UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
AGNES KOBAYASHI CALVO DE SANT'ANA

ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DO PEPTÍDEO E12F DERIVADO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO BRN2 EM DIFERENTES LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO

Mogi das Cruzes, SP
2025

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

AGNES KOBAYASHI CALVO DE SANT'ANA

ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DO PEPTÍDEO E12F DERIVADO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO BRN2 EM DIFERENTES LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia aplicada a saúde humana, animal e ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Denise Costa Arruda

Mogi das Cruzes, SP
2025

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

S232e

Sant'ana, Agnes Kobayashi Calvo de
Estudo do efeito antitumoral do peptídeo E12F derivado do fator de transcrição BRN2 em diferentes linhagens de melanoma humano / Agnes Kobayashi Calvo de Sant'ana. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Denise Costa Arruda

1. Melanoma 2. Neoplasias cutâneas 3. Peptídeos I. Arruda, Denise Costa II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 616.994

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

Tel.: (11) 4798-7000
0800 19 2001
www.umc.br

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DO PEPTÍDEO E12F DERIVADO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO BRN2 EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Agnes Kobayashi Calvo de Sant'ana**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Denise Costa Arruda e Tiago Rodrigues, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Dayane Batista Tada, da Universidade Federal de São Paulo. Sob a presidência da primeira, como orientadora da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pela senhora presidenta da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA — (aprovado(a) /reprovado(a))

por UNANIMIDADE — (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 27 de fevereiro de 2025.

Comissão Examinadora — Julgamento

gov.br Documento assinado digitalmente
DAYANE BATISTA TADA
Data: 28/02/2025 08:46:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Dayane Batista Tada — APROVADA (aprovado(a) / reprovado(a))

gov.br Documento assinado digitalmente
TIAGO RODRIGUES
Data: 28/02/2025 18:33:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof Dr. Tiago Rodrigues — APROVADA (aprovado(a) / reprovado(a))

Profª. Drª Denise Costa Arruda — APROVADA (aprovado(a) / reprovado(a))

Dedico este trabalho àqueles que em vida
se tornaram inspiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a aqueles que me ensinaram o que é amar incondicionalmente e o que é perseverança. Agradeço à minha família, a aqueles que me ensinaram a ter fé e coragem. A aqueles que regam meus sonhos como seus próprios e que me oferecem diariamente seus corações como lar.

Agradeço também aos meus amigos, aqueles que indubitavelmente acreditaram em mim, mesmo quando eu não conseguia.

Agradeço aos meus companheiros de bancada, especialmente ao Guilherme Madruga, Maria Eduarda Rafful e Rebeca Chaguri por estarem ao meu lado diariamente mesmo nos mais conturbados dos dias, mas principalmente por confiarem no meu trabalho para fazer parte de um breve momento de suas formações como cientistas. Agradeço também as minhas companheiras de vivências Jociele Gonçalves e Juliana Machado por me ouvirem, compreenderem e apoiarem todos os dias.

Agradeço a Dra. Maria Carolina Mariano Cesar por ser um exemplo diário de dedicação, força, companheirismo e alegria.

Agradeço a todos os educadores que tive a honra de aprender durante esta curta caminhada. Em especial a professora Dra. Denise Costa Arruda por me dar a oportunidade de me reconhecer como cientista e por me aconselhar e apoiar em todos os momentos. Agradeço grandemente também aos professores Dr. Tiago Rodrigues e Dr. Mauricio Machado por todas as trocas e conversas que tive a honra de ter, mas principalmente por me inspirarem, apoiarem e acreditarem em mim como cientista em formação. Agradeço aos três por enxergarem potencial em mim, mesmo quando eu não conseguia enxergar.

Agradeço aos colegas e professores do Laboratório de Genômica Estrutural, Laboratório de Organismos Aquáticos e Aquicultura, Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica e Laboratório MitoMetab (UFABC) pela paciência e disponibilidade no uso de equipamentos, reagentes e compartilhamento de conhecimentos.

Agradeço também a Universidade de Mogi das Cruzes pela a oportunidade de realizar este projeto, me formar como mestre e pela estrutura fornecida.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.821232/2023-00 (PROSUP); O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Código de Financiamento 2022/06400-0 e com o apoio da FAEP (Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa) da UMC (Universidade de Mogi das Cruzes) pelo apoio à pesquisa em nossa universidade.

RESUMO

O melanoma se origina a partir da transformação maligna de melanócitos, células localizadas na camada basal da epiderme responsáveis pela produção de melanina. Este tipo de câncer de pele é considerado o mais agressivo devido ao seu alto potencial metastático. As principais mutações associadas ao melanoma envolvem os genes B-RAF e N-RAS que levam a ativação constitutiva da via MAPK e, consequentemente à desregulação dos mecanismos de proliferação, morte celular, migração e invasão. O fator de transcrição BRN2 é superexpresso no melanoma favorecendo a progressão tumoral. Assim, compostos capazes modular a atividade de BRN2 e consequentemente controlar a expressão de proteínas reguladas por este fator de transcrição, apresentam potencial terapêutico para o tratamento do melanoma. Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito do peptídeo E12F em linhagens de melanoma humano, avaliando seu impacto na proliferação celular, formação de colônias, migração, invasão e modulação de proteínas associadas à via MAPK e ao BRN2. Foram utilizadas as linhagens SK-MEL-25, A-375 (mutação B-RAF^{V600E}) e SK-MEL-147 (mutação N-RAS^{Q61R}). Na linhagem SK-MEL-25, o peptídeo E12F inibiu a formação de colônias, reduziu a migração e a invasão celular, além de diminuir a fosforilação de ERK e aumentar a expressão de MITF e CDH13. Em células A-375, o peptídeo reduziu a proliferação a partir de 48 h, inibiu a formação de colônias, diminuiu a ativação de ERK e aumentou a expressão de MITF, sem alterar os níveis de CDH13. Já na linhagem SK-MEL-147, o peptídeo induziu um efeito paradoxal na via MAPK, sem impactos significativos na proliferação, migração ou invasão. Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação do peptídeo E12F está relacionada à modulação da via MAPK e sua interação com proteínas como MITF e CDH13, variando conforme o contexto genético das células. Além disso, ao combinar o peptídeo com vemurafenibe e sorafenibe foi observado um efeito sinérgico nas linhagens SK-MEL-25 e A-375. O peptídeo mostrou potencial terapêutico, destacando-se como uma molécula promissora para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do melanoma.

Palavras-chave: melanoma; peptídeo; vias de sinalização; mutações; E12F.

ABSTRACT

Melanoma originates from the malignant transformation of melanocytes, cells located in the basal layer of the epidermis and responsible for melanin production. This type of skin cancer is considered the most aggressive due to its high metastatic potential. The main mutations associated with melanoma involve the B-RAF and N-RAS genes, which lead to the constitutive activation of the MAPK pathway and, consequently, the dysregulation of mechanisms related to proliferation, cell death, migration, and invasion. The transcription factor BRN2 is overexpressed in melanoma, promoting tumor progression. Therefore, compounds capable of modulating BRN2 activity and, consequently, controlling the expression of proteins regulated by this transcription factor, hold therapeutic potential for melanoma treatment. This study aimed to investigate the effect of the E12F peptide on human melanoma cell lines, evaluating its impact on cell proliferation, colony formation, migration, invasion, and modulation of proteins associated with the MAPK pathway and BRN2. The SK-MEL-25, A-375 (B-RAF^{V600E} mutation), and SK-MEL-147 (N-RAS^{Q61R} mutation) cell lines were used. In the SK-MEL-25 line, the E12F peptide inhibited colony formation, reduced cell migration and invasion, decreased ERK phosphorylation, and increased MITF and CDH13 expression. In A-375 cells, the peptide reduced proliferation after 48 hours, inhibited colony formation, decreased ERK activation, and increased MITF expression without altering CDH13 levels. In the SK-MEL-147 line, the peptide induced a paradoxical effect on the MAPK pathway, with no significant impacts on proliferation, migration, or invasion. These results suggest that the mechanism of action of the E12F peptide is related to the modulation of the MAPK pathway and its interaction with proteins such as MITF and CDH13, varying according to the genetic context of the cells. Furthermore, when combining the peptide with vemurafenib and sorafenib, a synergistic effect was observed in the SK-MEL-25 and A-375 cell lines. The peptide showed therapeutic potential, emerging as a promising molecule for the development of new strategies in melanoma treatment.

Keywords: melanoma; peptide; signaling pathways; mutations; E12F.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais características para o desenvolvimento e progressão tumoral. 14
Figura 2 - Estágios do desenvolvimento do melanoma. 16
Figura 3 - Via de sinalização de proteínas quinase ativadas por mitógenos - MAPK. 19
Figura 4 - Impacto de mutações na via de sinalização MAPK. 20
Figura 5 – Estrutura tridimensional do fator de transcrição BRN2. 24
Figura 6 - Sequência de aminoácidos do BRN2 murino e humano. 25
Figura 7 - Vias de Interação B-RAF, BRN2 e MITF 26
Figura 8 – Caracterização do efeito do peptídeo E12F sobre a proliferação celular de células de melanoma humano. 37
.Figura 9 - E12F não causa aumento de EROs em células A-375 39
Figura 10 – E12F não causa fragmentação do DNA em células A-375. 40
Figura 11 – E12F não causa permeabilização da membrana plasmática de células A-375. 41
Figura 12 – Caracterização do efeito do E12F na formação de colônias. 42
Figura 13 – E12F apresenta efeito na via MAPK em linhagens de melanoma humano. 42
Figura 14 – E12F modula a expressão de MITF em células de melanoma humano. 44
Figura 15 – Caracterização do efeito do E12F na migração de células de melanoma humano. 45
Figura 16 - Caracterização do efeito do E12F na invasão de células de melanoma humano. 46
Figura 17 - E12F modula a expressão de CDH13 em células de melanoma humano. 47
Figura 18 - Caracterização dos efeitos do vemurafenibe e sorafenibe em células de melanoma humano. 48
Figura 19 - Caracterização do efeito da combinação do peptídeo E12F com o vemurafenibe e sorafenibe em células de melanoma humano. 50
Figura 20 – Resumo gráfico da atividade do peptídeo E12F em células de melanoma humano. 56

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP. *Adenosine Triphosphate*

B-RAFi Inibidor de B-RAF

BRN2. *Brain-2*

CDH13. *Cadherin 13*

CDK2. *Cyclin-Dependent Kinase 2*

CDK4. *Cyclin-Dependent Kinase 4*

DHE. Dihidroetídio

DMEM. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO. *Dimetilsulfóxido*

PDGFR-β. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta*

ERK. *Extracellular Signal–Regulated Kinases*

FDA. *Food and Drug Administration*

FLT-3. *Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3*

GDP. *Guanosine Diphosphate*

GEFs. *Guanine Nucleotide Exchange Factor*

GRB2. *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*

Gtp. *Guanosine Triphosphate*

HEPES. *2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanesulfonic acid*

IARC. Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

KIT. *KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*

MEK. *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*

MEKi Inibidor de MEK

MITF. *Microphthalmia-Associated Transcription Factor*

MORE. *More Palindromic Oct Recognition Element*

NORE. *N-OCT-3 Responsive Element*

PBS. *Phosphate-buffered Saline*

PORE. *Palindromic Oct Recognition Element*

POUh. *POU-homeo*

POUs. *POU-específico*

PVDF. *Polyvinylidene Difluoride*

RAF*. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

RAS. *Rat Sarcoma Vírus Protein*

RET. *RET proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor*

SEM. *standard error mean*

SFB. *Soro Fetal Bovino*

SHP. *SRC homology region 2 domain-containing Phosphatase*

SOS. *Son of Sevenless*

TBST. Tampão Tris salino

Tris. Tris(hidroximetil)aminometano

VEGFR-1. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*

VEGFR-2. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*

VEGFR-3. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1. MELANOMA 15
1.2. VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR MAPK 18
1.3. SORAFENIBE 21
1.4. VEMURAFENIBE 22
1.5. FATOR DE TRANSCRIÇÃO BRN2 23
1.6. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE PEPTÍDEOS 27
2. OBJETIVOS 29
2.1. OBJETIVO GERAL 29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29
3. METODOLOGIA 30
3.1. LINHAGENS CELULARES 30
3.2. PEPTÍDEO 30
3.3. TESTE DE EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN 30
3.4. TESTE DE REDUÇÃO DO 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZÓLIO (MTT). 31
3.5. DETERMINAÇÃO DO AUMENTO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO 31
3.6. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA 32
3.7. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA 32
3.8. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO E12F SOBRE A CLONOGENICIDADE 33
3.9. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO E12F SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR 33
3.10. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO E12F SOBRE A INVASÃO CELULAR 34
3.11. EXTRAÇÃO DE PROTÉINAS TOTAIS PARA WESTERN BLOTTING 34
3.12. WESTERN BLOTTING 35
3.13. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 36
4. RESULTADOS 37
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO PEPTÍDEO E12F EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO 37
4.2. E12F NÃO AUMENTA OS NÍVEIS DE EROS EM CÉLULAS A-375 38
4.3. E12F NÃO CAUSA FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS A-375 39

4.4. E12F NÃO CAUSA PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM CÉLULAS A-375 40
4.5. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO E12F SOBRE A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS 41
4.6. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA MAPK EM CÉLULAS TRATADAS COM O PEPTÍDEO E12F 42
4.7. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MITF EM CÉLULAS TRATADAS COM O PEPTÍDEO E12F 43
4.8. EFEITO DO PEPTÍDEO E12F NA MIGRAÇÃO CELULAR 45
4.9. EFEITO DO PEPTÍDEO E12F NA INVASÃO CELULAR 46
4.10. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CDH13 EM CÉLULAS TRATADAS COM O PEPTÍDEO E12F 46
4.11. CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO VEMURAFENIBE E SORAFENIBE EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO 47
4.12. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA COMBINAÇÃO DO PEPTÍDEO E12F COM O VEMURAFENIBE E SORAFENIBE EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO 49
5. DISCUSSÃO 51
6. CONCLUSÕES 57
REFERÊNCIAS 58

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença complexa que se desenvolve a partir de um processo dinâmico e multifacetado (HANAHAN; WEINBERG, 2000) (Figura 1). Esse processo é caracterizado pela presença de mutações e alterações epigenéticas em células somáticas, frequentemente provocadas pela exposição a agentes mutagênicos químicos, físicos ou biológicos (LOBO *et al.*, 2019; DAS *et al.*, 2020). Essa exposição pode levar à instabilidade genômica que ativa oncogenes e promove a sinalização contínua para o crescimento e a proliferação celular. Simultaneamente, genes supressores de tumor responsáveis por regular o ciclo celular, reparar o DNA (*deoxyribonucleic acid*) e induzir a apoptose têm sua atividade inibida (NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010). Isso permite que células atípicas continuem a proliferar, resistam à morte celular e se adaptem continuamente contribuindo para a progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 - Principais características para o desenvolvimento e progressão tumoral.



Diagrama ilustrando as principais características que favorecem o desenvolvimento tumoral. Fonte: Hanahan, 2022.

Dentre essas adaptações, destaca-se a capacidade do tumor de modular seu metabolismo energético, evadir o sistema imunológico e promover inflamação, angiogênese e plasticidade fenotípica. Além disso, fatores como a presença de células senescentes e o microbioma dos tecidos afetados também contribuem para a progressão tumoral. Em conjunto, essas características contribuem para o estágio mais avançado do câncer, onde as células tumorais adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e gerar metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN, 2022).

Devido à sua complexidade, o câncer permanece como uma das principais causas de morte globalmente. Em 2022, foram registrados aproximadamente 20 milhões de novos casos e cerca de 9,7 milhões de óbitos relacionados à doença mundialmente (BRAY *et al.*, 2024; SIEGEL; GIAQUINTO; JEMAL, 2024). Entre esses casos, aproximadamente 331 mil são de melanoma, que resultaram em cerca de 58 mil mortes (IARC, 2024). Além disso, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) estima que até 2045 haverá um aumento de 36,7% nos casos de melanoma e um aumento de 58,4% nas mortes relacionadas a essa forma de câncer. No Brasil o câncer de pele é a neoplasia de maior incidência, correspondendo a aproximadamente 30% dos tumores malignos diagnosticados, com o melanoma representando 3% desses casos (INCA, 2022). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), foram estimados 8.980 novos casos de melanoma em 2023 (INCA, 2022). Adicionalmente, a IARC projeta para 2045 um aumento de 64,6% na incidência e de 78,3% nos óbitos por melanoma.

1.1. MELANOMA

Apesar de sua baixa incidência, o melanoma é considerado o câncer de pele mais agressivo devido ao seu potencial metastático (HSIEH *et al.*, 2024), sendo responsável por aproximadamente 80% das mortes associadas a cânceres de pele (SIEGEL; GIAQUINTO; JEMAL, 2024). Esse câncer afeta melanócitos, células originadas a partir de melanoblastos que durante a embriogênese migram da crista neural para estruturas específicas como pele, olhos e folículos capilares (CENTENO; PAVET; MARAIS, 2023). Na pele os melanócitos localizam-se na camada basal da epiderme (Figura 2A), onde produzem e distribuem melanina (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Figura 2 - Estágios do desenvolvimento do melanoma.

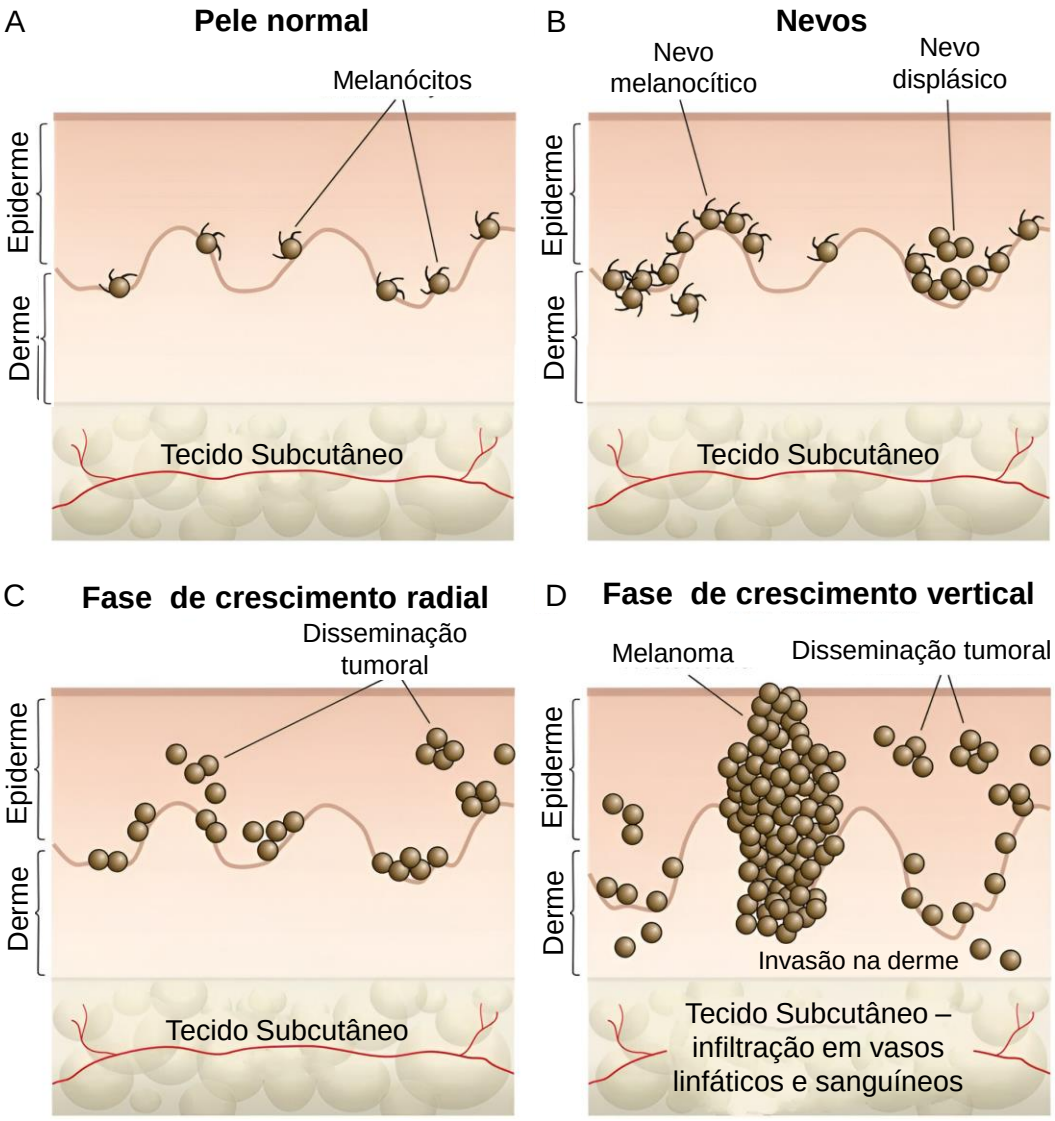


Ilustração representativa do desenvolvimento do melanoma. (A) Este câncer de pele acomete melanócitos, células presentes na membrana basal da epiderme. (B) A presença de mutações nessas células pode levar a formação de nevos melanocítico e/ou nevos atípicos. (C) Esses nevos podem adquirir características malignas, evoluindo para a fase de crescimento radial deste câncer, onde as células mutadas se dispersam horizontalmente permanecendo restritas à epiderme. (D) Em seguida, estas células podem adquirir a capacidade de invadir e se difundir pela derme, atingindo vasos linfáticos e sanguíneos dando início ao processo metastático. Fonte: Gray-Schopfer e colaboradores 2007.

A formação do melanoma geralmente se inicia a partir de nevos melanocíticos, lesões benignas causadas por uma proliferação limitada de melanócitos. A exposição contínua a agentes mutagênicos pode induzir mutações adicionais, rompendo o controle da proliferação celular e levando à manifestação de alterações morfológicas características de um nevo displásico (Figura 2B). Essa proliferação exacerbada favorece o acúmulo de mutações, contribuindo para o início da progressão tumoral do

melanoma. Nesse estágio as células se disseminam horizontalmente permanecendo restritas à epiderme, o que caracteriza a fase de crescimento radial do melanoma (Figura 2C). Em seguida, essas células podem adquirir propriedades invasivas evoluindo para a fase de crescimento vertical (Figura 2D). Nessa fase ocorre a difusão das células pela derme permitindo que estas atinjam órgãos adjacentes, vasos linfáticos e sanguíneos, podendo levar à formação de metástases (MILLER; MIHM, 2006; GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; SHAIN; BASTIAN, 2016).

Quando diagnosticado precocemente, o prognóstico para pacientes com melanoma é favorável com possibilidade de remissão. O tratamento geralmente envolve a ressecção cirúrgica do tumor, associada à radioterapia e/ou quimioterapia. No entanto, o prognóstico torna-se desfavorável quando o melanoma não é detectado em seus estágios iniciais. Nesses casos há risco de disseminação para órgãos adjacentes e distantes, o que dificulta a abordagem terapêutica e reduz significativamente as chances de remissão (RASTRELLI *et al.*, 2014; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

A progressão e a resposta ao tratamento do melanoma estão diretamente relacionadas às mutações genéticas presentes nas células tumorais. No melanoma, as mutações mais frequentes ocorrem nos proto-oncogenes B-RAF e N-RAS. A proteína serina/treonina quinase B-RAF encontra-se mutada em 40 a 60% dos casos, com cerca de 90% desses casos referindo-se à mutação B-RAF^{V600E}, na qual ocorre a substituição de uma valina (V) por um ácido glutâmico (E) na posição 600 (GTG > GAG). Já as mutações da GTPase N-RAS estão presentes em 15 a 20% dos casos de melanoma, com aproximadamente 60% dessas mutações correspondendo à N-RAS^{Q61R}, onde há a substituição de uma glutamina (Q) por uma arginina (R) na posição 61 (CAA > CGA) (ASCIERTO *et al.*, 2012; RANDIC *et al.*, 2021).

As opções terapêuticas para o tratamento do melanoma incluem quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia alvo dirigida. A quimioterapia utiliza agentes como a dacarbazina, que atua como um agente alquilante bloqueando a replicação do DNA, inibindo a proliferação celular e consequentemente induzindo morte celular (BOUTROS; CARLINO; MENZIES, 2024; SIERRA-DAVIDSON; BOLAND, 2024). Na imunoterapia, os inibidores de *checkpoints* imunológicos atuam auxiliando o sistema imune a reconhecer células tumorais. Anticorpos monoclonais como o nivolumabe e pembrolizumabe bloqueiam a interação de PD-1 (*Programmed Cell Death 1*) com seus

ligantes, PD-L1 (*Programmed Cell Death Ligand 1*) e PD-L2 (*Programmed Cell Death Ligand 2*) gerando a ativação da resposta imune contra as células tumorais, levando à morte celular. Assim como o ipilimumabe, um anticorpo que bloqueia a ação inibitória de CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*) intensificando a atividade das células do sistema imune (REISS; FORDE; BRAHMER, 2014; ROWSHANRAVAN; HALLIDAY; SANSOM, 2018). Além disso, as terapias alvo dirigidas atuam sobre proteínas presentes em vias de sinalizações desreguladas que ao serem inibidas conseguem reduzir a progressão tumoral. Uma das principais vias na tumorigênese do melanoma é via das MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*). Diante disso, na última década diversos inibidores de proteínas quinase presentes nessa via foram desenvolvidos (PROIETTI *et al.*, 2020; BAHAR; KIM; KIM, 2023).

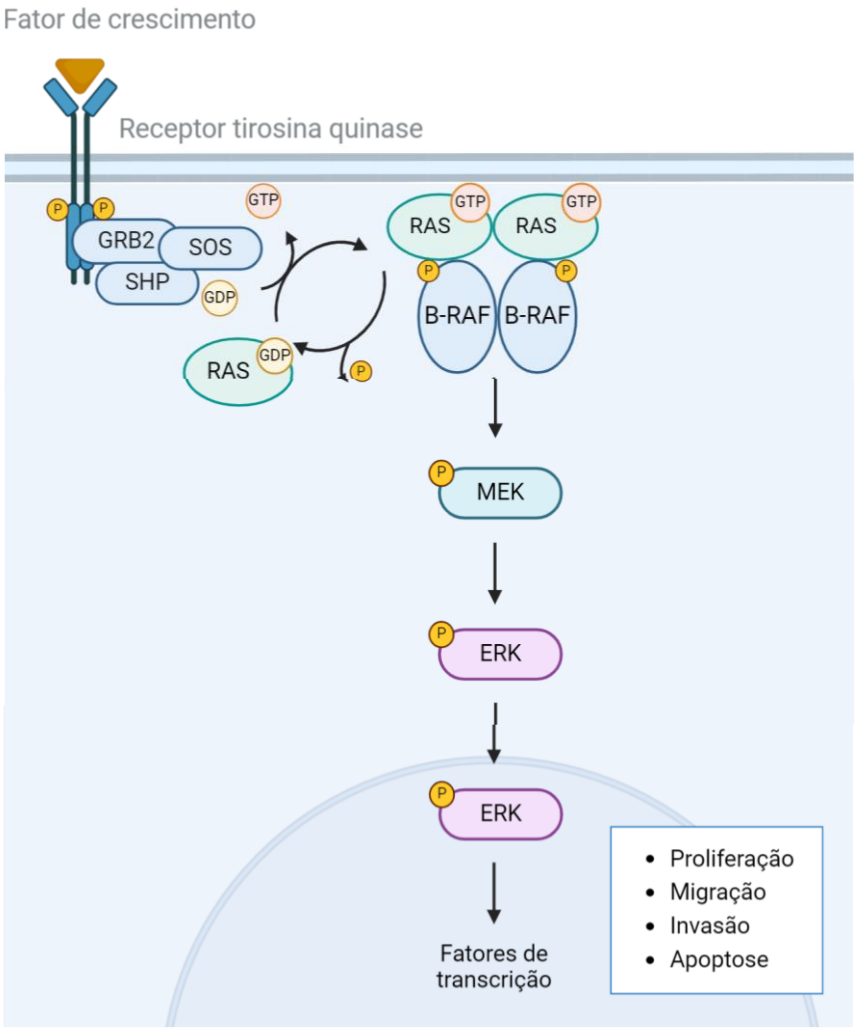
1.2. VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR MAPK

As vias de sinalização intracelular são sistemas complexos e altamente regulados que possibilitam a comunicação entre células e respostas a estímulos externos. A via de sinalização MAPK transmite sinais extracelulares da membrana plasmática para o núcleo por meio de uma cascata de proteínas quinases, regulando diferentes mecanismos celulares (CERIONE, 2000; SULLIVAN; FLAHERTY, 2013).

Fisiologicamente, esse processo começa quando um fator de crescimento se liga à receptores tirosina quinase localizados na membrana celular. Essa interação induz a dimerização desses receptores e a autofosforilação de seus domínios intracelulares, criando sítios de ligação para proteínas adaptadoras como GRB2 (G*rowth Factor Receptor-Bound Protein 2*) e SHP (*SRC homology region 2 domain-containing Phosphatase*). Esse complexo se conecta a GEFs *(Guanine Nucleotide Exchange Factors)* como SOS (*Son of Sevenless*) que promovem a troca de GDP (*Guanosine Diphosphate*) por GTP (G*uanosine Triphosphate*) em RAS (*Rat Sarcoma Vírus Protein*) (H-RAS, K-RAS ou N-RAS) levando à sua ativação. RAS ativo recruta RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) (A-RAF, B-RAF ou C-RAF) para a membrana celular, onde RAF é fosforilado, se dimeriza e se torna ativo. A ativação de RAF desencadeia a fosforilação de MEK (*Mitogen-activated Protein Kinase*), que então fosforila e ativa ERK (*Extracellular Signal – Regulated Kinases*). ERK fosforilado é translocado para o núcleo, regulando a expressão de diferentes fatores de transcrição que irão mediar o funcionamento de mecanismos celulares como proliferação,

migração, invasão e apoptose (Figura 3) (ZHANG; LIU, 2002; GODING; ARNHEITER, 2019; WAGSTAFF *et al.*, 2022; BAHAR; KIM; KIM, 2023).

Figura 3 - Via de sinalização de proteínas quinase ativadas por mitógenos - MAPK.

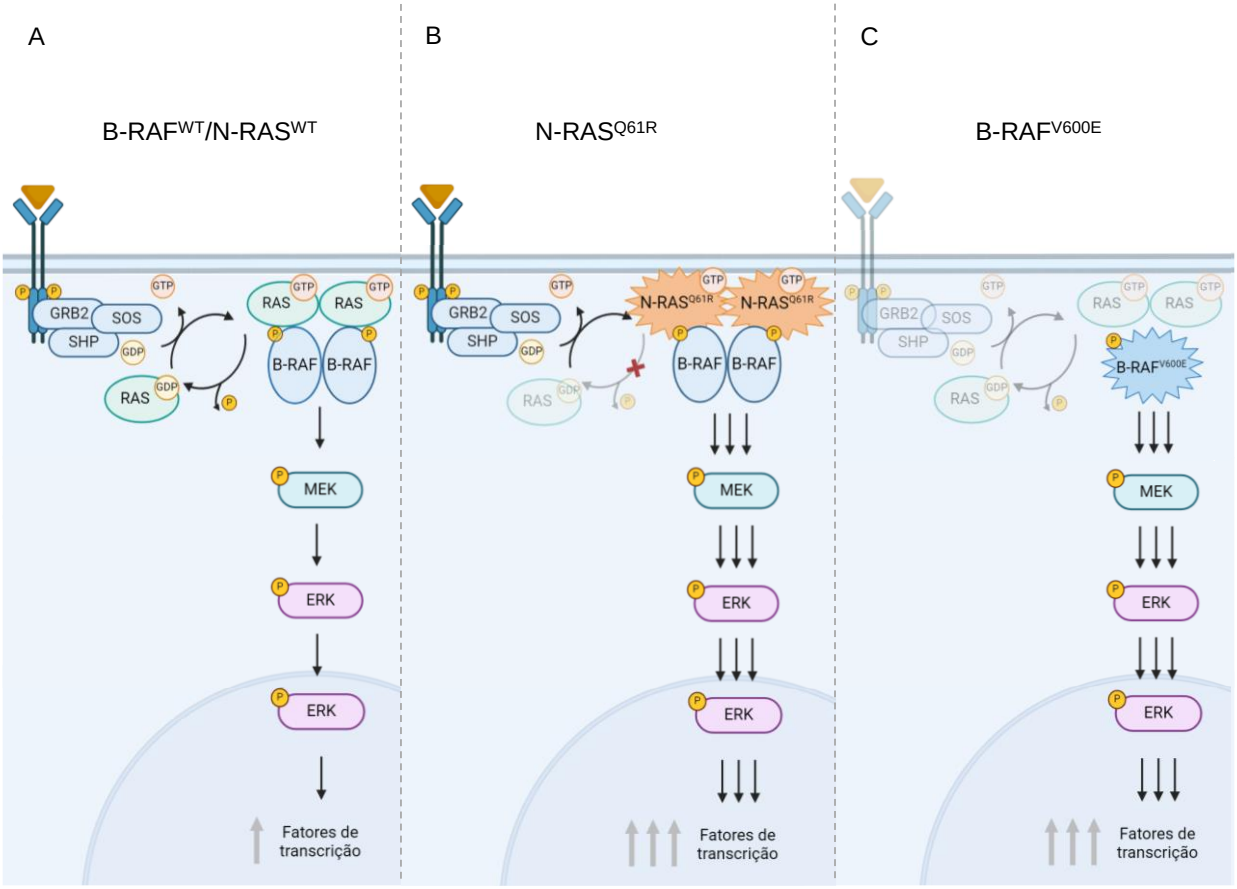


Esquema da via de sinalização MAPK. Fatores de crescimento se ligam aos receptores tirosina quinase, promovendo sua dimerização e autofosforilação, o que cria sítios de ligação para proteínas adaptadoras, como GRB2 e SHP. Esse complexo recruta SOS, que ativa RAS por meio da troca de GDP por GTP. RAS ativado recruta RAF para a membrana, onde é fosforilado e dimerizado. RAF recruta e ativa MEK e, em seguida, ERK. ERK fosforilado se transloca para o núcleo, onde regula fatores de transcrição, como BRN2 e MITF, controlando processos celulares, como proliferação, migração, invasão e apoptose. Fonte: Próprio autor.

Em neoplasias essa via geralmente se apresenta de três formas. Quando as proteínas N-RAS e B-RAF estão em sua forma selvagem (Figura 4A), a via MAPK permanece funcionalmente inalterada, semelhante ao seu estado fisiológico. Por outro lado, a presença de mutações em N-RAS como a Q61R provoca mudanças conformacionais no sítio de ligação ao GTP impedindo a hidrólise de GTP para GDP mantendo esta proteína constitutivamente ativa (Figura 4B). De maneira similar,

mutações em B-RAF como a V600E geram uma alteração conformacional no domínio quinase desta proteína, permitindo que ela permaneça constitutivamente ativa em sua forma monomérica (Figura 4C) (KORTUM; MORRISON, 2015; ŚMIECH et al., 2020). Consequentemente, a atividade resultante destas mutações geram um aumento da ativação de fatores de transcrição que promovem a proliferação celular, inibem a morte celular e estimulam a migração e invasão favorecendo a progressão tumoral (AL MAHI; ABLAIN, 2022; RANDIC *et al*., 2021; SIMANSHU; NISSLEY; MCCORMICK, 2017).

Figura 4 - Impacto de mutações na via de sinalização MAPK.



Esquema comparativo da via de sinalização MAPK em diferentes contextos mutacionais. **B-RAF/N-RAS^{WT}**: via sem mutações, com ativação normal da cascata, onde a ligação do fator de crescimento ao receptor de tirosina quinase, leva à ativação de RAS, dimerização de B-RAF, ativação de MEK e ERK, e regulação de fatores de transcrição, como MITF e BRN2. **B-RAF^{V600E}**: ativação constitutiva de MEK e ERK, independentemente da ativação de RAS. **N-RAS^{Q61R}**: ativação constitutiva da via MAPK, devido à interferência na hidrólise de GTP para GDP de RAS. Ambas as mutações levam a ativação crônica da via de sinalização MAPK, aumentando os níveis de fatores de transcrição como MITF e BRN2, consequentemente, desregulando a proliferação, migração, invasão celular e apoptose. Fonte: Próprio autor.

A elevada incidência de mutações nessa via e sua relevância na regulação do melanoma impulsionaram o desenvolvimento de fármacos como vemurafenibe, dabrafenibe, encorafenibe e sorafenibe, inibidores de B-RAF (B-RAFi). Da mesma

forma, foram desenvolvidos inibidores de MEK (MEKi) como trametinibe, cobimetinibe e binimetinibe. Além disso, inibidores de ERK estão em fase de desenvolvimento e testes clínicos.

Neste trabalho, dois desses inibidores foram explorados: o sorafenibe, um inibidor de múltiplas quinases e o vemurafenibe um inibidor seletivo para mutação $BRAF^{V600E}$ (MOSCHOS *et al.*, 2018; BHAGWAT *et al.*, 2020; BAHAR; KIM; KIM, 2023; BUCHBINDER *et al.*, 2024).

1.3. SORAFENIBE

O sorafenibe (Nexavar®) é um inibidor de múltiplas quinases que atua bloqueando tanto quinases intracelulares quanto receptores de tirosina quinase na superfície celular. Esse fármaco inibe a proliferação celular ao interagir com as isoformas de RAF, incluindo C-RAF, B-RAF selvagem e B-RAF mutante, além de outros alvos como KIT (*KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*), FLT-3 (*fms related receptor tyrosine kinase 3*) e RET (*RET proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor*). Paralelamente, o sorafenibe também pode inibir a angiogênese ao bloquear receptores de tirosina quinase, como VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*), VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*), VEGFR-3 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3*) e PDGFR-β (*Platelet-derived Growth Factor Receptor Beta*) (WILHELM *et al.*, 2006; HASSKARL, 2010).

Esse fármaco foi aprovado pelo FDA em dezembro de 2005 e pela ANVISA em abril de 2008. Atualmente é aprovado para o tratamento de carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular e câncer de tireoide (HASSKARL, 2010; BRASIL, 2025b). Em relação ao tratamento de melanoma, alguns ensaios clínicos foram realizados, no entanto não foram obtidos resultados conclusivos (PAVLICK, *et al.*, 2006; EISEN *et al.*, 2006; OTT *et al.*, 2010; MANGANA *et al.*, 2012). No entanto alguns estudos clínicos mostraram que a combinação de sorafenibe com outros quimioterápicos pode ser uma opção para o tratamento do melanoma. A associação de sorafenibe com paclitaxel/carboplatina mostrou atividade promissora em pacientes com melanoma metastático, alcançando uma taxa de controle da doença de 84% (TAKIMOTO; AWADA, 2008; FLAHERTY *et al.*, 2013). Além disso, a combinação de sorafenibe com dacarbazina resultou em uma taxa de controle da doença de 66 a

78%, indicando benefícios clínicos significativos (EISEN *et al.*, 2006; LORIGAN *et al.*, 2006; TAKIMOTO; AWADA, 2008).

No entanto, paralelamente aos testes de combinações entre sorafenibe e outros quimioterápicos, a falta de especificidade deste inibidor impulsionou o desenvolvimento de inibidores mais específicos, como o vemurafenibe (FLAHERTY; YASOTHAN; KIRKPATRICK, 2011; BOLLAG *et al.*, 2012).

1.4. VEMURAFENIBE

Aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em agosto de 2011 e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em dezembro de 2011, o vemurafenibe (Zelboraf®) é um fármaco de terapia alvo dirigida bem estabelecido e amplamente utilizado em casos de melanoma (FLAHERTY; YASOTHAN; KIRKPATRICK, 2011; BOLLAG *et al.*, 2012; BRASIL, 2025a).

O vemurafenibe é um inibidor de proteína quinase seletivo para a forma mutada da proteína B-RAF, especialmente para a variante B-RAF^{V600E}. Esse fármaco atua no sítio de ligação de ATP (*Adenosine Triphosphate*) na proteína B-RAF mutante, bloqueando sua atividade quinase. Consequentemente, inibindo a sinalização mediada pela via MAPK/ERK, resultando na parada do ciclo celular na fase G1 e apoptose (PATEL *et al.*, 2020; NATARELLI *et al.*, 2024).

Em estudos de fase clínica I e II, o vemurafenibe apresentou resposta em mais de 50% dos pacientes com melanoma metastático portadores da mutação B-RAF^{V600E} (FLAHERTY *et al.*, 2010; RIBAS *et al.*, 2011). Já em estudos de fase clínica III, observou-se uma redução relativa de 74% no risco de morte ou progressão da doença (CHAPMAN *et al.*, 2011). No entanto, devido à natureza agressiva do melanoma e sua capacidade de adaptação ao ambiente terapêutico, ainda em 2011 foram registrados casos em que pacientes apresentavam resistência ao tratamento com vemurafenibe (APLIN; KAPLAN; SHAO, 2011; ROUKOS, 2011; SOLIT; ROSEN, 2011). O tratamento com vemurafenibe pode resultar em recorrência da doença após 6 a 7 meses do fim do tratamento, especialmente em casos mais avançados (SOLIT; ROSEN, 2011; SHI *et al.*, 2014; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019;).

A fim de superar a resistência observada com a monoterapia, foi implementado o uso de combinações de inibidores da via MAPK. Um exemplo é a combinação B-

RAFi/MEKi. Estudos de fase clínica III mostraram que a combinação entre vemurafenibe e cobimetinibe aumentou em 41% a taxa de sobrevivência de pacientes com melanoma avançado portadores de mutações em B-RAF, em comparação com a monoterapia com vemurafenibe (LARKIN *et al.*, 2015). Além disso, em casos de melanoma avançado com a mutação B-RAF^{V600E} a combinação mostrou um aumento de 21% na taxa de sobrevivência (ASCIERTO *et al.*, 2016).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de inibidores de proteína quinase e do estabelecimento de possíveis combinações terapêuticas, a resistência aos tratamentos ainda representa um desafio significativo (ROBERT *et al.*, 2015; SUBBIAH *et al.*, 2023; BARBATO *et al.*, 2024). Nesse contexto, esforços contínuos estão sendo direcionados para expandir o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral e na resistência, bem como para identificar novas proteínas-alvo com potencial terapêutico.

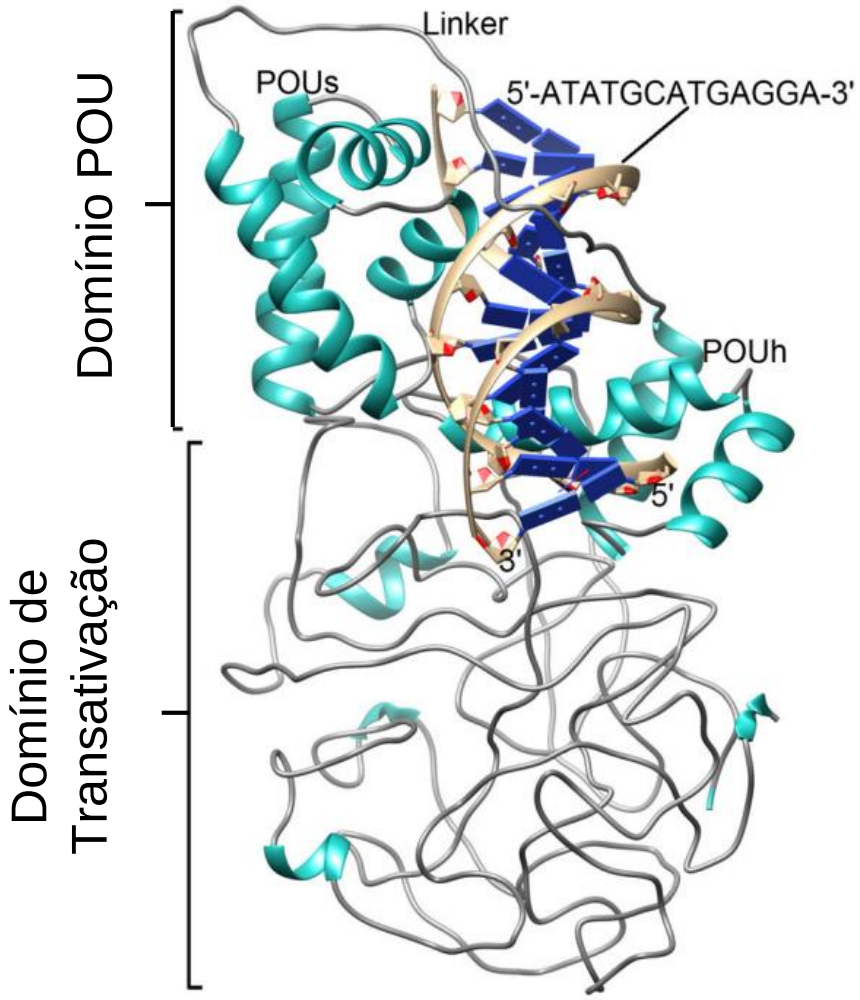
1.5. FATOR DE TRANSCRIÇÃO BRN2

Uma área em destaque é o estudo de fatores de transcrição como possíveis alvos terapêuticos (HENLEY; KOEHLER, 2021). Fatores de transcrição de ligação ao DNA representam uma classe crucial de proteínas devido à sua capacidade de modular a transcrição de genes (LAMBERT *et al.*, 2018). Esses fatores são responsáveis por coordenar as respostas a estímulos internos e externos, servindo como pontos finais nas vias de sinalização celular (BRIVANLOU; DARNELL, 2002; LEE; YOUNG, 2013). No melanoma o BRN2 (*Brain-2*) se destaca como um dos principais fatores de transcrição envolvidos na progressão tumoral, por estar localizado *downstream* não apenas da via MAPK (GOODALL *et al.*, 2004b), mas também das outras duas principais vias desreguladas neste câncer, PI3K/AKT (BONVIN *et al.*, 2012) e WNT/β-catenina (GOODALL *et al.*, 2004a).

O fator de transcrição BRN2 (POU3F2/N-Oct-3) é uma proteína da família de fatores de transcrição de Classe III do domínio POU. Esta proteína possui dois domínios de ligação ao DNA, POU-específico (POUs) e POU-homeo (POUh). Ambos apresentam uma conformação estrutural do tipo hélice-volta-hélice, conectados por uma região menos conservada e de comprimento variável conhecida como *linker*. Além disso, o BRN2 também apresenta um domínio de transativação responsável pela

sua interação com outros fatores de transcrição (Figura 5) (HERR *et al.*, 1988; COOK; STURM, 2008; CABOS-SIGUIER *et al.*, 2009).

Figura 5 – Estrutura tridimensional do fator de transcrição BRN2.



O fator de transcrição BRN2 é composto por quatro estruturas: dois domínios POU de ligação ao DNA, POUs e POUh, representados em azul claro; uma estrutura linker que conecta os dois domínios POU, em azul escuro; e um domínio de transativação, que permite a interação do BRN2 com outros fatores de transcrição, em cinza. Fonte: Vale Coelho e colaboradores (2016).

A proteína BRN2 é composta por 445 aminoácidos em murinos e 443 aminoácidos em humanos com uma diferença de apenas 2 glutaminas em sua sequência e apresenta um peso molecular de aproximadamente 47 kDa. Além disso, seu domínio N-terminal (POUs) é constituído por 75 aminoácidos, enquanto o domínio C-terminal (POUh) contém 60 aminoácidos com ambas as sequências conservadas entre espécies (Figura 6) (VALE COELHO; ARRUDA; TARANTO, 2016).

Figura 6 - Sequência de aminoácidos do BRN2 murino e humano.



Sequência de aminoácidos da proteína BRN2 murina e humana alinhadas, destacando os domínios de ligação ao DNA, POU-específico (POUs) (vermelho) e do domínio POU-homeo (POUh) (azul). Fonte: NCBI (2024).

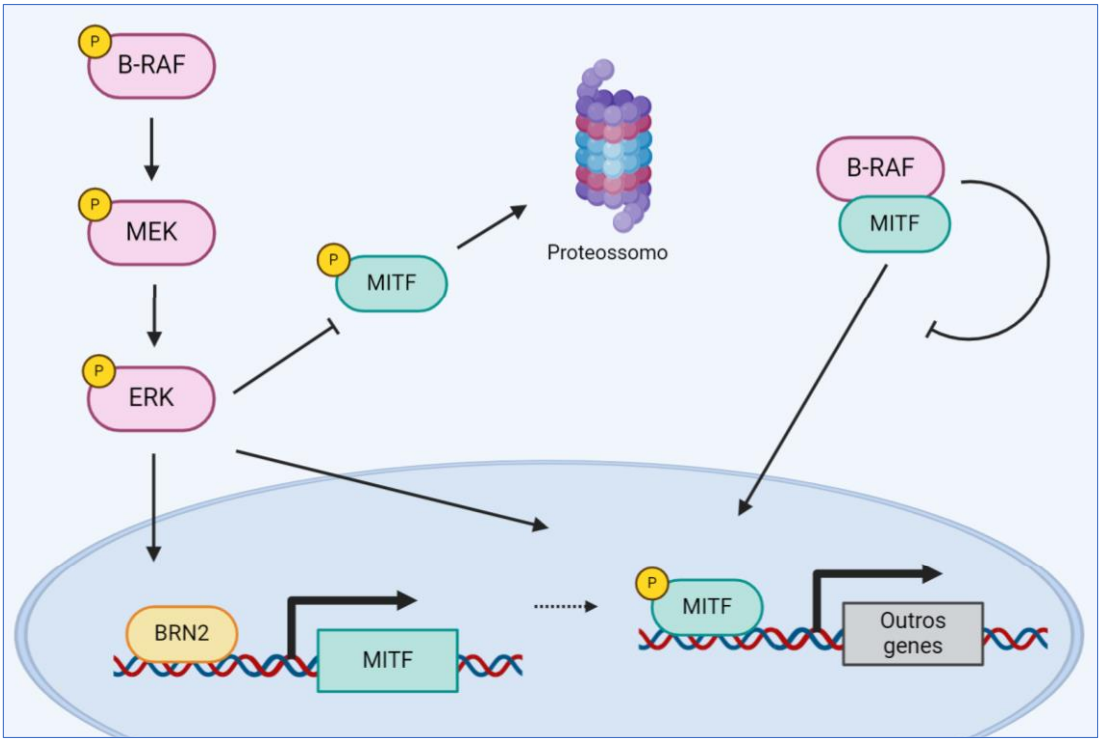
A interação do BRN2 com o DNA ocorre de forma canônica por meio da sua ligação na sequência octamérica 5'-ATGCAAAT-3'. No entanto, a estrutura flexível entre seus domínios (*linker*) permite que este fator de transcrição também se ligue a outras regiões específicas, como PORE (*Palindromic Oct Recognition Element*), MORE (*More Palindromic Oct Recognition Element*) e NORE (*N-OCT-3 Responsive Element*), atuando de forma monomérica ou dimérica (COOK; STURM, 2008; VALE COELHO; ARRUDA; TARANTO, 2016).

Este fator de transcrição é super expresso no melanoma podendo influenciar na regulação dos mecanismos de proliferação (GOODALL *et al.*, 2004b), morte celular (HERBERT *et al.*, 2019), migração (FANE *et al.*, 2017), invasão (ZENG *et al.*, 2018) e formação de metástases (SIMMONS *et al.*, 2017). Á vista disso, peptídeos derivados desse fator de transcrição poderiam competir com o seu domínio de ligação ao DNA regulando a expressão gênica de tais proteínas, diminuindo e controlando a progressão tumoral do melanoma. Entre os genes regulados por BRN2, destacam-se o MITF (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*) e o CDH13 (*Cadherin 13*) por serem diretamente regulados por este fator de transcrição (GOODALL *et al.*, 2008; ELLMANN *et al.*, 2012).

MITF é um fator de transcrição essencial para a manutenção dos melanócitos regulando a expressão de múltiplos genes desde sua formação até sua maturação. No melanoma MITF atua como um modulador da mudança fenotípica, modulando a proliferação, migração e invasão de acordo com os diferentes níveis de sua expressão (HARTMAN; CZYZ, 2015; WELLBROCK; AROZARENA, 2015).

A transcrição de MITF pode ser induzida pela ativação da cascata RAS/RAF/MEK/ERK mediada pelo fator de transcrição BRN2 (WELLBROCK *et al.*, 2008; HARTMAN; CZYZ, 2015), que pode tanto promover sua transcrição (WELLBROCK *et al.*, 2008) quanto inibi-lo diretamente (GOODALL *et al.*, 2008). Além disso, a fosforilação de MITF por ERK é essencial para sua ativação, permitindo a transcrição de diversos genes-alvo. No entanto, o aumento excessivo da fosforilação de MITF por ERK pode levar à sua relocalização parcial do núcleo para o citoplasma, onde ocorre a sua degradação proteassomal (WELLBROCK *et al.*, 2008; NGEOW *et al.*, 2018). Adicionalmente, estudos mostraram que as RAF quinases podem interagir diretamente com MITF, inibindo sua função transcricional (ESTRADA *et al.*, 2022).

Figura 7 - Vias de Interação B-RAF, BRN2 e MITF



Esquema das vias de interação entre a via de sinalização MAPK, BRN2 e MITF. MITF é regulado pelo fator de transcrição BRN2 e ativado pela fosforilação de ERK resultante da cascata RAS/RAF/MEK/ERK. O aumento da fosforilação de MITF por ERK leva ao seu aumento de níveis citoplasmáticos levando a sua degradação via proteossomo. Além disso, MITF pode interagir diretamente com B-RAF, inibindo sua função transcricional. Fonte: Castellani e colaboradores 2023.

Além de MITF, o fator de transcrição BRN2 também regula a expressão de CDH13, uma proteína de adesão celular essencial para as interações célula-célula. A superexpressão de BRN2 induz uma repressão transcricional de CDH13, consequentemente resultando na diminuição de seus níveis (RANSCHT; DOURS-ZIMMERMANN, 1991; ELLMANN *et al.*, 2012). CDH13 é considerado um gene supressor de tumor e sua redução está associada ao aumento do potencial invasivo das células de melanoma, contribuindo para uma maior agressividade tumoral (KUPHAL *et al.*, 2009; RUBINA *et al.*, 2015). Portanto, terapias que consigam modular os níveis de MITF e CDH13 podem oferecer uma abordagem promissora para o tratamento do melanoma, interferindo nos mecanismos de proliferação, migração e invasão celular limitando assim a agressividade do tumor.

1.6. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE PEPTÍDEOS

A terapia com peptídeos tem ganhado destaque no tratamento do câncer devido à sua alta especificidade, baixa toxicidade e raros efeitos adversos. Nesse contexto, peptídeos derivados de proteínas chaves para o funcionamento celular, como lipoproteínas transmembranares (MAIA *et al.*, 2022), proteínas transportadoras de acilas (SHIN *et al.*, 2022), interleucinas (CHANG *et al.*, 2023), imunoglobulinas (ARRUDA *et al.*, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2015), glicoproteínas (AL-AZZAWI *et al.*, 2019), cinesinas (YAMADA; KANG; MALIK, 2017) e histonas (WANG *et al.*, 2022) têm sido estudados por seus potenciais terapêuticos, com vários deles atualmente em fase de estudos clínicos (DRAPPATZ *et al.*, 2013; LULLA *et al.*, 2016; MITTENDORF *et al.*, 2019; MIZUKOSHI *et al.*, 2022; NHÀN; YAMADA; YAMADA, 2023; VADEVOO *et al.*, 2023; GHALY *et al.*, 2023).

Outra linha de investigação que têm mostrado resultados promissores é o uso de peptídeos derivados de fatores de transcrição. Como por exemplo, o peptídeo Bac-ELP-H1 derivado do fator de transcrição c-Myc, que é capaz de inibir a progressão tumoral e aumentar a sobrevida de ratos utilizando modelo de glioma (BIDWELL *et al.*, 2013). Outro exemplo é o peptídeo Dpep derivado do fator de transcrição CEBPD (*CCAAT/enhancer-binding protein-delta*) que promove morte celular por apoptose em diferentes linhagem tumorais, diminui a progressão tumoral e aumenta a sobrevivência em modelo de xenoenxerto utilizando células de melanoma A-375 (ZHOU *et al.*, 2021). Além disso, o peptídeo OMO-103, que impede a dimerização

entre MYC e MAX, interrompendo sua ligação ao DNA, passou pela fase clínica I recentemente (GARRALDA *et al.*, 2024). Outros estudos também mostraram que os peptídeos derivados do fator de transcrição BRN2, os peptídeos L13S e R18H, inibiram a migração e invasão, e induziram apoptose em células de melanoma murino B16F10-Nex2, respectivamente (DA CUNHA *et al.*, 2019; CESAR *et al.*, 2024). Assim como, foi observado uma diminuição do número de nódulos metastáticos em camundongos tratados com estes peptídeos.

Em suma, o melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo caracterizado por um alto potencial metastático e resistência a tratamentos convencionais (RASTRELLI *et al.*, 2014; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Mutações nos genes B-RAF e N-RAS levam à ativação constitutiva da via MAPK e estão frequentemente associadas ao desenvolvimento e progressão desse tipo de câncer (SULLIVAN; FLAHERTY, 2013). Além disso, o fator de transcrição BRN2 é superexpresso no melanoma podendo regular os mecanismos de proliferação, migração e invasão celular (COOK; STURM, 2008), destacando-se como possível alvo para intervenções terapêuticas. Nesse contexto, peptídeos derivados de fatores de transcrição têm exibido potencial antitumoral, oferecendo uma possível abordagem para o tratamento do melanoma (INAMOTO; SHIN, 2019). Diante disso, justifica-se a investigação do efeito do peptídeo E12F em linhagens de melanoma humano com diferentes contextos mutacionais (B-RAF selvagem, B-RAF^{V600E} ou N-RAS^{Q61R}), avaliando sua capacidade de modular a via MAPK e proteínas associadas, como MITF e CDH13. A hipótese deste estudo é que o peptídeo E12F, derivado do domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição BRN2, pode interagir com seus sítios de ligação regulando mecanismos de proliferação, migração e invasão em células de melanoma através da modulação da expressão de proteínas envolvidas na progressão tumoral. Além disso, resultados anteriores mostraram que o peptídeo E12F, também derivado do fator de transcrição BRN2 mostrou efeitos promissores *in vitro* e *in vivo* (Dissertação Maria Carolina Cesar, 2020). Com base nesses achados, o presente trabalho visa dar continuidade ao estudo do efeito antitumoral do peptídeo E12F em linhagens celulares de melanoma humano abrangendo diferentes perfis mutacionais (B-RAF selvagem, B-RAF^{V600E} ou N-RAS^{Q61R}), ampliando a compreensão de seu mecanismo de ação e potencial terapêutico.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito antitumoral do peptídeo E12F em células de melanoma humano com diferentes perfis mutacionais, avaliando sua influência na via da sinalização MAPK e em proteínas regulatórias dos mecanismos de proliferação, migração e invasão celular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efeito do E12F sobre a proliferação, migração e invasão das linhagens de melanoma humano;
- Avaliar as alterações de expressão das proteínas presentes na via MAPK/ERK após o tratamento com E12F;
- Avaliar as alterações de expressão das proteínas MITF e CDH13 após o tratamento com E12F;
- Investigar o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio nas células tratadas com o peptídeo;
- Investigar o efeito do vemurafenibe e sorafenibe nas linhagens de melanoma humano;
- Analisar os efeitos da combinação de vemurafenibe e E12F ou sorafenibe e E12F sobre a viabilidade das linhagens de melanoma humano.

3. METODOLOGIA

3.1. LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular de melanoma humano SK-MEL-25 (melanoma epitelial humano) (RRID: CVCL_6028) foi cedida pelo Professor Dr. Luiz Rodolpho Travassos (UNIFESP, São Paulo, São Paulo, Brasil). As linhagens celulares de melanoma humano SK-MEL-147 (melanoma epitelial humano com mutação N-RAS^{Q61R}) (RRID:CVCL_3876) e A-375 (melanoma epitelial humano com mutação B-RAF^{V600E}) (RRID:CVCL_0132) foram cedidas pelo Professor Dr. Tiago Rodrigues (UFABC, Santo André, São Paulo, Brasil). As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementadas com HEPES 10 mM (m/v) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), de bicarbonato de sódio 24 mM (m/v) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), gentamicina (0,04 mg/mL) (Hipolabor, Belo Horizonte, MG, Brasil) e soro fetal bovino 10% (v/v) (SFB) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e mantidas em uma atmosfera úmida de 37 °C e 5% de CO_2 (Panasonic MCO-18ACL-PA CytoGrow CO_2 Incubator).

3.2. PEPTÍDEO

O E12F (EDTPTSDDLEQF) foi desenhado utilizando o programa DNASTAR®, considerando regiões de sequências de aminoácidos mais hidrofílicos e com maior probabilidade de ligação à superfície celular. O peptídeo foi sintetizado pelas empresas Peptide 2.0 Inc. (Chantilly, VA, EUA) e GenScript Biotech (Piscataway, NJ, EUA).

3.3. TESTE DE EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN

Para estabelecer uma curva dose-resposta ao longo do tempo do peptídeo, as células SK-MEL-25, A-375 e SK-MEL-147 (1×10^3 células/poço) foram incubadas em meio DMEM em placas de 96 poços e mantidas *overnight* em estufa com 5 % de CO_2 a 37 ºC. Após este período, as células foram tratadas com concentrações crescentes de E12F (0, 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mM) e incubadas por 24, 48, 72 ou 96 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37 ºC. Após o tratamento, as células foram desaderidas com tripsina e contadas com o auxílio do corante de exclusão azul de tripan em uma câmara de Neubauer. A porcentagem do número de células foi avaliada em relação ao controle

(100%). Para os ensaios de combinação, o E12F (1 mM) foi associado ao vemurafenibe (1 µM) (Selleckchem, USA) e ao sorafenibe (1 µM) (Selleckchem, USA) e as células foram incubadas também por 24, 48, 72 ou 96 horas. Os cálculos preliminares de sinergismo foram realizados seguindo o modelo de Bliss.

3.4. TESTE DE REDUÇÃO DO 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

Para estabelecer uma curva dose-resposta ao longo do tempo dos inibidores de proteína quinase, as células SK-MEL-25, A-375 e SK-MEL-147 (1 x 10^3 células/poço) foram incubadas em meio DMEM em placas de 96 poços e mantidas *overnight* em estufa com 5 % de CO_2 a 37 ºC. Posteriormente, as células foram tratadas com concentrações crescentes (1; 10; 100; 1000 e 10000 nM) de vemurafenibe e sorafenibe e incubadas por 24, 48, 72 ou 96 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37 ºC. Após o período de incubação, 5 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionado aos poços da placa e as amostras foram incubadas por 4 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37 ºC. Em seguida foi adicionado 100 µL de SDS 10% (m/v) (em HCl 0,01 mol/L) e deixadas *overnight* em temperatura ambiente para solubilização dos cristais de formazan. As absorbâncias das amostras foram determinadas em 570 nm usando um leitor de placas Thermo Multiskan FC (Thermo Fisher Cientific, China) e os resultados foram expressos em redução de MTT em porcentagem avaliada em relação ao controle (100%).

3.5. DETERMINAÇÃO DO AUMENTO DOS NÍVEIS DE ÂNION SUPERÓXIDO

O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliado utilizando o fluoróforo di-hidroetídio (DHE) seguindo as recomendações do fabricante (Thermo Fisher Scientific). O DHE é uma molécula lipofílica em seu estado reduzido que na presença de ânion superóxido é oxidado e convertido em etídio. Em seguida, esta forma oxidada se intercala no DNA, emitindo fluorescência em vermelho (WOJTALA *et al.*, 2014). Células A-375 (2,5 × 10^3 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços e mantidas *overnight* a 37 °C e 5% de CO_2. Após este período, as células foram tratadas com ou 1 mM de E12F e deixadas em uma atmosfera de 37 °C com 5% de CO_2 por 48 horas. O controle negativo foi incubado somente com meio, enquanto o controle positivo foi incubado com peróxido de hidrogênio 10 mM. Após o

tratamento, as células foram incubadas simultaneamente com DHE 5 µM (Life Technologies, Invitrogen, USA) e Hoechst 33342 (2 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, USA) por 1 hora e analisadas por microscopia de fluorescência (Leica Microsystems CMS GmbH, Alemanha). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata, estes foram lidos com comprimento de onda de excitação de 350 nm e uma emissão de 461 nm para o Hoechst 33342 e comprimento de onda de excitação de 518 nm e uma emissão de 606 nm para o DHE. Aumento de 400x.

3.6. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA

A presença de fragmentação do DNA foi avaliada utilizando o Kit TUNEL (*TdT-mediated dUTP-X Nick End Labeling*) "*In Situ Cell Death Detection kit, AP*" (Roche Molecular Biochemicals, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. Esta metodologia visa detectar a marcação de fragmentos terminais de DNA (3'-OH), associada à fragmentação do DNA nuclear, como indicativo de morte celular por apoptose (KYRYLKOVA *et al.*, 2012). Células A-375 (2,5 x 10^3 células/poço) foram incubadas em meio DMEM em placas de 96 poços e mantidas *overnight* a 37 °C e 5% de CO_2. Após este período, 1 mM de E12F foi adicionado as células por 48 horas. O controle negativo foi incubado somente com meio, enquanto o controle positivo foi incubado com DMSO (Dimetilsulfóxido) 5% por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 4% por 1 hora (v/v) e permeabilizadas com triton X-100 0,1% (v/v) por 2 minutos a 2-8 °C. Após, foi adicionado a "*TUNEL Labeling solution*" por 1 hora e posteriormente incubadas com Hoechst 33342 (5 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, USA) por 10 minutos e analisadas por microscopia de fluorescência (Leica Microsystems CMS GmbH, Alemanha). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata, estes foram lidos com comprimento de onda de excitação de 350 nm e uma emissão de 461 nm para o Hoechst 33342 e comprimento de onda de excitação de 494 nm e uma emissão de 521 nm para o TUNEL. Aumento de 200x.

3.7. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA

A presença de permeabilização da membrana plasmática foi avaliada utilizando o fluoróforo iodeto de propídio (PI) seguindo as recomendações do fabricante (Thermo

Fisher Scientific). O PI é uma molécula fluorescente que ao se intercalar ao DNA emite fluorescência em vermelho. No entanto esta molécula não consegue passivamente atravessar a membrana plasmática intacta, sendo um bom indicativo para morte celulares que comprometem a integridade da membrana plasmática como necrose, necroptose ou apoptose tardia (CROWLEY *et al.*, 2016). Células A-375 (2,5 x 10^3 células/poço) foram incubadas em meio DMEM em placas de 24 poços e mantidas *overnight* a 37 °C e 5% de CO_2. Após este período, 1 mM de E12F foi adicionado as células por 48 horas. O controle negativo foi incubado somente com meio, enquanto o controle positivo foi incubado com utilizado ácido acético (CH_3COOH) 1 M por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e marcadas com Hoechst 33342 (5 µg/mL) e PI (2 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, USA) por 10 minutos e analisadas por microscopia de fluorescência (Leica Microsystems CMS GmbH, Alemanha). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata, estes foram lidos com comprimento de onda de excitação de 350 nm e uma emissão de 461 nm para o Hoechst 33342 e comprimento de onda de excitação de 493 nm e uma emissão de 636 nm para o PI. Aumento de 400x.

3.8. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO E12F SOBRE A CLONOGENICIDADE

Células SK-MEL-25 (3 × 10^2 células/poço), A-375 e SK-MEL-147 (5 × 10^2 células/poço) foram incubadas em meio DMEM em placas de 12 poços e mantidas *overnight* a 37 °C e 5% de CO_2. Após este período, 0,75 mM de E12F foi adicionado as células SK-MEL-25 e 1 mM foi adicionado as células A-375 e SK-MEL-147. O controle foi incubado somente com meio. Após 4 dias de tratamento, as células foram retratadas seguindo os mesmos parâmetros. No sétimo dia, as colônias foram fixadas com etanol 70% (v/v), lavadas com PBS (*Phosphate-buffered Saline*) e coradas com cristal violeta 0,5% (m/v) (FRANKEN *et al.*, 2006). O efeito do E12F na formação de colônias foi avaliado com base na área ocupada pelas colônias, com os valores calculados em relação ao controle considerado 100%. Os parâmetros foram quantificados utilizando o software ImageJ – versão 1.41a/Java 1.6.0.

3.9. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO E12F SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR

Células SK-MEL-25, A-375 e SK-MEL-147 (1,5 x 10^5 células/poço) foram incubadas em meio DMEM em placas de 12 poços e mantidas *overnight* a 37 °C e 5%

de CO_2. Após este período, utilizando uma ponteira estéril (1000 µL), lesões verticais foram realizadas na monocamada celular de cada poço a fim de obter uma área livre de células. Posteriormente, células SK-MEL-25 foram tratadas com (0; 0.25; 0,5; 0,75 e 1 mM) e células SK-MEL-147 e A-375 foram tratadas com 1 mM de E12F por 24 e 48 horas. O controle foi incubado somente com meio DMEM. Imagens foram digitalmente capturadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas com auxílio de microscópio óptico (Zeiss, Primovert) em um aumento de 100x. A distância percorrida pelas células foi determinada a partir da subtração da área da lesão no tempo inicial (0 horas) pela área após os tempos de tratamento (24 e 48 horas). As medidas foram feitas através do software ImageJ – versão1.41a/Java 1.6.0 (RODRIGUEZ; WU; GUAN, 2004). A migração celular foi calculada em relação ao controle, considerada como 100%.

3.10. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO E12F SOBRE A INVASÃO CELULAR

O ensaio de invasão foi realizado utilizando insertos ThinCert® (Greiner Bio-One, São Paulo, SP, Brasil; 8 µm) revestido com Matrigel (Corning®, Gledale, AZ, EUA) (1:6 em meio DMEM sem SFB) em placas de 24 poços. Células SK-MEL-25, A-375 e SK-MEL-147 (2,5 x 10^4 células/poço) foram ressuspendidas em solução contendo 0,75 mM (SK-MEL-25) ou 1 mM (SK-MEL-147 e A-375) de E12F diluído em meio sem SFB e adicionadas a câmara superior do inserto. O controle foi ressuspendido somente em meio sem SFB. No compartimento inferior ao inserto foi adicionado meio suplementado com 15% de SFB, como quimioatraente. Após 24 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO_2, as células não invasivas foram removidas com o auxílio de um *swab*, e as células invasivas presentes no inserto foram fixadas com formaldeído 4% (v/v), permeabilizadas com Triton-X 0,05% (v/v), coradas com cristal violeta 0,05% (m/v) e observadas em microscópio óptico (Zeiss, Primovert) em um aumento de 200x. Para determinar o número de células invasivas, foram capturadas imagens de 7 campos aleatórios de cada uma das triplicatas e realizada a contagem manual das células invasivas. O efeito do peptídeo na invasão celular foi determinado em relação ao controle, considerada como 100%.

3.11. EXTRAÇÃO DE PROTÉINAS TOTAIS PARA WESTERN BLOTTING

Células SK-MEL-25, A-375 e SK-MEL-147 (1,5 x 10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços e mantidas *overnight* a 37 °C e 5% de CO_2. Após

este período, as células foram tratadas com 0,75 mM (SK-MEL-25) ou 1 mM (A-375 e SK-MEL-147) por 12, 24, 36 e 48 horas. Após o tratamento, as células foram lisadas com tampão de lise contendo inibidores de protease e fosfatase (Thermo Fisher Scientific, EUA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14462 g por 10 minutos a 4ºC, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.12. WESTERN BLOTTING

Para realizar Western Blotting ~50 µg de proteína totais foram desnaturados a 100 ° C por 3 minutos e submetidos a eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (8, 10 ou 15%). A eletroforese foi realizada com tensão constante de 100V em tampão de corrida contendo Tris (tris (hidroximetil) aminometano) 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1% (m/v), pH 8,8. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) (Bio-Rad Laboratories, EUA) por 2 horas e 45 minutos com corrente elétrica constante de 300 mA em tampão de transferência contendo Tris 65 mM, Glicina 192 mM e Metanol 20% (v/v), pH 8,3, a 4° C. Após este período, estas membranas foram bloqueadas por 60 minutos em Tampão Tris salino (TBST) contendo NaCl 150 mM, Tris 20 mM e Tween 20® 0,1% (v/v) com leite Molico 5% (m/v). Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com os anticorpos primários anti-RAS (1:1000; 610001; BD Biosciences, EUA), anti-B-RAF (1:1000; 14814; Cell Signaling Technologies, EUA), anti-MITF (1:1000; 12590; Cell Signaling Technology, EUA), anti-CDH13 (1:1000; OAPB00334; Aviva Sysbio, EUA) ou anti-β-actina (1:3.000; M01263; Boster, EUA) diluídos em TBST. Após o período de incubação, as membranas foram submetidas a três lavagens de cinco minutos com TBST e incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário *anti-rabbit IgG + HRP* (BA1050-0.5) ou *anti-mouse IgG + HRP* (BA1054-0.5) diluído em TBST (1:10.000) por 1 hora (Boster, EUA). As proteínas foram detectadas por quimioluminescência utilizando o kit *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) utilizando o Fotodocumentador FluorChem R (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Todos os resultados de western blotting mostrados são representativos de dois experimentos independentes. A densitometria das bandas foi mensurada usando o software ImageLab 6.1.0 build 7

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e normalizada usando a β-actina (*loading control*).

3.13. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

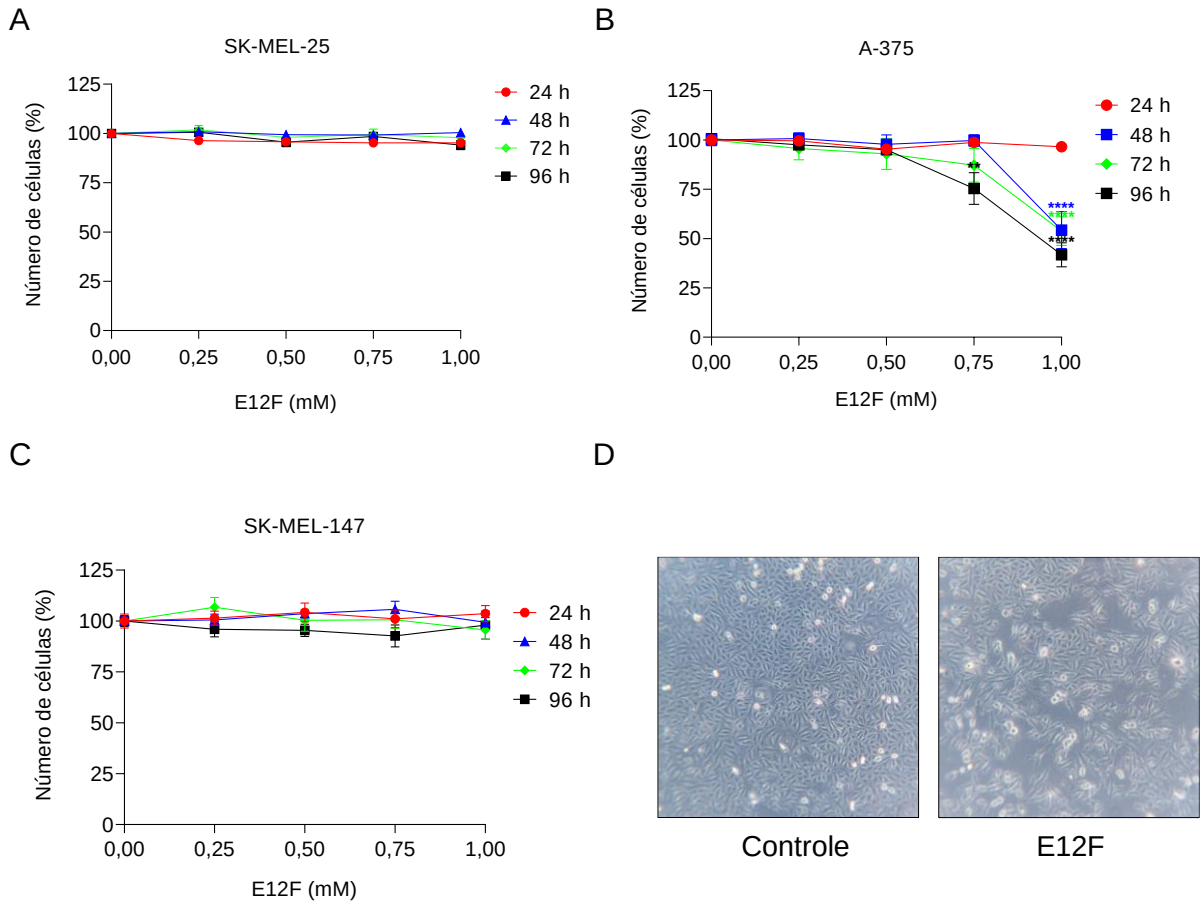
Todos os dados foram expressos como médias ± erro padrão da média (*standard error mean*) (SEM) de pelo menos dois experimentos independentes em triplicata. As análises gráficas e os cálculos estatísticos foram realizadas usando o software Prism 6.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para realizar a análise de significância estatística dos dados experimentais, inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, a fim de determinar se seguiam uma distribuição paramétrica ou não paramétrica. Com base nessa informação, os ensaios que envolviam dois grupos e uma única variável dependente foram analisados por meio do teste t de Student. Para análises com três ou mais grupos em relação a uma variável dependente, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) simples *(One-way ANOVA*). Já nos ensaios que envolviam duas ou mais variáveis independentes, foi aplicada a análise de variância de dois fatores (*Two -way ANOVA*). Os testes ANOVA foram seguidos pelo pós teste de Dunnett para a comparação de médias de diferentes grupos com um grupo controle ou pelo pós teste de Tukey para uma comparação entre todos os grupos (MCHUGH, 2011; MISHRA *et al.*, 2019).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO PEPTÍDEO E12F EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Para avaliar o efeito do peptídeo nas células SK-MEL-25, A-375 e SK-MEL-147 foram realizadas curvas de concentrações nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h. Os resultados mostraram que o peptídeo não afetou a viabilidade das células SK-MEL-25 (Figura 8A) e SK-MEL-147 (Figura 8C) em comparação ao controle. Em contraste, observamos uma diminuição significativa do número de células A-375 a partir de 48h de tratamento com o peptídeo (Figura 8B), com uma redução de aproximadamente 49% em comparação ao controle.

Figura 8 – Caracterização do efeito do peptídeo E12F sobre a proliferação celular de células de melanoma humano.



(A) Células SK-MEL-25, (B) A-375 e (C) SK-MEL-147 foram tratadas com concentrações crescentes de peptídeo E12F por 24, 48, 72 e 96 h. (D) Imagens capturadas das células A-375 após 48 horas de tratamento com o E12F coradas com azul de tripan. O número de células foi determinado através do ensaio de exclusão de azul de tripan. A porcentagem do número de células foi calculada em relação

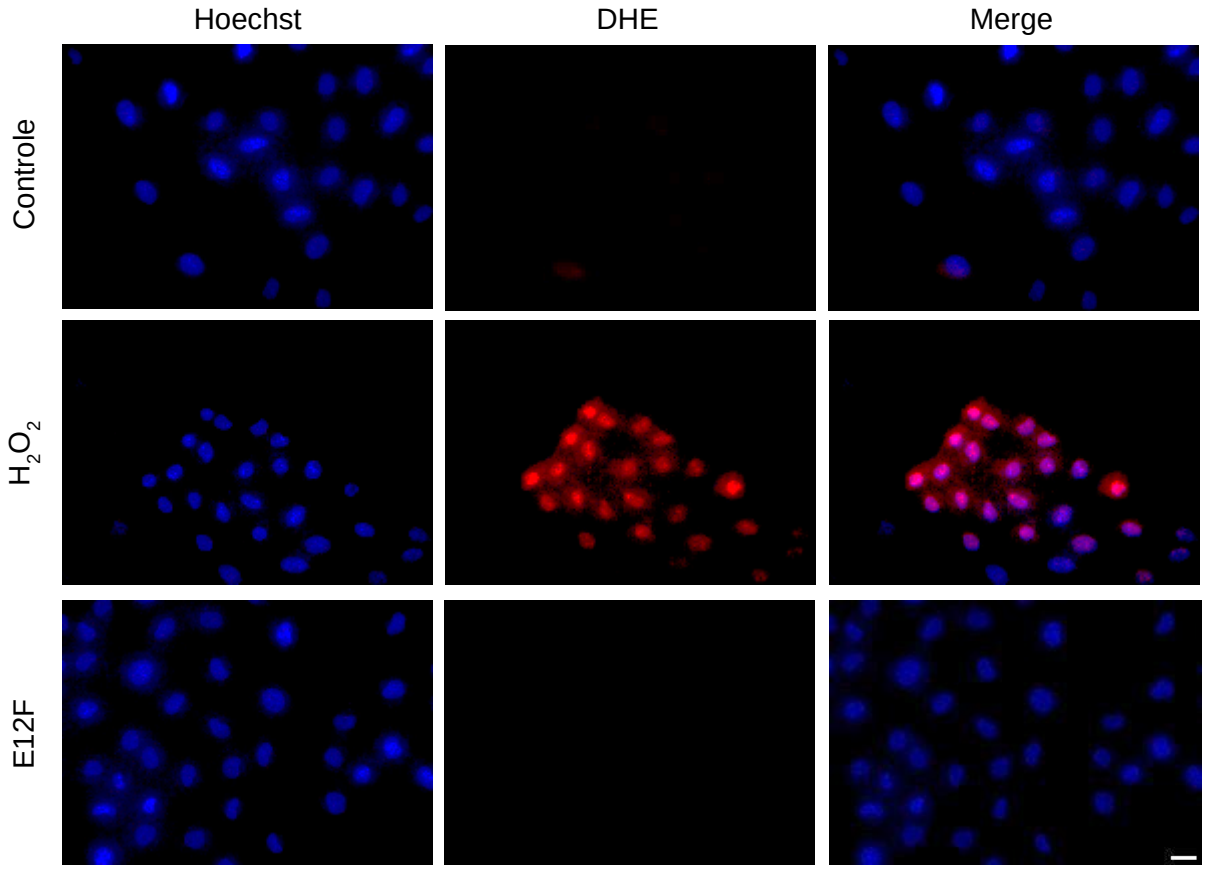
ao controle, considerado como 100%. Os resultados são apresentados em média ± SEM de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata. Análise estatística: *One-way ANOVA* e pós teste de Dunnet. ** p<0,01; **** p<0,0001.

Para este ensaio foi utilizado o teste de exclusão de azul de tripan que permite avaliar a presença de células viáveis ou não com base na integridade da membrana plasmática. Células viáveis com membranas íntegras são capazes de excluir o corante, enquanto células não viáveis incorporam o azul de tripan tornando-se coradas (TENNANT, 1964). Neste ensaio, durante a contagem de células não foi observado a presença de células coradas, mas sim uma diminuição na presença de células totais. Diante disso, imagens de células tratadas e não tratadas após 48 horas de tratamento com o peptídeo na presença de azul de tripan foram capturadas (Figura 8D). Nessas imagens, é possível observar que as células tratadas com o peptídeo permaneceram viáveis, no entanto, houve uma redução no número de células presentes no poço, sugerindo que o E12F não foi citotóxico e apresenta efeito sobre a proliferação das células A-375.

4.2. E12F NÃO AUMENTA OS NÍVEIS DE EROs EM CÉLULAS A-375

Com o intuito de obter mais dados para verificar se a diminuição observada nas células A-375 tratadas com E12F está relacionada a uma diminuição da proliferação celular e não à morte celular, foi realizado o experimento de microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo DHE que permite avaliar o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), um processo frequentemente associado a mecanismos de morte celular (WOJTALA *et al.*, 2014). Neste ensaio, não foi observado um aumento dos níveis de EROs em células tratadas com o peptídeo após 48h (Figura 9).

.Figura 9 - E12F não causa aumento de EROs em células A-375

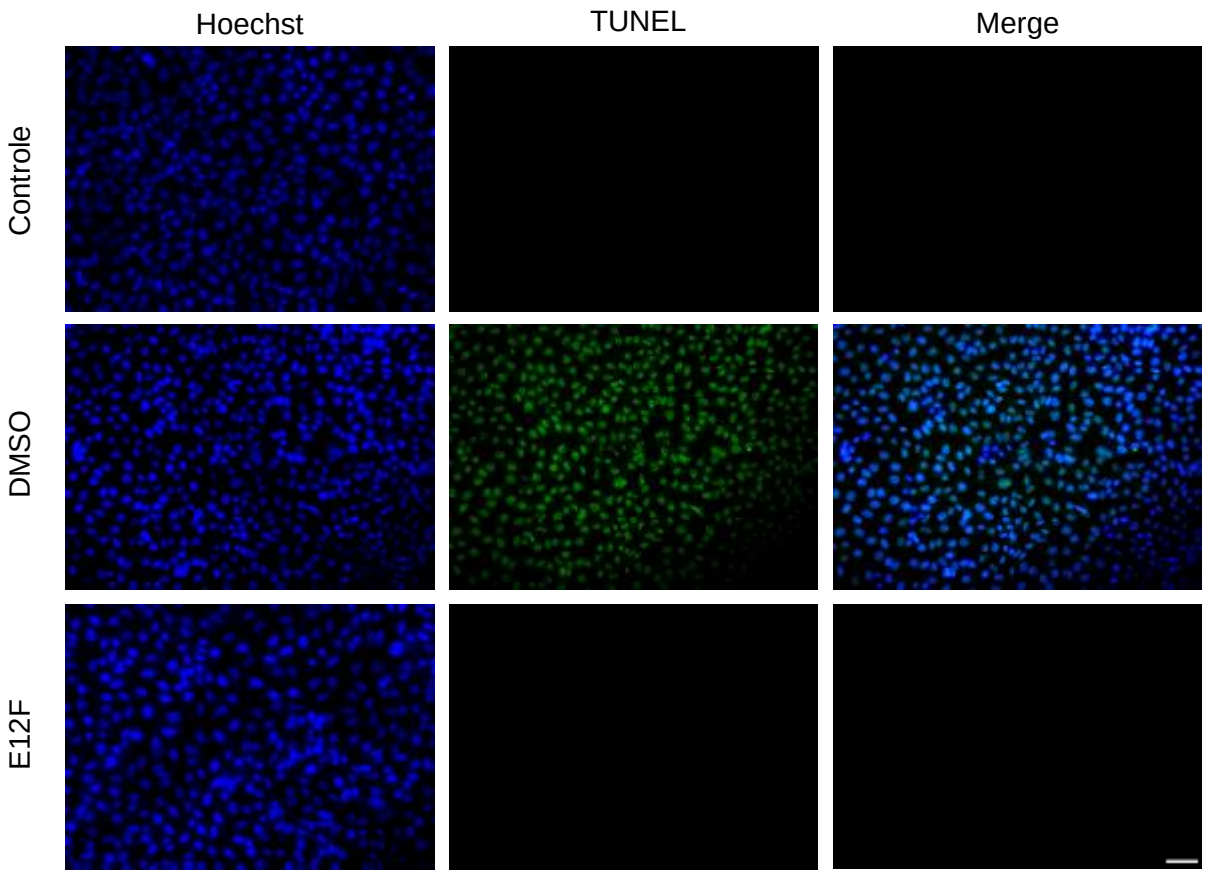


Células A-375 foram tratadas com 1 mM de E12F por 48 h. O controle negativo foi incubado somente com meio, enquanto o controle positivo foi incubado com peróxido de hidrogênio (10 mM) por 1 hora. Posteriormente, as células foram marcadas com Hoechst 33342 (2 µg/mL) e DHE (5 µM) e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Merge: sobreposição das imagens. Aumento de 400x. Escala: 10 µm.

4.3. E12F NÃO CAUSA FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS A-375

Em seguida, foi conduzido o ensaio TUNEL para avaliar se a diminuição do número de células observado no teste de exclusão de azul de tripan em células A-375 poderia ser um processo de morte celular apoptótica ao avaliar uma das principais características desse tipo de morte, a fragmentação do DNA na porção 3'OH (KYRYLKOVA *et al.*, 2012). Após a leitura por microscopia de fluorescência foi visto que o E12F não induz fragmentação do DNA em células A-375 (Figura 10).

Figura 10 – E12F não causa fragmentação do DNA em células A-375.

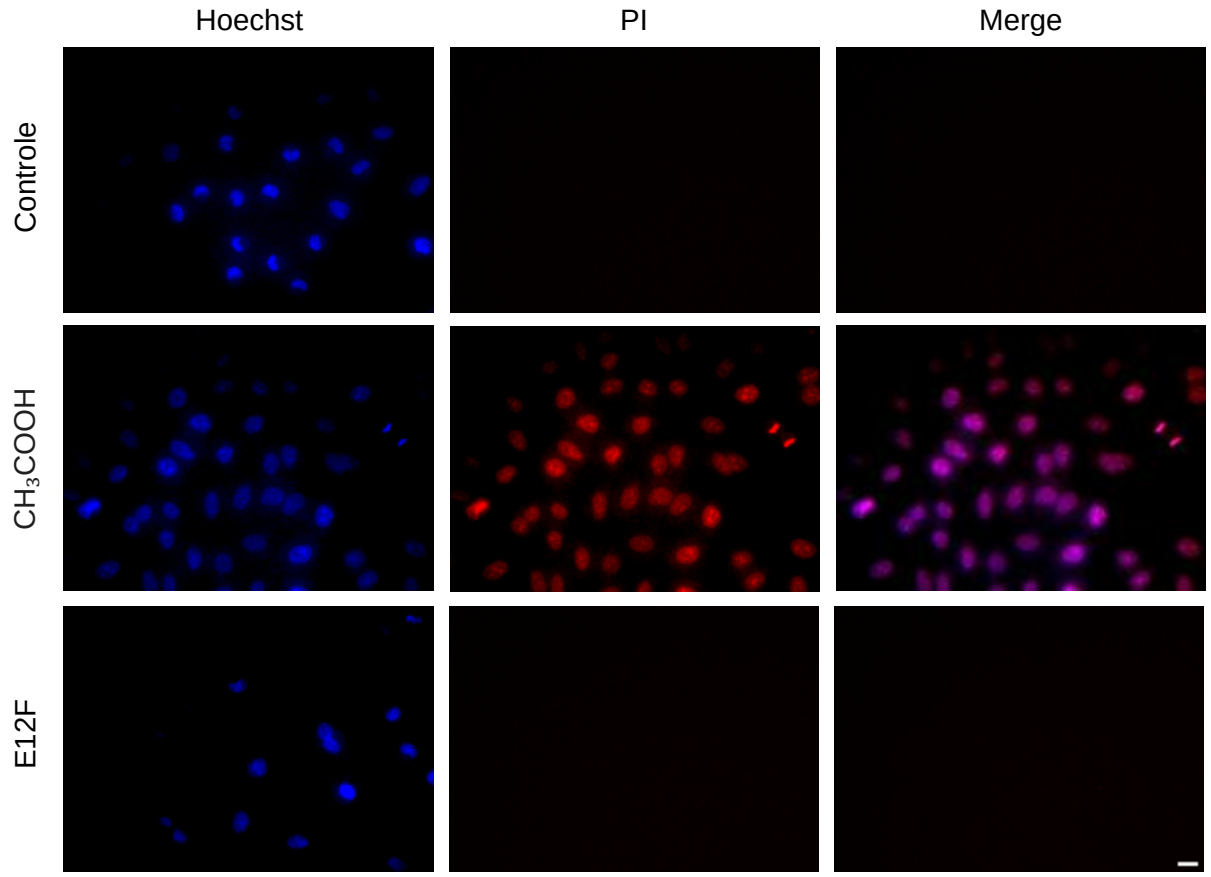


Células A-375 foram tratadas com 1 mM de E12F por 48 h. O controle negativo foi incubado somente com meio, enquanto o controle positivo foi incubado com DMSO 5% por 1 hora. Posteriormente, as células foram marcadas com TUNEL e Hoechst 33342 (5 µg/mL) e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Merge: sobreposição das imagens. Aumento de 200x. Escala: 20 µm.

4.4. E12F NÃO CAUSA PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM CÉLULAS A-375

Para avaliar se a diminuição observada não estaria relacionada com os processos de morte celular por necrose, necroptose ou apoptose tardia, foi avaliado se o E12F induziria uma característica clássica destes tipos de morte, a permeabilização da membrana plasmática (CROWLEY *et al.*, 2016). A partir do ensaio de microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo PI, verificou-se que o peptídeo não induz permeabilização na membrana plasmática, indicando que seu efeito na linhagem A-375 não está relacionado a esses mecanismos de morte celular (Figura 11).

Figura 11 – E12F não causa permeabilização da membrana plasmática de células A-375.

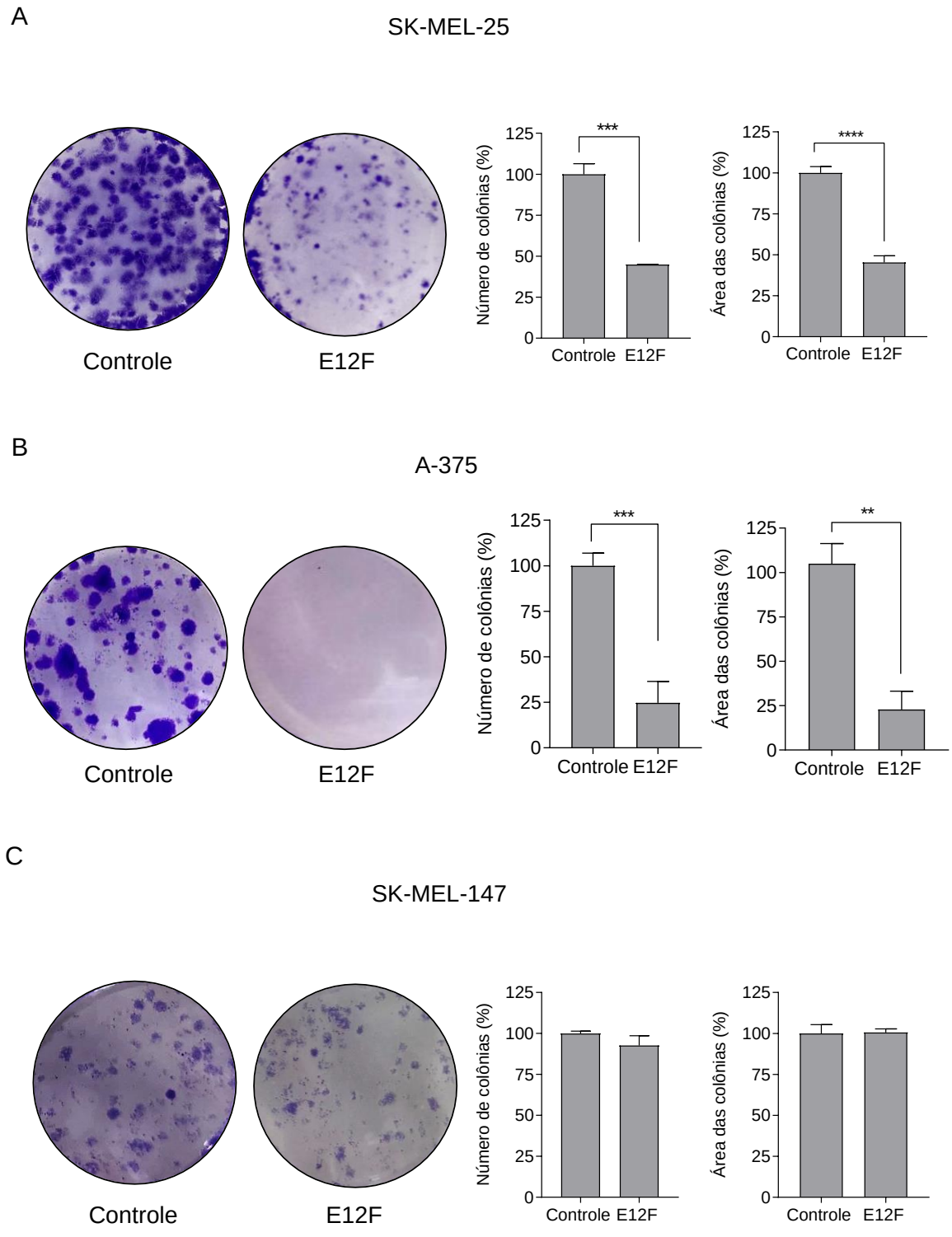


Células A-375 foram tratadas com 1 mM de E12F por 48 h. O controle negativo foi incubado somente com meio, enquanto o controle positivo foi incubado com ácido acético (1 M) por 1 hora. Posteriormente, as células foram marcadas com Hoechst 33342 (5 µg/mL) e PI (2 µg/mL) e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Merge: sobreposição das imagens. Aumento de 400x. Escala: 10 µm.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO E12F SOBRE A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Para dar continuidade na investigação do efeito do E12F foi realizado o ensaio de clonogenicidade, a fim de avaliar a capacidade das células tratadas de proliferarem e formarem colônias (FRANKEN *et al.*, 2006). Em células SK-MEL-25 o peptídeo foi capaz de inibir o número de colônias em 54% e a área em 56% quando comparadas ao controle (Figura 12A). Já em células A-375 observou-se uma diminuição de 72% no número de colônias e 83% na área das colônias (Figura 12B). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas na formação de colônias da linhagem SK-MEL-147 tratadas em comparação com o controle (Figura 12C).

Figura 12 – Caracterização do efeito do E12F na formação de colônias.

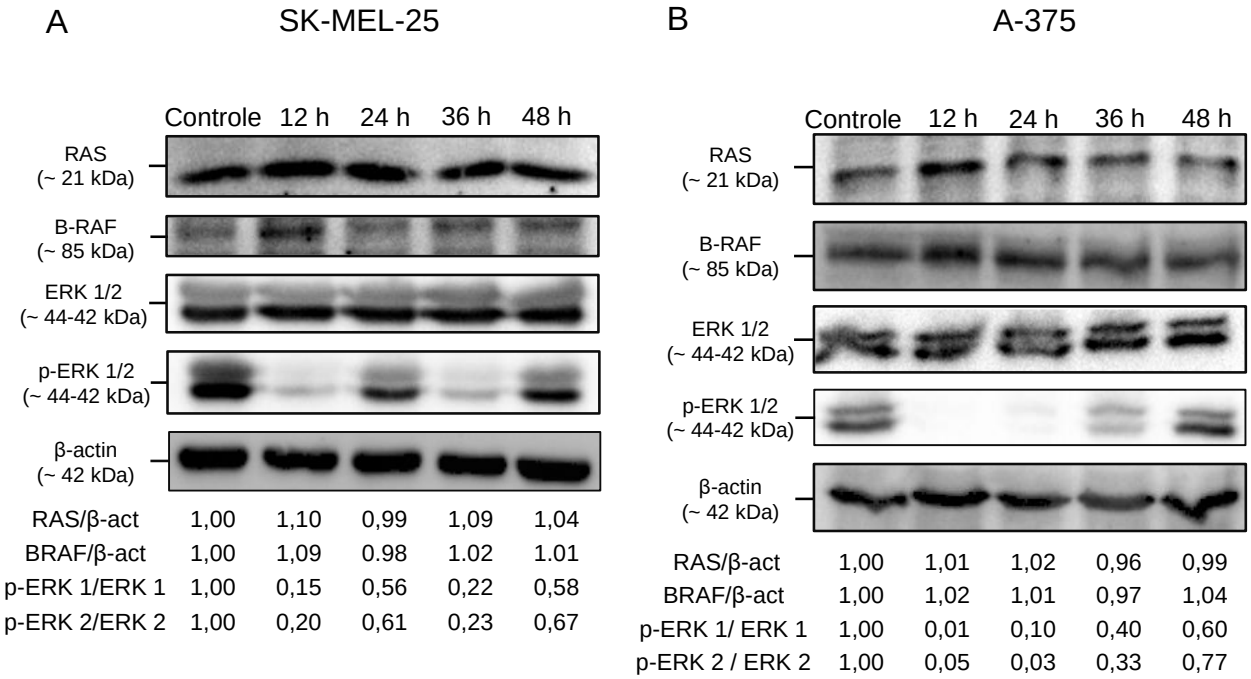


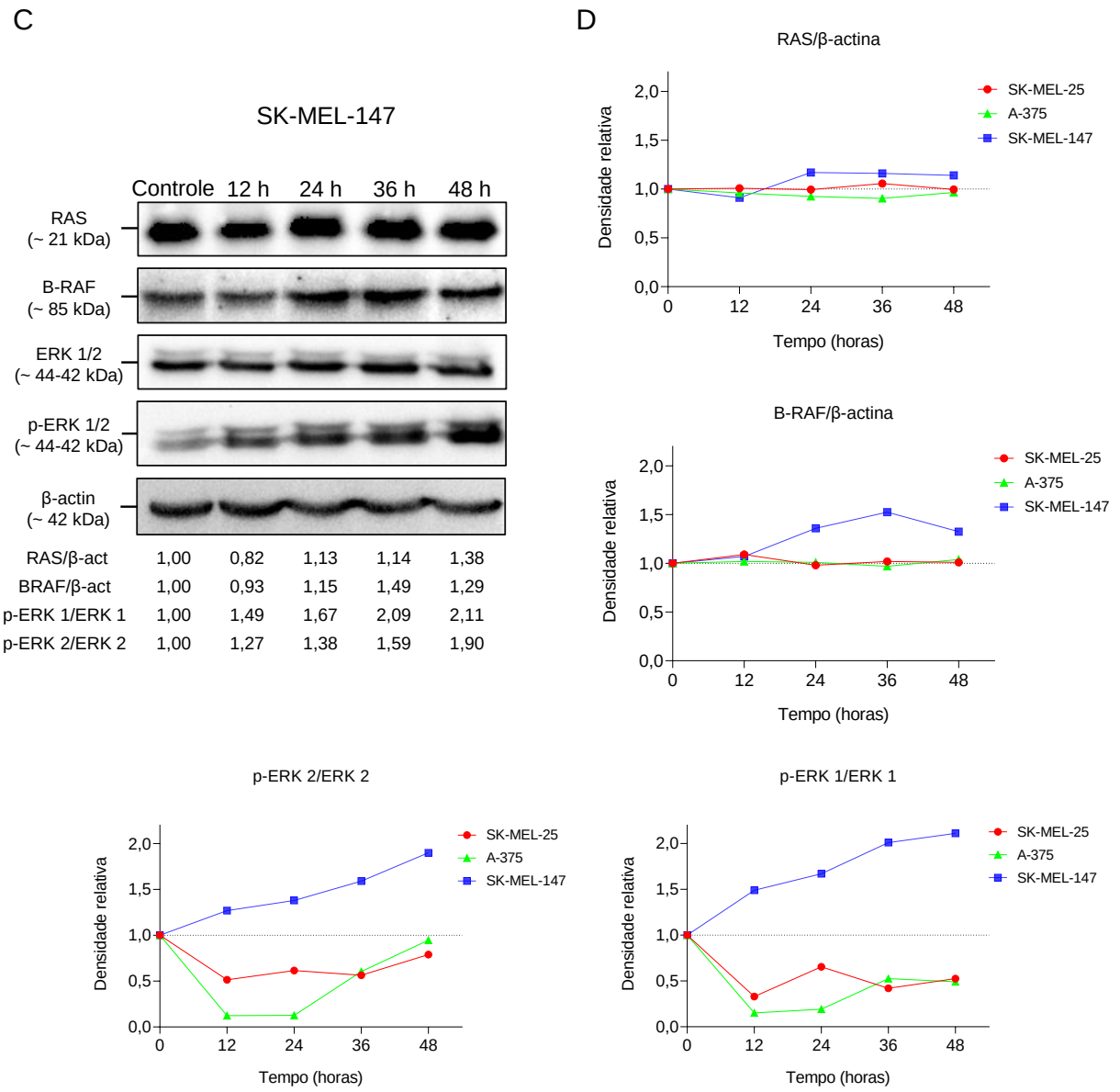
(A) Células SK-MEL-25 foram tratadas com 0,75 mM de E12F e (B) células A-375 e (C) SK-MEL-147 foram tratadas com 1 mM de E12F por 7 dias. A porcentagem do número e área das colônias foi calculada em relação ao controle (células não tratadas), considerado como 100%. Após o final do tratamento, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta. Em seguida, foram capturadas imagens para avaliação dos resultados. A área e o número das colônias foram medidos no software ImageJ. Os resultados são apresentados em média ± SEM de pelo menos dois experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística: teste t de Student. ** p<0,01; **** p<0,0001.

4.6. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA MAPK EM CÉLULAS TRATADAS COM O PEPTÍDEO E12F

A via de sinalização MAPK é uma das principais vias envolvidas na progressão tumoral do melanoma, atuando na regulação de mecanismos como proliferação, migração e invasão celular (SULLIVAN; FLAHERTY, 2013). Nesse contexto, o ensaio de Western Blotting foi realizado para avaliar se o peptídeo pode alterar a expressão de proteínas presentes nessa via como RAS, B-RAF, ERK e ERK fosforilado. Na linhagem SK-MEL-25 foram observadas somente alterações na ativação de ERK (Figura 13A e 13D). O mesmo foi observado na linhagem A-375 (Figura 13B). No entanto, na linhagem SK-MEL-147 foi observado um aumento na expressão de RAS e BRAF, bem como um aumento na ativação de ERK (Figura 13C).

Figura 13 – E12F apresenta efeito na via MAPK em linhagens de melanoma humano.





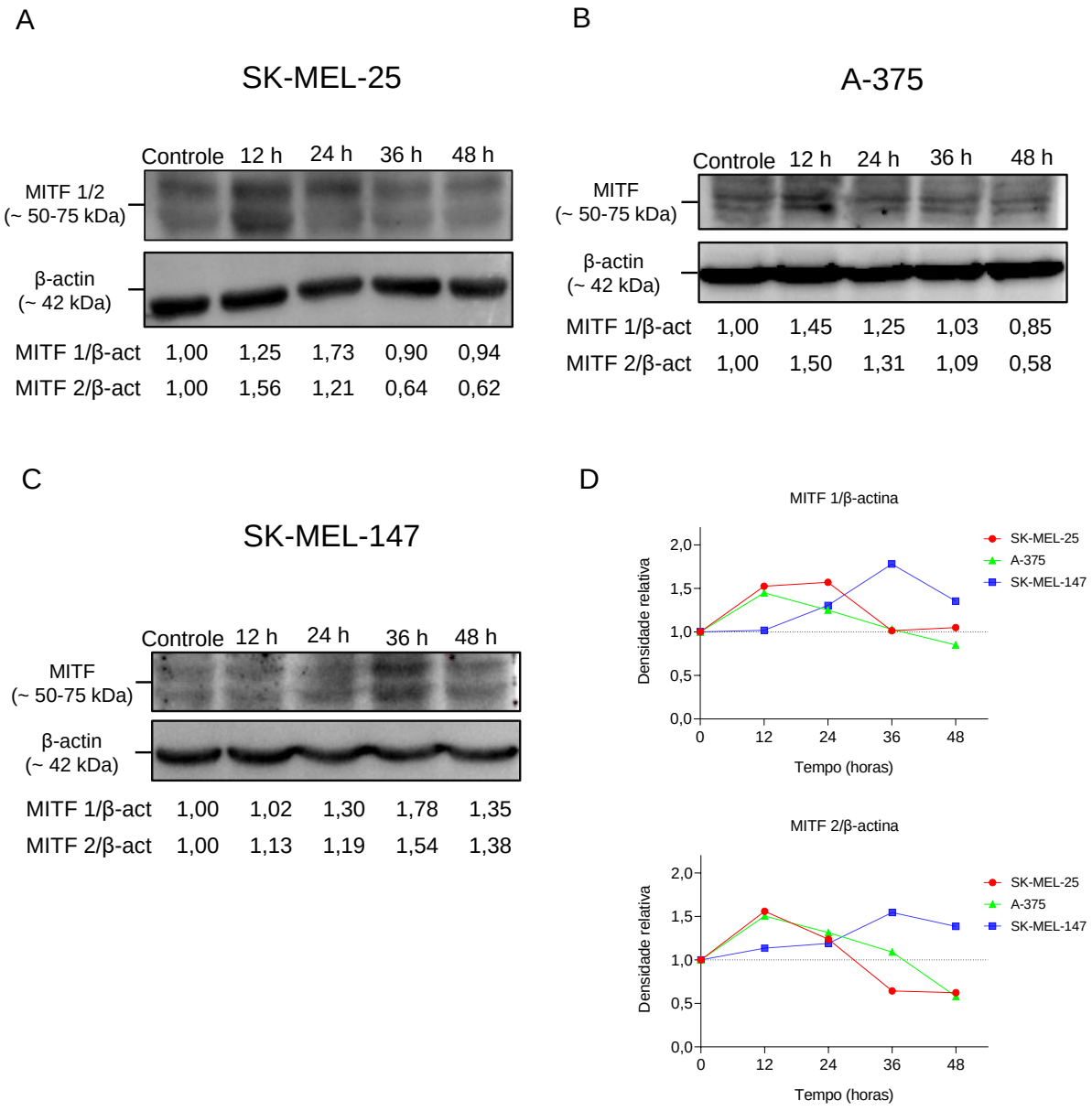
Os lisados das proteínas totais das linhagens (A) SK-MEL-25, (B) A-375 e (C) SK-MEL-147 foram obtidos após incubação com E12F (0,75 mM ou 1 mM) por 12, 24, 36 e 48 h. A expressão as proteínas RAS, B-RAF, ERK e ERK fosforilado (p-ERK) foi analisada por western blotting e quantificada por densitometria, com normalização pela β-actina. Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes. (D) Representação gráfica da variação da expressão da mesma proteína nas diferentes linhagens.

4.7. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MITF EM CÉLULAS TRATADAS COM O PEPTÍDEO E12F

A alteração da ativação de ERK pode impactar também a expressão de proteínas reguladas por essa via como MITF (CHAUHAN *et al.*, 2022). À vista disso, o efeito do E12F na expressão de MITF também foi avaliada. Nas linhagens SK-MEL-25 (Figura 14A e 14D) e A-375 (Figura 14B e 14D), foi observado um aumento na expressão de MITF a partir de 12 h de tratamento. Em contraste, nas células SK-MEL-

147, houve um aumento na expressão de MITF após 36 e 48 h de tratamento (Figura 14C e 14D).

Figura 14 – E12F modula a expressão de MITF em células de melanoma humano.

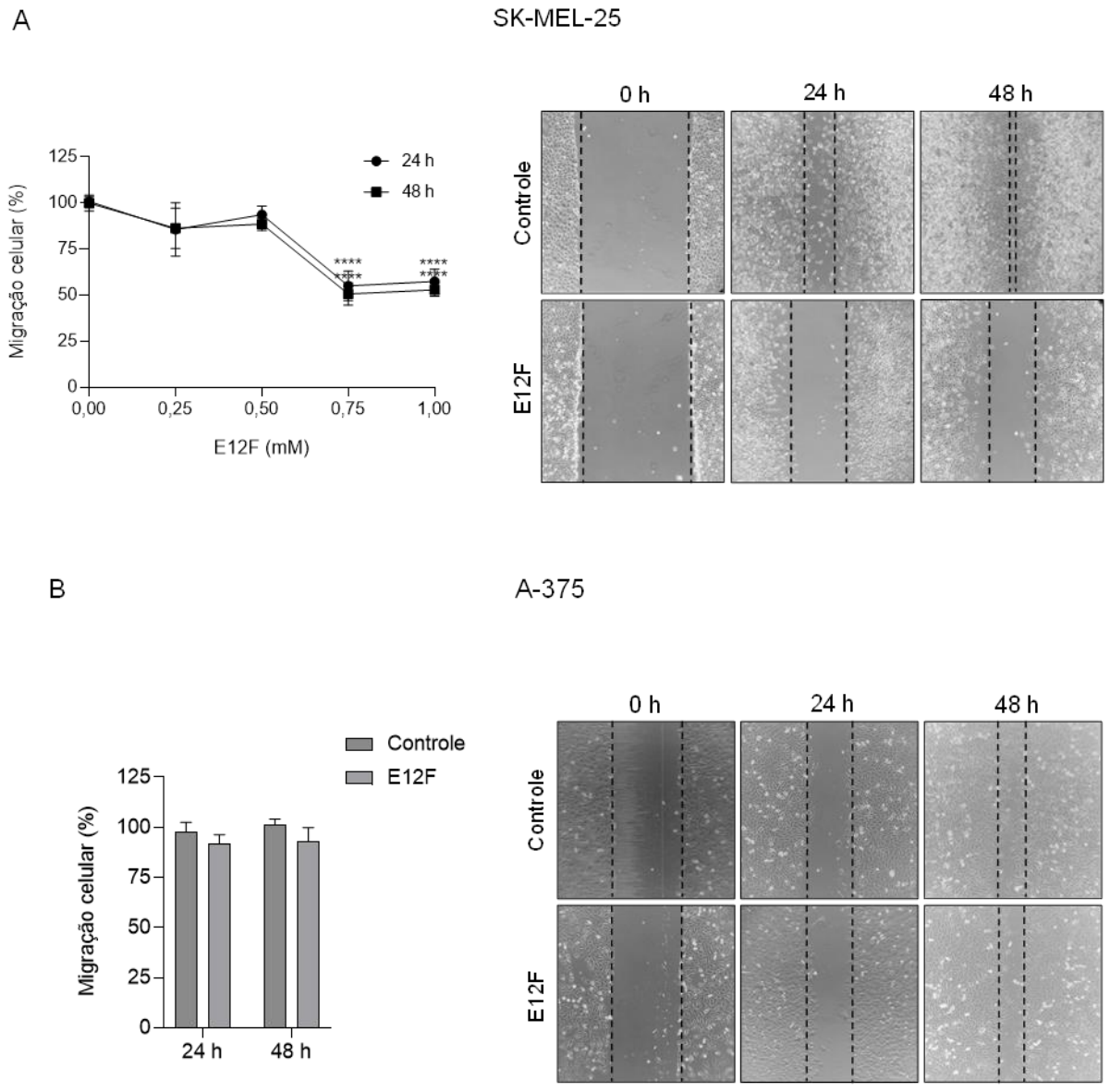


Os lisados das proteínas totais das linhagens (A) SK-MEL-25, (B) A-375 e (C) SK-MEL-147 foram obtidos após incubação com o E12F (0,75 mM ou 1 mM) por 12, 24, 36 e 48 h. A expressão de MITF foi analisada por western blotting e quantificada por densitometria, com normalização pela β-actina. Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes. (D) Representação gráfica da variação da expressão da mesma proteína nas diferentes linhagens.

4.8. EFEITO DO PEPTÍDEO E12F NA MIGRAÇÃO CELULAR

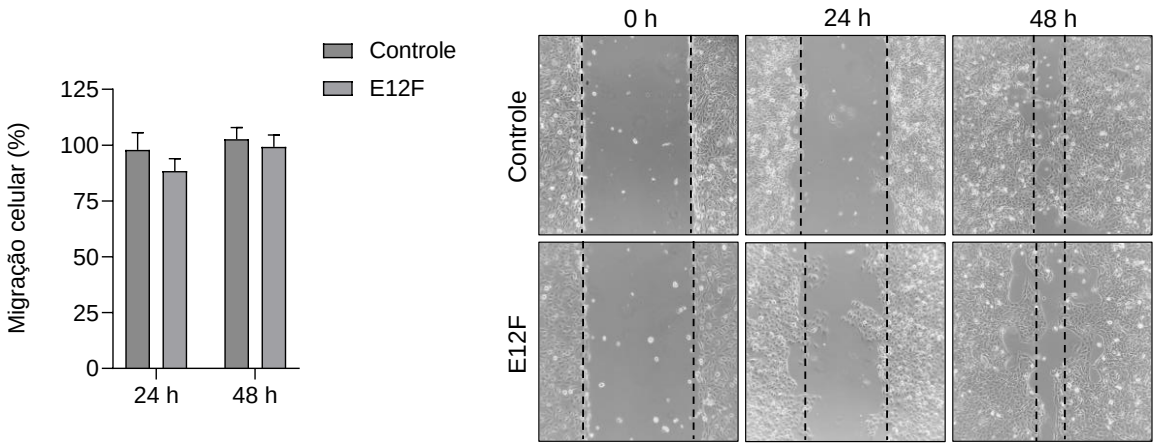
Para abranger mais os possíveis efeitos do E12F nas linhagens estudas o ensaio *Wound Healing (Scratch)* para investigar seu impacto na migração celular. Neste ensaio, o peptídeo E12F inibiu 47% da migração celular após 24 h e 45% após 48 h nas células SK-MEL-25, a partir de 0,75 mM, quando comparadas ao controle (Figura 15A). No entanto, não houve efeito significativo na migração das células A-375 (Figura 15C) e SK-MEL-147 (Figura 15B) após tratamento com o peptídeo, mesmo em sua maior concentração (1 mM).

Figura 15 – Caracterização do efeito do E12F na migração de células de melanoma humano.



C

SK-MEL-147



(A) Células SK-MEL-25 foram tratadas com (0; 0.25; 0,5; 0,75 e 1 mM) e (B) células A-375 e (C) SK-MEL-147 foram tratadas com 1 mM de E12F por 24 e 48 h. O efeito do peptídeo na migração celular foi estabelecido através do ensaio *Wound – Healing (Scratch)*. A porcentagem de migração celular foi calculada em relação ao controle, considerado como 100%. As imagens são representativas de um experimento independente. Aumento de 100x. Os resultados são apresentados em média ± SEM de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Análise estatística: Two-way ANOVA. **** p<0,0001.

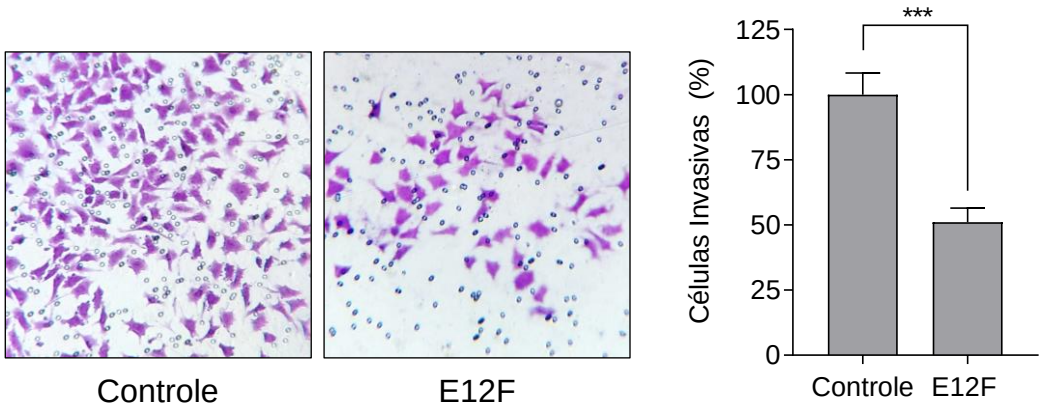
4.9. EFEITO DO PEPTÍDEO E12F NA INVASÃO CELULAR

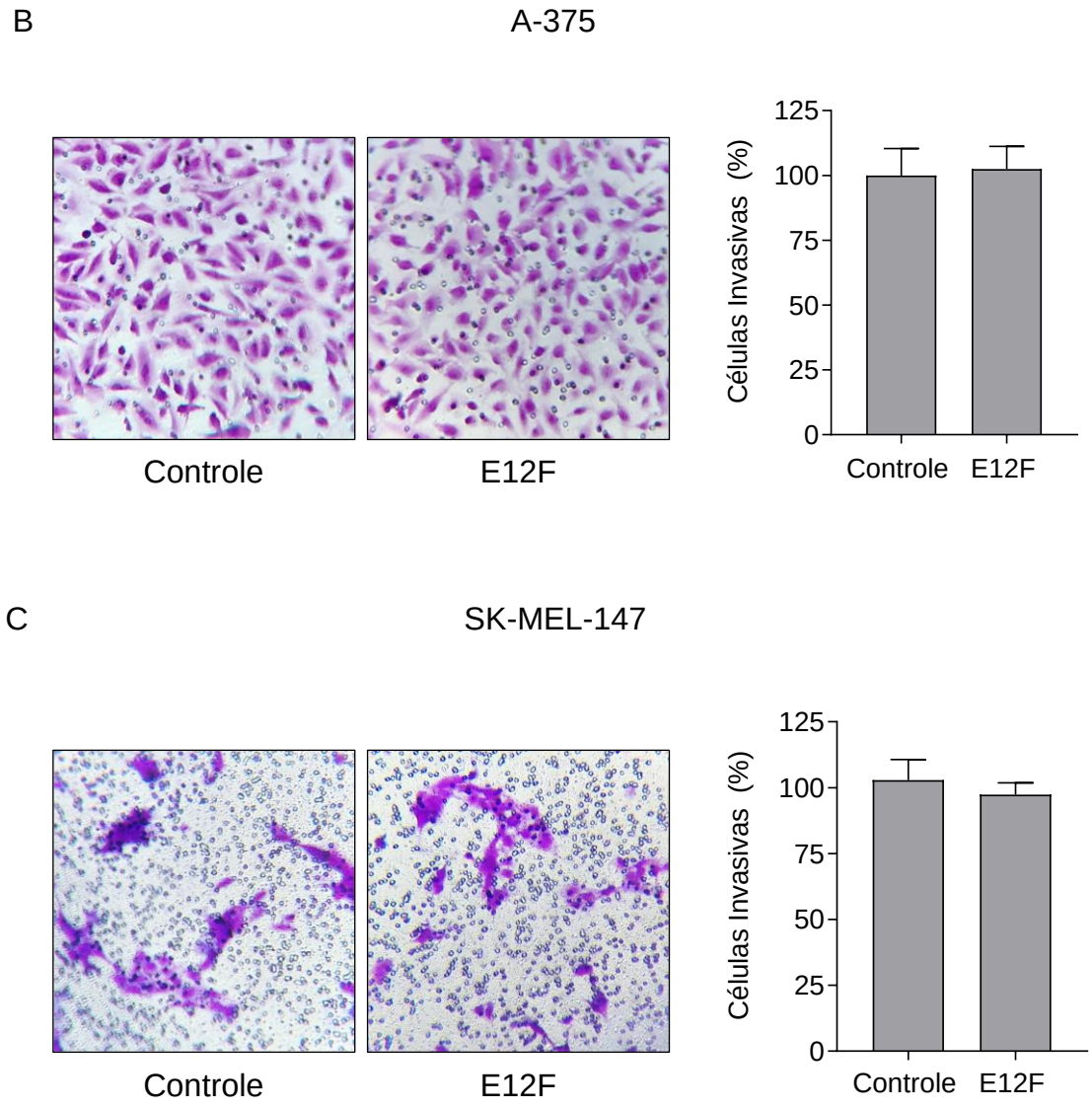
Além do efeito do peptídeo na migração celular, também foi avaliado a sua possível interferência na invasão celular, dado que ambos os mecanismos estão intimamente interligados (FARES *et al.*, 2020). Assim como na migração celular, o E12F inibiu 49% a invasão celular de células SK-MEL-25 (0,75 mM) em relação ao controle (Figura 16A). De maneira semelhante, não foi observado efeito na invasão das células e A-375 (Figura 16B) SK-MEL-147 (Figura 16C) tratadas (1 mM).

Figura 16 - Caracterização do efeito do E12F na invasão de células de melanoma humano.

A

SK-MEL-25





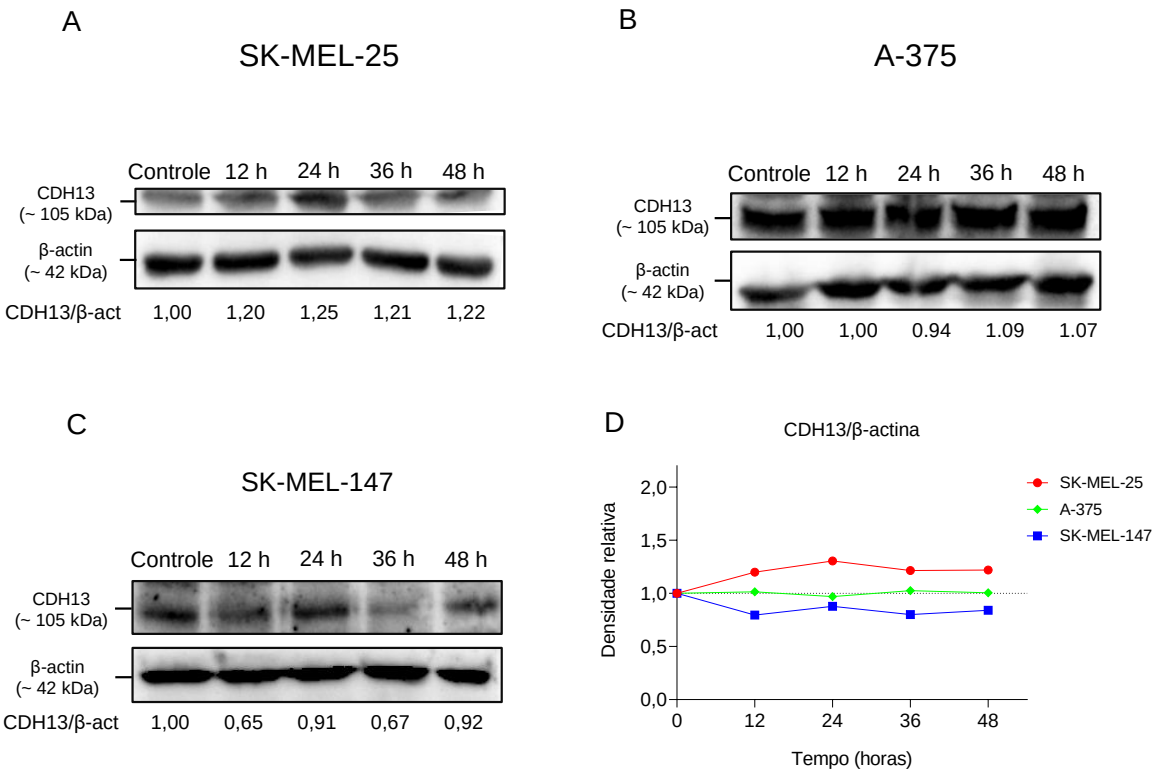
(A) Células SK-MEL-25 foram tratadas com 0,75 mM e (B) células A-375 e (C) SK-MEL-147 foram tratadas com 1 mM de E12F. A invasão celular foi avaliada usando insertos transwell com matrigel. Após 24 h, imagens dos campos de células tratadas e dos controles foram capturadas através de microscópio óptico. A porcentagem de invasão celular foi calculada em relação ao controle, considerado como 100%. As imagens são representativas de um experimento independente. Aumento de 200x. Os resultados são apresentados em média ± SEM de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata. Análise estatística: Teste t de student. *** p<0,001.

4.10. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CDH13 EM CÉLULAS TRATADAS COM O PEPTÍDEO E12F

Para complementar os resultados de migração e invasão celular, foi realizado o ensaio de Western Blotting para avaliar se o peptídeo poderia modular a expressão de CDH13, proteína de adesão célula-célula que está normalmente subregulada no melanoma (KUPHAL *et al.*, 2009). Conforme observado nos ensaios anteriores, o E12F induziu um aumento na expressão dessa proteína apenas nas células SK-MEL-

25 (Figura 17A e 17D). Nas células A-375, não foi observada nenhuma variação na expressão (Figura 17B e 17D). Em contrapartida, na linhagem SK-MEL-147 o peptídeo diminuiu a expressão dessa proteína (Figura 17C e 17D).

Figura 17 - E12F modula a expressão de CDH13 em células de melanoma humano.



Os lisados das proteínas totais das linhagens (A) SK-MEL-25, (B) A-375 e (C) SK-MEL-147 foram obtidos após incubação com o E12F (0,75 mM ou 1 mM) por 12, 24, 36 e 48 h. A expressão das proteínas de CDH13 foi analisada por western blotting e quantificada por densitometria, com normalização pela β-actina. Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes. (D) Representação gráfica da variação da expressão de CDH13 nas diferentes linhagens.

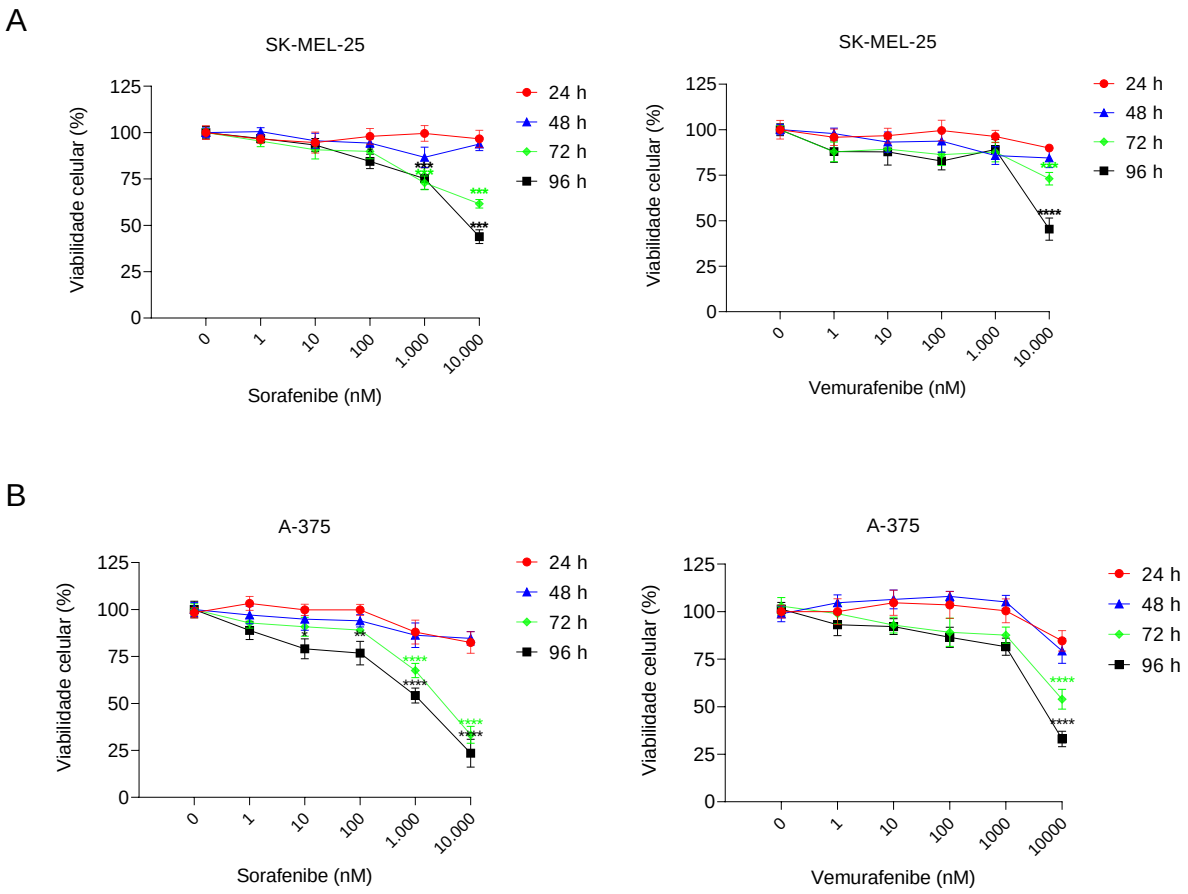
4.11. CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO VEMURAFENIBE E SORAFENIBE EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Para expandir a análise dos possíveis efeitos do E12F, como o seu potencial de combinação com inibidores de proteína quinase, primeiramente foi estabelecida uma curva de concentração em função do tempo visando determinar a concentração ideal dos inibidores baseada no estudo de Ferraz e colaboradores (2020). Neste ensaio, observou-se uma diminuição significativa na viabilidade celular nas concentrações de 1.000 nM (1 µM) e 10.000 nM (10 µM). Entretanto, na concentração de 10.000 nM todas as linhagens, incluindo a SK-MEL-147 (mutante N-RAS^{Q61R}), apresentaram resposta aos inibidores indicando um efeito inespecífico nessa dosagem, uma vez que

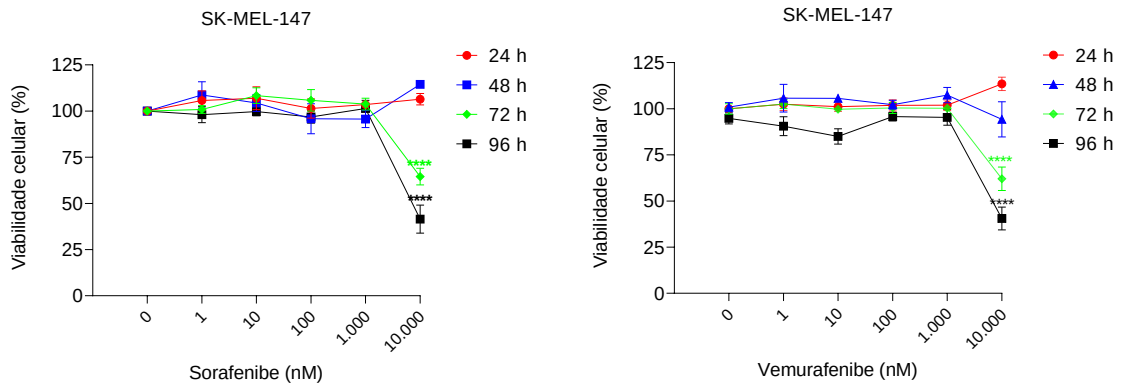
é sabido que células que apresentam esse tipo de mutação não respondem ao tratamento com vemurafenibe (RANDIC *et al.*, 2021).

Diante disso, a concentração de 1 µM foi selecionada para os experimentos subsequentes, pois nessa condição foi observado resposta na linhagem A-375 (mutante B-RAF^{V600E}) (Figura 18B), enquanto na linhagem SK-MEL-147 nenhum efeito foi detectado (Figura 18C). Padrão que está alinhado com observações clínicas, onde pacientes com mutação B-RAF^{V600E} respondem a inibidores de quinase, enquanto aqueles com mutação N-RAS^{Q61R} exibem resistência (FLAHERTY; YASOTHAN; KIRKPATRICK, 2011). Adicionalmente, na linhagem SK-MEL-25 houve redução significativa na viabilidade celular a partir de 1 µM somente após 72 h de tratamento com sorafenibe (Figura 18A).

Figura 18 - Caracterização dos efeitos do vemurafenibe e sorafenibe em células de melanoma humano.



C



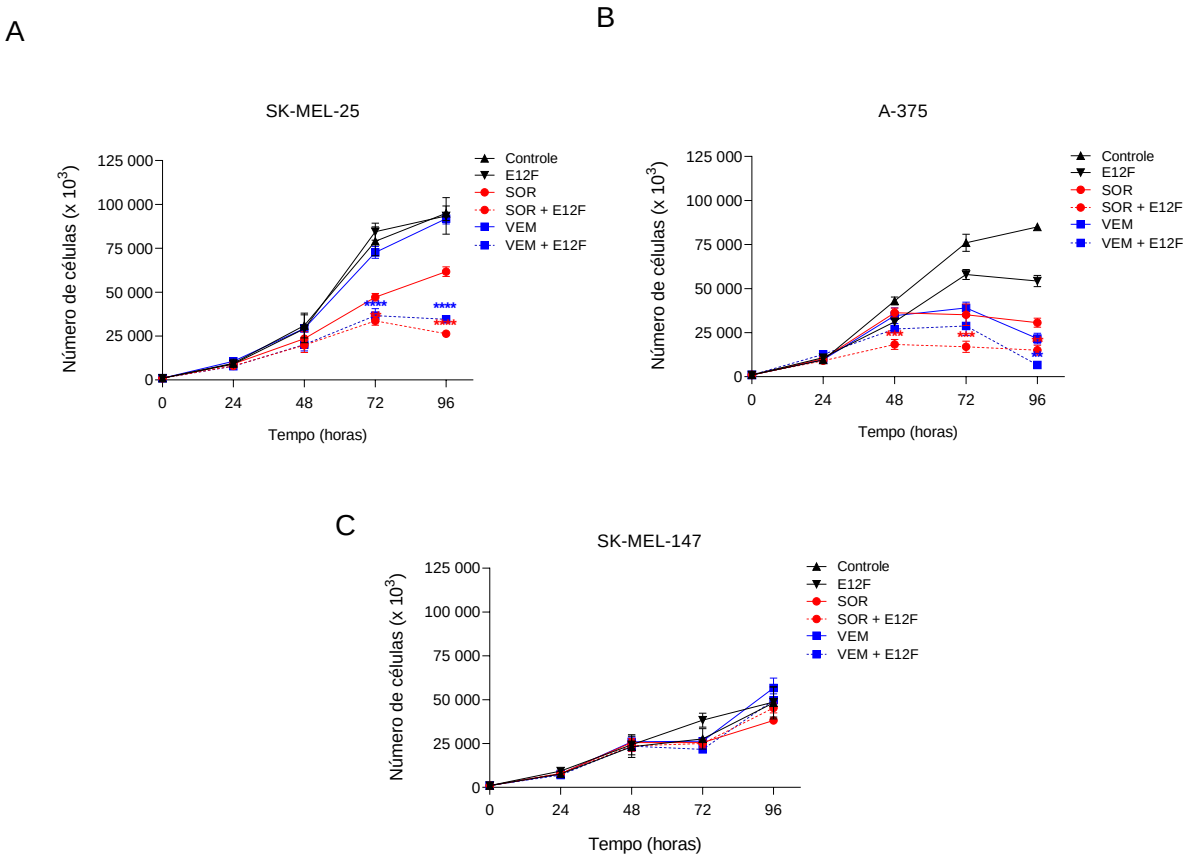
(A) Células SK-MEL-25, (B) A-375 e (C) SK-MEL-147 foram tratadas com concentrações crescentes de vemurafenibe e sorafenibe (0, 1, 10, 100, 1000, 10000 nM) por 24, 48, 72 e 96 h. O número de células foi determinado através do teste de redução de MTT. A porcentagem da redução de MTT foi calculada em relação ao controle, considerado como 100%. Os resultados são apresentados em média ± SEM de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata. Análise estatística: *One-way ANOVA* e pós teste de Dunnet. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

4.12. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA COMBINAÇÃO DO PEPTÍDEO E12F COM O VEMURAFENIBE E SORAFENIBE EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Após determinar a concentração ideal, o potencial terapêutico do peptídeo E12F em combinação com inibidores de proteína quinase atualmente utilizados na prática clínica foi avaliado. Ao comparar o efeito dos inibidores de proteína quinase isolados com suas combinações com o peptídeo E12F, foi possível observar um efeito sinérgico nas linhagens SK-MEL-25 e A-375.

Em células SK-MEL-25, a combinação SOR + E12F causou sinergismo, reduzindo o número de células em 28,6% em 72 h e 57,2% em 96 h, em comparação com os tratamentos isolados. Da mesma forma, a combinação VEM + E12F também apresentou sinergismo, diminuindo 49,5% do número de células em 72 h e 62,4% em 96 h (Figura 19A). Além disso, em células A-375 foi observado efeito sinérgico na combinação SOR + E12F após os períodos de 48, 72 e 96 h com uma diminuição de 49,5%, 51,1 e 51,6% respectivamente, em relação a monoterapia com o sorafenibe e uma diminuição de 69,2% entre a combinação VEM + E12F após 96 h comparado com vemurafenibe isolado (Figura 19B). Por outro lado, nenhum efeito foi observado ao combinar o peptídeo com os inibidores na linhagem SK-MEL-147 (Figura 19C).

Figura 19 - Caracterização do efeito da combinação do peptídeo E12F com o vemurafenibe e sorafenibe em células de melanoma humano.



(A) Células SK-MEL-25, (B) A-375 e (C) SK-MEL-147 foram tratadas com vemurafenibe e sorafenibe (1000 nM) e E12F (1 mM) por 24, 48, 72 e 96 h. O número de células foi determinado através do teste de exclusão de azul de tripan. Controle: células incubadas somente com meio de cultura. E12F: células tratadas com E12F. SOR: células tratadas com sorafenibe. SOR + E12F: combinação entre sorafenibe e E12F. VEM: células tratadas com vemurafenibe. VEM + E12F: combinação entre vemurafenibe e E12F. A porcentagem do número de células foi calculada em relação ao controle, considerado como 100%. Os resultados são apresentados em média ± SEM de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata. Análise estatística: *Two-way ANOVA* e pós teste de Tukey. As significâncias estatísticas mostradas nos gráficos são referentes à comparação entre o efeito dos inibidores isolados com suas combinações com o peptídeo E12F.** p<0,01; **** p<0,0001.

5. DISCUSSÃO

Peptídeos têm se destacado como uma alternativa promissora no tratamento do câncer com estudos mostrando sua atividade em diferentes mecanismos celulares (GHALY *et al.*, 2023; NHÀN; YAMADA; YAMADA, 2023). Nesse contexto, peptídeos derivados de fatores de transcrição são uma boa alternativa devido à sua capacidade de modular a expressão gênica, interações proteína-proteína e proteína-DNA (CRAIK *et al.*, 2013; STONES *et al.*, 2013; INAMOTO; SHIN, 2019; BUSHWELLER, 2019; HENLEY; KOEHLER, 2021). Além disso, resultados mostraram que o peptídeo E12F não diminui o número de células de melanoma murino B16F10-Nex2. Entretanto, o peptídeo inibiu a migração e invasão destas células em 50%. Assim como, diminuiu o número de nódulos metastáticos em camundongos tratados com o peptídeo E12F em 88% sem apresentar toxicidade para os animais (Dissertação de Maria Carolina Cesar, 2020). Em vista disso, neste trabalho foi avaliado o efeito do peptídeo E12F derivado do fator de transcrição BRN2 nas linhagens de melanoma humano SK-MEL-25, A-375 (mutante B-RAF^{V600E}) e SK-MEL-147 (mutante N-RAS^{Q61R}), avaliando seu efeito na proliferação, formação de colônias, migração, invasão celular e na modulação de proteínas da via MAPK, MITF e CDH13.

Na linhagem SK-MEL-25, o tratamento com o peptídeo E12F não diminuiu a proliferação celular após 96 h (4 dias) de tratamento. Contudo, no ensaio de formação de colônias foi observado uma diminuição de aproximadamente 50% do número e da área das colônias após 7 dias de tratamento. Esses resultados sugerem que embora o peptídeo E12F não altere a proliferação celular em um período inicial (até 96 h), ele pode reduzir a proliferação celular a partir de 7 dias de tratamento. Consoante a isso, foi observada uma diminuição na ativação de ERK e um aumento na expressão de MITF, proteínas essenciais para a regulação da proliferação do melanoma (SULLIVAN; FLAHERTY, 2013; HARTMAN; CZYZ, 2015). Além disso, o peptídeo inibiu a migração e a invasão celular, bem como aumentou os níveis de CDH13, proteína regulatória dos mecanismos de migração e invasão no melanoma. Na linhagem A-375, o peptídeo E12F reduziu a proliferação celular a partir de 48 h, assim como diminuiu a formação de colônias em 83%. De forma semelhante ao observado na linhagem SK-MEL-25, houve uma redução na ativação de ERK e um aumento na

expressão de MITF em células A-375. No entanto, não foram observados efeitos significativos na migração e invasão celular, nem alterações na expressão de CDH13.

Embora os resultados nas duas linhagens estejam alinhados em relação à redução da proliferação celular, é possível observar que uma linhagem responde ao peptídeo E12F de forma mais rápida e sensível em comparação a outra. Enquanto a linhagem A-375 é conhecida por portar a mutação B-RAF^{V600E}, o perfil mutacional da linhagem SK-MEL-25 ainda não foi descrito na literatura. Em resultados anteriores com a linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2, que apresenta B-RAF e N-RAS em sua forma selvagem (DOBROFF *et al.*, 2002; MELNIKOVA *et al.*, 2004), mostraram que o E12F induziu efeitos semelhantes aos observados nas células SK-MEL-25 (Dissertação Maria Carolina Cesar, 2020). Isso sugere que a linhagem SK-MEL-25 pode apresentar mecanismos de sinalização semelhantes aos da linhagem B16F10-Nex2, os quais são influenciados pelo peptídeo E12F. Além disso, neste estudo foi observado que a linhagem SK-MEL-25 não responde ao vemurafenibe, inibidor seletivo para B-RAF^{V600E}, reforçando a hipótese de que essa linhagem apresenta B-RAF em sua forma selvagem. A diferença no perfil mutacional dessas linhagens pode justificar a maior sensibilidade observada na linhagem A-375, visto que esta apresenta a via das MAPK constitutivamente ativa. Assim como, pode sugerir que o efeito do peptídeo está relacionado a via MAPK.

A via MAPK regula a transdução de sinais extracelulares para o núcleo, atuando como mediadora de diferentes mecanismos celulares (BAHAR; KIM; KIM, 2023). Isso ocorre principalmente através da proteína efetora da via ERK, descrita por possuir mais de 1000 alvos (ÜNAL; UHLITZ; BLÜTHGEN, 2017). Esses alvos incluem fatores de transcrição, proteínas regulatórias e outras moléculas envolvidas em processos como proliferação, migração, invasão e sobrevivência celular (RAM *et al.*, 2023). No presente estudo, observamos que o E12F induz uma redução na ativação de ERK nas linhagens SK-MEL-25 e A-375, o que se alinha com a diminuição da proliferação celular observada.

Além de uma diminuição da expressão de ERK nas linhagens SK-MEL-25 e A-375 tratadas com o peptídeo, um aumento de MITF foi observado. No melanoma, a interação entre ERK e MITF está amplamente documentada na literatura (GOODALL *et al.*, 2008; HARTMAN; CZYZ, 2015; SIMMONS *et al.*, 2017; GODING; ARNHEITER, 2019). Essa interação pode ocorrer diretamente, com ERK ativo fosforilando MITF e

direcionando-o para degradação via proteossomo (NGEOW *et al.*, 2018) ou indiretamente, via fator de transcrição BRN2 que pode promover a transcrição de MITF (GOODALL *et al.*, 2008; WELLBROCK *et al.*, 2008; GODING; ARNHEITER, 2019). MITF já foi descrito por pode atuar como um fator de transcrição antiproliferativo, regulando a saída do ciclo celular ao ativar o inibidor do ciclo celular INK4A, um supressor tumoral frequentemente mutado em melanomas (LOERCHER *et al.*, 2005). Assim como, por poder ativar o gene $p21^{Cip1}$ (CDKN1A), um inibidor de quinase dependente de ciclina, promovendo a parada do ciclo celular na fase G1(CARREIRA *et al.*, 2005).

De maneira semelhante ao observado com E12F, estudos já evidenciaram outros peptídeos derivados de fatores de transcrição que apresentam efeito na proliferação celular, como por exemplo o peptídeo M1-20 e M1-21 derivados do fator de transcrição FOXM1 que inibem a proliferação celular em diferentes linhagens tumorais (BU *et al.*, 2023; CHENG *et al.*, 2023). Outro exemplo é o peptídeo WT1-Ptj, derivado do fator de transcrição WT1, que induz senescência e inibe o crescimento de células de melanoma murino e humano ao interagir diretamente com a proteína p53 (MASSAOKA *et al.*, 2014). Semelhante ao efeito observado com o E12F, o peptídeo C15D também derivado do fator de transcrição BRN2 inibiu a proliferação de células B16F10-Nex2 e SK-MEL-25 observando alterações nos níveis de ciclina A, ciclina B e p53 (Dissertação de Juliana Anástacio, 2021).

Além disso, o peptídeo E12F inibiu a migração e invasão das células SK-MEL-25. Assim como na proliferação celular, MITF já foi descrito como regulador dos mecanismos de migração e invasão celular no melanoma (VACHTENHEIM; ONDRUŠOVÁ, 2015; SIMMONS *et al.*, 2017; DILSHAT *et al.*, 2021; CHAUHAN *et al.*, 2022). MITF pode ser diretamente regulado pelo fator de transcrição BRN2 e estudos evidenciaram que níveis altos de MITF podem levar a inibição da migração e invasão celular (WELLBROCK *et al.*, 2008; AROZARENA *et al.*, 2011; WELLBROCK; AROZARENA, 2015; DILSHAT *et al.*, 2021). O tratamento com o E12F também levou a um aumento da expressão de CDH13 em células SK-MEL-25. CDH13 é um gene supressor de tumor e assim como o MITF pode ter sua expressão diretamente regulada pelo fator de transcrição BRN2, com sua atividade apresentando uma relação inversa em relação aos níveis de BRN2 (KUPHAL *et al.*, 2009; ELLMANN *et*

al., 2012). Portanto, o aumento dos níveis de MITF e CDH13 pode justificar o efeito inibitório do peptídeo na migração e invasão celular na linhagem SK-MEL-25.

De maneira similar, os peptídeos M1-20 e M1-21 além de atuarem na proliferação celular também exibiram capacidade de inibir a migração de diferentes linhagens tumorais (BU *et al.*, 2023; CHENG *et al.*, 2023). O peptídeo L13S derivado do fator de transcrição BRN2 apresentou efeito na modulação de expressão de MITF, bem como, diminuição da migração e invasão de células B16F10-Nex2 e SK-MEL-25 (CESAR *et al.*, 2024). Adicionalmente, o peptídeo C9K também derivado de um fator de transcrição, inibiu a migração e invasão das células B16F10-Nex2 e SK-MEL-25 também modulando a expressão de MITF e CDH13 (Tese de Maria Carolina Cesar, 2024).

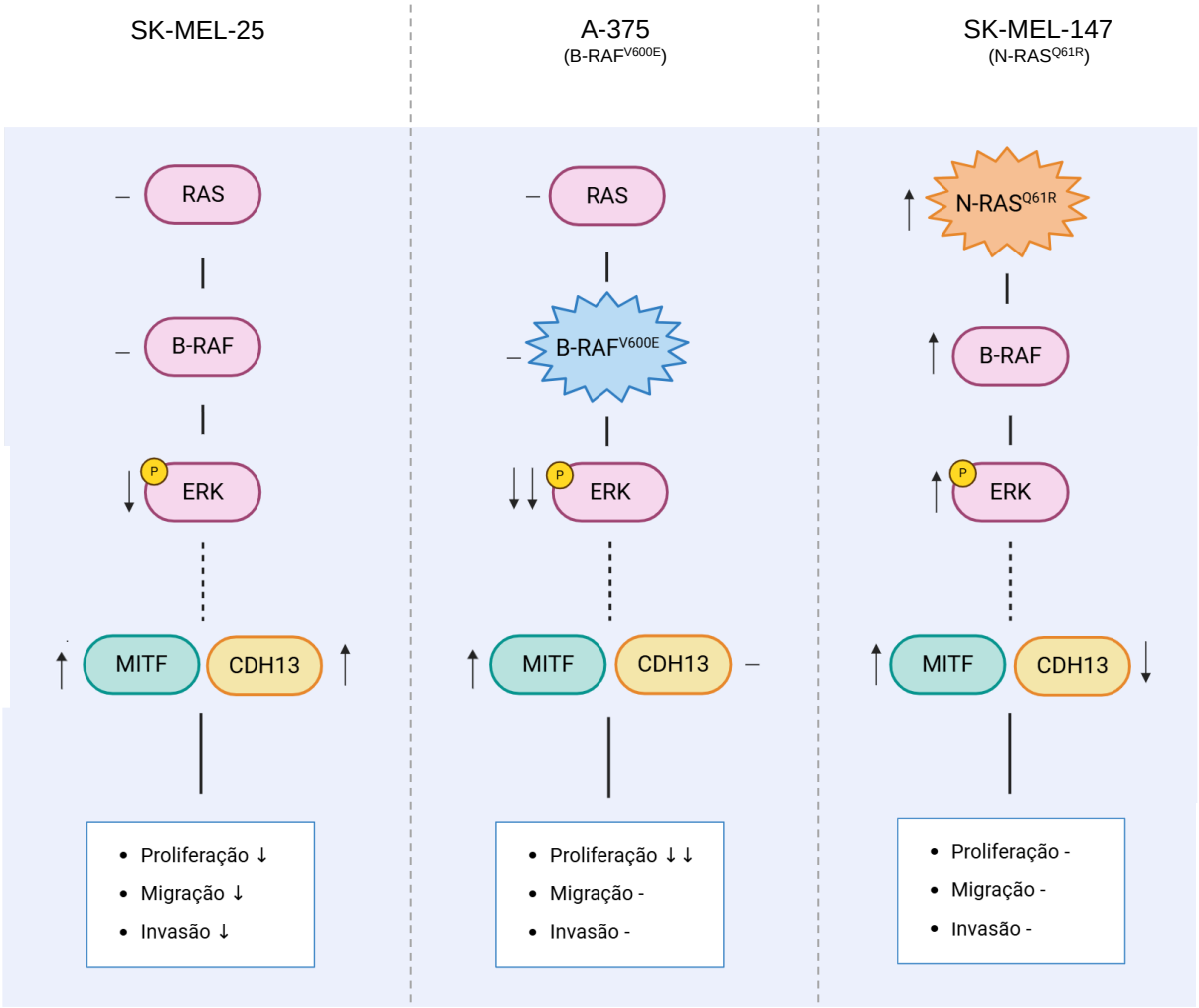
Na linhagem SK-MEL-147 contendo a mutação N-RAS^{Q61R} o peptídeo não apresentou efeito significativo na proliferação celular, formação de colônias, migração e invasão. Isto pode sugerir que a influência do peptídeo dependa da presença de RAS em sua forma selvagem. Além disso, ao avaliar o efeito do peptídeo E12F na expressão de proteínas da via MAPK observou-se um aumento na expressão de RAS e B-RAF, bem como um aumento na ativação de ERK. Assim como um aumento na expressão de MITF e diminuição na expressão de CDH13.

Esse comportamento observado em células mutantes de N-RAS já foi extensivamente descrito na literatura ao utilizar moléculas que apresentam efeito inibitória da via MAPK. Efeitos semelhantes foram registrados com o uso de inibidores de B-RAF como vemurafenibe, dabrafenibe e encorafenibe quando aplicados em monoterapia em células que contém mutações em RAS mutantes ou que apresentam N-RAS e B-RAF em seu formato selvagem (POULIKAKOS *et al.*, 2010; HEIDORN *et al.*, 2010; STONES *et al.*, 2013; GIBNEY *et al.*, 2013; ADELMANN *et al.*, 2016; DORARD *et al.*, 2017). Esse tipo de efeito ocorre quando a inibição de B-RAF nestas células induz uma atividade compensatória, resultando na formação de heterodímeros entre B-RAF e C-RAF, paradoxalmente favorecendo a progressão tumoral ao invés de inibi-la (FATEEVA; EDDY; CHEN, 2024; RANDIC *et al.*, 2021). Além de sua influência na via de sinalização MAPK, RAS também é capaz de regular e compensar sua atividade através de *crosstalk* com a via PI3K/AKT/mTOR, mantendo assim sua funcionalidade (MUÑOZ-COUSELO *et al.*, 2017; BAHAR; KIM; KIM, 2023).

Para expandir os possíveis efeitos do E12F o teste de exclusão de azul de tripan foi conduzido associando o E12F com os inibidores de proteína quinase sorafenibe e vemurafenibe. Observou-se que a combinação do peptídeo E12F com esses inibidores nas linhagens SK-MEL-25 e A-375 apresentou um efeito sinérgico em comparação ao efeito isolado dos inibidores. O uso de monoterapia com inibidores de proteína quinase não trouxeram benefícios expressivos em termos de sobrevida a longo prazo em casos avançados, principalmente devido ao frequente desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Diante disso, foi implementada a combinação entre inibidores de proteína quinase visando afetar simultaneamente múltiplos alvos, reduzindo a probabilidade de escape terapêutico e reativação da via MAPK, frequentemente observada em monoterapias (HAARBERG; SMALLEY, 2014; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; DORARD *et al.*, 2017; PATEL *et al.*, 2020; BAHAR; KIM; KIM, 2023; FATEEVA; EDDY; CHEN, 2024). Sinergismo também foi observado ao combinar o inibidor de ERK (BVD-523) com os inibidores de B-RAF dabrafenibe e vemurafenibe em células A-375 (GERMANN *et al.*, 2017). Assim como ao combinar sorafenibe e vemurafenibe em células A-375 e A-375Res (resistentes ao vemurafenibe) (MOORTHY, 2019).

Os resultados mostram que o E12F apresenta efeito na via MAPK, assim como pode modular a expressão de MITF e CDH13 nas linhagens SK-MEL-25, A-375 e SK-MEL-147 (Figura 20) Além disso, os dados obtidos até agora ainda não são conclusivos para delinear com precisão o mecanismo de ação do peptídeo. Para obter resultados mais descritivos na análise comparativa do efeito do peptídeo pretendemos realizar a caracterização da linhagem SK-MEL-25, análises de ciclo celular e RNA-seq.

Figura 20 – Resumo gráfico da atividade do peptídeo E12F em células de melanoma humano.



Resumo gráfico do efeito do peptídeo E12F entre diferentes linhagens de melanoma (SK-MEL-25, A-375, e SK-MEL-147) com mutações distintas. Em células SK-MEL-25, supostamente N-RAS/B-RAF selvagem, o peptídeo diminuiu a ativação de ERK, aumentou os níveis de MITF e aumentou os de CDH13, resultando na diminuição da proliferação, migração e invasão. Na linhagem A-375, com a mutação B-RAF^{V600E}, o peptídeo provocou redução na ativação de ERK, aumento na expressão de MITF sem apresentar alterações nos níveis de CDH13, levando à redução da proliferação sem impactar migração e invasão. Já na linhagem SK-MEL-147, com a mutação N-RAS^{Q61R}, exibiu aumento na expressão de RAS, B-RAF e na ativação de ERK, assim como um aumento dos níveis de MITF e diminuição de CDH13, sem apresentar alterações significativas na proliferação, invasão ou migração. As setas indicam aumento (↑), redução (↓) ou ausência de alteração (–) nas vias e mecanismos celulares analisados.

6. CONCLUSÕES

Em células SK-MEL-25, o peptídeo E12F não diminuiu a proliferação celular em até 96 h de tratamento, no entanto o peptídeo foi capaz de diminuir a formação de colônias após 7 dias de tratamento com o peptídeo. Além disso, o E12F inibiu a migração e invasão celular, possivelmente por meio da diminuição da ativação de ERK e da modulação de MITF e CDH13. Na linhagem A-375 que apresenta a mutação B-RAF^{V600E} o peptídeo diminuiu a proliferação celular a partir de 48 h, provavelmente também devido à redução da ativação de ERK e à modulação de MITF, mas não apresentou efeitos significativos sobre a migração, invasão celular ou expressão de CDH13. Já na linhagem SK-MEL-147, que contém a mutação N-RAS^{Q61R}, o peptídeo não mostrou efeitos na proliferação, migração ou invasão celular e pareceu exercer um efeito paradoxal nesta linhagem aumentando a atividade de ERK e a expressão de MITF, enquanto diminuía a expressão de CDH13.

Adicionalmente, ao combinar o peptídeo E12F com sorafenibe e vemurafenibe, observou-se um aumento do efeito antitumoral em comparação com o tratamento isolado com os inibidores de proteína quinase, tanto em células SK-MEL-25 quanto em A-375. Esses resultados sugerem que o E12F pode ser uma molécula promissora para aprofundar a compreensão das vias de sinalização no melanoma e para o desenvolvimento de novas terapias.

REFERÊNCIAS

ADELMANN, C. H.; CHING, G.; DU, L.; SAPORITO, R. C.; BANSAL, V.; PENCE, L. J.; LIANG, R.; LEE, W.; TSAI, K. Y. Comparative Profiles of BRAF Inhibitors: The Paradox Index as a Predictor of Clinical Toxicity. **Oncotarget**, v. 7, n. 21, p. 30453–30460, 24 maio 2016.

AL MAHI, A.; ABLAIN, J. RAS Pathway Regulation in Melanoma. **Disease Models & Mechanisms**, v. 15, n. 2, p. dmm049229, 1 fev. 2022.

AL-AZZAWI, S.; MASHETA, D.; GUILDFORD, A.; PHILLIPS, G.; SANTIN, M. Designing and Characterization of a Novel Delivery System for Improved Cellular Uptake by Brain Using Dendronised Apo-E-Derived Peptide. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 49, 26 mar. 2019.

ANASTÁCIO, Juliana Machado. **Peptídeo C15D derivado do fator de transcrição BRN2 interfere no ciclo celular em células de melanoma murino B16F10-Nex2**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2021.

APLIN, A. E.; KAPLAN, F. M.; SHAO, Y. Mechanisms of Resistance to RAF Inhibitors in Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 9, p. 1817–1820, set. 2011.

AROZARENA, I.; SANCHEZ-LAORDEN, B.; PACKER, L.; HIDALGO-CARCEDO, C.; HAYWARD, R.; VIROS, A.; SAHAI, E.; MARAIS, R. Oncogenic BRAF Induces Melanoma Cell Invasion by Downregulating the cGMP-Specific Phosphodiesterase PDE5A. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 45–57, jan. 2011.

ARRUDA, D. C.; SANTOS, L. C. P.; MELO, F. M.; PEREIRA, F. V.; FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; MORTARA, R. A.; JULIANO, M. A.; RODRIGUES, E. G.; DOBROFF, A. S.; POLONELLI, L.; TRAVASSOS, L. R. β-Actin-Binding Complementarity-Determining Region 2 of Variable Heavy Chain from Monoclonal Antibody C7 Induces Apoptosis in Several Human Tumor Cells and Is Protective against Metastatic Melanoma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 18, p. 14912–14922, abr. 2012.

ASCIERTO, P. A.; KIRKWOOD, J. M.; GROB, J.-J.; SIMEONE, E.; GRIMALDI, A. M.; MAIO, M.; PALMIERI, G.; TESTORI, A.; MARINCOLA, F. M.; MOZZILLO, N. The Role of BRAF V600 Mutation in Melanoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 85, dez. 2012.

ASCIERTO, P. A.; MCARTHUR, G. A.; DRÉNO, B.; ATKINSON, V.; LISZKAY, G.; DI GIACOMO, A. M.; MANDALÀ, M.; DEMIDOV, L.; STROYAKOVSKIY, D.; THOMAS, L.; DE LA CRUZ-MERINO, L.; DUTRIAUX, C.; GARBE, C.; YAN, Y.; WONGCHENKO, M.; CHANG, I.; HSU, J. J.; KORALEK, D. O.; ROONEY, I.; RIBAS, A.; LARKIN, J. Cobimetinib Combined with Vemurafenib in Advanced BRAFV600-Mutant Melanoma (coBRIM): Updated Efficacy Results from a Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 9, p. 1248–1260, set. 2016.

BAHAR, M. E.; KIM, H. J.; KIM, D. R. Targeting the RAS/RAF/MAPK Pathway for Cancer Therapy: From Mechanism to Clinical Studies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 455, 18 dez. 2023.

BARBATO, M. I.; NASHED, J.; BRADFORD, D.; REN, Y.; KHASAR, S.; MILLER, C. P.; ZOLNIK, B. S.; ZHAO, H.; LI, Y.; BI, Y.; SHORD, S. S.; AMATYA, A. K.; MISHRA-KALYANI, P. S.; SCEPURA, B.; AL-MATARI, R. A.; PAZDUR, R.; KLUETZ, P. G.; DONOGHUE, M.; SINGH, H.; DREZNER, N. FDA Approval Summary: Dabrafenib in Combination with Trametinib for *BRAF* V600E Mutation–Positive Low-Grade Glioma. **Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 2, p. 263–268, 17 jan. 2024.

BHAGWAT, S. V.; MCMILLEN, W. T.; CAI, S.; ZHAO, B.; WHITESELL, M.; SHEN, W.; KINDLER, L.; FLACK, R. S.; WU, W.; ANDERSON, B.; ZHAI, Y.; YUAN, X.-J.; POGUE, M.; VAN HORN, R. D.; RAO, X.; MCCANN, D.; DROPSEY, A. J.; MANRO, J.; WALGREN, J.; YUEN, E.; RODRIGUEZ, M. J.; PLOWMAN, G. D.; TIU, R. V.; JOSEPH, S.; PENG, S.-B. ERK Inhibitor LY3214996 Targets ERK Pathway–Driven Cancers: A Therapeutic Approach Toward Precision Medicine. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 325–336, 1 fev. 2020.

BIDWELL, G. L.; PERKINS, E.; HUGHES, J.; KHAN, M.; JAMES, J. R.; RAUCHER, D. Thermally Targeted Delivery of a C-Myc Inhibitory Polypeptide Inhibits Tumor Progression and Extends Survival in a Rat Glioma Model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55104, 25 jan. 2013.

BOLLAG, G.; TSAI, J.; ZHANG, J.; ZHANG, C.; IBRAHIM, P.; NOLOP, K.; HIRTH, P. Vemurafenib: The First Drug Approved for BRAF-Mutant Cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 11, p. 873–886, nov. 2012.

BONVIN, E.; FALLETTA, P.; SHAW, H.; DELMAS, V.; GODING, C. R. A Phosphatidylinositol 3-Kinase–Pax3 Axis Regulates Brn-2 Expression in Melanoma. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 22, p. 4674–4683, 1 nov. 2012.

BOUTROS, A.; CARLINO, M. S.; MENZIES, A. M. Melanoma medicine: New drugs for melanoma and the role of the general practitioner. **Australian Journal of General Practice**, v. 53, n. 9, p. 619–624, 1 set. 2024.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Consultas Anvisa - Medicamentos** - Nexavar. 2025a. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/560240?nomeProduto=Nexavar>. Acesso em: 11 fev. 2025.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Consultas Anvisa - Medicamentos** - Zelboraf. 2025b. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/780870?numeroRegistro=101000656>. Acesso em: 11 fev. 2025.

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN

Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, maio 2024.

BRIVANLOU, A. H.; DARNELL, J. E. Signal Transduction and the Control of Gene Expression. **Science**, v. 295, n. 5556, p. 813–818, fev. 2002.

BU, H.; LAN, X.; Haojie; PEI, C.; OUYANG, M.; CHEN, Y.; HUANG, X.; YU, L.; TAN, Y. Development of an Interfering Peptide M1-20 with Potent Anti-Cancer Effects by Targeting FOXM1. **Cell Death & Disease**, v. 14, n. 8, p. 533, 19 ago. 2023.

BUCHBINDER, E. I.; COHEN, J. V.; TARANTINO, G.; LIAN, C. G.; LIU, D.; HAQ, R.; HODI, F. S.; LAWRENCE, D. P.; GIOBBIE-HURDER, A.; KNOERZER, D.; SULLIVAN, R. J. A Phase II Study of ERK Inhibition by Ulixertinib (BVD-523) in Metastatic Uveal Melanoma. **Cancer Research Communications**, v. 4, n. 5, p. 1321–1327, 21 maio 2024.

BUSHWELLER, J. H. Targeting Transcription Factors in Cancer — from Undruggable to Reality. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 11, p. 611–624, nov. 2019.

CABOS-SIGUIER, B.; STEUNOU, A.-L.; JOSEPH, G.; ALAZARD, R.; DUCOUX-PETIT, M.; NIETO, L.; MONSARRAT, B.; ERARD, M.; CLOTTES, E. Expression and Purification of Human Full-Length N Oct-3, a Transcription Factor Involved in Melanoma Growth. **Protein Expression and Purification**, v. 64, n. 1, p. 39–46, mar. 2009.

CARREIRA, S.; GOODALL, J.; AKSAN, I.; LA ROCCA, S. A.; GALIBERT, M.-D.; DENAT, L.; LARUE, L.; GODING, C. R. Mitf Cooperates with Rb1 and Activates p21Cip1 Expression to Regulate Cell Cycle Progression. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 764–769, fev. 2005.

CENTENO, P. P.; PAVET, V.; MARAIS, R. The Journey from Melanocytes to Melanoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 23, n. 6, p. 372–390, jun. 2023.

CERIONE, R. A. Cell Signaling. **Cell**, v. 103, n. 4, p. 555–556, nov. 2000.

CESAR, Maria Carolina Mariano. **Determinação dos mecanismos de internalização e da inibição da invasão celular induzida por peptídeos derivados de BRN2**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2020.

CESAR, Maria Carolina Mariano. **Análise do efeito antitumoral do peptídeo C9k e da bixina em células de melanoma**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2024.

CESAR, M. C. M.; MORTARA, R. A.; SOUZA, V. S.; ALVES, V. R. G.; PASCHOALIN, T.; SOUFEN, M. A.; DE FREITAS, G. M.; DA CUNHA, F. F. M.; TADA, D. B.; DOBROFF, A. S.; ARRUDA, D. C. Peptide L13S Derived from the BRN2 POU Domain Reduces Metastasis *In Vivo* and Inhibits Cell Migration and Invasion *In Vitro*. **Anticancer Research**, v. 44, n. 1, p. 71–84, jan. 2024.

CHANG, C.-M.; CHANG, C.-C.; LAM, H. Y. P.; PENG, S.-Y.; LAI, Y.-H.; HSIANG, B.-D.; LIAO, Y.-Y.; HSU, H.-J.; JIANG, S.-J. Therapeutic Peptide RF16 Derived from

CXCL8 Inhibits MDA-MB-231 Cell Invasion and Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14029, 13 set. 2023.

CHAPMAN, P. B.; HAUSCHILD, A.; ROBERT, C.; HAANEN, J. B.; ASCIERTO, P.; LARKIN, J.; DUMMER, R.; GARBE, C.; TESTORI, A.; MAIO, M.; HOGG, D.; LORIGAN, P.; LEBBE, C.; JOUARY, T.; SCHADENDORF, D.; RIBAS, A.; O'DAY, S. J.; SOSMAN, J. A.; KIRKWOOD, J. M.; EGGERMONT, A. M. M.; DRENO, B.; NOLOP, K.; LI, J.; NELSON, B.; HOU, J.; LEE, R. J.; FLAHERTY, K. T.; MCARTHUR, G. A. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2507–2516, 30 jun. 2011.

CHAUHAN, J. S.; HÖLZEL, M.; LAMBERT, J.; BUFFA, F. M.; GODING, C. R. The MITF Regulatory Network in Melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 35, n. 5, p. 517–533, set. 2022.

CHENG, H.; YUAN, J.; PEI, C.; OUYANG, M.; BU, H.; CHEN, Y.; HUANG, X.; ZHANG, Z.; YU, L.; TAN, Y. The Development of an Anti-Cancer Peptide M1-21 Targeting Transcription Factor FOXM1. **Cell & Bioscience**, v. 13, n. 1, p. 114, 21 jun. 2023.

COOK, A. L.; STURM, R. A. POU Domain Transcription Factors: BRN2 as a Regulator of Melanocytic Growth and Tumourigenesis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 6, p. 611–626, dez. 2008.

CRAIK, D. J.; FAIRLIE, D. P.; LIRAS, S.; PRICE, D. The Future of Peptide-based Drugs. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, n. 1, p. 136–147, jan. 2013.

CROWLEY, L. C.; SCOTT, A. P.; MARFELL, B. J.; BOUGHABA, J. A.; CHOJNOWSKI, G.; WATERHOUSE, N. J. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, p. pdb.prot087163, jul. 2016.

DA CUNHA, F. F. M.; MUGNOL, K. C. U.; DE MELO, F. M.; NASCIMENTO, M. V. S. Q.; DE AZEVEDO, R. A.; SANTOS, R. T. S.; MAGALHÃES, J. A.; MIGUEL, D. C.; TADA, D. B.; MORTARA, R. A.; TRAVASSOS, L. R.; ARRUDA, D. C. Peptide R18H from BRN2 Transcription Factor POU Domain Displays Antitumor Activity In Vitro and In Vivo and Induces Apoptosis in B16F10-Nex2 Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 389–401, 25 jun. 2019.

DAS, S.; KUNDU, M.; JENA, B. C.; MANDAL, M. Causes of cancer: physical, chemical, biological carcinogens, and viruses. In: KUNDU, Subhas C.; REIS, Rui L. **Biomaterials for 3D Tumor Modeling.** Amsterdã: Elsevier, 2020. p.607–p.641.

DAVIS, L. E.; SHALIN, S. C.; TACKETT, A. J. Current State of Melanoma Diagnosis and Treatment. **Cancer Biology & Therapy**, v. 20, n. 11, p. 1366–1379, 2 nov. 2019.

DILSHAT, R.; FOCK, V.; KENNY, C.; GERRITSEN, I.; LASSEUR, R. M. J.; TRAVNICKOVA, J.; EICHHOFF, O. M.; CERNY, P.; MÖLLER, K.; SIGURBJÖRNSDÓTTIR, S.; KIRTY, K.; EINARSDOTTIR, B. Ó.; CHENG, P. F.; LEVESQUE, M.; CORNELL, R. A.; PATTON, E. E.; LARUE, L.; DE TAYRAC, M.;

MAGNÚSDÓTTIR, E.; ÖGMUNDSDÓTTIR, M. H.; STEINGRIMSSON, E. MITF Reprograms the Extracellular Matrix and Focal Adhesion in Melanoma. **eLife**, v. 10, p. e63093, 13 jan. 2021.

DO VALE COELHO, I. E.; ARRUDA, D. C.; TARANTO, A. G. In Silico Studies of the Interaction between BRN2 Protein and MORE DNA. **Journal of Molecular Modeling**, v. 22, n. 9, p. 228, set. 2016.

DOBROFF, A. S.; RODRIGUES, E. G.; MORAES, J. Z.; TRAVASSOS, L. R. Protective, Anti-Tumor Monoclonal Antibody Recognizes a Conformational Epitope Similar to Melibiose at the Surface of Invasive Murine Melanoma Cells. **Hybridoma and Hybridomics**, v. 21, n. 5, p. 321–331, out. 2002.

DORARD, C.; ESTRADA, C.; BARBOTIN, C.; LARCHER, M.; GARANCHER, A.; LELOUP, J.; BEERMANN, F.; BACCARINI, M.; POUPONNOT, C.; LARUE, L.; EYCHÈNE, A.; DRUILLENNEC, S. RAF Proteins Exert Both Specific and Compensatory Functions during Tumour Progression of NRAS-Driven Melanoma. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15262, 12 maio 2017.

DRAPPATZ, J.; BRENNER, A.; WONG, E. T.; EICHLER, A.; SCHIFF, D.; GROVES, M. D.; MIKKELSEN, T.; ROSENFELD, S.; SARANTOPOULOS, J.; MEYERS, C. A.; FIELDING, R. M.; ELIAN, K.; WANG, X.; LAWRENCE, B.; SHING, M.; KELSEY, S.; CASTAIGNE, J. P.; WEN, P. Y. Phase I Study of GRN1005 in Recurrent Malignant Glioma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 6, p. 1567–1576, 15 mar. 2013.

EISEN, T.; AHMAD, T.; FLAHERTY, K. T.; GORE, M.; KAYE, S.; MARAIS, R.; GIBBENS, I.; HACKETT, S.; JAMES, M.; SCHUCHTER, L. M.; NATHANSON, K. L.; XIA, C.; SIMANTOV, R.; SCHWARTZ, B.; POULIN-COSTELLO, M.; O'DWYER, P. J.; RATAIN, M. J. Sorafenib in Advanced Melanoma: A Phase II Randomised Discontinuation Trial Analysis. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 5, p. 581–586, set. 2006.

ELLMANN, L.; JOSHI, M. B.; RESINK, T. J.; BOSSERHOFF, A. K.; KUPHAL, S. BRN2 Is a Transcriptional Repressor of CDH13 (T-Cadherin) in Melanoma Cells. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 12, p. 1788–1800, dez. 2012.

ESTRADA, C.; MIRABAL-ORTEGA, L.; MÉRY, L.; DINGLI, F.; BESSE, L.; MESSAOUDI, C.; LOEW, D.; POUPONNOT, C.; BERTOLOTTO, C.; EYCHÈNE, A.; DRUILLENNEC, S. MITF Activity Is Regulated by a Direct Interaction with RAF Proteins in Melanoma Cells. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 101, 28 jan. 2022.

FANE, M. E.; CHHABRA, Y.; HOLLINGSWORTH, D. E. J.; SIMMONS, J. L.; SPOERRI, L.; OH, T. G.; CHAUHAN, J.; CHIN, T.; HARRIS, L.; HARVEY, T. J.; MUSCAT, G. E. O.; GODING, C. R.; STURM, R. A.; HAASS, N. K.; BOYLE, G. M.; PIPER, M.; SMITH, A. G. NFIB Mediates BRN2 Driven Melanoma Cell Migration and Invasion Through Regulation of EZH2 and MITF. **EBioMedicine**, v. 16, p. 63–75, fev. 2017.

FARES, J.; FARES, M. Y.; KHACHFE, H. H.; SALHAB, H. A.; FARES, Y. Molecular Principles of Metastasis: A Hallmark of Cancer Revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 28, 12 mar. 2020.

FATEEVA, A.; EDDY, K.; CHEN, S. Current State of Melanoma Therapy and Next Steps: Battling Therapeutic Resistance. **Cancers**, v. 16, n. 8, p. 1571, 19 abr. 2024.

FERRAZ, L. S.; COSTA, R. T. D.; COSTA, C. A. D.; RIBEIRO, C. A. J.; ARRUDA, D. C.; MARIA-ENGLER, S. S.; RODRIGUES, T. Targeting Mitochondria in Melanoma: Interplay between MAPK Signaling Pathway and Mitochondrial Dynamics. **Biochemical Pharmacology**, v. 178, p. 114104, ago. 2020.

FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; AZEVEDO, R. A.; MASSAOKA, M. H.; GIROLA, N.; POLONELLI, L.; TRAVASSOS, L. R. A Novel Microtubule De-Stabilizing Complementarity-Determining Region C36L1 Peptide Displays Antitumor Activity against Melanoma in Vitro and in Vivo. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14310, 22 set. 2015.

FLAHERTY, K. T.; LEE, S. J.; ZHAO, F.; SCHUCHTER, L. M.; FLAHERTY, L.; KEFFORD, R.; ATKINS, M. B.; LEMING, P.; KIRKWOOD, J. M. Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel with or Without Sorafenib in Metastatic Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 3, p. 373–379, 20 jan. 2013.

FLAHERTY, K. T.; PUZANOV, I.; KIM, K. B.; RIBAS, A.; MCARTHUR, G. A.; SOSMAN, J. A.; O'DWYER, P. J.; LEE, R. J.; GRIPPO, J. F.; NOLOP, K.; CHAPMAN, P. B. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 9, p. 809–819, 26 ago. 2010.

FLAHERTY, Keith. T.; YASOTHAN, U.; KIRKPATRICK, P. Vemurafenib. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 11, p. 811–812, nov. 2011.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic Assay of Cells in Vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, dez. 2006.

GARRALDA, E.; BEAULIEU, M.-E.; MORENO, V.; CASACUBERTA-SERRA, S.; MARTÍNEZ-MARTÍN, S.; FORADADA, L.; ALONSO, G.; MASSÓ-VALLÉS, D.; LÓPEZ-ESTÉVEZ, S.; JAUSET, T.; CORRAL DE LA FUENTE, E.; DOGER, B.; HERNÁNDEZ, T.; PEREZ-LOPEZ, R.; ARQUÉS, O.; CASTILLO CANO, V.; MORALES, J.; WHITFIELD, J. R.; NIEWEL, M.; SOUCEK, L.; CALVO, E. MYC Targeting by OMO-103 in Solid Tumors: A Phase 1 Trial. **Nature Medicine**, v. 30, n. 3, p. 762–771, mar. 2024.

GERMANN, U. A.; FUREY, B. F.; MARKLAND, W.; HOOVER, R. R.; ARONOV, A. M.; ROIX, J. J.; HALE, M.; BOUCHER, D. M.; SORRELL, D. A.; MARTINEZ-BOTELLA, G.; FITZGIBBON, M.; SHAPIRO, P.; WICK, M. J.; SAMADANI, R.; MESHAW, K.; GROOVER, A.; DECRESCENZO, G.; NAMCHUK, M.; EMERY, C. M.; SAHA, S.; WELSCH, D. J. Targeting the MAPK Signaling Pathway in Cancer: Promising Preclinical Activity with the Novel Selective ERK1/2 Inhibitor BVD-523 (Ulixertinib). **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 11, p. 2351–2363, 1 nov. 2017.

GHALY, G.; TALLIMA, H.; DABBISH, E.; BADR ELDIN, N.; ABD EL-RAHMAN, M. K.; IBRAHIM, M. A. A.; SHOEIB, T. Anti-Cancer Peptides: Status and Future Prospects. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1148, 23 jan. 2023.

GIBNEY, G. T.; MESSINA, J. L.; FEDORENKO, I. V.; SONDAK, V. K.; SMALLEY, K. S. M. Paradoxical Oncogenesis—the Long-Term Effects of BRAF Inhibition in Melanoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 7, p. 390–399, jul. 2013.

GODING, C. R.; ARNHEITER, H. MITF—the First 25 Years. **Genes & Development**, v. 33, n. 15–16, p. 983–1007, 1 ago. 2019.

GOODALL, J.; CARREIRA, S.; DENAT, L.; KOBI, D.; DAVIDSON, I.; NUCIFORO, P.; STURM, R. A.; LARUE, L.; GODING, C. R. Brn-2 Represses Microphthalmia-Associated Transcription Factor Expression and Marks a Distinct Subpopulation of Microphthalmia-Associated Transcription Factor–Negative Melanoma Cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, p. 7788–7794, 1 out. 2008.

GOODALL, J.; MARTINOZZI, S.; DEXTER, T. J.; CHAMPEVAL, D.; CARREIRA, S.; LARUE, L.; GODING, C. R. Brn-2 Expression Controls Melanoma Proliferation and Is Directly Regulated by β-Catenin. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 7, p. 2915–2922, 1 abr. 2004a.

GOODALL, J.; WELLBROCK, C.; DEXTER, T. J.; ROBERTS, K.; MARAIS, R.; GODING, C. R. The Brn-2 Transcription Factor Links Activated BRAF to Melanoma Proliferation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 7, p. 2923–2931, 1 abr. 2004b.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma Biology and New Targeted Therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 22 fev. 2007.

HAARBERG, H. E.; SMALLEY, K. S. M. Resistance to Raf Inhibition in Cancer. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 27–32, mar. 2014.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 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, mar. 2011.

HARTMAN, M. L.; CZYZ, M. MITF in Melanoma: Mechanisms behind Its Expression and Activity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 7, p. 1249–1260, abr. 2015.

HASSKARL, J. Sorafenib. *Em*: MARTENS, U. M. **Small Molecules in Oncology**. Recent Results in Cancer Research. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 61–70.

HEIDORN, S. J.; MILAGRE, C.; WHITTAKER, S.; NOURRY, A.; NICULESCU-DUVAS, I.; DHOMEN, N.; HUSSAIN, J.; REIS-FILHO, J. S.; SPRINGER, C. J.;

PRITCHARD, C.; MARAIS, R. Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 209–221, jan. 2010.

HENLEY, M. J.; KOEHLER, A. N. Advances in Targeting 'Undruggable' Transcription Factors with Small Molecules. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 669–688, set. 2021.

HERBERT, K.; BINET, R.; LAMBERT, J.-P.; LOUPHRASITTHIPHOL, P.; KALKAVAN, H.; SESMA-SANZ, L.; ROBLES-ESPINOZA, C. D.; SARKAR, S.; SUER, E.; ANDREWS, S.; CHAUHAN, J.; ROBERTS, N. D.; MIDDLETON, M. R.; GINGRAS, A.-C.; MASSON, J.-Y.; LARUE, L.; FALLETTA, P.; GODING, C. R. BRN2 Suppresses Apoptosis, Reprograms DNA Damage Repair, and Is Associated with a High Somatic Mutation Burden in Melanoma. **Genes & Development**, v. 33, n. 5–6, p. 310–332, 1 mar. 2019.

HERR, W.; STURM, R. A.; CLERC, R. G.; CORCORAN, L. M.; BALTIMORE, D.; SHARP, P. A.; INGRAHAM, H. A.; ROSENFELD, M. G.; FINNEY, M.; RUVKUN, G. The POU Domain: A Large Conserved Region in the Mammalian Pit-1, Oct-1, Oct-2, and Caenorhabditis Elegans Unc-86 Gene Products. **Genes & Development**, v. 2, n. 12a, p. 1513–1516, 1 dez. 1988.

HSIEH, M.; HSU, S.-K.; LIU, T.-Y.; WU, C.-Y.; CHIU, C.-C. Melanoma Biology and Treatment: A Review of Novel Regulated Cell Death-Based Approaches. **Cancer Cell International**, v. 24, n. 1, p. 63, 9 fev. 2024.

INAMOTO, I.; SHIN, J. A. Peptide Therapeutics That Directly Target Transcription Factors. **Peptide Science**, v. 111, n. 1, p. e24048, jan. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. *E-book*. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf. Acesso em: 11 fev. 2025.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Estimated number of new cases from 2022 to 2045, Both sexes, age [0-85+]**. 2022 Disponível em: https://gco.iarc.who.int/tomorrow/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=16&types=1 Acesso em: 14 ago. 2024a.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Estimated number of deaths from 2022 to 2045, Both sexes, age [0-85+]**. 2022. Disponível em: https://gco.iarc.who.int/tomorrow/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=16&types=1.Acesso em: 14 ago. 2024b.

KORTUM, R. L.; MORRISON, D. K. Path Forward for RAF Therapies: Inhibition of Monomers and Dimers. **Cancer Cell**, v. 28, n. 3, p. 279–281, set. 2015.

KUPHAL, S.; MARTYN, A. C.; PEDLEY, J.; CROWTHER, L. M.; BONAZZI, V. F.; PARSONS, P. G.; BOSSERHOFF, A. K.; HAYWARD, N. K.; BOYLE, G. M. H-Cadherin Expression Reduces Invasion of Malignant Melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 22, n. 3, p. 296–306, jun. 2009.

KYRYLKOVA, K.; KYRYACHENKO, S.; LEID, M.; KIOUSSI, C. Detection of Apoptosis by TUNEL Assay. *Em*: KIOUSSI, C. **Odontogenesis**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p. 41–47.

LAMBERT, S. A.; JOLMA, A.; CAMPITELLI, L. F.; DAS, P. K.; YIN, Y.; ALBU, M.; CHEN, X.; TAIPALE, J.; HUGHES, T. R.; WEIRAUCH, M. T. The Human Transcription Factors. **Cell**, v. 175, n. 2, p. 598–599, out. 2018.

LARKIN, J. M. G.; YAN, Y.; MCARTHUR, G. A.; ASCIERTO, P. A.; LISZKAY, G.; MAIO, M.; MANDALÀ, M.; DEMIDOV, L. V.; STROYAKOVSKIY, D.; THOMAS, L.; DE LA CRUZ-MERINO, L.; ATKINSON, V.; DUTRIAUX, C.; GARBE, C.; WONGCHENKO, M.; ROONEY, I. A.; CHANG, I.; HACK, S. P.; DRÉNO, B.; RIBAS, A. Update of Progression-Free Survival (PFS) and Correlative Biomarker Analysis from coBRIM: Phase III Study of Cobimetinib (Cobi) plus Vemurafenib (Vem) in Advanced *BRAF* -Mutated Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 15_suppl, p. 9006–9006, 20 maio 2015.

LEE, T. I.; YOUNG, R. A. Transcriptional Regulation and Its Misregulation in Disease. **Cell**, v. 152, n. 6, p. 1237–1251, mar. 2013.

LOBO, J.; GILLIS, A. J. M.; JERÓNIMO, C.; HENRIQUE, R.; LOOIJENGA, L. H. J. Human Germ Cell Tumors Are Developmental Cancers: Impact of Epigenetics on Pathobiology and Clinic. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 258, 10 jan. 2019.

LOERCHER, A. E.; TANK, E. M. H.; DELSTON, R. B.; HARBOUR, J. W. MITF Links Differentiation with Cell Cycle Arrest in Melanocytes by Transcriptional Activation of INK4A. **The Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 1, p. 35–40, 3 jan. 2005.

LORIGAN, P.; CORRIE, P.; CHAO, D.; NATHAN, P.; AHMAD, T.; MARAIS, R.; BURK, K.; ERLANDSSON, F.; GORE, M.; EISEN, T. Phase II Trial of Sorafenib Combined with Dacarbazine in Metastatic Melanoma Patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 18_suppl, p. 8012–8012, 20 jun. 2006.

LULLA, R. R.; GOLDMAN, S.; YAMADA, T.; BEATTIE, C. W.; BRESSLER, L.; PACINI, M.; POLLACK, I. F.; FISHER, P. G.; PACKER, R. J.; DUNKEL, I. J.; DHALL, G.; WU, S.; ONAR, A.; BOYETT, J. M.; FOULADI, M. Phase I Trial of P28 (NSC745104), a Non-HDM2-Mediated Peptide Inhibitor of P53 Ubiquitination in Pediatric Patients with Recurrent or Progressive Central Nervous System Tumors: A Pediatric Brain Tumor Consortium Study. **Neuro-Oncology**, v. 18, n. 9, p. 1319–1325, set. 2016.

MAIA, V. S. C.; BERZAGHI, R.; ARRUDA, D. C.; MACHADO, F. C.; LOUREIRO, L. L.; MELO, P. M. S.; MORAIS, A. S.; BUDU, A.; TRAVASSOS, L. R. PLP2-Derived Peptide Rb4 Triggers PARP-1-Mediated Necrotic Death in Murine Melanoma Cells. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2890, 21 fev. 2022.

MANGANA, J.; LEVESQUE, M. P.; KARPOVA, M. B.; DUMMER, R. Sorafenib in Melanoma. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 4, p. 557–568, abr. 2012.

MARCO RASTRELLI; SAVERIA TROPEA; CARLO RICCARDO ROSSI; MAURO ALAIBAC. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. **In Vivo**, v. 28, p. 1005–11, nov. 2014.

MASSAOKA, M. H.; MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; GIROLA, N.; FARIA, C. F.; AZEVEDO, R. A.; TRAVASSOS, L. R. A Novel Cell-penetrating Peptide Derived from WT1 Enhances P53 Activity, Induces Cell Senescence and Displays Antimelanoma Activity in Xeno- and Syngeneic Systems. **FEBS Open Bio**, v. 4, n. 1, p. 153–161, jan. 2014.

MCHUGH, M. L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. **Biochemia Medica**, p. 203–209, 2011.

MELNIKOVA, V. O.; BOLSHAKOV, S. V.; WALKER, C.; ANANTHASWAMY, H. N. Genomic Alterations in Spontaneous and Carcinogen-Induced Murine Melanoma Cell Lines. **Oncogene**, v. 23, n. 13, p. 2347–2356, 25 mar. 2004.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 6 jul. 2006.

MISHRA, P.; SINGH, U.; PANDEY, C.; MISHRA, P.; PANDEY, G. Application of Student's t-Test, Analysis of Variance, and Covariance. **Annals of Cardiac Anaesthesia**, v. 22, n. 4, p. 407, 2019.

MITTENDORF, E. A.; LU, B.; MELISKO, M.; PRICE HILLER, J.; BONDARENKO, I.; BRUNT, A. M.; SERGII, G.; PETRAKOVA, K.; PEOPLES, G. E. Efficacy and Safety Analysis of Nelipepimut-S Vaccine to Prevent Breast Cancer Recurrence: A Randomized, Multicenter, Phase III Clinical Trial. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 14, p. 4248–4254, 15 jul. 2019.

MIZUKOSHI, E.; NAKAGAWA, H.; TAMAI, T.; KITAHARA, M.; FUSHIMI, K.; NIO, K.; TERASHIMA, T.; IIDA, N.; ARAI, K.; YAMASHITA, T.; YAMASHITA, T.; SAKAI, Y.; HONDA, M.; KANEKO, S. Peptide Vaccine-Treated, Long-Term Surviving Cancer Patients Harbor Self-Renewing Tumor-Specific CD8+ T Cells. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 3123, 3 jun. 2022.

MOORTHY, A. Sorafenib Induces Synergistic Effect on Inhibition of Vemurafenib Resistant Melanoma Growth. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 193–202, 2019.

MOSCHOS, S. J.; SULLIVAN, R. J.; HWU, W.-J.; RAMANATHAN, R. K.; ADJEI, A. A.; FONG, P. C.; SHAPIRA-FROMMER, R.; TAWBI, H. A.; RUBINO, J.; RUSH, T. S.; ZHANG, D.; MISELIS, N. R.; SAMATAR, A. A.; CHUN, P.; RUBIN, E. H.; SCHILLER, J.; LONG, B. J.; DAYANANTH, P.; CARR, D.; KIRSCHMEIER, P.; BISHOP, W. R.; DENG, Y.; COOPER, A.; SHIPPS, G. W.; MORENO, B. H.; ROBERT, L.; RIBAS, A.; FLAHERTY, K. T. Development of MK-8353, an Orally Administered ERK1/2 Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors. **JCI Insight**, v. 3, n. 4, p. e92352, 22 fev. 2018.

MUÑOZ-COUSELO, E.; ZAMORA ADELANTADO, E.; ORTIZ VÉLEZ, C.; SOBERINO-GARCÍA, J.; PEREZ-GARCIA, J. M. NRAS-Mutant Melanoma: Current

Challenges and Future Prospect. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 3941–3947, ago. 2017.

NATARELLI, N.; ALEMAN, S. J.; MARK, I. M.; TRAN, J. T.; KWAK, S.; BOTTO, E.; AFLATOONI, S.; DIAZ, M. J.; LIPNER, S. R. A Review of Current and Pipeline Drugs for Treatment of Melanoma. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 2, p. 214, 7 fev. 2024.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic Instability — an Evolving Hallmark of Cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 220–228, mar. 2010.

NGEOW, K. C.; FRIEDRICHSEN, H. J.; LI, L.; ZENG, Z.; ANDREWS, S.; VOLPON, L.; BRUNSDON, H.; BERRIDGE, G.; PICAUD, S.; FISCHER, R.; LISLE, R.; KNAPP, S.; FILIPPAKOPOULOS, P.; KNOWLES, H.; STEINGRÍMSSON, E.; BORDEN, K. L. B.; PATTON, E. E.; GODING, C. R. BRAF/MAPK and GSK3 Signaling Converges to Control MITF Nuclear Export. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 37, 11 set. 2018. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1810498115>. Acesso em: 2 set. 2024.

NHÀN, N. T. T.; YAMADA, T.; YAMADA, K. H. Peptide-Based Agents for Cancer Treatment: Current Applications and Future Directions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 16, p. 12931, 18 ago. 2023.

OTT, P. A.; HAMILTON, A.; MIN, C.; SAFARZADEH-AMIRI, S.; GOLDBERG, L.; YOON, J.; YEE, H.; BUCKLEY, M.; CHRISTOS, P. J.; WRIGHT, J. J.; POLSKY, D.; OSMAN, I.; LIEBES, L.; PAVLICK, A. C. A Phase II Trial of Sorafenib in Metastatic Melanoma with Tissue Correlates. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15588, 29 dez. 2010.

PATEL, H.; YACOUB, N.; MISHRA, R.; WHITE, A.; YUAN, L.; ALANAZI, S.; GARRETT, J. T. Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 482, 19 fev. 2020.

PAVLICK, A; LIEBES, L; OSMAN, I; BROOKS, P; YEE, H; POLSKY, D; BUCKLEY, M; HAMILTON, A; WRIGHT, J; MUGGIA, F. Sorafenib down-regulation of the RAS/BRAF/MEK/MAPK pathway: clinical, pathologic and PET correlation. **Melanoma Research**, p. 96–97, set. 2006.

POULIKAKOS, P. I.; ZHANG, C.; BOLLAG, G.; SHOKAT, K. M.; ROSEN, N. RAF Inhibitors Transactivate RAF Dimers and ERK Signalling in Cells with Wild-Type BRAF. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 427–430, mar. 2010.

PROIETTI, I.; SKROZA, N.; MICHELINI, S.; MAMBRIN, A.; BALDUZZI, V.; BERNARDINI, N.; MARCHESIELLO, A.; TOLINO, E.; VOLPE, S.; MADDALENA, P.; DI FRAIA, M.; MANGINO, G.; ROMEO, G.; POTENZA, C. BRAF Inhibitors: Molecular Targeting and Immunomodulatory Actions. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1823, 7 jul. 2020.

RAM, A.; MURPHY, D.; DECUZZI, N.; PATANKAR, M.; HU, J.; PARGETT, M.; ALBECK, J. G. A Guide to ERK Dynamics, Part 2: Downstream Decoding. **Biochemical Journal**, v. 480, n. 23, p. 1909–1928, 13 dez. 2023.

RANDIC, T.; KOZAR, I.; MARGUE, C.; UTIKAL, J.; KREIS, S. NRAS Mutant Melanoma: Towards Better Therapies. **Cancer Treatment Reviews**, v. 99, p. 102238, set. 2021.

RANSCHT, B.; DOURS-ZIMMERMANN, M. T. T-Cadherin, a Novel Cadherin Cell Adhesion Molecule in the Nervous System Lacks the Conserved Cytoplasmic Region. **Neuron**, v. 7, n. 3, p. 391–402, set. 1991.

REISS, K. A.; FORDE, P. M.; BRAHMER, J. R. Harnessing the Power of the Immune System Via Blockade of PD-1 and PD-L1: A Promising New Anticancer Strategy. **Immunotherapy**, v. 6, n. 4, p. 459–475, abr. 2014.

RIBAS, A.; KIM, K. B.; SCHUCHTER, L. M.; GONZALEZ, R.; PAVLICK, A. C.; WEBER, J. S.; MCARTHUR, G. A.; HUTSON, T. E.; FLAHERTY, K. T.; MOSCHOS, S. J.; LAWRENCE, D. P.; HERSEY, P.; KEFFORD, R. F.; CHMIELOWSKI, B.; PUZANOV, I.; LI, J.; NOLOP, K. B.; LEE, R. J.; JOE, A. K.; SOSMAN, J. A. BRIM-2: An Open-Label, Multicenter Phase II Study of Vemurafenib in Previously Treated Patients with *BRAF* V600E Mutation-Positive Metastatic Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15_suppl, p. 8509–8509, 20 maio 2011.

ROBERT, C.; KARASZEWSKA, B.; SCHACHTER, J.; RUTKOWSKI, P.; MACKIEWICZ, A.; STROIAKOVSKI, D.; LICHINITSER, M.; DUMMER, R.; GRANGE, F.; MORTIER, L.; CHIARION-SILENI, V.; DRUCIS, K.; KRAJSOVA, I.; HAUSCHILD, A.; LORIGAN, P.; WOLTER, P.; LONG, G. V.; FLAHERTY, K.; NATHAN, P.; RIBAS, A.; MARTIN, A.-M.; SUN, P.; CRIST, W.; LEGOS, J.; RUBIN, S. D.; LITTLE, S. M.; SCHADENDORF, D. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 1, p. 30–39, 1 jan. 2015.

RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J.-L. Wound-Healing Assay. *Em*: GUAN, J.-L. **Cell Migration**. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 023–030.

ROUKOS, D. H. PLX4032 and Melanoma: Resistance, Expectations and Uncertainty. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 11, n. 3, p. 325–328, mar. 2011.

ROWSHANRAVAN, B.; HALLIDAY, N.; SANSOM, D. M. CTLA-4: A Moving Target in Immunotherapy. **Blood**, v. 131, n. 1, p. 58–67, 4 jan. 2018.

RUBINA, K.; SURKOVA, E.; SEMINA, E.; SYSOEVA, V.; KALININA, N.; POLIAKOV, A.; TRESHALINA, H.; TKACHUK, V. T-Cadherin Expression in Melanoma Cells Stimulates Stromal Cell Recruitment and Invasion by Regulating the Expression of Chemokines, Integrins and Adhesion Molecules. **Cancers**, v. 7, n. 3, p. 1349–1370, 21 jul. 2015.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From Melanocytes to Melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, jun. 2016.

SHI, H.; HUGO, W.; KONG, X.; HONG, A.; KOYA, R. C.; MORICEAU, G.; CHODON, T.; GUO, R.; JOHNSON, D. B.; DAHLMAN, K. B.; KELLEY, M. C.; KEFFORD, R. F.; CHMIELOWSKI, B.; GLASPY, J. A.; SOSMAN, J. A.; VAN BAREN, N.; LONG, G. V.;

RIBAS, A.; LO, R. S. Acquired Resistance and Clonal Evolution in Melanoma during BRAF Inhibitor Therapy. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 1, p. 80–93, 1 jan. 2014.

SHIN, M. K.; JANG, B.-Y.; BU, K.-B.; LEE, S.-H.; HAN, D.-H.; OH, J. W.; SUNG, J.-S. De Novo Design of AC-P19M, a Novel Anticancer Peptide with Apoptotic Effects on Lung Cancer Cells and Anti-Angiogenic Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15594, 9 dez. 2022.

SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2024. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 1, p. 12–49, jan. 2024.

SIERRA-DAVIDSON, K.; BOLAND, G. M. Advances in Adjuvant and Neoadjuvant Therapy for Melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 38, n. 5, p. 953–971, out. 2024.

SIMANSHU, D. K.; NISSLEY, D. V.; MCCORMICK, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 17–33, jun. 2017.

SIMMONS, J. L.; PIERCE, C. J.; AL-EJEH, F.; BOYLE, G. M. MITF and BRN2 Contribute to Metastatic Growth after Dissemination of Melanoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10909, 7 set. 2017.

ŚMIECH, M.; LESZCZYŃSKI, P.; KONO, H.; WARDELL, C.; TANIGUCHI, H. Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks. **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1342, 12 nov. 2020.

SOLIT, D. B.; ROSEN, N. Resistance to BRAF Inhibition in Melanomas. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 8, p. 772–774, 24 fev. 2011.

STONES, C. J.; KIM, J. E.; JOSEPH, W. R.; LEUNG, E.; MARSHALL, E. S.; FINLAY, G. J.; SHELLING, A. N.; BAGULEY, B. C. Comparison of responses of human melanoma cell lines to MEK and BRAF inhibitors. **Frontiers in Genetics**, v. 4, 2013. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2013.00066/abstract>. Acesso em: 25 jul. 2024.

SUBBIAH, V.; KREITMAN, R. J.; WAINBERG, Z. A.; GAZZAH, A.; LASSEN, U.; STEIN, A.; WEN, P. Y.; DIETRICH, S.; DE JONGE, M. J. A.; BLAY, J.-Y.; ITALIANO, A.; YONEMORI, K.; CHO, D. C.; DE VOS, F. Y. F. L.; MOREAU, P.; FERNANDEZ, E. E.; SCHELLENS, J. H. M.; ZIELINSKI, C. C.; REDHU, S.; BORAN, A.; PASSOS, V. Q.; ILANKUMARAN, P.; BANG, Y.-J. Dabrafenib plus Trametinib in BRAFV600E-Mutated Rare Cancers: The Phase 2 ROAR Trial. **Nature Medicine**, v. 29, n. 5, p. 1103–1112, maio 2023.

SULLIVAN, R. J.; FLAHERTY, K. MAP Kinase Signaling and Inhibition in Melanoma. **Oncogene**, v. 32, n. 19, p. 2373–2379, 9 maio 2013.

TAKIMOTO, C. H.; AWADA, A. Safety and Anti-Tumor Activity of Sorafenib (Nexavar®) in Combination with Other Anti-Cancer Agents: A Review of Clinical Trials. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 535–548, abr. 2008.

TENNANT, J. R. EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY: **Transplantation**, v. 2, n. 6, p. 685–694, nov. 1964.

ÜNAL, E. B.; UHLITZ, F.; BLÜTHGEN, N. A Compendium of ERK Targets. **FEBS Letters**, v. 591, n. 17, p. 2607–2615, set. 2017.

VACHTENHEIM, J.; ONDRUŠOVÁ, L. Microphthalmia-associated Transcription Factor Expression Levels in Melanoma Cells Contribute to Cell Invasion and Proliferation. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 7, p. 481–484, jul. 2015.

VADEVOO, S. M. P.; GURUNG, S.; LEE, H.-S.; GUNASSEKARAN, G. R.; LEE, S.-M.; YOON, J.-W.; LEE, Y.-K.; LEE, B. Peptides as Multifunctional Players in Cancer Therapy. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 55, n. 6, p. 1099–1109, 1 jun. 2023.

WAGSTAFF, W.; MWAMBA, R. N.; GRULLON, K.; ARMSTRONG, M.; ZHAO, P.; HENDREN-SANTIAGO, B.; QIN, K. H.; LI, A. J.; HU, D. A.; YOUSSEF, A.; REID, R. R.; LUU, H. H.; SHEN, L.; HE, T.-C.; HAYDON, R. C. Melanoma: Molecular Genetics, Metastasis, Targeted Therapies, Immunotherapies, and Therapeutic Resistance. **Genes & Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1608–1623, nov. 2022.

WANG, D.; LIU, J.; LI, T.; WANG, Y.; LIU, X.; BAI, Y.; WANG, C.; JU, S.; HUANG, S.; YANG, C.; ZHOU, C.; ZHANG, Y.; XIONG, B. A VEGFR Targeting Peptide-Drug Conjugate (PDC) Suppresses Tumor Angiogenesis in a TACE Model for Hepatocellular Carcinoma Therapy. **Cell Death Discovery**, v. 8, n. 1, p. 411, 6 out. 2022.

WELLBROCK, C.; AROZARENA, I. Microphthalmia-associated Transcription Factor in Melanoma Development and MAP -kinase Pathway Targeted Therapy. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 28, n. 4, p. 390–406, jul. 2015.

WELLBROCK, C.; RANA, S.; PATERSON, H.; PICKERSGILL, H.; BRUMMELKAMP, T.; MARAIS, R. Oncogenic BRAF Regulates Melanoma Proliferation through the Lineage Specific Factor MITF. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. e2734, 16 jul. 2008.

WILHELM, S.; CARTER, C.; LYNCH, M.; LOWINGER, T.; DUMAS, J.; SMITH, R. A.; SCHWARTZ, B.; SIMANTOV, R.; KELLEY, S. Discovery and Development of Sorafenib: A Multikinase Inhibitor for Treating Cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 10, p. 835–844, 1 out. 2006.

WOJTALA, A.; BONORA, M.; MALINSKA, D.; PINTON, P.; DUSZYNSKI, J.; WIECKOWSKI, M. R. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. *Em*: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 243–262.

YAMADA, K. H.; KANG, H.; MALIK, A. B. Antiangiogenic Therapeutic Potential of Peptides Derived from the Molecular Motor KIF13B That Transports VEGFR2 to Plasmalemma in Endothelial Cells. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 1, p. 214–224, jan. 2017.

ZENG, H.; JORAPUR, A.; SHAIN, A. H.; LANG, U. E.; TORRES, R.; ZHANG, Y.; MCNEAL, A. S.; BOTTON, T.; LIN, J.; DONNE, M.; BASTIAN, I. N.; YU, R.; NORTH, J. P.; PINCUS, L.; RUBEN, B. S.; JOSEPH, N. M.; YEH, I.; BASTIAN, B. C.; JUDSON, R. L. Bi-Allelic Loss of CDKN2A Initiates Melanoma Invasion via BRN2 Activation. **Cancer Cell**, v. 34, n. 1, p. 56- 68.e9, jul. 2018.

ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK Signal Pathways in the Regulation of Cell Proliferation in Mammalian Cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, mar. 2002.

ZHOU, Q.; SUN, X.; PASQUIER, N.; JEFFERSON, P.; NGUYEN, T. T. T.; SIEGELIN, M. D.; ANGELASTRO, J. M.; GREENE, L. A. Cell-Penetrating CEBPB and CEBPD Leucine Zipper Decoys as Broadly Acting Anti-Cancer Agents. **Cancers**, v. 13, n. 10, p. 2504, 20 maio 2021.

ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO

JOURNAL OF CHEMOTHERAPY
https://doi.org/10.1080/1120009X.2023.2264585

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ANTICANCER ORIGINAL RESEARCH PAPER

Check for updates

Astaxanthin induces autophagy and apoptosis in murine melanoma B16F10-Nex2 cells and exhibits antitumor activity *in vivo*

Fernanda Fernandes Miranda da Cunha[a], Angela Pedroso Tonon[b,c], Fabricio Machado[d], Luis Rodolpho Travassos[d]*, Nathalia Grazzia[e], João Fernando Possatto[b], Agnes Kobayashi Calvo de Sant'ana[a], Rayssa de Mello Lopes[f], Tiago Rodrigues[f], Danilo Ciccone Miguel[e], Fernanda Ramos Gadelha[e] and Denise Costa Arruda[a]

[a]Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB), Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Mogi das Cruzes, Brazil; [b]Instituto de Física e Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil; [c]Institute of Environmental Science and Technology, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; [d]Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil; [e]Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; [f]Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC, UFABC, Santo André, Brazil

ABSTRACT

Countless efforts have been made to prevent and suppress the formation and spread of melanoma. Natural astaxanthin (AST; extracted from the alga *Haematococcus pluvialis*) showed an antitumor effect on various cancer cell lines due to its interaction with the cell membrane. This study aimed to characterize the antitumor effect of AST against B16F10-Nex2 murine melanoma cells using cell viability assay and evaluate its mechanism of action using electron microscopy, western blotting analysis, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay, and mitochondrial membrane potential determination. Astaxanthin exhibited a significant cytotoxic effect in murine melanoma cells with features of apoptosis and autophagy. Astaxanthin also decreased cell migration and invasion *in vitro* assays at subtoxic concentrations. In addition, assays were conducted in metastatic cancer models in mice where AST significantly decreased the development of pulmonary nodules. In conclusion, AST has cytotoxic effect in melanoma cells and inhibits cell migration and invasion, indicating a promising use in cancer treatment.

ARTICLE HISTORY
Received 12 September 2022
Revised 25 July 2023
Accepted 22 September 2023

KEYWORDS
Antitumor activity; apoptosis; astaxanthin; autophagy; cell migration; invasion; melanoma; metastasis

Introduction

Melanoma is a malignant neoplasm mainly caused by genetic predisposition, exposure to ultraviolet (UV) radiation, and interaction with other environmental factors. The accumulation of sequential genetic changes, activation of oncogenes, inactivation of tumour suppressor genes, and inhibition of DNA repair mechanisms lead to increased cell proliferation and tumour development [1–6].

Malignant melanoma has become a major health problem; its incidence is increasing worldwide, being more frequent in light-skinned populations. The World Health Organization estimates the occurrence of about 132,000 new cases of melanoma per year and 66,000 deaths due to all types of skin cancers in the world [7]. About 325,000 new melanoma cases and 57,000 deaths were estimated for 2020 according to GLOBOCAN 2020 [8].

Recent studies have shown the importance of carotenoids in preventing human diseases, including cancer. Astaxanthin (AST), a carotenoid of the xanthophylls group, is found in microorganisms such as bacteria, yeast, and especially microalgae. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that AST has several benefits, including neuroprotective, cardioprotective, and antitumor properties, and prevents Alzheimer's and Parkinson's diseases [9–13]. Astaxanthin supplementation has already been used in a clinical trial and showed to be well tolerated by patients with type 2 diabetes mellitus [14].

AST inhibited the proliferation and migration of U251MG, GL261, and U87MG glioblastoma cells in tumour cells and showed antitumour effects in a

CONTACT Denise Costa Arruda denisearr@gmail.com Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB), Universidade de Mogi das Cruzes, UMC; Mogi das Cruzes, SP, Brazil.

Supplemental data for this article can be accessed online at https://doi.org/10.1080/1120009X.2023.2264585.

*In memoriam

© 2023 Universidade de Mogi das Cruzes

ANEXO II – ARTIGO SUBMETIDO

Peptides derived from the POU domain of BRN2 show antitumor activity against murine melanoma model cells *in vitro* and *in vivo*

Maria Carolina Mariano Cesar[1‡], Agnes Kobayashi Calvo de Sant'ana[1], Renato Arruda Mortara[2], Victória Santos Souza[1], Thaysa Paschoalin[3], Marco Antônio Soufen[4], Juliana Machado Anastácio[1], Erenildo F. Macedo[5], Fernanda Fernandes Miranda da Cunha[1], Dayane Batista Tada[5], Denise Costa Arruda[1*]

[1]Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes – Mogi das Cruzes, SP, Brazil; [2]Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo – São Paulo, SP, Brazil; [3]Departamento de Biofisica, Universidade Federal de São Paulo – São Paulo, SP, Brazil; [4]Faculdade de Medicina da Universidade de Mogi das Cruzes, Universidade de Mogi das Cruzes – Mogi das Cruzes, SP, Brazil; [5]Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de São Paulo – São José dos Campos, SP, Brazil.

*Corresponding author: denisearr@gmail.com
‡Current address: College of Engineering, Bioengineering Department, Temple University – Philadelphia, PA, USA.

Submitted to Cancer Chemotherapy and Pharmacology on December 2024
ID 535755f1-528b-4653-9532-acacbff13b60