



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

KATHARINE GURGEL DIAS FLORÊNCIO

**CROMOMICINAS ISOLADAS DE *Streptomyces* sp. BRA-384 RECUPERADA DO
ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum* INDUZEM MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA
EM MELANOMA METASTÁTICO**

FORTALEZA – CE

2021

KATHARINE GURGEL DIAS FLORÊNCIO

**CROMOMICINAS ISOLADAS DE *Streptomyces* sp. BRA-384 RECUPERADA DO
ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum* INDUZEM MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA
EM MELANOMA METASTÁTICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke
Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto César
Pereira Lima Júnior

FORTALEZA – CE

2021

KATHARINE GURGEL DIAS FLORÊNCIO

CROMOMICINAS ISOLADAS DE *Streptomyces* sp. BRA-384 RECUPERADA DO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum* INDUZEM MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA EM MELANOMA METASTÁTICO

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

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (UFC)

Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong (UFC)

Prof. Dr. Alexandre Guido Lenz (UFRGS)

Prof. Dr. Fábio Klamt (UFRGS)

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho (UFDPAR)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

F654c Florêncio, Katharine Gurgel Dias.
Cromomicinas isoladas de *Streptomyces* sp. BRA-384 recuperada do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* induzem morte celular imunogênica em melanoma metastático / Katharine Gurgel Dias Florêncio. – 2021.
87 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

Coorientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

1. cromomicina A5. 2. morte celular imunogênica. 3. melanoma metastático. 4. estresse do retículo endoplasmático. 5. anticâncer. I. Título.

CDD 615.1

DEDICATÓRIA

METAMORFOSE

Borboleta,
Lagarta,
Casulo,
Borboleta...

Quem disser que o homem não sofre metamorfose,
Está enganado!

Somos as únicas criaturas de Deus que passam
Toda a nossa vida sofrendo ou superando a
'metamorfose'.

“Sofremos” quando não sabemos aproveitá-la para que,
a cada transformação, nos tornemos lindos
Para Deus.

“Superamos” quando, mesmo diante de todos os
Sofrimentos que a 'metamorfose' nos causa, a
Nossa única preocupação é nos tornarmos cada vez
Mais belos aos olhos de Deus.

Deus não se preocupa com a etapa em
que estamos:
Se borboleta; lagarta ou casulo!..

Deus nos ama como somos. O importante é que
queiramos nos tornar, a cada metamorfose:

Uma 'borboleta' belíssima para Deus;
Uma 'lagarta' faminta de Deus;
Um 'casulo', totalmente envolvido nos braços de Deus!

[Poema escrito por minha mãe, **Maria José Gurgel**, em 2000,
enquanto travava uma intensa batalha contra o câncer.]

Dedico esse trabalho a todos os pacientes oncológicos que travam ou
travaram uma intensa e corajosa batalha contra o câncer, em especial à
minha mãe **Maria José** (*in memorian*), e aos meus avós **Teresinha
Gurgel** (*in memorian*) e **Gerardo Cavalcante** (*in memorian*), e à
minha prima **Daiane Gurgel** (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da vida e por ser infinitamente presente em cada momento do meu viver. Sem Ele e sem o Seu infinito amor, eu nada seria.

Aos meus amados pais, **Maria José** (*in memorian*) e **Antônio Alves** pelo imenso Amor, pelos ensinamentos e pelos seus exemplos de que o estudo, o trabalho e a honestidade são fundamentais para a formação pessoal e profissional. Eu serei eternamente grata por tudo o que fizeram e fazem por mim.

Aos meus queridos e amados avós, **Gerardo Dias** (*in memorian*) e **Teresinha Gurgel** (*in memorian*) pelo imenso Amor, carinho e conselhos tão preciosos. Por torcerem pela minha carreira de cientista mesmo antes de eu ingressar na universidade.

Aos meus amados irmãos, **Caroline Mary, Anne Karine, Leandro, Leonardo** e aos meus sobrinhos e pequenos cientistas **Clarice, Bento, Maitê e Diana**, por serem meus maiores amores e por serem, também, parte de mim. Por sempre me apoiarem nos momentos em que mais precisei e por torcerem por mim! Minha imensa gratidão a vocês!

Ao meu grande orientador **Dr. Diego Veras Wilke**, por todos esses anos de ensinamentos, pela confiança que depositou em mim e por sempre me desafiar na realizações de novos projetos, isso foi essencial para o meu amadurecimento pessoal e profissional. Agradeço também pelo entusiasmo, paciência, incentivo, alegria e, sobretudo, pelos preciosos aprendizados. Tenho grande admiração pelo brilhante orientador que é. As conquistas que eu obtive durante essa intensa jornada do doutorado, também foram suas! Tenho muito orgulho de ser sua primeira doutoranda!

Aos queridos professores: meu coorientador **Dr. Roberto César, Dr. Guido Lenz, Dra. Deysi Wong, Dr. Fábio Klamt, Dr. Delano Marinho, Dra. Paula Jimenez e Dra. Larissa Alves**, por aceitarem fazer parte da minha banca de doutorado e por todas as considerações e contribuições que foram feitas para melhoria desse trabalho. Tenho grande admiração pelos grandes pesquisadores que são.

Aos amigos e companheiros de Laboratório, **Alexia Assef, Elthon Goes, Keilla Santana, Felipe Teles, Yuri Silva, José Matheus, Nicole Sousa, Mariana e Andréa Oliveira** pela prazerosa convivência, por compartilharem todos os momentos vividos, dentro e fora do laboratório, afinal nós somos uma Família! Em especial, agradeço às minhas queridas amigas, **Clara Nogueira e Laura Cardoso**, as quais eu tive o imenso prazer em coorientar. Muito obrigada pela confiança que depositaram em mim, por toda a ajuda e dedicação, e por me permitirem aprender sempre mais com vocês também! Aliás, quem ensina, aprende duas vezes.

À **Evelline Araújo** e a **Maísa Holanda**, que se tornaram amigas e parceiras na ciência, por serem meu braço direito e tão essenciais no desenvolvimento desse trabalho, por estarem comigo no dia-a-dia da bancada, comemorando os bons resultados, e lutando para que tudo desse certo. Vocês fizeram os dias árduos se tornarem mais leves!

Às minhas grandes amigas **Erlânia Alves e Thaís Brito**. Não há um dia que eu não agradeça por ter vocês na ciência e na vida! Obrigada por todo o apoio durante essa intensa jornada! Por fazerem parte da minha vida dentro e fora do laboratório! Admiro muito vocês!

Ao meu grande companheiro, amor e professor, **Gleidison Furtado de Lima (Boboi)**, por todo o amor, ensinamentos, cuidado e dedicação. Obrigada por ter sido meu grande apoio durante parte dessa intensa jornada do doutorado, e por me fazer ver e viver a vida de forma mais leve!

Tenho grande admiração pelo grande profissional e ser humano que és. Obrigada por partilhar a vida ao meu lado e por sempre acreditar em mim e no meu potencial!

Aos indispensáveis colaboradores da química, **Profa Dra Otília Pessoa**, sempre preocupada com o andamento dos experimentos, ao Pós doutorando **Francisco das Chagas Lima Pinto**, por estar sempre disposto a ajudar e pelos importantes ensinamentos na área química.

Ao colaborador da USP, **Prof Dr João Agostinho**, por todos os ensinamentos valiosos e contribuições importantes na tese, por me receber de braços abertos em seu laboratório, e por todas as trocas de conhecimentos ali realizadas. Em especial à **Keli Lima, Bruna, Camila, Jean, Hugo e Lucas** por estarem sempre dispostos a ajudar e ensinar. Obrigada de coração!

Aos meus queridos amigos que a Farmacologia/UFC me deu de presente, por compartilharem as alegrias e os momentos tensos durante a nossa formação como doutores. Fazer ciência é um ato de amor e de resistência! Foi um grande diferencial ter vocês comigo nessa jornada!

A todos os amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação profissional e pessoal. Vocês foram essenciais para que tudo desse certo!

Por fim, agradeço ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de estudo concedida, e o apoio do projeto de pesquisa PROSPECMAR, o qual este trabalho faz parte. À Unidade Multiusuário do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará pelo suporte técnico.

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

RESUMO

CROMOMICINAS ISOLADAS DE *Streptomyces* sp. BRA-384 RECUPERADA DO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum* INDUZEM MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA EM MELANOMA METASTÁTICO

Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará defendida em 2021. Aluna: Katharine Gurgel Dias Florêncio. Orientador: Prof. Diego Veras Wilke.

Alguns quimioterápicos citotóxicos de primeira linha, por exemplo, a doxorrubicina, o paclitaxel e a oxaliplatina induzem a ativação do sistema imunológico do paciente por meio da morte celular imunogênica (MCI). As células tumorais submetidas ao MCI funcionam como uma vacina, liberando padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage associated molecular patterns*), que atuam como adjuvantes, e os neoantígenos do tumor são reconhecidos como antígenos. A indução de MCI é rara, porém produz respostas antitumorais melhores e mais duradouras. O melanoma metastático avançado (MMA) é incurável para mais da metade dos pacientes. A descoberta de indutores de MCI contra MMA é uma estratégia interessante de descoberta de drogas com alto potencial translacional. As cromomicinas (CAs) são moléculas produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces*, e que possuem atividades biológicas como citotóxica e antibiótica, sendo consideradas promissoras para aplicação da área farmacológica. Assim, nesse estudo avaliou-se a indução de MCI pelas CA₅₋₈ obtidas da *Streptomyces* sp. BRA384, em melanoma metastático murino (linhagem B16-F10). O teste da sulforrodamina B (SRB) e o ensaio clonogênico foram realizados para avaliar o efeito antiproliferativo e a sobrevivência de células B16-F10 expostas às CAs. Em seguida, foram avaliados estresse e morte celular, bem como a liberação de DAMPs por citometria de fluxo, imunoblot, PCR em tempo real e luminescência. Em relação ao efeito antiproliferativo pelo SRB, as CAs foram testadas no intervalo de concentrações 0,32 a 1000 nM, nos tempos de 4, 8, 12, 24, 48 e 72h de incubação. Foi observado que as CA₅ e CA₇ apresentaram citotoxicidade em baixo tempo de exposição (4h e 8h), respectivamente, ambas na ordem de nM. Foi visto que a inibição da proliferação teve efeito concentração e tempo-dependentes. Além disso, CA₅₋₈ inibiram completamente a formação de colônias de células tumorais após 24h de incubação em concentrações baixas, que variaram entre 1 a 500 nM entre as CAs. Para esse ensaio, novamente houve um destaque para a potência da CA₅ e CA₇. Foi possível verificar que a CA₅ 100nM, CA₆ 250nM, CA₇ 250nM e CA₈ 500nM e o controle positivo, doxorrubicina (0,6µM), incubadas por 24 horas, alteraram a morfologia celular, aumentando populações de células com alta granulidade e murchas, bem como ocasionando a ruptura da membrana plasmática e a fragmentação do DNA. A indução de morte por apoptose induzida pelas CAs foi confirmada através da detecção do PARP-1 clivado. A autofagia, detectada através do ensaio de acridina laranja, mostrou um aumento significativo de vesículas autofágicas por todas as moléculas e

pela Dox incubadas por 24h. Esses dados foram comprovados pela conversão da proteína LC3BI em II. Nos ensaios com marcadores específicos para os DAMPs, foi verificada a externalização da CRT na superfície da membrana plasmática e a liberação do HMGB1 nuclear por todas as moléculas. Em relação ao ATP, foi possível verificar um aumento de ATP extracelular somente por células incubadas com CA₅, quando comparado ao grupo controle negativo. Os resultados de estresse e morte celular foram utilizados para o estabelecimento de um índice de eventos relacionados à MCI. A CA₅ apresentou o maior índice e juntamente com a Dox prosseguiu com os estudos. Tanto a CA₅ quanto a Dox induziram a externalização de ERp57. Porém, somente a CA₅ foi capaz de induzir a fosforilação de eIF2a, fator crucial para que o fenômeno da MCI aconteça. A expressão gênica de genes relacionados a apoptose, autofagia e estresse de retículo também foi avaliada por PCR *array*, e verificou-se que a CA₅ e Dox induziram alterações nesses genes. Por fim, o teste de vacinação *in vivo* realizado em C57BL/6 mostrou que a CA₅ foi capaz de gerar um efeito vacinal, reduzindo significativamente o crescimento tumoral nos animais vacinados com células pré-expostas à CA₅. Desta forma conclui-se que a CA₅ é uma molécula indutora de MCI. 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 metastático; estresse do retículo endoplasmático; autofagia; anticâncer.

ABSTRACT

CHROMOMYCINS FROM *Streptomyces* sp. FROM THE ZOANTHID *Palythoa caribaeorum* INDUCE IMMUNOGENIC CELL DEATH IN METASTATIC MELANOMA

Some first-line cytotoxic chemotherapeutics, for example, doxorubicin, paclitaxel and oxaliplatin induce the activation of the patient's immune system through immunogenic cell death (ICD). Tumor cells subjected to ICD work like a vaccine, releasing damage associated molecular patterns (DAMPs), which act as adjuvants, and tumor neoantigens are recognized as antigens. Induction of ICD is rare, but it produces better and longer-lasting antitumor responses. Advanced metastatic melanoma (AMM) is incurable for more than half of patients. The discovery of ICD inducers against AMM is an interesting drug discovery strategy with high translational potential. Chromomycins (CAs) are molecules produced by bacteria of the *Streptomyces* genus, which have biological activities such as cytotoxic and antibiotic, being considered promising for application in the pharmacological area. Thus, in this study, the induction of ICD by CA₅₋₈ obtained from *Streptomyces* sp. BRA384 in murine metastatic melanoma (lineage B16-F10). The sulforhodamine B (SRB) test and the clonogenic assay were performed to assess the antiproliferative effect and survival of B16-F10 cells exposed to CAs. Then, stress and cell death, as well as the release of DAMPs by flow cytometry, immunoblot, real-time PCR and luminescence were evaluated. Regarding the antiproliferative effect by the SRB, the CAs were tested in the range of concentrations from 0.32 to 1000 nM, at the times of 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h of incubation. It was observed that CA₅ and CA₇ presented cytotoxicity at a low exposure time (4h and 8h), respectively, both in the nM range. It was seen that the inhibition of proliferation had concentration and time-dependent effects. Furthermore, CA₅₋₈ completely inhibited the formation of tumor cell colonies after 24 hours of incubation at low concentrations, which ranged from 1 to 500 nM among the CAs. For this test, again there was an emphasis on the potency of CA₅ and CA₇. It was possible to verify that CA₅ 100nM, CA₆ 250nM, CA₇ 250nM and CA₈ 500nM and the positive control, doxorubicin (0.6µM), incubated for 24 hours, changed the cell morphology, increasing cells with high granularity and wilt, as well as causing the disruption of the plasma membrane and the fragmentation of DNA. The induction of death by apoptosis induced by CAs was confirmed through the detection of cleaved PARP-1. Autophagy, detected using the orange acridine assay, showed a significant increase in

autophagic vesicles by all molecules and by Dox, when incubated for 24h. These data were confirmed by the conversion of the LC3BI protein into II. In assays with specific markers for DAMPs, externalization of CRT on the surface of the plasma membrane and release of nuclear HMGB1 by all molecules was verified. Regarding ATP, it was possible to verify an increase in extracellular ATP only by cells incubated with CA₅, when compared to the negative control group. The results of stress and cell death contributed to the establishment of an index of events related to ICD. CA₅ presented the highest index and together with Dox continued with the studies. Both CA₅ and Dox induced the externalization of ERp57. However, only CA₅ was able to induce eIF2a phosphorylation, a crucial factor for the ICD phenomenon to happen. Gene expression of genes related to apoptosis, autophagy and reticulum stress was also evaluated by array PCR, and it was found that CA₅ and Dox induced alterations in these genes. Finally, the in vivo vaccination test performed on C57BL/6 showed that CA₅ was able to generate a vaccine effect, significantly reducing tumor growth in animals vaccinated with cells pre-exposed to CA₅. CA₅ is an ICD-inducing molecule. Further studies are needed to assess other potentials and mechanisms of action of this compound, contributing to its possible pharmacological use.

Keywords: chromomycin A₅; immunogenic cell death; metastatic melanoma; endoplasmic reticulum stress; autophagy; anticancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características adquiridas por células neoplásicas para o desenvolvimento e progressão tumoral.....	18
Figura 2: Requisitos diferenciais para a imunogenicidade da morte celular.....	21
Figura 3: Mecanismos envolvidos na morte celular imunogênica (MCI).....	25
Figura 4: Mapa mundial com destaque para o Brasil e Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil.....	26
Figura 5: Modelo esquemático dos mecanismos de ação da cromomicina A5 isolada de <i>Streptomyces</i> sp. BRA-384.....	29
Figura 6: Planejamento experimental.....	34
Figura 7: Estrutura molecular das cromomicinas.....	36
Figura 8: Estratégia de gates para citometria de fluxo.....	41
Figura 9: Estratégia de gates para análise da morfologia celular.....	42
Figura 10: Estratégia de gates para análise da integridade de membrana celular.....	43
Figura 11: Estratégia de gates para análise de vesículas autofágicas.....	44
Figura 12: Estratégia de gates para análise da externalização da CRT.....	45
Figura 13: Estratégia de gates para análise da externalização da ERp57.....	46
Figura 14: Estratégia de gates para fosforilação de eIF2 α	47
Figura 15: Estratégia de gates para verificação de eIF2 α	48
Figura 16: Estratégia de gates para análise da liberação do HMGB1.....	49
Figura 17: Teste de vacinação com células incubadas com CA ₅	52
Figura 18: Efeito antiproliferativo das CAs em células da linhagem B16-F10.....	53
Figura 19: Avaliação de sobrevivência de células tumorais in vitro através do ensaio clonogênico.....	54
Figura 20: Avaliação da morfologia celular de células da linhagem B16-F10.	55
Figura 21: Avaliação da integridade de membrana celular de células B16-F10.....	57
Figura 22: Avaliação das vesículas autofágicas.....	58
Figura 23: Avaliação da externalização da CRT na membrana de células B16-F10.....	59
Figura 24: Avaliação da liberação do HMGB1 em células B16-F10.....	60
Figura 25: Avaliação do ATP extracelular liberado por linhagem B16-F10.....	61

Figura 26: Gráfico de radar do índice de morte celular imunogênica (MCI).....	62
Figura 27: Avaliação da externalização de ERp57.....	63
Figura 28: Avaliação da fosforilação de eIF2 α	63
Figura 29: Avaliação de expressão gênica de células incubadas com CA ₅	65
Figura 30: Teste de vacinação com células pré-incubadas com CA ₅	66
Figura 31: Visão geral de morte celular imunogênica induzida por CA ₅	71

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Reação da enzima luciferase.....	50
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
ANXA1	Anexina A1
ATF4	Fator de transcrição ativa 4 (<i>Activating transcription factor 4</i>)
ATF6	Fator de transcrição ativa 6 (<i>Activating transcription factor 6</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
BAK	Proteínas pró-apoptóticas
BAX	Proteínas pró-apoptóticas
BAD	Proteínas pró-apoptóticas
BCL2	Fator de ativação de autofagia
CAs	Cromomicinas
CO ₂	Gás carbônico
CDs	Células dendríticas
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CIT	Concentração inibitória total
CL ₅₀	Concentração letal média
CRT	Calreticulina
CTLA-4	Linfócitos T citotóxicos associado a proteína 4 (do inglês <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>)
CXCL10	CXC-quimiocina
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo (do inglês <i>danger-associated molecular patterns</i>)
DAPI	4-6-diamidino-2- fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EIF2A	Fator de iniciação de tradução em eucariotos 2A (do inglês <i>eukaryotic translation initiation fator 2A</i>)
FSC	Desvio frontal (do inglês <i>Forward scatter</i>)
HMGB1	Proteína nuclear não histona (do inglês <i>high mobility group box protein 1</i>)
HO 33342	Hoechst 33342
HSP	Proteínas do choque térmico

IFN-1	Interferons do tipo I
IFN- γ	Interferon gama
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IL-1 β	Interleucina-1 β
LAMP1	Proteína de membrana de lisossomo 1 (do inglês <i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>)
LC3	<i>Light chain of the microtubule-associated protein 1</i>
LRP1	Proteína 1 relacionada ao receptor proteico de baixa densidade (do inglês <i>low density protein receptor-related protein 1</i>)
MAT	Microambiente tumoral
MCI	Morte celular imunogênica
MFI	Intensidade mediana de fluorescência (do inglês <i>median fluorescence intensity</i>)
mM	Milimolar
MTX	Mitoxantrona
NLRP3	Receptores NOD do tipo 3
nm	Nanômetro
PANX1	Panexina 1
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PDIA3	Proteína dissulfeto-isomerase A3 (do inglês <i>protein disulfide isomerase family A member 3</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês <i>phycoerythrin</i>)
PS	Fosfatidilserina (do inglês <i>phosphatidylserine</i>)
RAGE	Receptor específico de glicosilação avançada de produto final (do inglês <i>receptor for advanced glycation endproducts</i>)
RE	Retículo endoplasmático
SNAP25	Proteína de 25 KDa associada ao sinaptossoma (do inglês <i>synaptosomal-associated protein, 25 KDa</i>)
SRB	Sulforrodamina B
SSC	Desvio lateral (do inglês <i>Side Scatter</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TLR-2	Receptor semelhante ao toll tipo 2 (do inglês <i>toll-like receptor</i>)
TLR-4	Receptor semelhante ao toll tipo 4 (do inglês <i>toll-like receptor</i>)
VAMP1	Proteína associada a vesículas de membrana 1 (do inglês <i>vesicle-associated membrana protein 1</i>)

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Câncer	17
1.1.1 Melanoma metastático	19
1.2 Morte celular imunogênica	21
1.3 Produtos naturais marinhos	25
1.3.1 Cromomicinas.....	28
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Planejamento experimental.....	34
4.2 Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	35
4.2.1 Cromomicinas A ₅₋₈	35
4.2.2 Cultivo das células.....	36
4.2.3 Ensaio as sulforodamina B.....	37
4.2.4 Análise do teste de sobrevivência através do ensaio clonogênico.....	39
4.3 Análise dos efeitos de cromomicinas sobre linhagem B16-F10.....	40
4.3.1 Análise de morfologia celular por microscopia óptica.....	40
4.4 Estudos dos efeitos das cromomicinas A ₅₋₈ por citometria de fluxo	40
4.4.1 Estratégias de <i>gates</i> e análise de dados.....	40
4.4.2 Avaliação da morfologia celular por citometria de fluxo.....	42
4.4.3 Avaliação da perda de integridade de membrana	42
4.4.4 Verificação de vesículas autofágicas por acridina laranja	43
4.4.5 Avaliação da externalização da CRT na superfície da membrana plasmática	44
4.4.6 Avaliação da liberação de HMGB1	46
4.5 Quantificação de ATP por kit de luminescência	47
4.6 Construção de index para escolha da CA com melhor perfil indutor de MCI	48
4.7 Estudo dos efeitos das CAs selecionadas no index – citometria de fluxo.....	48
4.7.1 Avaliação da externalização da ERp57 na superfície da membrana celular	48
4.7.2 Avaliação da fosforilação da eIF2alfa (Ser51).....	49
4.7.3 Avaliação de eIF2alfa (Ser51).....	50
4.8 RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)	51

4.9 Análise de Western blotting	52
4.10 Teste de vacinação para avaliar a capacidade imunogênica da CA ₅ <i>in vivo</i>	52
5 RESULTADOS	55
5.1 Efeito antiproliferativo das CA ₅₋₈	55
5.2 Avaliação de sobrevivência através do ensaio clonogênico	56
5.3 Avaliação dos efeitos das cromomicinas em células B16-F10	57
5.3.1 Alterações na morfologia celular	57
5.3.2 Alterações da integridade de membrana	59
5.3.3 Avaliação de vesículas autofágicas	60
5.3.4 Avaliação da externalização da CRT na superfície da membrana celular	61
5.3.5 Avaliação da liberação de HMGB1	63
5.3.6 Quantificação do ATP liberado	63
5.3.7 Index para escolha da molécula para prosseguimento dos testes	64
5.3.8 Avaliação da externalização do ERp57 na superfície da membrana celular	65
5.3.9 Avaliação da fosforilação de eIF2 α	66
5.3.10 Avaliação da expressão gênica em células incubadas com CA ₅	67
5.3.11 Teste de vacinação com células incubadas com CA ₅	68
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2020, câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças diferentes que possuem características malignas. Essas doenças relacionadas apresentam cunho genético, sendo caracterizadas, fundamentalmente, por mudanças que ocorrem em genes que controlam a forma como as células funcionam, crescem e se dividem, conferindo a elas a capacidade de crescimento desordenado e de invasão de órgãos e tecidos adjacentes.

Biologicamente, o câncer envolve mudanças dinâmicas no genoma celular, silencia ou deleta genes supressores de tumor e estimula a atividade de oncogêneses, gerando defeitos no circuito regulatório que governa a proliferação celular e homeostase tecidual (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Em 2011, Hanahan e Weinberg apresentaram uma análise atualizada sobre como células normais podem evoluir gradativamente para o estado neoplásico, listando 10 habilidades adquiridas, que podem ser encontradas em todos os tipos de câncer, a saber: instabilidade genética, autossuficiência em fatores do crescimento, insensibilidade a supressores do crescimento, evasão da destruição pelo sistema imune, potencial replicativo ilimitado, inflamação relacionada ao tumor, invasão tecidual e metástase, indução à angiogênese, evasão da apoptose e desregulação do metabolismo energético (Figura 1). Somado a isso, os tumores são compostos por diferentes tipos celulares que podem interagir entre si e com as células em seu entorno, formando um microambiente tumoral (MAT). O MAT apresenta células não tumorais como infiltrado leucocitário, células do estroma e vasos sanguíneos em formação e expansão, os quais desempenham papel fundamental na progressão e malignidade do tumor. A junção de todos esses fatores fazem do câncer uma doença altamente complexa, o que dificulta o seu tratamento (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 – Capacidades adquiridas pelas células tumorais para o desenvolvimento e progressão tumoral



Fonte: Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011.

Além disso, o câncer é considerado um dos principais problemas da saúde pública mundial, especialmente nos países em fase de desenvolvimento. Há uma previsão de que estes países serão responsáveis por 80% dos 20 milhões de casos novos da doença estimados para 2025. Segundo dados da GLOBOCAN (2021) em todo o mundo, cerca de 19,3 milhões de novos casos das doenças (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e quase 10,0 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) ocorreram em 2020. De acordo com o INCA, 2020, para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). A doença representa a segunda causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (WHO, 2020).

O câncer pode ser tratado de diversas formas, e o tratamento é escolhido de acordo com o tipo de câncer e em que estágio ele está. Atualmente, os tratamentos mais utilizados podem ser usados separada ou conjuntamente, e os mais empregados são: cirurgia, quimioterapia,

radioterapia, imunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal, entre outros que geralmente são utilizados apenas como adjuvantes (NCI, 2015; MILLER et al., 2016).

A imunoterapia e a terapia dirigida são técnicas mais atuais e muito caras, sendo de uso restrito e muitas vezes adjuvante. A imunoterapia é, por definição, uma terapia antineoplásica adjuvante que se baseia em anticorpos capazes de reconhecer antígenos específicos que são diferencialmente expressos na superfície de células de câncer, marcando-as como alvos (WEINER; MURRAY; SHUPTRINE, 2012).

Apesar dos inúmeros avanços na área da oncologia, e do grande arsenal de medicamentos, ainda não se chegou a um composto ideal. Sendo assim, é grande o interesse por novas estratégias terapêuticas que solucionem os problemas relatados e que possibilitem o tratamento de pacientes com câncer (SUI et al., 2013).

1.1.1 Melanoma metastático

O melanoma se origina a partir de mutações malignas dos melanócitos. Estes últimos são um tipo de células predominantemente localizadas na pele, folículos capilares e olhos, onde produzem a melanina, um pigmento responsável pela coloração da pele e cabelos (GRAY-SCHOPFER et al, 2007; BANDERCHI et al, 2013).

Dentre os cânceres de pele, o melanoma metastático se destaca por ser o tipo mais grave, e vem se evidenciando devido ao grande aumento da sua incidência nas últimas décadas. Apesar de não ser o tipo de câncer de pele com maior incidência (menos de 5% de todos os casos de câncer de pele), porém eles são responsáveis por 60-80% das mortes (BANDERCHI et al, 2013). Essa alta taxa de mortalidade, que está relacionada à sua capacidade metastática (INCA, 2021). A taxa de mortalidade causada por esse tipo de câncer pode ser reduzida através da detecção precoce, juntamente com a utilização de novos medicamentos, incluindo os imunoterápicos.

Dentre os fármacos mais utilizados para o tratamento do melanoma, destacam-se a dacarbazina e a temozolomida. No entanto, a eficácia desses fármacos ainda é considerada baixa. Em termos de porcentagem, a dacarbazina geralmente é inferior a 10%, apresentando uma taxa de sobrevida reduzida (cerca de 6 meses) e, a temozolomida, na maioria das vezes, apresenta uma resposta temporária (LUKE et al., 2017; TEIMOURI; NIKFAR; ABDOLLAHI, 2012). Além desses dois quimioterápicos, as terapias que possuem uma capacidade de modular o sistema imunológico, também eram muito utilizadas no tratamento do melanoma, como por exemplo, a administração de altas doses de interleucina-2 (IL-2), que eram responsáveis por

gerar cerca de 5-10% de sobrevida dos pacientes, mas infelizmente a sua toxicidade é muito alta (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Estudos recentes com enfoque nas vias de sinalização imunológicas associadas aos tumores, permitiram que novas estratégias de tratamento fossem desenvolvidas, como os fármacos inibidores de *checkpoint* imunológico. Dentre esses tipos de fármacos, pode-se destacar o ipilimumabe, que é um anticorpo monoclonal que atua bloqueando o CTLA-4, um receptor expresso em linfócitos T, que quando é ativado atuará regulando negativamente a ativação dos linfócitos T, e dessa forma leva a uma inibição da secreção de IL-2 (LARKIN et al, 2015). Quando o receptor CTLA-4 é bloqueado pelo anticorpo monoclonal, ele viabiliza a ação de células T e impede a tolerância a antígenos tumorais, produzindo uma resposta imunológica. Outro importante inibidor de *checkpoint* imunológico é o nivolumabe. Este atua bloqueando o receptor da morte programada (PD-1), e dessa forma, impede a ligação com o ligante de morte programada 1 (PD-L1) que está presente em células neoplásicas. Esse bloqueio acarretará na ativação de linfócitos T expostos aos antígenos e, conseqüentemente, uma potente resposta imune específica ao tumor (MAVERAKIS et al., 2015; QUEIROLO et al., 2019). Em termos gerais, tais fármacos agem inibindo a imunossupressão, assim, pode-se deduzir que o sistema imunológico é capaz de eliminar células cancerígenas quando não se encontra mais suprimido. Estudos evidenciaram que pacientes que utilizaram esses medicamentos em monoterapia ou em terapia combinada obtiveram um aumento considerável no tempo de sobrevida, sendo esse aumento superior a 50% em relação à média anterior que era de 5% (LARKIN et al., 2015; QUEIROLO et al., 2019). Em termos gerais, tais fármacos agem inibindo a imunossupressão, assim, pode-se deduzir que o sistema imunológico é capaz de eliminar células neoplásicas quando não se encontra mais suprimido. Estudos evidenciaram que pacientes que utilizaram esses medicamentos em monoterapia ou em terapia combinada obtiveram um aumento considerável no tempo de sobrevida, sendo esse aumento superior a 50% em relação à média anterior que era de 5% (LARKIN et al., 2015; QUEIROLO et al., 2019).

Outro fármaco muito utilizado na clínica é o vemurafenibe. Este é considerado uma terapia alvo-direcionada, e atua bloqueando a função da tirosina quinase da *BRAFV600* (ATKINS et al, 2014). Esse medicamento tem sido largamente utilizado em pacientes com melanoma que possuem a mutações na *BRAFV600*, estudos clínicos de fase III evidenciaram um aumento significativo na taxa de sobrevida livre de progressão da doença (ROBERT et al, 2015; WONG; RIBAS, 2015). Apesar de propiciar uma boa resposta, essa terapia apresenta uma desvantagem quando comparada às imunoterapias por se limitar a pacientes que tenham

esse tipo mutação específica, enquanto os inibidores de *checkpoint* imunológico são eficazes independentemente do *status* mutacional do BRAF (MILLER et al., 2016).

Devido a isso e à grande refratariedade desse tipo de câncer, as pesquisas por novas terapias para o melanoma metastático procuram por estratégias que estimulem a imunogenicidade característica desse tipo de tumor. Adicionalmente, a imunoterapia combinada com quimioterapia imunogênica ou como monoterapias podem aumentar a eficácia do tratamento de melanoma (GALLUZZI et al., 2020; HEINHUIS et al., 2019).

1.2 Morte celular imunogênica

Estudos pré-clínicos, revelaram que as antraciclina e alguns outros quimioterápicos possuem uma maior eficiência no controle do crescimento de tumores em camundongos imunocompetentes (em oposição à imunodeficientes), o que posteriormente também foi observado e validado em pacientes com câncer (GALLUZZI et al., 2020; KROEMER et al., 2015). Um dos principais mecanismos que podem explicar essa melhora no tratamento e aumento no tempo de resposta, reside na capacidade desses medicamentos de induzirem a morte celular imunogênica (MCI), o que significa que eles matam as células tumorais de forma que elas se tornem reconhecíveis pelo sistema imunológico (GALLUZZI et al., 2020).

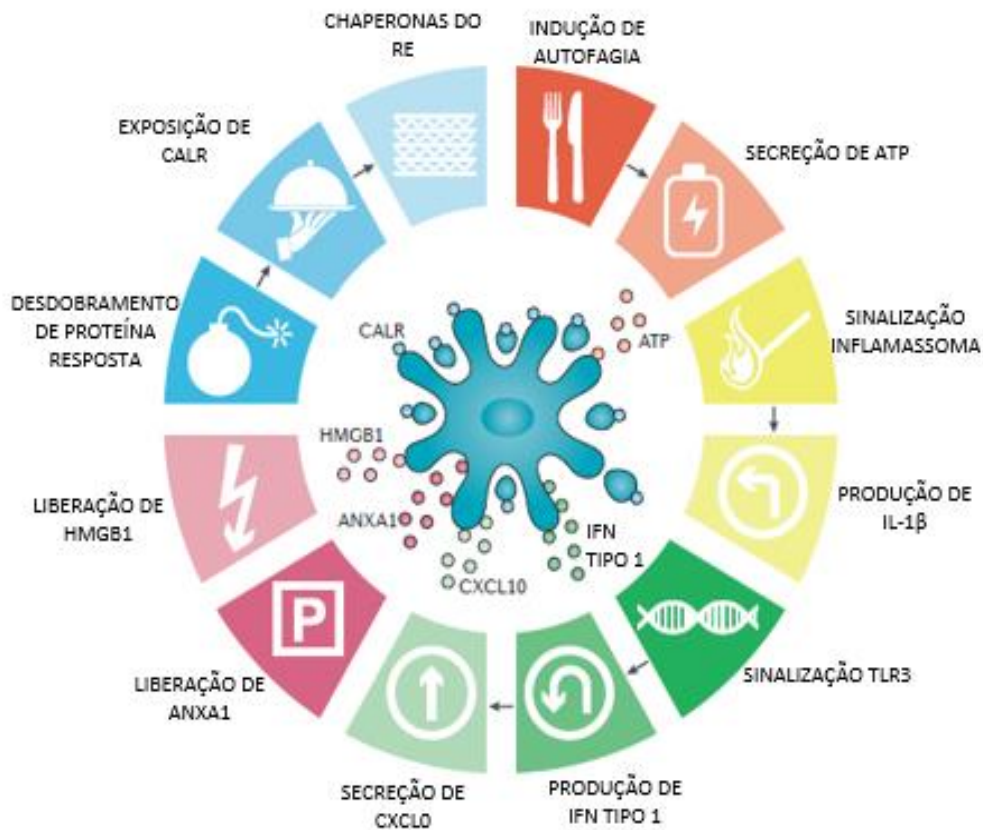
A morte celular imunogênica (MCI) é um tipo raro de morte celular regulada que é desencadeada pela ativação do sistema imunológico adaptativo na presença de antígenos que derivam do processo de morte celular, principalmente de células cancerígenas (BEZU et al., 2018). Isso se torna possível devido à liberação de sinais de perigo (DAMPs do inglês, *Damage-associated molecular patterns*) que são responsáveis pela ativação de uma série de eventos que levam a uma resposta imune tumor-específica, gerando um efeito mais eficiente e mais duradouro em pacientes, bem como promovem a vacinação contra tumores em modelos experimentais. Para que esse tipo de morte celular ocorra é necessário a plena indução de liberação ou exposição de DAMPs pelas células cancerígenas, além de um sistema imune eficiente para a percepção dos efetores imunológicos (HUMEAU et al., 2020; VANMEERBEEK et al., 2020).

Dentro os principais DAMPs presentes na MCI, tem-se 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; DICATO; DIEDERICH, 2019). Vale salientar que a indução de citotoxicidade e detecção desses parâmetros são importantes para fazer previsões sobre a capacidade dos fármacos em induzir esse processo de

morte celular. Porém, outros DAMPs importantes também estão relacionados a MCI, como as proteínas do choque térmico (HSP), interferons (IFN) do tipo I, anexina A1 (ANXA1), entre outros (Figura 2) (GOMEZ-CADENA et al., 2016; KEPP et al., 2014a). Alguns ensaios específicos podem ser realizados com células tumorais *in vitro* para verificar a presença dos DAMPs.

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

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



Fonte: adaptado de GALLUZZI et al., 2017.

A externalização da CRT na superfície da membrana plasmática ocorre em resposta ao estresse de RE, e é um evento precoce na MCI, ou seja, pré-apoptótico. Essa externalização acontece antes da externalização da fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*). A CRT é co-expressa com a proteína ERp57 na superfície da membrana plasmática, funcionando como um sinal “*eat me*” para células fagocíticas, ou seja, torna os fagócitos sensíveis a ativação e maturação após ligação com o seu receptor, o CD91 (também conhecido por LRP1, do inglês *low density protein receptor-related protein 1*) (GALLUZZI et al., 2017; LIU et al., 2019; PANARETAKIS et al., 2009). E os eventos para esse processo ocorrer envolve 3 módulos de sinalização distintos. Primeiro: o evento apoptótico que envolve a ativação de caspase 8 e clivagem seguida de ativação da proteínas pró-apoptóticas da família do Bcl-2, Bax e Bak; segundo: a fosforilação do fator de iniciação de tradução em eucariotos 2A (EIF2A, do inglês *eukaryotic translation initiation fator 2A*) e síntese de proteínas represadas no RE; e terceiro: evento de exocitose onde são requisitados componentes do citoesqueleto incluindo actina, proteína associada à proteína de 25 KDa associada ao sinaptossoma (SNAP25, do inglês *synaptosomal-associated protein, 25 KDa*) e às vesículas de membrana 1 (VAMP1, do inglês *vesicle-associated membrane protein 1*), essas duas estão relacionadas ao transporte de vesículas intracelulares (KEPP; SENOVILLA; KROEMER, 2014).

Duas chaperonas importantes no processo de MCI são as Hsp70 e Hsp90, ambas estão localizadas no meio intracelular e quando são expressas na membrana plasmática tem função semelhante à da CRT, ou seja, elas funcionam como um sinal imunogênico facilitando a ativação das CDs ou atuam como veículo para exposição ao antígeno (FUCIKOVA et al., 2020; RODRÍGUEZ-SALAZAR et al., 2017).

O ATP, cuja liberação para o meio extracelular está relacionada ao processo de apoptose e autofagia, é outro DAMP necessário na MCI (KROEMER et al., 2013). Através do processo autofágico ocorre a realocação do ATP vesicular dos lisossomos para autolisossomos, seguido da redistribuição da proteína de membrana de lisossomo 1 (LAMP1, do inglês *lysosomal-associated membrane protein 1*). A liberação do ATP, ocorre com a formação de vesículas e com a abertura de canais de panexina 1 (PANX1) (KEPP et al., 2014a). Esses canais de PANX1 possuem um papel importante na liberação do ATP por células apoptóticas. Dessa forma, os níveis extracelulares de ATP são significativamente maiores quando os processos de autofagia e apoptose acontecem simultaneamente (CHEN et al., 2017; MARTINS et al., 2012).

Quando o ATP encontra-se de forma extracelular, ele constitui um sinal “*find-me*” e pró-inflamatório através da interação com os receptores purinérgicos P2YR2 e P2XR7 das

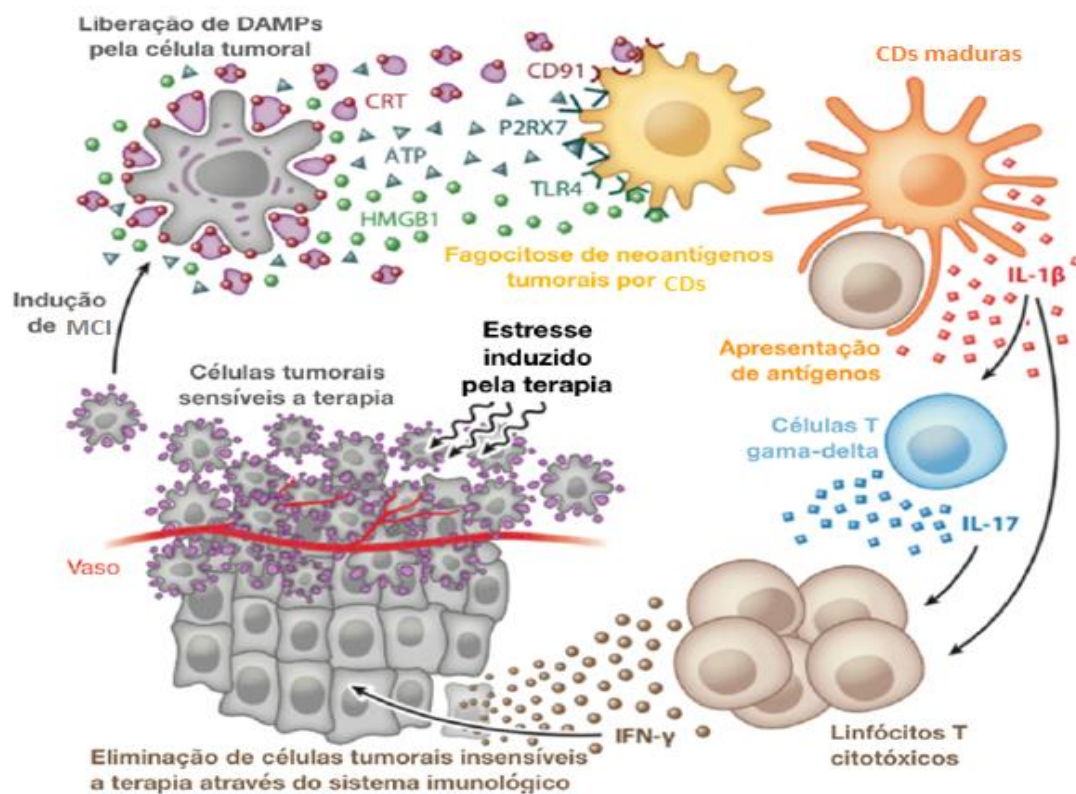
células dendríticas (CDs). O P2Y₂ exerce função quimioatraente para o recrutamento de APCs, assim como na diferenciação destas. O ATP, através de receptores purinérgicos P2X₇, também propicia a ativação de inflamassoma constituído por receptores NOD (NLR) do tipo 3 (NLRP3) citoplasmáticos. A ativação deste tipo de inflamassoma estimula a liberação de IL-1 β e IL-18 pelas APCs, importantes para a resposta imune inicial (GALLUZZI et al., 2017; MARTINS et al., 2012).

Outro DAMP essencial para que o processo de MCI ocorra, é a presença de HMGB1 no meio extracelular, onde ele passa a atuar como um potente indutor pró-inflamatório. A liberação de HMGB1 nuclear por células em processo de morte necessita, principalmente, da permeabilização das membranas nucleares, visto que o HMGB1 está localizado no núcleo, e da membrana plasmática das células (HEINHUIS et al, 2019). Esse evento ocorre na fase tardia de morte celular, quando as células sofrem necrose secundária (WANG et al, 2018). Já a sua resposta inflamatória é ocasionada a partir de uma ligação ao receptor similar ao toll (TLR, do inglês *toll-like receptor*) tipo 2 (TLR-2) e ao tipo 4 (TLR-4). Além desses dois, há uma ligação com o receptor específico de glicosilação avançada de produto final (RAGE, do inglês *receptor for advanced glycation endproducts*). Para que a resposta imune aconteça, é requerida a ligação ao TLR-4. Alguns estudos demonstraram que o efeito vacinal não ocorreu em modelo *knockout* para TLR-4, porém os resultados se mantiveram na ausência dos demais receptores (OBEID et al., 2007; APETOH et al., 2007; GALLUZZI 2018). Além disso, o HMGB1 pode exercer uma atividade quimiotática, sendo capaz de formar um complexo com a quimiocina CXCL12 com sinalização através do receptor CXCR4 (KEPP et al., 2014b).

A externalização e liberação dos DAMPs durante o processo MCI ocorre seguindo uma sequência de eventos temporalmente definidos. Como etapa prioritária, é necessário que as células dendríticas (CDs) sejam ativadas, e dessa forma, elas possam englobar, processar e apresentar os antígenos de células tumorais para os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) (PROCUREUR et al, 2021). Além disso, as CDs quando ativadas, também realizam apresentação de antígenos cruzada para células T $\alpha\beta$. Podendo então, secretar interleucina (IL) 1 β (IL-1 β), responsáveis pela ativação de células T $\gamma\delta$, que por sua vez, irão secretar IL-17, contribuindo para que ocorra a ativação das células T citotóxicas $\alpha\beta$. Tanto as células T $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$ são produtoras de interferon gama (IFN- γ), granzima e perforina, que tem por função eliminar as células tumorais (Figura 3) (KROEMER et al, 2013). Como resultado dessa sequência de eventos, ocorre a ativação do sistema imune, onde também são geradas células de memória, conferindo assim uma proteção imunológica de longa duração (GOMEZ-CADENA et al., 2016; KEPP et al., 2014b).

A validação de ocorrência de MCI podem ser realizada através dos testes *in vitro*, para a detecção de DAMPs, para a avaliação da ativação de células apresentadoras em cultura, co-cultivadas com células mortas por alguma molécula indutora de MCI, e para uma melhor caracterização fenotípica dos estudos. Porém, os ensaios *in vivo* são considerados o padrão-ouro e únicos testes válidos para a confirmação que a MCI está, de fato, ocorrendo experimentalmente. Estes incluem experimentos de vacinação, bem como de avaliação de resposta terapêutica em animais imunocompetentes e imunodeficientes (GOMEZ-CADENA et al., 2016; HUMEAU et al., 2019; VANMEERBEEK et al., 2020).

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



Fonte: adaptado de KROEMER et al., 2013.

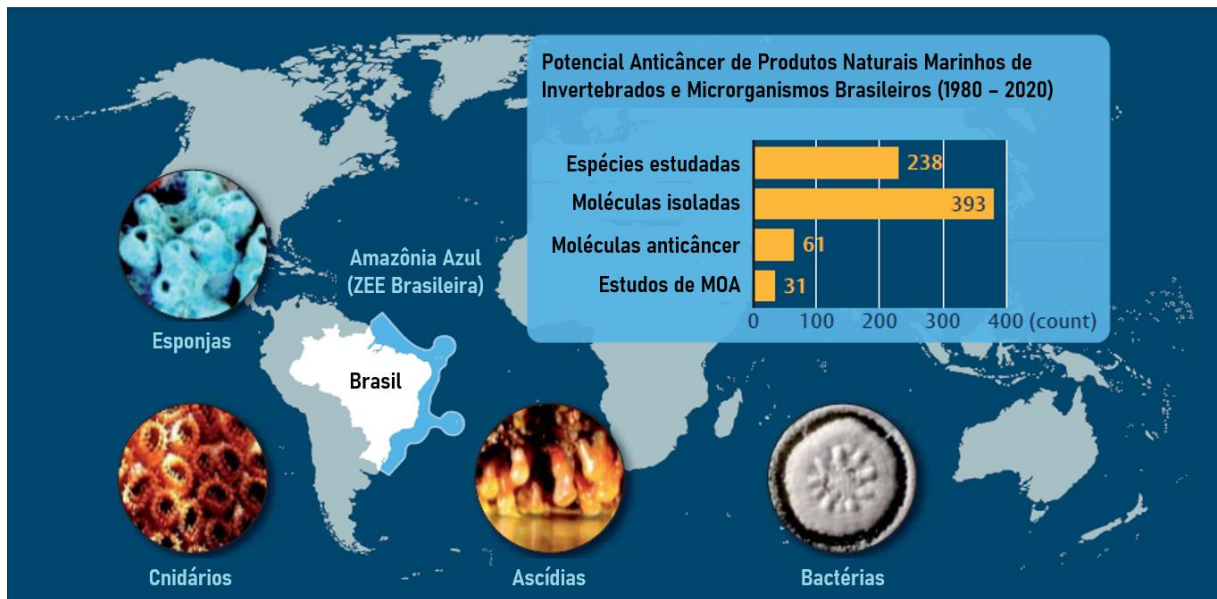
1.3 Produtos naturais marinhos

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 existentes (WILKE et al., 2021). Os ecossistemas marinhos são fontes profícuas de produtos naturais promissores, os quais foram utilizados diretamente ou após alterações em suas estruturas moleculares, para o desenvolvimento de novos fármacos (BOEUF, 2011). No entanto, o potencial farmacológico do ambiente marinho, em grande parte foi negligenciado até meados do século passado e, até o momento presente, a biodiversidade desse ambiente permanece praticamente inexplorada (ROBERTS, 2002; BOEUF, 2011).

Os estudos visando a descoberta de novos fármacos para o tratamento do câncer, tem tido uma maior demanda nas últimas décadas. Diante da necessidade de novas terapias, a prospecção de novas moléculas, seja em ambiente terrestre ou marinho, ganhou um caráter de urgência dentro da ciência.

O Brasil é detentor de uma extensa faixa marítima chamada de “Amazônia Azul”. Esse território é uma Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil (Figura 4), e possui uma dimensão comparável ao da Floresta Amazônica. O litoral brasileiro abrange 8000 km de regiões tropicais e temperadas que são o habitat de muitos organismos, se tornando uma fonte de novas substâncias, visto que a sua biodiversidade resulta em vasta diversidade genética e, consequente, produção de diferentes moléculas que podem apresentar bioatividade de interesse farmacológico (WILKE *et al.*, 2020). Esse alto potencial farmacológico poder estar diretamente relacionado à diversidade de organismos e as altas pressões seletivas as quais os mesmos estão expostos, sejam condições variáveis de temperatura e salinidade, comunicação, predação, além de defesa poderosa, já que muitos dos animais desse hábitat são sésseis (NEWMAN & CRAGG, 2016).

Figura 4. Mapa mundial com destaque para o Brasil e a Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil. 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.



Fonte: Adaptado de Wilke *et al.* (2020).

Mais de uma centena de novos produtos estão em desenvolvimento clínico, particularmente como agente anticâncer e anti-infecciosos. Treze novos fármacos relacionados a produtos naturais foram aprovados entre 2005 e 2007, cinco representam novas classes de fármacos, incluindo os produtos marinhos Dolastatina (Adcetris[®]), trabectedina (Yondelis[®]) e ziconotídeo (Prialt[®]) (HARVEY, et al, 2008, NEWMAN e CRAGG., 2016).

Outros exemplos de compostos de origem marinha, em estágio de triagem clínica são: a briostatina isolada de *Bulgula neritina*, um briozoário, a halicondrina E7389, um derivado da halicondrina B, isolado da esponja *Halichondria okadai* por Hirata e Uemura (1986), o HTI-286 um análogo sintético do tripeptídeo hemiasterlina, obtido da esponja *Hemiasterella minor* por Loganzo *et al.* (2003), a aplicidina, um análogo do composto didemnina, isolado do tunicato *Aplidium albicans*, e KRN7000 um derivado sintético de um esfingolípídeo isolado de *Agelas mauritanus*, uma espécie de esponja (NEWMAN & CRAGG., 2016).

O ambiente marinho corresponde, provavelmente, à última grande fronteira para a prospecção farmacológica de produtos naturais. Este ambiente, que cobre cerca de 70% da superfície da Terra e compõe mais de 90% do volume de sua crosta, e, segundo especialistas, dotado de ecossistemas, como os recifes de corais ou o assoalho profundo, que apresentam biodiversidade superior à das florestas tropicais (LAM, 2006).

A complexidade do acesso a esse ambiente, principalmente devido às suas profundidades, adiou a sua exploração, escapando do interesse dos cientistas de produtos naturais até os anos 50. Com o avanço das técnicas e o advento dos equipamentos seguros de

mergulho, na década de 70, algas e invertebrados marinhos puderam dar início às suas histórias nas bancadas dos laboratórios de química e farmacologia (FENICAL et al, 2006).

Os estudos iniciais em busca de novos produtos naturais se concentraram, inicialmente, em invertebrados marinhos como ascídias, esponjas, corais, moluscos, briozoários e sedimentos, além das algas. Inúmeros estudos comprovam a importância dos invertebrados marinhos como fonte de novos compostos de interesse e aplicação biomédica. Em diversos casos, a síntese química de compostos bioativos mostrou-se muito difícil de ser obtida racionalmente, devido à complexidade das moléculas. Mais além, não é econômica nem ecologicamente viável de obter estes compostos diretamente dos organismos hospedeiros. Dessa forma, a prospecção de compostos com potencial biomédico a partir de microrganismos surge como uma solução sustentável para a exploração dos recursos marinhos como fonte de novos fármacos (NEWMAN & CRAGG., 2016).

Com o advento dos estudos abrangendo produtos naturais marinhos, foi possível descobrir uma diversidade de alvos moleculares, revelando o potencial farmacológico e terapêutico dessas moléculas, podendo ser, inclusive, aplicadas no tratamento do câncer. Dentre essas moléculas promissoras, algumas já passaram pelas etapas de estudos pré-clínicos e clínicos, e atualmente já estão disponibilizadas para uso clínico em diversos tipos de neoplasias (JIMENEZ et al., 2019). Alguns desses medicamentos merecem ser destacados, como por exemplo: Cytosar® (rabinucleosídeo isolado da esponja *Tethya crypta*, Ara-C), o Yondelis® (alcalóide trabectedina, isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*), Halaven® (mesilato de eribulina, isolado da esponja *Halichondria okadai*), e o Acetris® (que possui o anticorpo anti-CD30 conjugado a um derivado de uma dolastatina, o mesilato de eribulina, família química descoberta em estudos com o molusco *Dolabella auricularia*)(JIMENEZ, WILKE, COSTA-LOTUFO, 2018; WILKE et al., 2020).

Na tentativa de aumentar o arsenal de moléculas com potencial aplicação terapêutica e incorporar sustentabilidade ao processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos de origem marinha, os microrganismos passaram a ser amplamente estudados (FENICAL & JENSEN, 2006). Além disso, os microrganismos marinhos tem se mostrado interessantes fontes para busca por moléculas inéditas com aplicação farmacológica devido à variedade de compostos que podem produzir. Os actinomicetos são bactérias Gram positivas que merecem destaque pela sua alta capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários. Dentre esses, a salinosporamida A, isolada do actinomiceto marinho *Salinispora tropica*, foi o composto que chegou à fase de testes pré-clínicos de forma rápida, onde todo o processo que compreende desde a descoberta até o início dos testes clínicos durou somente três anos. Esse acontecimento deve-se, dentre outros, ao fato desse composto ter sido suprido pela fermentação bacteriana,

corroborando que essa técnica é eficiente para obtenção dos compostos, além de possuir o melhor custo-benefício quando comparada a outras técnicas desenvolvidas (FENICAL et al., 2008).

Diante tudo o que foi exposto anteriormente, fica evidente que os estudos e investimentos na área marinha beneficiam a bioprospecção e aplicação da biodiversidade marinha, bem como a descobertas de diferentes moléculas com potencial anticâncer.

1.3.1 Cromomicinas

As cromomicinas são policetídeos tricíclicos glicosilados pertencentes ao grupo dos ácidos aureólicos, este é constituído por compostos policetídeos aromáticos poliglicosilados que tem como representantes as cromomicinas, mitramicinas, olivomicinas, e duramicinas, como demonstrado na Figura 7 adiante. Estudos anteriores demonstraram que grande parte destes compostos são antibióticos contra bactérias Gram-positivas e antineoplásicos, podendo inibir a proliferação de células tumorais. Desta família, pode-se destacar a mitramicina A e cromomicina A3, sendo a mitramicina A aprovada como fármaco anticâncer na década de 1970. Porém, a utilização de compostos desta família como antineoplásico em seres humanos têm sido limitadas devido à sua alta toxicidade (FERLA et al., 2011; PETTIT et al., 2015).

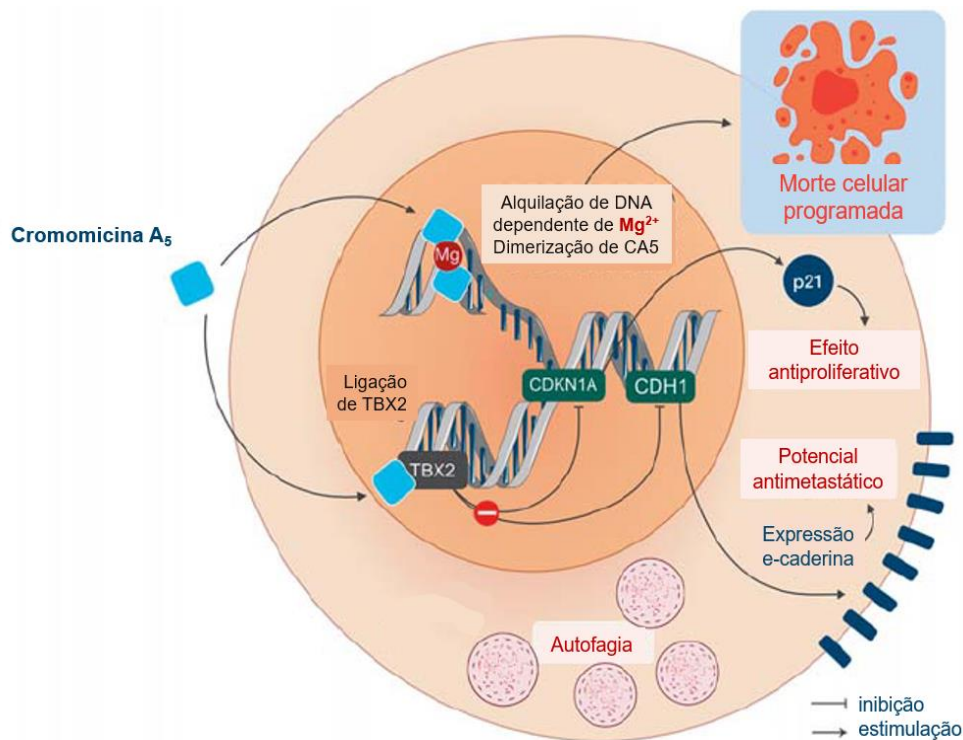
As cromomicinas são produzidas e secretadas por *Streptomyces*, e que podem possuir uma importante atividade antimicrobiana e antitumoral. Dentre as cromomicinas (CAs) já estudadas, a cromomicina A3 (CA3) mostrou possuir uma importante atividade antitumoral. Esta molécula é capaz de ligar-se reversivelmente às fendas menores de DNA, interagindo às regiões de DNA ricas em citosina e guanina (C-G) na presença de íons metálicos como o Mg^{2+} . Essa ligação é capaz de impedir a replicação e a transcrição (CHAKRABARTI; BHATTACHARYYA; DASGUPTA, 2000). Por possuir essa capacidade de se ligar ao material genético, as cromomicinas são utilizadas como marcadores de DNA, devido à sua capacidade e emitir fluorescência (BRAMMER; TONIAZZO; POERSCH, 2015).

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). Além disso, neste mesmo trabalho, foi realizado estudo de citotoxicidade, pelo método de MTT, em um painel contendo 7 linhagens celulares, onde 6 linhagens eram tumorais e uma linhagem era não tumoral. Essas linhagens foram submetidas ao tratamento com CA2 em diferentes tempos, e os resultados mostraram que a CA2 foi capaz de inibir a proliferação celular e causar morte das mesmas em concentrações na escala de nanomolar (nM).

Sahm *et al.* (2020) mostraram pela primeira vez que as cromomicinas CA5 e CA6, isoladas e purificadas a partir do cultivo de *Streptomyces* sp. BRA-384, possuem afinidade pelo

fator de transcrição T - box 2 (TBX2). Este que pode ser considerado um novo alvo da terapia anticâncer, por estar superexpresso em alguns tipos de câncer como rhabdomyosarcoma, de mama, nasofaríngeo, e próstata. O TBX2 está presente em células tumorais como um fator de proliferação, pois faz com que a senescência seja contornada, assim como ele é capaz de limitar os principais reguladores negativos do ciclo celular. Um apanhado geral sobre os mecanismos de ação das cromomicinas é mostrado no trabalho de Wilke *et al.* (2020) como está relatado na figura 5. Uma das abordagens é sobre a capacidade da CA₅ inibir o fator de transcrição TBX2. O que acarreta na indução de efeitos antiproliferativos e anti metastáticos ao permitir a expressão da quinase 1 dependente da ciclina (p21) e da e-caderina, respectivamente.

Figura 5. Modelo esquemático dos mecanismos de ação da cromomicina A₅ isolada de *Streptomyces* sp. BRA-384.



Fonte: Adaptado de Wilke *et al.* (2020).

Todos os achados reforçam o grande potencial que as cromomicinas possuem, principalmente no contexto anticâncer. Novos achados acerca da sua atividade podem trazer novas perspectivas para o seu possível uso como um fármaco ou adjuvante anticâncer, bem como intensificar a importância dos estudos da biodiversidade marinha brasileira.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das principais causas de morte por doença nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. Estima-se que, nas próximas duas décadas cerca de 22 milhões de novos casos ocorrerão no mundo. No Brasil e no mundo, o câncer possui grande relevância pelo perfil epidemiológico, e apesar do considerável arsenal de drogas já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos esquemas de tratamento, altos índices de recidivas, redução da sobrevida dos pacientes e do grande número de efeitos adversos, o que leva a uma contínua busca por novos fármacos (GLOBOCAN, 2020; INCA, 2020).

Dentre os tipos de câncer mais agressivos, o câncer de pele do tipo melanoma se destaca, pois apesar de sua baixa incidência, este tipo de neoplasia maligna possui uma alta letalidade devido à sua grande capacidade de metastizar. Além disso, esse tipo de câncer é praticamente refratário a grande parte dos quimioterápicos disponíveis na clínica (INCA, 2020).

Tanto a quimioterapia quanto a imunoterapia são importantes estratégias para o tratamento de diversos tipos de câncer. A quimioterapia, apesar de poder gerar inúmeros efeitos colaterais em pacientes com câncer, ainda é a modalidade de tratamento mais utilizada, e por vezes, confere um aumento de sobrevida dos pacientes, bem como uma maior taxa de cura (GALLUZZI et al, 2020). Uma estratégia de terapia mais atual e que vem recebendo destaque para o tratamento do câncer, incluindo o melanoma, é a imunoterapia. Os imunoterápicos atuam por diferentes estratégias que tenham a finalidade em comum de gerar uma resposta imunológica antitumoral. Esse tipo de terapia vem se destacando por produzir respostas eficazes, além de possuírem menos efeitos colaterais quando comparados à quimioterapia. Apesar de todas as suas vantagens, o uso de imunoterápicos ainda não foi muito bem difundido devido ao seu alto custo. Sendo assim, é de extrema relevância a busca por novos compostos e fármacos quimioterápicos que tenham efeitos imunogênicos antitumoral, tentando obter respostas mais eficazes, mais duradouras e com menores efeitos colaterais para os pacientes oncológicos (CHEN et al., 2017; YU et al., 2019).

Ainda dentro deste cenário, vale ressaltar que a imunoterapia tem sido a forma mais eficaz de tratamento para pacientes com melanoma metastático e, sendo assim, a indução de MCI apresenta-se como uma estratégia para o desenvolvimento de quimioterápicos para estes tumores, pois além da citotoxicidade necessária em um tratamento para câncer, existe também a capacidade de sensibilização e ativação do sistema imunológico contra as células neoplásicas em questão (QUEIROLO et al., 2019; INCA, 2020).

Apesar de ter seu sucesso terapêutico em tumores mais imunogênicos, como é o caso do melanoma, os inibidores de *checkpoint* imunológicos ainda são amplamente ineficazes em uma parcela de pacientes com tumores que não possuem infiltração de células imunes, que são então denominados tumores frios. Sendo assim, a combinação de inibidores de *checkpoint* imunológicos com outros tipos de terapias pode aumentar a resposta imune antitumoral mesmo em tumores refratários às quimioterapias, isso se o composto for capaz de induzir melhores condições imunológicas no microambiente tumoral (HEINHUIS et al, 2019).

A quimioterapia pode gerar efeitos imunomoduladores que podem ser vantajosos quando associados a um imunoterápico. Sendo assim, a identificação de compostos que sejam capazes de induzir MCI configuram uma importante estratégia para aumentar o poder translacional de estudos pré-clínicos, configurando um alto potencial de melhora das respostas em tratamentos associados com imunoterápicos, além de poder transformar tumores imunologicamente frios em quentes (GALON et al, 2019; QUEIROLO et al., 2019).

Na busca por novos compostos para serem utilizados na terapia do câncer, os produtos naturais marinhos se mostram uma fonte profícua de moléculas com potencial farmacológico, como já é comprovado pelos fármacos em uso clínico, como a trabectedina, citarabina, e pelas moléculas que vem sendo isoladas e testadas para esse fim, como é o caso das moléculas de cromomicinas, que apresentam citotoxicidade como atividade biológica (GUIMARÃES et al., 2014; JIMENEZ et al., 2020; PINTO et al., 2019; WILKE et al., 2020). Nesse contexto, estudos que analisem a possível indução de MCI como aplicação das moléculas derivadas de organismos marinhos podem ser bastante promissores.

Tendo em vista todas as dificuldades apresentadas na correlação entre alvo, estrutura-atividade e ferramentas de bioinformática confiáveis, os estudos que envolvem a detecção de MCI, necessitam de testes que avaliem as alterações fenotípicas, detectando assim os marcadores celulares para MCI *in vitro* e ensaio de vacinação *in vivo*. Mesmo a MCI sendo comprovada de fato com o teste *in vivo* (considerado padrão-ouro), por questões éticas os protocolos de estudo para esse tipo de morte celular é iniciado *in vitro*, onde pode-se verificar a presença dos DAMPs envolvidos no mecanismo de morte celular em modelos celulares (GOMEZ-CADENA et al., 2016; FUSIKOVA et al, 2020).

Baseando-se nos resultados preliminares de Guimarães et al., 2014 e Pinto et al., 2019, a pergunta de partida para o presente estudo foi se as cromomicinas (A₅₋₈) são capazes de induzir a liberação de DAMPs envolvidos na morte celular imunogênica em melanoma metastático. Sendo confirmado o seu potencial indutor de MCI pelas CAs, isso abrirá a possibilidade de utilizá-las como possíveis adjuvantes no tratamento do câncer, incluindo o do tipo melanoma.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a indução de morte celular imunogênica (MCI) por cromomicinas (CA₅₋₈) em melanoma metastático murino.

3.2 Objetivos específicos

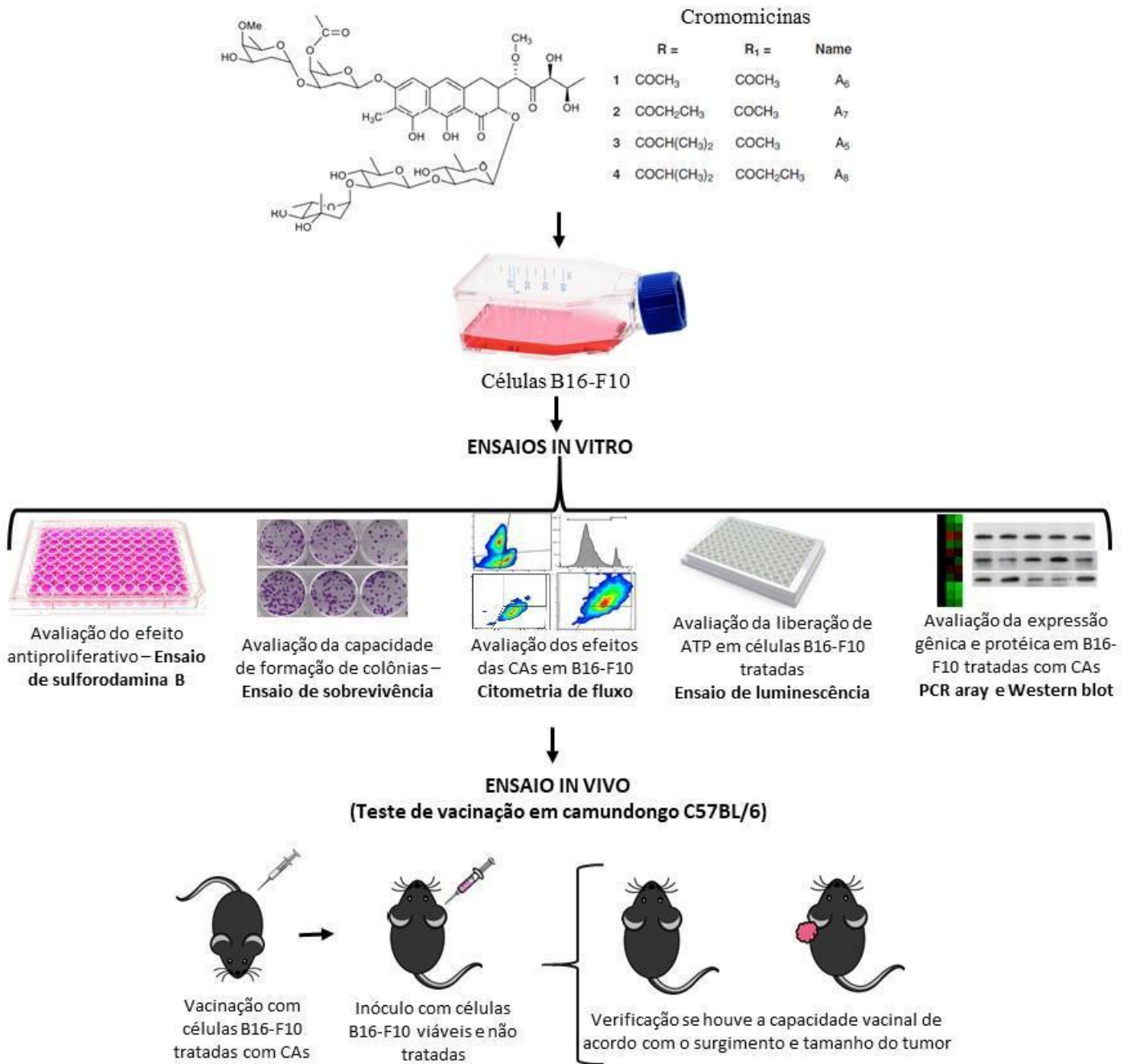
- Avaliar o efeito antiproliferativo *in vitro* de cromomicinas (CAs) sobre células de melanoma metastático murino em linhagem B16-F10;
- Avaliar estresse e morte celular em células B16-F10 incubadas com CAs;
- Avaliar a liberação de padrões moleculares associados a dano típicos de MCI em células B16-F10 incubadas com CAs;
- Avaliar a expressão de genes relacionados à apoptose, autofagia e estresse de retículo em células B16-F10 incubadas com o CAs;
- Avaliar o efeito vacinal em camundongos tratados com células B16-F10 incubadas com pelo menos uma cromomicina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planejamento Experimental

As cromomicinas (CAs), moléculas utilizadas nesse trabalho, foram produzidas pela cepa bacteriana *Streptomyces* sp. BRA-384 e, em seguida, isoladas para serem estudadas (PINTO et al., 2019). A atividade antiproliferativa dessas moléculas foi avaliada utilizando o ensaio da sulforodamina B e o ensaio de sobrevivência em linhagem de células tumorais melanoma metastático murino (B16-F10). Após a identificação da atividade antiproliferativa das CAs, prosseguiu-se com estudos para verificar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade, através dos métodos por citometria de fluxo. Para isso, analisaram-se alterações na morfologia e na integridade da membrana em células tumorais da linhagem B16-F10 incubadas previamente com as amostras por 24 horas. Além disso, foram utilizadas técnicas de citometria de fluxo, *western blot*, *PCR array*, ensaio de luminescência em conjunto, afim de detectar eventos típicos de MCI induzidas por CAs. Para a comprovação do efeito vacinal foi realizado o teste de vacinação *in vivo* (padrão-ouro) em camundongos C57BL/6 para a comprovação do mecanismo de MCI induzido pelas CAs.

Figura 6. Planejamento experimental. Ensaio *in vitro* que foram realizados a fim de verificar os efeitos das cromomicinas em células tumorais de melanoma metastático murino linhagem B16-F10 e ensaio *in vivo* para avaliar o efeito vacinal de células B16-F10 incubadas com cromomicinas.



Fonte: Elaborado pela autora.

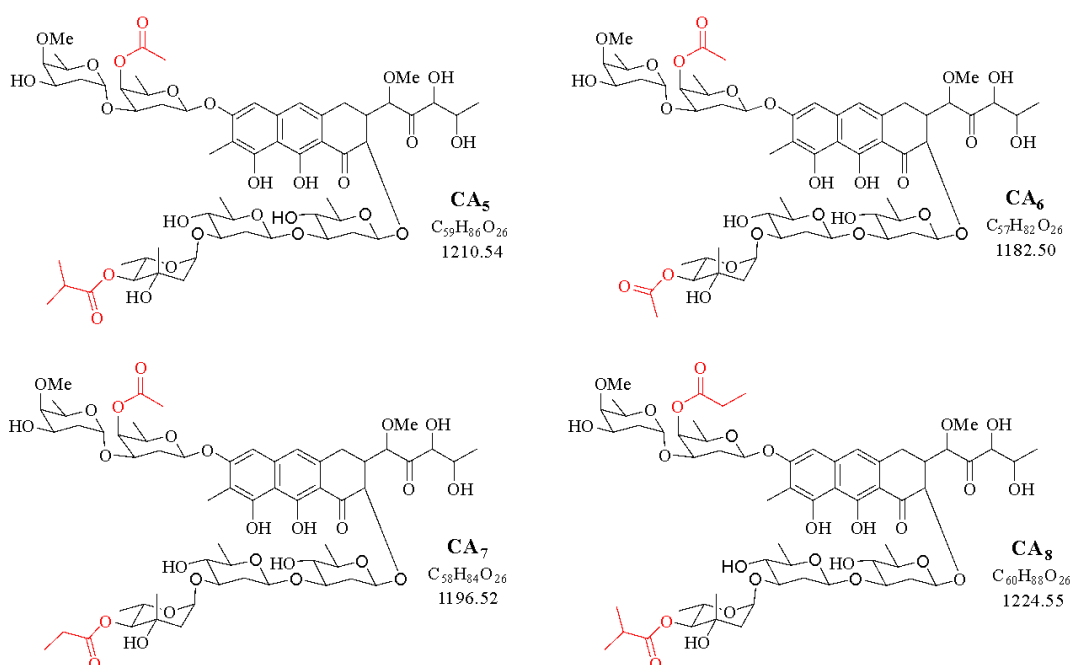
4.2 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

4.2.1 Cromomicinas A₅₋₈

As 4 moléculas utilizadas nesse trabalho, foram produzidas pela cepa bacteriana *Streptomyces* sp. que vive associada ao invertebrado marinho *Palythoa caribaeorum*. Essa cepa bacteriana 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 das CAs foi realizado em colaboração com o pós doutorando Francisco Chagas Pinto, e a professora doutora Otilia Loiola Pessoa, ambos do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM) na Universidade Federal do Ceará. Além disso, um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa desenvolveu métodos de otimização da produção de CAs (Marinho et al, 2021), permitindo que houvesse o fornecimento da quantidade de moléculas para que os testes *in vitro* e *in vivo* pudessem ser realizados. A estrutura molecular das 4 cromomicinas estão representadas com maiores detalhes na Figura 7.

Figura 7. Estrutura molecular representativa das cromomicinas CA₅ a CA₈ isoladas de *Streptomyces* sp. Os compostos 1-4 compartilham a mesma porção aglicona mostrando apenas pequenas diferenças em C-A4 ou C-E4 das cadeias laterais de sacarídeo.



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

4.2.2 Cultivo das células

O melanoma metastático murino (B16-F10) foi a linhagem celular utilizada em todos os experimentos deste estudo. Sendo utilizada para a avaliação da atividade citotóxica, bem como nos demais experimentos necessários para realização deste trabalho. A linhagem celular utilizada foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura DMEM (Gibco)

suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100 µg/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) (Gibco).

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

4.2.3 Ensaio da sulforodamina B

Princípio do método:

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

A configuração do ensaio SRB permite a identificação de três valores principais: concentração média inibitória do crescimento (CI₅₀) quando as células tratadas crescem 50% em relação às células da placa “tempo zero”; concentração inibitória de crescimento total (CIT), quando as células tratadas não crescem em relação às células semeadas na placa “tempo zero”; e concentração letal média (CL₅₀), quando 50% das células morreram em relação à concentração de células observada na placa “tempo zero”.

Para a realização desse ensaio, as células foram plaqueadas 24 horas antes da adição da amostra teste em placas de 96 poços na densidade de 3×10^4 céls/mL.

Em uma análise inicial, a amostra a ser testada foi diluída em dimetilsulfóxido, DMSO 0,4%, e testadas quanto ao seu efeito antiproliferativo em células de melanoma metastático murino (B16-F10), após 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas de incubação. As Cromomicinas (A5-A8) foram testadas em concentrações crescentes de 0,32nM a 1000 nM (diluição de razão 5), e foram incubadas juntamente com a suspensão de células em volume final de 200 µL em estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

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

Após cada tempo de incubação, 4 à 72 horas, o sobrenadante das células foi retirado e as mesmas foram também fixadas com TCA a 10%, sendo então guardadas a uma temperatura de 4°C por no mínimo 1 hora. Após o período de fixação, as placas foram lavadas 5 vezes com água destilada e em seguida esperou a secagem dos poços até que não houvesse umidade aparente. Em seguida adicionou-se 100 µL da solução de SRB a 0,4%, e as placas então foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 30 minutos. Ao término do tempo de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes usando ácido acético a 1% para remover o excesso de SRB que não ficou ligado aos aminoácidos celulares. Já as paredes dos poços foram limpas cuidadosamente para remover qualquer excesso de SRB que pudesse falsear o teste.

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

Análise dos dados:

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

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

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

Se $T < T_0$, o efeito é citotóxico:

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

Onde: T: Absorbância das células incubadas com a amostra, T₀: Absorbância das células da placa tempo zero, CN: Absorbância das células do controle negativo (DMSO).

Para análise de inibição de proliferação celular, os dados normalizados foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios-padrão. Para a análise das amostras testadas em diluição seriada, em triplicatas, um gráfico de absorbância x concentração foi plotado para determinação da inibição do crescimento celular em 50% (CI₅₀) com seu efeito citostático, a inibição do crescimento total (CIT) e seu efeito citotóxico com a concentração letal média (CL₅₀) a partir de interpolação de regressão não-linear no GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0).

4.2.4 Análise de teste de sobrevivência através do ensaio clonogênico

Princípio do método:

O ensaio de sobrevivência avalia a capacidade de uma célula se proliferar indefinidamente, mantendo sua capacidade de proliferação para formar uma colônia. A proliferação de uma única célula em colônia, que pode ser visualizada a olho nu, é a prova de que ela manteve a sua capacidade de se dividir.

Dentro desse contexto, a perda da capacidade reprodutora e a incapacidade de células proliferarem indefinidamente e formarem colônias, podem ser observados no ensaio clonogênico. Isso o torna um método confiável para a avaliação da toxicidade *in vitro*, visto que ele difere de outros testes de viabilidade que mensuram um efeito biológico específico. O crescimento de uma única célula formando uma colônia corada com cristal violeta, que pode ser visualizada inclusive a olho nu, comprova a sua capacidade de se reproduzir (MELCHIOR et al., 2016).

Procedimento experimental:

Para a realização desse teste, células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços, na concentração de 500 células por poço, e contendo 3mL de meio DMEM completo por poço. Após 24h do plaqueamento, as células foram incubadas nas seguintes concentrações: CA₅ (1, 5 e 10nM), CA₆ (10, 50, 250nM), CA₇ (10, 50, 250nM) e CA₈ (20, 100 e 500nM). Como controle positivo, foi utilizada a doxorrubicina a 0,6 µM, enquanto o controle negativo foram células expostas apenas com o veículo (DMSO 0,4%). Após 24h de incubação com as amostras, o meio de cada poço foi trocado por um meio novo, e dessa vez, as moléculas não foram adicionadas. A placa foi mantida em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, e permaneceu em observação por cerca de 6 dias, período em que as primeiras colônias começaram a se aproximar, e o teste precisou ser parado. Para contagem das colônias, o meio de cultura foi removido, os poços lavados 2X com PBS e adicionou-se o corante cristal de violeta (0,5% cristal de violeta em metanol 50% e água destilada) e deixou-se sob agitação por 1h. Em seguida foram feitas 3-5 lavagens com água destilada até total remoção do excesso de corante, as placas em seguida foram deixadas em temperatura ambiente por cerca de 1h para secagem total.

Análise de dados:

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

4.3 Análise dos efeitos de cromomicinas sobre linhagem B16-F10

Para os estudos do mecanismo de ação das cromomicinas (CAs), utilizou-se as células da linhagem de melanoma metastático murino (B16-F10). Para os ensaios descritos a seguir, as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de 3×10^4 células/mL, e incubadas com as CAs por 24h, nas concentrações detalhadas nos tópicos seguintes. O controle negativo constituiu-se de células incubadas com DMSO 0,4% e controle positivo consistiu por células tratadas com Doxorrubicina a 0,6 μ M.

4.3.1 Análise de morfologia celular por microscopia óptica

Para analisar o efeito gerado pelas cromomicinas na morfologia celular de células incubadas, foi utilizada a técnica de microscopia óptica por contraste de fase. Para isso as células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 24 poços nas concentrações de 3×10^4 células/mL. As células foram incubadas com as CAs, nas concentrações: CA₅ (100nM), CA₆ (250nM), CA₇ (250nM) e CA₈ (500nM) por 24h. A análise morfológica foi realizada utilizando o microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM 400; Nikon, modelo Diaphot). As células foram analisadas nos aumentos de 200x.

4.4 Estudo dos efeitos das cromomicinas A₅₋₈ por citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo permite investigar e classificar inúmeras alterações e características de eventos biológicos em células ou outras partículas microscópicas. O citômetro possui um feixe de luz (*laser*) que incide sobre as células, à medida que elas fluem individualmente sob um fluxo hidrodinâmico, permitindo a detecção dos sinais desviados por cada célula. Os detectores são capazes de registrar desvios na dispersão linear (FSC, *Forward Scatter*) ou lateral (SSC, *Side Scatter*) da luz, além de captar a fluorescência emitida pelos marcadores utilizados, classificando as células de partículas com cada evento (GIVAN, 2004). O citômetro de fluxo utilizado nos testes foi o FACSVerse (BD Biosciences).

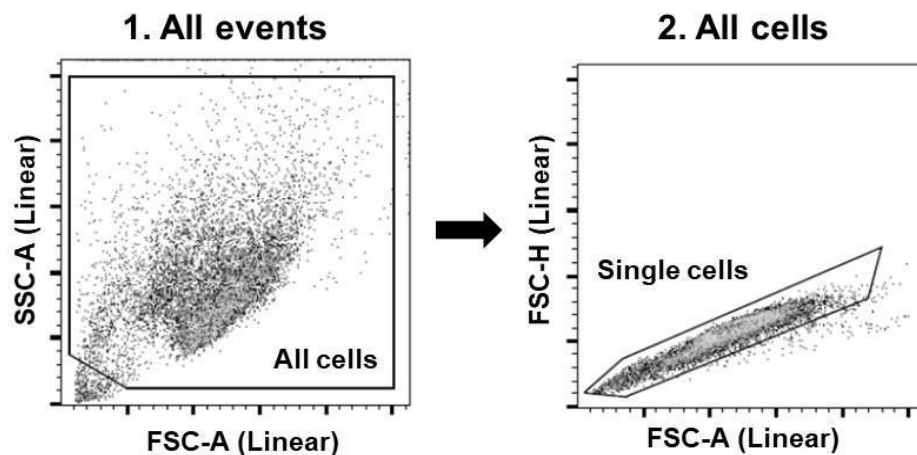
4.4.1 Estratégias de *gates* e análise dos dados

Após a marcação adequada, 10 mil eventos (sem *debris* e *doublets*) foram adquiridos no citômetro de fluxo para avaliação dos testes citados abaixo. Inicialmente foi criado um gráfico de pontos (dot plot) com parâmetros de morfologia (FSC vs SSC) contendo todos os eventos adquiridos pelo citômetro (*all events*) onde foi criada uma região de seleção (*gate*) contendo todas as células adquiridas (*all cells*) de forma a excluir os *debris* e *outliers*. Em um novo

gráfico contendo apenas a população de *all cells* criou-se um *gate* para selecionar os eventos simples (*single cells*) através da plotagem de 2 medidas do parâmetro FSC (Figura 8). Esses gráficos e *gates* (*all cells e single cells*) são comuns pra todos os testes de citometria e a partir de *single cells* que são criados os específicos de cada experimento. Ademais, os dez mil eventos celulares adquiridos foram referentes a população de *single cells* e foram contados de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise.

Os resultados de todos os testes foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star Inc), sendo, então, obtidos os valores em porcentagem das populações ou em intensidade mediana de fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*), dependendo do teste em questão. Para verificação da ocorrência de diferenças entre os diferentes grupos, os dados foram analisados no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0), sendo comparados em relação ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$).

Figura 8. Estratégia de *gates* para citometria de fluxo. Gráficos em formato *dot plot* contendo os *gates* de *all cells* e *single cells* que são comuns de todos os testes realizados por citometria de fluxo e que foram obtidos a partir de parâmetros de morfologia.



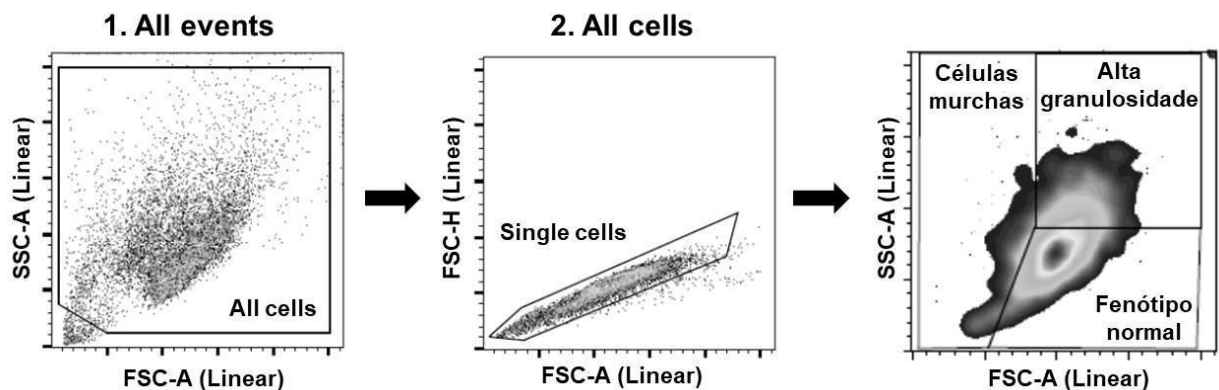
Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.2 Avaliação da morfologia celular por citometria de fluxo

A avaliação da morfologia celular indica os possíveis efeitos que uma molécula pode provocar nas células. As células tumorais B16-F10 incubadas com CAs foram tripsinizadas da placa e repassadas para um microtubo para que a avaliação de alterações morfológicas pudesse ser realizada por citometria. Para essa análise não foi necessária a utilização de fluorocromos,

visto que as características morfológicas podem ser avaliadas a partir da dispersão frontal (FSC), que indica o tamanho ou volume celular, e a dispersão lateral (SSC), correlacionada com a complexidade interna ou granulosidade. Os dados obtidos na citometria de fluxo foram analisados no programa FlowJo como mostrado na figura 9 e a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism obedecendo os testes descritos acima (item 4.4.1).

Figura 9. Estratégia de *gates* para análise da morfologia celular. A partir do *gate* de *single cells* é criado um novo gráfico *dot plot* selecionando os parâmetros de morfologia (FSC vs SSC). Nesse gráfico é feito os *gates* para seleção das populações de células murchas, granulosas e normais. Esses *gates* indicam a % de cada população, que são os valores analisados estatisticamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

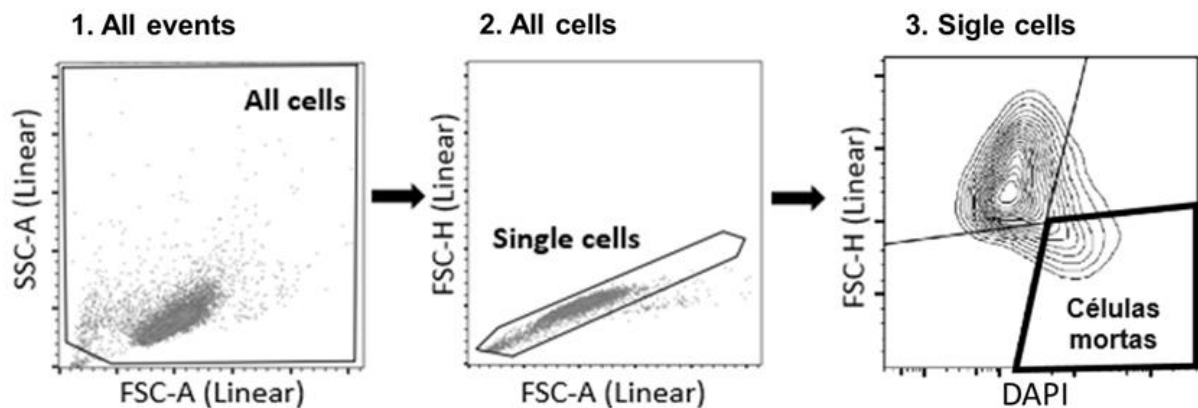
4.4.3 Avaliação da perda da integridade de membrana

As células que estão mortas ou em processo de morte podem perder a integridade da membrana plasmática e dessa forma perdem sua capacidade de permeabilidade seletiva. Para a avaliação da integridade da membrana plasmática foi utilizado o fluorocromo DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) que possui capacidade de se ligar seletivamente ao DNA de fita dupla, formando complexo DAPI-DNA, porém esse fluorocromo só consegue penetrar em células que já estejam com a membrana plasmática rompida, assim, as células cujas membranas estão íntegras não emitem fluorescência. Sendo assim, é possível a identificação de células mortas pela detecção da fluorescência do DAPI (violeta com excitação aproximada de 355 nm e emissão a cerca de 457 nm) (HAMADA, FUGITA, 1983).

Após a preparação das células, o *pellet* obtido foi ressuspenso em 300 μ L de uma solução de DAPI a 2 μ g/mL diluído em PBS. Após 10 minutos de incubação, as células foram lavadas com PBS para retirar o excesso de DAPI e, em seguida, foram analisadas em citômetro de fluxo. A intensidade de emissão de fluorescência correlaciona com a quantidade de células que já estão com a membrana rompida. Posteriormente, os dados obtidos na citometria foram

analisados no programa FlowJo (Figura 10) e a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como indicado anteriormente (item 4.4.1).

Figura 10: Estratégia de *gates* para análise da integridade da membrana celular. A partir do *gate* de *single cells* é criado um novo gráfico de *contour plot* selecionando o filtro correspondente a fluorescência do DAPI. Nesse gráfico é feito o *gate* para seleção da população de células mortas ou com a membrana rompida. Esse *gate* indica a porcentagem de células mortas, que é o valor analisado estatisticamente.



Fonte: Elaborado pela autora

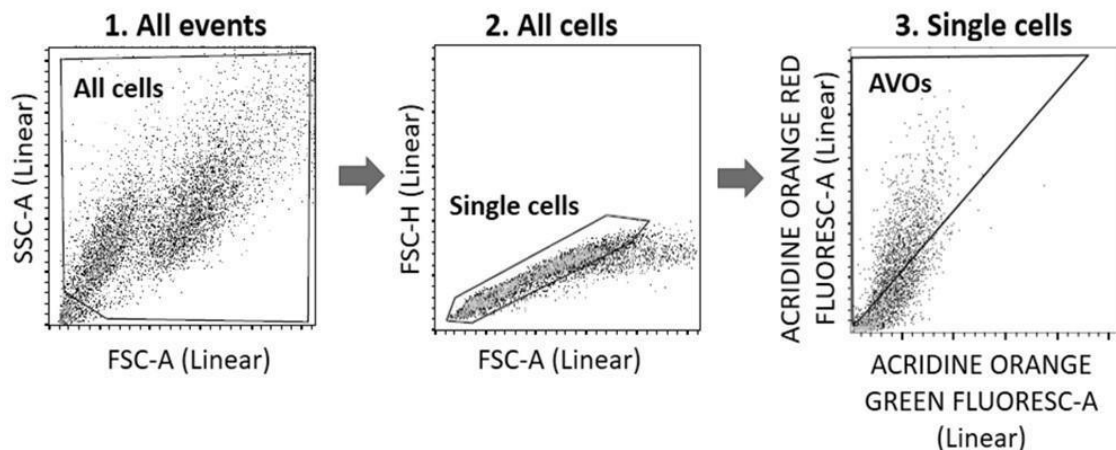
4.4.4 Verificação de vesículas autofágicas por acridina laranja

Laranja de acridina é um corante lisotrópico que em sua forma sem carga é capaz de atravessar livremente os compartimentos celulares e acumular-se em vesículas ácidas de forma dependente de pH. Em meio com pH neutro, o corante laranja de acridina é uma molécula hidrofóbica que tem espectro de emissão de aproximadamente 519 nm, fluorescendo na cor verde. Em locais com pH baixo, como em organelas de vesículas ácidas (AVOs, do inglês *acidic vacuolar organelles*), a laranja de acridina encontra-se em sua forma protonada e fica retida, levando a uma fluorescência na cor avermelhada. Com a análise combinada entre as fluorescências emitidas em verde e vermelho, é possível realizar a detecção de vesículas autofágicas, ou seja, a ocorrência de autofagia (THOME et al., 2016). Como visto anteriormente, a autofagia é um tipo de estresse que está relacionado a liberação de ATP para o meio extracelular no processo de morte celular imunogênica, logo, a confirmação do acontecimento de vesículas autofágicas pode ser um indicativo da liberação de ATP, que deve ser confirmado com outros testes.

Esse teste foi realizado primeiramente incubando as células por 24h com as cromomicinas CA₅ (100nM), CA₆ (250nM), CA₇ (250nM), CA₈ (500nM), Doxorubicina como controle positivo (0,6 uM) e DMSO controle negativo (0,4%). Após a preparação das células, o *pellet* obtido foi ressuspenso em 300 µL de uma solução de acridina laranja a 1 µg/mL diluído

em PBS. Após 15 minutos de incubação no escuro, a 37°C, as amostras foram lavadas com PBS para retirar o excesso de acridina laranja e, em seguida, foram analisadas em citômetro de fluxo. A intensidade de emissão de fluorescência correlaciona com a quantidade de vesículas autofágicas presentes nas células. Os dados obtidos foram analisados no software flowjo (Figura 11), e posteriormente, os dados obtidos na citometria foram analisados no programa FlowJo e a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism.

Figura 11. Estratégia de *gates* para análise de vesículas autofágicas. Foi criado um *gate* a partir do *gate* de *single cells* para verificar as células que apresentavam o aumento de *Acidic Vesicular Organelles (AVOs)* a partir da fluorescência da Acridina laranja (com as fluorescência verde vs vermelho). As células que apresentam alteração de fluorescência e ficaram dentro do espaço do *gate* de AVOs foram consideradas como formadoras de vesículas autofágicas. Os valores das quantidades de células que estavam dentro do *gate* de AVOs foram analisados no Prism para a comparação de diferenças entre os grupos.



4.4.5 Avaliação da externalização da CRT na superfície da membrana plasmática

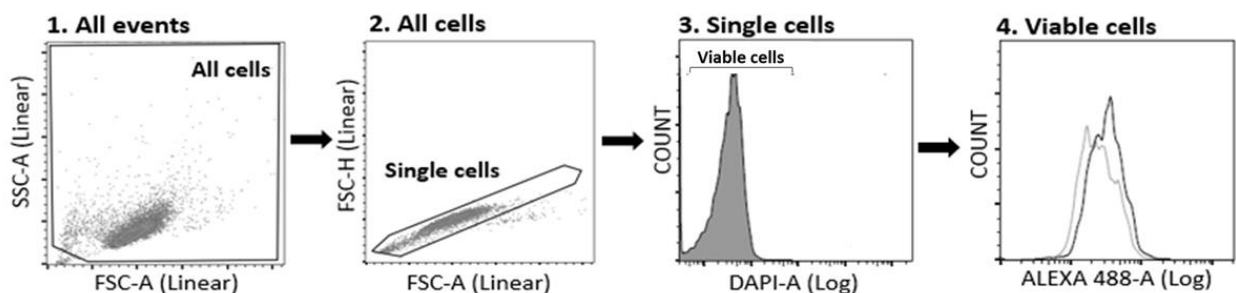
A externalização da chaperona CRT na superfície da membrana plasmática ocorre como uma resposta ao estresse de RE, e é um evento precoce na MCI. A CRT é quando presente na superfície da membrana plasmática, funciona como um sinal “*eat me*” para células fagocíticas (GALLUZZI et al, 2017).

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

verificar apenas a CRT que foi externalizada na membrana plasmática, ou seja, apenas em células que ainda estão com a membrana íntegra.

Para esse teste as células foram fixadas em paraformoldeído 0,25% por 5 minutos, lavadas com PBS e incubadas primeiramente com o anti-CRT (diluição 1:800) por 40 minutos, no escuro e em gelo. Posteriormente, essas células foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (diluição 1:400) por 40 minutos, no escuro e no gelo. Nos 5 minutos finais de incubação foi adicionado o DAPI em uma concentração de 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$. Essas células, então, foram centrifugadas e ressuspensas em tampão FACs para aquisição por citometria de fluxo. Os dados obtidos foram analisados no software flowjo (Figura 12) e, posteriormente, a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como descrito acima (item 4.4.1). No caso desse experimento, a estatística foi realizada utilizando os valores de MFI do Alexa Fluor 488.

Figura 12. Estratégia de *gates* para análise da externalização da CRT. Foi criado um gráfico de histograma a partir do *gate* de *single cells* para verificar as células viáveis a partir da fluorescência do DAPI, selecionando essa população a partir do *gate* de *viable cells*. Novamente um novo gráfico de histograma foi criado a partir do *gate* de *viable cells* para verificar a externalização da CRT a partir da fluorescência do fluorocromo Alexa Fluor 488. O MFI obtido nesse último gráfico corresponde aos valores analisados no Prisma para a comparação de diferenças entre os grupos.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.6 Avaliação da liberação do HMGB1

O HMGB1 é uma proteína nuclear, e sua liberação é um dos eventos necessários para que a MCI ocorra (KEEP et al., 2014). Para verificar sua liberação através da citometria de fluxo é necessário permeabilizar a membrana, para permitir a entrada e ligação do anticorpo secundário com o HMGB1.

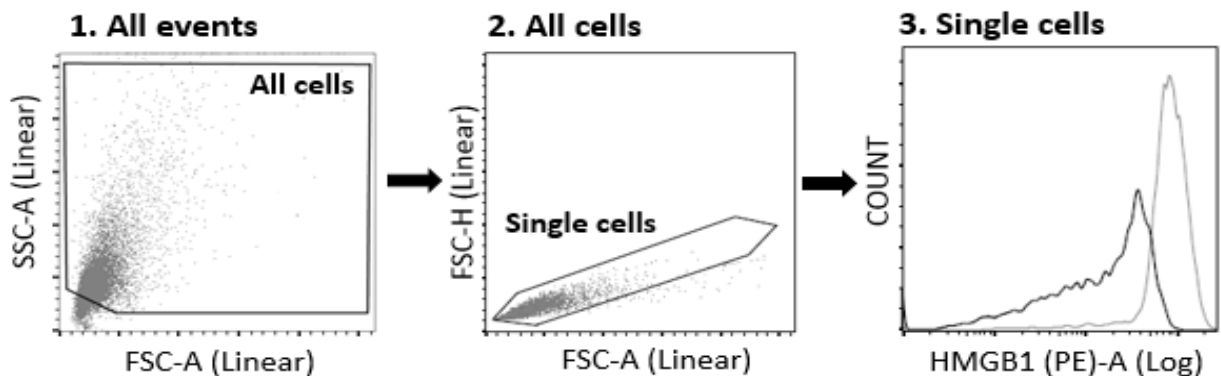
Se o HMGB1 estiver sendo liberado do núcleo, o anticorpo já não possui tanto substrato para se ligar e, desse modo, a fluorescência do PE conjugado ao anticorpo se torna menos intensa. Em termos de citometria de fluxo, se as cromomicinas forem capazes de causar a

liberação do HMGB1 a fluorescência do PE nesse grupo deve ser menor do que no grupo do controle negativo.

O teste para verificação do HMGB1 também consiste do princípio de um anticorpo que se liga a essa proteína e é conjugado com o fluorocromo ficoeritrina (PE, do inglês *phycoerythrin*) (PE anti-HMGB1; Biolegend), que tem fluorescência amarela com espectro de excitação de 564 nm e emissão máxima cerca de 574 nm e floresce quando ocorre a ligação do anticorpo com essa proteína.

Inicialmente as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o *pellet* obtido foi ressuspensionado e submetido a fixação em uma solução de paraformaldeído 0,25%. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com o detergente Triton-X 100 0,1% por 5 minutos. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas e incubadas com o PE anti-HMGB1 (diluição 1:100) por 40 min, no escuro e em gelo. Após todo esse processo, as células foram centrifugadas e ressuspensionadas em 300 μ L de tampão FACs para serem adquiridas no citômetro. Os dados obtidos são analisados no programa Flowjo (Figura 16) e, posteriormente, a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como descrito acima (item 4.4.1). Para esse experimento, assim como no teste para verificação da externalização da CRT, os testes estatísticos para comparação entre os grupos foram realizados utilizando os valores de MFI do PE.

Figura 16. Estratégia de *gates* para análise da liberação do HMGB1. A partir de *single cells* foi criado um gráfico de histograma selecionando o filtro para fluorescência do PE para verificar a liberação do HMGB1, de modo, que a diminuição da intensidade da fluorescência do grupo teste comparado ao grupo controle representa a liberação do HMGB1. O MFI da fluorescência do PE obtido nesse último gráfico corresponde aos valores analisados no prisma para a comparação de diferenças entre os grupos.

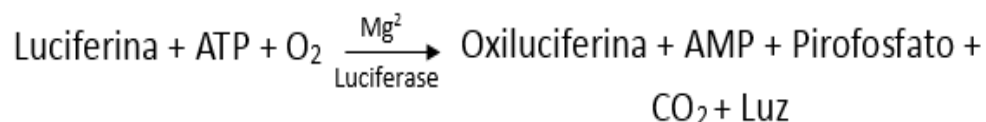


Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Quantificação de ATP por kit de luminescência

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

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



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

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

4.6 Construção de index para escolha da CA com melhor perfil indutor de MCI

Após a análise de todos os resultados obtidos com os testes anteriores, foi realizado um índice de imunogenicidade (Index – IndImunnog) que pode representar qual a molécula obteve maior relevância biológica no processo de MCI. Logo, esse índice foi utilizado para direcionar a escolha das moléculas que apresentaram uma melhor capacidade indutora de MCI. Após a

escolha das moléculas, prosseguiu-se com novos testes para continuar o rastreamento de outros DAMPs típicos de MCI.

4.7 Estudo dos efeitos das CAs selecionadas no Index - citometria de fluxo

Os testes de citometria realizados a seguir seguiram o mesmo padrão de incubação dos testes de citometria mencionados anteriormente, mantendo as mesmas concentrações referente a cada cromomicina, tempo de incubação, e estratégias de *gate* detalhadas no item 4.4 e 4.4.1.

4.7.1 Avaliação da externalização da ERp57 na superfície da membrana plasmática

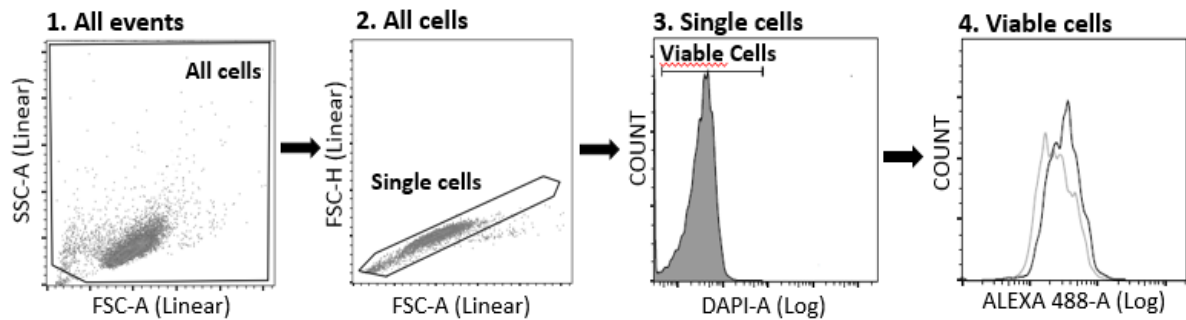
A externalização de CRT, que ocorre durante estágio inicial da MCI, é regulada pela proteína ERp57. Tanto a CRT quanto a ERp57 estão localizadas no retículo endoplasmático e são externalizadas quando as células sofrem estresse de retículo (GALLUZZI et al, 2017).

O anticorpo utilizado nesse teste não é conjugado, de forma que se usou um anticorpo secundário, o Alexa Fluor 488 que emite fluorescência verde a 499-520 nm, para ser possível a visualização da ligação do anticorpo com a CRT. Também foi utilizado o fluorocromo DAPI que possui fluorescência violeta a cerca de 457 nm e, como citado anteriormente, é utilizado para avaliação da integridade da membrana plasmática. Tal função é necessária para esse teste pois a intenção é verificar apenas a ERp57 que foi co-externalizada na membrana plasmática, ou seja, apenas em células que ainda estão com a membrana íntegra.

Para esse teste as células foram fixadas em paraformoldeído 0,25% por 5 minutos, lavadas com PBS e incubadas primeiramente com o anti-ERp57 (A484) (diluição 1:100) por 40 minutos, no escuro e em gelo. Posteriormente, essas células foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (diluição 1:400) por 40 minutos, no escuro e no gelo. Nos 5 minutos finais de incubação foi adicionado o DAPI em uma concentração de 2 μ M/mL. Essas células, então, foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão FACs para aquisição por citometria de fluxo. Os dados obtidos foram analisados no software flowjo (Figura 13) e, posteriormente, a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como descrito acima (item 4.4.1). No caso desse experimento, a estatística foi realizada utilizando os valores de MFI do Alexa Fluor 488.

Figura 13. Estratégia de *gates* para análise da externalização da ERp57. Foi criado um gráfico de histograma a partir do *gate* de *single cells* para verificar as células viáveis a partir da fluorescência do DAPI, selecionando essa população a partir do *gate* de *viable cells*. Novamente um novo gráfico de histograma foi criado a partir do *gate* de *viable cells* para verificar a externalização da ERp57 a partir da fluorescência do fluorocromo Alexa Fluor 488.

O MFI obtido nesse último gráfico corresponde aos valores analisados no Prisma para a comparação de diferenças entre os grupos.



Fonte: Elaborado pela autora.

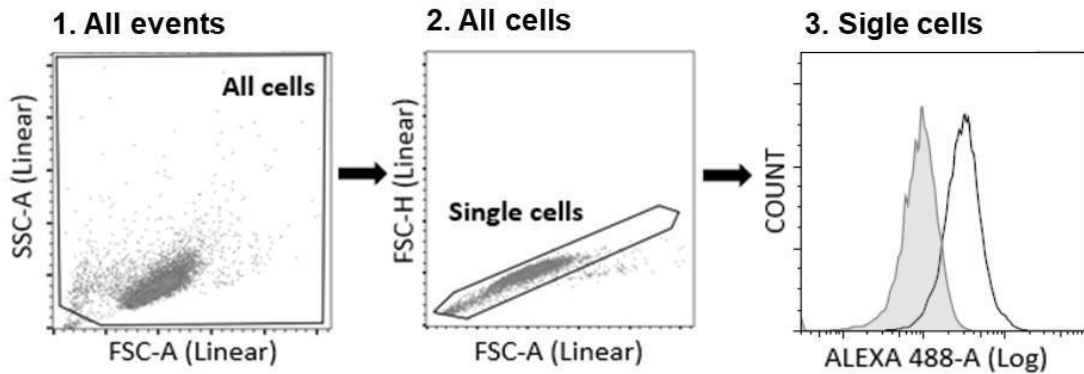
4.7.2 Avaliação da fosforilação de eIF2alfa (Ser51)

Dentre os principais eventos que envolvem a MCI destaca-se a fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica 2 (eIF2 α). Essa fosforilação de eIF2 α é necessária para a exposição pré-apoptótica da calreticulina chaperona ER (CALR) na superfície da célula e o seu aumento fornece um parâmetro válido para monitorar a MCI (KEPP et al, 2014).

Esse anticorpo não é conjugado, de forma que se usou um anticorpo secundário, o Alexa Fluor 488 que emite fluorescência verde a 499-520 nm, para ser possível a visualização da ligação do anticorpo com a Phospho-eIF2alfa.

Inicialmente as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o *pellet* obtido foi ressuspendido e submetido a fixação em uma solução de paraformaldeído 0,25%. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com o detergente Triton-X 100 0,1% por 5 minutos. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas e incubadas com o Phospho-eIF2alfa (Ser51) na diluição (1:100) por 40 min, no escuro e em gelo. Após todo esse processo, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 300 μ L de tampão FACs para serem adquiridas no citômetro. Os dados obtidos são analisados no programa Flowjo (Figura 14) e, posteriormente, a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como descrito acima (item 4.4.1). Os testes estatísticos para comparação entre os grupos foram realizados utilizando os valores de MFI do Alexa 488.

Figura 14. Estratégia de *gates* para análise da fosforilação de Phospho-eIF2alfa. Foi criado um gráfico de histograma a partir do *gate* de *single cells* para verificar as células que apresentaram fosforilação de eIF2alfa, indicada pelo aumento da fluorescência do fluorocromo Alexa Fluor 488. O MFI obtido a partir desse último gráfico foi utilizado para análise no Prisma para a comparação de diferenças entre os grupos.



Fonte: Elaborado pela autora.

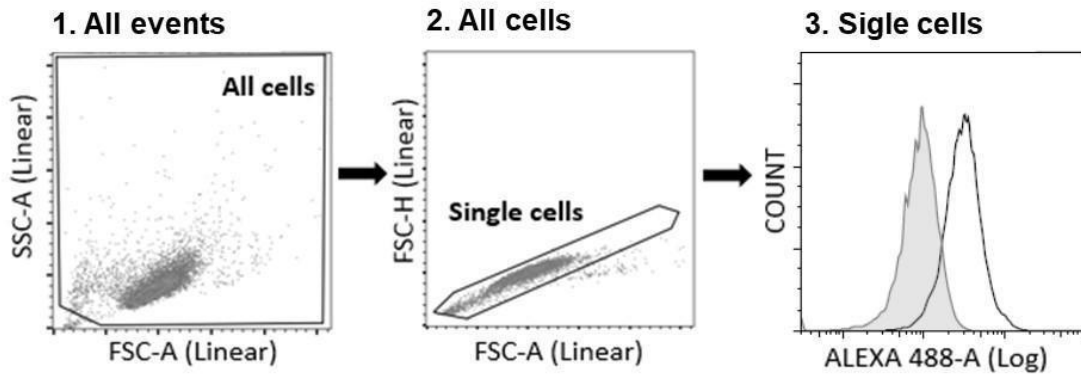
4.7.3 Avaliação de eIF2 α (Ser51)

Em geral, os indutores de morte celular imunogênica (MCI) desencadeiam a fosforilação de eIF2 α sem qualquer ativação do outro braços do estresse ER. Esta resposta ao estresse centrado em eIF2 α promove a translocação de calreticulina (CRT) do ER para a membrana plasmática, onde atua como um sinal de "eat me" para células dendríticas (CDs) (HUMEAU et al, 2020).

O anticorpo utilizado nesse teste não é conjugado, de forma que se usou um anticorpo secundário, o Alexa Fluor 488 que emite fluorescência verde a 499-520 nm, para ser possível a visualização da ligação do anticorpo com o eIF2 α .

Inicialmente as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o *pellet* obtido foi ressuscitado e submetido a fixação em uma solução de paraformaldeído 0,25%. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com o detergente Triton-X 100 0,1% por 5 minutos. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas e incubadas com o anti-eIF2 α (Ser51) na diluição (1:100) por 40 min, no escuro e em gelo. Após todo esse processo, as células foram centrifugadas e ressuscitadas em 300 μ L de tampão FACs para serem adquiridas no citômetro. Os dados obtidos são analisados no programa Flowjo (Figura 15) e, posteriormente, a análise estatística foi realizada no GraphPad Prism como descrito acima (item 4.4.1). Os testes estatísticos para comparação entre os grupos foram realizados utilizando os valores de MFI do Alexa 488.

Figura 15. Estratégia de *gates* para análise da avaliação de eIF2 α . Foi criado um gráfico de histograma a partir do *gate* de *single cells* para verificar as células que apresentaram o aumento da detecção eIF2 α , indicada pelo aumento da fluorescência do fluorocromo Alexa Fluor 488. O MFI obtido a partir desse último gráfico foi utilizado para análise no Prisma para a comparação de diferenças entre os grupos.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.8 RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)

As células B16-F10 foram semeadas em placas de cultura de células (90x15 mm) e incubadas com DMSO 0,05%, cromomicina CA₅ (0,1 μM) ou doxorrubicina (0,6 μM) por 24 h. O RNA total foi obtido usando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific), e o cDNA foi sintetizado a partir de 1 μg de RNA usando um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific). A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada usando um sistema de PCR em tempo real QuantStudio 3 em conjunto com um sistema SybrGreen (Thermo Fisher Scientific) em conjunto com um sistema SybrGreen para a expressão de genes relacionados a estresse de retículo (Atf4, Atf6, Carl, Hspa4, Hspa5), a autofagia (Atg5, Atg7, Sqstm1, Becn1) e apoptose (Bcl2, Bak1, Bad, Bax). Actb e Hprt1 foram usados como genes de referência. Um negativo 'No Template Control' foi incluído para cada par de primer. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os valores de quantificação relativa foram calculados usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O mapa de calor foi construído usando o software Multiple Experimental Viewer (MeV) 4.9.0 (SAEED et al., 2003). A análise da rede foi realizada usando genes modulados por grupos Dox ou CA₅ usando a ferramenta GeneMANIA (WARDE-FARLEY et al., 2010).

4.9 Análise de Western blotting

Inicialmente as células B16-F10 foram semeadas em placas de cultura de células (90 x 15 mm) e incubadas com DMSO 0,05%, cromomicina CA₅ (100 nM) ou doxorrubicina (0,6 μM) por 24h.

A extração de proteína total foi realizada usando um tampão contendo Tris 100 mM (pH 7,6), Triton X-100 a 1%, NaCl 150 mM, PMSF 2 mM, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e EDTA 4 mM. Quantidades iguais de proteína foram usadas a partir de

extratos totais seguidos por SDS-PAGE e análise de Western blot com os anticorpos: contra PARP1 total e clivada (# 9542), LC3BI / II (# 2775), e A α -tubulina (# 2144) foi obtida na Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). O anticorpo contra γ -H2AX (p-Histona H2A.X S139; sc-101696) foi obtido na Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). A ligação do anticorpo foi revelada usando um sistema de substrato SuperSignalTM West Dura Extended Duration (Thermo Fisher Scientific) e um sistema de documento em gel G: BOX Chemi XX6 (Syngene, Cambridge, UK). Após revelação e captura de imagens, foram obtidos os valores referentes para cada banda de cada amostra testada. Dados numéricos referentes ao valores obtidos pela densidade relativa.

4.10 Teste de vacinação para avaliar capacidade imunogênica da CA5 *in vivo*

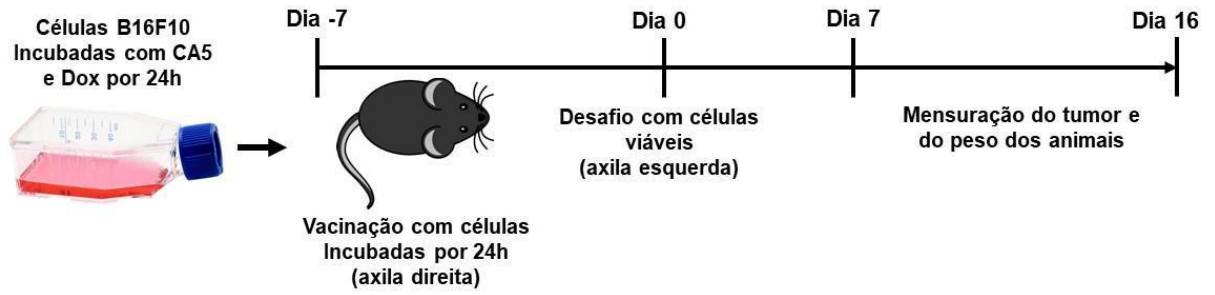
O teste de vacinação é considerado padrão ouro para a comprovação de que a estimulação do sistema imunológico e o efeito vacinal estão de fato acontecendo nos animais testados. Apesar dos ensaios *in vitro* disponíveis para estudo de morte celular imunogênica, apenas ensaios de vacinação *in vivo* são 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 pela molécula testada são capazes de liberar os DAMPs e, dessa forma, estimulam o sistema imunológico do animal para produção de anticorpos contra os antígenos dessas células tumorais, impedindo ou reduzindo o surgimento de tumores após inoculação de células B16-F10 viáveis.

Para a realização desse teste (modelo singênico), foram utilizadas células da linhagem de melanoma metastático murino B16-F10, e os animais utilizados foram camundongos *Mus musculus* C57BL/6 fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas oriundos do biotério da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Ceará, com água e ração *ad libidum*, com ciclo claro/escuro de 12 horas. O manejo dos animais seguiu todos os princípios éticos de experimentação animal para amenizar o sofrimento destes Projeto aprovado CEUA, N° 7270010621.

Para o teste de vacinação, as células B16-F10 foram semeadas em placas de cultura circulares na concentração de 3×10^4 células/mL. Cada placa continha 8mL de meio DMEM suplementado com SFB inativado, após 24 horas essas células foram incubadas com: controle negativo: PBS, controle positivo: doxorubicina ($0,6\mu\text{M}$) e cromomicina A (100nM). A soltura das células foi realizada a frio, usando um *cell scraper*. Em seguida as células foram lavadas 3X com PBS gelado, e centrifugadas a uma temperatura de 4°C , 1500rpm, por 5 minutos para a remoção e excesso de moléculas e quimioterápico indutor de MCI (doxorubicina), e em seguida foram contadas para posterior vacinação.

Para a vacinação: dia -7, foi realizada em camundongos black C57BL/6 fêmeas, entre 7 e 8 semanas de vida. Após lavadas e contadas, as células B16-F10 de cada grupo foram inoculadas. O inóculo consistiu de 180 mil células, estando estas ressuspensas em 200uL de PBS e esse volume foi inoculado de forma sub-cutânea na axila direita do respectivo animal. O Desafio: no dia chamado de zero (dia 0), foi realizado uma semana após a vacinação, onde as células B16-F10 sem tratamento (viáveis) foram inoculadas na axila esquerda dos animais. Para o desafio foram inoculadas 100 mil células por animal de forma subcutânea, sendo ressuspensas em um volume de 200uL de PBS. As medições dos tumores foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital, e o volume tumoral foi calculado pela fórmula do volume do tumor = $d^2 \times D/2$, onde “D” representa o maior diâmetro do tumor e “d” o menor diâmetro do tumor (*Institutional Animal Care & Use Committee*, 2016). Foi realizado o acompanhamento dos animais para verificar o surgimento de tumores, peso dos animais e sobrevivência dos mesmos. O teste de vacinação foi realizado segundo Gomez-Cadena, 2016 com modificações, como representado na figura 17 a seguir.

Figura 17. Teste de vacinação com células incubadas com CA₅ 100nM. As células B16F10 foram incubadas por 24h com CA₅ (100nM), Dox (0,6μM). $1,8 \times 10^5$ células pré-incubadas com CA₅ (100nM) e Dox (0,6μM) foram injetadas via sub-cutânea na axila direita dos animais. 7 dias após a vacinação os camundongos foram desafiados com 1×10^5 células B16F10 vivas na axila esquerda dos animais. Incluímos um grupo adicional que não recebeu vacinação, mas apenas células B16F10 vivas como controle de crescimento tumoral para um total de 3 grupos de 8 camundongos cada. A evolução do tumor foi monitorada a cada 2 dias em um total de 16 dias.



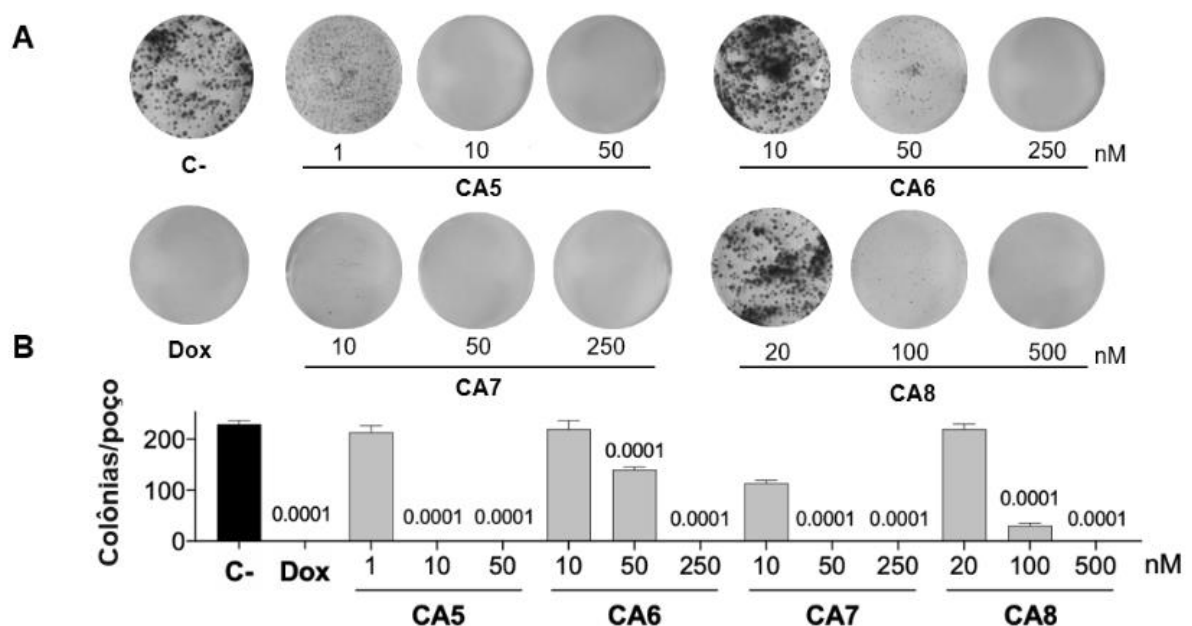
Fonte: Adaptado de Gomez-Cadena, 2016.

Após a avaliação do perfil antiproliferativo das CAs em diferentes concentrações e tempos através do ensaio do SRB, mais estudos eram necessários para a avaliação dos possíveis mecanismos de ação das moléculas. Para isso prosseguiu-se com o teste de sobrevivência.

5.2 Avaliação de sobrevivência através do ensaio clonogênico

Os resultados obtidos no ensaio de sobrevivência são mostrados na figura 19. Observou-se que após os 6 dias de incubação, as cromomicinas foram capazes de impedir a capacidade formadora de colônias das células B16-F10 em determinadas concentrações testadas. A partir da concentração 10 nM foi verificado que a CA₅ foi capaz de impedir a capacidade das células formarem colônias. O mesmo ocorreu com as demais cromomicinas, porém a partir de concentrações diferentes (CA₆ a partir de 250nM, CA₇ a partir de 50nM e a CA₈ na concentração de 500nM). Não houve crescimento de colônias no grupo do controle positivo (Dox 0,6µM). Como esperado, as células do controle negativo (DMSO 0,4%) mantiveram sua capacidade formadora de colônia. Vale ressaltar que, nos poços onde não houve o aparecimento de colônias, também não apresentaram células remanescentes em senescência.

Figura 19. Avaliação da sobrevivência de células tumorais *in vitro* através do ensaio clonogênico. **A)** Poços de placa de cultura com células B16-F10 incubadas por 6 dias. Grupos: dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-), doxorubicina a 0,6 µM (DOX) como controle positivo, e CA₅ (1, 5 e 10nM), CA₆ (10, 50 e 250nM), CA₇ (10, 50 e 250nM) e CA₈ (20, 100 e 500nM). **B)** Gráficos com o número de colônias relativo aos poços com células incubadas com os grupos teste.



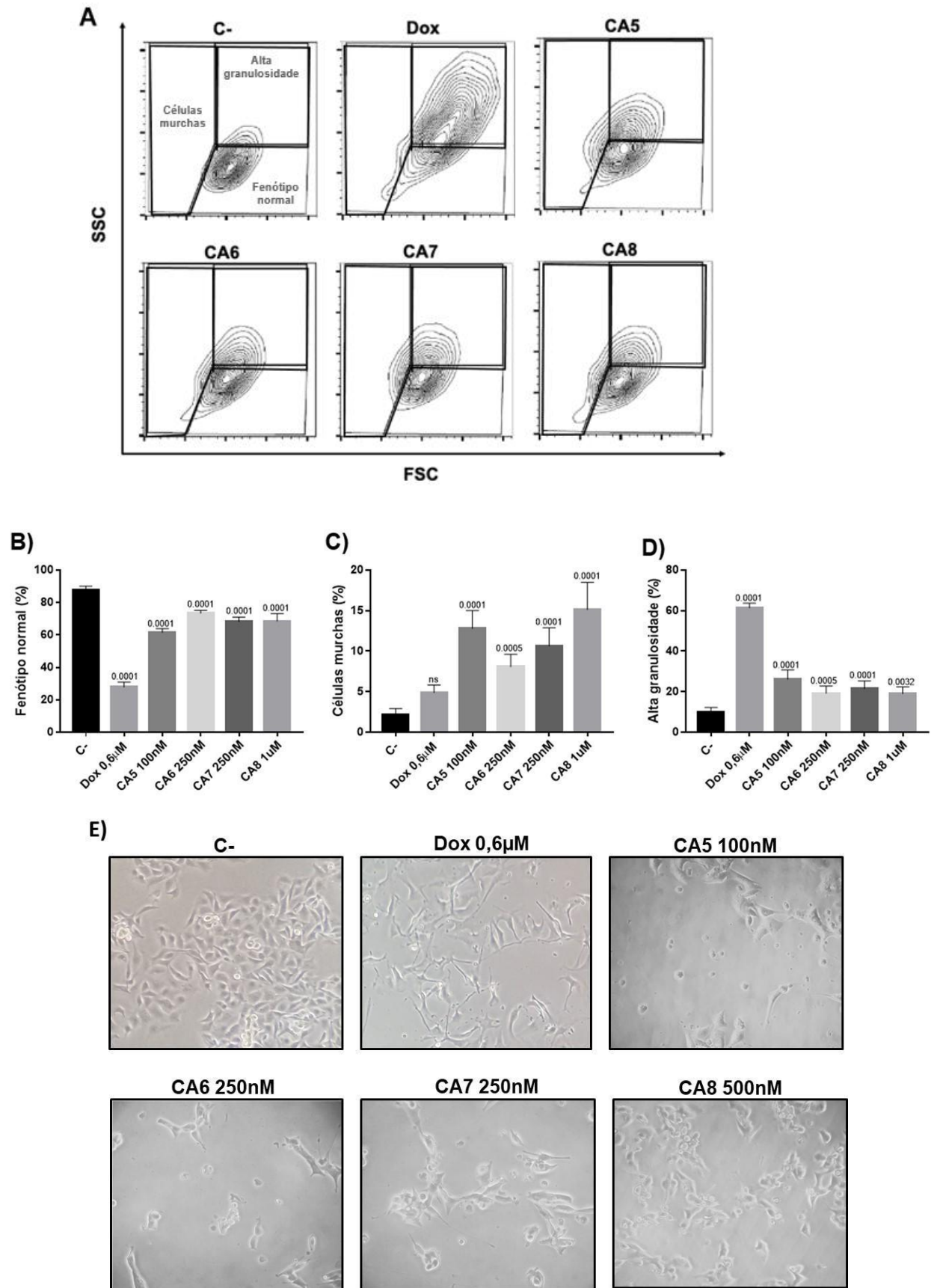
5.3 Avaliação dos efeitos das cromomicinas em células B16-F10

5.3.1 Alterações na morfologia celular

A apoptose é o mecanismo mais conhecido de morte celular programada. Vários fármacos possuem a capacidade de gerar morte por apoptose através da via intrínseca, que envolve a liberação de fatores mitocondriais pró-apoptóticos, ativação de caspases e clivagem de componentes celulares por essas proteases (FULDA et al, 2006). As células que estão em processo de apoptose inicial podem apresentar alterações morfológicas tais como o encolhimento celular (ELMORE, 2007). Através do teste de microscopia óptica, observamos que as CAs foram capazes de gerar um redução do tamanho celular, como demonstrado na (Figura 20 E), e através dos testes de citometria, observamos o aumento do número de células mortas, como mostrado na (Figura 20A).

Todas as cromomicinas testadas provocaram alterações morfológicas como diminuição de tamanho celular e aumento de granulosidade, nas células B16-F10 incubadas com a amostra por 24 horas quando comparado ao controle negativo. O controle positivo também provocou as mesmas alterações celulares, aumentando a granulosidade e reduzindo o tamanho celular (Figura 20). Posteriormente, outros testes complementares foram realizados para uma maior confiabilidade dos dados.

Figura 20. Avaliação da morfologia celular de células da linhagem B16-F10. **A.** Morfologia das células B16-F10 incubadas por 24h com cromomicinas CA₅ (100nM), CA₆ (250nM), CA₇ (250nM) e CA₈ (500nM), doxorubicina a 0,6 µM (Dox) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-). **B.** Percentual de células com fenótipo normal. **C.** Percentual de células murchas. **D.** Percentual de células com alta granulosidade. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média ± D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste. **E.** imagens por microscopia óptica (contraste de fase) evidenciando as alterações morfológicas de células B16-F10 incubadas com as mesmas concentrações citadas anteriormente. Cromomicinas (CA₅₋₈), doxorubicina (DOX) como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO 0,4%) como controle negativo.

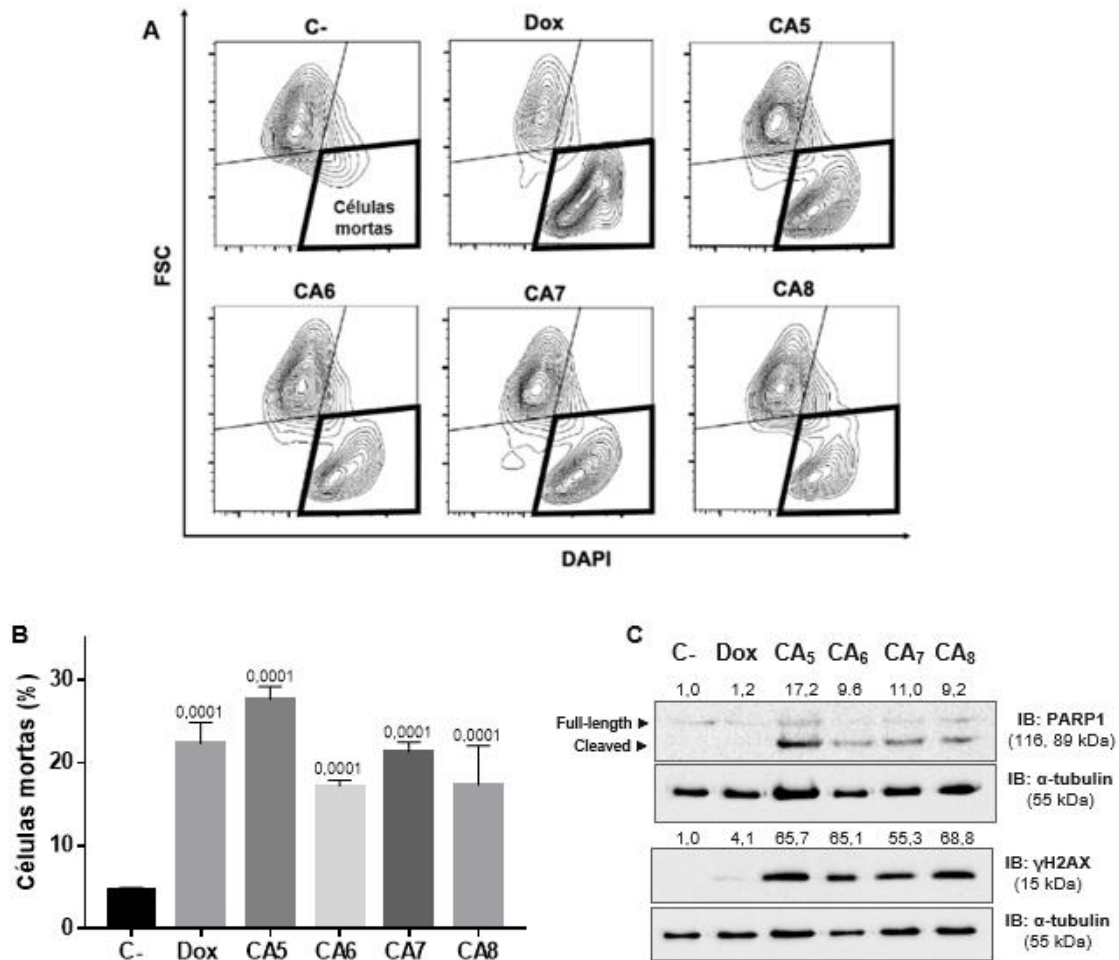


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.2 Avaliação da integridade de membrana celular

Um marcador amplamente utilizado para detecção de apoptose é verificar a clivagem de PARP-1. Todas as cromomicinas induziram a clivagem de PARP-1, com destaque para a CA5, como mostrado na (Figura 21 C). Já a apoptose tardia, que é caracterizada por fragmentação nuclear e celular (TEWARI, et al, 1995), foi confirmada através de WB, onde observamos o aumento de γ H2AX, um importante marcador de dano de DNA (NOUBISSI et al, 2021). Todas as cromomicinas induziram um aumento da expressão de γ H2AX (Figura 21 C). Em relação a integridade da membrana plasmática, que permite a informação sobre as células que estão viáveis ou mortas, pôde-se observar um aumento no número de células mortas que foram incubadas com as CA5-8, em todas as concentrações testadas, e com a Dox quando comparado com o controle negativo. Como mostrado na figura 21A.

Figura 21. Avaliação da integridade de membrana de células da linhagem B16-F10. **A.** Integridade de membrana das células B16-F10 incubadas por 24h com cromomicinas CA5 (100nM), CA6 (250nM), CA7 (250nM) e CA8 (500nM), doxorubicina (0,6 μ M) como controle positivo, e com dimetilsulfóxido (0,4%) como controle negativo (C-). **B.** Percentual de células com a membrana rompida. **C.** Expressão de PARP1 clivada e H2AX obtido por Western blot. Os valores associados às proteínas de teste foram normalizados para α -tubulina padrão para a medida de expressão relativa. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste. Cromomicinas (CAs), doxorubicina (Dox) como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO 0,4%) como controle negativo.



Fonte: Elaborado pela autora.

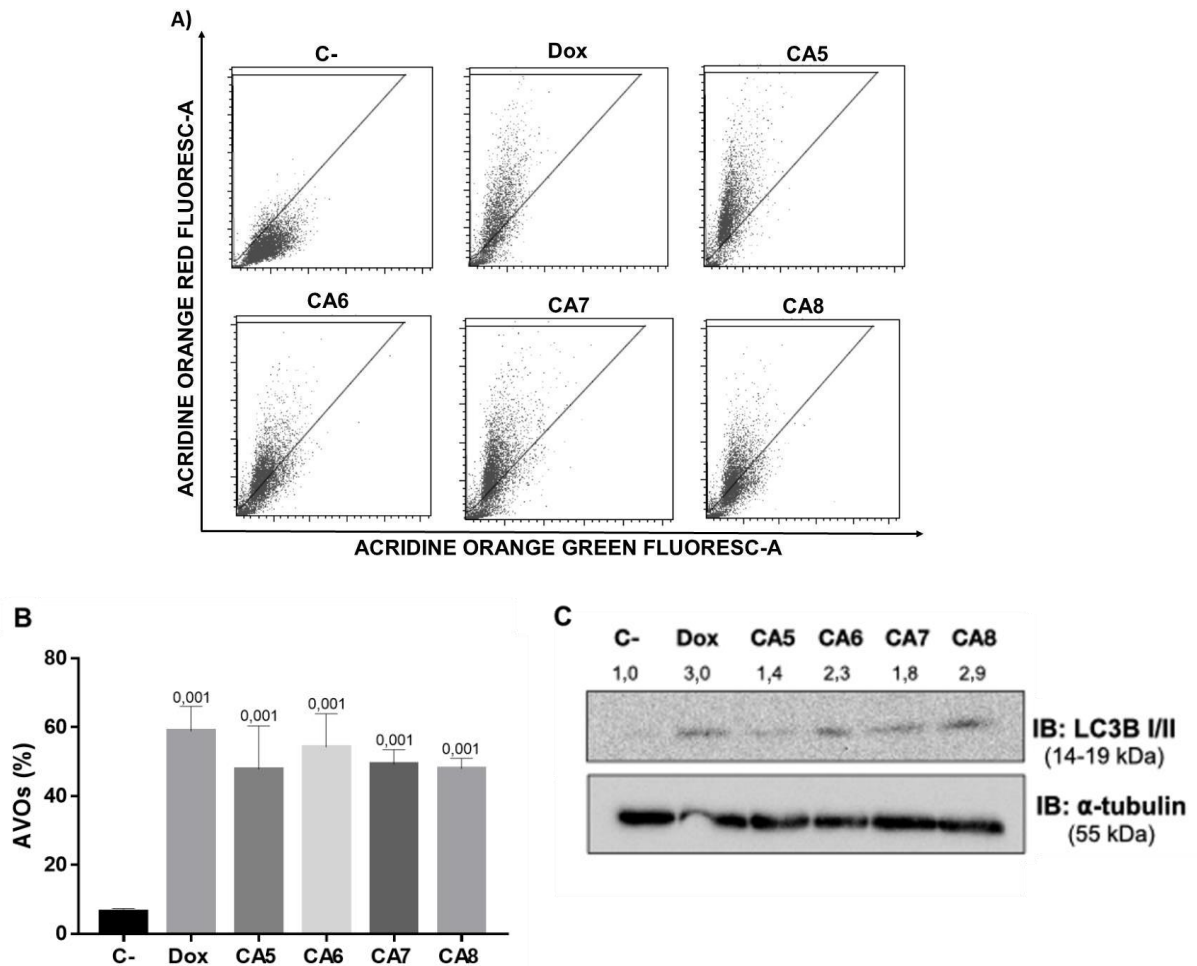
5.3.3 Avaliação de vesículas autofágicas

As células incubadas com cromomicinas CA5, CA6, CA7 e CA8 e a Dox, aumentaram consideravelmente a formação de vesículas autofágicas quando comparados ao grupo controle negativo (Figura 22 A e B). Além disso, essas células também foram capazes de induzir a conversão de LC3B I em II (Figura 22 C), um marcador amplamente utilizado para comprovação do processo autofágico. Esses dados confirmam a indução de autofagia por cromomicinas em células B16-F10.

Figura 22. Avaliação de vesículas autofágicas. **A.** Vesículas autofágicas (AVOs) das células B16-F10 incubadas por 24h com cromomicinas CA5 (100nM), CA6 (250nM), CA7 (250nM) e CA8 (500nM), doxorrubicina a 0,6 μ M (DOX) como controle positivo e com dimetilsulfóxido 0,4% como controle negativo (C-). **B.** Percentual de células com vesículas autofágicas. **C.** Expressão da proteína LC3B I / II com valores normalizados por α -tubulina padrão para a medida de expressão relativa. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com

pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste.

Ref: THOME M.P. et al. Ratiometric analysis of acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *Journal of Cell Science*, v. 129, n. 24, p. 4622, 2016.

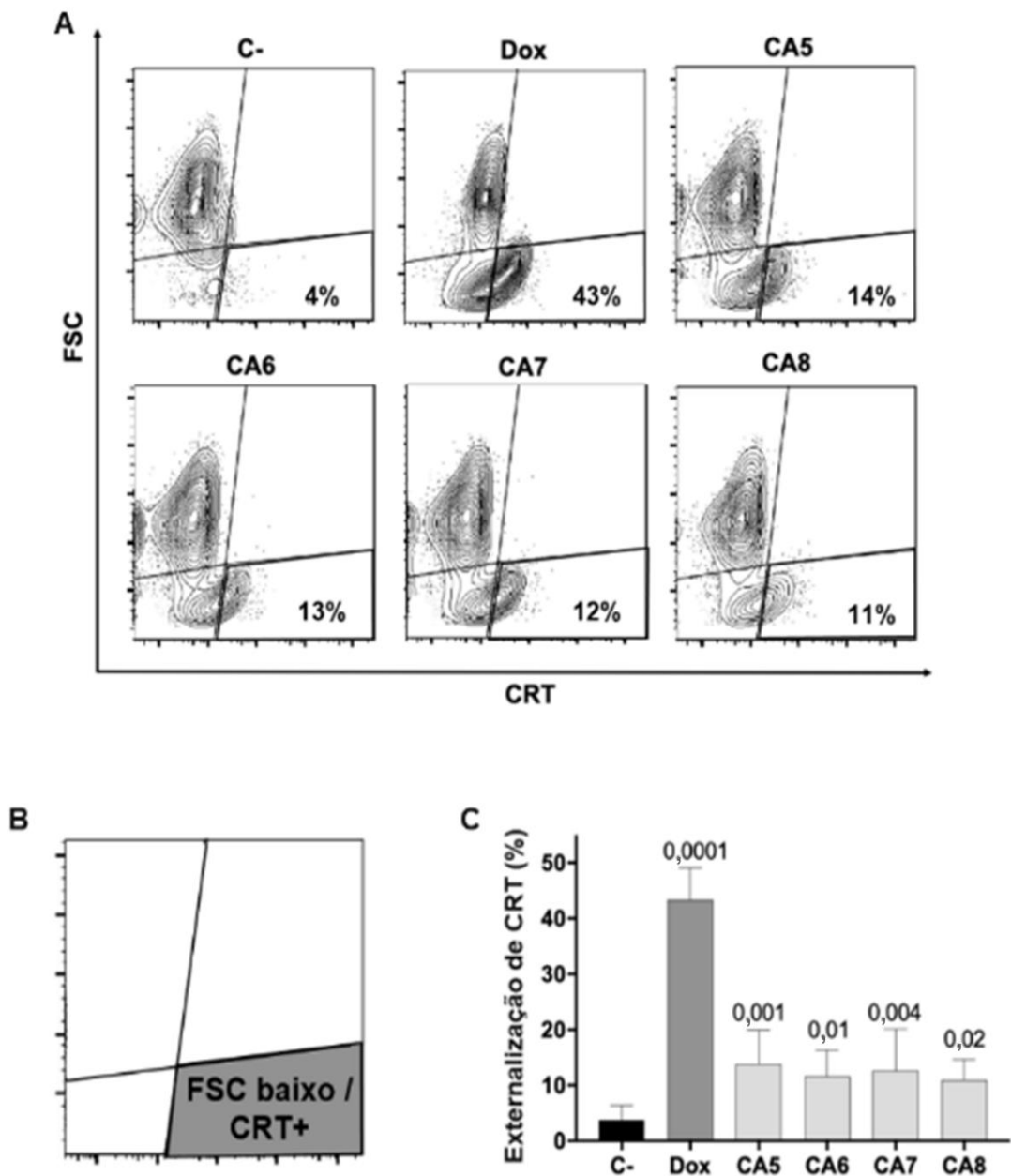


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.4 Avaliação da externalização da CRT na superfície da membrana plasmática

As células incubadas com cromomicinas CA₅, CA₆, CA₇ e CA₈ e a Dox, aumentaram consideravelmente a externalização de CRT quando comparados ao grupo controle negativo, células incubadas apenas com o DMSO 0,4%. Além disso, é possível notar uma relação entre a redução do tamanho celular e o aumento da externalização de CRT, como demonstrado na (Figura 23A).

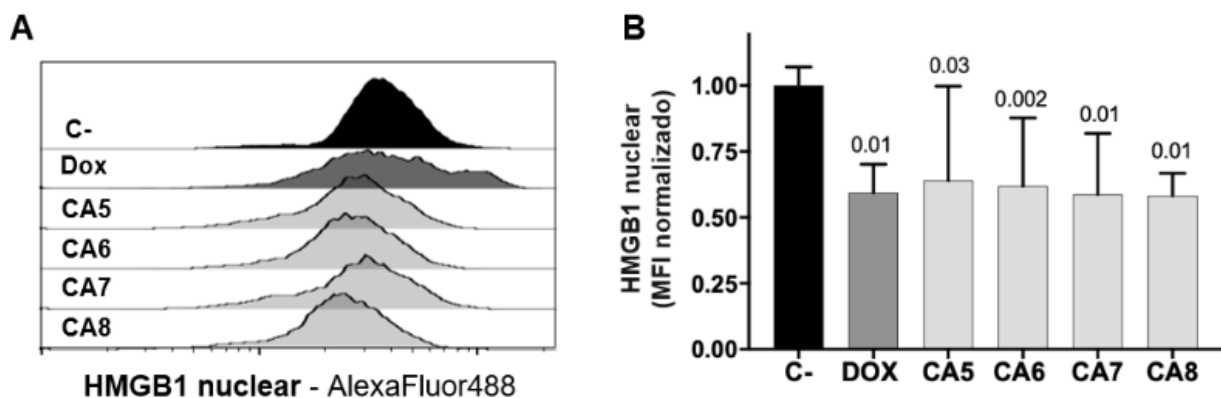
Figura 23. Avaliação da externalização da CRT na membrana de células da linhagem B16-F10. **A**, Gráficos *coutourn plot* representativos de calreticulina (CRT) vs tamanho da célula (dispersão direta, FSC) por citometria de fluxo. **B**, Ilustração do *gate* de células CRT + com baixo FSC (mostrando a redução do tamanho celular). **C**, gráfico que descreve a porcentagem de células que externalizaram CRT. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste. Grupos: CA5 (250nM), CA6 (250nM), CA7 (250nM) e CA8 (500 nM), doxorubicina a 0,6 μ M (Dox) foi utilizada como controle positivo e o dimetilsulfóxido 0,4% (DMSO) como o controle negativo. Incubação de 24h para todas as amostras.



5.3.5 Avaliação da liberação do HMGB1

A liberação do HMGB1 do núcleo para o meio extracelular pode ser avaliada de forma indireta com a diminuição da fluorescência do fluorocromo PE, que está conjugado ao anticorpo HMGB1, no grupo de células incubadas com a molécula em relação a fluorescência das células do controle negativo que devem armazenar o HMGB1 nuclear normalmente. Assim, foi verificado uma diminuição da fluorescência do fluorocromo PE no grupo de células incubadas com as CA5, CA6, CA7 e CA8. Assim como as CAs, a doxorrubicina também apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo controle negativo (Figura 24).

Figura 24. Avaliação da liberação do HMGB1 em células B16-F10. **A.** Intensidade de fluorescência relacionada a liberação de HMGB1 nuclear em células B16-F10 incubadas por 24h com CA₅ (250nM), CA₆ (250 nM), CA₇ (250 nM), CA₈ (500 nM), doxorrubicina a 0,6 μ M (Dox), como controles positivos e com dimetilsulfóxido 0,4% (DMSO) como controle negativo. **B.** Valores normalizados da intensidade de fluorescência mediana do fluorocromo PE, que está conjugado ao anticorpo HMGB1, em células B16-F10 incubadas com os grupos-teste. Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism. O valor de significância estatística (p) comparado ao controle negativo está sobre as barras dos grupos-teste.

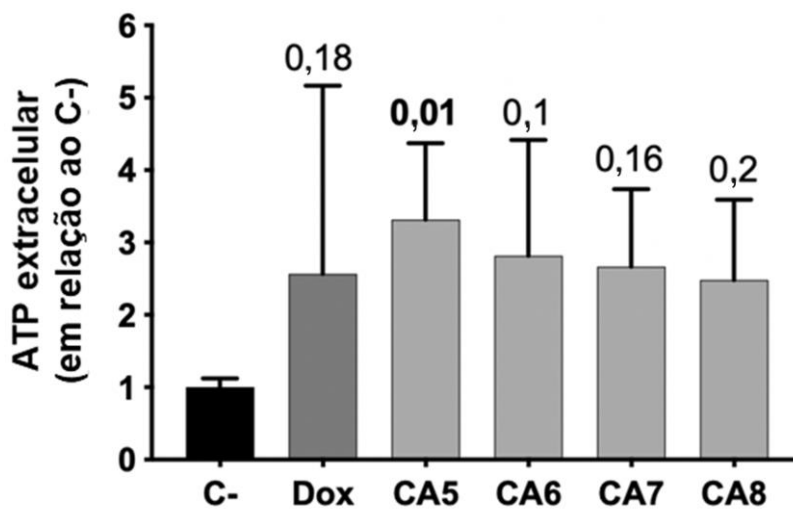


5.3.6 Quantificação do ATP liberado

ATP liberado no meio extracelular funciona com um DAMP, ajudando na ativação do sistema imune. O teste para quantificação do ATP liberado foi realizado utilizando o sobrenadante de células B16-F10 em cultura, já que a intenção é verificar o ATP que foi liberado da célula. Comparando os grupos CA₅, CA₆, CA₇, CA₈ e Dox com o controle negativo,

pode ser visto que somente a CA₅ foi capaz de induzir a liberação de ATP de forma significativa (figura 25).

Figura 25. Avaliação do ATP extracelular liberado por células da linhagem B16-F10. Concentração de ATP em nM nos grupos dimetilsulfóxido 0,4% (DMSO) utilizado como controle negativo, doxorubicina a 0,6 μ M (Dox) como controle positivo e as CA_s (CA₅ (250 nM), CA₆ (250 nM), CA₇ (250 nM), CA₈ (500 nM)). Os dados, que foram obtidos de pelo menos 3 experimentos realizados com pelo menos três réplicas, estão apresentados como os valores da média \pm D.P.M., foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism.

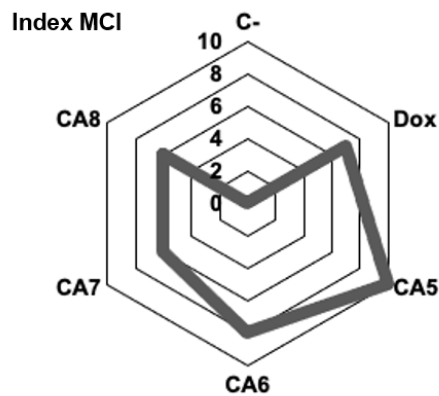


5.3.7 Index para escolha da molécula para prosseguimento dos testes

Índice de imunogenicidade (Index) indicou que a CA₅ desencadeou os níveis mais altos de DAMPs associados à MCI em células B16-F10, e por isso, ela foi a molécula escolhida para prosseguir com os testes para confirmação de MCI.

Figura 26. Gráfico de radar do índice de morte celular imunogênica (índice MCI). **A.** Representação do radar do índice de imunogenicidade mostrando a CA₅ com maior pontuação. **B.** Tabela com pontuação referente a cada tipo de DAMP relacionado à MCI.

A



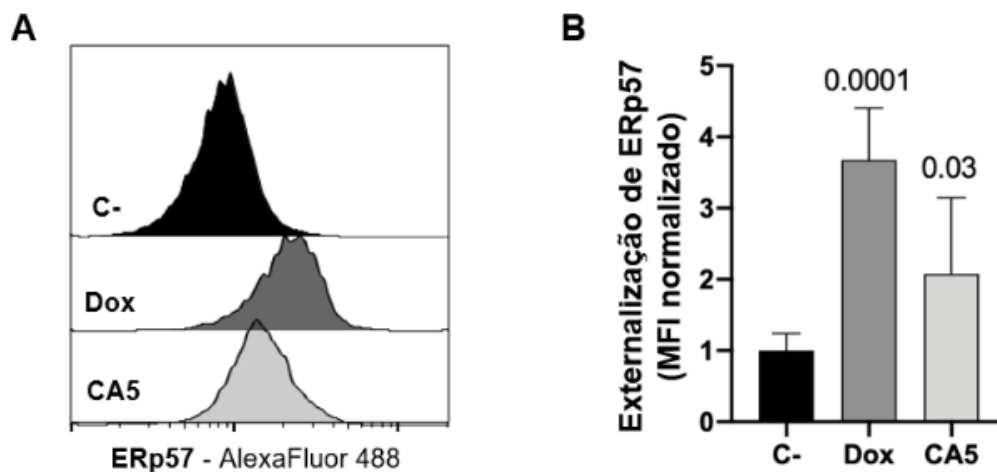
B

Fenótipo celular		C-	Dox	CA5	CA6	CA7	CA8
Citotoxicidade	Ruptura de membrana	0	1	1	1	1	1
	PARP1 clivado	0	0	1	1	1	1
Autofagia	AVOs	0	1	1	1	1	1
	LC3B I/II	0	1	1	1	1	1
Liberação de DAMP	HMGB1	0	2	2	2	2	2
	ATP	0	0	2	0	0	0
	CRT	0	2	2	2	2	0
ICD index (sum)		0	7	10	8	8	6

5.3.8 Avaliação da externalização do ERp57 na superfície da membrana plasmática

A co-externalização de ERp57 com CRT é o verdadeiro sinal “*eat-me*” para fagocitose pelas APCs com um resultado de ativação. As células B16-F10 expostas a CA5 e Dox apresentaram externalização ERp57 (Figura 27). O estresse de retículo (RE) é um importante evento da MCI, estando relacionado à externalização de CRT e do ERp57, podendo desencadear o início da autofagia, bem como da apoptose.

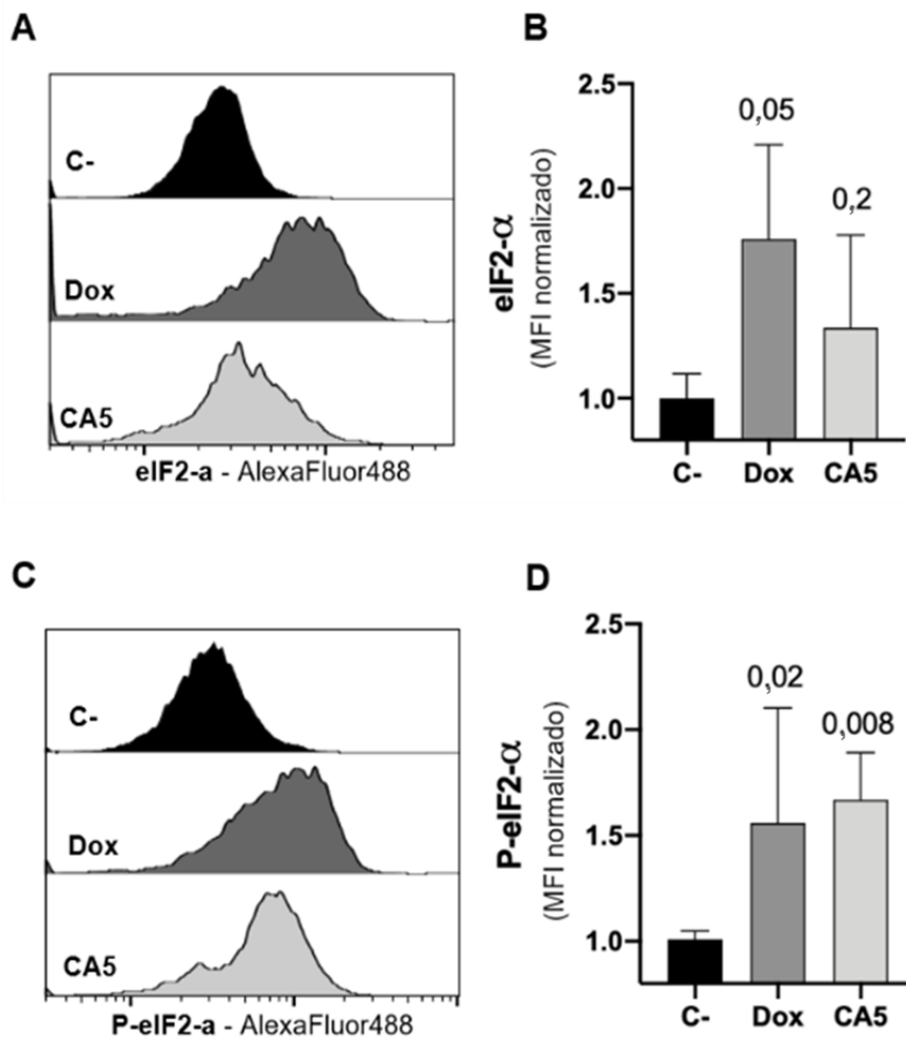
Figura 27. A, histogramas representativos de ERp57 avaliados por citometria de fluxo e B, gráfico representando MFI normalizado de ERp57.



5.3.9 Avaliação da fosforilação de eIF2 α

A eIF2 α é uma proteína de estresse de retículo (ER) envolvida na MCI. As células tratadas com Dox induziram um aumento de eIF2 α (Fig. 28 A e B), enquanto o tratamento com CA₅ não alterou o nível desta proteína. No entanto, as células incubadas com CA₅ provocaram uma fosforilação significativa de eIF2 α , tendo o aumento da detecção de P-eIF2 α , e a Dox não aumentou os níveis desta proteína fosforilada (Fig. 28 C e D). A fosforilação de eIF2 α é considerada uma sinalização crucial da MCI (HUMEAU et al, 2020).

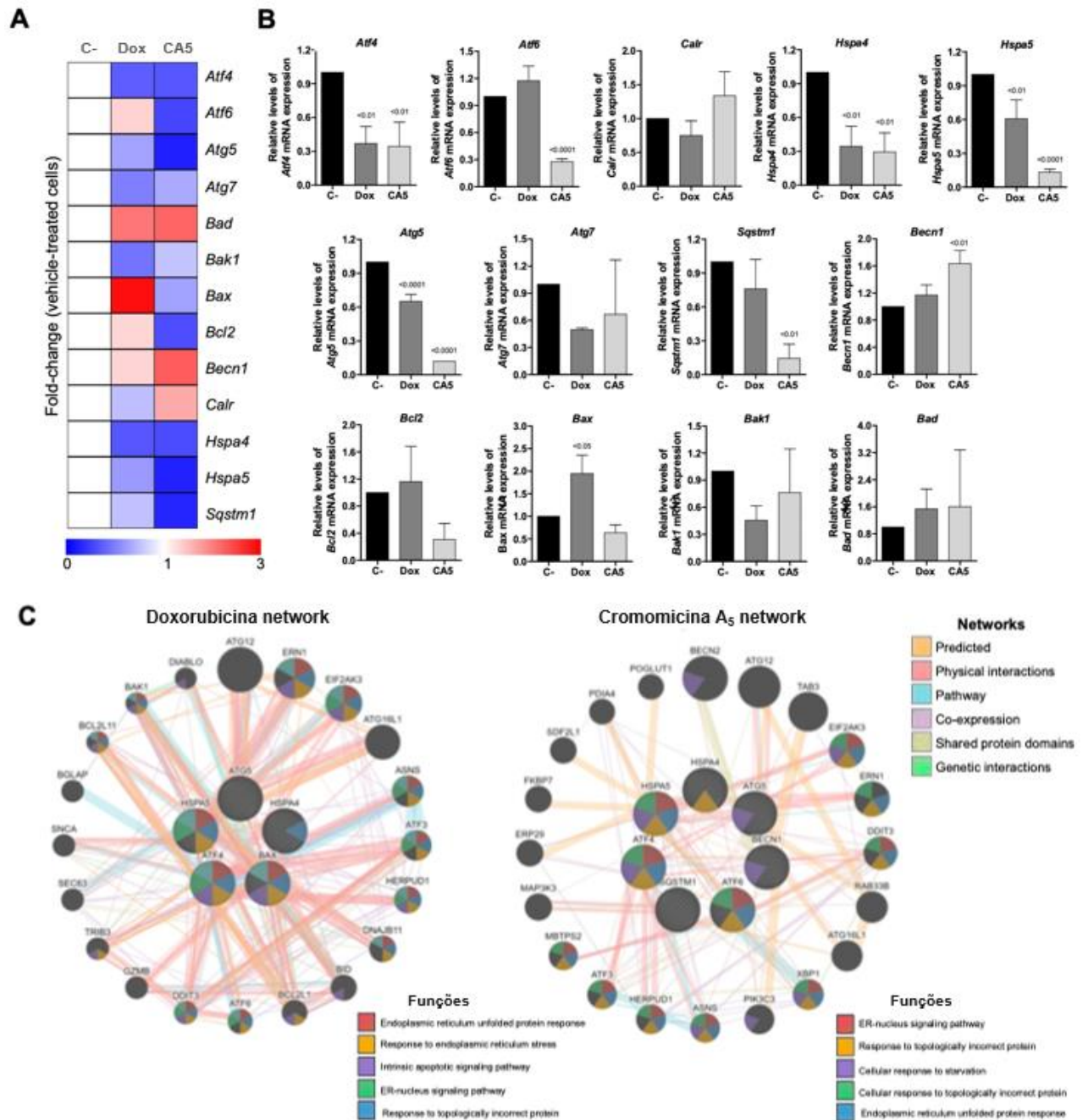
Figura 28. **A**, Histogramas representativos de eIF2 α avaliados por citometria de fluxo e **B**, gráfico representando MFI normalizado de eIF2 α . **C**, histogramas representativos de células com eIF2 α fosforilado na serina 51 (P-eIF2 α) avaliados por citometria de fluxo e **D**, gráfico que descreve MFI normalizado de P-eIF2 α . Dados apresentados em gráficos como média \pm desvio padrão de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. Os valores de p de C- comparados aos grupos tratados estão acima de cada grupo tratado.



5.3.10 Avaliação da expressão gênica em células incubadas com CA₅

A CA₅ foi capaz de alterar a expressão gênica relacionada à autofagia, estresse de retículo e apoptose. Para obter novos *insights* sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta das células B16-F10 à CA₅, investigamos a expressão de 13 genes relacionados à autofagia, apoptose e estresse no ER por RT-PCR quantitativo. Um total de 7 de 13 genes foi significativamente modulado pelo tratamento CA₅ (6 regulados negativamente [Atf4, Atf6, Hspa4, Hspa5, Atg5 e Sqstm1] e 1 regulado positivamente [Becn1], todos $p < 0,05$), enquanto 5 genes foram significativamente modulados por tratamento com Dox (4 regulados negativamente [Atf4, Hspa4, Hspa5 e Atg5] e 1 regulado positivamente [Bax] todos $p < 0,05$) em células B16-F10. Digno de nota, o tratamento com CA₅, mas não com Dox, aumentou significativamente as razões Becn1/Bcl2 e Bad/Bcl2 (Fig. 5A-B). A análise da rede indica que CA₅ induz relações mais complexas, que efetivamente interconectam os processos de apoptose, autofagia e estresse ER (Fig. 29).

Figura 29. A cromomicina A5 modula genes de transcrição relacionados ao estresse do retículo endoplasmático (RE), autofagia e morte celular. O RT-PCR quantitativo foi realizado para 13 genes selecionados relacionados ao estresse ER (Atf4, Atf6, Calr, Hspa4 e Hspa5); autofagia (Atg5, Atg7, Becn1 e Sqstm1); e apoptose (Bad, Bak1, Bax e Bcl2). **A**, mapa de calor ilustrando todos os genes selecionados em B16-F10 sobre um veículo, exposição Dox (0,6 μ M) ou CA₅ (0,1 μ M) por 24 h. Os dados são apresentados como variação de dobra das células incubadas com veículo. Genes regulados negativamente e regulados positivamente são ilustrados em azul e vermelho, respectivamente. **B**, comparação dos genes selecionados apresentada em gráficos de barras e os valores de p são indicados. **C**, Análise de rede para genes modulados significativamente por Dox ou CA₅ construído usando o banco de dados GeneMANIA (<https://genemania.org/>). Os genes regulados positivamente e regulados negativamente no RT-PCR quantitativo são ilustrados como círculos tachados, e os genes de interação incluídos pela modelagem de *software* são indicados por fios tachados. As principais interações entre os genes são indicadas por linhas coloridas e os cinco principais processos celulares são demonstrados na figura.

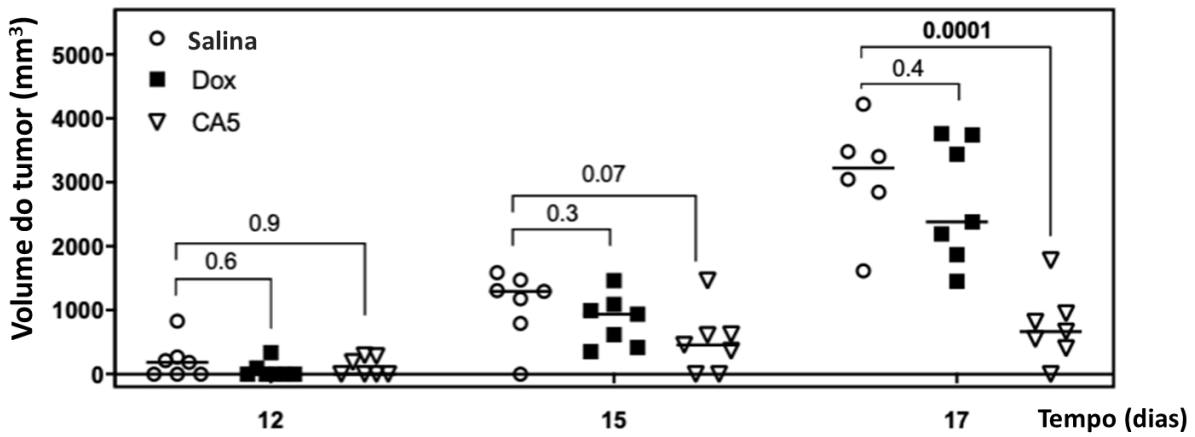


5.3.11 Teste de vacinação com células incubadas com CA₅

O ensaio de vacinação com células que morrem desencadeadas por um agente citotóxico é a técnica padrão ouro para confirmação de MCI (GOMEZ-CADENA et al, 2016). As células expostas a CA₅ injetadas 7 dias antes do desafio com células viáveis B16-F10, desenvolveram uma proteção de controle de crescimento tumoral significativa (Fig. 30). Este efeito da vacinação não foi observado em camundongos do grupo Dox. Vale ressaltar que as células moribundas dos grupos CA₅ e Dox foram lavadas antes da injeção em solução salina.

Figura 30. A vacinação com células B16-F10 mortas expostas à cromomicina A₅ confere resistência a camundongos contra células B16-F10 vivas. No dia -7, $1,8 \times 10^5$ células pré-incubadas por 24 h com $0,1 \mu\text{M}$ de

CA5 (CA₅) e 0,6 μ M de doxorubicina (Dox) foram injetadas por via subcutânea na axila direita de camundongos. 7 dias após a vacinação (dia 0), os camundongos foram desafiados com 1×10^5 células B16-F10 vivas na axila esquerda. Os camundongos do grupo de controle negativo (solução salina) foram injetados com solução salina em -7 dias e células B16-F10 vivas no dia 0. N = 7 camundongos / grupo. O crescimento do tumor foi monitorado até o dia 17. As diferenças entre os grupos são expressas como valores de p indicados acima dos grupos comparados.



6 DISCUSSÃO

O melanoma metastático avançado (MMA) carece de uma opção terapêutica para converter tumores imunologicamente frios (ou tolerogênicos), em quentes (ou imunogênicos) para melhorar a resposta clínica dos pacientes que não respondem ao arsenal atual disponível, incluindo imunoterapia (BONAVENTURA et al, 2019). Durante muito tempo, a cirurgia e quimioterapia eram os tratamentos mais utilizados para o melanoma, porém existia uma carência de fármacos que influenciassem sobre as características imunogênicas desses tipos de tumores, fazendo com que as respostas clínicas fossem de baixa duração e com uma sobrevida muito curta nos pacientes tratados (MAVERAKIS et al., 2015).

Após anos de estudos, houve a inclusão de imunoterapias e terapias alvo direcionadas para o tratamento de pacientes diagnosticados com melanoma metastático, fazendo com que ocorresse uma alteração no cenário relacionado ao tratamento dessa doença (MAVERAKIS et al, 2015; QUEIROLO et al, 2019). Apesar desse grande avanço, os índices de mortalidade ainda permanecem elevados, chegando a quase 1.800 casos em 2018, que correspondeu a 1,7% do total de mortes por câncer no Brasil (INCA, 2020).

Um perfil neoantigênico de um tumor é um fator determinante das respostas imunes anticâncer, conforme demonstrado pelo fato de que vários tumores sólidos tornam-se resistentes à imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos, adquirindo defeitos na maquinaria de apresentação do antígeno (GALLUZZI et al, 2020; PROCUREUR et al, 2021). Diante disso, a identificação de indutores de MCI poderia preencher essa necessidade combinando dois efeitos úteis ao mesmo tempo, citotoxicidade direta contra células tumorais e liberação de sinais de ativação imunológica.

A MCI foi primeiramente descrita em 2005, por Casares et al. A indução desse tipo de morte celular é muito interessante do ponto de vista da terapia anticâncer, uma vez que esse tipo de morte celular resulta na ativação do sistema imunológico, o que pode tornar o tratamento mais eficaz e duradouro. Um dos eventos centrais no curso da MCI é a ativação de uma resposta ao estresse do retículo endoplasmático (RE). Isso é fundamental para as células sofrendo MCI para emitir todos os sinais necessários para que sua morte seja percebida como imunogênica pelo hospedeiro e culmina com a fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica 2α (eIF2 α) (KEPP et al, 2020). Uma abordagem para identificar esse tipo de morte pode ser realizada por meio de testes *in vitro* para detectar DAMPs como CRT, ERp57, HSPs, HMGB1, ATP, eIF2 α entre outros, que juntos são responsáveis por gerar ativação e favorecer a resposta imune adaptativa no organismo (GALLUZZI et al, 2020).

As terapias anticâncer utilizadas atualmente podem induzir processos de morte celular imunogênicas ou tolerogênicas. A maioria das terapias utilizadas são capazes de induzir morte celular através da ativação da via apoptótica. Este tipo de morte é silenciosa para o sistema imunológico, sendo assim, há uma incapacidade de produzir resposta específica para os antígenos das células mortas, ou seja, um processo de tolerância imunológica (RADOGNA et al, 2019). A morte celular imunogênica (MCI) foi percebida nos últimos anos a partir da ação de alguns quimioterápicos de primeira linha, como antraciclinas, oxaliplatina e bortezomib, e algumas formas de radioterapia, que além de ter efeito citotóxico podem induzir o desenvolvimento da imunidade antitumoral, determinando uma maior eficácia terapêutica (GARG et al., 2013; PROCUREUR et al, 2021).

Esse tipo de morte celular regulada permite a ativação adequada do sistema imunológico, que por sua vez, elimina as células tumorais resistentes à quimioterapia. Este mecanismo está relacionado a respostas mais eficazes e duradouras (ZITVOGEL et al, 2008). Aqui nós investigamos a indução de MCI de quatro cromomicinas obtidas a partir da bactéria marinha *Streptomyces* sp. BRA-384 contra células B16-F10 de melanoma metastático.

Vale ressaltar que, o uso de microrganismos apresenta uma excelente estratégia de sustentabilidade, pois eles podem fornecer uma grande quantidade de material a partir da sua fermentação, o que é indispensável para produção suficiente de moléculas para serem utilizadas nos testes pré-clínicos e clínicos (JIMENEZ et al., 2019; WILKE et al, 2020).

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Marinho *et al*, 2021, dados não publicados), mostraram o cultivo da cepa de *Streptomyces* sp. BRA-384 isolada do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, sob diferentes condições de cultivo (variações no tempo e no método de fermentação: em meio líquido ou meio sólido). Nesse mesmo estudo, 16 cromomicinas foram isoladas, sendo 4 dessas (CA₅₋₈) já descritas no trabalho de Pinto *et al*, 2019. As demais cromomicinas isoladas carecem de identificação, podendo haver algumas inéditas com base nas informações preliminares já obtidas (dados não publicados). As moléculas isoladas tiveram sua atividade antiproliferativa avaliada, sendo testadas em linhagem de melanoma metastático murino (B16-F10), e os resultados mostraram atividades muito potentes mesmo em concentrações na ordem de nM. Digno de nota, o trabalho de Marinho *et al*, 2021 mostrou a importância de propor novos métodos de cultivo que sejam capazes de tornar a produção de biocompostos mais rápida, barata e eficiente, além de proporcionar a descoberta de moléculas inéditas. Dessa forma, foi possível obter quantidade de CAs suficientes para a realização deste trabalho, bem como viabilizar a continuação de estudos *in vivo*, que demandam uma maior quantidade de molécula. Isto é de grande relevância, visto que trabalhos que envolvem a utilização de produtos naturais possuem um gargalo devido ao baixo suprimento

de compostos para a realização de testes pré-clínicos e clínicos. Sendo assim, trabalhos que tenham a finalidade de reduzir esse obstáculo, criam a expectativa de uma otimização adicional para produção em larga escala e realização de testes clínicos, o que é bastante favorável.

Como mencionado anteriormente, as cromomicinas são policetídeos tricíclicos glicosilados pertencentes aos ácidos aureólicos, produzidas por *Streptomyces*, que possuem atividades antimicrobiana e antitumoral (PETIT et al, 2015). A mitramicina A e cromomicina A3 são os membros mais representativos da família dos ácidos aureólicos, sendo a mitramicina A aprovada como um fármaco anticâncer na década de 1970. Porém, a utilização de compostos desta família como fármacos anticâncer em seres humanos têm tido limitações devido à sua alta toxicidade (FERLA et al., 2011; PETTIT et al., 2015).

O mecanismo de ação descrito para cromomicinas e outros ácidos aureólicos, está relacionado com a capacidade que essas moléculas possuem em se ligar a regiões ricas em CG ao longo do DNA. Essa ligação faz com que as cromomicinas possam prevenir a ligação de proteínas regulatórias de DNA através da inibição de suas regiões promotoras específicas (LOMBÓ et al, 2005), que foram relatados recentemente pela supressão de CA₃ na função antiapoptótica, fenômeno relacionado às proteínas Sp1 (SARANARUK et al., 2019).

Estudos de comparação na expressão gênica global de compostos de ligação a sulcos menores de DNA revelaram que o tratamento com altas doses de cromomicina A3 em uma linhagem celular de leucemia humana possuem impactos negativos em genes relacionados às funções celulares importantes enquanto regulam positivamente genes relacionados à apoptose (ZIHLIF et al., 2010).

Inicialmente, os perfis citostático e citotóxico das CA5-8 foram investigados com o aumento do tempo de exposição, e foi observado um efeito dependente do tempo na ordem de nM. Notavelmente, CA5 e CA7 representaram citotoxicidade em baixo tempo de exposição de 4h e 8h, respectivamente. Além disso, as CA5-8 inibiram completamente a formação de colônias de células tumorais após 24h de incubação. Esses dados destacaram uma característica citotóxica favorável das CAs como compostos anticâncer, que devem atingir níveis plasmáticos terapêuticos em um curto intervalo de tempo devido à toxicidade. Vale ressaltar, que as CAs mantiveram sua capacidade citotóxica mesmo estando em baixo tempo de exposição com as células, já que o meio de cultura com a molécula foi sendo retirado nos devidos intervalos de tempo. Essa atividade pode estar relacionada com a capacidade que essas moléculas possuem de se ligarem ao DNA.

A abordagem mais confiável para a identificação inicial de MCI ainda consiste em realizar vários ensaios fenotípicos para avaliar autofagia, apoptose e liberação de DAMPs em células tratadas *in vitro* e, posteriormente, com os testes *in vivo* (GALLUZZI et al, 2020). Em

geral, as células que foram incubadas com CA₅₋₈ e Dox representaram algumas características do MCI, como apoptose, autofagia e externalização de CRT e liberação de HMGB1.

Notavelmente, as células incubadas com CA₅ representaram o perfil MCI mais consistente, preenchendo todas as características fenotípicas investigadas até agora, seguidas por CA₇ e CA₆, Dox e CA₈.

Em relação à morte por apoptose, a Dox não conseguiu aumentar PARP1 clivada em células B16-F10, um marcador de apoptose (KAUFMANN et al, 1993; TEWARI et al, 1995). Além disso, Dox e CA₆₋₈ falharam em liberar ATP, um DAMP essencial envolvido no MCI, que nesse caso pode ser liberado de forma dependente do processo de autofagia. Esse ATP extracelular atua como um importante sinal de “*find me*” para precursores de células dendríticas e macrófagos (KEPP et al, 2014; HUMEAU et al, 2019; PANARETAKIS et al, 2009). Ademais, a CA₅ foi capaz de induzir a liberação de ATP, externalização ERp57 e fosforilação de eIF2 α . Já a Dox aumentou os níveis de eIF2 α , sem fosforilação significativa na serina 51.

As análises de indutores anticâncer de MCI revelaram fosforilação de eIF2 α mediada por eIF2 α quinase-3 (EIF2AK3), mas nenhum outro sinal de estresse ER está relacionado à exposição a CRT (BEZU et al, 2018; HUMEAU et al, 2020; SUKKURWALA et al, 2014).

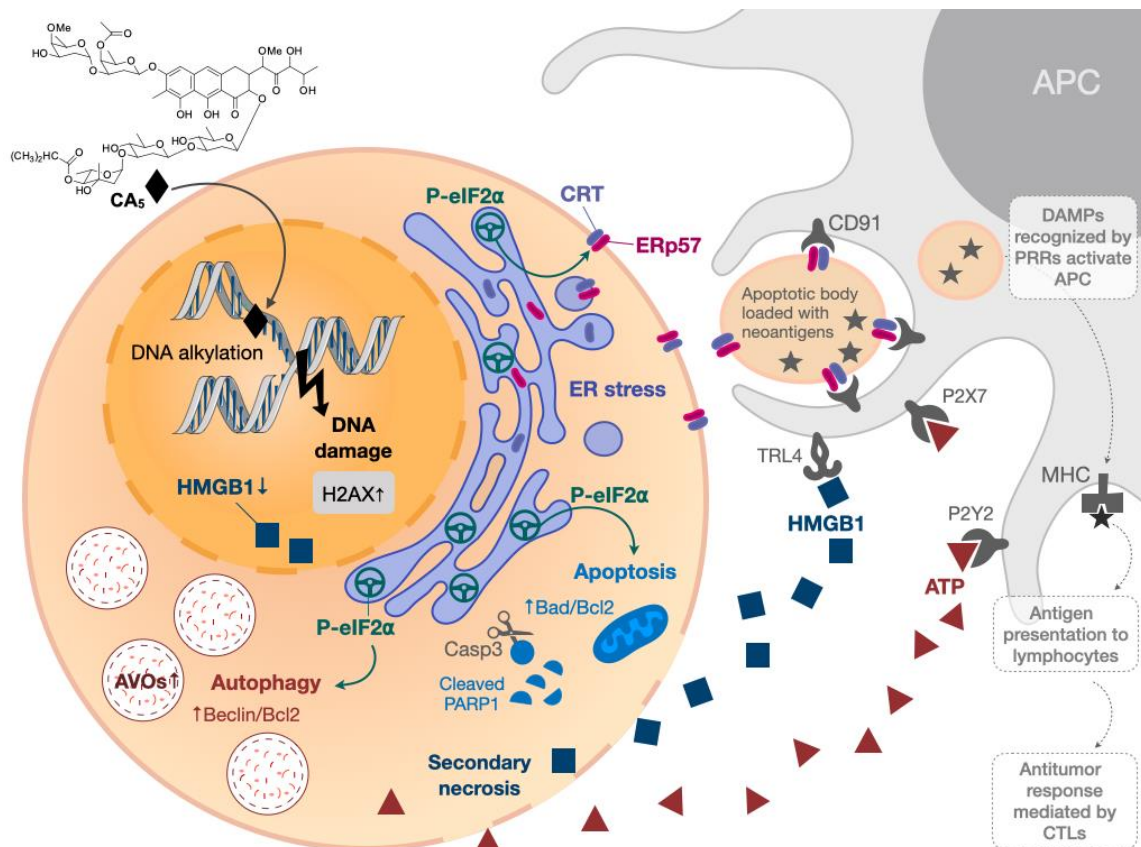
Além disso, as abordagens de análise de rede revelaram a fosforilação de eIF2 α como a única resposta de estresse ER relevante para o algoritmo com algumas consequências, incluindo exposição CRT, formação de grânulos de estresse e indução de autofagia (GARG et al, 2012; HUMEAU et al, 2020). Estudos mostram que indutores de MCI, como antraciclinas, são capazes de gerar um aumento da fosforilação de eIF2 α (BEZU et al, 2018; HUMEAU et al, 2020). Embora a Dox não tenha induzido um aumento significativo de fosforilação de eIF2 α , ela foi capaz de induzir a externalização de CRT e aumentar a população celular de alta granulosidade e autofagia. Essas respostas peculiares ao estresse associado à MCI envolvem autofagia (que facilita a liberação lisossomal de ATP das células cancerosas que estão morrendo, causando a emissão de um sinal quimiotático para precursores de CD), bem como a ativação da fosforilação do fator de iniciação eucariótica 2 alfa (eIF2 α), um evento típico do estresse do retículo endoplasmático (ER), que facilita a exposição da proteína calreticulina normalmente residente em ER à superfície da célula (GALLLUZI et al, 2020)

Esses dados conflitantes podem ser explicados como um efeito de mascaramento do aumento de eIF2 α em células tratadas com Dox, que poderia produzir fosforilação biologicamente relevante de eIF2 α , conforme detectado por aumento de ecto-CRT e autofagia. Em particular, a fosforilação de eIF2 α é necessária para a exposição pré-apoptótica da CRT na superfície celular, que é um determinante central da MCI (KEPP et al, 2020).

A CA5 e a doxorubicina alteraram a expressão da transcrição de 13 genes selecionados relacionados à autofagia, estresse de ER e apoptose. No entanto, as células incubadas com CA5 apresentaram uma alteração mais acentuada da maioria dos genes avaliados, e aumentaram as razões *Becn1/Bcl2* e *Bad/Bcl2*, o que demonstra que os genes relacionados à autofagia (*Becn1*) e apoptose (*Bad*) estão sendo modulados de forma mais expressiva quando comparados com o gene anti-apoptótico (*Bcl2*). Além disso, a CA5 apresentou uma rede interconectada (*network*) mais ampla entre apoptose, autofagia e estresse ER do que as células tratadas com doxorubicina. Os fatores de transcrição de ativação *Atf4* e *Atf6* foram regulados negativamente nas células CA5. Já o tratamento com Dox também diminuiu o *Atf4*, porém não alterou o *Atf6*.

As alterações celulares induzidas por CA5 estão resumidas na figura 30 juntamente com o efeito esperado nas células dendríticas.

Figura 31. Visão geral da morte celular imunogênica (MCI) induzida por cromomicina A5 (CA₅) em melanoma metastático. As células B16-F10 incubadas com CA₅ exibiram estresse celular e morte celular, juntamente com a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que supostamente ativam as células apresentadoras de antígenos (APC) e geram uma resposta imune celular eficaz. A fosforilação de eIF2 α , devido ao estresse do retículo endoplasmático (ER), conduz eventos imunogênicos cruciais, como a externalização dos sinais “eat me” calreticulina (CRT) e ERp57, autofagia e apoptose. AVOs: organelas vesiculares ácidas; Casp3: caspase 3; PRRs: receptores de reconhecimento de padrões; CTLs: linfócitos T citotóxicos.



O ensaio de vacinação é o método padrão ouro para confirmação do MCI, devido à sua complexa natureza espaço-temporal. Células morrendo submetidas à MCI devem recrutar e ativar eficazmente APCs e linfócitos sem quaisquer adjuvantes externos. A eficácia da vacinação é avaliada desafiando camundongos com células vivas da mesma linhagem (VANMEERBEEK et al, 2020; KEPP et al, 2014; HUMEAU et al, 2019).

Os camundongos C57BL/6 vacinados com células incubadas com CA5 controlaram o crescimento do tumor de maneira eficiente. No dia 17, o volume médio do tumor de camundongos do grupo CA5 foi significativamente menor ($p = 0,0001$) do que o volume médio do tumor do grupo de solução salina. Na verdade, os animais do grupo CA5 apresentaram apenas 20% do volume médio do tumor de solução salina, e um animal desse grupo não desenvolveu nenhum tumor. Este resultado confirma a CA5 como uma indutora de MCI, sendo comprovado *in vitro* e *in vivo*. Os tumores do grupo Dox não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo ($p = 0,4$). Gomez-Cadena et al (2016), relataram controle tumoral significativo de camundongos C57BL/6 vacinados com células B16-F10 tratadas com Dox. Em seu estudo, o tratamento celular com doxorrubicina foi mais longo (48h), e uma menor concentração (0,06 μM), e a ativação da caspase 3 confirmou a indução de apoptose. No entanto, eles também observaram que os níveis de ATP nos sobrenadantes das células tratadas com Dox também não aumentaram, semelhante aos resultados encontrados no presente estudo.

O ajuste fino das condições *in vitro* para confirmar a indução de MCI ainda é um desafio e alguns estudos podem falhar em demonstrá-lo, dependendo da origem histológica das células e também do tempo e das concentrações de exposição utilizadas (SUKKURWALA et al, 2014).

A maioria dos indutores de MCI, como doxorrubicina, oxaliplatina, bortezomibe e alcalóides de vinca, foram identificados usando linhagens de células tumorais de diferentes origens tumorais da prática clínica (SUKKURWALA et al, 2014; MENDER et al, 2012). Embora inicialmente esta abordagem tenha gerado conhecimento robusto sobre indutores de MCI, ela levou a uma identificação tardia de alguns importantes agentes anticâncer indutores de MCI, incluindo o paclitaxel e a cisplatina (LAU et al, 2020; SOLARI et al, 2020). Da mesma forma, outras cromomicinas, incluindo CA₇₋₈ estudadas aqui, também induzem MCI dependendo do projeto experimental; no entanto, mais estudos são necessários para caracterizar completamente o MCI desencadeado por cromomicinas. Além disso, os resultados subótimos que obtivemos com células de melanoma expostas à doxorrubicina, um importante indutor de MCI usado no tratamento de vários cânceres sólidos e hematológicos (por exemplo, mama,

ovário, próstata e mieloma múltiplo), também ilustram o desafio de identificar condições experimentais que desencadeiam MCI.

Alguns agentes quimioterápicos são conhecidos por induzir MCI e demonstram desempenho clínico notável (KEPP et al, 2014). A CA₅ mostra evidências de MCI e, portanto, é um candidato altamente promissor para estudos posteriores com o MMA, e merece mais estudos pré-clínicos. Também vale destacar a oferta como um importante gargalo para o desenvolvimento pré-clínico e clínico de fármacos (JIMENEZ et al, 2020). Obtivemos CA₅ para este estudo usando uma técnica sustentável e facilmente escalonável (PINTO et al, 2019), e seu fornecimento para estudos *in vivo* é bastante viável.

Diante dos dados aqui apresentados, e comparados com estudos realizados por outros grupos de pesquisa, podemos justificar a diferença da atividade apresentada pela Dox devido à diferença de tempo e concentração que ela foi utilizada no presente trabalho. Consideramos que a Dox e as outras CAs poderiam apresentar outros resultados compatíveis com a MCI se tivessem uma modulação de concentração e tempo de incubação, o qual inicialmente, não foi compatível com o tempo escolhido para as CAs. Dito isso, seria necessário realizar um rastreio de condições experimentais para as demais cromomicinas e Dox, que possivelmente poderiam ter apresentado um melhor index para MCI.

Em resumo, identificamos a CA₅ como um indutor de MCI em células de melanoma metastático. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa estão em andamento para investigar adicionalmente alguns aspectos importantes como efeito *in vitro* em melanoma humano, efeito antitumoral em monoterapia e em associação com inibidores de *checkpoint* imunológico. Mais estudos *in vivo* com CA₅ são necessários para avaliar a atividade antitumoral, toxicidade e sobrevivência, bem como o efeito sobre CA₅ associado à imunoterapia. Além disso, a valorização desse tipo de estudo é de extrema relevância para reforçar o grande potencial da nossa biodiversidade marinha, levantando a importância de investimentos para que esses estudos de bioprospecção, bem como de conservação possam prosseguir.

7 CONCLUSÕES

As cromomicinas testadas induziram características compatíveis com a indução de morte celular imunogênica *in vitro*, sendo comprovado a partir dos efeitos nas células tumorais de melanoma metastático, como alterações morfológicas, ruptura da membrana plasmática, formação de vesículas autofágicas e expressão de importantes genes relacionados à autofagia, estresse de retículo e apoptose. Além disso, foi constatado que algumas células incubadas com as CAs liberaram os DAMPs típicos de morte celular imunogênica, como a externalização de CRT, liberação de HMGB1 nuclear e secreção de ATP. Porém, a CA₅ produziu melhor perfil nas condições testadas, e por isso os testes prosseguiram com ela. A CA₅ induziu a externalização de ERp57 na superfície da membrana plasmática e a fosforilação de eIF2alfa, características cruciais indicativas da MCI. Ademais, no teste *in vivo*, as células incubadas com CA₅ foram capazes de gerar um efeito vacinal contra B16-F10.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

CHEN, Y. et al. Metronomic Chemotherapy and Immunotherapy in Cancer Treatment. **Cancer Letters**, 2017.

FUCIKOVA, J. et al. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 11, 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. 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.

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, n. 6, p. 1–12, 2016.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 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.

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.

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.

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

KEPP, O. et al. Zong Sheng Guo 33 , Akseli Hemminki 34 , Martin Herrmann 35 , James W. Hodge 36 , Stefan Holdenrieder 37. **Patrizia Rovere-Querini**, v. 29, p. 11, 2014b.

KEPP, O.; SENOVILLA, L.; KROEMER, G. Immunogenic cell death inducers as anticancer agents. **Oncotarget**, v. 5 (14), p. 5190–5191, 2014.

KROEMER, G. et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 51–72, 2013.

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. 13, p. 1270–1271, 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.
- LUKE, J. J. et al. optimizing outcomes in melanoma. **Nature Publishing Group**, 2017.
- MARTINS, I. et al. Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death. **Autophagy**, v. 8:3, p. 413–415, 2012.
- MAVERAKIS, E. et al. Metastatic melanoma – A review of current and future treatment options. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, n. 5, p. 516–524, 2015.
- MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, 2016.
- OBEID, M. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. **Nature Medicine**, v. 13, n. 1, p. 54–61, 2007.
- PANARETAKIS, T. et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. **EMBO Journal**, v. 28, n. 5, p. 578–590, 2009.
- PETTIT, G. R.; TAN, R. et al. Antineoplastic agents 596. Isolation and structure of chromomycin A5 from a beaufort Sea microorganism. **RSC Advances**, England, v. 5, p. 9116–9122, 2015.
- QUEIROLO, P. et al. Immune-checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic melanoma: a model of cancer immunotherapy. **Seminars in Cancer Biology**, n. June, p. 0–1, 2019.
- RADOGNA, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Natural modulators of the hallmarks of immunogenic cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 162, n. January, p. 55–70, 2019.
- RODRÍGUEZ-SALAZAR, M. D. C. et al. The novel immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. **Oncology Letters**, v. 14, n. 1, p. 844–852, 2017.
- SUI, X. et al. Autophagy and chemotherapy resistance: A promising therapeutic target for cancer treatment. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 10, p. 1–12, 2013.
- TEIMOURI, F.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. 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.
- VANMEERBEEK, I. et al. Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology. **OncoImmunology**, v. 9, n. 1, p. e1703449, 2020.
- WEINER, L.; MURRAY, J.; SHUPTRINE, C. Antibody-based immunotherapy of cancer: New insights, new targets. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1081–1084, 2012.
- WILKE, D. V. et al. Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Medica**, v. 87, n. 1–2, p. 49–70, 2021.

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

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

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

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

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

FULDA, S., DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**. V. 25, p. 4798–4811, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MELCHIOR, K. et al. Avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade do polímero poli-ε-caprolactona (PCL) e poli-ε-caprolactona funcionalizada com fibroína, vidro

bioativo e incorporada oxipatita dopada com lantânio. **Rev Ciên Farm Básica Apl.**, v. 37, 2016

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

TEWARI, M. L.T.; QUAN, K.O.; ROURKE, S.; DESNOYERS, Z.; ZENG, D.R.; BEIDLER, G.G.; POIRIER, G.S.; SALVESEN, N.; CAROLINA, Y. CPP3213 , a Mammalian Homolog of CED-3, Is a CrmA-Inhibitable Protease That Cleaves the Death Substrate Poly (ADP-Ribose) Polymerase, *Cell*. 81 (1995) 801–809. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90541-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90541-3).

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

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

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

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

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

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

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

PETTIT, G. R.; TAN, R. *et al.* Antineoplastic agents 596. Isolation and structure of chromomycin A5 from a beaufort Sea microorganism. **RSC Advances**, England, v. 5, p. 9116-9122, 2015.

GONZÁLEZ-SABÍN, J.; MORÍS, F. B. Exploring novel opportunities for aureolic acids as anticancer drugs. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 2-4, 2013.

FERLA, B. L. *et al.* Natural glycoconjugates with antitumor activity. **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 28 p. 630-648, 2011.

