



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

JOSÉ EDUARDO DE MELO SOEIRO

**CROMOMICINA A5 INDUZ ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DE MORTE CELULAR
IMUNOGÊNICA EM LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO COM MUTAÇÃO
BRAF**

FORTALEZA

2025

JOSÉ EDUARDO DE MELO SOEIRO

CROMOMICINA A5 INDUZ ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DE MORTE CELULAR
IMUNOGÊNICA EM LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO COM MUTAÇÃO BRAF

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

FORTALEZA

2025

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

S664c Soeiro, José Eduardo de Melo.

Cromomicina A5 induz alterações fenotípicas de morte celular imunogênica em linhagem de melanoma humano com mutação BRAF / José Eduardo de Melo Soeiro. – 2025.
76 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

1. Produtos Naturais. 2. Morte Celular Imunogênica. 3. Melanoma Metastático. I. Título.

CDD 615.1

JOSÉ EDUARDO DE MELO SOEIRO

CROMOMICINA A5 INDUZ ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DE MORTE CELULAR
IMUNOGÊNICA EM LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO COM MUTAÇÃO BRAF

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Paula Rezende Teixeira
Universidade de Santo Amaro (UNISA)

Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus avós, Luiz e Conceição, por me apoiarem incondicionalmente.

Aos meus pais, Paulo e Marqueleia, que nunca me deixaram desistir.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo e Marqueleia, vocês são o alicerce da minha vida, obrigado por me motivarem tanto durante a escrita deste manuscrito.

Aos meus avós, Luiz e Conceição, vocês são a luz na minha vida, obrigado por garantirem que nunca me faltasse nada.

Ao meu irmão, Henrique, pelo apoio constante e por tornar a escrita deste manuscrito menos tediosa.

À Mirella, minha amada companheira de todas as horas. Nossas lutas estão sendo recompensadas.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Diego Veras Wilke, pela excelente orientação, dedicação e ensinamentos ao longo de todo o trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong e Profa. Dra. Paula Rezende Teixeira, pelo tempo dedicado, pelas valiosas contribuições e sugestões oferecidas.

Aos amigos que fiz na bancada do laboratório — Clara, Katharine, Maísa, Marcelo Fernandes, Marcelo Lima, Mariana, Thaís e Yuri — pelos ensinamentos, reflexões, críticas e sugestões compartilhadas ao longo da jornada.

Às professoras colaboradoras, Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo e Profa. Dra. Paula Rezende Teixeira, pelo apoio técnico e científico fundamental durante a aquisição e análise dos dados de qPCR.

Aos amigos e colegas que contribuíram, direta ou indiretamente, para minha formação profissional e pessoal. Sem vocês, essa caminhada teria sido muito mais difícil.

À rede de pesquisa PROSPECMAR, do qual este trabalho faz parte, pelo suporte e oportunidade de aprendizado.

À Unidade Multiusuário do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, pelo suporte técnico fundamental à realização deste trabalho.

RESUMO

CROMOMICINA A5 INDUZ ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DE MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA EM LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO COM MUTAÇÃO BRAF

A morte celular imunogênica (MCI) representa uma forma de morte celular regulada, caracterizada não apenas pela eliminação de células tumorais, mas também pela indução de uma resposta imune adaptativa contra o próprio tumor. Essa forma de morte celular é marcada por eventos fenotípicos de autofagia, estresse de retículo e apoptose. Dentre os marcadores típicos, tem-se a exposição de calreticulina (CRT) na membrana plasmática, a liberação extracelular da proteína HMGB1 e de ATP, que atuam como sinais de alerta e recrutamento imunológico. A prospecção de fármacos capazes de desencadear MCI têm emergido como alternativa promissoras, sobretudo em neoplasias agressivas e resistentes, como o melanoma metastático. A cromomicina A5 (CA5), isolada da bactéria marinha *Streptomyces* sp. BRA-384, demonstrou, em estudos pré-clínicos com modelos murinos, capacidade de induzir MCI. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos imunogênicos da CA5 em modelos de melanoma humano, utilizando a linhagem SK-MEL-28 (com mutação V600E em BRAF), a fim de avaliar seu potencial translacional. A molécula foi obtida a partir do cultivo da cepa *Streptomyces* sp. BRA-384, seguido de extração e purificação conforme protocolos previamente padronizados, com foco na maximização do rendimento e pureza do composto. A atividade citotóxica da CA5 foi avaliada por meio do ensaio de SRB. A citometria de fluxo foi empregada para análise de parâmetros morfológicos, integridade de membrana plasmática, exposição de calreticulina na superfície celular e liberação da proteína nuclear HMGB1, ambos considerados marcadores clássicos da MCI. Adicionalmente a expressão de genes associados à apoptose, ao estresse do retículo endoplasmático e à autofagia foi avaliada por PCR quantitativa (qPCR) após 6 e 24 horas da exposição à CA5. Os resultados revelaram que a CA5 possui atividade citotóxica e citostática dependente da concentração, com uma concentração inibitória total (CIT) de aproximadamente 4 nM. A análise da citometria de fluxo evidenciou aumento da granulosidade, redução do volume celular e perda da integridade de membrana, alterações compatíveis com estresse celular e morte celular regulada. A análise de expressão gênica indicou a regulação de nove genes relacionados à morte celular imunogênica, incluindo apoptose, estresse do retículo endoplasmático e autofagia. Foi também observada a exposição de CRT na membrana celular, sugerindo o início de um processo imunogênico de morte celular. No entanto, não foi detectada a liberação de HMGB1 no tempo analisado, o que pode estar relacionado à natureza tardia desse evento na cascata da MCI. Os resultados obtidos demonstram que a CA5 induz características compatíveis com MCI *in vitro*, em células de melanoma humano, replicando parcialmente os efeitos previamente observados em modelos murinos. Tais evidências reforçam o potencial translacional da CA5 como um protótipo terapêutico promissor na imunoterapia do câncer, especialmente para o tratamento de melanomas agressivos.

Palavras-chave: morte celular imunogênica; melanoma maligno; produtos naturais.

ABSTRACT

CHROMOMYCIN A5 INDUCES PHENOTYPIC CHANGES OF IMMUNOGENIC CELL DEATH IN A HUMAN MELANOMA CELL LINE WITH BRAF MUTATION

Immunogenic cell death (ICD) represents a specialized form of regulated cell death characterized not only by the elimination of tumor cells but also by the induction of an adaptive immune response against the tumor itself. This form of cell death is marked by phenotypic events such as autophagy, endoplasmic reticulum stress and apoptosis. The exposure of calreticulin (CRT) on the plasma membrane, extracellular release of HMGB1 protein and ATP, act as danger signals and promote immune recruitment. The search for pharmacological agents capable of triggering ICD has emerged as a promising alternative, particularly for aggressive and therapy-resistant neoplasms such as metastatic melanoma. Chromomycin A5 (CA5), isolated from the marine bacterium *Streptomyces* sp. BRA-384, has demonstrated, in preclinical studies using melanoma murine models, the ability to induce ICD. In this context, the present study aimed to investigate the immunogenic effects of CA5 in human melanoma models using the SK-MEL-28 cell line (BRAF V600E mutation) to assess its translational potential. The molecule was obtained through the cultivation of the *Streptomyces* sp. BRA-384 strain, followed by extraction and purification according to previously standardized protocols, with a focus on maximizing yield and compound purity. The cytotoxic activity of CA5 was assessed using the sulforhodamine B (SRB) assay. Flow cytometry was employed to analyze morphological parameters, plasma membrane integrity, CRT exposure on the cell surface, and HMGB1 release, both considered classical ICD markers. Additionally, the expression of genes associated with apoptosis, endoplasmic reticulum stress, and autophagy was evaluated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) at two time points: 6 and 24 hours after exposure to CA5. The results revealed that CA5 exhibits concentration-dependent cytotoxic and cytostatic activity, with a total growth inhibition (TGI) concentration of approximately 4 nM. Flow cytometry analysis showed increased cell granularity, reduced cell volume, and loss of membrane integrity—alterations consistent with cellular stress and regulated cell death. Gene expression analysis indicated the modulation of nine genes associated with regulated cell death pathways, including apoptosis, endoplasmic reticulum stress, and autophagy. CRT exposure on the cell surface was also observed, suggesting the initiation of an immunogenic cell death process. However, HMGB1 release was not detected at the analyzed time point, which may be attributed to the late occurrence of this event in the ICD cascade. The findings demonstrate that CA5 induces features consistent with ICD *in vitro* in human melanoma cells, partially reproducing effects previously observed in murine models. These results support the translational potential of CA5 as a promising therapeutic prototype in cancer immunotherapy, especially for the treatment of aggressive melanomas.

Keywords: immunogenic cell death; malignant melanoma; natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Capacidades adquiridas pelas células tumorais para o desenvolvimento e progressão tumoral.....	14
Figura 2 – Mecanismos envolvidos na morte celular imunogênica (MCI).....	20
Figura 3 – Mapa mundial com destaque para o Brasil e a Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil.....	22
Figura 4 – Estrutura molecular representativa das cromomicinas A2 e A3.....	24
Figura 5 – Estrutura molecular representativa das cromomicinas A5 a A8 isoladas de <i>Streptomyces</i> sp.....	25
Figura 6 – Planejamento experimental do estudo desenvolvido.....	30
Figura 7 – Etapas do processo de crescimento da cepa de <i>Streptomyces</i> sp. BRA-384 e obtenção do extrato bruto de cromomicinas.....	32
Figura 8 – Estratégia de gates para citometria de fluxo.....	34
Figura 9 – Estratégia de gates para análise de morfologia celular.....	35
Figura 10 – Estratégia de gates na citometria de fluxo para análise e aquisição de dados da integridade de membrana.....	36
Figura 11 – Estratégia de gates na citometria de fluxo para análise e aquisição de dados sobre a exposição de calreticulina na membrana plasmática.....	38
Figura 12 – Estratégia de gates na citometria de fluxo para análise e aquisição de dados sobre a liberação de HMGB1.....	40
Figura 13 – Efeito da cromomicina A5 sobre a proliferação celular em células da linhagem SK-MEL-28.....	42
Figura 14 – Avaliação de alterações na morfologia celular da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 e controles em 24 horas.....	44
Figura 15 – Avaliação da integridade de membrana da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 e controles em 24 horas.....	46
Figura 16 – Avaliação da externalização da celreticulina da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 e controles em 24 horas.....	48
Figura 17 – Avaliação da liberação de HMGB1 da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 e controles em 24 horas.....	50
Figura 18 – Avaliação da expressão gênica da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 em 6 e 24 horas.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	trifosfato de adenosina
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CA2	cromomicina A2
CA3	cromomicina A3
CA5	cromomicina A5
CA6	cromomicina A6
CD8	<i>cluster of differentiation 8</i>
CD80	<i>cluster of differentiation 80</i>
CD86	<i>cluster of differentiation 86</i>
CD91	<i>cluster of differentiation 91</i>
CDKN2	inibidor de cinase dependente de ciclina 2A
CDs	células dendríticas
CI ₅₀	concentração inibitória média
CIT	inibição total do crescimento
CL ₅₀	concentração letal média
CRT	calreticulina
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein 4</i>
DAMPs	<i>damage associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIF2 α	<i>eukaryotic translation initiation fator 2A</i>
FACS	do inglês <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> ou Classificação de células ativada por fluorescência
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
HMGB1	<i>High-Mobility Group Box 1</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> ou Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IFN- γ	interferon gama
IL-17	interleucina 17

INCA	Instituto Nacional do Câncer
LaBBMar	Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha
LAFIPLAM	Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais
LC3-II	<i>Light Chain 3 II</i>
LRP1	<i>low density protein receptor-related protein 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MCI	morte celular imunogênica
MFI	intensidade de fluorescência mediana
nm	nanômetros
nM	nanomolar
PBS	tampão fosfato salino
PD-1	<i>Programmed cell Death protein 1</i>
PDIA3	<i>protein disulfide isomerase family A member 3</i>
PDT	terapia fotodinâmica
PN	produtos naturais
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RE	retículo endoplasmático
ROS	espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
SNAP25	<i>synaptosomal-associated protein, 25 KDa</i>
SRB	Sulforrodamina B
TBX2	<i>T-box Transcription Factor 2</i>
TCA	ácido tricloroacético
TLR2	<i>toll-like receptor 2</i>
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i>
UV	ultravioleta
VAMP1	<i>vesicle-associated membrane protein 1</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> ou Organização Mundial de Saúde
ZEE	Zona Econômica Exclusiva
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Câncer.....	13
1.1.1. Melanoma metastático.....	15
1.2. Morte Celular Imunogênica.....	17
1.3. Produtos Naturais Marinhos.....	21
1.3.1. Cromomicinas.....	23
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MÉTODOS E TÉCNICAS.....	29
4.1. Planejamento Experimental.....	29
4.2. Obtenção da cromomicina A5.....	30
4.2.1. Crescimento da cepa bacteriana.....	30
4.2.2. Extração, isolamento e obtenção da cromomicina A5.....	31
4.3. Avaliação da atividade citotóxica in vitro.....	32
4.3.1. Ensaio de sulforodamina B (SRB).....	32
4.4. Estudo dos efeitos da cromomicina A5 em células SK-MEL-28 por citometria de fluxo.....	33
4.4.1. Estratégia de gates.....	34
4.4.2. Análise de dados.....	34
4.4.3. Avaliação da morfologia celular por citometria de fluxo.....	35
4.4.4. Avaliação da perda da integridade de membrana.....	36
4.4.5. Avaliação da externalização de calreticulina na superfície da membrana plasmática.....	37
4.4.6. Avaliação da liberação da HMGB1.....	39
4.5. Estudo dos efeitos da cromomicina A5 por PCR quantitativa (qPCR).....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Atividade citotóxica in vitro da cromomicina A5 (CA5).....	41
5.2. Avaliação dos efeitos da cromomicina A5 em células SK-MEL-28.....	42
5.2.1. Condições experimentais para testes de citometria de fluxo e PCR quantitativa (qPCR).....	42
5.2.2. Alterações na morfologia celular.....	43
5.2.3. Alterações na integridade da membrana plasmática.....	45
5.2.4. Avaliação da externalização de calreticulina (CRT) na superfície da membrana plasmática.....	47
5.2.5. Avaliação da liberação da HMGB1.....	49
5.2.6. Avaliação da expressão gênica induzida pela CA5 por qPCR.....	50
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO.....	65
8. REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

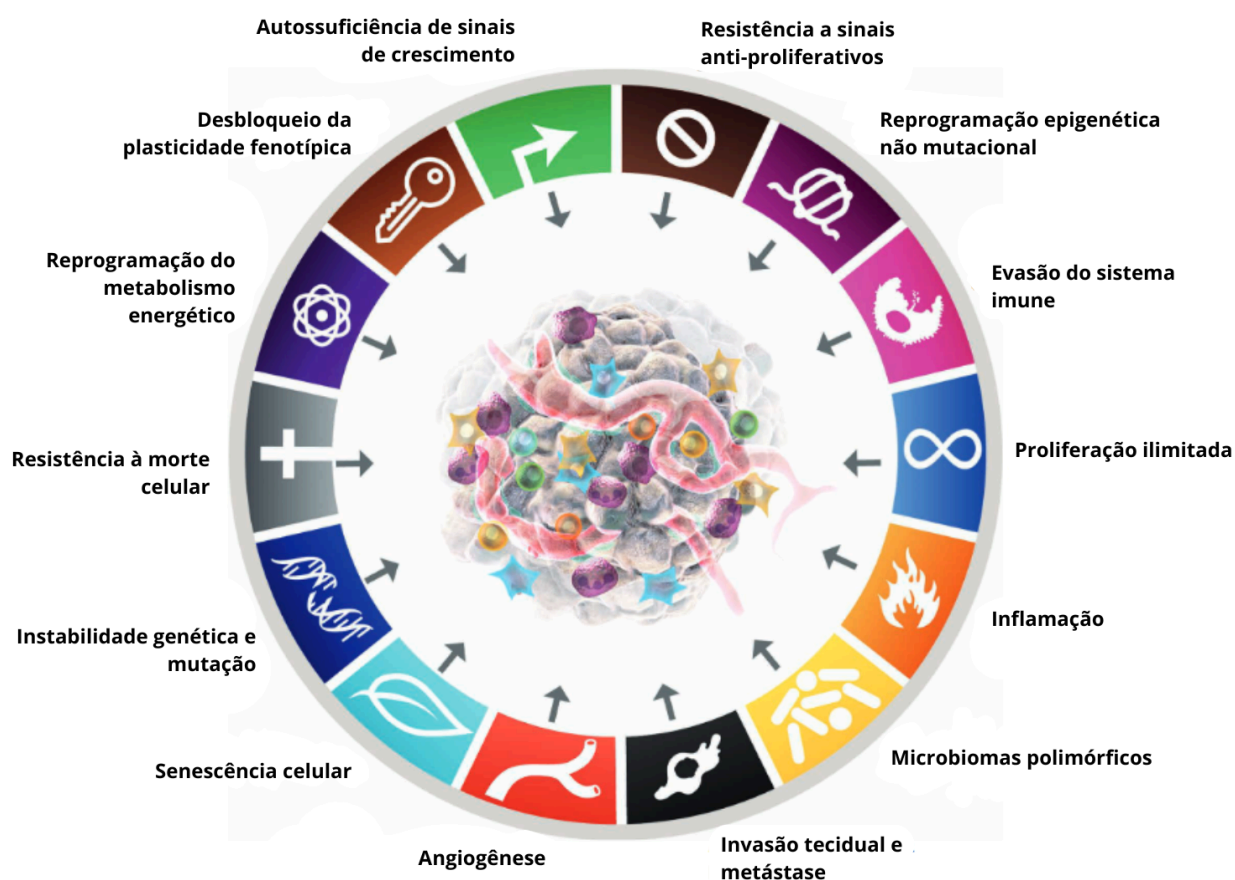
O câncer representa um conjunto heterogêneo de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células anormais, que podem invadir tecidos adjacentes e originar metástases (Katzung; Vanderah, 2023). Esse crescimento desregulado geralmente decorre de mutações genéticas que comprometem mecanismos essenciais de controle celular, como proliferação, apoptose, diferenciação e reparo do DNA (WHO, World Health Organization, 2022).

Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento do câncer, incluindo predisposição genética, exposição a agentes carcinogênicos, infecções virais e hábitos de vida pouco saudáveis (IARC, International Agency for Research on Cancer, 2010). Atualmente, mais de 100 tipos de câncer são reconhecidos, sendo classificados conforme a origem celular ou órgão afetado (Hanahan, 2022).

As opções terapêuticas incluem cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapias-alvo e, mais recentemente, imunoterapia. Esta última tem se destacado por sua capacidade de estimular o sistema imunológico a reconhecer e eliminar células tumorais, especialmente em casos refratários aos tratamentos convencionais (Esfahani *et al.*, 2020). Nesse contexto, o desenvolvimento de novas estratégias imunoterapêuticas é fundamental para ampliar as alternativas de tratamento e melhorar o prognóstico de pacientes oncológicos (Weiner; Murray; Shuptrine, 2012).

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na transformação celular maligna avançou significativamente nas últimas décadas, sendo sistematizada pelo conceito dos *hallmarks* do câncer. Proposto por Hanahan e Weinberg (Figura 1), esse modelo descreve as propriedades biológicas essenciais adquiridas pelas células tumorais ao longo da carcinogênese, que lhes conferem vantagens proliferativas, evasão de mecanismos de supressão e adaptação ao microambiente tumoral.

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



Fonte: Hanahan, (2022, com adaptações).

Inicialmente, foram descritas seis características fundamentais: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese e capacidade de invasão e metástase (Hanahan; Weinberg, 2000). Posteriormente, foram incluídas outras propriedades emergentes, como instabilidade genômica, inflamação tumoral, evasão da resposta imune e reprogramação metabólica (Hanahan; Weinberg, 2011).

Atualizações recentes também consideram aspectos como a plasticidade celular, influência do microbioma, estados de ativação não mutacionais e a senescência associada à progressão tumoral (Hanahan, 2022). Esses *hallmarks* fornecem uma estrutura conceitual valiosa para compreender a complexidade do câncer e têm guiado o desenvolvimento de terapias mais específicas e eficazes.

Dentre os elementos centrais da biologia tumoral, destaca-se o microambiente tumoral, que exerce papel determinante na carcinogênese. Composto por células não

tumorais, como fibroblastos associados ao câncer, células endoteliais, células imunes, matriz extracelular, citocinas e vesículas extracelulares, o microambiente participa ativamente da progressão tumoral (Xiao; Yu, 2021). Ele favorece a proliferação celular, induz angiogênese, promove inflamação crônica, suprime respostas imunes e facilita processos de invasão e metástase. Além disso, contribui para a resistência terapêutica e para a adaptação fenotípica das células tumorais, consolidando-se como um alvo relevante para intervenções terapêuticas modernas (Zhang *et al.*, 2022).

O câncer representa um dos principais desafios de saúde pública no Brasil e no mundo. De acordo com as estimativas mais recentes do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o país deverá registrar cerca de 704 mil novos casos de câncer por ano no triênio 2023–2025. Excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma, esse número corresponde a aproximadamente 483 mil casos anuais.

Dados de distribuição regional dos casos de câncer no Brasil do INCA (2023) revelam que as regiões Sul e Sudeste concentram cerca de 70% da incidência total, influenciada por fatores como maior urbanização, envelhecimento populacional e estilos de vida que incluem sedentarismo, alimentação inadequada e consumo de álcool e tabaco. Além disso, observa-se uma heterogeneidade na incidência de tipos específicos de câncer entre as regiões. Por exemplo, o câncer do colo do útero é mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste, refletindo desigualdades no acesso a serviços de saúde e programas de prevenção, como apontam estudos do Instituto Nacional de Câncer.

Esses dados destacam a importância de estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento eficaz, adaptadas às realidades regionais e às necessidades específicas da população brasileira (Sui *et al.*, 2013).

1.1.1. Melanoma metastático

O melanoma é uma neoplasia maligna originada a partir de melanócitos, células especializadas na produção de melanina, localizadas predominantemente na pele, mas também presentes em estruturas como olhos e mucosas. A formação do melanoma envolve uma série de alterações genéticas e moleculares que conferem aos melanócitos características de crescimento descontrolado e potencial metastático (Gray-Schopfer; Wellbrock; Marais, 2007).

O desenvolvimento do melanoma envolve uma série de alterações genéticas progressivas em melanócitos inicialmente normais, os quais podem acumular mutações em genes fundamentais responsáveis pelo controle do ciclo celular, apoptose e mecanismos de

reparo do DNA. Dentre as mutações mais frequentemente associadas ao melanoma destacam-se aquelas nos genes BRAF (do inglês, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), NRAS (do inglês, *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*) e CDKN2A (do inglês, *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) (Brombin; Patton, 2024). Em particular, a mutação BRAF V600E — na qual ocorre a substituição do aminoácido valina (V) por ácido glutâmico (E) na posição 600 — resulta em uma ativação constitutiva da via de sinalização MAPK (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase*), promovendo a proliferação celular de forma independente de estímulos mitogênicos externos, presente em uma proporção significativa de casos de melanoma cutâneo e associada a formas mais agressivas da doença (Brombin; Patton, 2024).

O desenvolvimento do melanoma pode ser descrito em fases distintas. Na fase de crescimento radial, as células tumorais se proliferam horizontalmente na epiderme (Rastrelli *et al.*, 2014). Com a progressão para a fase de crescimento vertical, as células adquirem capacidade invasiva, penetrando nas camadas mais profundas da derme e, eventualmente, alcançando vasos linfáticos e sanguíneos, o que facilita a disseminação metastática (Eddy; Chen, 2020; Pavri *et al.*, 2016).

O melanoma cutâneo destaca-se em seus dados epidemiológicos por sua agressividade e potencial metastático (Arnold *et al.*, 2022). Dados específicos sobre a incidência de melanoma metastático em nível nacional são escassos. No entanto, estudos regionais, como o realizado no Distrito Federal, indicam que aproximadamente 35% dos casos de melanoma podem evoluir para a forma metastática. Essa progressão está associada a um prognóstico reservado, apesar dos avanços terapêuticos recentes, como o uso de inibidores de *checkpoint* imunológico, que têm melhorado significativamente as taxas de sobrevida (Brasil, 2024).

A exposição à radiação ultravioleta (UV) é um fator de risco significativo para o melanoma, pois pode induzir danos diretos ao DNA, como dímeros de pirimidina, levando a mutações se não forem adequadamente reparadas. Essas mutações podem afetar genes supressores de tumor e proto-oncogenes, contribuindo para a transformação maligna dos melanócitos (Sample; He, 2018).

Embora o melanoma represente uma pequena proporção dos cânceres de pele, é responsável pela maioria das mortes relacionadas a esses tumores, devido à sua alta capacidade de metastatizar (Song *et al.*, 2015). A taxa de sobrevivência em cinco anos para melanoma metastático é doze vezes menor em comparação com os estágios iniciais da doença (Sandru *et al.*, 2014).

As terapias atuais para o tratamento do melanoma, especialmente nas formas

metastáticas, evoluíram significativamente nas últimas décadas, incorporando abordagens mais específicas e eficazes (Teimouri; Nikfar; Abdollahi, 2013). Inicialmente, a quimioterapia convencional, com agentes como dacarbazina e temozolomida, era amplamente utilizada. No entanto, essas terapias apresentavam eficácia limitada, com taxas de resposta inferiores a 10% e sobrevida média de aproximadamente 6 meses (Luke *et al.*, 2017).

A introdução da imunoterapia revolucionou o tratamento do melanoma. Inibidores de *checkpoint imunológico*, como ipilimumabe (anti-CTLA-4) e nivolumabe (anti-PD-1), usados em conjunto em estudos clínicos demonstraram um aumento de pelo menos cinco meses na sobrevida livre de progressão dos pacientes quando comparados aos tratamentos separadamente (Larkin *et al.*, 2015).

Além disso, terapias alvo-direcionadas, como vemurafenibe e dabrafenibe, que atuam como inibidores seletivos da mutação BRAF V600E, demonstraram eficácia clínica significativa em pacientes portadores dessa alteração molecular. Esses fármacos bloqueiam a sinalização aberrante da via MAPK. A utilização combinada de inibidores de BRAF com inibidores de MEK (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*), como o trametinibe, tem mostrado resultados promissores ao prolongar a sobrevida livre de progressão da doença em 12,7 meses em relação aos tratamentos isolados (Robert *et al.*, 2019; Atkins *et al.*, 2023).

O tratamento do melanoma em fase metastática evoluiu com a introdução de terapias imunológicas e alvo-específicas, que melhoraram a sobrevida dos pacientes. No entanto, devido à alta especificidade e à refratariedade desse tipo tumoral, novas abordagens terapêuticas ainda são necessárias (Heinhuis *et al.*, 2019). Estratégias que estimulem a imunogenicidade do melanoma, como a combinação de imunoterapia com quimioterapia imunogênica ou seu uso isolado, têm demonstrado resultados promissores (Galluzzi *et al.*, 2020)

1.2. Morte Celular Imunogênica

A morte celular imunogênica (MCI) é um processo específico de morte celular regulada que promove a ativação do sistema imune adaptativo, especialmente relevante para o tratamento do câncer (Galluzzi *et al.*, 2020). A morte celular imunogênica é desencadeada pela liberação de sinais de perigo, conhecidos como DAMPs (do inglês, *damage-associated molecular patterns*), que são fundamentais para ativar uma cascata de eventos imunológicos que culminam em uma resposta imune tumoral específica e duradoura (Galluzzi *et al.*, 2023). Dentre os principais DAMPs envolvidos destacam-se: a exposição de calreticulina (CRT) e

ERp57 (do inglês *endoplasmic reticulum protein 57*) na membrana plasmática, a liberação da proteína nuclear não-histona HMGB1 (do inglês *high mobility group box 1*), o ATP extracelular e a fosforilação do fator eIF2 α (do inglês *eukaryotic initiation factor 2 alpha*) (Bezu *et al.*, 2018; Radogna; Dicato; Diederich, 2019).

Dentre os medicamentos aprovados e já conhecidos como indutores de MCI, estão as antraciclinas, como a doxorubicina e a epirrubicina, tradicionalmente utilizadas no tratamento de neoplasias hematológicas, câncer de mama e sarcomas (Sprooten *et al.*, 2023). Estes fármacos demonstraram capacidade de induzir MCI por meio da exposição de CRT na superfície celular, liberação de ATP e liberação de HMGB1 intracelular durante o processo apoptótico (Roy *et al.*, 2018). Além disso, a ciclofosfamida, um agente alquilante amplamente utilizado, mostrou potencial para induzir MCI em certos contextos, particularmente quando administrada em doses metronômicas, promovendo uma resposta imunológica antitumoral sustentada (Maharjan *et al.*, 2022).

Outro agente relevante é a oxaliplatina, uma platina de terceira geração aprovada para o tratamento de câncer colorretal, que difere da cisplatina e da carboplatina ao induzir uma forma de apoptose compatível com a MCI, especialmente pela exposição precoce de calreticulina e liberação de ATP e HMGB1 (Bains *et al.*, 2020). Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que o efeito antitumoral da oxaliplatina depende, em parte, da integridade do sistema imunológico adaptativo, o que reforça sua atividade imunogênica (Wang *et al.*, 2022).

Entre as estratégias terapêuticas que demonstraram capacidade de induzir MCI, destacam-se a radioterapia e a fototerapia, tradicionalmente conhecidas por seus efeitos citotóxicos diretos sobre as células tumorais (Rodriguez-Ruiz *et al.*, 2020). Estudos recentes demonstram que a radioterapia, por meio da geração de danos no DNA e estresse celular, pode desencadear a liberação coordenada de DAMPs, promovendo um ambiente imunológico favorável à resposta antitumoral (Zhu *et al.*, 2021).

De modo semelhante, a fototerapia, especialmente a terapia fotodinâmica (PDT), destaca-se como estratégia eficaz para induzir MCI. A ativação de um fotossensibilizador por luz específica leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), promovendo estresse do retículo endoplasmático, liberação de DAMPs e maturação de células dendríticas. Isso desencadeia uma resposta imune adaptativa eficaz, com formação de memória imunológica duradoura (Alzeibak *et al.*, 2021).

A CRT, expressa precocemente na superfície celular durante o estresse do retículo endoplasmático RE, atua como sinal “*eat me*” pré-apoptótico, favorecendo a fagocitose por

células dendríticas via receptor CD91 (ou LRP1, do inglês *low density protein receptor-related protein 1*). A externalização da CRT, co-expressa com a proteína ERp57 (ou PDIA3, do inglês *protein disulfide isomerase family A member 3*) na superfície da membrana plasmática, torna os fagócitos sensíveis a ativação e maturação após a ligação com o receptor anteriormente citado. Esse processo envolve três módulos de sinalização distintos: ativação apoptótica (via caspase 8) e ativação das proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak e Bcl-2); fosforilação de eIF2 α com parada na síntese de proteínas no retículo endoplasmático; mobilização de componentes do citoesqueleto – como a actina, associada ao sinaptossoma de 25 KDa (ou SNAP25, do inglês *synaptosomal-associated protein, 25 KDa*) – e as vesículas da membrana 1 (ou VAMP1, do inglês *vesicle-associated membrane protein 1*) (Kepp *et al.*, 2014; Obeid *et al.*, 2007).

Outro DAMP essencial para a ocorrência do processo de MCI é a presença da proteína HMGB1 no meio extracelular, onde ela atua como um potente indutor pró-inflamatório não tolerogênico. A HMGB1, liberada tardiamente após a permeabilização das membranas nucleares e plasmáticas, se liga aos receptores TLR2 (do inglês *toll-like receptor 2*), TLR4 (do inglês *toll-like receptor 4*) e RAGE (do inglês *receptor for advanced glycation endproducts*). A ligação ao TLR4 é essencial para a indução de resposta imune eficaz, conforme demonstrado por modelos *knockout*, em que, mesmo na ausência dos demais receptores o efeito ainda persistia (Apetoh *et al.*, 2007). O processo de liberação da HMGB1 é desencadeado quando as células sofrem necrose secundária tardia ou após liberação vesicular. Devido a isso, a liberação desse DAMP ocorre de forma tardia (Wang *et al.*, 2018).

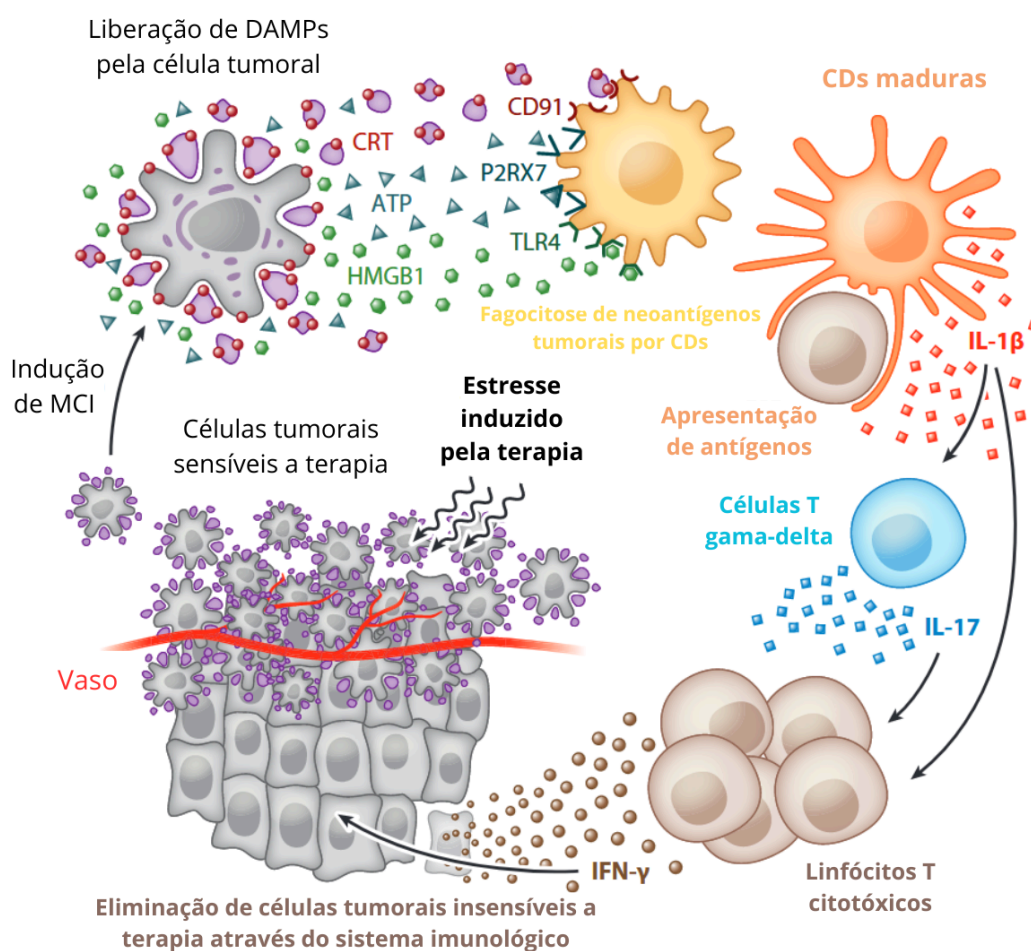
A exposição e liberação dos DAMPs durante o processo de MCI seguem uma sequência de eventos biologicamente organizada no tempo (Kepp *et al.*, 2014). Inicialmente, destaca-se a necessidade de ativação das células dendríticas (CDs), as quais desempenham papel fundamental na fagocitose, processamento e apresentação dos antígenos tumorais aos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), promovendo uma resposta imune antitumoral efetiva (Galluzzi *et al.*, 2017).

Complementarmente, as CDs ativadas também realizam a apresentação cruzada de antígenos às células T $\alpha\beta$, além de secretarem interleucina 1 beta (IL-1 β), elemento chave para a ativação das células T $\gamma\delta$. Estas últimas, uma vez ativadas, produzem interleucina 17 (IL-17), contribuindo diretamente para a ativação das células T citotóxicas $\alpha\beta$ (Humeau *et al.*, 2019).

Tanto as células T $\alpha\beta$ quanto as $\gamma\delta$ são reconhecidas por sua capacidade de sintetizar importantes moléculas efetoras, como o interferon gama (IFN- γ), granzimas e perforinas, que

participam diretamente da lise de células tumorais (Figura 2) (Kroemer *et al.*, 2013). Esta cascata de eventos culmina na ativação sistêmica da resposta imune adaptativa, promovendo não apenas a eliminação do tumor primário, mas também a geração de células T de memória (Gomez-Cadena *et al.*, 2016). Esse processo, portanto, é responsável por estabelecer uma resposta imunológica duradoura, sendo essencial para o controle de recidivas tumorais e amplamente estudado como base para estratégias terapêuticas anticâncer.

Figura 2 – Mecanismos envolvidos na morte celular imunogênica (MCI)



Fonte: Kroemer *et al.* (2013, com adaptações).

A validação da MCI pode ser realizada por meio de ensaios *in vitro*, que avaliam a presença de DAMPs, a ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e sua fenotipagem. No entanto, os ensaios *in vivo* são considerados o padrão-ouro, especialmente os experimentos de vacinação. Esse tipo de ensaio consiste na injeção subcutânea de células tumorais previamente tratadas com o composto candidato a indutor de MCI. Após alguns dias, os animais são desafiados com células tumorais viáveis; a ausência ou redução do

crescimento tumoral é interpretada como indicativo de indução de uma resposta imune protetora (Vanmeerbeek *et al.*, 2020).

1.3. Produtos Naturais Marinhos

Os produtos naturais (PNs) têm desempenhado um papel central no desenvolvimento de novos fármacos, especialmente em áreas como oncologia e hematologia (Rayan; Raiyn; Falah, 2017; Prestegard *et al.*, 2009; Jimenez *et al.*, 2020). Estima-se que cerca de 60% dos medicamentos utilizados nessas especialidades sejam oriundos de substâncias naturais, e aproximadamente um terço dos fármacos mais comercializados globalmente são agentes naturais ou seus derivados (Barreca *et al.*, 2020; Rayan; Raiyn; Falah, 2017). Essa expressiva representatividade ressalta a importância da bioprospecção como estratégia para a descoberta de compostos com potencial terapêutico.

Dentre as diversas fontes de produtos naturais, o ambiente marinho tem se destacado como um reservatório particularmente rico e promissor (Jimenez; Wilke; Costa-Lotuf, 2018). A produção de metabólitos secundários por organismos marinhos é frequentemente resultante das pressões seletivas às quais estão submetidos — como competição, predação, variações físico-químicas e necessidade de adaptação ao ambiente (Jimenez *et al.*, 2020).

Essas condições favorecem o surgimento de moléculas estruturalmente únicas, com mecanismos de ação diferenciados e potencial aplicação na indústria farmacêutica, especialmente no desenvolvimento de agentes terapêuticos inovadores (Alves *et al.*, 2020; Negreanu-Pirjol *et al.*, 2022; Sansone *et al.*, 2021). Esses compostos têm demonstrado propriedades farmacológicas relevantes, incluindo atividades antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antitumoral (Wang; Meng; Wang, 2020).

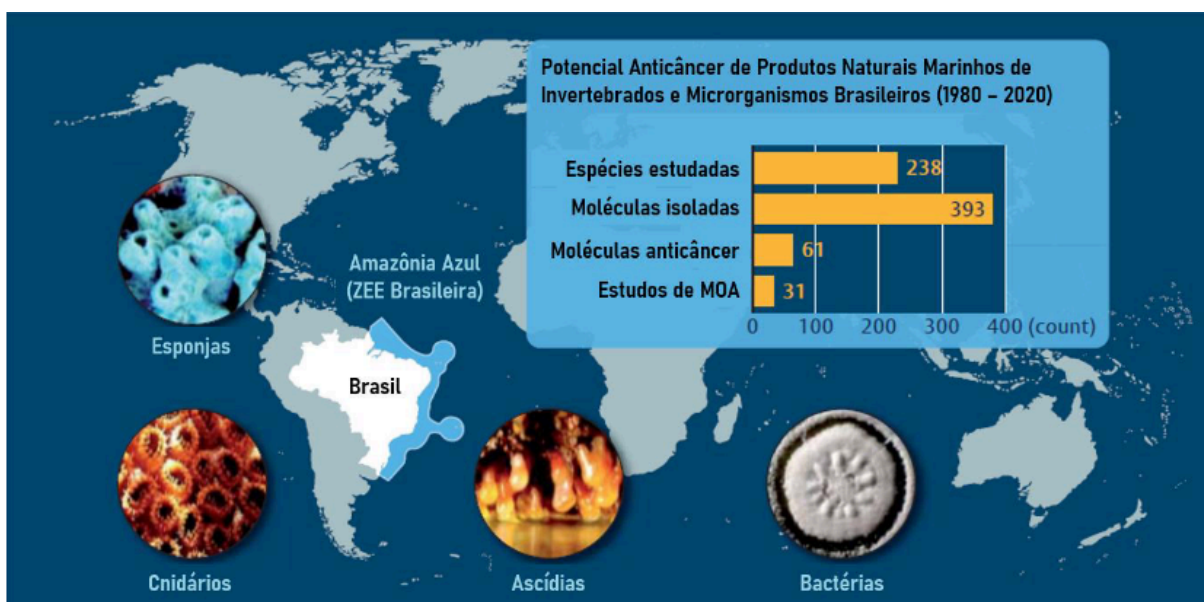
Até 2022, havia 19 fármacos de origem marinha aprovados para uso clínico por diversas agências regulatórias ao redor do mundo (Haque *et al.*, 2022). Desses, 12 foram aprovados para o tratamento do câncer, entre os quais se destacam: *Cytosar*® (citarabina), arabinonucleosídeo isolado da esponja *Tethya crypta*, amplamente utilizado em leucemias, o *Yondelis*® (trabectedina), derivado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, é indicado para sarcomas e câncer de ovário e o *Zepzelca*® (lurbinectedina) aprovado em 2020 para o tratamento de câncer de pulmão de pequenas células (Cooreman *et al.*, 2023).

O Brasil possui uma extensa faixa marítima conhecida como “Amazônia Azul”. Esse território corresponde a uma Zona Econômica Exclusiva (ZEE) e, em termos de extensão, apresenta uma dimensão comparável à da Floresta Amazônica (Wilke *et al.*, 2021). A ampla biodiversidade presente nesta região resulta em elevada variabilidade genética e,

consequentemente, na produção de diversas moléculas com potenciais aplicações farmacológicas (Jimenez *et al.*, 2020).

Wilke e colaboradores (2021) revelaram que aproximadamente 15% dos produtos naturais marinhos isolados em território brasileiro apresentaram atividades com potencial antineoplásico, incluindo efeitos citotóxicos e anti-metastáticos (Figura 3). Esses achados evidenciam o valor da prospecção da biodiversidade marinha nacional como ferramenta essencial na identificação de novos compostos bioativos para o tratamento de doenças complexas, como o câncer, justificando o crescente interesse científico por essa área (Wilke *et al.*, 2021).

Figura 3 – Mapa mundial com destaque para o Brasil e a Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil.



Fonte: Wilke *et al.* (2021, com adaptações).

Nesse sentido, a exploração racional de microrganismos marinhos, especialmente actinobactérias do gênero *Streptomyces*, tem revelado uma diversidade de substâncias bioativas, entre elas as cromomicinas, com reconhecido potencial antineoplásico (Del Bianco Sahn *et al.*, 2022; Florêncio *et al.*, 2022; Guimarães *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2020; Sahn *et al.*, 2020). Diante dos desafios enfrentados no tratamento do câncer, especialmente em neoplasias agressivas como o melanoma metastático, os produtos naturais marinhos despontam como uma valiosa alternativa na busca por terapias inovadoras e mais eficazes.

1.3.1. Cromomicinas

As cromomicinas constituem uma classe de policetídeos tricíclicos glicosilados pertencentes ao grupo dos ácidos aureólicos, o qual engloba compostos policetídeos aromáticos com múltiplas glicosilações, como as mitramicinas, olivomicinas, duramicinas e as próprias cromomicinas (La Ferla *et al.*, 2011). Evidências científicas demonstram que diversos membros desse grupo possuem propriedades antibacterianas, especialmente contra bactérias Gram-positivas, além de atividades antitumorais, com capacidade de inibir a proliferação de células cancerígenas (Pettit *et al.*, 2015).

Entre os compostos mais estudados estão a mitramicina A e a cromomicina A3, sendo a mitramicina A introduzida como agente antineoplásico na década de 1970. Entretanto, o uso clínico dos ácidos aureólicos como agentes quimioterápicos têm sido restrito, principalmente devido ao perfil de toxicidade elevado observado em humanos (La Ferla *et al.*, 2011).

As cromomicinas, metabólitos secundários sintetizados por bactérias do gênero *Streptomyces*, destacam-se por suas propriedades antimicrobianas e antitumorais. Entre os compostos mais estudados dessa classe, a cromomicina A3 (CA3) tem demonstrado significativa atividade antineoplásica (Chakrabarti; Dasgupta; Bhattacharyya, 2000).

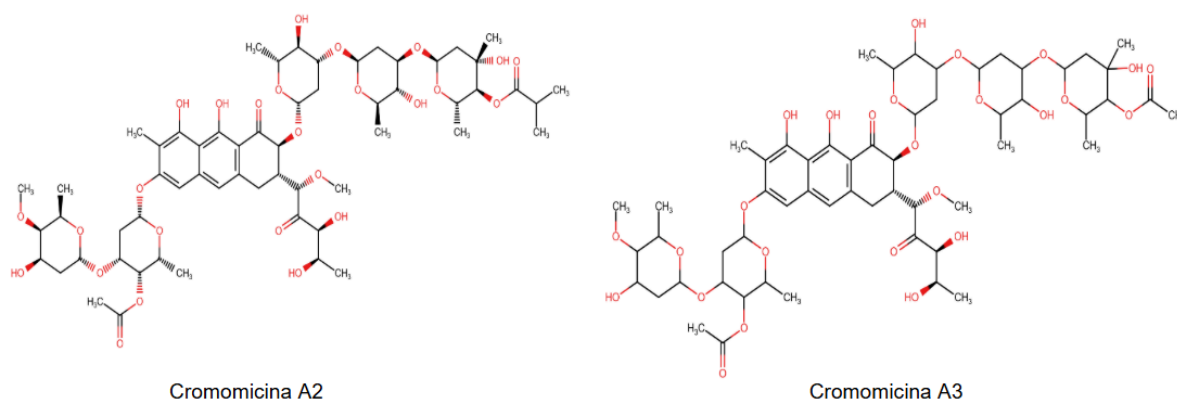
As cromomicinas se ligam de maneira reversível às regiões menores do sulco do DNA, com alta afinidade por sequências ricas em citosina e guanina, especialmente na presença de íons metálicos como o magnésio (Mg^{2+}). Essa interação impede processos essenciais à viabilidade celular, como a replicação e a transcrição do material genético (Chakrabarti; Dasgupta; Bhattacharyya, 2000). Além disso, em razão de sua capacidade de se associar ao DNA e emitir fluorescência, as cromomicinas têm sido amplamente empregadas como sondas fluorescentes na marcação de ácidos nucleicos (Brammer; Toniazzo; Poersch, 2015).

Guimarães e colaboradores (2014) investigaram os efeitos da cromomicina A2 (CA2) sobre células de melanoma humano, destacando seu potencial como agente antitumoral. Os autores demonstraram que a CA2 reduz significativamente a viabilidade celular de forma concentração-efeito, tendo a autofagia como principal mecanismo de morte celular induzido. Evidências dessa atividade incluíram a formação de autofagossomos e o aumento da expressão da proteína LC3-II, um marcador clássico da ativação autofágica.

Adicionalmente, os resultados indicaram que a CA2 inibe a via de sinalização Akt/mTOR, conhecida por suprimir a autofagia em condições fisiológicas normais. Esse achado reforça a hipótese de que a ativação autofágica observada decorre da ação direta da

substância sobre essa via regulatória (Guimarães *et al.*, 2014). Importante destacar que o processo de morte celular não foi acompanhado por marcadores característicos de apoptose, sugerindo que a CA2 pode representar uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de melanomas resistentes à morte apoptótica convencional (Guimarães *et al.*, 2014). As cromomicinas A2 e A3 estão representadas na Figura 4.

Figura 4 – Estrutura molecular representativa das cromomicinas A2 e A3.

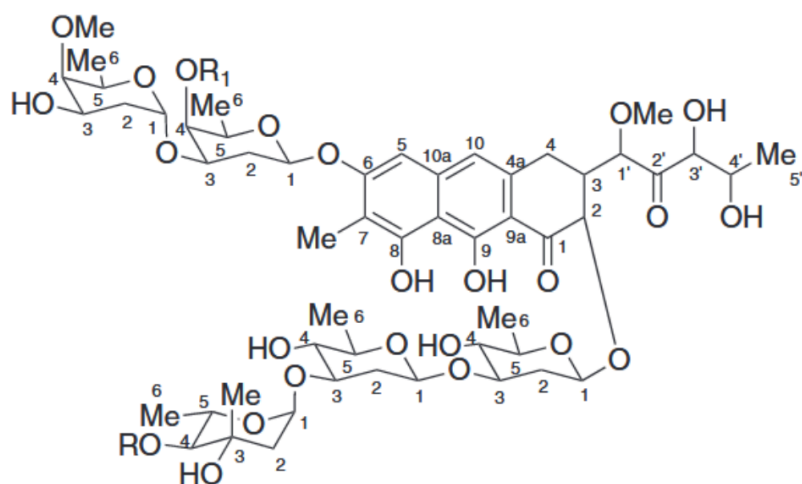


Fonte: Elaborado pelo autor.

O potencial terapêutico das cromomicinas A5 e A6 foi investigado por Sahn e colaboradores (2020) como inibidores funcionais de TBX2 (*T-box Transcription Factor 2*), um gene com papel relevante na tumorigênese por atuar como agente imortalizador das células (Jacobs *et al.*, 2000; Lingbeek, Jacobs, Van Lohuizen, 2002). Os resultados do estudo indicaram que as cromomicinas A5 e A6 podem agir como agentes epigenéticos moduladores da atividade de TBX2, promovendo senescência celular em tumores que dependem dessa via de sinalização (Sahn *et al.*, 2020).

No estudo conduzido por Pinto e colaboradores (2020), foram isoladas e caracterizadas quatro novas cromomicose dextrorrotatórias — cromomicina A5 (CA5), cromomicina A6 (CA6), cromomicina A7 (CA7) e cromomicina A8 (CA8), representadas na Figura 5 — a partir de uma cepa de *Streptomyces* associada ao cnidário *Palythoa caribaeorum*, coletado no litoral brasileiro.

Figura 5 – Estrutura molecular representativa das cromomicinas A5 a A8 isoladas de *Streptomyces* sp.



	R =	R ₁ =	Nome
1	COCH ₃	COCH ₃	A ₆
2	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	A ₇
3	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	A ₅
4	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₂ CH ₃	A ₈

Fonte: Pinto *et al.* (2020, com adaptações)..

Os compostos isolados foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica *in vitro* em diferentes linhagens tumorais humanas. Os resultados demonstraram que as cromomicinas exibiram potente e seletiva atividade antiproliferativa, com destaque para a cromomicina A5, com valores de concentração inibitória média (CI₅₀) na faixa nanomolar, evidenciando seu elevado potencial antineoplásico (Pinto *et al.*, 2020).

Florêncio e colaboradores (2022) demonstraram que a incubação de células de melanoma murino B16-F10 com CA5 resultou em redução significativa da viabilidade celular, associada à liberação de marcadores típicos da morte celular imunogênica (MCI). Entre os achados dos autores estão a exposição da calreticulina (CRT) na superfície celular, bem como a liberação extracelular de ATP e da proteína HMGB1, moléculas que atuam como sinais fagocíticos e de alerta para o sistema imunológico (Florêncio *et al.*, 2022).

Além disso, a vacinação de animais com células tumorais (B16-F10) incubadas com CA5 promoveu a maturação das células dendríticas, evidenciada pelo aumento da expressão de

moléculas co estimuladoras (CD80 e CD86, respectivamente *cluster of differentiation* 80 e 86), pela produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação de linfócitos com atividade antitumoral contra B16-F10, indicando o estabelecimento de uma resposta imune antitumoral (Florêncio *et al.*, 2022). Além disso, com um experimento de vacinação seguido de desafio de animais com células B16-F10 viáveis, observou-se o controle eficiente do crescimento tumoral (Florêncio *et al.*, 2022).

No contexto de terapias citotóxicas para o câncer, a possibilidade de que a cromomicina A5 possa também induzir morte celular imunogênica, por meio da liberação de sinais de perigo (DAMPs) e consequente ativação da resposta imune antitumoral, amplia ainda mais seu potencial terapêutico, alinhando-se às abordagens mais modernas da imunoterapia do câncer (Bezu *et al.*, 2015; Florêncio *et al.*, 2022).

Com a crescente compreensão dos mecanismos de resistência tumoral e da interação entre tumor e sistema imune, a investigação aprofundada da cromomicina A5 pode confirmar a identificação de compostos inovadores com aplicação clínica relevante no combate ao melanoma metastático e outros tipos de câncer agressivo (Green *et al.*, 2009; Hanahan, 2022; Kroemer *et al.*, 2022).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O câncer permanece como um dos maiores desafios em saúde pública global, sendo uma das principais causas de mortalidade por doença nos países desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento (WHO, World Health Organization, 2022). Projeções do GLOBOCAN (2020) indicam que, nas próximas duas décadas, o número de novos casos pode alcançar 22 milhões em todo o mundo, o que reforça a necessidade de aprimoramento contínuo das estratégias terapêuticas disponíveis. No Brasil, o cenário não é diferente: o câncer apresenta elevada incidência e relevância epidemiológica, com impactos significativos sobre o sistema de saúde, tanto no aspecto clínico quanto socioeconômico (INCA, 2023).

A quimioterapia e a imunoterapia constituem abordagens terapêuticas essenciais no combate a diversos tipos de neoplasias (Galluzzi *et al.*, 2017). Embora a quimioterapia esteja associada a múltiplos efeitos adversos em pacientes oncológicos, ela ainda representa a estratégia de tratamento mais amplamente empregada, proporcionando, em muitos casos, aumento da sobrevida e maior probabilidade de cura (Galluzzi *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, a imunoterapia tem se destacado como uma alternativa inovadora no tratamento do câncer, incluindo o melanoma. Os agentes imunoterápicos atuam por diferentes mecanismos com o propósito comum de desencadear uma resposta imune dirigida

contra o tumor (Chattopadhyay *et al.*, 2024). Essa abordagem tem demonstrado elevada eficácia clínica e apresenta menor frequência de efeitos colaterais quando comparada à quimioterapia tradicional (Chattopadhyay *et al.*, 2024).

Entretanto, a aplicação clínica da imunoterapia ainda é limitada por seu alto custo, restringindo seu acesso em larga escala (Chen; Chang; Cheng, 2017). Nesse contexto, a identificação e o desenvolvimento de novas moléculas com propriedades imunogênicas antitumorais, capazes de induzir respostas imunes duradouras e com perfil de toxicidade reduzido, tornam-se estratégias promissoras no aprimoramento do tratamento oncológico (Yu *et al.*, 2019).

Mesmo com o avanço no desenvolvimento de diversos agentes antineoplásicos, ainda se observam limitações importantes no sucesso terapêutico, como falhas nos esquemas de tratamento, elevadas taxas de recidiva, redução da sobrevida e toxicidades associadas às terapias convencionais (Knezevic; Clarke, 2020).

No entanto, a investigação de novos produtos naturais, especialmente aqueles provenientes de organismos marinhos, pode oferecer novas opções terapêuticas. A natureza farmacológica de alguns desses compostos — sua capacidade de tanto induzir citotoxicidade quanto estimular uma resposta imunológica — pode fornecer abordagens terapêuticas inovadoras (Yun; Kim; Lee, 2019).

Diversos fármacos já aprovados para uso clínico demonstraram capacidade de induzir MCI, entre eles a doxorrubicina, a ciclofosfamida, a oxaliplatina e a mitoxantrona (Zitvogel *et al.*, 2013). A doxorrubicina, por exemplo, é amplamente empregada no tratamento de diversos tipos de câncer, como mama, linfomas e sarcomas, sendo um dos principais modelos de indutor de MCI (Casares *et al.*, 2005). A oxaliplatina, utilizada em câncer colorretal, também induz MCI de maneira eficiente, enquanto a ciclofosfamida, além de seu efeito citotóxico, pode modular o microambiente tumoral imunossupressor, ampliando a resposta imunogênica (Bains *et al.*, 2020; Bezu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2022).

Desta forma, a morte celular imunogênica (MCI) pode ser explorada como uma inovação para desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer, ao combinar os efeitos citotóxicos dos quimioterápicos com a ativação do sistema imunológico contra as células tumorais (Galluzzi *et al.*, 2024). Diferentemente das formas clássicas de morte celular, como apoptose e necrose, a MCI é caracterizada pela liberação de sinais de alarme imunológicos que promovem o reconhecimento e a eliminação das células tumorais pelas células do sistema imune (Kepp *et al.*, 2014).

Essas evidências têm impulsionado a busca por novos compostos quimioterápicos

capazes de induzir MCI, especialmente em neoplasias refratárias às terapias convencionais, como o melanoma metastático. A identificação e o desenvolvimento de agentes com esse perfil representam uma estratégia terapêutica inovadora, com potencial para redefinir o tratamento de tumores agressivos e resistentes.

O melanoma é uma neoplasia maligna caracterizada por alta agressividade, baixa incidência relativa, porém elevada letalidade, ganhando destaque no cenário oncológico. Sua rápida capacidade de metastatização e resistência aos quimioterápicos disponíveis evidenciam a necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas para seu controle (Dimitrova; Weber, 2024). Adicionalmente, cerca de 90% dos casos de melanoma apresentam ativação anormal da via de sinalização MAPK, resultando na desregulação do ciclo celular e na inibição da apoptose (Atkins *et al.*, 2023). Entre as mutações mais frequentemente associadas a essa via, destaca-se a alteração no gene BRAF, especialmente a variante V600E (Leonardi *et al.*, 2018). A forma mutada exibe atividade quinase cerca de 500 vezes superior à da proteína BRAF do tipo selvagem, promovendo proliferação celular descontrolada e evasão dos mecanismos fisiológicos de morte celular programada (Rager *et al.*, 2022).

Assim, a investigação de compostos bioativos com potencial de ação sobre mecanismos moleculares capazes de induzir uma resposta imune sistêmica e duradoura, promovendo a apresentação das células tumorais ao sistema imune, representa um avanço promissor na imunoterapia do melanoma metastático (Pavri *et al.*, 2016; Kuijpers; Van Akkooi, 2024).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avançar na translação da cromomicina A5, previamente caracterizada por Florêncio e colaboradores (2022) como indutora de morte celular imunogênica em modelos murinos. A proposta central desta dissertação consistiu em investigar a ocorrência desses mesmos eventos em uma linhagem celular humana portadora da mutação BRAF V600E, visando validar seu potencial terapêutico em um modelo mais representativo da aplicação clínica, especialmente por sua alta relevância médica e agressividade tumoral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a indução de marcadores fenotípicos de morte celular imunogênica em células de melanoma metastático humano pela cromomicina A5.

3.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito citotóxico *in vitro* da cromomicina A5 em células de melanoma metastático humano da linhagem SK-MEL-28;
- II. Avaliar marcadores fenotípicos *in vitro* em células SK-MEL-28 incubadas com CA5;
- III. Avaliar a expressão de genes relacionados à apoptose, autofagia e estresse do retículo endoplasmático em células SK-MEL-28 incubadas com CA5.

4. MÉTODOS E TÉCNICAS

4.1. Planejamento Experimental

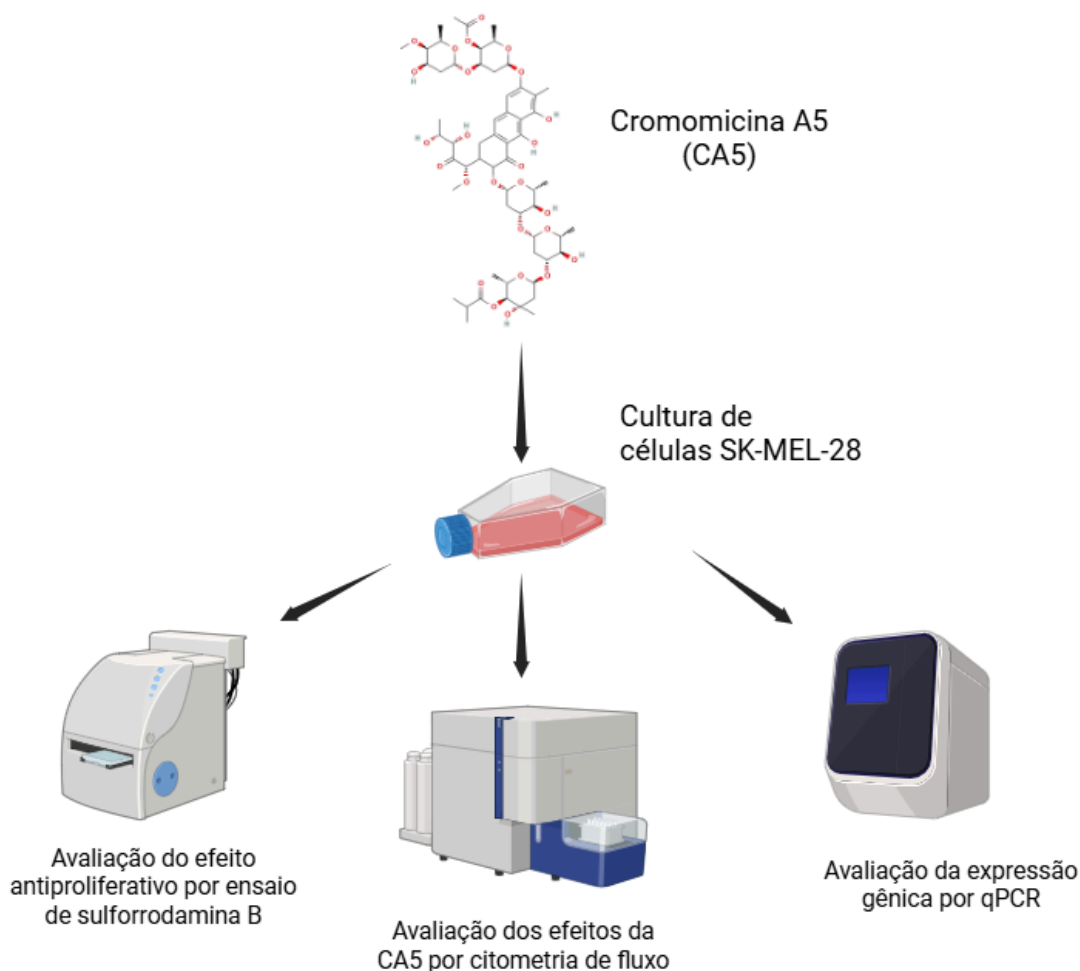
A cromomicina A5 (CA5), utilizada neste estudo, foi produzida por meio do cultivo da cepa bacteriana *Streptomyces* sp. BRA-384, seguindo o protocolo descrito por Marinho (2021), e posteriormente isolada conforme metodologia estabelecida por Pinto e colaboradores (2020). Estudo anterior do nosso grupo demonstrou que a CA5 é capaz de induzir morte celular imunogênica (MCI) em modelos murinos de melanoma metastático (Florêncio *et al.*, 2022).

A linhagem celular humana SK-MEL-28, representativa do melanoma metastático, foi empregada em todos os experimentos, sendo cultivada sob condições padrão (descritas no ANEXO I). A atividade citotóxica da CA5 foi inicialmente avaliada pelo ensaio de sulforrodamina B (SRB), com incubação das células por 24 horas.

Com base nos resultados de viabilidade, experimentos subsequentes foram realizados para elucidar os mecanismos moleculares associados à morte celular induzida pela CA5. As células foram novamente incubadas com a molécula por 24 horas e submetidas à análise por citometria de fluxo, com o objetivo de avaliar a integridade da membrana plasmática, alterações morfológicas, externalização da calreticulina (CRT) e liberação da proteína nuclear HMGB1.

Adicionalmente a expressão de genes relacionados à apoptose, autofagia e estresse do retículo endoplasmático foi quantificada por meio da reação em cadeia quantitativa da polimerase (qPCR). A doxorubicina foi empregada como controle positivo em experimentos de citometria de fluxo, por ser um quimioterápico amplamente utilizado e conhecido como indutor de MCI. O planejamento experimental encontra-se detalhado na Figura 6.

Figura 6 – Planejamento experimental do estudo desenvolvido.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2. Obtenção da cromomicina A5

4.2.1. Crescimento da cepa bacteriana

O processo de cultivo da cepa bacteriana e obtenção da cromomicina A5 foi desenvolvido e otimizado por Marinho (2021), estando representado de forma esquemática na Figura 7. Conforme o protocolo estabelecido, a cepa *Streptomyces* sp. BRA-384, previamente criopreservada no banco de microrganismos marinhos (MicroMarin) do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar), foi inicialmente reativada. Essa etapa consistiu na transferência do conteúdo descongelado do criotubo (aproximadamente 2 mL) para 100 mL de meio A1 líquido (composto por amido, peptona, extrato de levedura e água salgada artificial, simulando condições marinhas), em frasco tipo Erlenmeyer, sob condições estéreis.

Após oito dias de incubação sob agitação orbital a 120 rpm, em temperatura ambiente

(25 °C), alíquotas de 500 µL foram transferidas para placas de Petri contendo meio A1 sólido (semelhante ao meio A1 líquido, contudo, adicionado de ágar), para promover o crescimento e a esporulação da cepa. Após mais oito dias de incubação, as placas contendo o crescimento bacteriano foram utilizadas para o processo de extração do extrato bruto, contendo os metabólitos secundários de interesse, entre eles a cromomicina A5.

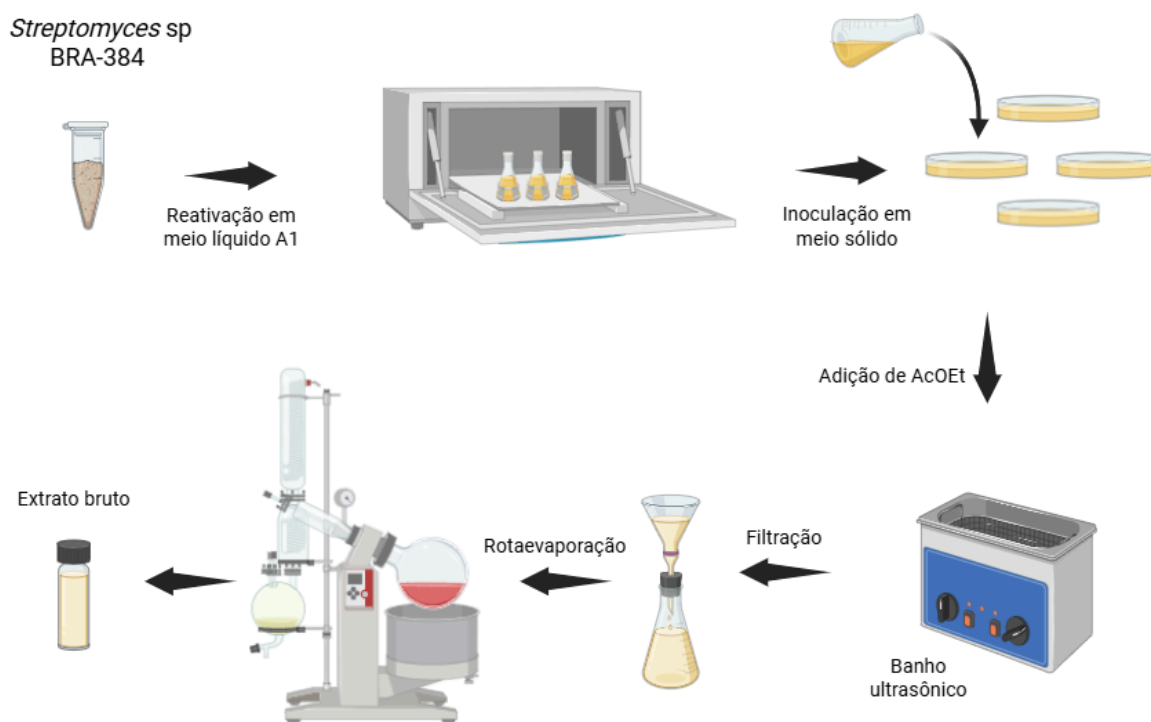
4.2.2. Extração, isolamento e obtenção da cromomicina A5

Dando continuidade ao protocolo previamente estabelecido por Marinho (2021), as placas de Petri contendo o microrganismo cultivado em meio A1 sólido foram fragmentadas com o auxílio de uma espátula em pequenos pedaços, com o objetivo de ampliar a área de superfície exposta, reduzindo o volume de solvente necessário. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para béqueres. Posteriormente, adicionou-se acetato de etila aos béqueres até a completa imersão do material. As amostras foram submetidas a banho de sonicação por 20 minutos a 35 °C, com a finalidade de liberar os metabólitos secundários do substrato sólido. O procedimento de extração por sonicação e filtração foi repetido três vezes consecutivas, a fim de maximizar o rendimento dos compostos bioativos.

O conteúdo líquido obtido foi filtrado por meio de funis contendo algodão, e o filtrado foi coletado em balões apropriados para evaporação do solvente. Os balões foram acoplados ao rotaevaporador, onde o acetato de etila foi removido sob pressão reduzida até a completa secagem. Os extratos concentrados foram transferidos para frascos de vidro previamente tarados e deixados sob exaustão em capela, visando à eliminação de resíduos do solvente. Após completa secagem, os frascos foram armazenados em condições controladas até sua utilização nas análises biológicas.

A extração dos compostos produzidos pela cepa *Streptomyces* sp. BRA-384 foi realizada em colaboração com o Dr. Francisco Chagas Pinto e a Profa. Dra. Otilia Loiola Pessoa, ambos do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM), da Universidade Federal do Ceará (UFC). A seguir, o isolamento e a purificação da cromomicina A5 foram conduzidos pelo Dr. Francisco Chagas Pinto por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*), utilizando protocolos previamente validados no LAFIPLAM.

Figura 7 – Etapas do processo de crescimento da cepa de *Streptomyces* sp. BRA-384 e obtenção do extrato bruto de cromomicinas.



Fonte: Elaborado pelo autor através do *software* Biorender.

4.3. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

4.3.1. Ensaio de sulforodamina B (SRB)

A atividade citotóxica da CA5 foi avaliada pelo ensaio de SRB, conforme metodologia descrita por Skehan *et al.* (1990) com adaptações. Este ensaio baseia-se na ligação do corante SRB, uma aminoxantina aniônica, a resíduos básicos de aminoácidos em proteínas celulares fixadas em meio ácido, permitindo a quantificação indireta da densidade celular por espectrofotometria.

Células da linhagem de melanoma metastático humano SK-MEL-28 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 3×10^4 células/mL e incubadas por 24 horas. A CA5, diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4% (veículo), foi então adicionada em concentrações crescentes (0,064 nM a 1000 nM), utilizando diluições seriadas em razão 2. As células foram incubadas com os compostos em volume final de 200 μ L, sob 5% de CO₂ a 37°C, por 24 horas. O controle negativo consistiu em células tratadas apenas com DMSO 0,4%.

Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, permanecendo a 4°C por pelo menos 1 hora. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com água destilada e secas até a completa eliminação de umidade aparente. Adicionou-se 100 µL de solução de SRB 0,4% (em ácido acético 1%) a cada poço, seguido de incubação a 37°C por 30 minutos.

O corante não ligado foi removido mediante cinco lavagens com ácido acético 1%, assegurando-se a limpeza das paredes dos poços. O corante ligado às proteínas foi solubilizado com 200 µL de tampão Tris Base 10 mM (previamente resfriado a 4°C), sob agitação em mesa agitadora por 10 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 570 nm.

Os dados de absorbância foram normalizados utilizando as seguintes equações:

- Efeito Citostático ($T \geq T_0$ e $T < CN$): % Proliferação Celular = $100 \times (T - T_0) / (CN - T_0)$
- Efeito Citotóxico ($T < T_0$): % Proliferação Celular = $100 \times (T - T_0) / T_0$
 - Onde: T = Absorbância das células tratadas com amostra; T_0 = Absorbância das células no tempo zero; CN = Absorbância do controle negativo.

Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. As curvas dose-resposta (absorbância \times concentração) foram analisadas por regressão não linear no *software* GraphPad Prism 8.0 para determinação dos parâmetros CI_{50} (concentração inibitória média), CIT (inibição total do crescimento) e CL_{50} (concentração letal média).

4.4. Estudo dos efeitos da cromomicina A5 em células SK-MEL-28 por citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo foi realizada para avaliar os efeitos da CA5 sobre células da linhagem de melanoma metastático humano SK-MEL-28. O método permitiu a avaliação de características físicas (dispersão frontal - FSC, do inglês *Forward Scatter* e lateral - SSC, do inglês *Side Scatter*) e fluorescentes, utilizando marcadores apropriados (Givan, 2011).

As células SK-MEL-28 foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 3×10^4 células/mL e incubadas por 24 horas nas concentrações de 3 e 10 nM de CA5, conforme especificado nos experimentos subsequentes. O controle negativo consistiu em células incubadas com dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4%, enquanto o controle positivo foi composto

por células incubadas com doxorrubicina a 100 nM. Após o período de incubação, os protocolos específicos de coloração e aquisição foram conduzidos conforme o objetivo de cada ensaio.

4.4.1. Estratégia de *gates*

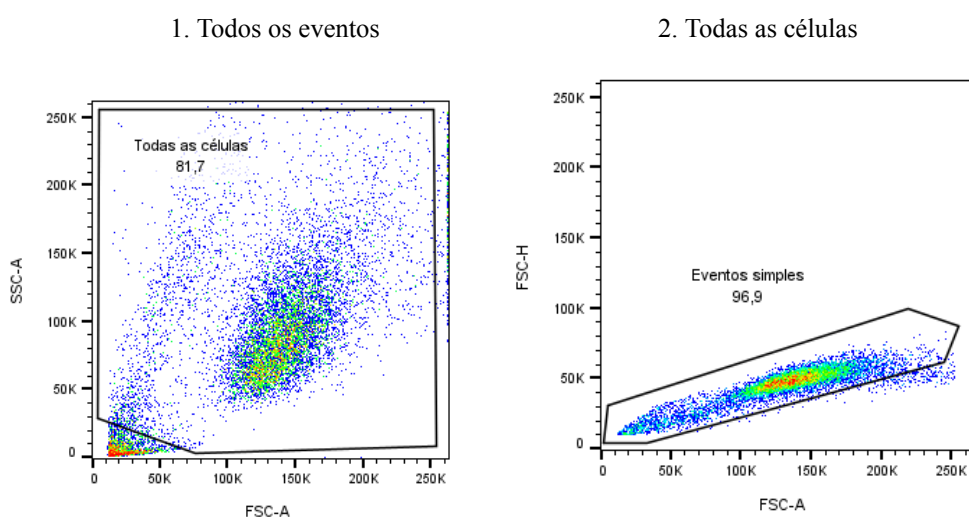
Os dados de citometria de fluxo foram adquiridos coletando 10.000 eventos por amostra e analisados mediante estratégia de *gates* sequencial para exclusão de *debris* e *doublets*.

Inicialmente, gerou-se um gráfico de dispersão (*dot plot*) de FSC versus SSC com todos os eventos detectados. Uma região de *gate* (Todas as células) foi aplicada para selecionar a população de células viáveis, excluindo *debris* e *outliers*.

Em seguida, a população selecionada foi analisada em um novo gráfico de FSC-Altura (FSC-H) versus FSC-Área (FSC-A) para discriminar *single cells* (eventos simples). Um *gate* adicional foi aplicado para selecionar exclusivamente eventos únicos (eventos simples).

Este protocolo de *gates* foi aplicado como padrão de pré-processamento a todas as amostras. As análises subsequentes basearam-se exclusivamente na população de *single cells* específicas para cada protocolo, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Estratégia de *gates* para citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Gráficos no formato *dot plot*, contendo os *gates* de “todas as células” e “eventos simples”, comuns a todos os testes realizados por citometria de fluxo, obtidos a partir dos parâmetros morfológicos.

4.4.2. Análise de dados

A análise dos dados de citometria de fluxo foi realizada no software FlowJo v.10.6. Os resultados foram expressos como porcentagem de populações celulares ou intensidade mediana de fluorescência (MFI, do inglês *Median Fluorescence Intensity*), conforme o parâmetro analisado e objetivo em cada ensaio.

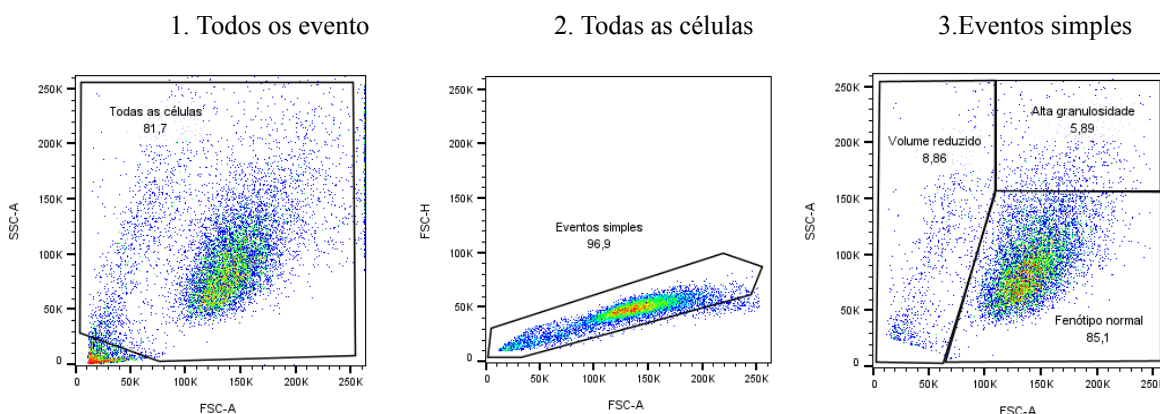
A análise estatística foi conduzida no *software* GraphPad Prism 8.0, utilizando-se a análise de variância unidirecional ANOVA seguida pelo teste de Dunnett (comparações múltiplas *versus* controle), com significância estatística definida de 5% ($p < 0,05$).

4.4.3. Avaliação da morfologia celular por citometria de fluxo

A morfologia celular foi avaliada pelos efeitos da CA5 (3 e 10 nM) em células SK-MEL-28. Após 24 horas de incubação, as células foram tripsinizadas e coletadas em microtubos para análise por citometria de fluxo.

Nesta análise, parâmetros físicos intrínsecos (dispensando fluorocromos) foram utilizados: FSC (tamanho celular) e SSC (complexidade interna/granulosidade). A estratégia de *gates* seguiu a Figura 9, com resultados expressos como porcentagem das populações celulares.

Figura 9 – Estratégia de *gates* para análise de morfologia celular.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A partir do *gate* de “*eventos simples*”, é criado um novo gráfico *dot plot* com os parâmetros morfológicos (FSC x SSC). Nesse gráfico, são definidos os *gates* para a seleção das populações de células com volume reduzido, alta granulosidade granulosa e fenótipo normal. Esses *gates* indicam a porcentagem de cada população, valores que são posteriormente analisados estatisticamente.

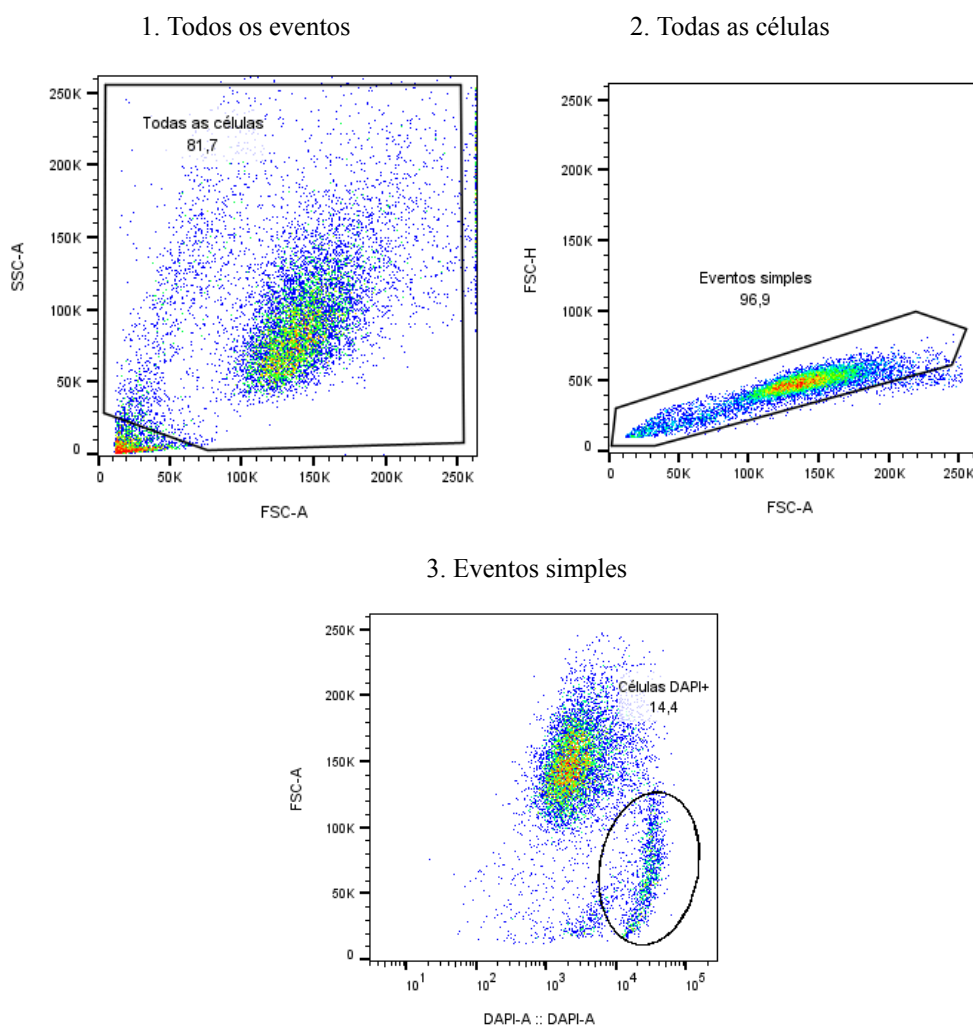
4.4.4. Avaliação da perda da integridade de membrana

Células que já estão mortas ou em processo de morte tendem a perder a integridade da membrana plasmática e, com isso, sua função de permeabilidade seletiva. Para investigar essa

característica, foi utilizado o fluorocromo DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol), que possui afinidade específica pelo DNA de fita dupla. No entanto, esse corante só é capaz de atravessar membranas danificadas, de modo que células com membranas preservadas não apresentam fluorescência. Assim, a emissão azul do DAPI (com excitação em 405 nm e detector em 448/45 nm) possibilita a detecção de células inviáveis (Hamada; Fujita, 1983).

Após o tempo de incubação, as células foram retiradas da placa por tripsinização para soltura, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, e o *pellet* obtido foi ressuspensão em 200 μ L de uma solução de DAPI a 2 μ g/mL. Após 5 minutos de incubação, as amostras foram lavadas com PBS para retirar o excesso do corante e, em seguida, foram analisadas em citômetro de fluxo seguindo a estratégia de *gates* da Figura 10. A intensidade da fluorescência emitida está diretamente associada à quantidade de células com membrana comprometida.

Figura 10 – Estratégia de *gates* na citometria de fluxo para análise e aquisição de dados da integridade de membrana.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A partir do gate de “eventos simples”, é criado um novo gráfico do tipo *dot plot*, selecionando o filtro correspondente à fluorescência do DAPI. Nesse gráfico, é definido o *gate* para a

seleção da população de células mortas, apresentando volume reduzido e a membrana plasmática rompida. O *gate* DAPI+ indica a porcentagem de células mortas, do qual o valor foi utilizado para a análise estatística.

4.4.5. Avaliação da externalização de calreticulina na superfície da membrana plasmática

A exposição da chaperona calreticulina (CRT) na membrana plasmática ocorre como resposta ao estresse do retículo endoplasmático (RE), caracterizando-se como evento inicial da morte celular imunogênica (MCI). Superficializada, a CRT atua como sinal de fagocitose, mediando o reconhecimento por células fagocíticas (Galluzzi *et al.*, 2017).

A detecção da exposição da CRT foi feita pelo uso do anticorpo primário anti-CRT não conjugado, seguido por anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 488 (λ_{em} : 520 nm). Para discriminar células viáveis, utilizou-se DAPI (λ_{em} : 457 nm), com a finalidade de avaliar a integridade membranar. Esta etapa assegura que a CRT detectada derive exclusivamente de células viáveis com membrana intacta.

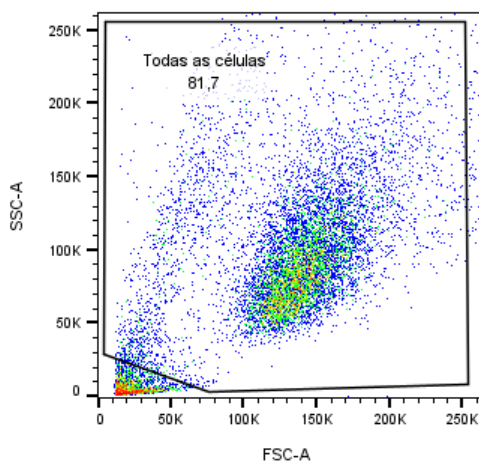
Para marcação extracelular, as células foram tripsinizadas e centrifugadas sob refrigeração. As amostras foram então incubadas com anticorpo primário anti-CRT (1:100) por 40 minutos (em gelo e no escuro). Após lavagem com PBS, procedeu-se à incubação com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1:400) por 40 minutos nas mesmas condições. Nos 5 minutos finais, adicionou-se DAPI (2 μ M) para avaliar a integridade da membrana, distinguindo células viáveis das com membrana comprometida.

Os tubos preparados foram centrifugados, com as células ressuspendidas em tampão FACS e analisadas por citometria de fluxo. A exposição superficial de CRT foi quantificada pela intensidade mediana de fluorescência (MFI) do Alexa Fluor 488 e percentual de células marcadas (CRT+), utilizando estratégia de *gates* conforme Figura 11.

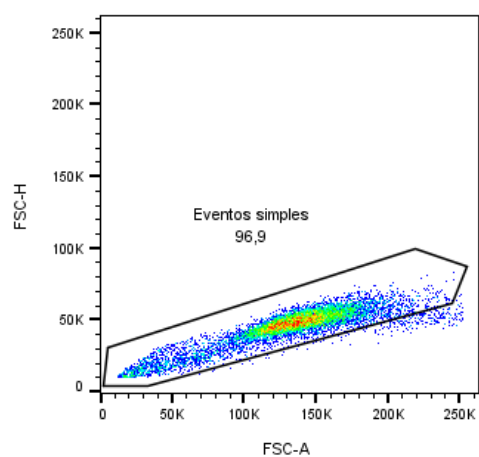
Figura 11 – Estratégia de *gates* na citometria de fluxo para análise e aquisição de dados sobre a exposição de calreticulina na membrana plasmática.

1. Todos os eventos

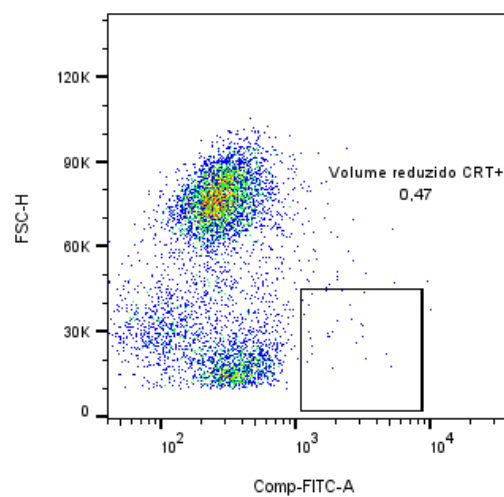
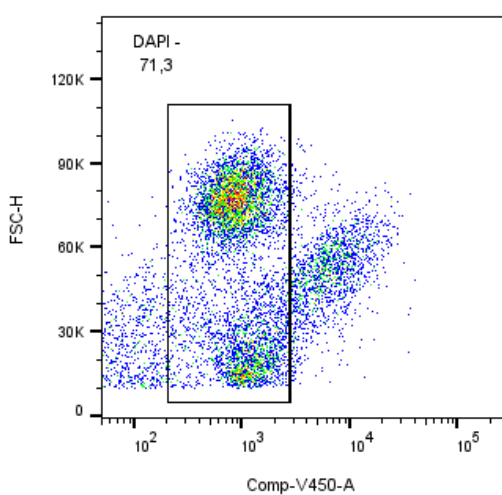
2. Todas as células



3. Eventos simples



4. DAPI-



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A partir do *gate* de “eventos simples”, foi criado um gráfico *dot plot* para verificar a fluorescência do DAPI, selecionando a população correspondente ao *gate* DAPI⁻, ou seja, células com membrana íntegra. Em seguida, um novo gráfico *dot plot* foi gerado a partir desse *gate* para avaliar a externalização de calreticulina (CRT), cruzando-se o parâmetro de fluorescência do fluoróforo Alexa Fluor 488 com o parâmetro de tamanho celular (FSC). A análise focou nas células com volume reduzido e positividade para Alexa Fluor 488, indicativas de exposição de CRT. Os valores de intensidade mediana de fluorescência (MFI) e a porcentagem dessa população foram utilizados nas análises estatísticas, visando à comparação entre os diferentes grupos experimentais.

4.4.6. Avaliação da liberação da HMGB1

A proteína nuclear HMGB1 é um marcador de morte celular imunogênica (MCI), cuja liberação é considerada um dos eventos-chave (Kepp *et al.*, 2014). Sua detecção por citometria de fluxo exigiu permeabilização celular para marcação intracelular com anticorpos e inferência indireta da liberação.

Se HMGB1 é liberado do núcleo, o anticorpo anti-HMGB1 encontra menos alvo para ligação, reduzindo a fluorescência do anticorpo secundário utilizado (Alexa Fluor 568). Quando retido no núcleo, a ligação abundante gera alta fluorescência. Assim, uma redução da MFI em células incubadas com amostras teste *versus* controle indica liberação de HMGB1.

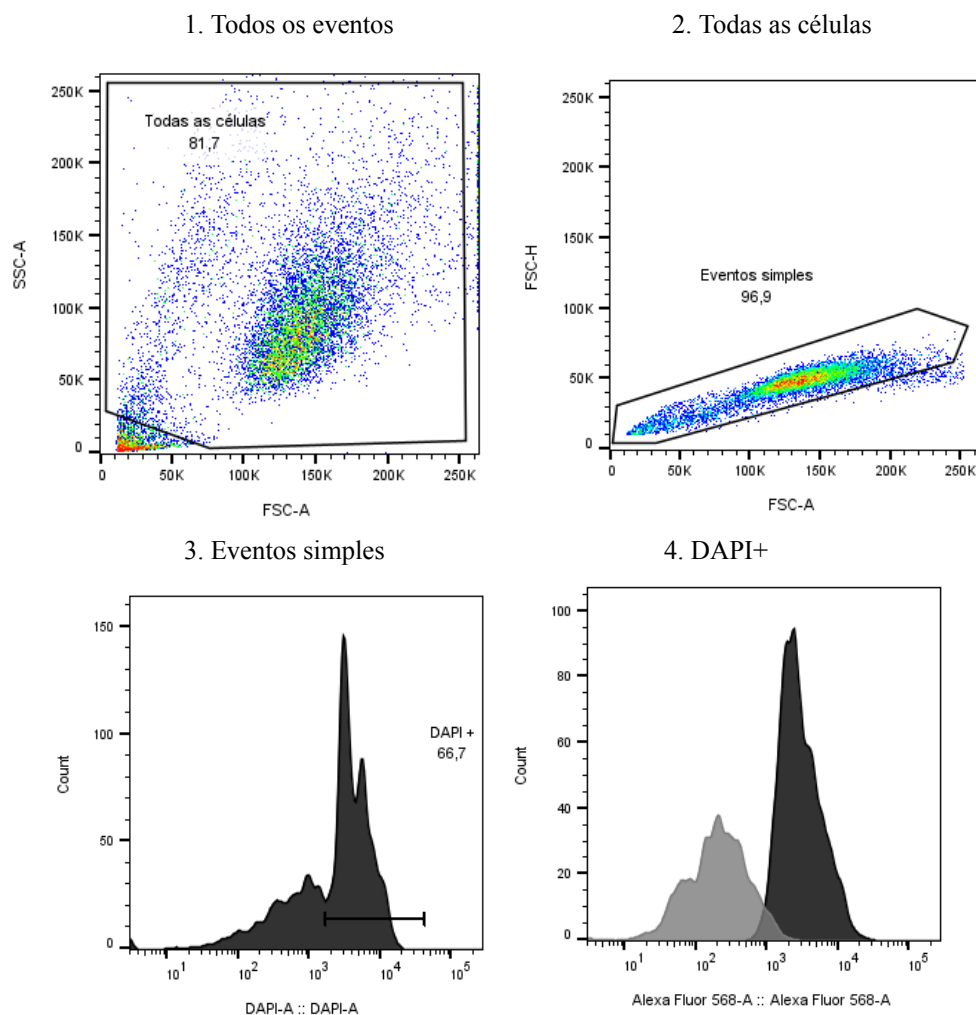
Para marcação intracelular, as células foram tripsinizadas e centrifugadas sob refrigeração. O *pellet* foi ressuscitado e submetido à fixação em solução de paraformaldeído a 0,25% e lavadas com PBS. Em seguida, as células foram permeabilizadas com o detergente Triton X-100 a 0,1% por 5 minutos e mais uma vez lavadas com PBS. As amostras foram então incubadas com anticorpo primário anti-HMGB1 (1:100) por 40 minutos (em gelo e no escuro). Após lavagem com PBS, procedeu-se à incubação com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 568 (1:400) por 40 minutos nas mesmas condições. Nos 5 minutos finais, adicionou-se DAPI (2 μ M) para garantir que a análise refletia apenas dados de células permeabilizadas.

Para marcação intracelular, células foram tripsinizadas e centrifugadas sob refrigeração. O *pellet* foi ressuscitado, fixado com paraformaldeído 0,25% e submetido a lavagens com PBS. Após permeabilização com Triton X-100 0,1% (5 min) e nova lavagem, as amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-HMGB1 (1:100) por 40 min (em gelo e no escuro).

Após nova lavagem, incubou-se com anticorpo secundário Alexa Fluor 568 (1:400) por 40 min nas mesmas condições. Adicionou-se DAPI (2 μ M) nos 5 minutos finais para garantir que a análise estava sendo feita apenas com células permeabilizadas.

A redução na intensidade de fluorescência mediana e no sinal detectado do Alexa Fluor 568 foi utilizada como parâmetro para quantificação da liberação de HMGB1 nuclear, utilizando a estratégia de *gates* seguindo o esquema da Figura 12.

Figura 12 – Estratégia de gates na citometria de fluxo para análise e aquisição de dados sobre a liberação de HMGB1.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A partir do *gate* de “eventos simples”, foi gerado um gráfico de histograma com a fluorescência do DAPI, selecionando apenas as células permeabilizadas (*gate* DAPI+). Em seguida, foi criado um segundo gráfico de histograma, utilizando a fluorescência do fluorocromo Alexa Fluor 568. A possível redução na intensidade de fluorescência do Alexa Fluor 568 observada no grupo teste, em comparação ao grupo controle, deve ser interpretada como indicativo da liberação de HMGB1 para o meio extracelular. Os valores de intensidade mediana de fluorescência (MFI) obtidos nesse gráfico foram utilizados na análise estatística para a comparação entre os grupos experimentais.

4.5. Estudo dos efeitos da cromomicina A5 por PCR quantitativa (qPCR)

Com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares subjacentes à ação citotóxica da CA5 na linhagem SK-MEL-28, foram avaliados dados de expressão transcricional de 17 genes selecionados, envolvidos nas vias de autofagia, estresse do retículo endoplasmático e apoptose. A análise por qPCR contemplou alvos moleculares representativos de vias críticas associadas à morte celular regulada. Os genes relacionados à autofagia incluíram ATG5,

BECN1 e SQSTM1, enquanto ATF4, ATF6, CALR, HSPA4, HSPA5, JUN e XBP1 foram analisados por sua participação na resposta ao estresse do retículo endoplasmático. No contexto da apoptose, foram investigados BAD, BAK, BAX e BCL2. Adicionalmente, BCL2L1, BCL2L10 e MCL1 foram incluídos devido à sua reconhecida associação com mecanismos de quimiorresistência tumoral (García-Aranda, Pérez-Ruiz e Redondo, 2018).

Para a análise da expressão gênica, células da linhagem SK-MEL-28 foram cultivadas em placas até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Após 24 horas de incubação com a CA5, amostras de material nuclear foram coletadas com 1 mL de TRIzol para extração do RNA total, realizada nos tempos de 6 e 24 horas. O processo incluiu a adição de clorofórmio, precipitação com isopropanol e lavagem com etanol a 70%, conforme o protocolo recomendado pelo fabricante. Após secagem à temperatura ambiente, o RNA foi ressuspense em água livre de RNase, sendo sua concentração e pureza avaliadas pela razão de absorvância 260/280.

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total. A reação de qPCR foi conduzida em volume final de 12 µL por reação, contendo os primers específicos. O gene ACTB foi utilizado como gene de referência para normalização da expressão.

A expressão relativa de cada gene foi calculada usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak; Schmittgen, 2001). O mapa de calor foi gerado no *software* Multiple Experiment Viewer (MeV) 4.9.0 (Saeed *et al.*, 2003). A análise de rede gênica foi realizada com os genes diferencialmente modulados por meio da ferramenta GeneMANIA (Warde-Farley *et al.*, 2010). A análise estatística foi conduzida no *software* GraphPad Prism (versão 8.0, GraphPad Software), utilizando análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett, considerando-se diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

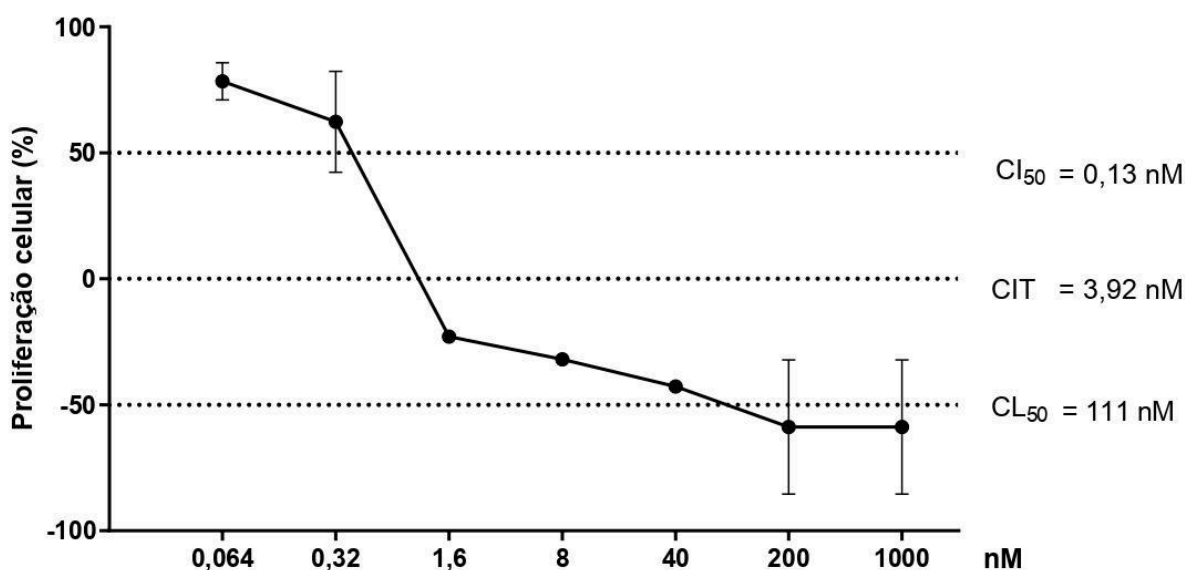
5. RESULTADOS

5.1. Atividade citotóxica *in vitro* da cromomicina A5 (CA5)

Para avaliar o efeito citotóxico da CA5 e determinar as concentrações apropriadas para os experimentos subsequentes, a CA5 foi incubada com as células em diferentes concentrações por 24 horas. Os valores de concentração inibitória média (CI₅₀), concentração inibitória total (CIT) e concentração letal média (CL₅₀) foram estimados por meio de interpolação de regressão não linear, a partir dos dados normalizados com base no percentual de crescimento celular em relação ao controle negativo (DMSO), demonstrados pela Figura 13.

Após a caracterização do perfil citotóxico da CA5 em diferentes concentrações, utilizando o ensaio de sulforrodamina B (SRB), foram realizados estudos adicionais para a investigação dos mecanismos de ação da molécula. Para isso, os experimentos prosseguiram com ensaios de exposição de sinais imunogênicos por citometria de fluxo e análise da expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR).

Figura 13 – Efeito da cromomicina A5 sobre a proliferação celular em células da linhagem SK-MEL-28.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Curvas de concentração-efeito da CA5 em células da linhagem SK-MEL-28 após 24 horas de incubação. Os dados foram calculados por meio de interpolação não linear e estão apresentados como média \pm desvio padrão, obtidos a partir de três experimentos realizados em triplicata. Os valores correspondentes à CI_{50} , CIT e CL_{50} estão indicados ao lado dos gráficos. As barras de desvio padrão ausentes não foram omitidas, mas estão ocultas devido estarem encobertas pelo próprio símbolo de marcação do gráfico, em razão de seu tamanho reduzido.

5.2. Avaliação dos efeitos da cromomicina A5 em células SK-MEL-28

5.2.1. Condições experimentais para testes de citometria de fluxo e PCR quantitativa (qPCR)

A CA5 foi avaliada quanto ao seu potencial citotóxico na linhagem SK-MEL-28 por meio do ensaio de sulforrodamina B (SRB). A análise da curva concentração-resposta indicou que a CA5 foi eficaz em induzir morte celular regulada, apresentando uma concentração inibitória total (CIT) de 3,92 nM e concentração letal média (CL_{50}) de 111 nM.

Com base no valor de CIT, foram selecionadas para os experimentos subsequentes as

concentrações de 3 e 10 nM, a fim de garantir uma representação adequada dos efeitos farmacológicos em curvas logarítmicas de concentração, facilitando a visualização de respostas concentração-efeito.

O tempo de incubação de 24 horas foi adotado nos ensaios de citometria de fluxo, por representar um intervalo adequado para a detecção de alterações morfológicas significativas e de integridade celular. Para a análise de expressão gênica por qPCR, foram selecionados os tempos de 6 e 24 horas, com o objetivo de captar variações na regulação gênica ao longo do tempo, permitindo a identificação de eventos precoces e tardios na resposta celular à exposição à CA5.

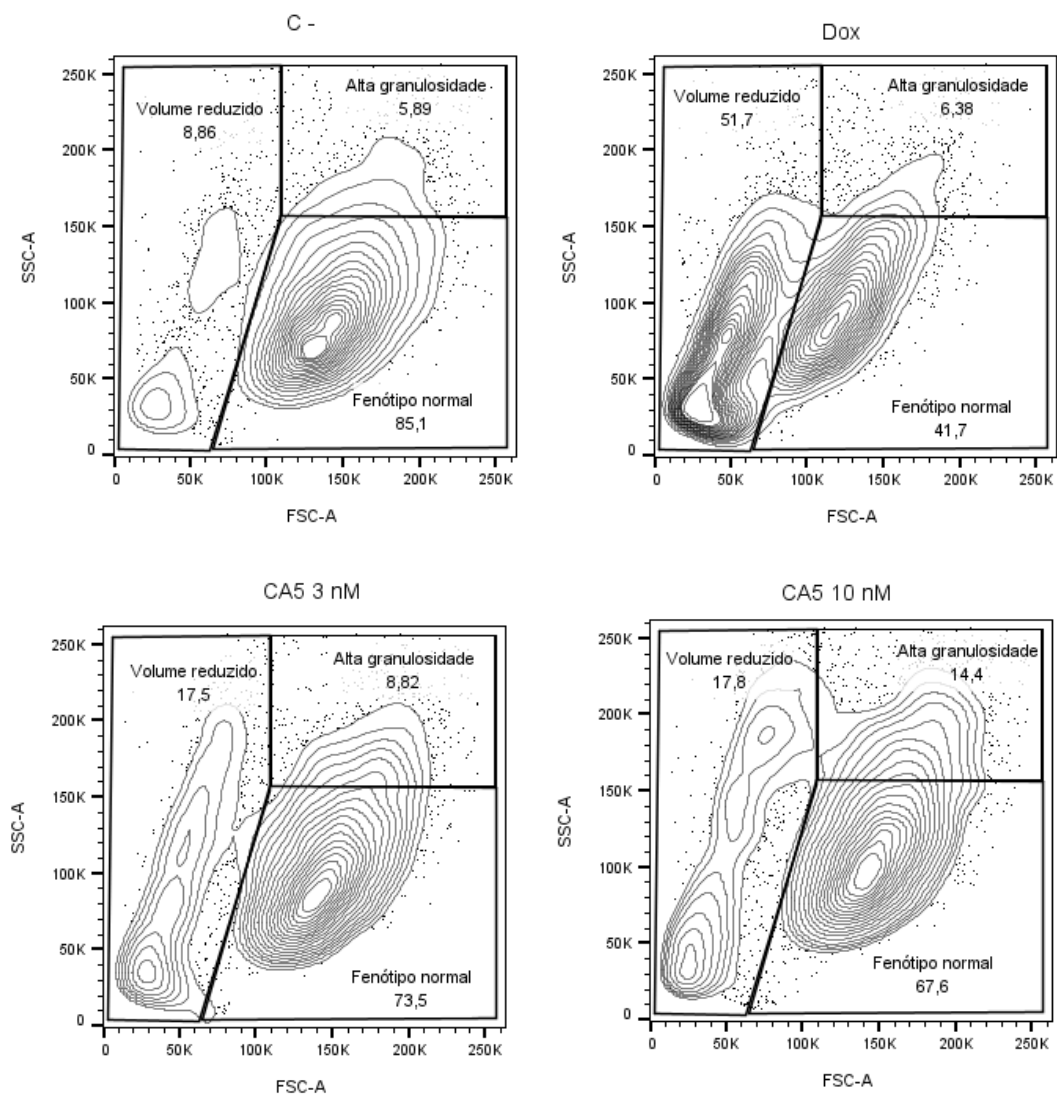
5.2.2. Alterações na morfologia celular

A apoptose é o tipo de morte celular regulada mais amplamente conhecido, sendo induzida por diversos fármacos, principalmente por meio da via intrínseca (Tian *et al.*, 2024). Durante as fases iniciais desse processo, as células podem apresentar alterações morfológicas características, como o encolhimento celular (Wickman; Julian; Olson, 2012).

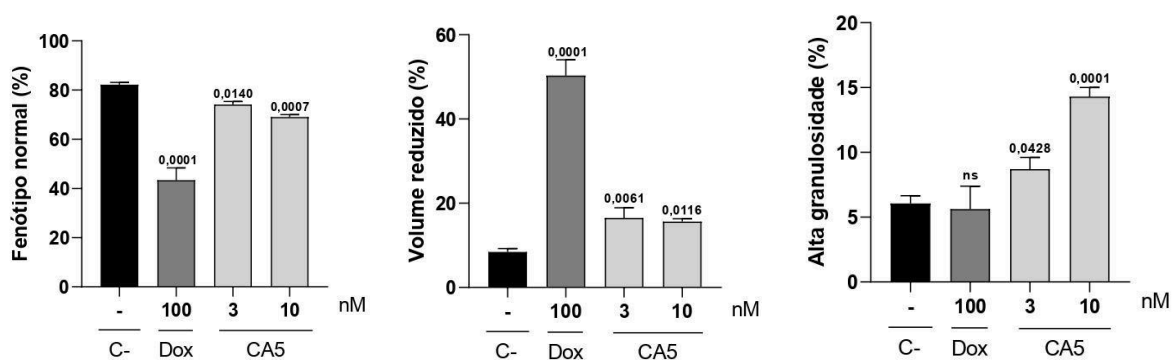
A Figura 14 (A, B) demonstra um aumento na granulocidade celular após incubação com CA5 nas concentrações de 3 e 10 nanomolar (nM), em comparação ao controle negativo. Observa-se, ainda, uma redução no volume celular, acompanhada por uma diminuição do número de células normais, compatível com a morte celular regulada. A análise por microscopia (Figura 14C) confirmou a redução das populações de células morfolologicamente normais em todas as condições testadas, com destaque para o grupo incubado com doxorrubicina (controle positivo), resultado que corrobora os dados obtidos por citometria de fluxo.

Figura 14 – Avaliação de alterações na morfologia celular da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 e controles em 24 horas.

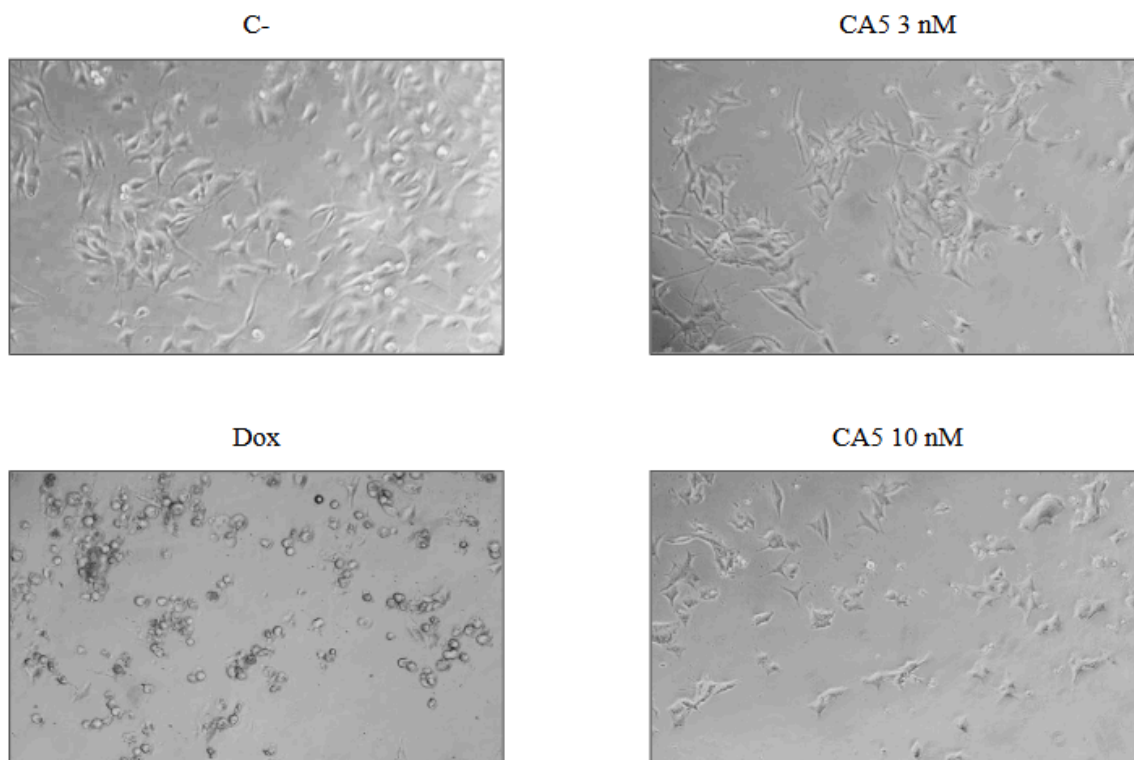
A.



B.



C.



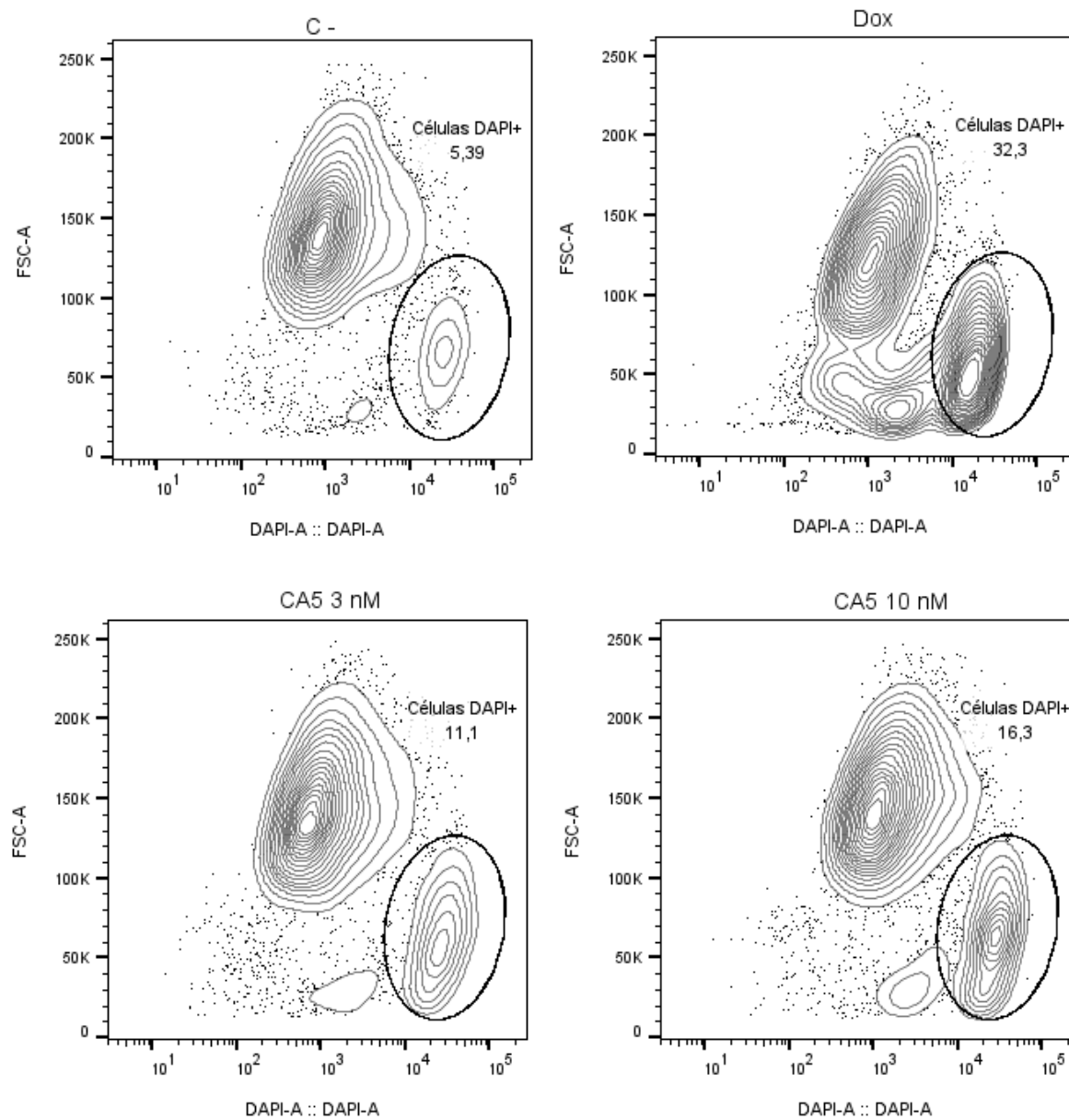
Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: **A.** Representação da morfologia das células SK-MEL-28 após 24 horas de incubação com CA5 nas concentrações de 3 nM e 10 nM, com doxorubicina a 100 nM (Dox) como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4% como controle negativo (C-). **B.** Percentual de células com morfologia normal, volume reduzido e alta granulosidade, obtido a partir de três experimentos com três réplicas cada. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. O valor de significância estatística (p), comparado ao controle negativo, está indicado sobre as barras dos grupos teste; ns = não significativo. **C.** Imagens obtidas por microscopia óptica em contraste de fase, ilustrando as alterações morfológicas das células SK-MEL-28 incubadas com as mesmas concentrações mencionadas anteriormente.

5.2.3. Alterações na integridade da membrana plasmática

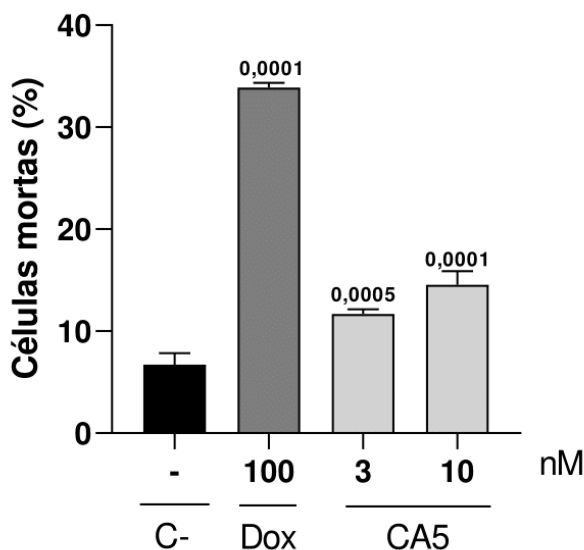
A Figura 15 (A, B) apresenta dados referentes à integridade da membrana plasmática como indicativo de viabilidade celular, evidenciando um aumento na morte celular após a incubação com a CA5, nas concentrações de 3 e 10 nanomolar (nM), e com doxorubicina, na concentração de 100 nanomolar (nM), em comparação ao controle negativo.

Figura 15 – Avaliação da integridade de membrana da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 e controles em 24 horas.

A.



B.



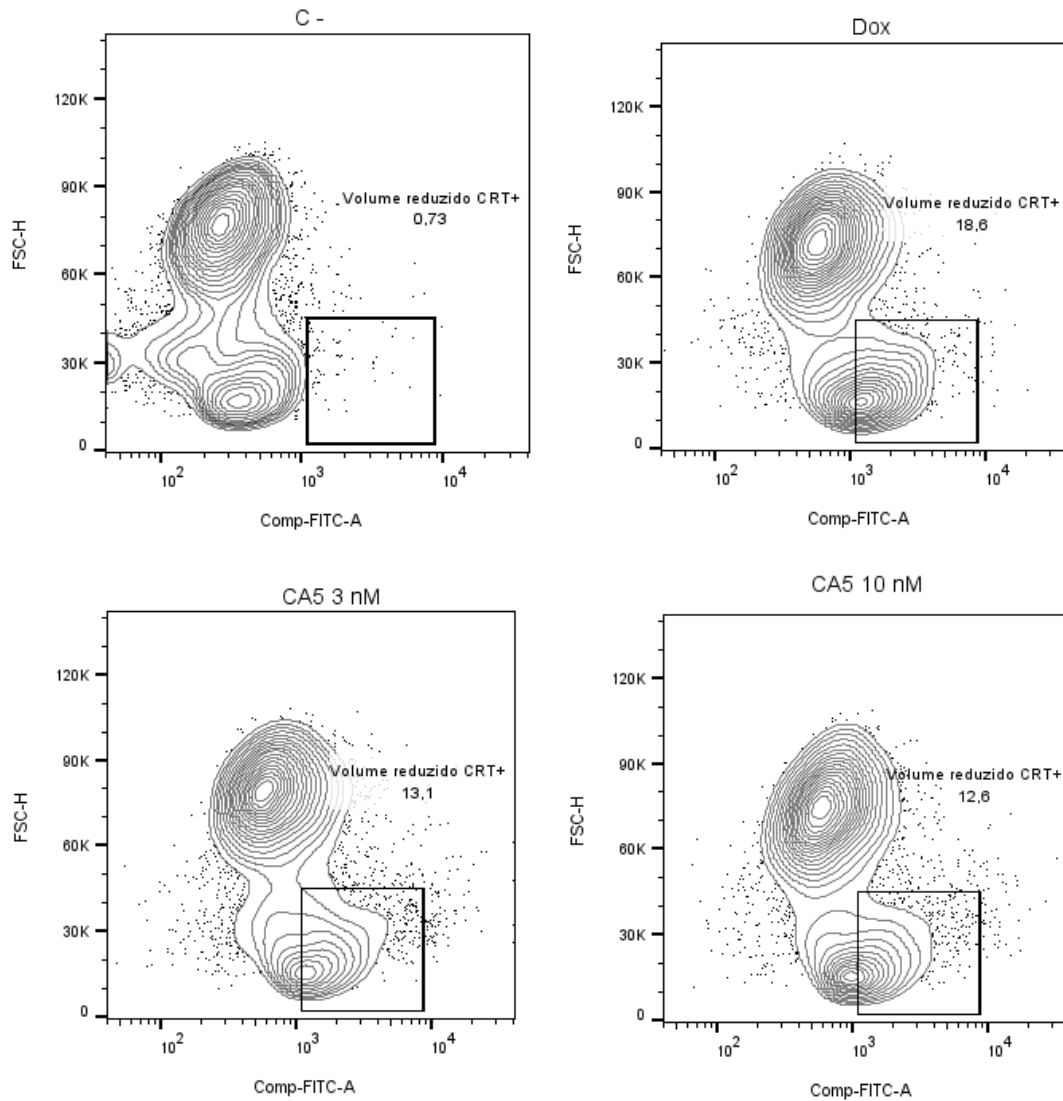
Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A. Avaliação da integridade de membrana das células SK-MEL-28 após 24 horas de incubação com cromomicina A5 (CA5) nas concentrações de 3 nM e 10 nM, utilizando doxorubicina a 100 nM (Dox) como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4% como controle negativo (C-). B. Percentual de células com membrana permeável ao fluorocromo DAPI, obtido a partir de três experimentos realizados em triplicata submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Os valores de significância estatística (p), comparados ao controle negativo, estão indicados sobre as respectivas barras dos grupos experimentais.

5.2.4. Avaliação da externalização de calreticulina (CRT) na superfície da membrana plasmática

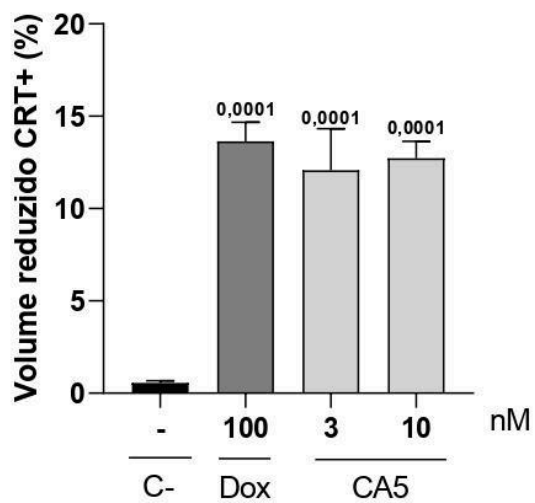
As células incubadas com CA5, nas concentrações de 3 e 10 nM, e com doxorubicina, na concentração de 100 nM, apresentaram aumento na externalização de CRT na membrana plasmática em comparação ao grupo controle negativo, composto por células incubadas apenas com DMSO a 0,4%.

Figura 16 – Avaliação da externalização da celreticulina da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 e controles em 24 horas.

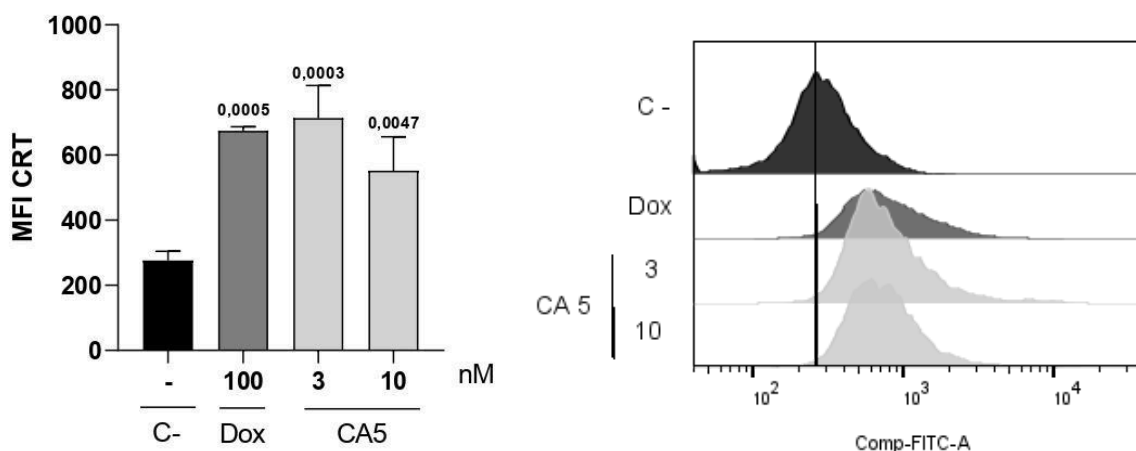
A.



B.



C.

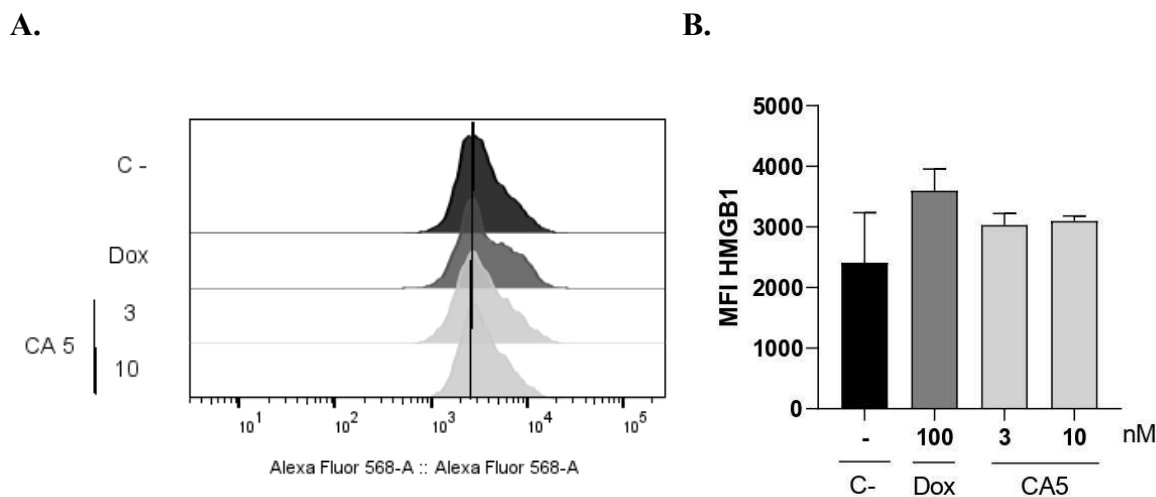


Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: **A.** Gráficos representativos de *contour plot* demonstrando a correlação entre a exposição de calreticulina (CRT) e o tamanho celular (parâmetro de dispersão frontal, FSC) por citometria de fluxo, em células SK-MEL-28 incubadas por 24 horas com CA5 nas concentrações de 3 nM e 10 nM. Doxorubicina a 100 nM (Dox) foi utilizada como controle positivo, e dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4% como controle negativo (C-). **B.** Porcentagem de células que apresentaram redução de volume celular e exposição de CRT, com dados obtidos a partir de três experimentos, realizados em triplicata submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão, e os valores de significância estatística (p), em comparação ao controle negativo, estão indicados sobre as respectivas barras dos grupos experimentais. **C.** Valores da intensidade de fluorescência mediana (MFI) do fluorocromo Alexa Fluor 488, com dados obtidos a partir de três experimentos, realizados em triplicata submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão, e os valores de significância estatística (p), em comparação ao controle negativo, estão indicados sobre as respectivas barras dos grupos experimentais. Ao lado, o deslocamento da curva na MFI do Alexa Fluor 488 causado pela externalização da calreticulina, com respectiva marcação e aumento da fluorescência das células marcadas.

5.2.5. Avaliação da liberação da HMGB1

A liberação do HMGB1 do núcleo para o meio extracelular pode ser avaliada indiretamente pela diminuição da fluorescência do fluorocromo Alexa Fluor 568 nas células tratadas, em comparação com o controle negativo, no qual o HMGB1 permanece predominantemente localizado no núcleo. Nesse contexto, não foi observada redução da intensidade de fluorescência do Alexa Fluor 568 nos grupos de células incubadas por 24 horas com CA5 ou doxorubicina (Dox), conforme ilustrado na Figura 17 (A, B).

Figura 17 – Avaliação da liberação de HMGB1 da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 e controles em 24 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: **A.** Intensidade de fluorescência relacionada a liberação de HMGB1 nuclear em células SK-MEL-28 incubadas por 24 horas com CA5 nas concentrações de 3 nM e 10 nM. Doxorubicina a 100 nM (Dox) foi utilizada como controle positivo, e dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,4% como controle negativo (C-). **B.** Valores da intensidade de fluorescência mediana (MFI) do fluorocromo Alexa Fluor 568, com dados obtidos a partir de três experimentos, realizados em triplicata submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão, e os valores de significância estatística (p), em comparação ao controle negativo, estão indicados sobre as respectivas barras dos grupos experimentais (quando forem significativos).

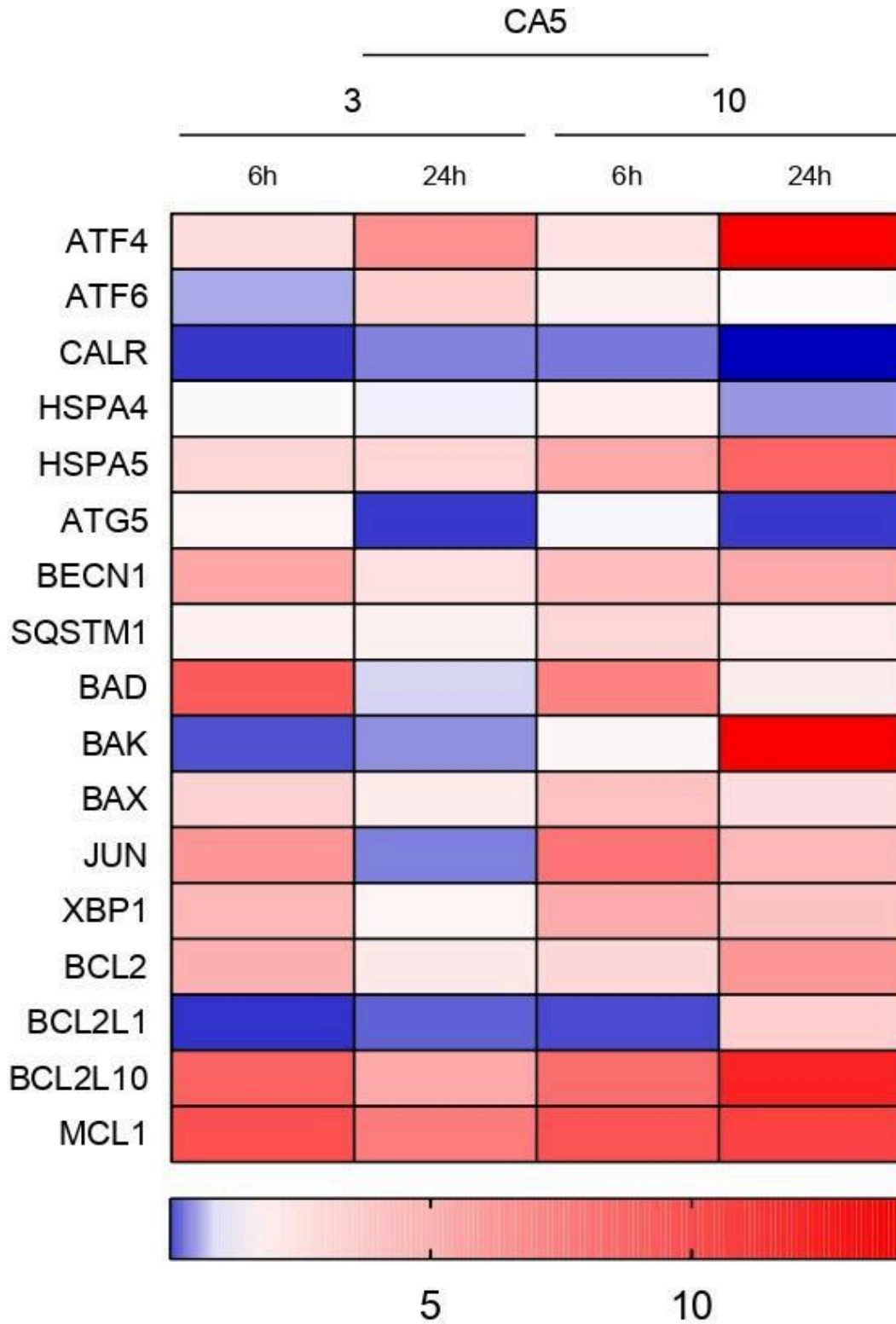
5.2.6. Avaliação da expressão gênica induzida pela CA5 por qPCR

A CA5 foi capaz de modular a expressão gênica associada às vias de autofagia, estresse do retículo endoplasmático e apoptose. Dentre os 17 genes analisados, um total de 9 apresentou modulação significativa em resposta a incubação com CA5, sendo 5 genes regulados negativamente e 4 regulados positivamente em diferentes condições na linhagem SK-MEL-28 (Figura 18A,B).

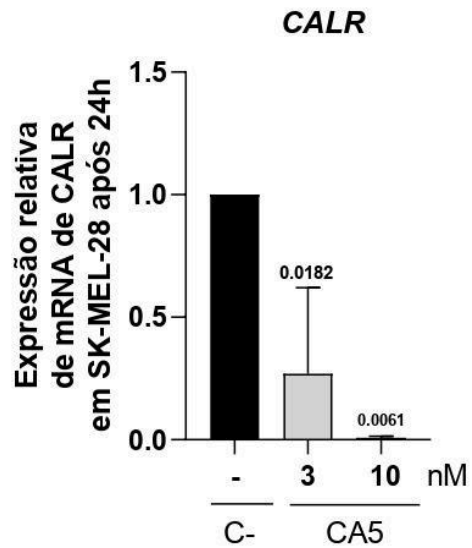
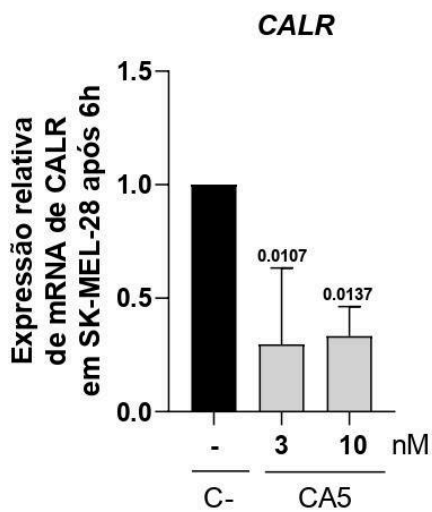
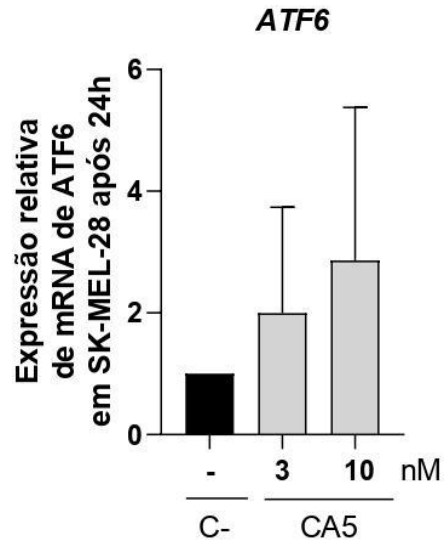
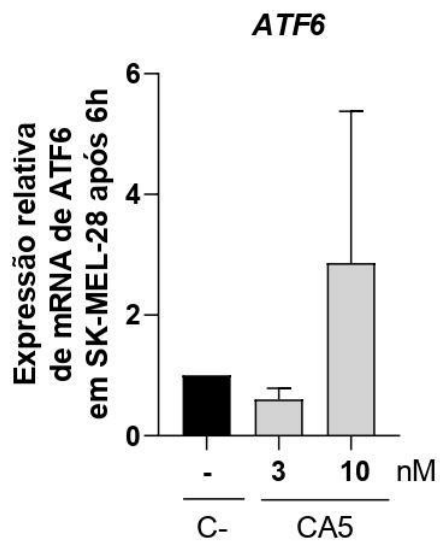
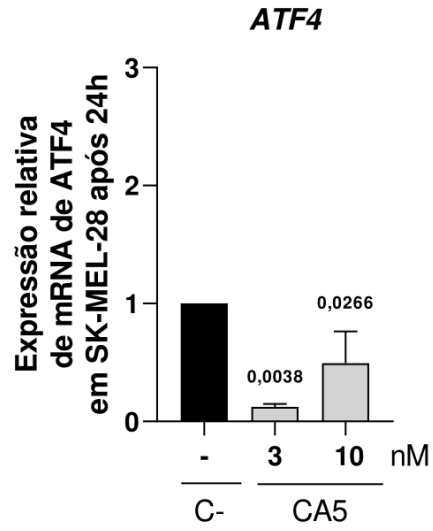
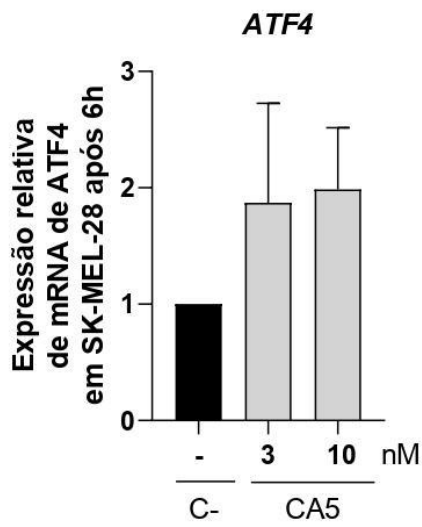
A análise de rede gênica (Figura 18C) revelou que o tratamento com CA5 promove uma interconexão funcional entre os mecanismos de morte celular regulada, evidenciando interações integradas entre os processos de apoptose, estresse de retículo endoplasmático e autofagia.

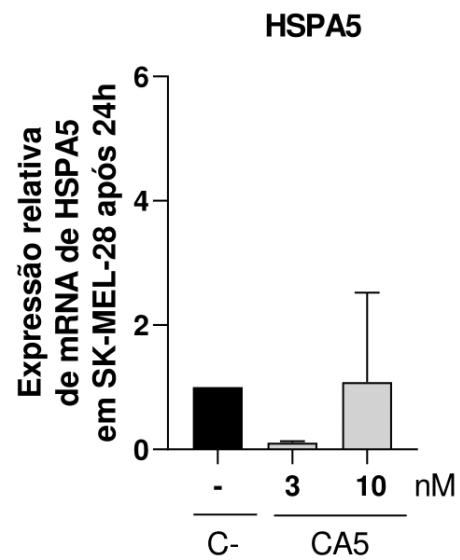
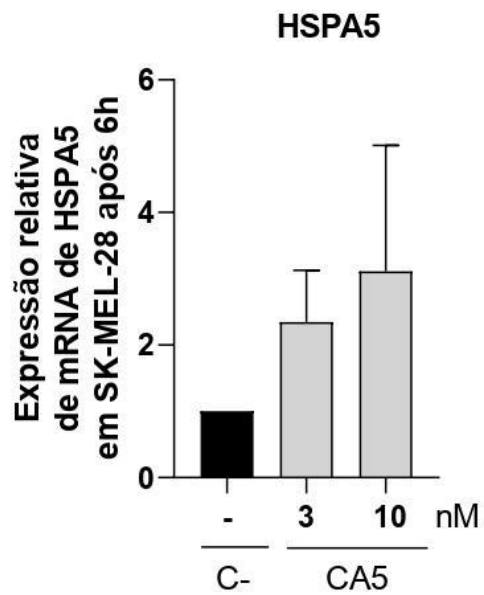
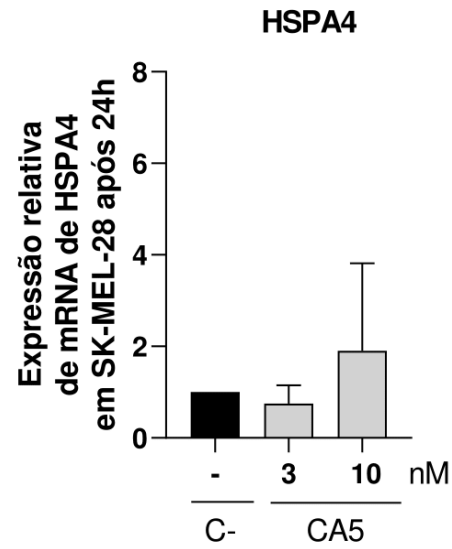
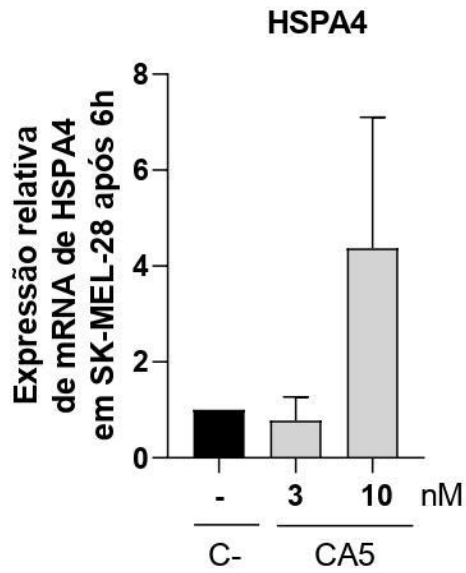
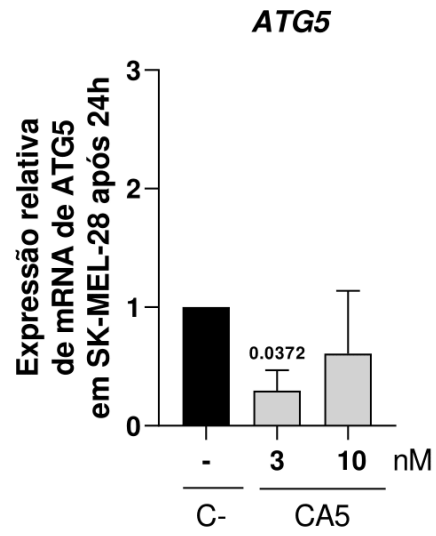
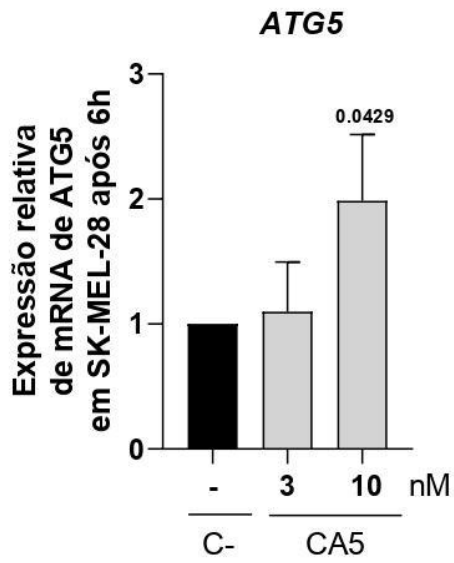
Figura 18 – Avaliação da expressão gênica da linhagem SK-MEL-28 após incubação com cromomicina A5 em 6 e 24 horas.

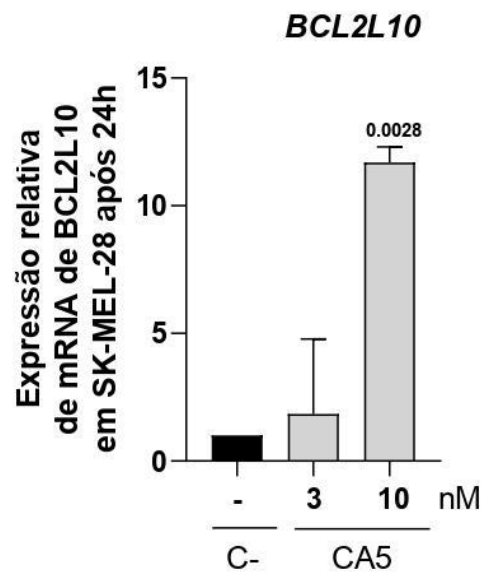
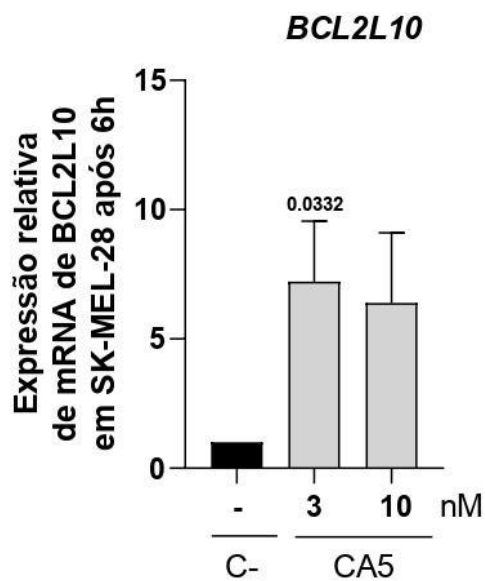
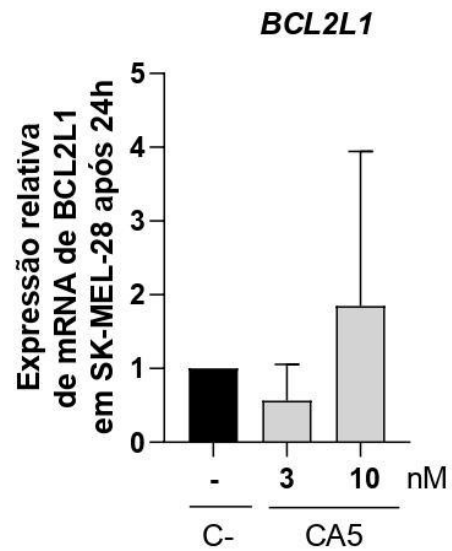
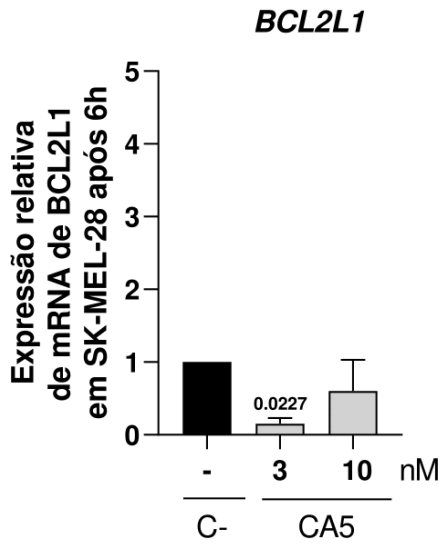
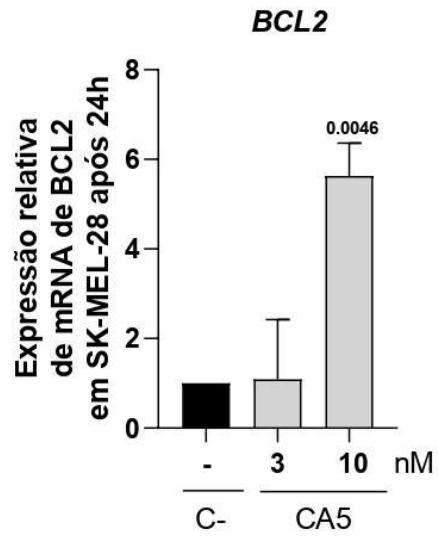
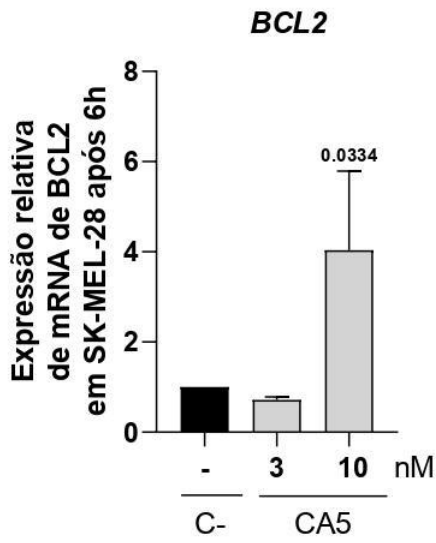
A.

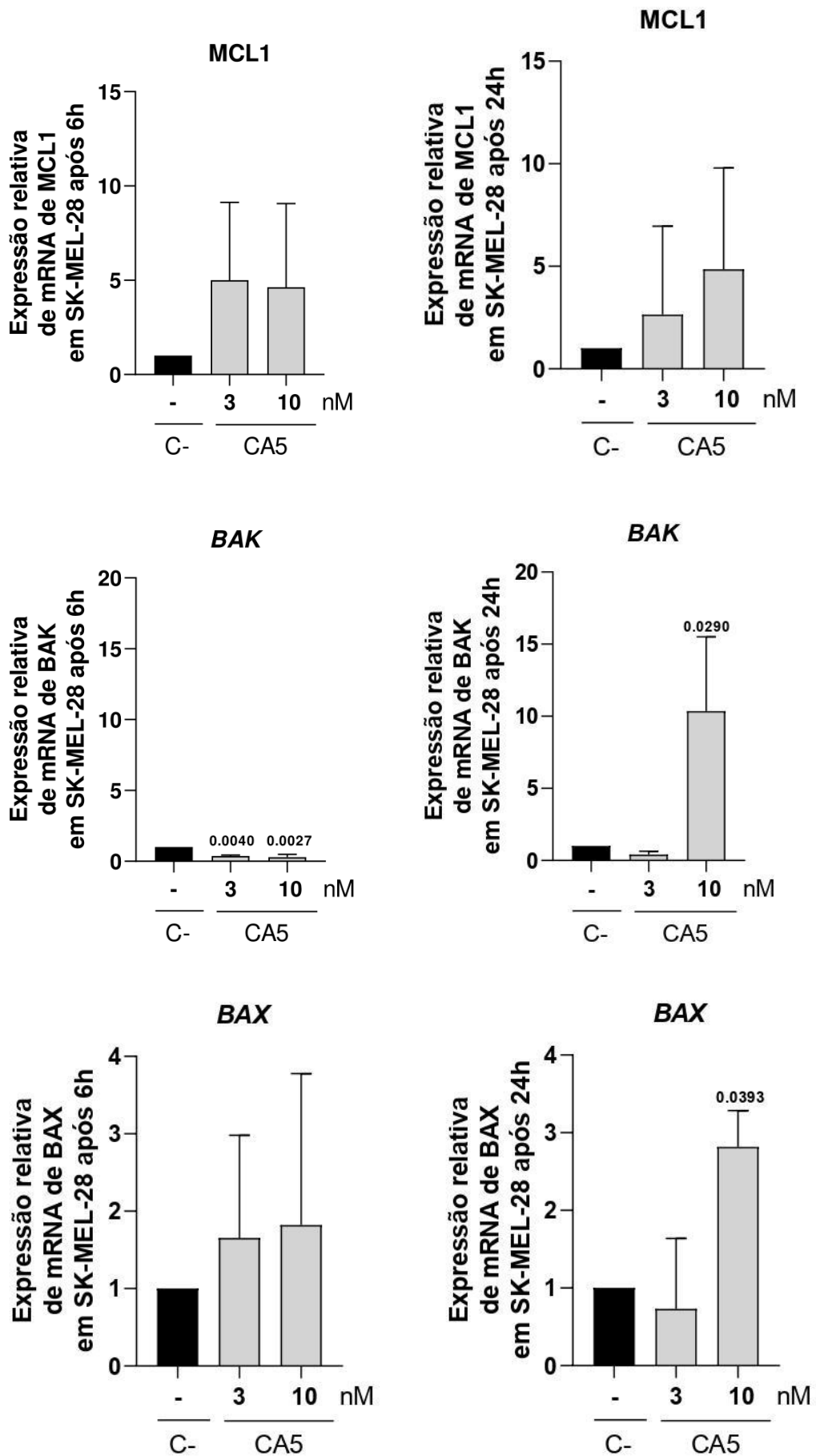


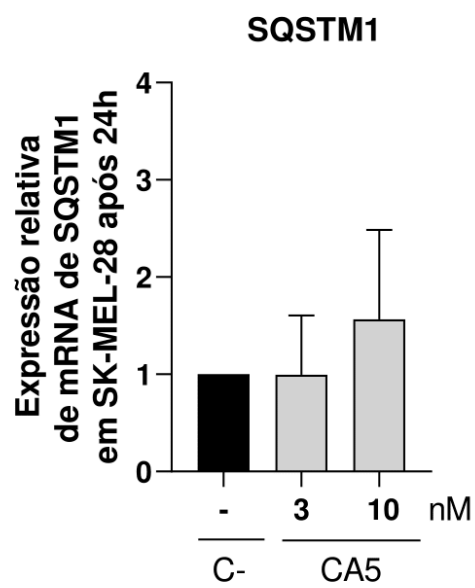
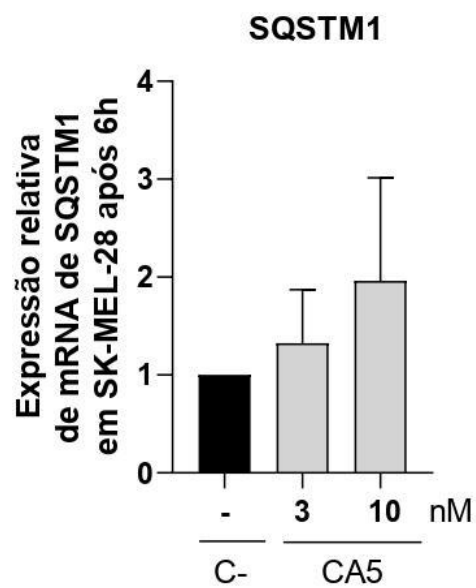
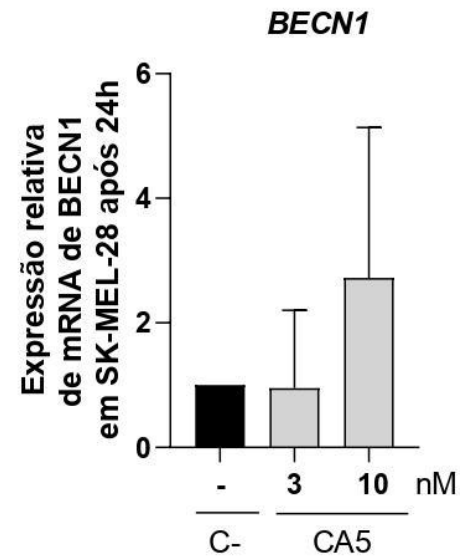
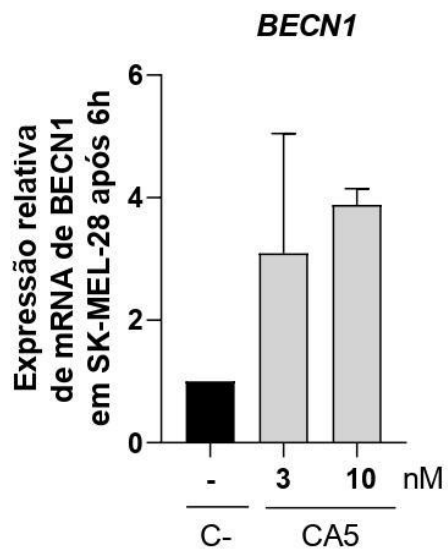
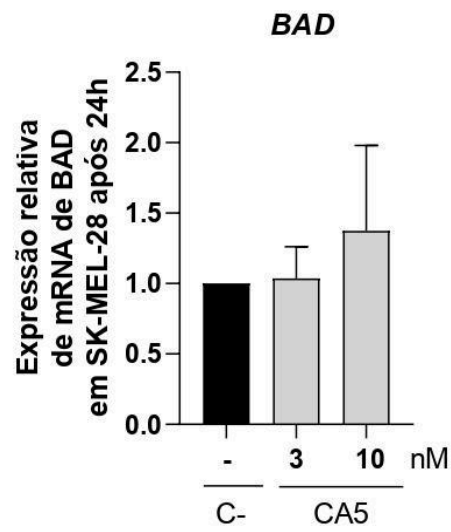
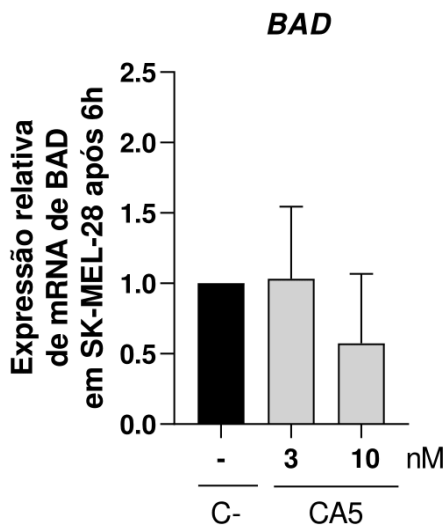
B.

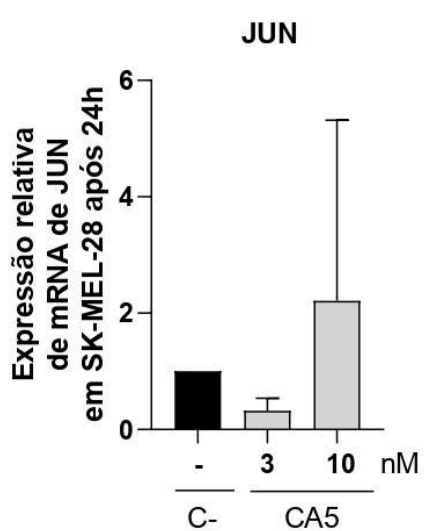
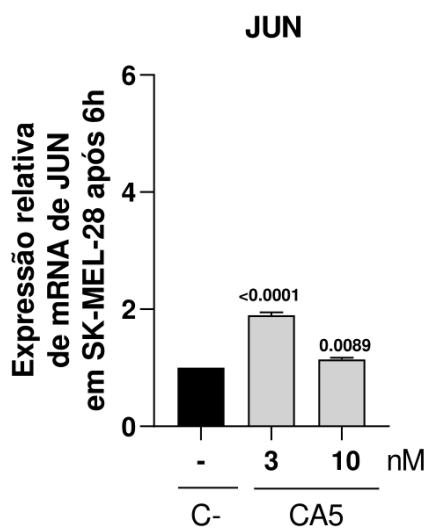
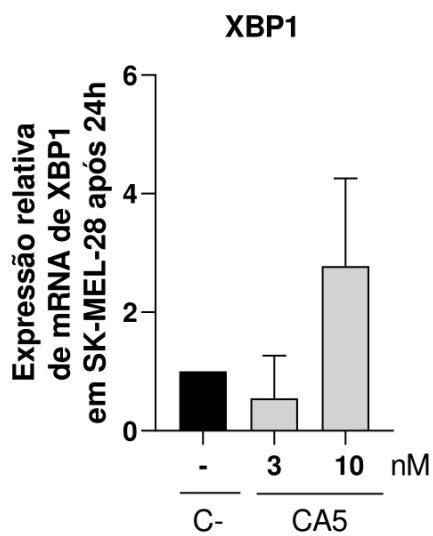
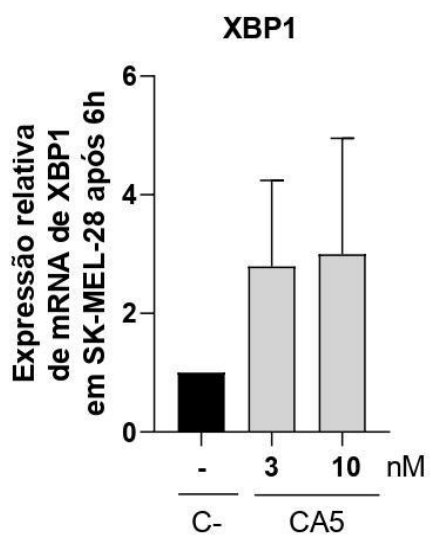




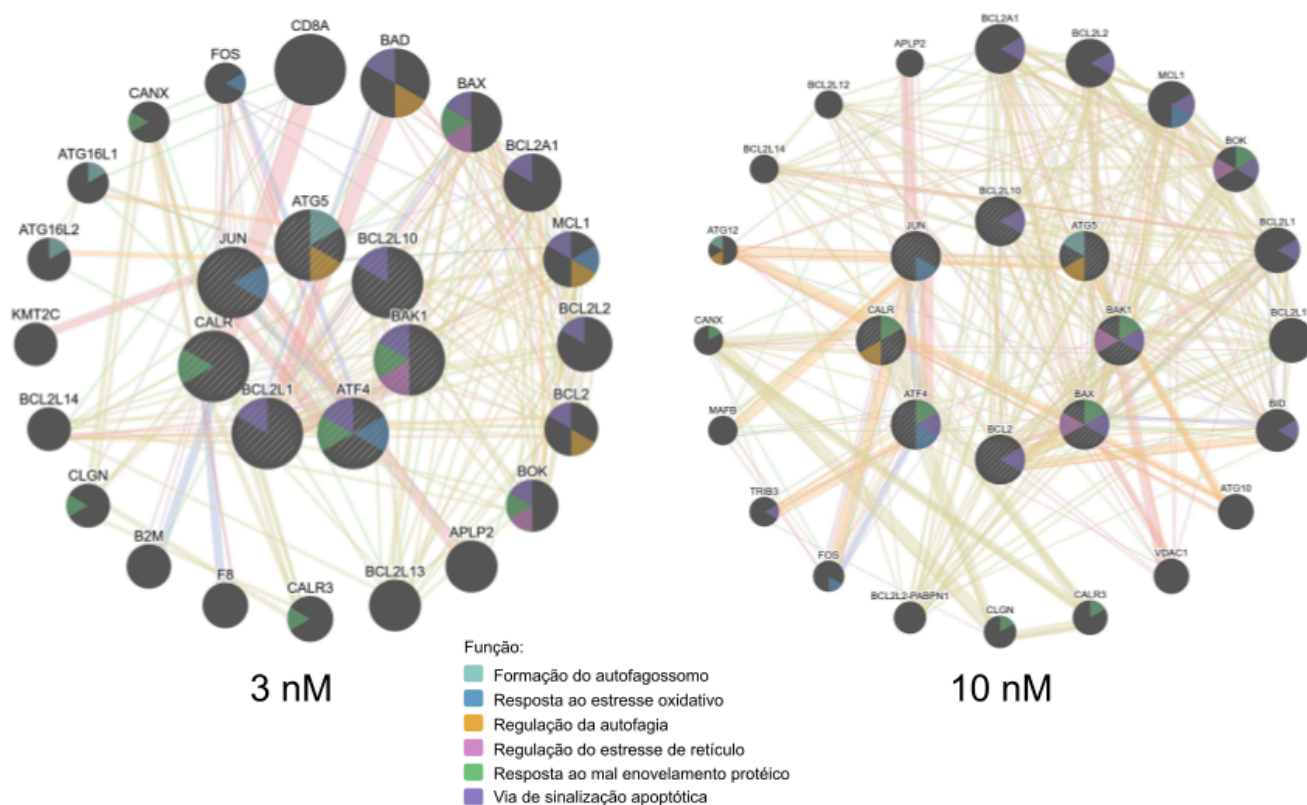








C.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: **A** Mapas de expressão gênica relativa representativo do qPCR de 17 genes associados ao estresse do retículo endoplasmático, autofagia e morte celular em células SK-MEL-28 incubadas por 6 e 24 horas com cromomicina A5 (CA5), nas concentrações de 3 nM (A) e 10 nM (B), normalizadas pelos níveis de mRNA do controle negativo (dimetilsulfóxido, DMSO a 0,4%). O gene ACTB foi utilizado como referência endógena. A coloração azul indica níveis reduzidos de mRNA, enquanto a coloração vermelha indica níveis aumentados de expressão. **B**. Representação gráfica dos valores de expressão gênica, apresentados em gráficos de barras com dados obtidos a partir de três experimentos realizados em triplicata submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão, com os valores de significância estatística (p), em comparação ao controle negativo, indicados sobre as respectivas barras dos grupos experimentais. **C**. Análise de rede dos genes modulados significativamente pela CA5, construída por meio do banco de dados GeneMANIA (<https://genemania.org/>). Os genes regulados positivamente ou negativamente no qPCR são representados por círculos hachurados, enquanto os genes interativos identificados por modelagem computacional estão indicados por fios tracejados. As principais interações gênicas são destacadas por linhas coloridas, e os seis principais processos biológicos relacionados estão ilustrados na figura.

6. DISCUSSÃO

O uso de microrganismos, especialmente bactérias do gênero *Streptomyces*, constitui uma abordagem estratégica e sustentável para a prospecção e produção de compostos bioativos com potencial farmacológico. Esses microrganismos são amplamente reconhecidos por sua capacidade de biossíntese de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e antitumorais (Jimenez; Wilke; Costa-Lotufo, 2018; Wilke *et al.*, 2021).

O cultivo *in vitro* de cepas bacterianas, como a *Streptomyces* sp. BRA-384, permite a produção em larga escala de metabólitos bioativos, o que é fundamental para atender à demanda de material necessário às etapas de triagem farmacológica, bem como aos testes pré-clínicos e estudos clínicos subsequentes (Marinho, 2021). Além disso, o cultivo em condições controladas viabiliza a padronização e a reprodutibilidade dos compostos obtidos, reduzindo a dependência de fontes naturais mais escassas ou ambientalmente sensíveis, como organismos de difícil acesso (Sahm *et al.*, 2022; Jimenez *et al.*, 2020).

A produção da cromomicina A5 (CA5), utilizada neste estudo, foi viabilizada por meio do cultivo padronizado e otimizado da cepa *Streptomyces* sp. BRA-384 por Marinho (2021). Essa cepa, isolada do cnidário *Palythoa caribaeorum*, encontra-se criopreservada no banco de microrganismos marinhos MicroMarin. Como demonstrado por Marinho (2021), condições de cultivo que simulavam o ambiente marinho aumentaram o rendimento da CA5, além de garantir a padronização e a qualidade do extrato. Essa abordagem mostrou-se fundamental para garantir o fornecimento contínuo do material necessário à execução deste trabalho e a continuidade de pesquisas correlatas.

A relevância farmacológica da CA5 já havia sido destacada por Pinto e colaboradores (2020), que relataram sua potente atividade antiproliferativa contra diferentes linhagens tumorais humanas, com valores de CI_{50} na faixa nanomolar, reforçando seu potencial como agente antineoplásico. Esses dados fornecem uma base sólida para a investigação aprofundada de seus mecanismos de ação.

Complementando esses achados, Florêncio e colaboradores (2022) evidenciaram a capacidade da CA5 em induzir morte celular imunogênica (MCI) em células de melanoma murino, caracterizada pela exposição da calreticulina (CRT), liberação de ATP e da proteína nuclear HMGB1. Tais eventos representam sinais moleculares fundamentais para a ativação do sistema imunológico contra o tumor (Florêncio *et al.*, 2022).

Essas evidências foram ainda corroboradas pelo ensaio de vacinação *in vivo*, no qual células tumorais previamente tratadas com a CA5 foram utilizadas para imunizar camundongos, seguidas de reexposição a células tumorais viáveis. A supressão do crescimento tumoral observado nos animais vacinados indicou a ativação de uma resposta imune antitumoral, sugerindo o envolvimento direto do sistema imunológico no efeito terapêutico promovido pela CA5 (Florêncio *et al.*, 2022).

O melanoma metastático continua representando um dos maiores desafios terapêuticos na oncologia moderna, em razão de sua elevada agressividade, rápida capacidade de disseminação e resistência intrínseca às abordagens terapêuticas convencionais (Pavri *et al.*, 2016). Apesar dos avanços substanciais proporcionados por terapias-alvo e imunoterapias, uma proporção significativa de pacientes não apresenta resposta satisfatória ou desenvolve resistência secundária aos tratamentos atualmente disponíveis, o que reforça a necessidade urgente de novas estratégias terapêuticas com mecanismos de ação alternativos e mais eficazes (Kudchadkar *et al.*, 2020).

Dentre as alterações genéticas associadas à agressividade do melanoma, destaca-se a mutação BRAF V600E, frequentemente acompanhada pela perda funcional de genes supressores tumorais, como PTEN e TP53, e pela ativação constitutiva da via MAPK (Sini *et al.*, 2018). Essa mutação está presente na linhagem celular SK-MEL-28, amplamente utilizada como modelo experimental devido à sua alta relevância clínica. O domínio catalítico mutado da proteína BRAF confere uma conformação constitutivamente ativa, com atividade quinase aproximadamente 500 vezes superior à da BRAF do tipo selvagem, resultando em desregulação do ciclo celular, inibição da apoptose e estímulo à proliferação celular (Leonardi *et al.*, 2018).

Nesse contexto, é relevante destacar que CA5 demonstrou atividade citotóxica sobre a linhagem SK-MEL-28 reforçando seu potencial como candidato terapêutico em linhagens agressivas de câncer. A atividade citotóxica da CA5 foi avaliada na linhagem de melanoma metastático humano SK-MEL-28 por meio do ensaio de SRB, após 24 horas de incubação com o composto. A análise da curva concentração-efeito demonstrou que a CA5 foi capaz de inibir significativamente a proliferação celular e induzir morte celular regulada na linhagem avaliada. A linhagem SK-MEL-28 mostrou-se sensível à exposição ao composto, apresentando uma concentração inibitória média (CI₅₀) de 0,13 nM concentração inibitória total (CIT) de 3,92 nM e concentração letal média (CL₅₀) de 111 nM.

Apesar da intervenção cirúrgica ser eficaz no tratamento das formas iniciais do melanoma, essa estratégia terapêutica e a quimioterapia com dacarbazina demonstram baixa

efetividade em estágios metastáticos da doença, contribuindo para a redução da taxa de sobrevida dos pacientes (Rager *et al.*, 2022). Nos casos avançados, os imunoterápicos, como ipilimumabe, nivolumabe e pembrolizumabe, têm se consolidado como opções terapêuticas de primeira linha, promovendo respostas anti-citocinas superiores e com menor toxicidade em comparação aos tratamentos baseados em citocinas utilizados anteriormente (Topalian *et al.*, 2012). Contudo, é importante destacar que entre 10 e 30% dos pacientes apresentam rápida resistência adquirida a essas terapias imunológicas, o que evidencia a urgência no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas mais eficazes e duradouras (Inaba *et al.*, 2019).

Dessa forma, a morte celular imunogênica (MCI) destaca-se como uma abordagem terapêutica promissora, ao aliar a eliminação direta das células tumorais à ativação do sistema imunológico do hospedeiro. A MCI é caracterizada pela liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como calreticulina (CRT), HMGB1 e ATP, que atuam como sinais de alarme, promovendo a ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e desencadeando uma resposta imune adaptativa específica contra o tumor (Kroemer *et al.*, 2022; Garg *et al.*, 2012).

Em condições de homeostase, os DAMPs exercem funções estruturais e metabólicas essenciais, não relacionadas à ativação imunológica. No entanto, durante a MCI, a sua liberação ocorre de maneira espaço-temporal altamente regulada, conferindo a esses sinais a capacidade de induzir ou amplificar respostas imunes antitumorais (Galluzzi *et al.*, 2020).

Os resultados da análise morfológica das células SK-MEL-28 por citometria de fluxo demonstraram que a incubação com a CA5 provocou aumento da granulosidade celular, acompanhado por redução no volume celular. A associação entre diminuição do tamanho celular e aumento da complexidade interna sugere a ativação de mecanismos de morte celular regulada, que deve ser melhor explorada posteriormente (Ibuki; Toyooka, 2012).

Além disso, o aumento da granulosidade pode ser indicativo de resposta ao estresse celular mediado por espécies reativas de oxigênio (ROS), comumente associadas à indução de autofagia e formação de autofagossomos (Ashraf *et al.*, 2022; Gosselin *et al.*, 2009). De forma comparativa, a incubação com doxorubicina (Dox) — utilizada como controle positivo — resultou em um aumento acentuado na população de células com volume reduzido, sem incremento significativo na complexidade celular. Este achado pode estar relacionado à indução de morte celular regulada precocemente pela Doxorubicina, sem danos estruturais extensivos às organelas celulares, o que é corroborado pelo aumento de quase seis vezes na proporção de células mortas em relação ao controle negativo (Hu *et al.*, 2021).

Quanto à integridade da membrana plasmática, observou-se um aumento significativo na proporção de células mortas em todas as condições testadas com CA5, bem como no grupo Dox, indicando a efetiva indução de morte celular por ambas as substâncias. É válido ressaltar que, apesar das cromomicinas serem utilizadas em altas concentrações como corantes de DNA fluorescente no mesmo canal de emissão do DAPI (Brammer; Toniazzo; Poersch, 2015), a concentração utilizada nos experimentos não apresentou interferência na análise. A ausência de interferência foi confirmada por meio de controles negativos com e sem a marcação pelo fluorocromo DAPI, nos quais não se verificou diferença significativa na MFI do DAPI.

Os resultados obtidos, aliados às alterações morfológicas observadas, sugerem que a CA5 induz morte celular regulada nas células de melanoma metastático humano. No entanto, são necessários ensaios adicionais de citometria de fluxo com o uso de marcadores específicos de vias apoptóticas para confirmar o envolvimento da maquinaria apoptótica nesse processo. Embora a adaptação celular ao estresse possa, em alguns casos, desencadear respostas inflamatórias tolerogênicas locais, é essencial que as células tumorais sejam efetivamente eliminadas para que seus fragmentos sejam fagocitados por células apresentadoras de antígenos (APCs), especialmente células dendríticas (CDs), e devidamente processados para apresentação antigênica (Lamberti *et al.*, 2020).

As células SK-MEL-28 incubadas tanto com CA5 como com Dox apresentaram a capacidade de externalizar CRT na superfície da membrana plasmática. No escopo da morte celular imunogênica (MCI), a exposição da CRT na membrana de células tumorais representa um dos eventos iniciais cruciais para a ativação da resposta imune antitumoral (Kroemer *et al.*, 2013). A proteína, normalmente localizada no lúmen do retículo endoplasmático, é translocada para a membrana plasmática poucas horas após o estímulo com agentes indutores de MCI interagindo com a proteína ERp57 (Kroemer *et al.*, 2013).

A co-translocação de CRT e ERp57 para a superfície celular funciona como um sinal pró-fagocítico, promovendo a interação da CRT com o receptor CD91 expresso nas células dendríticas. Essa interação facilita a fagocitose das células tumorais e subsequente apresentação de seus antígenos, contribuindo para a ativação de uma resposta imune adaptativa antitumoral (Tesniere *et al.*, 2008).

Fucikova e colaboradores (2016) demonstraram que a exposição de CRT na superfície de blastos malignos aumentou significativamente a imunogenicidade tumoral, estando associada a uma maior sobrevida global em pacientes com leucemia mieloide aguda submetidos à quimioterapia. Esses achados reforçam o valor clínico da CRT como um

marcador funcional da morte celular imunogênica (MCI) (Fucikova *et al.*, 2016).

A ativação imune mediada pela proteína HMGB1 ocorre por meio de sua interação com diferentes receptores de reconhecimento de padrão, como os receptores do tipo Toll (TLR4) e o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE, do inglês Receptor for Advanced Glycation End Products). A família TLR é responsável por induzir respostas da imunidade inata, ativando reações inflamatórias por meio da liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Adicionalmente, o RAGE é uma proteína da superfamília das imunoglobulinas com estrutura transmembranar que reconhece HMGB1 e promove a ativação da via NF- κ B (Troitskaya *et al.*, 2022).

Além disso, a HMGB1 pode exercer atividade quimiotática, sendo capaz de formar um complexo com a quimiocina CXCL12 e sinalizar por meio do receptor CXCR4 (Kepp; Senovilla; Kroemer, 2014). A liberação da proteína HMGB1 do núcleo para o meio extracelular pode ser inferida indiretamente por meio da diminuição do sinal de fluorescência emitido pelo anticorpo conjugado ao fluoróforo utilizado na detecção intracelular (Lee *et al.*, 2019).

Apesar da ausência de evidências indicativas da liberação extracelular de HMGB1 após 24 horas de incubação com a CA5, esse resultado não invalida os dados previamente obtidos nem reduz o potencial farmacológico da CA5 como indutor de MCI. Considerando que a liberação de HMGB1 é um evento tardio no processo de MCI, decorrente da progressão da morte celular e permeabilização das membranas nucleares e plasmáticas, faz-se necessária a avaliação de tempos adicionais de incubação para confirmar com maior robustez a ocorrência deste marcador nos modelos celulares utilizados neste estudo.

Estudos comparativos de expressão gênica global envolvendo compostos que se ligam ao sulco menor do DNA demonstraram que a incubação com a cromomicina A3 em linhagens celulares de leucemia humana resulta na repressão de genes relacionados a funções celulares essenciais, enquanto induz a expressão de genes associados à ativação de vias apoptóticas (Zihlif *et al.*, 2010). Adicionalmente, evidências prévias obtidas em modelos murinos de melanoma metastático indicaram um aumento na expressão relativa de genes relacionados à autofagia (como BECN1) e à apoptose (como BAD) após a incubação com CA5 (Florêncio *et al.*, 2022).

Neste estudo, a CA5 modulou a expressão transcricional de nove genes relacionados a processos celulares de autofagia, estresse do retículo endoplasmático e apoptose. Observou-se que, particularmente na concentração de 10 nM, a CA5 induziu alterações mais pronunciadas na expressão dos genes pró-apoptóticos BAX (do inglês *Bcl-2-associated X protein*) e BAK

(do inglês *Bcl-2 homologous antagonist/killer*), embora sem modificação significativa na razão entre genes pró- e antiapoptóticos, como BCL2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*), sugerindo um envolvimento da via intrínseca da apoptose, que deverá ser melhor explorada em experimentos futuros.

Em relação à resposta ao estresse do retículo endoplasmático, observou-se uma regulação negativa do fator de transcrição ATF4 (do inglês *Activating Transcription Factor 4*) o qual desempenha papel central na mediação de respostas adaptativas ao estresse do retículo. A diminuição da expressão de ATF4 sugere falhas no restabelecimento da homeostase e possível progressão para morte celular (Liu *et al.*, 2023).

Ainda nesse contexto, a expressão reduzida do gene CALR (do inglês *Calreticulin*), que codifica a chaperona calreticulina — normalmente expressa de forma constitutiva em condições fisiológicas — reforça a hipótese de uma interrupção na produção de proteínas intracelulares, típica de estados de estresse do retículo (Park, Kang e So, 2021).

No processo autofágico, a formação de autofagossomos é frequentemente induzida fisiologicamente pela privação de nutrientes, mas também pode ser observada em resposta a espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) (Noguchi *et al.*, 2020). Neste trabalho, tal mecanismo foi evidenciado pelo aumento na expressão de ATG5 (do inglês *Autophagy Related 5*), um gene essencial para a biogênese dos autofagossomos, observado após 6 horas de incubação com 10 nM de CA5 (Debnath; Gammoh; Ryan, 2023). Adicionalmente, foi identificado aumento na expressão do gene JUN (do inglês *Jun proto-oncogene*), reconhecido por sua indução em resposta ao estresse oxidativo mediado por ROS, em ambas as concentrações testadas (3 e 10 nM), também no tempo de 6 horas (Zhang *et al.*, 2007). Esses dados reforçam a hipótese de que a CA5 induz uma resposta autofágica associada à geração de estresse oxidativo celular, que deverá ser melhor explorada posteriormente.

A análise de rede através do *software* GeneMANIA revelou uma complexa interconexão entre os processos de apoptose, autofagia e estresse de retículo, indicando que múltiplas vias de sinalização foram simultaneamente ativadas pela CA5, culminando na morte celular regulada observada nos experimentos de citometria de fluxo e SRB.

Apesar dos resultados promissores, a confirmação de que a CA5 atua como um indutor genuíno de morte celular imunogênica em modelos de melanomas metastáticos humanos requer a realização de experimentos adicionais. Entre eles, destacam-se a avaliação de outros DAMPs, como a liberação de ATP e a fosforilação do fator de iniciação da tradução eIF2 α , bem como a condução de ensaios de vacinação *in vivo* para validar sua eficácia

imunogênica em modelos experimentais, que estão fora do escopo do trabalho atual.

7. CONCLUSÃO

A CA5 induziu alterações compatíveis com estresse e morte celular regulada em melanoma metastático humano *in vitro*. Observou-se alterações morfológicas e a exposição de CRT na superfície celular após incubação com a CA5, sugerindo que os efeitos imunogênicos previamente descritos em modelos murinos por este grupo de pesquisa podem ser parcialmente reproduzidos em sistemas celulares humanos. A análise de expressão gênica por qPCR indicou a participação de vias associadas à autofagia, estresse do retículo endoplasmático e apoptose, reforçando a complexidade dos mecanismos envolvidos na morte celular induzida pela CA5. Esses achados sustentam o potencial translacional da CA5 como candidata terapêutica para o tratamento de melanomas metastáticos.

8. REFERÊNCIAS

- ALVES, A. et al. Marine-Derived Compounds with Potential Use as Cosmeceuticals and Nutricosmetics. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2536, 29 maio 2020.
- ALZEIBAK, R. et al. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 9, n. 1, p. e001926, jan. 2021.
- APETOH, L. et al. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1050–1059, set. 2007.
- ARNOLD, M. et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. **JAMA Dermatology**, v. 158, n. 5, p. 495, 1 maio 2022.
- ASHRAF, W. et al. Tannin extract from maritime pine bark exhibits anticancer properties by targeting the epigenetic UHRF1/DNMT1 tandem leading to the re-expression of *TP73*. **Food & Function**, v. 13, n. 1, p. 316–326, 2022.
- ATKINS, M. B. et al. Combination Dabrafenib and Trametinib Versus Combination Nivolumab and Ipilimumab for Patients With Advanced *BRAF* -Mutant Melanoma: The DREAMseq Trial—ECOG-ACRIN EA6134. **Journal of Clinical Oncology**, v. 41, n. 2, p. 186–197, 10 jan. 2023.
- BAINS, S. J. et al. Immunogenic cell death by neoadjuvant oxaliplatin and radiation protects against metastatic failure in high-risk rectal cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 69, n. 3, p. 355–364, mar. 2020.
- BARRECA, M. et al. Marine Anticancer Agents: An Overview with a Particular Focus on Their Chemical Classes. **Marine Drugs**, v. 18, n. 12, p. 619, 4 dez. 2020.
- BEZU, L. et al. Combinatorial Strategies for the Induction of Immunogenic Cell Death. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 24 abr. 2015.
- BEZU, L. et al. eIF2 α phosphorylation is pathognomonic for immunogenic cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 8, p. 1375–1393, ago. 2018.
- BRAMMER, S. P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L. B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 0, 2015.
- BROMBIN, A.; PATTON, E. E. Melanocyte lineage dynamics in development, growth and

disease. **Development**, v. 151, n. 15, p. dev201266, 1 ago. 2024.

CHAKRABARTI, S.; DASGUPTA, D.; BHATTACHARYYA, D. Role of mg²⁺ in chromomycin a₃ - DNA interaction: a molecular modeling study. **Journal of Biological Physics**, v. 26, n. 3, p. 203–218, 2000.

CHATTOPADHYAY, S. et al. Small-molecule in cancer immunotherapy: Revolutionizing cancer treatment with transformative, game-changing breakthroughs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1879, n. 5, p. 189170, set. 2024.

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

COOREMAN, K. et al. Emerging pharmaceutical therapies of Ascidian-derived natural products and derivatives. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 102, p. 104254, set. 2023.

DEBNATH, J.; GAMMOH, N.; RYAN, K. M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 8, p. 560–575, ago. 2023.

DEL BIANCO SAHM, B. et al. FOSTERING CONSERVANCY THROUGH BIOPROSPECTION: THE PHARMACEUTICAL VALUE OF THE BRAZILIAN ASCIDIAN FAUNA. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 55, n. Especial, p. 432–460, 21 mar. 2022.

DIMITROVA, M.; WEBER, J. Melanoma—Modern Treatment for Metastatic Melanoma. **The Cancer Journal**, v. 30, n. 2, p. 79–83, mar. 2024.

EDDY, K.; CHEN, S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 8984, 26 nov. 2020.

ESFAHANI, K. et al. A Review of Cancer Immunotherapy: From the Past, to the Present, to the Future. **Current Oncology**, v. 27, n. 12, p. 87–97, 1 abr. 2020.

FLORÊNCIO, K. G. D. et al. Chromomycin A₅ induces bona fide immunogenic cell death in melanoma. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 941757, 9 nov. 2022.

FUCIKOVA, J. et al. Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. **Blood**, v. 128, n. 26, p. 3113–3124, 29 dez. 2016.

GALLUZZI, L. et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. **Nature**

Reviews Immunology, v. 17, n. 2, p. 97–111, fev. 2017.

GALLUZZI, L. et al. Targeting immunogenic cell stress and death for cancer therapy. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 23, n. 6, p. 445–460, jun. 2024.

GALLUZZI, L. et al. Immunogenic cell death in cancer: concept and therapeutic implications. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, n. 1, p. 162, 2 mar. 2023.

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. e000337, mar. 2020.

GARCÍA-ARANDA, M.; PÉREZ-RUIZ, E.; REDONDO, M. Bcl-2 Inhibition to Overcome Resistance to Chemo- and Immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3950, 8 dez. 2018.

GARG, A. D. et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death: CRT, ATP, and immunogenic cancer cell death. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 5, p. 1062–1079, 7 mar. 2012.

GIVAN, A. L. Flow Cytometry: An Introduction. Em: HAWLEY, T. S.; HAWLEY, R. G. (Eds.). **Flow Cytometry Protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 699p. 1–29.

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 & Disease**, v. 7, n. 6, p. e2243–e2243, 2 jun. 2016.

GOSSELIN, K. et al. Senescent Keratinocytes Die by Autophagic Programmed Cell Death. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 2, p. 423–435, fev. 2009.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 22 fev. 2007.

GREEN, D. R. et al. Immunogenic and tolerogenic cell death. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 353–363, maio 2009.

GUIMARÃES, L. A. et al. Chromomycin A2 induces autophagy in melanoma cells. **Marine Drugs**, v. 12, n. 12, p. 5839–5855, 4 dez. 2014.

HAMADA, S.; FUJITA, S. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. **Histochemistry**, v. 79, n. 2, p. 219–226, 1983.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HAQUE, N. et al. Marine Natural Products in Clinical Use. **Marine Drugs**, v. 20, n. 8, p. 528, 18 ago. 2022.

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, fev. 2019.

HU, X. et al. Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 634690, 4 mar. 2021.

HUMEAU, J. et al. Gold Standard Assessment of Immunogenic Cell Death in Oncological Mouse Models. Em: LÓPEZ-SOTO, A.; FOLGUERAS, A. R. (Eds.). **Cancer Immunossurveillance**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2019. v. 1884p. 297–315.

IBUKI, Y.; TOYOOKA, T. Nanoparticle Uptake Measured by Flow Cytometry. Em: REINEKE, J. (Ed.). **Nanotoxicity**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 926p. 157–166.

JACOBS, J. J. L. et al. Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19ARF) and is amplified in a subset of human breast cancers. **Nature Genetics**, v. 26, n. 3, p. 291–299, nov. 2000.

JIMENEZ, P. C. et al. Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 1, p. 3–27, jan. 2020.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; COSTA-LOTUFO, L. V. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. **Clinics**, v. 73, p. e482s, 2018.

JUNG, S.; JEONG, H.; YU, S.-W. Autophagy as a decisive process for cell death. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 6, p. 921–930, jun. 2020.

KEPP, O.; SENOVILLA, L.; KROEMER, G. Immunogenic cell death inducers as anticancer agents. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5190–5191, 30 jul. 2014.

KEPP, O. et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. **OncoImmunology**, v. 3, n. 9, p. e955691, 2 set. 2014.

KNEZEVIC, C. E.; CLARKE, W. Cancer Chemotherapy: The Case for Therapeutic Drug Monitoring. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 42, n. 1, p. 6–19, fev. 2020.

KROEMER, G. et al. Immunogenic cell stress and death. **Nature Immunology**, v. 23, n. 4, p. 487–500, abr. 2022.

KROEMER, G. et al. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 51–72, 21 mar. 2013.

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

KUDCHADKAR, R. R. et al. Metastatic melanoma. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 2, p. 78–85, mar. 2020.

KUIJPERS, A. M. J.; VAN AKKOOI, A. C. J. Neo-Adjuvant Therapy for Metastatic Melanoma. **Cancers**, v. 16, n. 7, p. 1247, 22 mar. 2024.

LA FERLA, B. et al. Natural glycoconjugates with antitumor activity. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, n. 3, p. 630–648, 2011.

LAMBERTI, M. J. et al. Dendritic Cells and Immunogenic Cancer Cell Death: A Combination for Improving Antitumor Immunity. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 256, 12 mar. 2020.

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, 2 jul. 2015.

LEE, J.-J. et al. HMGB1 modulates the balance between senescence and apoptosis in response to genotoxic stress. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 10, p. 10942–10953, out. 2019.

LEONARDI, G. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, 27 fev. 2018.

LINGBEEK, M. E.; JACOBS, J. J. L.; VAN LOHUIZEN, M. The T-box Repressors TBX2 and TBX3 Specifically Regulate the Tumor Suppressor Genep14 via a Variant T-site in the Initiator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 26120–26127, jul. 2002.

LIU, S. et al. Autophagy: Regulator of cell death. **Cell Death & Disease**, v. 14, n. 10, p. 648, 4 out. 2023.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LUKE, J. J. et al. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 8, p. 463–482, ago. 2017.

MAHARJAN, R. et al. A novel oral metronomic chemotherapy provokes tumor specific immunity resulting in colon cancer eradication in combination with anti-PD-1 therapy. **Biomaterials**, v. 281, p. 121334, fev. 2022.

NEGREANU-PIRJOL, B.-S. et al. Marine Bioactive Compounds Derived from Macroalgae as New Potential Players in Drug Delivery Systems: A Review. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 1781, 25 ago. 2022.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448–3459, dez. 2013.

NOGUCHI, M. et al. Autophagy as a modulator of cell death machinery. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 7, p. 517, 8 jul. 2020.

OBEID, M. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. **Nature Medicine**, v. 13, n. 1, p. 54–61, jan. 2007.

PARK, S.-M.; KANG, T.-I.; SO, J.-S. Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes. **Biomedicines**, v. 9, n. 7, p. 791, 8 jul. 2021.

PAVRI, S. N. et al. Malignant Melanoma: Beyond the Basics. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 138, n. 2, p. 330e–340e, ago. 2016.

PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents 596. Isolation and structure of chromomycin A₅ from a Beaufort Sea microorganism. **RSC Advances**, v. 5, n. 12, p. 9116–9122, 2015.

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

PRESTEGARD, S. K. et al. Marine Benthic Diatoms Contain Compounds Able to Induce Leukemia Cell Death and Modulate Blood Platelet Activity. **Marine Drugs**, v. 7, n. 4, p.

605–623, 18 nov. 2009.

RADOGNA, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Natural modulators of the hallmarks of immunogenic cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 162, p. 55–70, abr. 2019.

RAGER, T. et al. Treatment of Metastatic Melanoma with a Combination of Immunotherapies and Molecularly Targeted Therapies. **Cancers**, v. 14, n. 15, p. 3779, 3 ago. 2022.

RASTRELLI, M. et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 28, n. 6, p. 1005–1011, 2014.

RAYAN, A.; RAIYN, J.; FALAH, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187925, 9 nov. 2017.

ROBERT, C. et al. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 7, p. 626–636, 15 ago. 2019.

RODRIGUEZ-RUIZ, M. E. et al. Immunological impact of cell death signaling driven by radiation on the tumor microenvironment. **Nature Immunology**, v. 21, n. 2, p. 120–134, fev. 2020.

ROY, A. et al. Methylglyoxal at metronomic doses sensitizes breast cancer cells to doxorubicin and cisplatin causing synergistic induction of programmed cell death and inhibition of stemness. **Biochemical Pharmacology**, v. 156, p. 322–339, out. 2018.

SAEED, A. I. et al. TM4: A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis. **BioTechniques**, v. 34, n. 2, p. 374–378, fev. 2003.

SAHM, B. D. B. et al. Targeting the Oncogenic TBX2 Transcription Factor With Chromomycins. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 110, 3 mar. 2020.

SAMPLE, A.; HE, Y. Mechanisms and prevention of UV -induced melanoma. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 34, n. 1, p. 13–24, jan. 2018.

SANDRU, A. et al. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. **Journal of Medicine and Life**, v. 7, n. 4, p. 572–576, 2014.

SANSONE, C. et al. Natural Compounds of Marine Origin as Inducers of Immunogenic Cell Death (ICD): Potential Role for Cancer Interception and Therapy. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 231, 25 jan. 2021.

SINI, M. C. et al. Genetic alterations in main candidate genes during melanoma progression. **Oncotarget**, v. 9, n. 9, p. 8531–8541, 2 fev. 2018.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990.

SONG, X. et al. Overall survival in patients with metastatic melanoma. **Current Medical Research and Opinion**, v. 31, n. 5, p. 987–991, 4 maio 2015.

SPROOTEN, J. et al. Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in oncology. **OncoImmunology**, v. 12, n. 1, p. 2219591, 31 dez. 2023.

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. **Melanoma Research**, v. 23, n. 5, p. 381–389, out. 2013.

TESNIERE, A. et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 1, p. 3–12, jan. 2008.

TIAN, X. et al. Targeting apoptotic pathways for cancer therapy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 134, n. 14, p. e179570, 15 jul. 2024.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2443–2454, 28 jun. 2012.

TROITSKAYA, O. S. et al. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. **Acta Naturae**, v. 14, n. 1, p. 40–53, 10 maio 2022.

VANMEERBEEK, I. et al. Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology. **Oncoimmunology**, v. 9, n. 1, p. 1703449, 2020.

WANG, J. et al. Oxaliplatin Induces Immunogenic Cell Death in Human and Murine Laryngeal Cancer. **Journal of Oncology**, v. 2022, p. 1–12, 12 set. 2022.

WANG, Y.-N.; MENG, L.-H.; WANG, B.-G. Progress in Research on Bioactive Secondary Metabolites from Deep-Sea Derived Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 18, n. 12, p. 614, 2 dez. 2020.

WARDE-FARLEY, D. et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_2, p. W214–W220, 1 jul. 2010.

WEINER, L. M.; MURRAY, J. C.; SHUPTRINE, C. W. Antibody-Based Immunotherapy of

Cancer. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1081–1084, mar. 2012.

WICKMAN, G.; JULIAN, L.; OLSON, M. F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 5, p. 735–742, maio 2012.

WILKE, D. V. et al. Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Medica**, v. 87, n. 01/02, p. 49–70, fev. 2021.

XIAO, Y.; YU, D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 221, p. 107753, maio 2021.

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, jun. 2019.

YUN, C. W.; KIM, H. J.; LEE, S. H. Therapeutic Application of Diverse Marine-derived Natural Products in Cancer Therapy. **Anticancer Research**, v. 39, n. 10, p. 5261–5284, out. 2019.

ZHANG, A. et al. Tumor heterogeneity reshapes the tumor microenvironment to influence drug resistance. **International Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 7, p. 3019–3033, 2022.

ZHANG, Y. et al. Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model. **BMC Cancer**, v. 7, n. 1, p. 145, dez. 2007.

ZHU, M. et al. Immunogenic Cell Death Induction by Ionizing Radiation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 705361, 20 ago. 2021.

ZIHLIF, M. et al. Effects of DNA minor groove binding agents on global gene expression. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 323–330, 2010.

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

ANEXO I - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

1. Cultivo de células

A linhagem celular de melanoma metastático humano SK-MEL-28 foi utilizada em todos os experimentos deste estudo, tanto para a avaliação da atividade citotóxica quanto para os demais ensaios necessários à realização do trabalho. Essa linhagem foi doada pela profa. Leticia Lotufo da USP-SP.

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura celular (Corning, 25 cm² – volume de 50 mL, ou 75 cm² – volume de 250 mL), utilizando o meio de cultura DMEM/F12 (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) (Gibco).

O manuseio das células foi realizado em câmaras de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream Classe II-B2; VECO, modelo Biosafe 12 Classe II), e as culturas foram mantidas em incubadoras de CO₂ a 37 °C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ (SANYO, modelo MCO-19AIC; NUAIRE, modelo TS Autoflow).

O crescimento celular foi monitorado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (LABOMED, modelo TCM 400; Nikon, modelo Diaphot), e as subculturas foram realizadas conforme necessário. Para o desprendimento das células aderentes, utilizou-se solução de tripsina-EDTA a 0,5% (Gibco), diluída 10 vezes em tampão fosfato salino (PBS).

2. Aquisição dos dados

Para os experimentos de viabilidade celular por Sulforrodamina B os dados foram adquiridos em leitor de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 570 nm.

Para os experimentos de citometria de fluxo, foram adquiridos 10.000 eventos por amostra, excluindo *debris* e *doublets*, utilizando o citômetro FACSVerse (BD Biosciences).

Para os experimentos de qPCR, as células foram cultivadas em placas de 60 mm e as amostras foram coletadas com 1 mL de TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), com o RNA total foi extraído conforme as instruções do fabricante. O protocolo incluiu a adição de clorofórmio, precipitação com isopropanol e lavagem com etanol a 70%. A concentração e a

pureza do RNA foram avaliadas por meio da razão de absorbância 260/280, utilizando um espectrofotômetro NanoDrop.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o sistema GoScript Reverse Transcriptase (Promega). As reações de qPCR foram conduzidas no equipamento Rotor-Gene 6000 (Corbett Research), com o uso do GoTaq qPCR Master Mix (Promega).

3. Análise de dados

A análise dos dados de citometria foi conduzida no *software* FlowJo, versão 10.6 (Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company), com os resultados expressos em porcentagem das populações celulares ou em intensidade mediana de fluorescência (MFI, *Median Fluorescence Intensity*), conforme o objetivo de cada ensaio. Para a análise estatística, os dados foram processados no *software* GraphPad Prism (versão 8.0, GraphPad Software), utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Anticorpos conjugados a fluorocromo

O anticorpo primário anti-CRT (Cell Signaling Technology, 1:100) foi utilizado em conjunto ao anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, 1:400), sob condições de temperatura e proteção à luz estabelecidas pelo fabricante.

O anticorpo primário anti-HMGB1 (BioLegend, diluição 1:100) foi utilizado em conjunto ao anticorpo secundário Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, diluição 1:400), sob condições de temperatura e proteção à luz estabelecidas pelo fabricante.