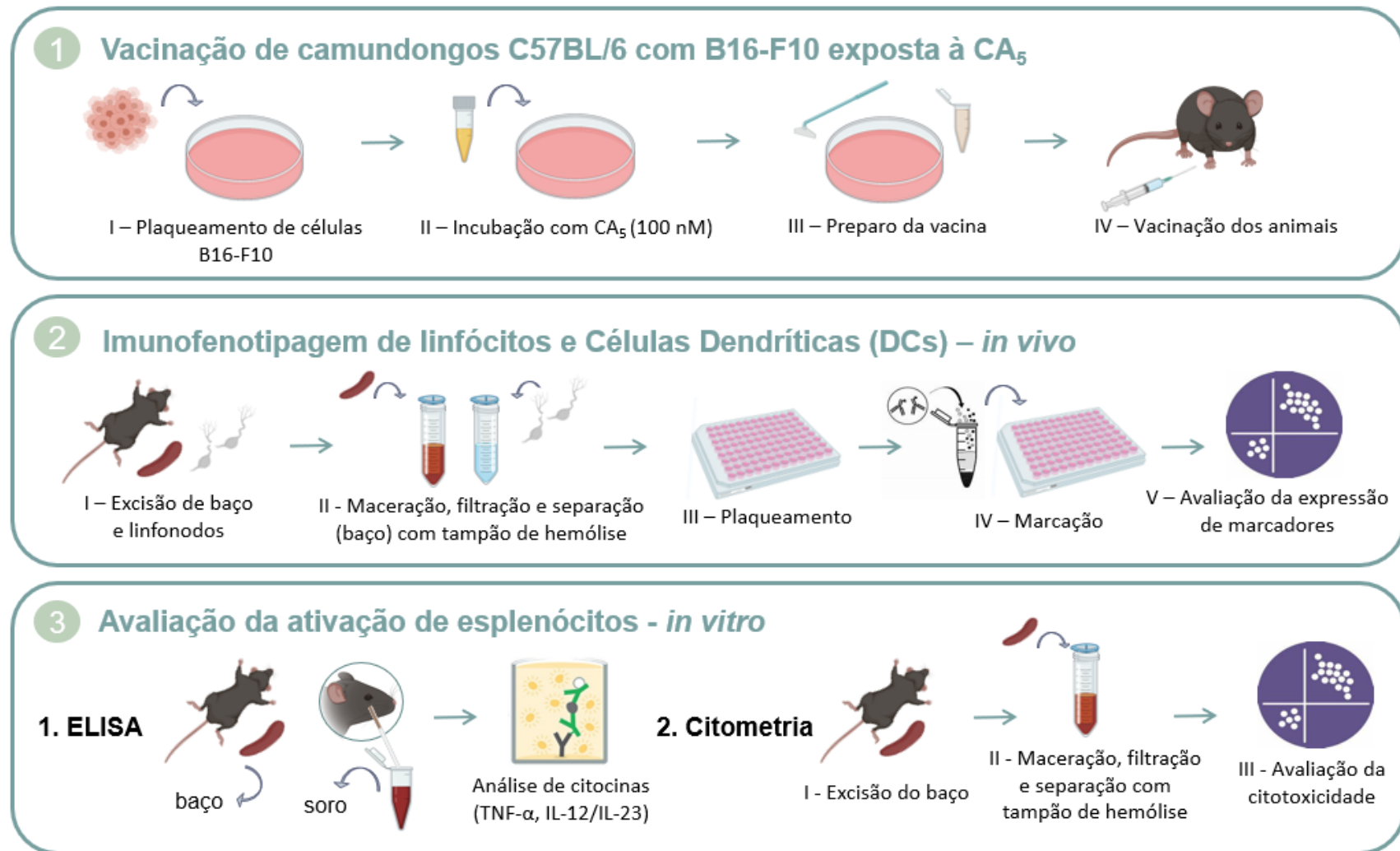
4.1 Planejamento Experimental

Isolados bacterianos foram feitos a partir da investigação do perfil microbiológico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, coletado na praia de Pedra Rachada, localizada no litoral oeste do Estado do Ceará. A obtenção das amostras ocorreu a partir da colaboração com a profa. Dra. Otília Loiola Pessoa e o Dr Francisco Chagas Pinto, ambos do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Mediciniais (LAFIPLAM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Uma das bactérias isoladas desse zoantídeo foi a *Streptomyces* sp. BRA-384. A cromomicina A₅ (CA₅), molécula utilizada nesse trabalho, foi produzida por essa cepa bacteriana e, em seguida, foi isolada por HPLC para estudos posteriores (PINTO et al., 2020).

Os experimentos foram feitos *in vivo* e *in vitro*, utilizando camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade entre seis e oito semanas. A vacinação dos animais foi a etapa inicial dos experimentos de imunofenotipagem de células dendríticas e linfócitos, bem como do ensaio de citotoxicidade. Todos os experimentos supracitados culminaram em análise de citometria de fluxo. Foram feitas dosagens de citocinas através do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) tanto do soro dos animais vacinados quanto de esplenócitos *naïve* em co-cultura com células B16-F10 expostas à CA₅

Figura 10 - Planejamento experimental do presente trabalho



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Material biológico

4.2.1 Bactérias

Os espécimes de *Palythoa caribaeorum* foram coletados após autorização emitida pelo SISBIO (48522-2) e a bactéria *Streptomyces* sp. BRA-384 isolada deste animal foi cadastrada no SISGEN (AC0781C). Os detalhes sobre a coleta e isolamento do microrganismo foram descritos e publicados por Pinto et al. (2020).

4.2.2 Células

A linhagem utilizada para os experimentos foi melanoma metastático murino B16-F10. A linhagem é oriunda do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e foi cultivada no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar) da Universidade Federal do Ceará. 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 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicilina e 100 g/mL estreptomicina), sempre manipuladas dentro de fluxo laminar vertical (ESCO, classe NBII).

O crescimento da cultura foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico (LABOMED, modelo TCM 400), sendo observadas forma, aderência, confluência e presença de contaminação. Elas foram mantidas em incubadoras de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (SAYNO, modelo MCO-19AIC). Quando a monocamada de células atingia entre 60-70% de confluência, as células eram removidas da garrafa; para o desprendimento das células tumorais utilizou-se uma solução de tripsina-EDTA 0,025% (Gibco) em PBS.

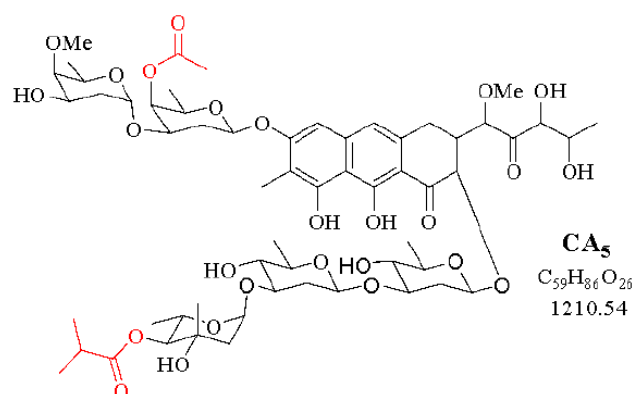
4.2.3 Animais

Para todos os experimentos, foram utilizados camundongos *Mus musculus* fêmeas, com idade entre seis e oito semanas e peso entre 18-22 g, da linhagem Black C57BL/6 e livres de ectoparasitas e endoparasitas. Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e com ração e água *ad libitum*. Eles foram obtidos nos biotérios da Universidade Federal do Ceará (UFC) e da Universidade de São Paulo (USP). O manejo dos animais seguiu princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Nº 11.724/2008), após autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFC (nº 3000310818) e Comitê de Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (nº 226/2018). Foram utilizados 15 camundongos da Universidade Federal do Ceará e 31 camundongos da Universidade de São Paulo. Os animais foram eutanasiados três ou sete dias após a vacinação, com cetamina 10% + xilasina 2%, por via intraperitoneal (i.p).

4.2.4 Cromomicina A₅

A molécula utilizada nesse trabalho, a Cromomicina A₅ (CA₅), foi produzida pela cepa bacteriana *Streptomyces* sp., que vive associada ao invertebrado marinho *Palythoa caribaeorum*. Essa bactéria foi isolada por nosso grupo de pesquisa e encontra-se criopreservada junto ao banco de microrganismos marinhos (MicroMarin) do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar). O isolamento da CA₅ foi realizado em colaboração com o Dr Francisco Chagas Pinto e a professora Dra Otília Loida Pessoa, ambos do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Além disso, um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa desenvolveu métodos de otimização da produção de Cas, garantindo o fornecimento de moléculas para a realização dos experimentos. A estrutura molecular da CA₅ está representada na Figura 11.

Figura 11 - Estrutura molecular representativa da cromomicina A₅ (CA₅) isolada de *Streptomyces* sp.



Fonte: Dr. Francisco Chagas Pinto, LAFIPLAM-UFC.

4.3 Vacinação de camundongos C57BL/6

O teste de vacinação foi considerado padrão-ouro para a comprovação de que a estimulação do sistema imunológico e o efeito vacinal estão de fato acontecendo nos animais testados. Apesar dos ensaios *in vitro* disponíveis para estudo de morte celular imunogênica, apenas ensaios de vacinação *in vivo* são aceitos como evidência irrefutável dos efeitos investigados *in vitro* (GOMEZ-CADENA et al, 2016; GALLUZZI et al, 2020). Desta forma, os procedimentos são necessários para obter respostas sistêmicas mais confiáveis com amostras selecionadas. A espécie utilizada neste trabalho é o modelo padrão para ensaios com melanoma B16-F10, tumor que inclusive foi obtido de camundongos C57BL/6. Nesse teste, as células B16-F10 mortas, ou em processo de morte, pela molécula testada são capazes de liberar os DAMPs e, dessa forma, estimulam o sistema imunológico do animal contra os antígenos dessas células tumorais. As condições experimentais para a realização desse teste foram baseadas nos estudos feitos por Florêncio et al. (2022).

Procedimento experimental:

A vacinação foi realizada em dois momentos: para imunofenotipagem de células dendríticas e linfócitos e para análise da citotoxicidade de esplenócitos contra células de melanoma. Para início dos experimentos, as células B16-F10 foram plaqueadas em placas de cultura

circulares na concentração de 3×10^4 células/mL. Cada placa continha 8 mL de meio DMEM suplementado com SFB inativado. Após 24 horas, essas células foram incubadas com: controle negativo: PBS, controle positivo: doxorubicina (600 nM) e cromomicina A₅ (100 nM). A soltura das células foi realizada a frio, usando um *cell scraper*. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS gelado, e centrifugadas a uma temperatura de 4 °C, 1500 rpm, por cinco minutos, para a remoção do excesso de moléculas e quimioterápico indutor de ICD (doxorubicina). As células foram, então, contadas para posterior vacinação.

Após a contagem, as células B16-F10 de cada grupo foram inoculadas. O inóculo consistiu em 180 mil células, ressuspensas em 200 uL de PBS, inoculadas de forma subcutânea na axila direita do respectivo animal. Camundongos C57/BL6 foram divididos em três grupos experimentais (N=5 animais/grupo), os quais receberam (s.c.) 200 uL de solução salina (controle negativo), células moribundas B16-F10 ($1,8 \times 10^5$ /200 µL) pré-expostas a 100 nM de Cromomicina A₅ (CA₅) e a 600 nM de doxorubicina (Dox) (controle positivo), respectivamente.

4.4 Obtenção e plaqueamento de esplenócitos e linfonodos drenantes

4.4.1 Esplenócitos

A obtenção de esplenócitos, seguida de plaqueamento, ocorreu três vezes. As duas primeiras vezes aconteceram para a realização da imunofenotipagem de células dendríticas e linfócitos, após três e sete dias da vacinação. O último procedimento foi para o ensaio de citotoxicidade de esplenócitos contra células B16-F10. Neste experimento, os esplenócitos foram obtidos após sete dias de vacinação e cultivados em placas de 24 poços por até cinco dias.

Procedimento experimental:

Após três e sete dias da vacinação, foi feita a excisão dos baços, que foram postos em placa de 24 poços, com 1,5 mL de meio DMEM completo, mantido sob refrigeração ao decorrer de todo o procedimento. Os esplenócitos

foram obtidos por meio de maceração e filtração do baço, em *cell strainer* de 40 µm acoplado a tubo Falcon. A este, foram adicionados 5 mL de um tampão de hemólise contendo uma proporção 9:1 de 0,16 M NH₄Cl e 0,01 M Tris-HCl; as células foram incubadas de sete a dez minutos a temperatura ambiente. Para o primeiro experimento, as células foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁶/mL por poço em nove placas de 24 poços, nomeadas a cada três placas como protocolos A, B e C. Para o segundo experimento,

4.4.2 Linfonodos

A obtenção de linfonodos, seguida de plaqueamento, ocorreu duas vezes, ambas para o experimento de imunofenotipagem de células dendríticas e linfócitos.

Procedimento experimental:

Os linfonodos cervicais e lombares foram retirados com auxílio de pinças de pontas curvadas e postos em placa de 24 poços, com 500 µL de meio DMEM completo em cada poço. Os demais procedimentos foram feitos como está descrito no item 4.4.1.

4.5 Avaliação da produção de citocinas inflamatórias

4.5.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O experimento foi realizado para detectar e quantificar as citocinas IL-12/IL-23 e TNF-α no soro de animais vacinados e esplenócitos em co-cultura com células B16-F10 expostas à CA₅ (100 nM), doxorrubicina (600 nM) e salina.

Procedimento experimental:

A detecção das citocinas IL-12/IL-23 e TNF-α foi realizada por meio do Kit DuoSet (R&D Systems, EUA). Em resumo, as placas para ELISA de

96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-12/IL-23 ou TNF- α por 16 horas em temperatura ambiente com 100 μ L de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e bloqueadas com 200 μ L de BSA 1% por uma hora. Após o bloqueio, 100 μ L das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por duas horas em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-12/IL-23 ou TNF- α em temperatura ambiente por 2 h. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos.

As placas foram lavadas três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 μ L da solução substrato para revelação foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 μ L solução de parada (H₂SO₄). Enfim, a absorbância foi medida à 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

Análise dos dados:

A partir da curva-padrão realizou-se uma regressão linear a fim de obter a equação da reta que permitiu determinar a concentração de cada citocina em função da sua absorbância. Após essas etapas, os valores das concentrações de citocinas obtidos foram interpolados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0) (com *p < 0,05 indicando diferença significativa quando comparado com o controle negativo).

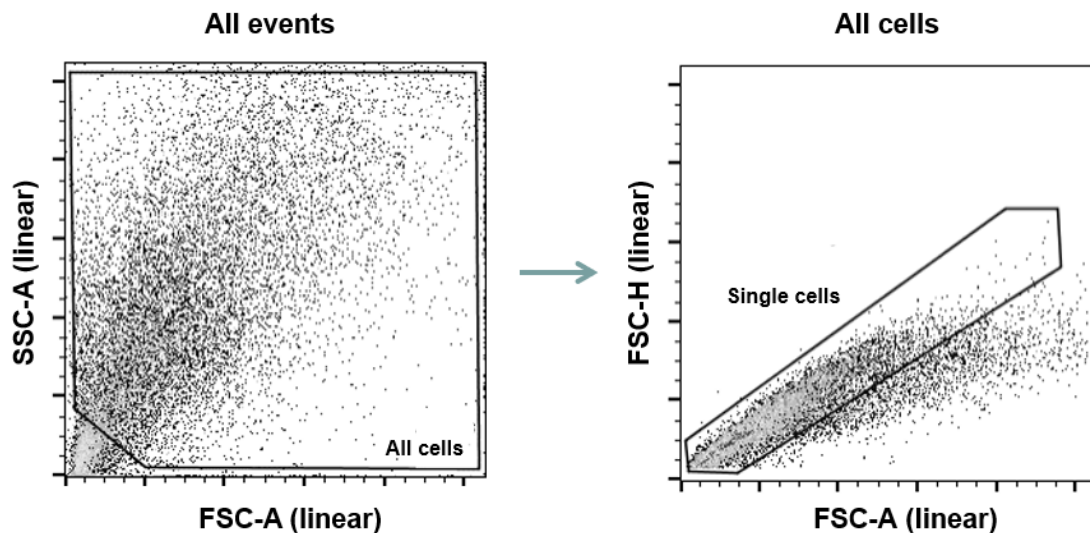
4.6 Citometria de fluxo

4.6.1 Estratégia de *gates* e análise dos dados

Dez mil eventos (sem *debris* e *doublets*) foram adquiridos no citômetro de fluxo. Inicialmente foi criado um gráfico de pontos (*dot plot*) com parâmetros de

morfologia (FSC x SSC), contendo todos os eventos adquiridos pelo citômetro (*all events*). Em *all events* foi criada uma região de *gate* contendo todas as células adquiridas (*all cells*). Em *all cells*, foi criado um *gate* para selecionar eventos simples (*single cells*). Essa estratégia inicial é comum para todos os experimentos de citometria de fluxo (Figura 12).

Figura 12 - Estratégia de *gates* para citometria de fluxo



Gráficos em formato *dot plot* contendo os *gates* de *all cells* e *single cells*, comuns a todos os testes realizados por citometria de fluxo.

Os resultados foram expressos como porcentagem (análise qualitativa), pelo número total de células (análise quantitativa) ou pela expressão da intensidade média de fluorescência (MFI, do inglês "*Mean Fluorescence Intensity*") (análise quantitativa) dos marcadores. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo BD FACSCanto e analisados no software GraphPad Prism (Versão 7.0) e no Flowjo (V10.0.7), sendo comparados em relação ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por post-test de Dunnet com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$).

4.7 Imunofenotipagem de células dendríticas e linfócitos T

Para análise por citometria de fluxo, 15 animais foram vacinados com células B16-F10 expostas à CA₅ e Dox (C+). Após três dias, os

esplenócitos foram obtidos para análise de células dendríticas (DCs). As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^6 /mL por poço em placa de 96 poços. A placa foi centrifugada a 1500 rpm, por oito minutos, a 4 °C e as células foram marcadas para identificação de células dendríticas. Após 30 minutos de marcação celular, a placa foi novamente centrifugada e fixada com solução de fixação (Biosciences) por 15 minutos em temperatura ambiente. Para a marcação de DCs, foram utilizados os seguintes anticorpos: CD11b PE-Cy7 (Cat # 552850, BD Bioscience), CD11c BV421 (Cat # 562782, BD Bioscience), CD45 BV510 (Cat # 563891, BD Bioscience), CD80 PE (Cat # 104708, BioLegend), CD86 APC (Cat # 17-086282, eBioscience), MHCII FITC (Cat # 553623, BD Bioscience).

Outros 15 animais foram vacinados com células B16-F10 expostas à CA5e Dox (C+). Após sete dias, os esplenócitos foram obtidos para análise de DCs e linfócitos. Para marcação de DCs, o protocolo foi o mesmo usado anteriormente.

Para o painel de análise de ativação, foram utilizados os seguintes anticorpos: CD3 PE (Cat # 48-0031-82, Invitrogen), CD4 FITC (Cat # 553047, BD Bioscience), CD8 APC-Cy7 (Cat # 557654, BD Bioscience), CD25 FITC (Cat # 564424, BD Bioscience), CD44 APC (Cat # 103012, BioLegend), CD69 PE (Cat # 553237, BD Bioscience).

Para os experimentos de imunofenotipagem, foi utilizado o controle FMO (do inglês "*Fluorescence Minus One Control*"), para identificar o ponto de corte entre as fluorescências negativas, possíveis interferências de fluorescências entre detectores e a marcação positiva em painéis com múltiplos fluorocromos. Em resumo, cada poço da placa tem todos os anticorpos menos um, como exemplificado na Figura 13.

Figura 13 – Estratégia de *gates* utilizando controle FMO

Para análise da população de células dendríticas foi selecionada a região do marcador leucocitário comum CD45 e posteriormente um gráfico dot plot foi gerado a partir dos eixos CD11b e CD11c (Figura 14).

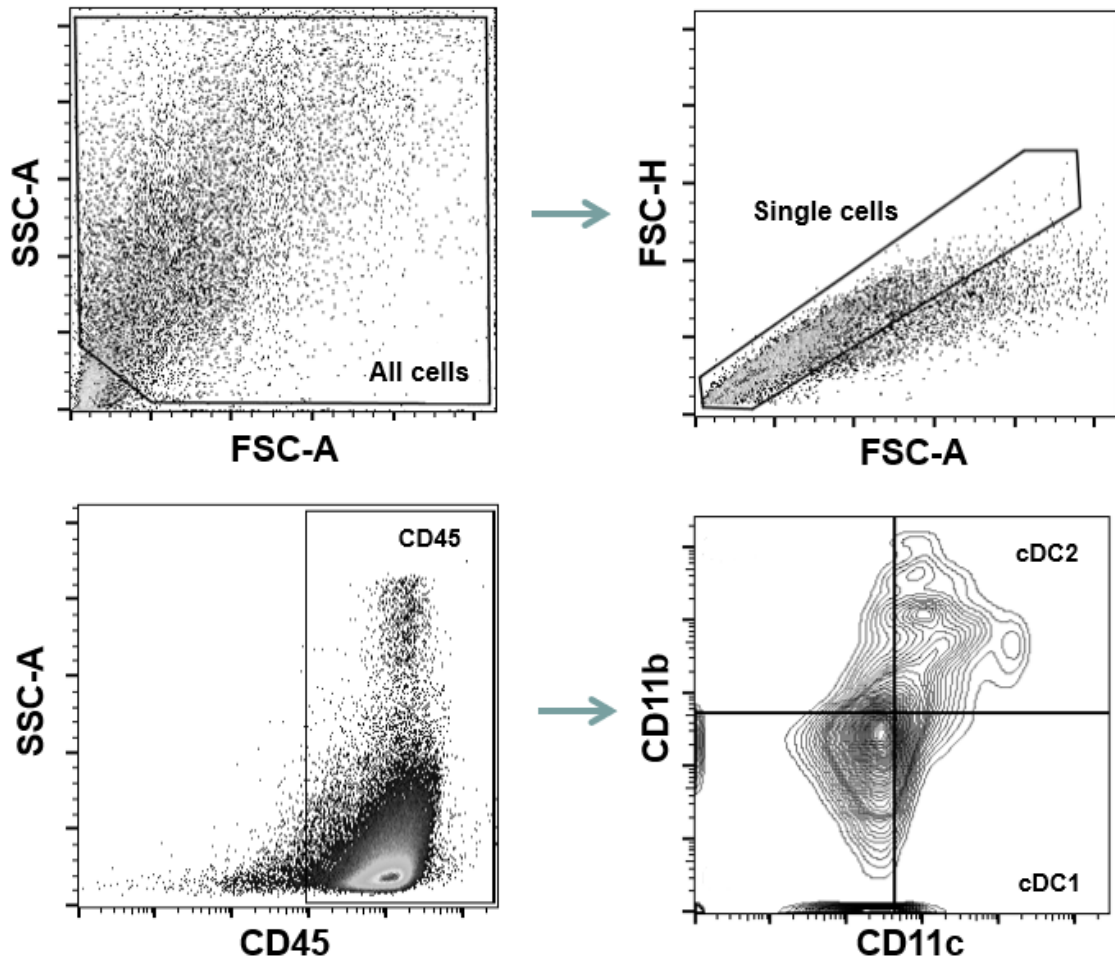
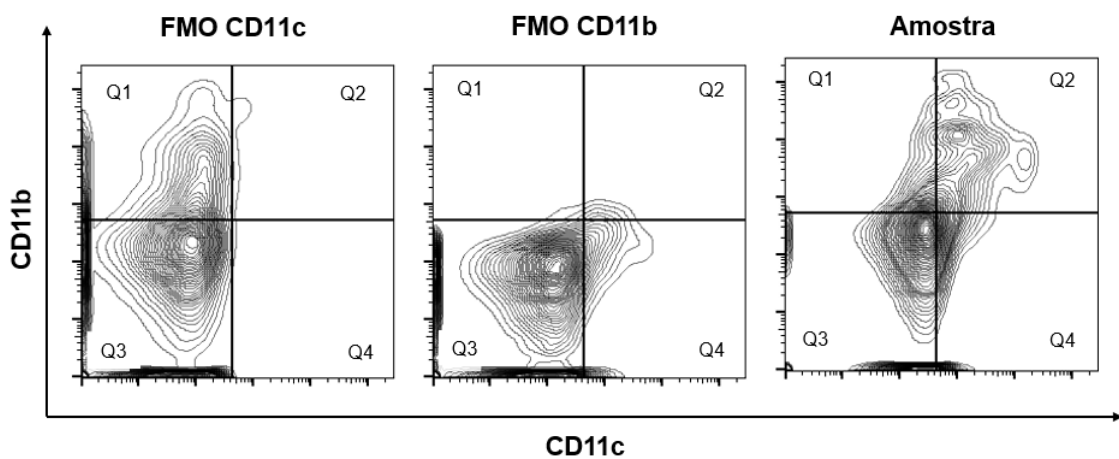
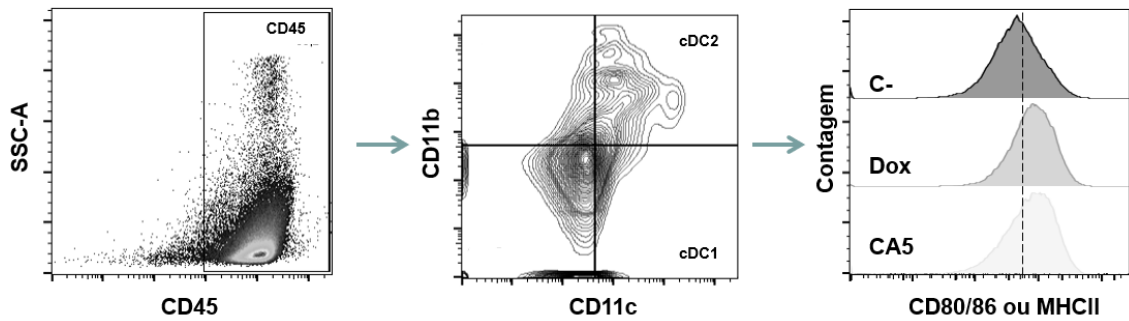


Figura 14 - Estratégia de *gates* para análise da população de células dendríticas



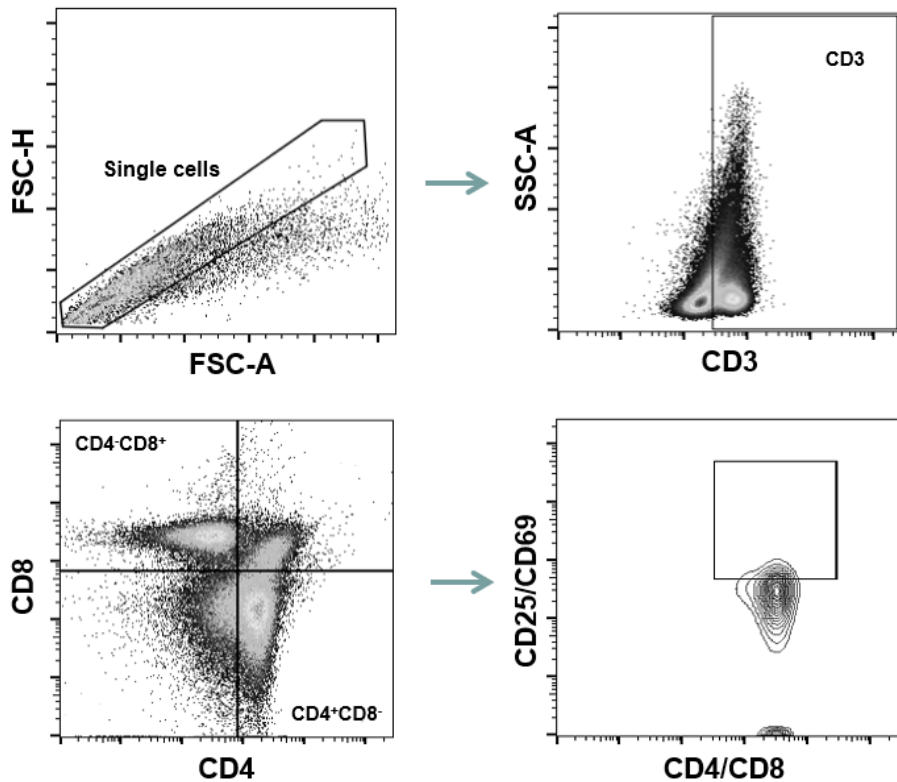
Para análise da ativação de células dendríticas, foram gerados histogramas para contagem de células expressando os marcadores de ativação CD80/86 e MHC-II. A partir disso, foram obtidos os valores de MFI, na região CD11b+CD11c+ para cDC2 e na região CD11b-CD11c+ para cDC1 (Figura 15).

Figura 15 - Estratégia de *gates* para análise da ativação de células dendríticas



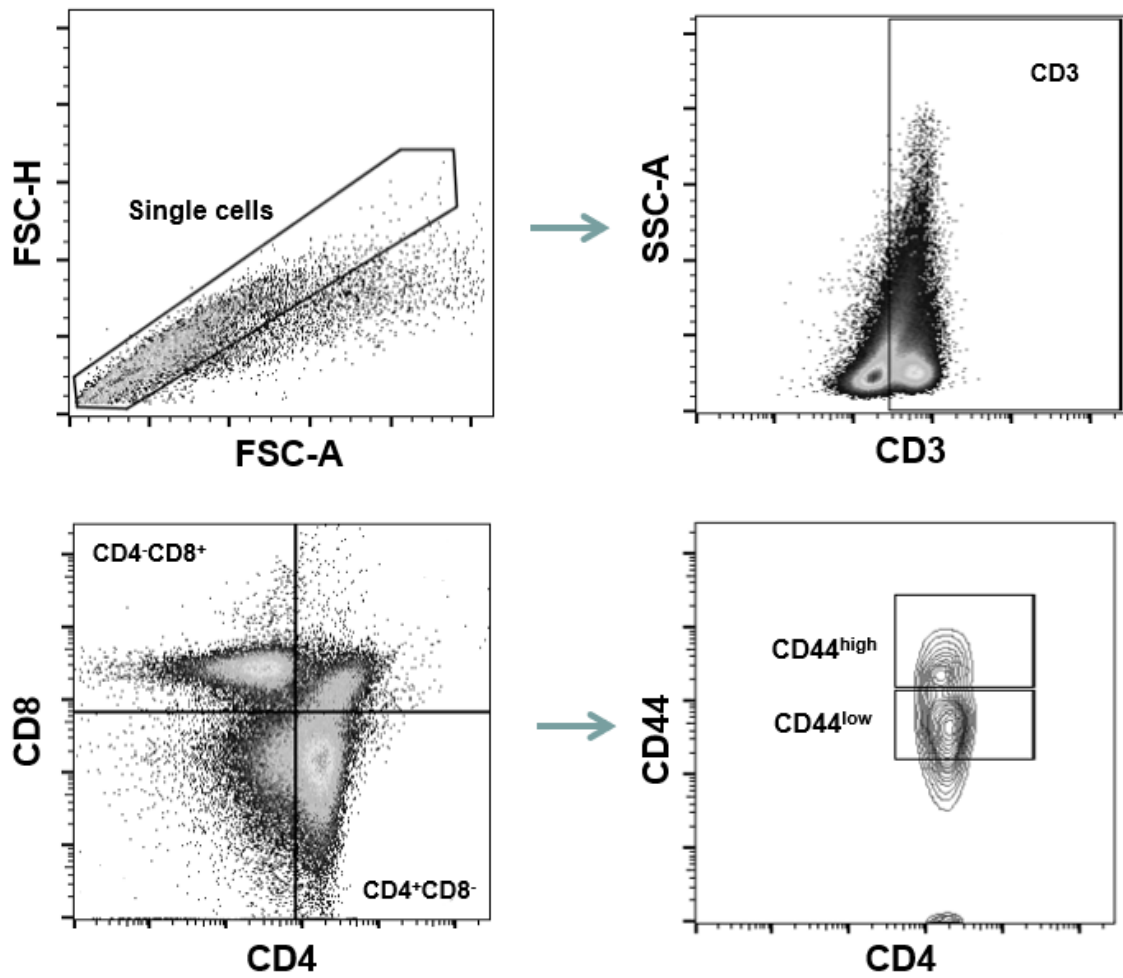
Para análise da ativação de linfócitos, foram selecionadas as células CD3⁺ a partir de *Single cells*. Dentro da população CD3⁺ foram selecionadas as células CD4⁻CD8⁺ e CD4⁺CD8⁻. Para cada uma dessas populações foi avaliada a marcação de CD69, CD25 (Figura 16) e CD44 (Figura 17).

Figura 16 - Estratégia de *gates* para análise da ativação de linfócitos T



Avaliação dos marcadores CD25 e CD69.

Figura 17 - Estratégia de *gates* para análise da ativação de linfócitos T



Avaliação do marcador CD44.

Tabela 1 – Painel utilizado na citometria para imunofenotipagem de células dendríticas e linfócitos

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	
CD45	BV510	30-F11	
CD11b	PE-Cy7	M1/70	DCs
CD11c	BV421	HL3	
CD80	PE	16-10A1	
CD86	APC	GL1	Ativação de DCs
MHC-II	FITC	2G9	
CD3	PE	145-2C11	
CD4	FITC	RM4-5	Linfócitos
CD8	APC-Cy7	53-6.7	
CD44	APC	IM7	
CD25	FITC	PC61	Ativação de linfócitos
CD69	PE	H1.2F3	

Fonte: elaborada pela autora. Legenda: DCs – células dendríticas.

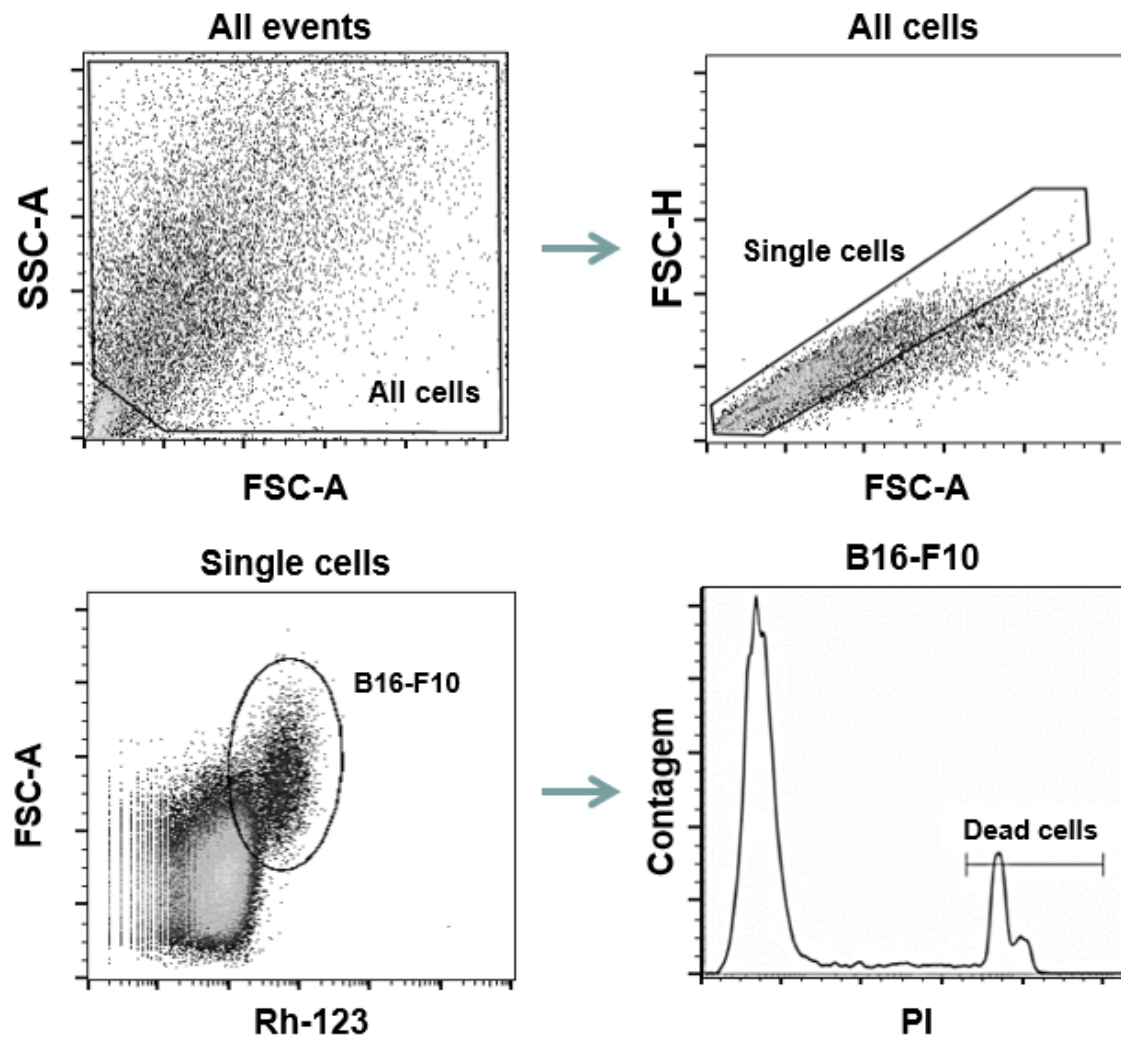
4.8 Avaliação da citotoxicidade de esplenócitos contra células tumorais

Para o protocolo A, os esplenócitos foram incubados com células B16-F10 viáveis após 24 h do plaqueamento deles. Para isso, células B16-F10 na concentração de $4 \times 10^4/\text{mL}$ (proporção 1:25) foram marcadas com Rh123 e incubadas durante 15 minutos em incubadora de células. Após isso, as células foram diluídas para obtenção das proporções 1:50 e 1:100 e foram adicionadas aos esplenócitos nas placas de 24 poços. Após cinco horas de incubação, as células foram marcadas com PI a 1 mg/mL e foram adquiridas em citômetro de fluxo.

Para os protocolos B e C, os esplenócitos foram reestimulados após 24 horas do seu plaqueamento com células B16-F10 pré-expostas à Dox e CA5 e foram incubados por 72 horas (protocolo B) e 120 horas (protocolo C). Após a incubação, os esplenócitos foram incubados com células B16-F10 viáveis por cinco horas e o mesmo procedimento do protocolo A foi realizado.

Para o ensaio de citotoxicidade de esplenócitos reestimulados com células B16-F10 pré-expostas à CA5 foi feita a seleção das células B16-10 viáveis (incubadas em co-cultura com os esplenócitos), marcadas com Rh-123. Após a seleção, foi feita a contagem de células B16-F10 mortas pelos esplenócitos ativados (Figura 18).

Figura 18 - Análise da citotoxicidade de esplenócitos contra células B16-F10

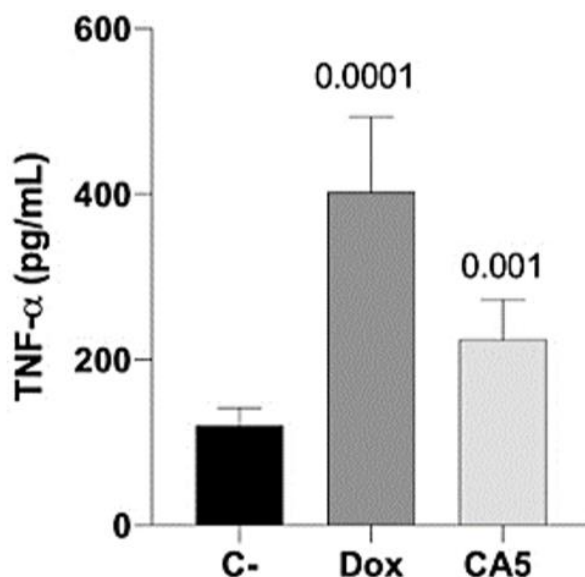


5 RESULTADOS

5.1 Ativação de células dendríticas (DCs) por células B16-F10 expostas à CA₅

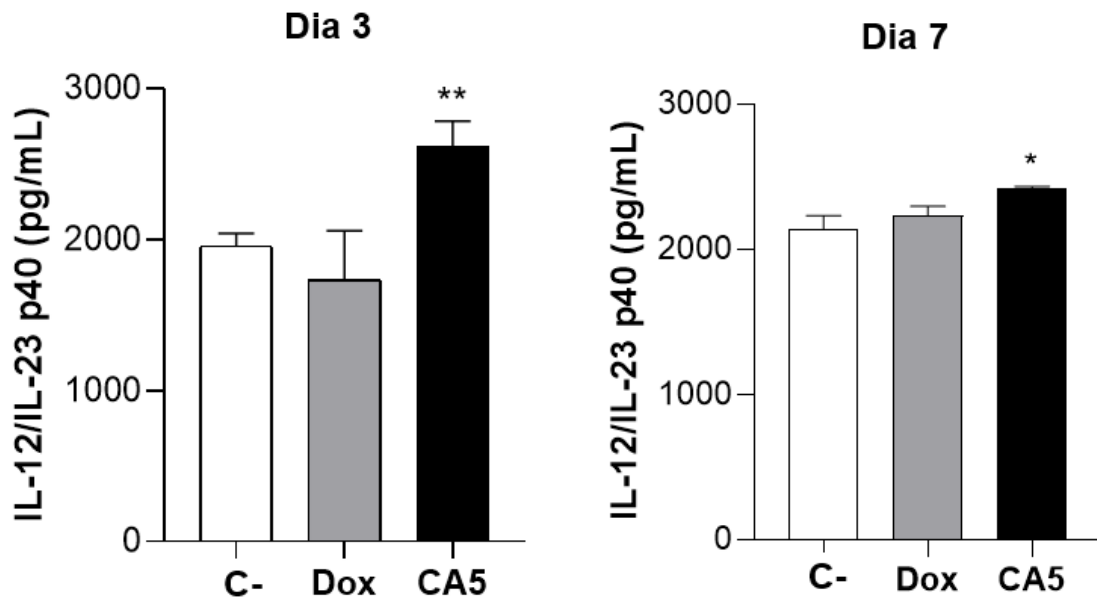
Com base nos experimentos anteriores do grupo, o primeiro passo foi investigar a ativação imunológica por células B16-F10 expostas à CA₅. Os esplenócitos de camundongos *naïve* liberaram TNF- α quando incubados com células B16-F10 expostas à Dox ou CA₅ (Figura 19). Além disso, a análise do soro de camundongos vacinados mostrou também liberação de Interleucina-12/23 (IL-12/IL-23) (Figura 20).

Figura 19 - Esplenócitos *naïve* produzem TNF- α quando tratados com B16-F10 exposta à CA₅



Células de melanoma B16-F10 foram tratadas com DMSO (C-), como controle negativo, doxorrubicina (Dox), como controle positivo, e Cromomicina A₅ (CA₅). Gráfico de colunas mostrando a produção de TNF- α determinada por ELISA. Os valores de p de C- comparados aos grupos tratados estão acima de cada grupo tratado (N=1). *p < 0,05.

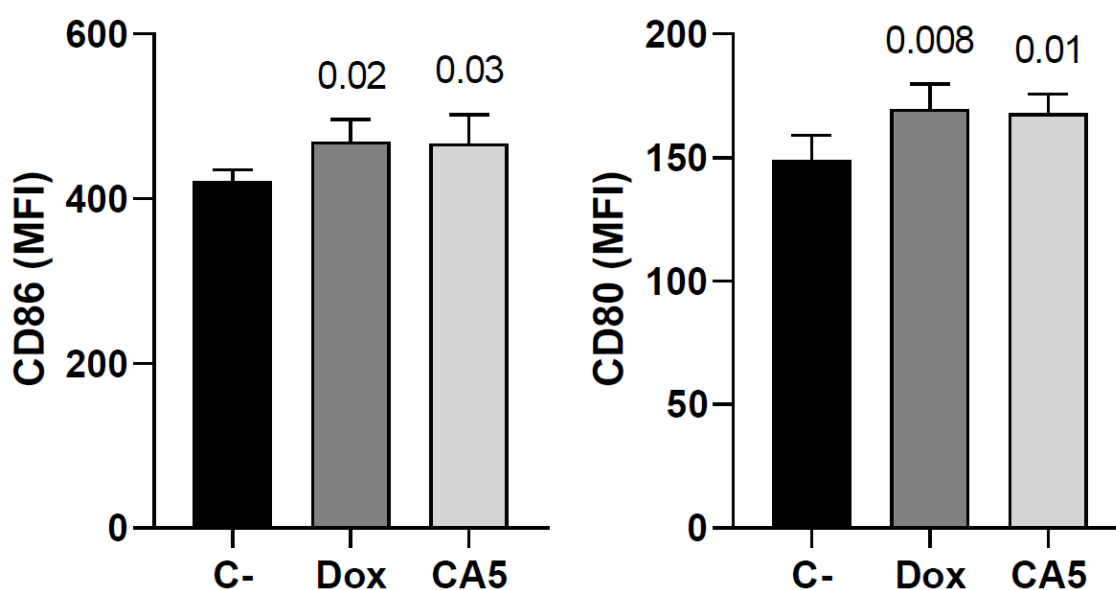
Figura 20 - Vacinação aumenta produção de IL-12/IL-23



Células de melanoma B16-F10 foram tratadas com DMSO (C-), como controle negativo, doxorrubicina (Dox), como controle positivo, e Cromomicina A₅ (CA₅) por 24 horas e as células foram coletadas após três e sete dias de vacinação. Gráfico de colunas mostrando a produção de IL-12/IL-23 determinada por ELISA. Os valores de p de C-comparados aos grupos tratados estão acima de cada grupo tratado (N=5, ao todo 15 animais). *p < 0,05 **p < 0,05.

A vacinação com células B16-F10 pré-expostas à CA₅ ativou a população de cDCs do tipo-1 (CD11b⁻CD11c⁺), aumentando a expressão de CD80 e CD86 três dias após a vacinação, o que não foi observado no grupo Dox (Figura 21).

Figura 21 - Vacinação com células de melanoma expostas à CA₅ aumenta expressão de CD80 e CD86 na população cDC1 (*in vivo*)

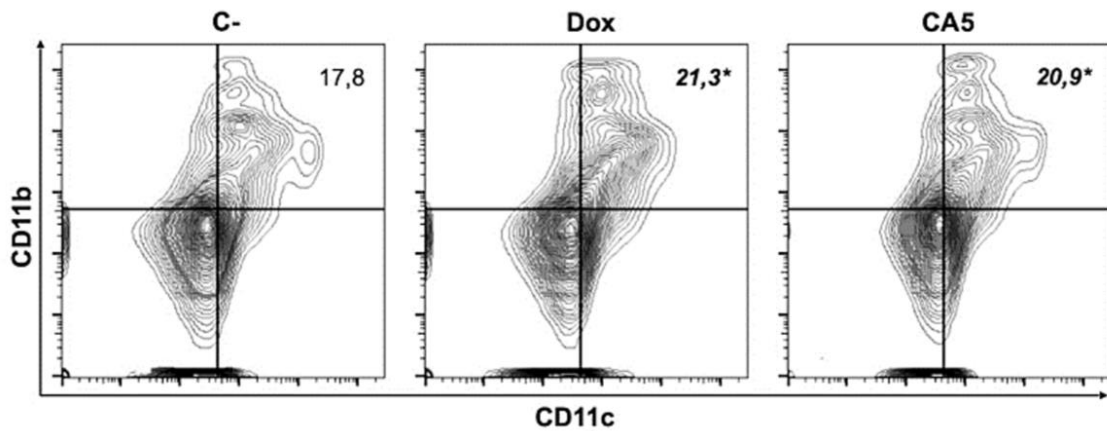


Células de melanoma B16-F10 foram tratadas com DMSO (C-), como controle negativo, doxorrubicina (Dox), como controle positivo, e Cromomicina A₅ (CA₅) por 24 horas, e as células foram coletadas após três dias de vacinação. Gráficos de coluna mostrando análise estatística do percentual de células CD11b⁻CD11c⁺. Os valores de p de C-comparados aos grupos tratados estão acima de cada grupo tratado nas figuras.

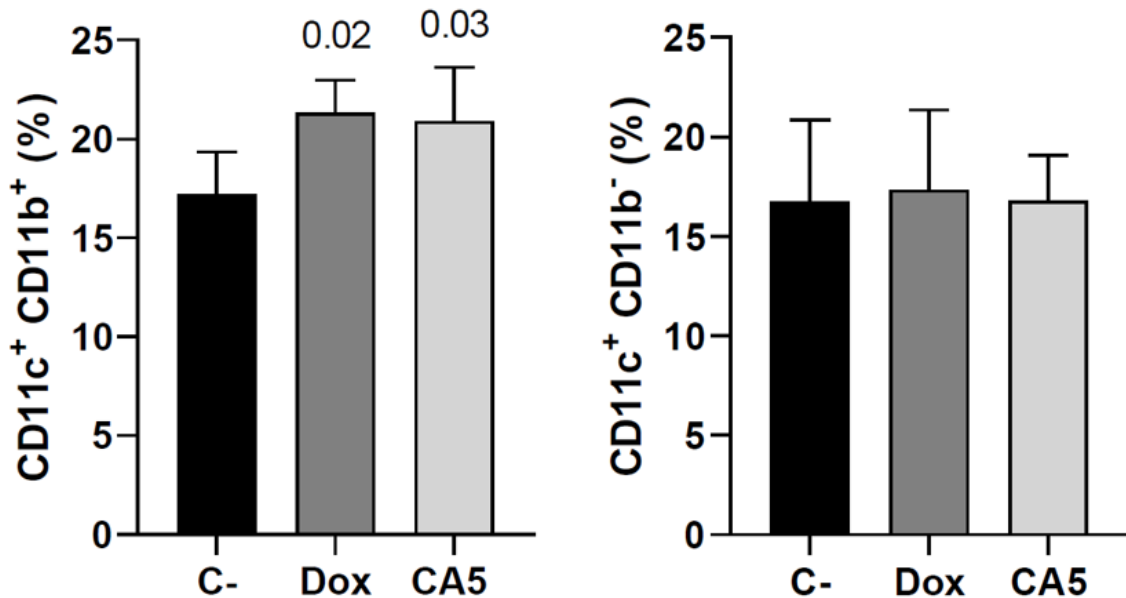
A vacinação de camundongos com células B16-F10 pré-expostas à Dox e à CA₅ aumentou a frequência da população de células dendríticas convencionais do tipo-2 (cDC2, do inglês “*type-2 Conventional Dendritic Cells*”) (CD11b⁺CD11c⁺) (Figura 22 A, B).

Figura 22 - Vacinação com células de melanoma expostas à CA₅ aumenta população cDC2 (*in vivo*)

A



B

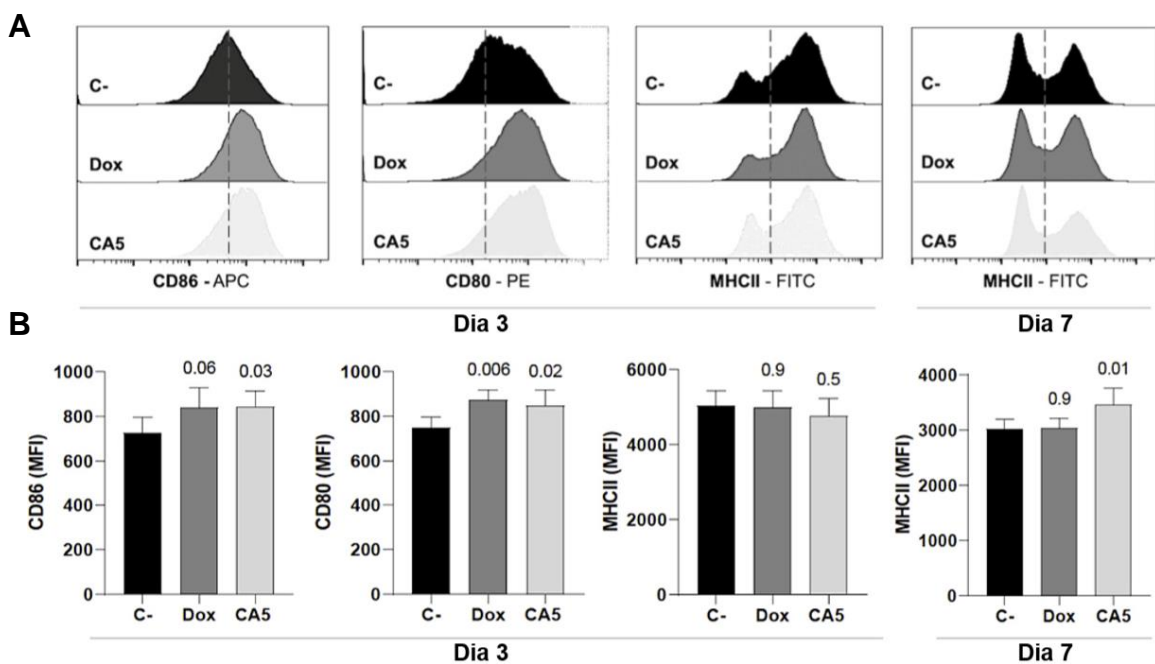


Células de melanoma B16-F10 foram tratadas com DMSO (C-), como controle negativo, doxorrubicina (Dox), como controle positivo, e Cromomicina A₅ (CA₅) por 24 horas, e as células foram coletadas após três dias de vacinação. A, B, Gráficos de plotagem de contorno representativos de células CD11b⁺CD11c⁺ e CD11b⁻CD11c⁺ por citometria de fluxo e gráficos de coluna mostrando análise estatística do percentual de células CD11b⁺CD11c⁺ e CD11b⁻CD11c⁺. Os valores de p de C- comparados aos grupos tratados estão acima de cada grupo tratado (N=5, 15 animais no total). *p < 0,05.

A vacinação também aumentou a expressão dos marcadores de ativação CD80 e CD86 na superfície dessas células, tanto no grupo CA₅ quanto no grupo Dox

(Figura 23 A, B). As cDC2 (CD11b⁺/CD11c⁺) do grupo CA5 tiveram também a expressão de MCH-II aumentada, porém não teve alteração da expressão desse marcador no grupo Dox em comparação ao grupo C- (Figura 23 A, B). Os dados mostrados nas figuras 12-16 sugerem que as células de melanoma expostas à CA₅ modulam a imunidade antitumoral inata, ativando células apresentadoras de antígenos.

Figura 23 – Vacinação com células de melanoma expostas à CA₅ ativa cDC2 (*in vivo*)

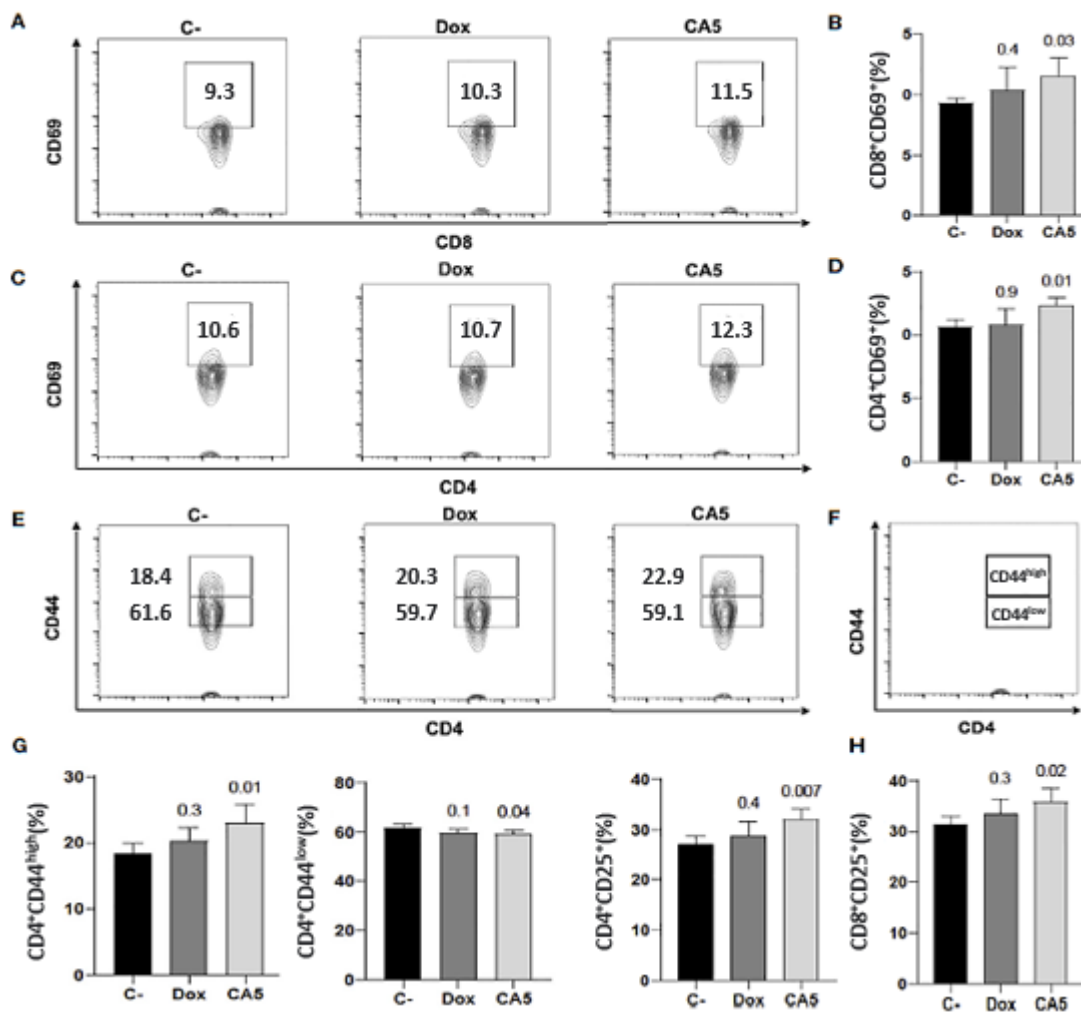


Células de melanoma B16-F10 foram tratadas com DMSO (C-), como controle negativo, doxorubicina (Dox), como controle positivo, e Cromomicina A₅ (CA₅) por 24 horas e as células foram coletadas após três e sete dias de vacinação. A, B, Histogramas representativos de citometria de fluxo dos marcadores de superfície CD80, CD86 e MHC II e gráficos em coluna de sua intensidade média de fluorescência (MFI) adquirida respectivamente na região CD11b⁺CD11c⁺. Os valores de p de C- comparados aos grupos tratados estão acima de cada grupo tratado. N = 5 animais por grupo. *p < 0,05

5.2 Ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ por vacinação com células B16-F10 expostas à CA₅

Os marcadores de ativação avaliados tiveram sua expressão aumentada nas células T CD4⁺ e CD8⁺ esplênicas de camundongos vacinados com células B16-F10 pré-expostas à CA₅ (Figura 24). No grupo CA₅ houve o aumento da expressão de CD69 (Figuras 24 A-D) e CD25 (Figura 24 H). O grupo Dox não apresentou diferença em relação ao grupo salina. Nos grupos CA₅ e Dox houve o aumento da expressão de CD44^{high} seguido por uma diminuição de CD44^{low} nas células T CD4⁺ (Figuras 24 E-G). Não houve diferença na expressão de CD44 nas células T CD8⁺ em Dox ou CA₅ (dados não mostrados). Além disso, a vacinação aumentou o percentual de células T CD8⁺CD69⁺CD25⁺, T CD4⁺CD69⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD69⁺CD44^{high} (Figura 25).

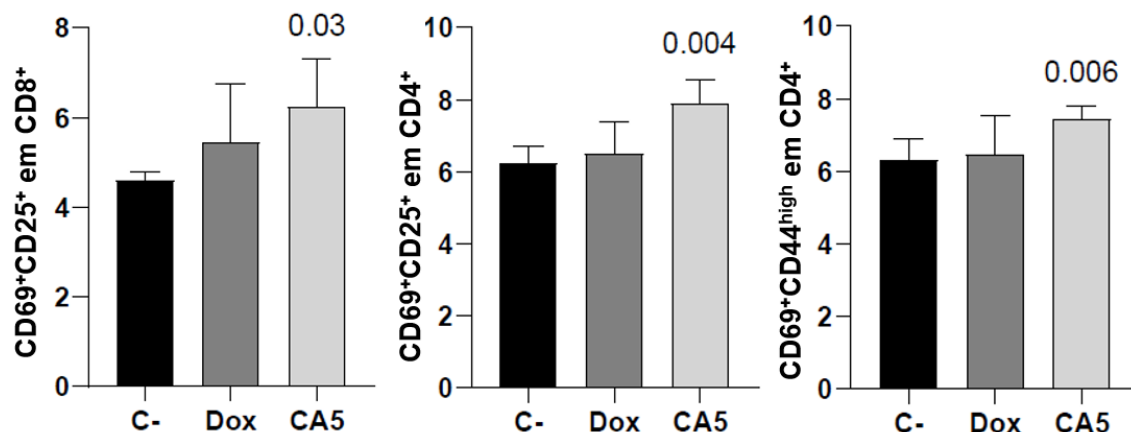
Figura 24 - Células B16-F10 expostas à cromomicina A₅ (CA₅) induzem a ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺



Células pré-incubadas por 24 horas com CA₅ (CA₅) 0,1 μM e doxorubicina (Dox) 0,6 μM ou solução salina estéril (C-) foram injetadas por via subcutânea na axila direita de camundongos e seus esplenócitos foram avaliados sete dias após a vacinação. A, Gráficos de contorno representativos do marcador de superfície CD69 em linfócitos T CD8. B, Gráficos de colunas mostrando a porcentagem de linfócitos T CD8⁺CD69⁺. C, Gráficos de contorno representativos do marcador de superfície CD69 em linfócitos T CD4. D, Gráficos de colunas mostrando a porcentagem de linfócitos T CD4⁺CD69⁺. E, Gráficos de contorno representativos do marcador de superfície CD44 em linfócitos T CD4 mostrando populações CD44^{high} e CD44^{low} e F, ilustração identificando populações CD44^{high} e CD44^{low}. G, Gráficos de coluna mostrando a porcentagem de linfócitos T CD4⁺CD44^{high}, linfócitos T CD4⁺CD44^{low} e T CD4⁺CD25⁺ e (H) gráficos de coluna mostrando a porcentagem de linfócitos T CD8⁺CD25⁺. As diferenças entre os grupos

são expressas como valores de p indicados acima dos grupos comparados. . N = 5 animais por grupo.*p < 0,05

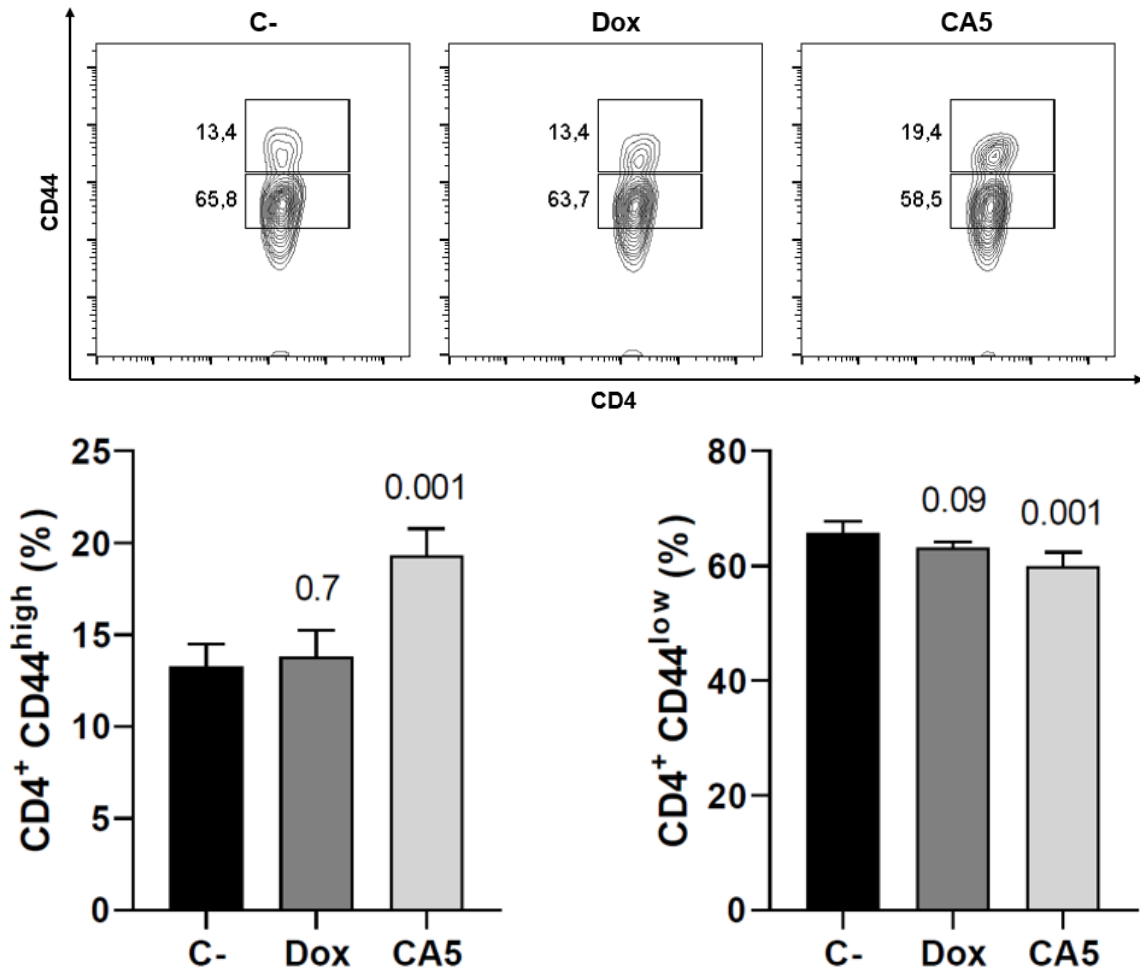
Figura 25 - Vacinação com células de melanoma expostas à CA₅ aumenta expressão de células T duplo-marcadas



Células de melanoma B16-F10 foram tratadas com DMSO (C-), como controle negativo, doxorrubicina (Dox), como controle positivo, e Cromomicina A₅ (CA₅) por 24 horas para vacinação, e as células foram coletadas após sete dias de vacinação. Gráficos de coluna mostrando análise estatística do percentual de linfócitos T CD8⁺CD69⁺CD25⁺, T CD4⁺CD69⁺CD25⁺ e T CD4⁺CD69⁺CD44^{high}. Os valores de p de C- comparados aos grupos tratados estão acima de cada grupo tratado . N = 5 animais por grupo.*p < 0,05

Nos linfonodos drenantes, as células T CD4⁺ também aumentaram o CD44^{high} seguido por uma diminuição das subpopulações CD44^{low} no grupo CA5, o que não aconteceu com o grupo Dox, como mostrado na Figura 26. O CD8⁺ não alterou a expressão de CD44 em Dox ou CA5 (dados não mostrados).

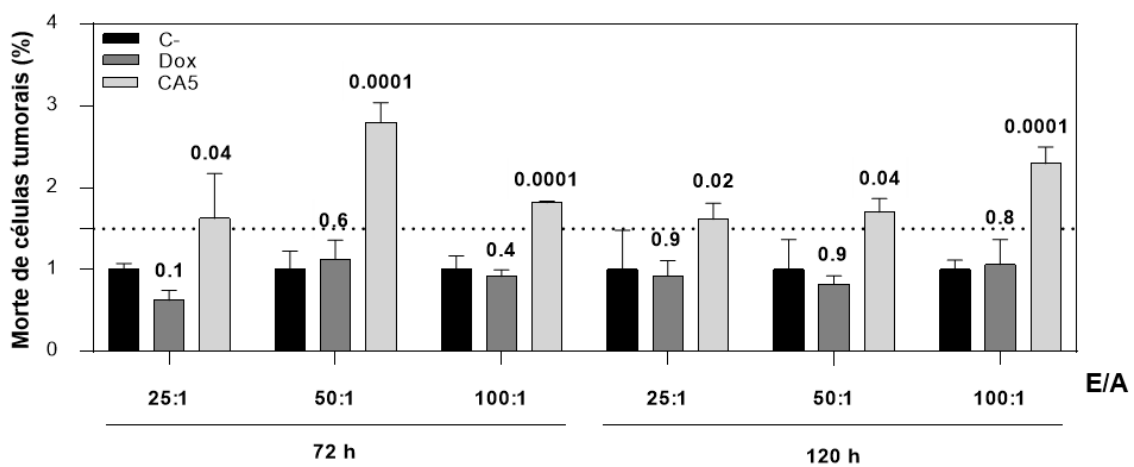
Figura 26 - Melanoma exposto à CA₅ ativa Linfócitos T em linfonodos drenantes



Células B16-F10 expostas à Cromomicina A₅ induzem ativação de linfócitos T CD4⁺ em linfonodos drenantes. Células de melanoma B16-F10 foram tratadas com DMSO (C-), como controle negativo, doxorubicina (Dox), como controle positivo, e Cromomicina A₅ (CA₅) por 24 horas para vacinação e as células foram coletadas após sete dias de vacinação. (A) Gráficos contour plots representativos do marcador de superfície CD44 em linfócitos T CD4 mostrando populações CD44^{high} e CD44^{low}. (B) Gráficos de coluna mostrando análise estatística do percentual de linfócitos T CD4⁺CD44^{high}, T CD4⁺CD44^{low}. Os valores de p de C- comparados aos grupos tratados estão acima de cada grupo tratado nas figuras. . N = 5 animais por grupo.*p < 0,05

De acordo com o perfil de ativação linfocitária e de células dendríticas, os esplenócitos do grupo CA5 exerceram atividade citotóxica contra células B16-F10 nas três proporções efetor-alvo testadas, bem como nos dois diferentes tempos de reestimulação de esplenócitos com células B16-F10 pré-expostas à CA5 (Figura 27), confirmando que ocorre uma resposta imune antitumoral em camundongos vacinados com B16-F10 expostas à CA5.

Figura 27 - Esplenócitos reestimulados têm atividade citotóxica contra células tumorais



Células de melanoma B16-F10 foram tratadas com DMSO (C-), como controle negativo, doxorrubicina (Dox), como controle positivo, e Cromomicina A₅ (CA₅) por 24 horas para vacinação, e as células foram coletadas após sete dias de vacinação. Gráficos de coluna mostrando a morte celular de células B16-F10 após 5 horas de incubação com proporções de esplenócitos de efetor/alvo (E/T). Os esplenócitos foram previamente reestimulados com solução salina estéril (C-), CA₅ e Dox por 72 horas e 120 horas antes do ensaio citotóxico. As diferenças entre os grupos são expressas como valores de p indicados acima dos grupos comparados. N = 5 animais por grupo. *p < 0,05

6 DISCUSSÃO

Apesar da baixa incidência, o melanoma metastático é o mais agressivo câncer de pele, podendo invadir rapidamente novos tecidos e se espalhar para outras partes do corpo (NCI, 2020). A incidência global é de 15-25 pessoas a cada 100 mil habitantes, sendo mais frequente em populações de pele clara. Embora a terapia antitumoral tenha progredido bastante, a metástase ainda é um grande obstáculo para a redução da alta taxa de mortalidade (NAKAMURA et al., 2002; SCHADENDORF et al., 2015).

O melanoma metastático avançado ainda carece de uma opção terapêutica que tenha a capacidade de converter tumores imunologicamente frios (ou tolerogênicos) em quentes (ou imunogênicos), uma vez que esse mecanismo pode melhorar a resposta clínica dos pacientes refratários, ou seja, que já não respondem ao arsenal de terapias disponível atualmente, incluindo a imunoterapia (BONAVENTURA et al., 2019). Durante muito tempo, a cirurgia e a quimioterapia foram os tratamentos mais utilizados para o melanoma, mas surgiu a necessidade de fármacos que tivessem influência sobre as características imunogênicas desses tipos de tumores (MAVERAKIS et al., 2015). Após longos anos, houve a inclusão de imunoterapias e terapias alvo-direcionadas para o tratamento dos pacientes (MAVERAKIS et al., 2015; QUEIROLO et al., 2019), mas os índices de mortalidade permanecem elevados (INCA, 2020).

Diante disso, a identificação de indutores de ICD poderia preencher essa necessidade combinando dois efeitos úteis ao mesmo tempo: citotoxicidade direta contra células tumorais e liberação de sinais de ativação imunológica (GALLUZZI et al., 2020; PROCUREUR et al., 2021). Alguns agentes quimioterápicos são conhecidos por induzirem ICD, mostrando desempenho clínico notável (KEPP et al., 2014). Dados anteriores do nosso grupo (FLORÊNCIO et al., 2022) mostraram que a CA₅ apresenta evidências genuínas de indução de ICD e, portanto, é uma candidata altamente promissora para estudos posteriores com o melanoma metastático. Esses dados evidenciaram que a exposição de células de melanoma B16-F10 à cromomicina A₅ (CA₅) resulta na liberação de DAMPs, bem como gera um efeito vacinal em camundongos.

No presente trabalho foram feitas investigações adicionais, que confirmaram uma ativação adequada do sistema imunológico pelas células B16-F10 expostas à CA₅. Primeiramente, foi observada a liberação de TNF- α por esplenócitos cultivados na presença de B16-F10 pré-expostas à CA₅ e Dox, bem como de IL-12/IL-23 no soro de animais vacinados. Estes resultados sugeriram que células dendríticas (DCs) estavam sendo ativadas, pois as células moribundas submetidas à ICD genuína devem recrutar e ativar efetivamente APCs e linfócitos sem quaisquer adjuvantes externos (KEPP et al., 2014; HUMEAU et al., 2019 VANMEERBEEK et al., 2020). A detecção de citocinas pró-inflamatórias secretadas em sobrenadantes por APCs (que adquirem um fenótipo imunoestimulador) tem sido uma abordagem alternativa ou complementar usada para monitorar a maturação funcional de células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês "*Antigen-presenting cells*"). Essas citocinas incluem, rotineiramente, IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23, avaliadas por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e citometria de fluxo (GHIRINGHELLI et al., 2009; FUCIKOVA et al., 2014; GALLUZZI et al., 2020).

O ensaio de vacinação é o método padrão-ouro para confirmação de ICD, devido à sua natureza espaço-temporal complexa (KEPP et al., 2014; HUMEAU et al., 2019 VANMEERBEEK et al., 2020). Tendo isso em vista, foram realizados múltiplos ensaios de vacinação com a administração de B16-F10 pré-expostas à CA₅ ou Dox em camundongos, seguidos pela avaliação de esplenócitos após diferentes momentos. CA₅ induziu o aumento e ativação de cDC2 (CD11b⁺CD11c⁺). As cDC1 (CD11b⁻CD11c⁺) também foram ativados no grupo CA₅ sem alteração quantitativa nesta população. As cDCs apresentam antígenos tumorais e secretam citocinas que regulam a sobrevivência e ativação das células T. A apresentação do antígenos depende de dois sinais principais: reconhecimento do complexo peptídeo-MHC pelo TCR (neoantígenos tumorais carregados no MHC II) e co-estimulação (moléculas coestimuladoras, como CD80 ou CD86) (JENSEN, 2007; GALLUZZI et al., 2017).

O grupo CA₅ teve expressão elevada de MHC-II em cDC2 e CD80/86 em cDC2 e cDC1. O grupo Dox aumentou a subpopulação cDC2 e aumentou CD80 e CD86, porém não alterou a expressão do MHC-II. As cDC1 são importantes para a imunidade antitumoral e estão associados ao aumento da

sobrevida global de pacientes oncológicos (BÖTTCHER et al., 2018). Elas fazem o transporte de antígenos tumorais para os linfonodos drenantes e são o principal subtipo responsável pela ligação cruzada de células T CD8⁺). Além disso, as cDC1 intratumorais atraem células T, reestimulam e expandem células T CD8⁺ específicas do tumor e apoiam a função efetora das células T secretando IL-12 (BÖTTCHER et al., 2018). O estado de maturação das APCs, classicamente, é mensurado por citometria de fluxo, marcando células com anticorpos específicos para moléculas de MHC-II e moléculas coestimulatórias, incluindo CD80, CD83 e CD86; todas elas reguladas positivamente durante a maturação de APCs (FUCIKOVA et al., 2011; ADKINS et al., 2017; GALLUZZI et al., 2020).

O aumento da ativação de linfócitos T também foi observado sete dias após a vacinação em células T CD4⁺ e CD8⁺ do grupo CA5, enquanto Dox não conseguiu aumentar os marcadores de ativação recente CD69, CD25 ou CD44 neste momento. O CD69 é um marcador de ativação recente de linfócitos, que direciona o tráfego de células T efectoras CD4⁺ para a medula óssea, onde vão interagir com células T auxiliares de memória (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017). O marcador CD25 está relacionado à estimulação antigênica recente e desenvolve um papel importante na regulação da proliferação de células T (LADÁNYI et al., 2004). O CD44 é encontrado em células *naïve* e ativadas. Em células *naïve*, há maior expressão de CD44^{low}, enquanto em células ativadas há uma maior expressão de CD44^{high}. A avaliação da expressão de CD44 é uma forma há muito tempo utilizada para identificação de células T de memória em camundongos (ZENG et al., 2008). Apesar da ativação das células T do grupo CA5, sua função efetora ainda precisa ser confirmada.

Após os ensaios de imunofenotipagem e avaliação da produção de algumas citocinas inflamatórias, foi avaliada a resposta imune antitumoral de camundongos vacinados com células expostas à CA5. De acordo com o perfil de ativação de linfócitos observado anteriormente, foi visto que os esplenócitos de CA5 mataram células B16-F10 *in vitro*, enquanto o grupo Dox não. Estes resultados mostram que os esplenócitos retirados de camundongos vacinados geram uma resposta imune antitumoral contra o melanoma, mediada por células T, semelhante ao que foi observado na literatura com outras moléculas (LIU et

al., 2019; TRIPODI et al., 2023).

O baço e os linfonodos são os chamados órgãos linfoides secundários (ou periféricos), nos quais ocorrem a apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T e B, que migram para os locais de infecção e desempenham ali seus papéis. Frequentemente, nos estudos de ativação imunológica em camundongos, esses órgãos são excisados e estudados quanto a sua população de células imunológicas e perfil de ativação. No ensaio de vacinação para investigação de ICD, isso não é diferente. Quando as células passam por algum tipo de RCD, é gerada uma resposta imune adaptativa específica para os antígenos associados a essas células, desde que essas células liberem DAMPs e citocinas que apoiem o recrutamento de APCs. Estas vão fagocitar o material antigênico e vão migrar para os órgãos linfoides secundários, onde podem iniciar uma resposta imune dependente de linfócitos T citotóxicos (CTL) (GOLDEN et al., 2013; GALLUZZI et al., 2020).

Florêncio et al. (2022) também avaliaram a eficácia da vacinação desafiando camundongos vacinados inoculando células vivas da mesma linhagem. Camundongos C57BL/6 vacinados com células tratadas com CA₅ controlaram eficientemente o crescimento do tumor. No dia 17, o volume tumoral médio dos camundongos do grupo CA₅ foi significativamente menor ($p = 0,0001$) do que o volume tumoral médio do grupo C-. Na verdade, os animais do grupo CA₅ apresentaram apenas 20% do volume médio do tumor com solução salina, e um animal não desenvolveu nenhum tumor. Este resultado confirma a CA₅ como um indutor genuíno de ICD.

Em resumo, o grupo identificou a CA₅ como um indutor genuíno de ICD em células de melanoma metastático. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa estão em andamento para investigar outros aspectos importantes da atividade da CA₅, como efeito *in vitro* contra linhagens de melanoma humano, efeito antitumoral em monoterapia e em associação com inibidores de *checkpoint* imunológico. Outros estudos são importantes a fim de elucidar aspectos como toxicidade e sobrevivência, bem como associações com imunoterápicos.

7 CONCLUSÃO

A cromomicina A₅ (CA₅) induziu morte celular imunogênica, como foi observado pela indução de resposta imune celular antitumoral em modelo de melanoma murino. As células pré-expostas à CA₅ ativaram células dendríticas convencionais do tipo 1 e do tipo 2, bem como linfócitos T auxiliares e citotóxicos. Essa ativação foi observada, através da liberação de citocinas inflamatórias e citotoxicidade contra células de melanoma murino, o que foi visto no ensaio de citotoxicidade dos esplenócitos em co-cultura com células B16-F10. Este é um teste *in vitro* comparável ao ensaio de vacinação feito anteriormente pelo grupo. Estudos adicionais são necessários para elucidar a atividade efetora de linfócitos T citotóxicos, bem como investigar a geração de memória imunológica em animais vacinados com células expostas à CA₅.

REFERÊNCIAS

ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; organização Mario Jorge Sobreira da Silva. – 5. ed. rev. atual. ampl. – Rio de Janeiro: Inca, 2019.

ADKINS, I. et al. Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells. **Onc Immunology**, v. 6, n. 5, p. e1311433, 4 maio 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>>. Acesso em 20. Set. 2023.

AUTOR: WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. **WORLD CANCER REPORT: cancer research for cancer development**. [s.l.: s.n.].

BEZU, L. et al. eIF2 α phosphorylation is pathognomonic for immunogenic cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, p. 1375 – 1393, 2018.

BLUNT, J. W. et al, Marine natural products, *Natural Product Reports*, v. 34, n. 3, p. 235–294, 2017. Disponível em: Acesso em: 20 Set. 2023.

BORGES, S. C. A. Análise da microbiota simbiote do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing e Michelotti, 1860) na Praia de Porto de Galinhas - PE. 2014. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/18914>. Acesso em: 22 set. 2023.

Cancer Tomorrow. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>>. Acesso em 20 set. 2023.

CHEN, X. et al. Target identification of natural medicine with chemical proteomics approach: probe synthesis, target fishing and protein identification. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 21 maio 2020.

CHEN, Y.L. et al. Metronomic chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. **Cancer Letters**, v. 400, p. 282-292, 2017.

CORICOVAC, D. et al. Cutaneous Melanoma-A Long Road from Experimental Models to Clinical Outcome: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 24 maio 2018.

CÔRTE-REAL, M. et al. 2002. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia* 71: 19-33.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim.*, 2 (1), 47-58, 2010.

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. drugs of marine origin. *Br J Pharmacol* 2020; 177: 3–27.

FUCIKOVA, J. et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 5, p. 1165–1177, 20 fev. 2014.

GALLUZZI, L. et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1–22, 2020.

GALLUZZI, L. et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 2, p. 97–111, 2017.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 23 jan. 2018.

Gaudêncio SP, Costa-Lotufo LV. Enriching cancer pharmacology with
GHIRINGHELLI, F. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. **Nature Medicine**, v. 15, n. 10, p. 1170–1178, 1 out. 2009.

GOLDEN, E. B. et al. An Abscopal Response to Radiation and Ipilimumab in a Patient with Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. v. 1, n. 6, p. 365–372, 1 dez. 2013.

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.

GUIMARÃES et al. Chromomycin A₂ Induces Autophagy in Melanoma Cells. **Marine Drugs**, v. 12, n. 12, p. 5839–5855, 4 dez. 2014.

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

HEINHUIS, K. M. et al. Enhancing antitumor response by combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy in solid tumors. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 2, p. 219–235, 2019.

HUG, J.J. et al. Bacteria as genetically programmable producers of bioactive natural products. **Nat Rev Chem** 4, 172–193 (2020).

HUMEAU, J. et al. EIF2 α phosphorylation: a hallmark of both autophagy and immunogenic cell death. **Molecular and Cellular Oncology**, v. 7, n. 5, p. e1776570, 2020.

HUMEAU, J. et al. Gold standard assessment of immunogenic cell death in oncological mouse models. **Methods in Molecular Biology**, v. 1884, p. 297–315, 2019.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2022.

JIMENEZ, P. C. et al. Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 1, p. 3–27, 23 dez. 2019.

KEPP, O. et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. **Onc Immunology**, v. 3, n. 9, p. 37–41, 2014.

KINGSTON, D. G. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **J Nat Prod**. v74(3), p 496-511, 2011.

KÖNIG, G. et al. Biological Activities of Selected Marine Natural Products. **Planta Medica**, v. 60, n. 06, p. 532–537, dez. 1994.

KORMANEC, Jan et al, The antitumor antibiotic mithramycin: new advanced approaches in modification and production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 18, p. 7701– 7721, 2020.

KROEMER, G. et al. Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. **Nature Medicine**, v. 21, n. 10, p. 1128–1138, 2015.

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.

LIU, C. C. et al. Integrins and ERp57 coordinate to regulate cell surface calreticulin in immunogenic cell death. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. MAY, p. 1–12, 2019.

LOMBÓ, F. et al. The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 1–14, 1 nov. 2006.

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

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

Melanoma Treatment (PDQ®)–Patient Version - National Cancer Institute.

Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq#_400>. Acesso em 3 Abr. 2021.

NAKAMURA, K. et al. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, n. 7, p. 791–798, 4 jan. 2002.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer Statistics**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>>. Acesso em 20 set. 2023.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What Is Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em 20 set. 2023.

O Melanoma. Disponível em: <<https://gbm.org.br/o-melanoma/#1495048437606-f49d7aa4-fc24>>. Acesso em: 20 set. 2023.

O'DONNELL, E. A. et al. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune Network Research*, v. 13, n. 2, p. 43- 54, 2013. Disponível em: . doi: 10.4110/in.2013.13.2.43.

OLIVEIRA, R. J. M. Revisão bibliográfica sobre câncer e avaliação da atividade

biológica de polissacarídeos obtidos dos gêneros *Pleurotus*, *Letinus* e *Agaricus*. Estudo *in vitro* utilizando-se a linhagem B16F10 (melanoma murino). Curitiba, 2011.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1, p. 21–31, 19 mar. 2010.

PINTO, F. C. L. et al. Dextrorotatory Chromomycins from the Marine *Streptomyces* sp. Associated to *Palythoa caribaeorum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 1 jan. 2020.

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.

RADOGNA, F. et al. Natural modulators of the hallmarks of immunogenic cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 162, n. January, p. 55–70, 2019.

SAHM, B. et al. Targeting the Oncogenic TBX2 Transcription Factor With Chromomycins. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 3 mar. 2020.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, p. 15003, 23 abr. 2015.

SHAPIRO, H. M. Practical Flow Cytometry. New York : **Ed Wiley-Liss**, 1995.

SOARES, C. L. S. et al. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2006.

TEIMOURI, F. et al. Efficacy and side effects of dacarbazine in comparison with temozolomide in the treatment of malignant melanoma : a meta-analysis consisting of 1314 patients. p. 381–389, 2012.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a cancer journal of clinicians.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

VANMEERBEEK, I. et al. Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology. **Oncolimmunology**, v. 9, n. 1, p. e1703449, 2020.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment, *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 4, p. 237–251, 2012.

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

WILKE, D. V. et al. Cytotoxic lipidic α -amino acids from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* from the Northeastern coast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1455–1459, 1 jan. 2009.

WOHLERT, S. E. et al. The Structure of Mithramycin Reinvestigated, *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 1, p. 119–121, 1999.

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.