

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Taís Vidal Palma

**EFEITO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE
CÉLULAS SK-MEL-28 DE MELANOMA**

Santa Maria, RS
2022

Taís Vidal Palma

EFEITO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE CÉLULAS SK-MEL-28 DE MELANOMA

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^a Dra. Cinthia Melazzo de Andrade
Coorientadora: Prof^a Dra. Micheli Mainardi Pillat

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

PALMA, TAÍS VIDAL
EFEITO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE CÉLULAS
SK-MEL-28 DE MELANOMA / TAÍS VIDAL PALMA.- 2022.
93 p.; 30 cm

Orientadora: CINTHIA MELAZZO ANDRADE
Coorientadora: MICHELI MAINARDI PILLAT
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2022

1. Berberina 2. Melanoma 3. SK-MEL-28 4. Câncer I.
ANDRADE, CINTHIA MELAZZO II. PILLAT, MICHELI MAINARDI
III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, TAÍS VIDAL PALMA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Taís Vidal Palma

EFEITO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE CÉLULAS SK-MEL-28 DE MELANOMA

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

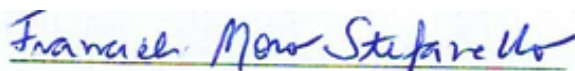
Aprovado em 10 de janeiro de 2022:



Cinthia Melazzo de Andrade, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador) - videoconferência



Roselia Maria Spanevello, Dra. (UFPel) - videoconferência



Francieli Moro Stefanello, Dra. (UFPel) - videoconferência



Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM) - videoconferência



Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo, Dr. (UFB) - videoconferência

Santa Maria, RS
2022

***Dedico esta dissertação a minha filha,
à qual sempre estive comigo em todas minhas escolhas.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus por abençoar a minha vida, a minha família e pelas oportunidades oferecidas ao longo desta caminhada.

À minha filha Nathália, por ser uma filha maravilhosa.

À minha mãe, Sandra, por ser uma mãe amiga e acima de tudo uma mulher guerreira. Aos meus irmãos Teonas, Tatiana, Júlia e Silvaní pelo companheirismo e amizade.

Em especial a professora Maria do Carmo, por tudo que me ensinou e continua ensinando, me apresentou o “mundo científico”, com bons conselhos, uma pessoa que admiro muito.

À professora Cinthia, um exemplo de profissional, agradeço pela oportunidade, dedicação e grande amizade que marcará para sempre minha vida. A sua visão de mundo e de trabalho em equipe servem de incentivo para buscar o conhecimento e seguir em frente.

À professora Micheli, que me muito ajudou no doutorado, uma pessoa incrível e parceira. Sempre me incentivou com bons conselhos. E acima de tudo é uma grande amiga.

Aos meus colegas de laboratório, pela parceria na realização dos trabalhos e por contribuírem para a concretização da minha pesquisa.

Aos professores e funcionários do PPGBTOX - UFSM.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante o doutorado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

EFEITO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE CÉLULAS SK-MEL-28 DE MELANOMA

AUTORA: Taís Vidal Palma
ORIENTADORA: Cinthia Melazzo de Andrade
COORIENTADORA: Micheli Mainardi Pillat

O melanoma é a forma mais agressiva dos cânceres de pele, possuindo alto poder metastático, responsável por causar a maioria (75%) das mortes relacionadas à pele. O poder metastático das células tumorais é um grande desafio aos agentes terapêuticos, uma vez que a metástase é a principal causa de morte relacionada ao câncer, devido a reprogramação celular, extravasamento e disseminação invasiva, promovendo o crescimento de tumores em tecidos distantes. A berberina (BBR), um alcaloide isoquinolina, é um composto encontrado em plantas como a *Coptis chinensis* e *Berberis aristata* que tem demonstrado propriedades antitumorais, além de diminuir a toxicidade causada por quimioterápico. Dessa forma, o objetivo do estudo foi investigar os mecanismos antitumorais da BBR na linhagem celular SK-MEL-28 de melanoma humano. Para isso, inicialmente foi utilizada a viabilidade celular pelo ensaio de MTT, no qual as células SK-MEL-28 foram tratadas em diferentes concentrações de BBR (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 μM) e tempos (24, 48 e 72 horas) para determinação do IC₅₀. Após foram realizadas análises de morte celular, índice de dano ao DNA e ciclo celular, além de quantificação de proteínas envolvidas na apoptose. Ainda, foram feitas análises da atividade antioxidante, níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de citocinas. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade de migração, assim como a atividade e expressão de componentes do sistema purinérgico frente ao tratamento com BBR e o uso concomitante ou isolado do inibidor de AMPK (iAMPK). Os resultados mostraram que a BBR promove uma diminuição da viabilidade celular após 24 horas e o IC₅₀ definido como 50 μM , causa o aumento do índice de dano ao DNA celular, aumento no número de células com parada na fase G₁/G₀ do ciclo celular, aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteínas ligadas à apoptose nas células SK-MEL-28. Em adição, a BBR induz à apoptose de células de melanoma e aumento nas citocinas anti- e pró-inflamatórias. Somado a isso, esse composto influencia a capacidade de migração, modificando a estrutura e adesão das células de melanoma humano, já o iAMPK influencia apenas a capacidade de migração. Não foram observadas alterações na expressão de NTPDase (CD39) e 5'-nucleotidase (CD73), mas em 24 horas de tratamento com BBR, houve uma inibição na hidrólise de nucleotídeos ATP, ADP e AMP. Por fim, tanto o iAMPK quanto o tratamento com BBR concomitantemente com o iAMPK resultaram em uma redução na hidrólise de nucleotídeos. É importante ressaltar que os resultados deste estudo são importantes, uma vez que o melanoma humano apresenta alta capacidade metastática e mortalidade, o que torna a pesquisa com compostos naturais uma importante aliada da medicina integrativa. Enfatizamos

que estudos *in vivo*, como ensaios clínicos são necessários para melhor demonstrar os efeitos da BBR, dada a complexidade do metabolismo corporal.

Palavras-chaves: Berberina, Melanoma, SK-MEL-28, Câncer.

ABSTRACT

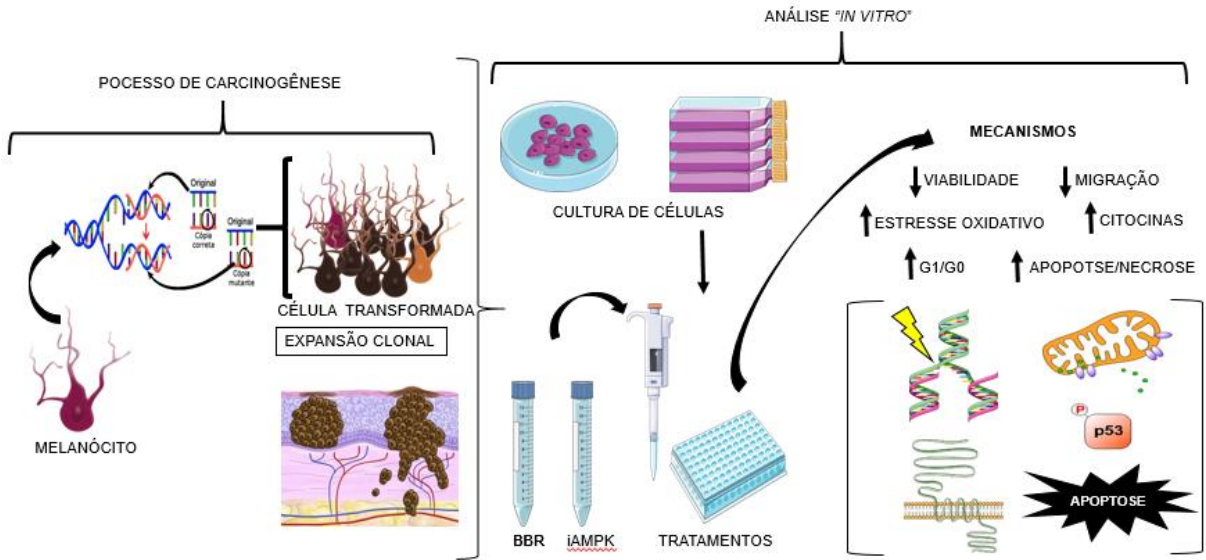
ANTITUMOR EFFECT OF BERBERINE IN MELANOMA SK-MEL-28 CELLS

AUTHOR: Taís Vidal Palma
ADVISOR: Cinthia Melazzo de Andrade
CO-ADVISOR: Micheli Mainardi Pillat

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer, having high metastatic power, responsible for causing the majority (75%) of skin-related deaths. The metastatic power of tumor cells is a major challenge for therapeutic agents, since metastasis is the main cause of cancer-related death, due to cellular reprogramming, extravasation and invasive dissemination, promoting the growth of tumors in distant tissues. Berberine (BBR), an isoquinoline alkaloid, is a compound found in plants such as *Coptis chinensis* and *Berberis aristata* that has shown antitumor properties, in addition to decreasing the toxicity caused by chemotherapy. Thus, the objective of the study was to investigate the antitumor mechanisms of BBR in the human melanoma cell line SK-MEL-28. For this, cell viability was initially used by the MTT assay, in which SK-MEL-28 cells were treated at different concentrations of BBR (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 and 250 μM) and times (24, 48 and 72 hours) to determine the IC₅₀. After that, analyzes of cell death, DNA damage index and cell cycle were performed, as well as quantification of proteins involved in apoptosis. Furthermore, analyzes of antioxidant activity, levels of reactive oxygen species (ROS) and cytokines were performed. Additionally, the ability to migrate was evaluated, as well as the activity and expression of components of the purinergic system against treatment with BBR and the concomitant or isolated use of the AMPK inhibitor (iAMPK). The results showed that BBR promotes a decrease in cell viability after 24 hours and the IC₅₀ defined as 50 μM , causes an increase in the cellular DNA damage index, an increase in the number of cells with arrest in the G1/G0 phase of the cell cycle, increase in reactive oxygen species (ROS) and proteins linked to apoptosis in SK-MEL-28 cells. In addition, BBR induces apoptosis of melanoma cells and increases in anti- and pro-inflammatory cytokines. In addition, this compound influences the migration capacity, modifying the structure and adhesion of human melanoma cells, whereas iAMPK influences only the migration capacity. No changes were observed in the expression of NTPDase (CD39) and 5'-nucleotidase (CD73), but in 24 hours of treatment with BBR, there was an inhibition in the hydrolysis of ATP, ADP and AMP nucleotides. Finally, both iAMPK and BBR treatment concomitantly with iAMPK resulted in a reduction in nucleotide hydrolysis. It is important to emphasize that the results of this study are important, since human melanoma has a high metastatic capacity and mortality, which makes research with natural compounds an important ally of integrative medicine. We emphasize that in vivo studies such as clinical trials are needed to better demonstrate the effects of BBR, given the complexity of body metabolism.

Keywords: Berberine, Melanoma, SK-MEL-28, Cancer.

GRAPHICAL ABSTRACT



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição da incidência do melanoma, por 100 mil habitantes, nas regiões do Brasil.....	16
Figura 2- Apresentação clínica de melanoma superficial.....	17
Figura 3- Apresentação dos principais tipos histogenéticos de melanoma. A: melanoma de disseminação superficial; B: melanoma nodular; C: melanoma lentigo maligno; D: melanoma lentiginoso acral; E: melanoma desmoplásico; F: melanoma nevoide.....	19
Figura 4- A: Pele normal; B: Nevo; C: Nevo displásico; D: melanoma <i>in situ</i> ; E: melanoma invasivo.....	22
Figura 5- Critérios do ABCDE para identificação do melanoma.....	23
Figura 6- Estrutura química da Berberina.....	34
Figura 7- A: <i>Coptis chinensis</i> ; B: rizoma seco; C: carpelos.....	34

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
ADA	Adenosina desaminase
α -MSH	Hormônio estimulante de alfa-melanócitos
BBR	Berberina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclica
CAT	Catalase
CD39	NTPDase
CD37	Ecto-5'-nucleotidase
CP	Ciclobutano de pirimidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutationa peroxidase
IFN- γ	Interferon γ
IL-17A	Interleucina 17A
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
LDH	Lactato desidrogenase
MC1R	Receptor de melanocortina 1
NF- κ B	Fator nuclear de transcrição- κ B
PP	Pirimidina-pirimidona
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dimutase
TACE	Enzima de conversão do fator de necrose tumoral- α
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UTP	5'-trifosfato de uridina

UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
8-OHdG	8-oxo-7,8-di-hidro-2'-desoxiguanosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CÂNCER.....	15
1.2 MELANOMA.....	17
1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	21
1.4 APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
1.5 SISTEMA PURINÉRGICO	30
1.6 BERBERINA.....	34
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 METODOLOGIA	40
4.1 LINHAGEM CELULAR, CULTURA CELULAR E COMPOSTO	40
4.2 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR E TRATAMENTO	40
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR	40
4.4 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR ANEXINA E IODETO DE PROPÍDIO, QUANTIFICAÇÃO DE CASPASE 3 TOTAL E ATIVADA, FOSFO-p38, FOSFO-p53, ERK, CD39, CD73, ADA ₁ , P ₂ X ₇ , P ₂ Y ₁₁ , A ₁ E A ₂ A.....	41
4.5 CICLO CELULAR	42
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	42
4.7 ENSAIO DO COMETA ALCALINO	42
4.8 FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) .	43
4.9 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	43
4.10 TIOIS TOTAIS E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	43
4.11 PROTEÍNAS TOTAIS.....	44
4.12 ENSAIO DE MIGRAÇÃO.....	44
4.13 ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES, NTPDASE, 5'-NUCLEOTIDASE E ADENOSINA DESAMINASE (ADA).....	44
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5 RESULTADOS	46
5.1 ARTIGO:	47
5.2 MANUSCRITO:.....	57
6 DISCUSSÃO	78

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer é uma doença caracterizada pelo progressivo acúmulo de mutações somáticas no DNA da célula, levando a alterações na expressão ou função de genes que atuam na manutenção da homeostasia da célula. Assim, a célula mutada não obedecerá mais aos sinais normais de controle de proliferação, morte e diferenciação celular, e sofrerá expansão clonal (MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015).

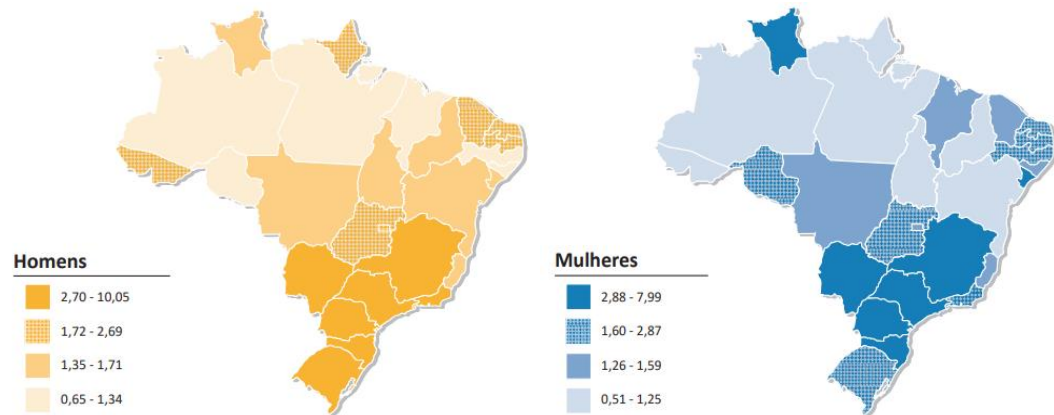
Para manter-se, as células cancerosas reprogramam seu metabolismo continuamente, se adaptando ao microambiente circundante, por processos altamente dinâmicos para uma rápida proliferação e sobrevivência. Esse rápido processo de adaptação metabólica ao microambiente circundante, com a capacidade e flexibilidade de utilizar diferentes substratos é conhecido por plasticidade metabólica (ALKARAKI et al., 2021).

Os cânceres são as principais causas de morte em todo o mundo (CHIU et al., 2021). Segundo recente estimativa mundial, ocorreram 18 milhões de casos novos de câncer em 2018, e 9,6 milhões de óbitos (BRAY et al., 2018; BRASIL, 2019). Ainda, para a Organização Mundial da Saúde a estimativa, para 2030, é de 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (BRASIL, 2011).

Para o Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer são que para cada ano do triênio 2020-2022 ocorrerão aproximadamente 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não-melanoma). Com grande incidência, os cânceres de pele não-melanoma representarão cerca de 83.770 em homens e de 93.160 em mulheres. Somado a isso, estima-se que para o câncer de pele melanoma, o número de casos será de 4.200 em homens e de 4.250 em mulheres (BRASIL, 2019).

O câncer de pele melanoma tem uma incidência baixa, porém sua letalidade é elevada (BRASIL, 2017). A Região Sul figura entre as três regiões de maior incidência de câncer no Brasil, com 23,4% dos casos, e quando comparada a todas as regiões, o câncer de pele melanoma é mais incidente para ambos os sexos (Figura 1) (BRASIL, 2019).

Figura 1- Distribuição da incidência do melanoma, por 100 mil habitantes, nas regiões do Brasil.

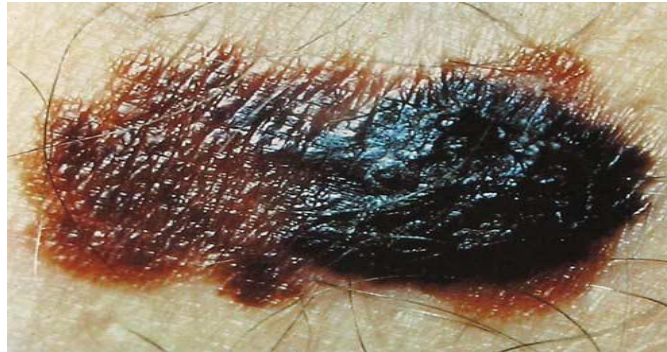


Fonte: Adaptado de BRASIL, 2019.

No mundo são comuns as neoplasias de pele, cerca de 225 milhões de pessoas são afetadas por ano, no entanto, a grande maioria é de câncer de pele não-melanoma (O'SULLIVAN et al., 2015). Os cânceres de pele podem ser divididos dependendo do tipo de célula envolvida: queratinócitos e melanócitos (BRASIL, 2017). Esses são também amplamente conhecidos como câncer de pele não-melanoma, com maior taxa de incidência, e melanoma, com maior taxa de mortalidade (BRASIL, 2017; GÁLVES et al., 2018).

Dentre os cânceres de pele, encontra-se o melanoma, o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular, como os tipos mais frequentes da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). O câncer de pele não-melanoma tem pequeno potencial de crescimento local ou para regiões distantes e raramente causa a morte do paciente (O'SULLIVAN et al., 2015). Já o melanoma é um tumor sólido e de crescimento rápido (HUANG; RADI; ARBISER, 2021), considerado a forma mais letal de câncer de pele (Figura 2) (GIROUARD; MURPHY, 2011).

Figura 2- Apresentação clínica de melanoma superficial.



Fonte: Adaptado de GIROUARD; MURPHY, 2011.

1.2 MELANOMA

O melanoma é a forma mais agressiva dos cânceres de pele, possuindo alto poder metastático (DE LOGU et al., 2021; ALKARAKI et al., 2021; DIENER et al., 2021), responsável por causar a maioria (75%) das mortes relacionadas à pele (SCHADENDORF et al., 2015). No ano de 2017, ocorreram 1.031 óbitos em homens e 804 óbitos em mulheres no Brasil em consequência ao melanoma, com risco de 1,02/100 mil e de 0,78/100 mil, respectivamente (BRASIL, 2019).

O poder metastático das células tumorais é um grande desafio aos agentes terapêuticos. Uma vez que a metástase é a principal causa de morte relacionadas ao câncer, devido a reprogramação celular, extravasamento e disseminação invasiva promovendo o crescimento de tumores em tecidos distantes. A reprogramação celular permite que o tumor cresça e sobreviva em novos microambientes, distintos da lesão inicial (ALKARAKI et al., 2021).

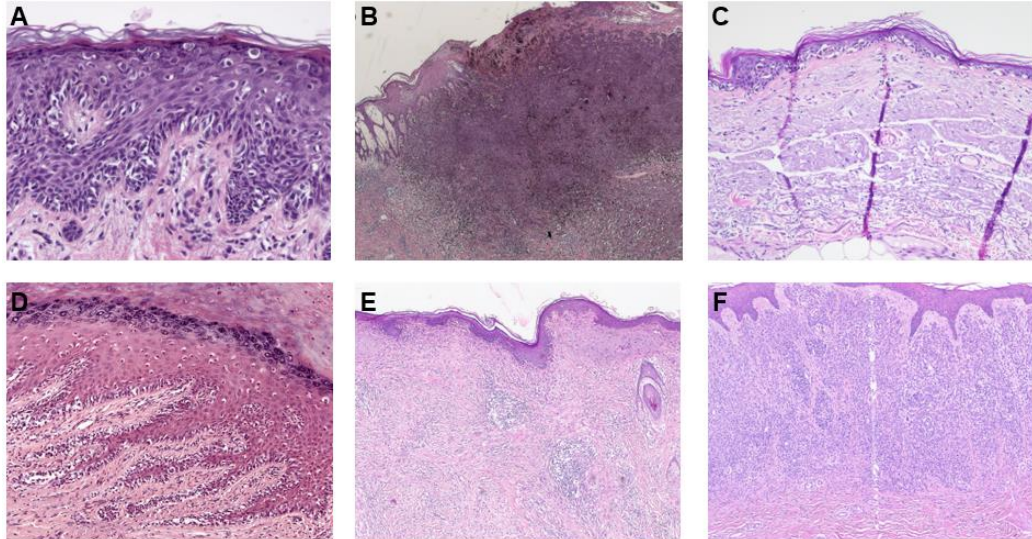
Os melanócitos, células onde a neoplasia maligna de pele (melanoma) surge, são produtoras de pigmento neuroectodérmico, a melanina (SCHADENDORF et al., 2015; HARTMAN; LIN, 2019). São células situadas no estrato germinativo da pele (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019), derivadas da crista neural, que durante o desenvolvimento distribuem-se na pele, olhos e outros tecidos do corpo, em menor grau (SHAIN; BASTIAN, 2016). Os melanócitos são estimulados pelo hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH), produzido por queratinócitos em resposta a radiação ultravioleta (UV), que se liga ao receptor de melanocortina 1 (MC1R) nos

melanócitos, estimulando a produção de melanina (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Durante o processo de melanogênese, a exposição excessiva e prolongada à luz solar pode provocar a produção excessiva de melanina, levando a distúrbios dermatológicos, como lentigos solares, vitiligo e lesões cancerígenas (SIM et al., 2021). O melanoma é uma lesão pigmentada, podendo ser facilmente detectado pelos pacientes em seus estágios iniciais porque ocorre na superfície da pele. No entanto, a presença de nevos e outras lesões benignas pigmentadas limitam as lesões selecionadas para biópsias de pele, influenciando o diagnóstico (SCHADENDORF et al., 2015).

De acordo com as características intraepidérmicas do tumor, são definidos os principais subtipos histogenéticos de melanoma: melanoma de disseminação superficial; melanoma nodular; melanoma lentigo maligno; melanoma lentiginoso acral; melanoma desmoplásico; melanoma nevoide (Figura 3). O melanoma de disseminação superficial geralmente acomete regiões do corpo expostas ao sol de forma intermitente. Apresenta-se como uma lesão plana, com crescimento lento e irregular, com pigmentação que aumenta de forma radial. Pode apresentar área elevada que indica invasão dérmica. É caracterizado histologicamente pela presença de grandes melanócitos epitelioides pleomórficos, com migração ascendente, além de espessamento epidérmico e melanização intracitoplasmática (SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011).

Figura 3- Apresentação dos principais tipos histogenéticos de melanoma. A: melanoma de disseminação superficial; B: melanoma nodular; C: melanoma lentigo maligno; D: melanoma lentiginoso acral; E: melanoma desmoplásico; F: melanoma nevoide.



Fonte: Adaptado de SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011.

Já os melanomas nodulares podem aparecer em qualquer local do corpo, apresentam-se como um nódulo em rápida expansão, pode ocorrer ulceração e hemorragia no local. Podem ainda, ser confundidos com carcinoma basocelular, principalmente se forem amelanóticos. Na avaliação histológica não apresentam componente epidérmico além da borda dérmica. O melanoma lentigo maligno acomete regiões cronicamente expostas ao sol. Apresenta-se como uma lesão grande, multicolorida e com bordas irregulares. Na histologia, mostra proliferação lentiginosa de melanócitos atípicos, com atrofia epidérmica, elastose, e afinamento dérmico (SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011).

Para o melanoma lentiginoso acral, os locais de acometimento são as palmas das mãos, plantas dos pés e região subungueal. Apresentam máculas pigmentadas, com crescimento lento. Na histologia encontram-se melanócitos atípicos únicos espalhados ao longo da camada epidérmica. Ainda, o melanoma desmoplásico que é definido por características patológicas de seu componente dérmico, formado por células fusiformes, separadas por desmoplasia estromal, com invasão dérmica. A epiderme sobrejacente pode mostrar evidência de um lentigo maligno ou outro tumor melanocítico. Em relação aos melanomas nevóides, a histologia se assemelha a um nevo, e podem ser divididos em pequenas células e a variante Spitzoide (SCOLYER;

LONG; THOMPSON, 2011). Dentre as lesões spitzoides podemos encontrar os melanomas spitzoides, o tumor spitz atípico e os nevos spitz benignos, o que gera um diagnóstico complicado, uma vez que as lesões se assemelham, apresentando epitelioides grandes e melanócitos fusiformes (HEGEDÜS et al., 2021).

Dentre os fatores de risco para os cânceres de pele melanoma e não-melanoma destaca-se a exposição excessiva à radiação solar UV (SCHADENDORF et al., 2015; SLOMINSKI et al., 2017), principalmente na infância e na adolescência, além de exposição a câmeras de bronzeamento artificial, histórico familiar de câncer de pele (BRASIL, 2019), fatores de risco genéticos e estilo de vida (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

Outros fatores, como cor de pele, olhos e cabelos claros; história familiar ou pessoal de câncer de pele; o sistema imune debilitado por doenças ou em indivíduos transplantados por causa do uso de imunossupressores (azatioprina e ciclosporina), podem aumentar o risco para o desenvolvimento do câncer de pele (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Ainda, está bem estabelecido que indivíduos com alto número de nevos melanocíticos apresentam risco aumentado de melanoma, embora o aumento do número de nevos também esteja relacionado, em parte, à exposição excessiva ao sol no início da vida (EMRI et al., 2018). Por fim, as mutações que aumentam o risco de melanoma são: CDKN₂A, CDK₄, BRCA₁, BRCA₂, p53 e RB₁. A mais comum, CDKN₂A, resulta na modulação da função de p16, que regula negativamente a progressão do ciclo celular (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

A radiação UV está relacionada ao aparecimento de aproximadamente 65% de todos os melanomas (EMRI et al., 2018). Portanto, a proteção efetiva contra o sol é uma importante medida preventiva. A exposição artificial a UV na utilização de cama de bronzeamento, tem sido associada a incidência muito maior de melanomas, diagnosticados entre os 30-40 anos, mais de 75% dos casos de melanoma (EMRI et al., 2018). Além disso, está ligada a gênese do carcinoma basocelular e espinocelular, onde a radiação UVB diminui a quantidade de P₂X₁, P₂Y₂ e P₂X₇R, o que contribui para a transformação maligna dos queratinócitos (RUZSNAVSZKY et al., 2011).

Quanto a radiação UVB (280-320 nm), o maior impacto é sobre o DNA nas células da pele, que quando irradiado com UVB produz dímeros de ciclobutano de pirimidina (CP) e fotoprodutos de pirimidina-pirimidona (PP), nos quais duas pirimidinas estão ligadas covalentemente, e quebras em uma ou nas duas fitas do DNA. A radiação UVA (320-400 nm) é menos prejudicial que a UVB, mas em altas

doses pode suprimir o sistema imunológico e levar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Além disso, as ERO pode formar 8-oxo-7,8-di-hidro-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) e CP. Tanto o 8-OHdG, quanto o CP ou o PP interferem no funcionamento normal da célula, bloqueando a replicação e transcrição do DNA, podendo levar a processo inflamatório ou morte celular (VECHTOMOVA et al., 2021).

Após a exposição a UV, as alterações no DNA são reparadas pelas células ou resultam em morte celular, e menos frequentemente levam a mudanças genômicas que podem resultar no desenvolvimento de câncer de pele (EMRI et al., 2018; VECHTOMOVA et al., 2021). A tumorigênese não depende de mudanças isoladas no DNA, mas da associação de mecanismos de reparos falhos, como os mecanismos de reparo de DNA, pontos de verificação de ciclo celular, ativação das vias de morte celular (apoptose, necrose e autofagia) e resposta imune às células danificadas (D'ORAZIO et al., 2013).

Dos melanócitos que acumulam múltiplas mutações patogênicas, e seguem sem reparo ou ativação da apoptose para eliminação, surge o melanoma. As células de melanoma são capazes de evadir da apoptose, proliferar e produzir metástases (ADAMS et al., 2021). Além disso, produzem inflamação e são capazes de interferir na comunicação intercelular, inibindo uma resposta imunológica eficiente (CHIU et al., 2021).

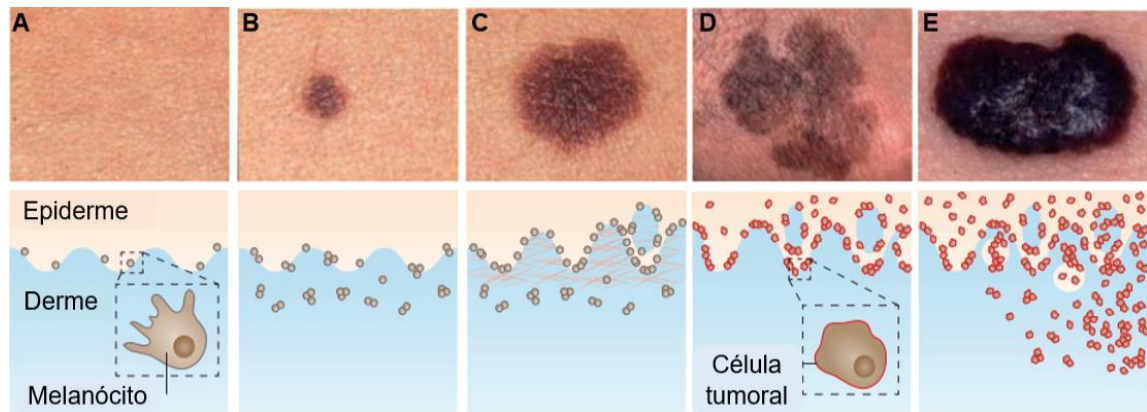
As principais mutações patogênicas encontradas em melanomas estão relacionadas as vias de proliferação (genes BRAF, NRAS e NF₁); no crescimento e metabolismo (genes PTEN e KIT); na identidade celular (gene ARID₂); na resistência a apoptose (gene TP53); no controle do ciclo celular (gene CDKN_{2A}); e no tempo de vida replicativo (gene TERT). Não existindo uma ordem fixa para essas vias serem alteradas pelas mutações (SHAIN; BASTIAN, 2016; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O câncer de pele melanoma é uma doença maligna, cuja incidência aumenta constantemente no mundo todo, sendo altamente fatal (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). Possui elevado poder metastático, característica que o torna o câncer de pele mais agressivo. A diferenciação entre nevos e melanoma é muito importante, uma

vez que nevos se assemelham na coloração aos melanomas por se originarem do mesmo tipo celular, os melanócitos (Figura 4) (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Figura 4: A- Pele normal; B: Nevo; C: Nevo displásico; D: melanoma *in situ*; E: melanoma invasivo.

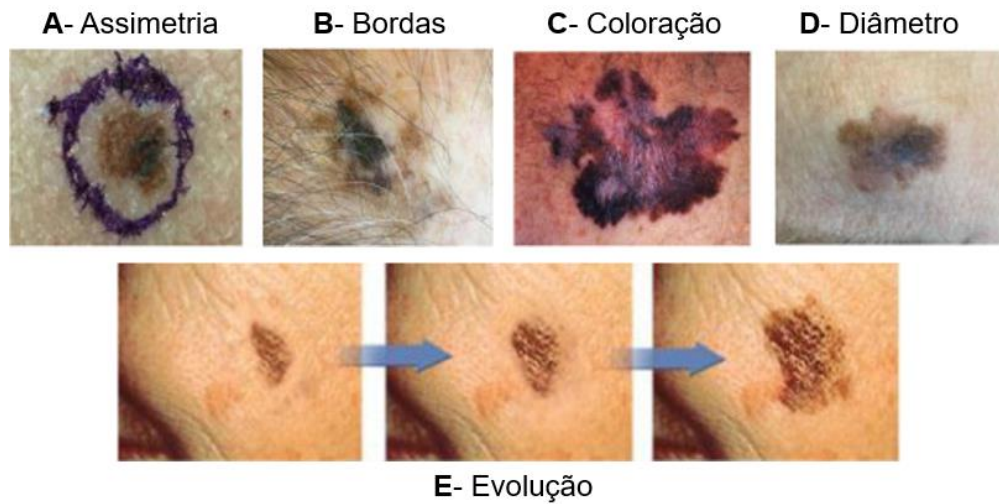


Fonte: Adaptado de SHAIN; BASTIAN, 2016.

A detecção precoce do melanoma e a ressecção cirúrgica das lesões são necessárias para prevenir o surgimento de metástases e mortalidade (SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011; CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). Mesmo possuindo tratamento, os melanomas são responsáveis por aproximadamente 73% das mortes relacionadas aos cânceres de pele. A cirurgia quando o tumor se apresenta em lesão local, traz uma sobrevida em 5 anos de 98% para os pacientes. Em contrapartida, quando o diagnóstico revela um melanoma avançado ou metastático a sobrevida diminui para 64% (lesões regionais) e 23% (melanomas distantes), pois as opções de tratamento se tornam limitadas (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

As identificações das lesões de melanoma aumentaram, em razão das autoavaliações de lesões cutâneas, por uma maior conscientização e conhecimento público. Muito embora, este aumento possa ser em função da maior exposição ao sol. Para aumentar a conscientização dos pacientes para a detecção precoce, foram criados em 1985, os critérios ABCDE (assimetria, bordas irregulares, variação de cor, diâmetro > 6 mm e evolução) (Figura 5) para identificação do melanoma. Sendo que qualquer lesão cutânea que apresentar uma ou mais características deve ser analisada por um dermatologista (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

Figura 5- Critérios do ABDCE para identificação do melanoma.



Fonte: Adaptado de CARR; SMITH; WERNBERG, 2020.

Implementadas recentemente, tecnologias de imagens contribuem para detectar o melanoma, incluindo aplicativos de smartphones (SkinVision, UMSkinCheck e MoleScope), aliados na detecção precoce para os pacientes. Apesar de, serem imprecisos quando se trata de lesões de baixo risco, o que é um complicador na identificação, uma vez que poderia resultar em um diagnóstico tardio de uma lesão que poderia ter sido diagnosticada cedo. Sobre tecnologias de imagens, ainda há recursos de imagens utilizadas por médicos quando as biópsias revelam lesões ambíguas. Para definir se uma biópsia é necessária, são utilizados os dispositivos MelaFind e SIAscope (*Spectrophotometric Intracutaneous Analysis*) que usam luz visível e infravermelha (~ 400 nm a ~ 1000 nm) para identificar lesões (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Quando uma lesão apresenta atipia, é encaminhada para biópsia, a fim de confirmar o melanoma. A amostra pode ser colhida por raspagem com lâmina, biópsia por punção ou excisão da lesão com margens de 2 mm. Na biópsia deve ser avaliada a profundidade de invasão, além de sequenciamento para mutações. No entanto, o diagnóstico pode ser difícil, geralmente quando se trata tumor Spitzoide, nevos epitelioides azuis ou de penetração profunda, pelas semelhanças (HARTMAN; LIN, 2019).

O diagnóstico histopatológico é baseado em características clássicas do melanoma, embora seja uma doença heterogênea, na qual algumas variantes podem dificultar a identificação pelo exame tradicional com hematoxilina e eosina. Devido a

isso, são utilizados marcadores moleculares e imunohistoquímicos. Os marcadores mais utilizados são marcadores melanocíticos (proteínas envolvidas na síntese de melanina, biogênese de melanossomas ou diferenciação de melanócitos) e proliferativos (atividade do ciclo celular) (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; HARTMAN; LIN, 2019).

Na classificação do melanoma é adotado o sistema TNM, baseado na avaliação de três componentes para determinar a extensão anatômica da doença: T - a extensão do tumor primário; N - ausência ou presença e extensão de metástase linfonodal regional; M - a ausência ou presença de metástase à distância. A essas letras são adicionados números que indicam a extensão do tumor (BRIERLEY et al., 2017). Além disso, o melanoma pode ser classificado de acordo com o sítio de acometimento, como cutâneo ou não cutâneo (ocular, gastrointestinal, geniturinário e nasofaríngeo) (SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011). Dentre os melanomas mais diagnosticados, cerca de 91,2% são de melanomas cutâneos e 5,2% são melanomas oculares (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

Como tratamentos para o câncer pode-se citar: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia pode ser realizada anteriormente a ressecção cirúrgica, para diminuir o tamanho do tumor, no entanto, a logo prazo tem efeitos colaterais (náuseas, vômitos, fadiga, queda de cabelo, leucopenia, mucosite, distúrbios neurossensoriais e alterações do paladar) além de induzir resistência a múltiplas drogas (CHIU et al., 2021). Quando a quimioterapia acontece antes da cirurgia é denominada neoadjuvante, já quando é administrada após a cirurgia para erradicar células tumorais residuais, é conhecida por adjuvante (DUMMER et al., 2021).

Quando o melanoma se apresenta localizado, a remoção cirúrgica é o tratamento primário realizado. Nesse procedimento, se o tumor possuir mais de 0,8 mm de espessura, é realizada a biópsia no linfonodo sentinela, para verificar a presença de células do melanoma. Caso sejam encontradas células do melanoma nessa biópsia, serão removidos todos os linfonodos da região. Além disso, as margens cirúrgicas são de extrema importância, pelo fato das células de melanoma crescerem além da margem existente (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

A radioterapia não é usada como primeira opção de tratamento para o melanoma, geralmente é uma alternativa quando o melanoma é irresssecável, e tem o papel de adjuvante quando as margens cirúrgicas positivas e negativas não estão bem

definidas, devido a agressividade do tumor. Ainda, a radioterapia é uma forma de tratamento quando há metástases, podendo ser usada como radiocirurgia (HARTMAN; LIN, 2019).

As quimioterapias citotóxicas mais utilizadas, incluem: platinas, temozolomida, dacarbazina e paclitaxel (SPECENIER, 2019). A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina) está entre os quimioterápicos mais tradicionalmente utilizados, inclusive para melanoma metastático. No entanto, possui uma baixa eficiência em melanomas, pois o tumor é resistente ao medicamento (GE et al., 2021). O quimioterápico temozolomida é utilizado como tratamento sistêmico inicial para pacientes com melanoma metastático irressecável, possui a capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica, característica importante para tratamento de metástases no cérebro, ainda possui excelente biodisponibilidade oral. A temozolomida atua pelo mesmo mecanismo da dacarbazina, no entanto a dacarbazina não possui boa disponibilidade oral e capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica. A dacarbazina também é utilizada para melanoma metastático (QUIRBT et al., 2007). Além disso a dacarbazina geralmente é administrada concomitante a outras drogas, afim de evitar seus efeitos colaterais (vômitos, náuseas e anorexia) (LEE et al., 2021).

O paclitaxel é um quimioterápico insolúvel em água, necessitando o uso de solventes (metanol e diclorometano) (SPECENIER, 2019). Possui ação antimicrotúbulo, interferindo nas funções celulares. Já o Nab-paclitaxel é uma forma de paclitaxel ligada somente a albumina, sem a utilização de solvente. Possui a vantagem de não precisar uso concomitante de medicamentos para reações de hipersensibilidade ligadas ao solvente. Além disso, pode ser administrado em doses maiores e em menor tempo do que o paclitaxel (KUNDRANDA; NIU, 2015).

Aliadas ao tratamento, terapias direcionadas como inibidores de BRAF, o vemurafenibe e o dabrafenibe, estão sendo utilizadas para melanomas metastáticos com mutação BRAF e irressecáveis. No entanto, os pacientes podem desenvolver resistência secundária aos medicamentos em curto período. Entre os tratamentos mais eficazes para o melanoma metastático estão os inibidores do ponto de controle imunológico, o anticorpo anti-CTLA-4 (ipilimumabe) e dois anticorpos anti-PD-1 (nivolumabe e pembrolizumabe). Quando utilizado o ipilimumabe, 20% dos pacientes tiveram uma sobrevida de 10 anos, visto que a taxa média em pacientes com melanoma em estágio IV é de menos de um ano. O pembrolizumabe e o nivolumabe

mostraram uma taxa de sobrevida de 74% e 73%, respectivamente, em 12 meses (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Os inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (bevacizumabe e ramucirumabe) também são utilizados como terapia para o melanoma, visto que, é o principal responsável pela angiogênese em tumores. Além disso, podemos citar o uso de anticorpos para os receptores de crescimento epidérmico (cetuximabe e panitumumabe), evitando assim que as células malignas entrem em proliferação desregulada e constante, aumentando o tamanho do tumor. Apesar da grande importância para o tratamento do melanoma, todos os agentes quimioterápicos podem trazer agravos para a saúde, como nefrotoxicidade (JAGIELA; BARTNICKI; RYSZ, 2021).

Já o prognóstico para o melanoma pode ser determinado pela espessura do tumor (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). Além disso características como taxa mitótica, a presença de ulceração, sítio anatômico e, em menor extensão, o nível de invasão de Clarck e características como idade e sexo podem influenciar no prognóstico do paciente (SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011). Segundo Clarck (1969), o prognóstico está relacionado a profundidade da invasão, ou seja, nível da pele envolvido (nível de invasão de Clarck) (CLARCK et al., 1969).

Dentre os marcadores para definir o prognóstico para o paciente, encontra-se o marcador de proliferação Ki-67, proteína envolvida na transcrição ribossomal, que é altamente expressa em melanomas agressivos. Outro marcador é a fosfohistona H3, um marcador mais específico que a Ki-67, pois mostra células que realmente estão em mitose, por estar associada a condensação da cromatina na fase G2/M do ciclo celular. Além disso, são levados em conta os marcadores sorológicos, como a atividade da lactato desidrogenase (LDH), que é indicador de prognóstico altamente relevante em melanomas, pois é o responsável por catalisar a conversão do piruvato em lactato no ambiente tumoral pobre em oxigênio. A elevada atividade da LDH em paciente com melanoma em estágio IV indica uma menor probabilidade de sobrevivência ao paciente (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

1.4 APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO

A morte celular pode ocorrer por necrose ou apoptose, desencadeando inflamação e aumento da expressão de citocinas. A necrose é a morte celular acidental e passiva resultante de distúrbios com liberação descontrolada de substâncias inflamatórias pela célula (FINK; COOKSON, 2005). Já a apoptose é descrita como a morte ativa, regulada e programada, impedindo o início da inflamação (HASSAN et al., 2014). Sabe-se que diferentes estímulos e rotas intracelulares podem desencadear a apoptose. Entre eles, destacam-se as vias canônicas, ativação de receptores, insuficiência de fatores de crescimento, presença de toxinas, estresse oxidativo e vias mediadas por cálcio [influxo através de canais da membrana plasmática ou liberação do retículo endoplasmático (RE)]. Adicionalmente, é válido mencionar que a liberação de citocromo c (a partir de mitocôndrias) para o citosol é um requisito para a apoptose (MATTSON; CHAN, 2003).

A apoptose é um mecanismo de manutenção da homeostase tecidual, eliminando células nocivas, danificadas ou desnecessárias e controlando a proliferação celular anormal (GOLDAR, et al., 2015). As vias de indução da apoptose podem bloquear a carcinogênese, enquanto que a desregulação das vias apoptóticas poderão promover a tumorigênese e inclusive tornar as células resistentes aos tratamentos (HASSAN et al., 2014).

A apoptose pode ser ativada por duas vias: a extrínseca, onde o fator de necrose tumoral recruta a proteína FADD e as caspases 8 e 10 em complexos, ou pela via intrínseca ou mitocondrial, quando o estresse ativa proteínas Bax e Bak que são pró-apoptóticas, que inibem Bcl-2, o citocromo c é liberado da mitocôndria e se liga a proteína Apaf-1 e a caspase 9. Essas caspases iniciais podem ativar as caspases efetoras (caspase-3, caspase-6 e caspase-7), que iniciam a quebra de proteínas e DNA celulares culminando na apoptose (ADAMS; CORY, 2007).

A expressão de Bcl-2 e Bax, assim como a regulação da parada celular e da morte celular são controladas por p53. Sobre Bax, a p53 promove uma regulação positiva. Ainda, p53 pode ativar a apoptose por vias que dependam ou não de transcrição, ou sob estresse induzir a parada do ciclo celular e a apoptose (HASSAN et al., 2014). Além disso, quando há dano ao DNA, o mecanismo de reparo é iniciado com a ativação de p53 (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000).

Por outro lado, as células cancerígenas podem evadir da apoptose, pela alteração dos componentes envolvidos na via apoptótica, durante a transcrição, tradução e pós-tradução. As proteínas anti-apoptóticas são mais expressas em células cancerosas para superar sinais de estresse. Essa maior expressão está relacionada a recorrência, prognóstico e resistência terapêutica (GOLDAR et al., 2015).

Uma das rotas para aumentar o metabolismo e proliferação celular é por meio da ativação da cinase regulada por sinal extracelular (ERK). O fato da glicólise e a fosforilação oxidativa estarem aumentadas reflete diretamente na agressividade das células tumorais, na capacidade de crescimento e formação de metástases (LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020). Além disso, as MPAKs ERK e p38 tem função de regular a liberação do ectodomínio mediado pela enzima de conversão do fator de necrose tumoral- α (TACE). A liberação desse ectodomínio é um mecanismo crítico para regular a função de ligantes e receptores ancorados na membrana, como o receptor TNF1 (TNF-R1) e o receptor do TNF2 (TNF-R2) (KATAOKA, 2009).

A inibição de TACE reverte a ativação do fator nuclear de transcrição- κ B (NF- κ B) induzida por TNF- α . ERK e p38 são responsáveis por induzir a liberação do ectodomínio TNF-R1 via TACE, evitando assim a via de sinalização de NF- κ B dependente de TNF-R1. Inibição de TACE aumenta a apoptose induzida por TNF- α . Portanto, a ativação de ERK e p38 aumenta TACE, que regula negativamente TNF-R1, necessário para a ligação de TNF- α , conferindo resistência à apoptose ou retardando o início de apoptose induzida por TNF- α (KATAOKA, 2009).

Envolvido na apoptose, o TNF- α (uma citocina pró-inflamatória) é responsável por desencadear a ativação de NF- κ B. Quando ele se liga a dois receptores diferentes, conhecidos como TNF-R1 e TNF-R2, induzindo assim uma variedade de genes envolvidos na inflamação, imunidade inata e adaptativa, sobrevivência e morte celular, bem como o desenvolvimento e progressão do câncer, dependendo do receptor ao qual se ligar. Após a ligação de TNF- α ao TNF-R1, o domínio TNF-R1 interage com o domínio de morte da proteína adaptadora (TRADD), proteína adaptadora Fas (FADD), ativando caspases (KATAOKA, 2009).

As diferentes citocinas são proteínas produzidas não somente por células imunes, para modular as vias de sinalização, como as responsáveis pela maturação, diferenciação, migração celular, sobrevivência e respostas antitumorais (KWAŚNIAK et al. 2019). A interleucina 6 (IL-6) tem funções pró-inflamatórias em respostas a

infecções ou lesão, atuando na diferenciação de células T, porém quando produzida em excesso gera inflamação crônica, levando a artrite e osteoporose (LEE et al., 2021).

Ainda, para a apoptose há de se considerar o estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio que ocorre entre os sistemas oxidante e antioxidante. Este desequilíbrio favorece o aumento das ERO. Essas ERO englobam as espécies radicalares também chamados de radicais livres (apresentam elétrons desemparelhados na sua camada eletrônica) e as espécies não radicalares (não apresentam elétron desemparelhado na sua camada eletrônica) (PISOSCHI; POP, 2015). Derivadas do oxigênio molecular, dentre as ERO temos o radical superóxido (O_2^{\cdot}), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que causam vários danos e morte às células (CHEN et al., 2008) quando produzidas em grandes quantidades, nos diferentes compartimentos celulares, incluindo as mitocôndrias (JONES IV et al., 2016).

As ERO são geradas constantemente no metabolismo aeróbico normal das células e os efeitos biológicos dessas espécies vão ser dependentes da sua concentração (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Níveis baixos de ERO são necessários para a regulação fisiológica da célula (sinais de transdução, proliferação celular, diferenciação, apoptose, etc.). No estresse oxidativo, há o aumento dessas espécies, e esse aumento é citotóxico, podendo causar morte celular, mutações e carcinogênese (WEYDERT; CULLEN, 2010).

Células tumorais produzem maiores níveis de ERO quando comparadas a células normais. Assim, como uma célula normal, a célula cancerígena também possui um sistema antioxidante, que reduz as ERO para níveis toleráveis (CHEN et al., 2008). A produção mitocondrial de ERO pode desempenhar seu papel na morte celular por causar permeabilidade mitocondrial e alterar o potencial de membrana (CHEN et al., 2009).

O sistema enzimático com as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e peroxiredoxinas atua diretamente na redução da oxidação. A enzima SOD converte o O_2^{\cdot} em H_2O_2 (SIES et al., 2017), enquanto a CAT e GPx transformam o H_2O_2 em oxigênio e água (WEYDERT; CULLEN, 2010). A ação das enzimas CAT e GPx é de grande importância, uma vez que o H_2O_2 , por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais

ferro e cobre, gera o radical $\text{OH}\cdot$ contra o qual não há sistema enzimático de defesa (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

O papel do sistema antioxidante é impedir a geração endógena de oxidantes, evitando os danos oxidativos a biomoléculas, inclusive dano a nucleobases de DNA e RNA (LÓPEZ et al., 2012; AHMED et al., 2015; SIES et al., 2017). Um dos danos oxidativos é a lipoperoxidação que forma muitos produtos secundários, dentre eles o malondialdeído (URSO; CLARKSON, 2003). A lipoperoxidação modifica a conformação química inicial dos ácidos graxos poli-insaturados e, conseqüentemente, altera a coesão, a fluidez, a permeabilidade e as funções metabólicas das células (LIOCHEV, 2013).

Quando a oxidação ocorre em proteínas são produzidos derivados carbonilados, resultado da oxidação das cadeias laterais de diversos aminoácidos (DALLE-DONNE et al., 2006). Os marcadores de oxidação proteica incluem os grupos tiois proteicos e os grupos carbonilados (JACKSON, 1999; FIRUZI et al., 2006; VINCENT et al., 2007).

1.5 SISTEMA PURINÉRGICO

Burnstock, em 1972, propôs que os nucleotídeos seriam responsáveis pela sinalização extracelular e o intitulou como sistema purinérgico (BURNSTOCK, 1972). Posteriormente, em 1976, Burnstock pela primeira vez descreveu receptores purinérgicos (BURNSTOCK, 1976), que só foram diferenciados nos anos seguintes (BURNSTOCK, 1978; VAN CALKER et al., 1979; BURNSTOCK E KENNEDY, 1985; LUSTIG et al., 1993; WEBB et al., 1993; BRAKE et al., 1994; VALERA et al., 1994; FREDHOLM et al., 2001). Divididos em P1 e P2, os receptores purinérgicos do subtipo P1 são receptores seletivos de adenosina (A_1 , A_2A , A_2B e A_3), acoplados a diferentes proteínas G, e modulam as vias da fosfolipase C ou da adenilato ciclase. Os receptores de nucleotídeos intitulados P2, incluem receptores metabotrópicos e ionotrópicos, P2Y e P2X, respectivamente (DI VIRGILIO et al., 2018; CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020), e são seletivos para ATP, ADP e 5'-trifosfato de uridina (UTP) (BURNSTOCK; KNIGHT; GREIG, 2012).

A sinalização purinérgica interage com várias moléculas de sinalização, modulando diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação e morte (BURNSTOCK; KNIGHT; GREIG, 2012). Os purinorreceptores P1, P2X e P2Y são

expressos em todas as partes do corpo, incluindo os sistemas nervoso, circulatório, respiratório, imunológico, urinário e outros. Tanto a desregulação dos níveis de nucleotídeos extracelulares, quanto a alteração na expressão dos purinorreceptores levam a várias doenças neurológicas, reumáticas, cardiovasculares, câncer e outras condições patológicas (HUANG et al., 2021). Além disso, o microambiente tumoral é rico em fatores de crescimento e citocinas, bem como em adenosina 5'-trifosfato extracelular (ATP) e adenosina (ADO) (BELLEFEUILLE; MOLLE; GENDRON, 2019). Diferentes subtipos de receptores P1 e P2 estão envolvidos no câncer de pele, atuando na diferenciação, apoptose e proliferação dessas células (BURNSTOCK, 2017).

Sabe-se que as células tumorais podem inibir a resposta imune por meio de atividade do sistema purinérgico, modulando a atividade de NTPDase (CD39) e 5'-nucleotidase (CD73), que são responsáveis por converter o ATP em ADO (ARAB; HADJATI, 2019). Inclusive, a capacidade de formar metástases tem sido associada à sinalização purinérgica (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020).

O ATP é geralmente encontrado em altas concentrações intracelulares, mas quando as concentrações extracelulares aumentam pode ocorrer a ativação da via inflamatória, que pode levar as células a morte (por necrose ou apoptose) e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Essa liberação exacerbada de ATP pela célula pode ser devido a lise, apoptose ou por canais químicos, mecânicos ou parácrinos em células vivas (BURR; PAREKKADAN, 2019).

Em relação as concentrações de ATP, quando a concentração extracelular de ATP está baixa, o receptor purinérgico P2 irá mediar a resposta, para concentrações intermediárias o P_2X_1 e o P_2Y_2 , já quando o nível de ATP está muito alto a resposta será mediada pelo receptor P_2X_7 (BURR; PAREKKADAN, 2019). A ativação do P_2X_7 por meio de agonistas demonstrou aumentar a apoptose em células tumorais (WHITE; BURNSTOCK, 2006). No entanto, há uma discrepância em alguns estudos, mostrando que a liberação de ATP e a ativação do receptor P_2X_7 aumentaria a migração, proliferação e sobrevivência de células de câncer de pulmão (TAKAI et al., 2014).

De acordo com Di Virgilio et al. (2016) o receptor P_2X_7 possui bifuncionalidade, logo, quando estimulado em altas doses de ATP teria efeito citotóxico, e quando a estimulação basal teria efeito trófico (DI VIRGILIO et al., 2016). No entanto, o

ambiente tumoral possui níveis elevados de ATP extracelular (DI VIRGILIO et al., 2016; DI VIRGILIO et al., 2018; BELLEFEUILLE; MOLLE; GENDRON, 2019) e P_2X_7 , embora não apresente efeitos citotóxicos ao tumor (DI VIRGILIO et al., 2016).

O receptor P_2Y_{11} ativado por ATP também participa do aumento da proliferação e migração celular (BELLEFEUILLE; MOLLE; GENDRON, 2019), bem como da diferenciação de células tumorais (WHITE; BURNSTOCK, 2006). A sinalização induzida por ATP pelo receptor P_2Y_{11} aumenta as concentrações intracelulares de $[Ca^{2+}]_i$ e induz a migração de células de carcinoma hepatocelular humano (KHALID et al., 2017).

A migração celular é importante para o desenvolvimento embrionário e a reparação de tecidos. Porém, quando a migração acontece em células tumorais é responsável pela formação de metástases, o que gera tumores secundários, conhecida como atividade metastática (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020).

Para a modulação da ADO existem os receptores nucleosídicos, que são quatro diferentes receptores P_1 , designados A_1 , A_2A , A_2B e A_3 , todos são glicoproteínas transmembrana acopladas à proteína G (ARAB; HADJATI, 2019; YAAR et al., 2005). Após a CD39 e a CD73 degradarem ATP / ADP e AMP, respectivamente, gerando ADO, a adenosina desaminase (ADA) é responsável pela degradação de ADO em inosina, etapa final da cadeia enzimática (DI VIRGILIO et al., 2016; DWYER; KISHORE; ROBSON, 2020). A inosina pode ser capturada pelos receptores P_1 purinérgicos, o que parece ser uma tática celular para remover as concentrações patológicas de ADO (ALLARD et al., 2020).

Além de gerar ADO, que desempenha importante papel no imunoescape tumoral, a CD73 também está envolvida na adesão, mediando propriedades invasivas e metastáticas dos cânceres, uma vez que sua superexpressão está associada à resistência a agentes antitumorais. Nesse sentido, Zhu e colaboradores (2017), após silenciar a CD73 em câncer de pulmão, encontraram uma diminuição na proliferação e migração de células tumorais (ZHU et al., 2017). Ainda, foi demonstrado anteriormente que camundongos deficientes em CD73 têm uma taxa reduzida de crescimento de fibrossarcoma induzido e que os anticorpos anti-CD73 diminuíram a proliferação tumoral e a metástase no câncer de próstata (STAGG et al., 2012).

A ADO é conhecida por se ligar aos receptores P_1 e estimular a proliferação tumoral (PIETROBONO et al., 2020). Os receptores P_1 são acoplados às proteínas

G, onde A_1 e A_3 inibem a atividade da adenilato ciclase de forma inibitória e A_2A e A_2B de forma estimuladora, o que causa aumento do monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) (BURNSTOCK; KNIGHT; GREIG, 2012). Já a ativação do receptor A_2A é conhecida por ocasionar metástase e um mau prognóstico para os pacientes (LOI et al., 2013).

A diminuição de ATP pela degradação do sistema purinérgico, formando ADO, pode ser uma explicação para o ATP não ter efeitos tóxicos no ambiente tumoral, uma vez que ADO estimula a proliferação celular quando se liga a receptores P1. Altos níveis de ATP são pré-requisitos bioquímicos para o acúmulo de ADO no ambiente tumoral (DI VIRIGILIO et al., 2016).

A regulação dos níveis de ATP, ADP e AMP, também pode ser realizada pela proteína cinase ativada por AMP (AMPK). AMPK é um complexo heterotrimérico ($\alpha\beta\gamma$), com 12 combinações possíveis entre as subunidades. A subunidade α é catalítica enquanto a β e γ são regulatórias. A regulação dos níveis de ATP, ADP e AMP é realizada pela subunidade γ , atuando como um sensor de energia da célula (HERZIG; SHAW, 2018). Além disso, a subunidade α é ativada por modificações oxidativas, decorrentes do estresse oxidativo (ZMIJEWSKI et al., 2010).

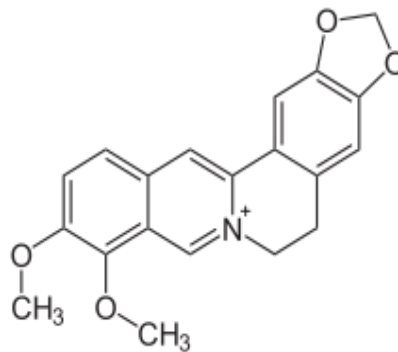
Eichner e colaboradores (2019), quando estudaram câncer de pulmão em um modelo murino, utilizaram animais com deleção de AMPK. Em sua análise, eles demonstraram que a deleção de AMPK suprime a tumorigênese pulmonar, evidenciada em nível histológico, com uma diminuição na carga de tumor pulmonar (EICHNER et al., 2019). Adicionalmente, pesquisadores demonstraram um atraso na leucemogênese em um modelo com deleção AMPK (SAITO et al., 2015).

Zmijewski e colaboradores (2010), após incubarem células HEK 293 com H_2O_2 (250 μM) por 30 min, encontraram uma redução de aproximadamente 30-40% nos níveis de ATP intracelular. H_2O_2 é um ativador AMPK, como as ERO. Outro achado importante mostrado no estudo de Zmijewski e colaboradores (2010), foi que a ativação e oxidação da subunidade AMPK α estava presente antes que houvesse mudanças nas concentrações de ADP e ATP ou na razão ATP / ADP (ZMIJEWSKI et al., 2010).

1.6 BERBERINA

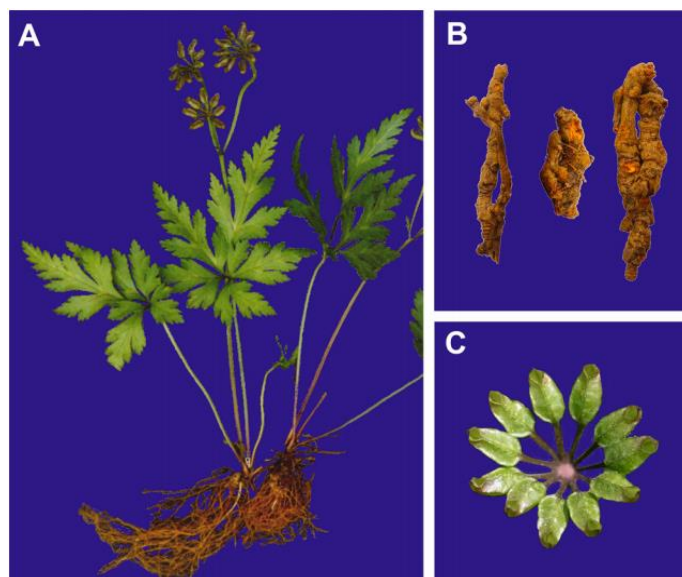
A Berberina (BBR), 5,6-dihydro-9,10-dimethoxy-benzo (g)-1,3-benzodioxolo(5,6-a) quinolizinium-, chloride (Figura 6), um alcaloide isoquinolina, é um composto encontrado em diversas plantas medicinais como *Hydrastis canadensis*, *Coptis chinensis*, *Berberis aquifolium*, *Berberis vulgaris* e *Berberis aristata*. A BBR pode ser extraída de raízes, rizomas e cascas do caule destas plantas (Figura 7) (CHEN et al., 2012).

Figura 6- Estrutura química da Berberina



Fonte: Adaptado de AHMED, T. et al., 2015.

Figura 7- A: *Coptis chinensis*; B: rizoma seco; C: carpelos.



Fonte: Adaptado de XIANG, K. et al., 2016.

A BBR tem sido estudada em diversas doenças, incluindo hiperlipidemia, diabetes melito, síndrome do ovário policístico, obesidade, doença hepática gordurosa, doença arterial coronariana, gastroenterite, dor e diarreia. Esse composto tem demonstrado um amplo espectro de aplicações clínicas (TILLHON et al., 2012), com atividade antimicrobiana e antiprotzoária (CHEN et al. 2020), antidiabético e anti-hiperglicêmico (HABTEMARIAM, 2020), anticancerígeno (SHEN et al., 2021), hiperlipidemia e hipercolesterolemia (OCH; PODGÓRSKI; NOWAK, 2020), na hipertensão (CAI, et al. 2021) e na insuficiência cardíaca (ABUDUREYIMU et al., 2020). A BBR protege células mensequimais da apoptose induzida por hipóxia, e no trauma cerebral induzido sendo capaz de reduzir o dano cerebral e edema, demonstrando assim uma ação neuroprotetora (ZHANG et al., 2009; CHEN, C.C. et al., 2014).

A BBR também possui ação protetora em ratos submetidos ao modelo de indução de demência do tipo Alzheimer com estreptozotocina (DE OLIVEIRA et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019). Além disso, foi observado que a BBR tem a capacidade de reverter a toxicidade de droga anticâncer ifosfamida, por diminuir a perda de peso e mortalidade induzida pela droga em ratos, melhorando os perfis antioxidantes e apresentando efeitos protetores sobre as funções renais, hepáticas, neurais e cardíacas (ILYAS et al., 2021).

Ao pesquisar se a BBR teria efeitos prejudiciais em células não tumorais, Qi e colaboradores (2014), utilizando diferentes concentrações de BBR (20, 40, 80 e 160 μM), por 48 e 72 horas, não observaram efeitos citotóxicos em células epiteliais brônquicas. Além disso, EI-Wahab e colaboradores (2013) verificaram que o cloreto de BBR e o extrato etanólico de bérberis em concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$ não mostraram efeito inibitório sobre a viabilidade de células sanguíneas normais.

Em contraste, quando a BBR foi pesquisada em células tumorais, observou-se que interfere em características da tumorigênese e desenvolvimento do tumor, inibindo a proliferação celular e a indução da parada do ciclo celular nas fases G1 ou G2, e início da apoptose. Também ativa AMPK que regula vias metabólicas (JIANG et al., 2017). Em glioblastoma multiforme demonstrou propriedades antitumorais, diminuindo a viabilidade das células tumorais e aumentando a apoptose, no entanto, não foi observado influência de AMPK na indução de apoptose, ou modulação de proteínas envolvidas nesse processo (PALMA et al., 2020).

A BBR inibe o complexo I da cadeia respiratória, o que impede a produção de ATP mitocondrial, com aumento da adenosina 5'-monofosfato (AMP) e consequente ativação da AMPK (TURNER et al., 2008). Foi demonstrado que em linhagens de melanoma A375, M8, SK-MEL-19, a BBR aumentou a produção de ERO e induziu a apoptose celular (WANG et al., 2021).

Além disso, a BBR aumenta a produção de ERO em células de câncer de mama, MCF-7 and MDAMB-23 (XIE et al., 2015), e em PANC-1 e células MIA-PaCa2, de câncer pancreático humano (PARK et al., 2015). Altera o potencial de membrana mitocondrial pela produção de ERO, sendo que essa alteração pode causar a liberação do citocromo c, desencadeando a apoptose nas células cancerosas. Ainda, ela foi capaz de interagir com ácidos nucleicos e p53 (TILLHON et al., 2012).

Quando Zheng e colaboradores (2014), testaram a BBR em células de câncer de pulmão, notaram que houve um aumento de p53, junto com aumento da apoptose e fosforilação de p38 e ERK. O aumento em p53 ocorreu via p38 MAPK / FOXO3a via, sem envolvimento de ERK. Além disso, quando o inibidor para p38 MAPK foi usado, houve uma diminuição nas células nas fases S e G2 do ciclo celular, que não aconteceu para o inibidor ERK. Somado a isso, na presença de um inibidor de p53, a BBR não foi eficiente em diminuir viabilidade e interromper o ciclo celular. O inibidor de p53 bloqueou o efeito da BBR (ZHENG et al., 2014).

Em um estudo com carcinoma hepático avançado, a BBR diminuiu a viabilidade celular das células cancerígenas de modo dependente da concentração em comparação com hepatócitos normais. A BBR aumentou a ativação de AMPK, e esse aumento foi acompanhado por efeitos apoptóticos, que ocorreram de modo dependente de caspase através da via mitocondrial que foi acoplada com a liberação do citocromo c, ativação das caspases 9 e 3, e ainda aumentou a proporção de Bax/Bcl-2 de forma dependente da concentração (YANG; HUANG, 2013).

A BBR ainda possui a capacidade de formar complexos com DNA e RNA, gerando danos em células malignas (ORTIZ et al., 2014). Um estudo com osteossarcoma demonstrou que a BBR foi capaz de causar a fragmentação do DNA das células cancerosas (ZHU et al., 2014). E em outra pesquisa com células tumorais, foi observado que a BBR pode causar dano ao DNA por meio da produção de ERO, esse dano ao DNA é responsável por gerar a morte celular (CHEN, T.C. et al., 2009).

Em melanoma, a BBR demonstra efeitos na diminuição da viabilidade em células A375 (REN et al., 2020) e B16 (KOU et al., 2016; LIN et al., 2020). Quando avaliada sua capacidade antimetastática em células A375.S2 foi verificado que a BBR induz alterações morfológicas e reduz o número de células viáveis, além de inibir a migração e invasão das células (LIU et al., 2018). Em células SK-MEL-19 e A375 de melanoma, foi encontrado que a BBR diminui a viabilidade celular, aumenta a produção de ERO, com aumento da apoptose e de proteínas pró-apoptóticas (FANG et al., 2021).

2 JUSTIFICATIVA

O melanoma é considerado a forma mais letal de câncer de pele, causa a maioria (75%) das mortes relacionadas à pele. Esse tumor possui alta capacidade de formar metástases. Os pacientes com melanoma geralmente apresentam resistência às terapias utilizadas, além de desenvolverem reações adversas ao tratamento, inclusive nefrotoxicidade. Levando-se em consideração essa alta taxa de mortalidade para apenas uma doença e dificuldades apontadas em relação ao tratamento, torna-se necessário a pesquisa e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que contribuam para gerar a remissão desse tumor. Para isso, é necessário avaliar a capacidade de compostos na morte das células de melanoma, e que sejam capazes de regular as moléculas envolvidas na proliferação, ciclo celular, migração, invasão e resposta imune dessas células tumorais. O composto BBR demonstrou propriedades antitumorais, interferindo em características da tumorigênese e desenvolvimento, além de ser elencado a vários efeitos benéficos em diversas patologias. Desta forma, considerando o fato do melanoma ser um câncer de alta letalidade, e sabendo que a BBR mostra-se influenciar na progressão de tumores, o presente estudo buscou demonstrar por quais mecanismos esse composto age em células de melanoma SK-MEL-28.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos antitumorais da BBR na linhagem celular SK-MEL-28 de melanoma humano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Na linhagem celular SK-MEL-28 tratada e não tratada com BBR foi avaliado:

- A viabilidade celular;
- A morte/apoptose celular;
- O ciclo celular;
- Índice de dano no DNA;
- A via apoptótica canônica (quantificação de p-p53, p-p38 e caspase 3 total e ativada, ERK);
- Citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF);
- Função mitocondrial e espécies reativas de oxigênio (ERO);
- Atividade de enzimas antioxidantes.

B) Na linhagem celular SK-MEL-28 tratada e não tratada com BBR, com o uso concomitante ou não do inibidor de AMPK, foi avaliado:

- Migração celular;
- Expressão das enzimas (NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA);
- Expressão dos receptores do sistema purinérgico (P2X7, P2Y11; A1 e A2A);
- Atividade das ectonucleotidases, NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA.

4 METODOLOGIA

4.1 LINHAGEM CELULAR, CULTURA CELULAR E COMPOSTO

A linhagem celular SK-MEL-28 de melanoma cutâneo humano (Code BCRJ: 0289- ATCC: HTB-72) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil. Foi mantida em meio de incubação Dulbecco's Modified Eagle Medium- DMEM (Life Technologies), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (15,140-122; Gibco) e 10% de soro bovino fetal – SBF (Invitrogen), em garrafas de cultura, e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂.

O composto BBR foi adquirido da Sigma-Aldrich.

O composto C (inibidor de AMPK) foi adquirido da Cayman Chemicals Company (14050, 11967).

4.2 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR E TRATAMENTO

A viabilidade celular foi determinada utilizando o método de análise colorimétrica através do ensaio do MTT [sal 3- (4,5-*dimethyl-2-thiazoly*) - 2,5-*diphenyl-2H-tetrazolium bromide*] (MOSMANN, 1983). As células foram cultivadas em placa de 96 poços na densidade de 1×10^5 células/mL, em 100 µL de meio de crescimento com o tratamento nas diferentes concentrações de BBR (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 µM), e incubadas em estufa de CO₂ a temperatura de 37°C, por 24, 48 e 72 horas.

Após o período de incubação, foram acrescentados 40 µL de MTT (solução de 5 mg/mL) em cada poço. Transcorrido 60 minutos de incubação a 37°C e 5% CO₂, foi retirada a solução de MTT e adicionado 120 µL/poço de DMSO para a solubilização dos cristais de formazam. Em seguida foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda 570 nm.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR

Para quantificação da morte celular, as células foram cultivadas em placa de 96 poços na densidade de 2×10^5 células / mL, em 100 µL de meio de crescimento com o tratamento BBR de 50 µM. Após 24 horas de incubação, o iodeto de propídio foi adicionado e fotografado sob um microscópio de fluorescência.

4.4 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR ANEXINA E IODETO DE PROPÍDIO, QUANTIFICAÇÃO DE CASPASE 3 TOTAL E ATIVADA, FOSFO-p38, FOSFO-p53, ERK, CD39, CD73, ADA₁, P₂X₇, P₂Y₁₁, A₁ E A₂A

Para a avaliação da indução de apoptose pela BBR, bem como, suas vias de sinalização, a linhagem celular foi cultivada em placas de 6 poços na densidade de 2×10^5 células/mL. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS e removidas dos poços com uma solução de tripsina/EDTA (0,2%/0,02%) deixando a solução agir por 5 minutos em estufa de 5% CO₂ a 37°C. A ação da tripsina foi neutralizada pela adição de meio DMEM com 10% SFB. Posteriormente, as células foram centrifugadas, descartado o sobrenadante e o sedimento celular foi ressuspenso com 200 µL de tampão de ligação (10 mM de HEPES, 140 mM de NaCl, 2,5 mM de CaCl₂ e 1 µL de Anexina-V). Em seguida, os tubos foram incubados em gelo por 15 minutos, acrescidos de iodeto de propídio e mensurados em citômetro de fluxo, sendo adquirido 30.000 eventos.

Paralelamente, outras amostras de células individualizadas em suspensão foram fixadas em 4% de paraformaldeído (PFA) em PBS por 20 minutos. Sequencialmente, as amostras foram incubadas em PBS contendo 3% de SFB para bloqueio dos sítios inespecíficos e 0,1% de Triton X-100 para permeabilizar as membranas celulares por 20 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas nessa mesma solução com os anticorpos primários anti-fosfo-p53 *rabbit* (Sigma-Aldrich), anti-fosfo-p38 *rabbit* (Cell Signaling Molecular Technology), anti-caspase 3 *rabbit* (Cell Signaling Technology), anti-ativada-caspase 3 *rabbit* (Sigma-Aldrich), and anti-ERK 1/2 *rabbit* (Santa Cruz Biotechnology), anti-CD39, anti-CD73, anti-ADA, anti-P₂X₇, anti-P₂Y₁₁, anti-A₁e anti-A₂A (BD Pharmingen TM) nas diluições indicadas pelo fabricante. Após 30 minutos de incubação com anticorpo primário a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS e incubadas novamente por 30 minutos com os anticorpos secundários conjugados a fluoróforos (Alexa Fluor 488/647, Invitrogen). Por fim, as células foram lavadas e ressuspenso em 500 mL de PBS para aquisição dos dados no citômetro de fluxo, sendo adquiridos no mínimo 30.000 eventos por amostra.

4.5 CICLO CELULAR

Após o período de tratamento, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS e removidas dos poços com uma solução de tripsina/EDTA (0,2%/0,02%) deixando a solução agir por 5 minutos em estufa de 5% CO₂ a 37°C. A ação da tripsina foi neutralizada com a adição de meio com 10% de SFB. As células foram fixadas com etanol 70% e marcadas com uma solução de iodeto de propídio (PI) (0,1% Triton, 0,5% Tween, 10 µg/mL PI) para determinar o ciclo celular. Após, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Para a determinação das citocinas foi utilizado BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Cytokine Kit, onde os níveis de interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-17A (IL-17A), interferon-γ (IFN-γ) e fator de necrose tumoral-α (TNFα) foram analisados. Os ensaios proporcionam um método de captura de um analito solúvel ou conjunto de analitos com dimensões e fluorescência conhecidas, utilizando citometria de fluxo (Kit BD CBA Human Cytokine Kit) de acordo com instruções do fabricante.

4.7 ENSAIO DO COMETA ALCALINO

O ensaio do cometa alcalino foi utilizado para verificar a genotoxicidade da BBR, de acordo com o método previamente descrito por Singh e colaboradores (1988) e seguindo técnica de coloração com nitrato de prata proposta por Nadin e colaboradores (2001). Brevemente, as amostras foram ressuspensas inicialmente em 0,7 % de agarose de baixo ponto de fusão e colocadas sobre lâminas de vidro previamente cobertas com 1% de agarose e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise a 4°C. Na etapa de eletroforese, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal e cobertas com uma solução (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH>13) por 20 minutos e, após esse período, uma corrente elétrica de 25 V e 300 A foi aplicada pelos mesmos 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas passaram pelas etapas de neutralização, fixação e posterior coloração com nitrato de prata. Para a análise, foi utilizado um score de dano padronizado, que vai do menor dano (0), até o dano máximo (4) e os resultados foram expressos como índice de dano relativo ao

controle. As amostras foram processadas em duplicata e todas as lâminas foram analisadas por, no mínimo, dois observadores treinados.

4.8 FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

A avaliação da função mitocondrial foi realizada usando o kit MitoTracker Green FM (Invitrogen). Após 24 horas de tratamento com 50 μM de BBR, as amostras foram incubadas com 100 nM de Mitotracker Green por 45 min. Depois disso, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Para quantificação de ROS, 2', 7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA, 10 μM , 30 min) foi incubado com células. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, com pelo menos 30.000 eventos por amostra sendo adquirida.

4.9 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) E SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Atividade da CAT foi medida segundo método Aebi (1984), que quantifica a decomposição do H_2O_2 em 240 nm, ao ser adicionado na amostra. A atividade da SOD foi medida com base na inibição da reação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ com adrenalina como descrito por Spitz e Oberley (1989).

4.10 TIOIS TOTAIS E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

O total de grupos tiois foi analisado espectrofotometricamente através do método de Ellman (1959) e Boyne (1972), com algumas modificações. Uma alíquota de 200 μL de amostra em um volume final de 900 μL de solução foi utilizada para a reação, a qual foi lida a 412 nm após a adição de 10 mM de DTNB (5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico)) (0,05 mL). Uma curva padrão foi usada para calcular os níveis de grupos tiol nas amostras. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol SH/ mL}$ de proteína.

A GSH foi medida espectrofotometricamente com o reagente de Ellman. As amostras foram misturadas (1:1) com 10% de ácido tricloroacético e centrifugadas a 4000 x g durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento de proteína foi descartado e os grupos NPSH livres foram determinados no sobrenadante. As amostras foram adicionadas em um sistema que contém tampão de fosfato de potássio 1 M, pH 7,4, e 5,5 mM, e após a adição de 10 mM de DTNB. O produto da

reação foi medido a 412 nm. Uma curva padrão utilizando GSH foi usada para calcular o teor de grupos tiois não proteicos em amostras, e foi expressa como nmol de GSH/mL.

4.11 PROTEÍNAS TOTAIS

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), que utiliza albumina bovina como padrão. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 595 nm.

4.12 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

A avaliação da capacidade de migração foi realizada de acordo com a metodologia de Burk (1973). As células SK-MEL-28 foram incubadas em placas de 24 poços com meio DMEN suplementado com 10% de SFB, até se observar confluência das células. Após ser feito um risco com ponteira estéril na região central do poço para remoção mecânica das células. As células foram expostas a BBR (50 μ M) ou ao composto C (10 μ M) sozinho ou em conjunto durante 24 horas. As células foram fotografadas em um microscópio (Axiovert 40 CFL, Zeiss) em 0 e 24 horas e as imagens foram analisadas com o software Image J. A área de migração celular foi calculada subtraindo do valor inicial da área de arranhão final.

4.13 ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES, NTPDASE, 5'-NUCLEOTIDASE E ADENOSINA DESAMINASE (ADA)

Após a incubação com a BBR (50 μ M) ou com o composto C (10 μ M) sozinho ou em conjunto durante 24 horas, as células foram lavadas por 3 vezes com meio de incubação livre de fosfato. A reação teve início através da adição de meio de incubação contendo 2 mM de CaCl_2 , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glicose, 20 mM HEPES e os nucleotídeos (ATP e ADP) a 37°C. A concentração dos nucleotídeos foi determinada através de curva do substrato para garantir a saturação da enzima e o tempo de incubação através da determinação da linearidade da reação.

Para parar a reação foi transferida uma alíquota para um microtubo contendo ácido tricloroacético 10%. A produção de fosfato inorgânico (Pi) foi medida utilizando verde de malaquita conforme a metodologia de Schetinger e colaboradores (1995) e

Leal e colaboradores (2005), para a qual foi utilizada uma curva padrão. As atividades foram expressas em nmol Pi/min/mg de proteína. A determinação da atividade da 5'-nucleotidase foi obtida da mesma forma como para a NTPDase, exceto a substituição no meio de incubação de 2 mM CaCl₂ por 2 mM de MgCl₂ e utilizou como substrato o AMP.

A atividade da ADA foi avaliada segundo o método colorimétrico de Giusti e Galanti (1984), que consiste em quantificar espectrofotometricamente os complexos de amônia liberados por minuto, a partir da degradação de adenosina. Os resultados foram expressos em U/ mg de proteína. Uma unidade (1 U) de ADA é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de amoníaco por minuto a partir de ADO, em condições de ensaio padrão.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism (versão 6 Prism), utilizando-se *Student's* t-test, análise de variância (ANOVA) "one-way" ou "two-way" quando necessário, seguida pelo pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados desta tese apresentam-se sob a forma de um artigo científico (5.1 ARTIGO) publicado na revista *Molecular Biology Reports*, e um manuscrito científico (5.2 MANUSCRITO) que será submetido à revista *Purinergic Signalling*. Os resultados apresentados no artigo e no manuscrito representam a íntegra deste estudo.

As referências citadas ao final da dissertação referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, METODOLOGIA E DISCUSSÃO, desta tese.

5.1 ARTIGO:

Molecular Biology Reports
<https://doi.org/10.1007/s11033-021-07022-4>

ORIGINAL ARTICLE



Berberine increases the expression of cytokines and proteins linked to apoptosis in human melanoma cells

Taís Vidal Palma¹ · Nathiele Botari Bianchin¹ · Juliana Sorraia de Oliveira¹ · Charles Elias Assmann¹ · Mona das Neves Oliveira² · Maria Rosa Chitolina Schetinger¹ · Vera Maria Morsch¹ · Henning Ulrich³ · Micheli Mainardi Pillat⁴ · Cinthia Melazzo de Andrade^{1,5}

Received: 28 July 2021 / Accepted: 25 November 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Background Melanoma is the most lethal form of skin cancer, and its incidence has increased considerably in the last decades. Melanoma presents difficult treatment with strong resistance of tumor cells, due to its extremely invasive nature with high capacity to metastases. Berberine (BBR), an isoquinoline alkaloid, is a molecule found in several medicinal plants, and has been studied in several diseases, demonstrating antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory properties and anti-tumorigenic effects.

Methods and results In SK-MEL-28 cells, 50 μ M BBR treatment for 24 h decreased cell viability by 50 percent. This concentration generated cell death both by early apoptosis and necrosis, with an increase in the DNA damage index. BBR increased (* $p < 0.05$) the proportion of cells in G1/G0 phase and decreased (### $p < 0.005$) the percentage of cells in S phase. The alkaloid increased (**** $p < 0.001$) ROS production compared to untreated controls with an increase in activated caspase 3 and phosphorylated p53 protein levels. In addition, BBR significantly enhanced ERK as well as both pro- and anti-inflammatory cytokine expression compared to untreated controls.

Conclusions BBR has important antiproliferative effects and may be alone or in adjunct therapy a promising candidate for melanoma treatment, a cancer with great incidence and high lethality.

Keywords Berberine · Melanoma · Apoptosis · p-p53 · ROS · Cytokines

✉ Taís Vidal Palma
 taisvid@hotmail.com

✉ Micheli Mainardi Pillat
 micheli.pillat@ufsm.br

✉ Cinthia Melazzo de Andrade
 cmelazzoandrade1@gmail.com

¹ Department of Chemistry, Center for Natural and Exact Sciences, Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicological, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Biolinker Synthetic Biology IERLI, São Paulo, Brazil

³ Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Department of Microbiology and Parasitology, Postgraduate Program in Pharmacology and Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁵ Department of Small Animal Clinic, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria-RS, Room 121, Veterinary Hospital Building, Avenue Roraima n° 1000, Santa Maria, RS 97105900, Brazil

Introduction

Melanoma is considered the most lethal form of skin cancer, and its incidence has increased considerably in the last decades [1–3], causing 75% of skin cancer-related deaths [4]. Melanoma presents difficult treatment with strong resistance of tumor cells, due to its extremely invasive nature with high capacity to metastases, which reduces survival and increases mortality [5]. The main factor involved in the onset of melanoma is ultraviolet (UV) radiation, which accounts for approximately 65% of all melanomas [6, 7].

Berberine (BBR), 5,6-dihydro-9,10-dimethoxy-benzo(g)-1,3-benzodioxole (5, 6-a) quinolinium, chloride, an isoquinoline alkaloid, is a molecule found in several medicinal plants, such as *Canadian Hydrastis* and *Coptis chinensis* [8, 9]. BBR has been studied in several diseases, demonstrating antimicrobial, antidiabetic, and anti-inflammatory properties [10]. In addition, its effects have also been studied in tumors, showing influence on tumorigenesis and

tumor development, inhibiting cell proliferation and promoting cell cycle arrest in G1 or G2 phases and onset of apoptosis [9, 11]. BBR still has complex-forming capacities with DNA and RNA, generating DNA damage in malignant cells [12].

Tumor cells produce higher levels of ROS, even though they have an antioxidant system [13]. The mitochondrial production of ROS can trigger cell death by causing mitochondrial permeability and altering the membrane potential [14], as well as, oxidizing biomolecules, causing damage to DNA and RNA nucleobases [15–17].

BBR significantly inhibited proliferation and suppressed cell migration of the B16 melanoma cell line [18]. Moreover, treatment with BBR plus cisplatin inhibited cell growth and increased chemosensitivity, promoting cell death through the activation of ROS/p38 cascade in melanoma cancer cell lines A375, M8, SK-Mel-19 [19]. In addition, in murine melanoma cell line (B16F10), BBR inhibited cell proliferation, increased frequency of cells in the G1 and G2/M phases, accompanied by decreased S phase and increased cell death [20]. However, it remains unknown the type of cell death caused by BBR and which roles could be involved in this process.

The high mortality rate of subjects affected with melanoma evidences the need to research and develop new therapies against this tumor that contribute to the blockade or cancer remission. Since BBR has shown promising anti-tumor properties, interfering with tumorigenesis and tumor progression in previous studies, the present study demonstrated which mechanisms BBR acts in melanoma cells *in vitro*, contributing to a better understanding of its underlying mechanisms. Here, we confirm that BBR decreased viability and induces apoptosis (which occurs by p53 and caspase 3) in SK-MEL-28 cells. Furthermore, we are the first demonstrating that BBR also induces necrosis and modulates the production of cytokines.

Materials and methods

Cell line, cell culture and BBR

The human cutaneous melanoma cell line (SK-MEL-28) (Code BCRJ: 0289—ATCC: HTB-72) was acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ), Brazil. The melanoma cells were maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Life Technologies) culture medium plus penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) (15,140-122; Gibco) and 10% fetal bovine serum (FBS) (F7524; Sigma-Aldrich). The cells were plated in plastic culture flasks (25 cm²) and incubated in a cell culture incubator at 37 °C, 5% CO₂ in the atmosphere and 95% humidity. BBR was purchased from Sigma-Aldrich.

Cell viability by MTT assay and cell death testing

Cell viability was determined with colorimetric analysis method by the MTT assay [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] salt [21]. Cells were cultured in a 96-well plate (1 × 10⁵ cells/mL) overnight, in 200 µL culture medium at 37 °C and 5% CO₂ at the temperature. After that, cells were treated with BBR at different concentrations (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 and 250 µM), and incubated in a CO₂ incubator at 37 °C for 24, 48 and 72 h. After the incubation period, 200 µL of the medium was withdrawn, and 40 µL of MTT (5 mg/mL solution; Life Technologies) was added to each well. After 1 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, the MTT solution was withdrawn and 120 µL/well of DMSO was added for solubilization of the formazan salts. Absorbance measurements were performed in a spectrophotometer at 570 nm.

For cell death quantification, cells were cultured in a 96-well plate at a density of 2 × 10⁵ cells/mL, in 100 µL of growth medium with a 50 µM BBR treatment. After 24 h of incubation, propidium iodide was added and photographed under a fluorescence microscope.

Apoptosis evaluation by quantification of annexin, propidium iodide, total and activated caspase 3, phospho-p53, phospho-p38 and phospho-ERK 1/2

For apoptosis assays of SK-MEL-28 cells in the presence of BBR (50 µM; 24 h), as well as to evaluate BBR-induced signaling pathways, cells were cultured in 6-well plates (2 × 10⁵ cells/well). Then, the supernatant was discarded, and the cells were removed from the wells with a trypsin/EDTA solution (0.2%/0.02%). Trypsin activity was neutralized with the addition of medium with 10% SFB. Subsequently, cells were centrifuged, supernatants were discarded, and cell pellets were resuspended with 200 µL of Annexin V binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂ and 1 µL Annexin-V; Life Technologies). The samples were incubated at room temperature for 30 min in the presence of propidium iodide (2.5 µg/mL) and immediately acquired in BD FACSCalibur flow cytometer. Data were analyzed with Flowjo V10 software.

In order to quantify total and activated Caspase 3, phospho-p53, phospho-p38 and phospho-ERK 1/2, samples of individualized cells in suspension were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 20 min. Sequentially, the samples were incubated for 20 min in PBS containing 3% FBS, for blocking non-specific binding, and 0.1% Triton X-100 for permeabilizing cell membranes. Subsequently, cells were incubated in the same solution with the primary anti-phospho-p53 rabbit (SAB4301466; Sigma-Aldrich), anti-phospho-p38 rabbit (D3F9; Cell Signaling

Technology), anti-caspase 3 rabbit (#9662; Cell Signaling Technology), anti-activated caspase 3 rabbit (C8487; Sigma-Aldrich), and anti-ERK 1/2 rabbit (sc-101760; Santa Cruz Biotechnology) at the dilutions indicated by the manufacturer. After 30 min of incubation with primary antibody at room temperature, the samples were incubated with the secondary fluorophores-conjugated antibody (Alexa Fluor 488; A11070; Invitrogen) for 30 min. Finally, the samples were resuspended in 500 μ L of PBS for data acquisition in the flow cytometer, with at least 30,000 events being acquired per sample.

Cell cycle determination

SK-MEL-28 cells were cultured in 6-well plates (2×10^5 cells/well). After the treatment with BBR (50 μ M; 24 h), the cells were dissociated. Subsequently, the samples were fixed and permeabilized with 75% ice-cold ethanol for at least 4 h. After that, samples were centrifuged and the pellet was resuspended with 500 μ L of DNA-staining solution with PBS (0.1% Triton, 0.5% Tween, 10 μ g/mL propidium iodide). The samples were incubated for 1 h and analyzed in a flow cytometer.

Quantification of cytokines

For the determination of cytokine concentrations after 24 h of treatment with 50 μ M BBR, the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Cytokine Kit was used, where levels of interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), interleukin-17A (IL-17A), interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF α) were analyzed. The assays provide a method of capturing a soluble analyte or set of analytes with known dimensions and fluorescence, using flow cytometry (BD CBA Human Cytokine Kit) according to the manufacturer's instructions.

Alkaline comet assay

The alkaline comet assay was used to check the genotoxicity of BBR (50 μ M; 24 h), according to the method previously described by Singh and collaborators [22] and following the silver nitrate staining technique proposed by Nadin and collaborators [23]. Briefly, the samples were initially resuspended in 0.7% low melting point agarose and placed on glass slides previously covered with 1% agarose, and the slides were dipped into a lysis solution at 4 °C. In the electrophoresis stage, the slides were placed in a horizontal vat and covered with a solution of 1 mM EDTA and 300 mM NaOH, pH > 13 for 20 min. Then, an electric current of 300 A at 25 V and 300 applied for 20 min. After electrophoresis, the slides went through the stages of neutralization, fixation and subsequent staining with silver nitrate. For the analysis,

a standardized damage score was used, ranging from the lowest damage (0) to the maximum damage (4), and the results were expressed as a damage index relative to the control. The samples were processed in duplicates, and all slides were analyzed by at least two trained observers.

Assessment of mitochondrial function and ROS

The assessment of mitochondrial function was performed using the MitoTracker Green FM kit (Invitrogen). After 24 h of treatment with 50 μ M BBR, the samples were incubated with 100 nM of Mitotracker Green for 45 min. After that, the samples were analyzed in flow cytometer. For ROS quantification, 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA, 10 μ M, 30 min) was incubated with cells. The samples were analyzed in flow cytometer, with at least 30,000 events per sample being acquired.

Determination of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity

After 24 h of treatment with 50 μ M BBR, CAT activity was determined in SK-MEL-28 cells by the decomposition of H₂O₂ at 240 nm according to a method described by Aebi [24]. SOD activity was quantified according to Spitz and Oberley [25], by spectrophotometric determination of the inhibition of auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome at an alkaline pH at 480 nm in SK-MEL-28 cells. For SOD and CAT activity, the assay was performed using 10–40 μ g of protein. The results were expressed in η moles/mg of protein relative to untreated control. Protein concentrations were determined according to Bradford [26].

Quantification of total thiols and GSH

The total of thiol groups was spectrophotometrically determined using the method of Ellman [27] and Boyne [28], with some modifications. After 24 h of treatment with 50 μ M BBR, an aliquot of 200 μ L of sample in a final volume of 900 μ L of solution was used for the reaction, which was read at 412 nm after the addition of 10 mM DTNB (di-thio-bis (2-nitrobenzoic acid) (0.05 mL). The results were expressed as μ mol SH/mL of protein.

Reduced glutathione (GSH) was spectrophotometrically measured with Ellman's reagent. The samples were mixed (1: 1) with 10% trichloroacetic acid and centrifuged at 4000 \times g for 10 min. After centrifugation, the protein pellet was discarded and the free NPSH groups were determined in the supernatant. The samples were added in a system that will contain 1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, and 5.5 mM-10 di-thio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The reaction product was measured at an O.D. of 412 nm. The results were expressed as nmol GSH/mL of protein.

Statistical analysis

Data were analyzed by Graph Pad Prism software (version 6 Prism) with *Student's t*-test, Nonlinear regression, one or two-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. Differences between mean values were considered significant at $p \leq 0.05$. Data are shown as mean value \pm SD, representative for three independent experiments.

Results

BBR decreased viability/proliferation of SK-MEL-28 cells

In a previous study, we demonstrated that BBR has anti-tumor effects on glioblastoma multiforme cells [9]. In this study, we evaluated the antitumor activity of BBR (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 250 μ M) in human cutaneous melanoma cell line, SK-MEL-28. After the analyzes, we obtained a cytotoxic concentration–response curve and identified that all BBR concentrations (Fig. 1a) were able to decrease cell viability. However, only the 50 μ M concentration decreased cell viability to 50%, being defined as a 50% inhibitory

concentration (IC 50) in 24 h. It was also assessed whether the effects induced by BBR on cell viability remain within 72 h (Fig. 1b). We observed that a progressive decrease of cell viability in all concentrations as a function of time compared to control. Taken together, BBR inhibited the viability of SK-MEL-28 cells in a concentration- and incubation time-dependent manner.

BBR induces cell death and DNA damage in SK-MEL-28

BBR at 50 μ M concentration generated cell death ($***p < 0.005$) in SK-MEL-28 cells (Fig. 1c, d). Flow cytometry with annexin V and propidium iodide revealed that SK-MEL-28 cells were dying both by apoptosis (early apoptosis) and necrosis (Fig. 2a, b). In Quantification of the DNA damage index by the comet assay, we found a significant increase in the damage index in SK-MEL-28 cells treated with BBR compared to the control without treatment (Fig. 2c, d; $****p < 0.001$).

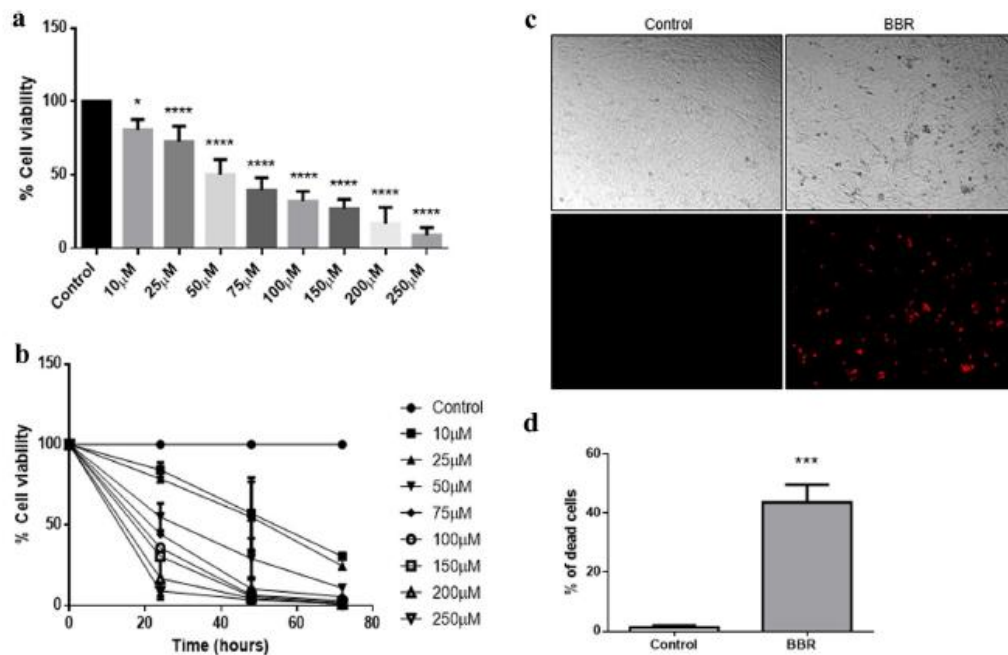


Fig. 1 Decreased viability of SK-MEL-28 cells after exposure to BBR. Samples were incubated with increasing concentrations of BBR (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 and 250 μ M). **a** MTT assay after 24 h (one-way ANOVA; *Represents the difference between BBR treatments and control), **b** 0–72 h of treatment (Nonlinear regression).

c Representative images and **d** Effects of BBR (50 μ M; 24 h) treatment on of propidium iodide staining (*Student's t*-test; *Represents the difference between BBR treatment and control). Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments, * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$

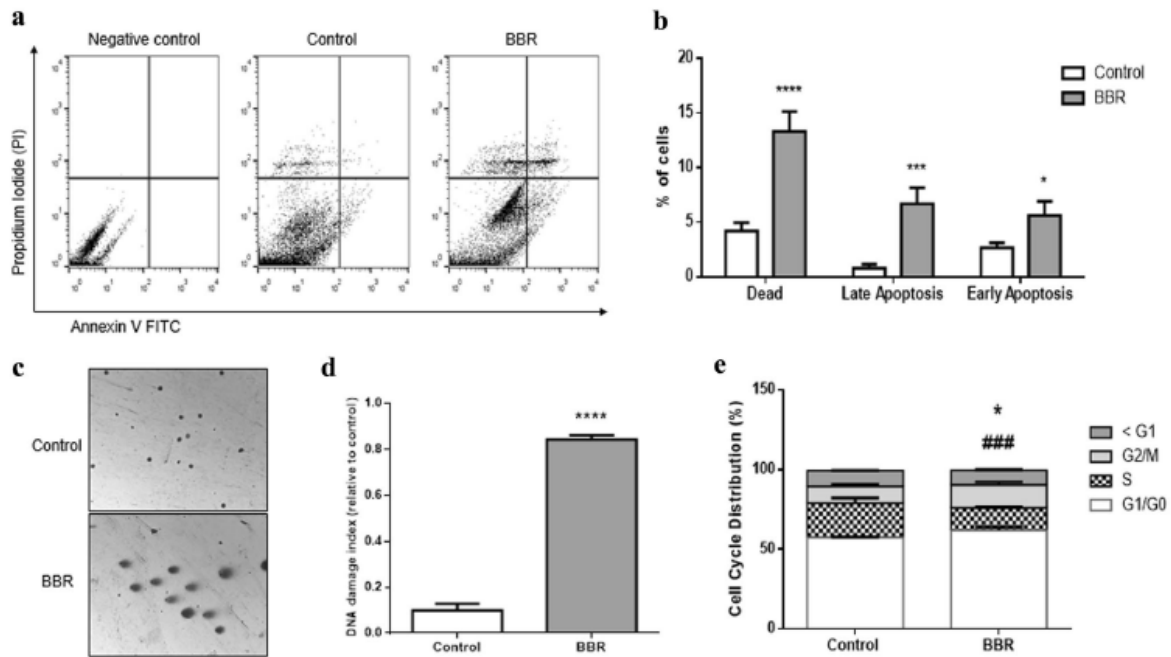


Fig. 2 Evaluation of apoptosis, DNA damage and cell cycle after 24 h of treatment with 50 μ M BBR. **a** Dot-plots of the BBR effects (50 μ M; 24 h) on cell apoptosis. **b** Quantification by flow cytometry of the percentage of cells in apoptosis and cell death (two-way ANOVA; *Represents the difference BBR treatment compared to control). **c** Representative images and **(d)** Effects of BBR (50 μ M; 24 h) treatment on DNA damage of SK-MEL-28 cells (*Student's t*-test; *Represents the difference BBR treatment compared to control). **e** Effects of

treatment with BBR for 24 h on the progression of the SK-MEL-28 cell cycle (two-way ANOVA; *Represents the difference in the G1/G0 phase of the treatment compared to control, #Refers to the difference in the S phase of the treatment compared to control). Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments, * $p < 0.05$, ***/### $p < 0.005$, **** $p < 0.001$. Negative control are samples without labeling of primary and secondary antibodies

BBR induces accumulation of cells in G1 phase

To verify whether BBR affects the proliferation of SK-MEL-28 cells, the phases of the cell cycle were examined by flow cytometry. The 50 μ M concentration (24 h of treatment) increased (* $p < 0.05$) the proportion of cells in G1/G0 phase (Fig. 2e) and decreased (### $p < 0.005$) the percentage of cells in S phase compared to untreated control. Percentages of cells in the G2/M phase did not change.

BBR modulates mitochondrial function and ROS production

Mitochondrial function was studied in the presence of MitoTracker Green, which readily accumulates in active mitochondria (Fig. 3a, b), while production of intracellular ROS was determined in the presence of DCF as a fluorescent probe (Fig. 3a, c). In conditions of treatment with BBR (50 μ M; 24 h) in SK-MEL-28 cells showed a tendency to decrease the mitochondrial function (Fig. 3a, b). BBR

increased (**** $p < 0.001$) ROS production compared to untreated controls (Fig. 3a, c).

BBR modulates cell conformation and antioxidant patterns

BBR treatments affect the antioxidant system (Fig. 3d-g). After treatment with BBR in SK-MEL-28 cells for 24 h, an increase (* $p < 0.05$) in the total TIÖIS (Fig. 3d), decreasing the GSH content (Fig. 3e). In addition, SOD enzyme activity increased (Fig. 3f), while CAT activity decreased (Fig. 3g) upon 24 h treatment with BBR.

BBR alters the expression of proteins involved in apoptosis

To determine which other signaling pathways may play a key role in the BBR effects on SK-MEL-28 cell apoptosis, we quantify these routes by flow cytometry (Fig. 4a). A significant increase in activated caspase 3 (Fig. 4c) and phosphorylated p53 protein levels (Fig. 4d). However,

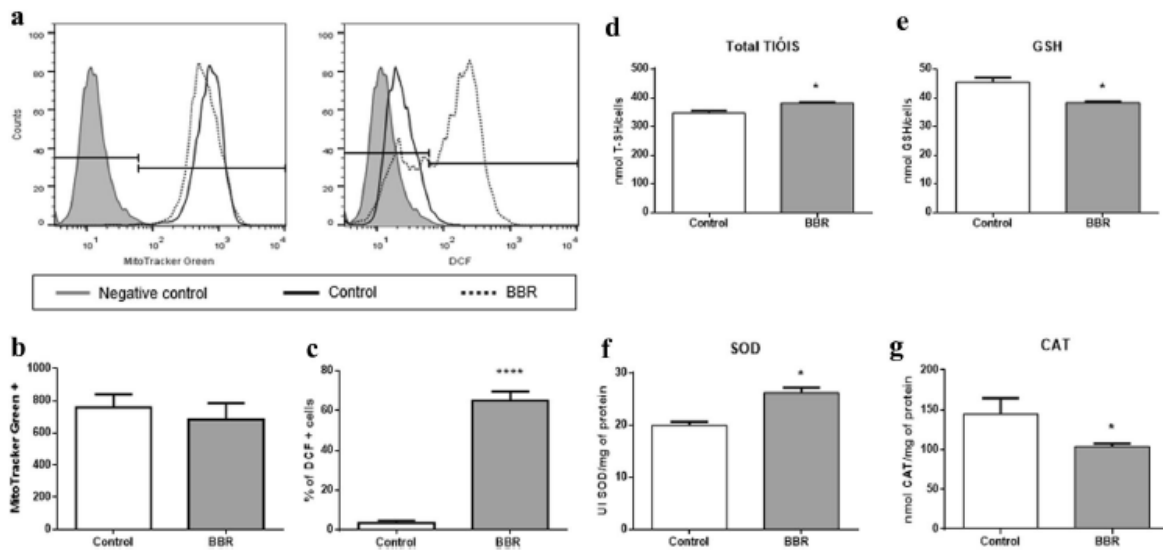


Fig. 3 Mitochondrial function, ROS production, and quantification of the antioxidant system after 24 h treatment with 50 μ M berberine (BBR). **a** Histograms of BBR effects (50 μ M; 24 h) on mitochondrial function and production of ROS. **b** Effect of treatment with BBR for 24 h on the mitochondrial function of SK-MEL-28 cells. **c** Quantification by flow cytometry of ROS production (DCF). **d** Quantifica-

tion of total TIÖIS, **e** GSH, **f** SOD and **g** CAT in SK-MEL-28 cells after exposure to BBR 50 μ M (24 h) (*Student's t*-test; *Represents the difference between BBR treatment and control). Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments, * $p < 0.05$, **** $p < 0.001$. Negative control are samples without labeling of primary and secondary antibodies

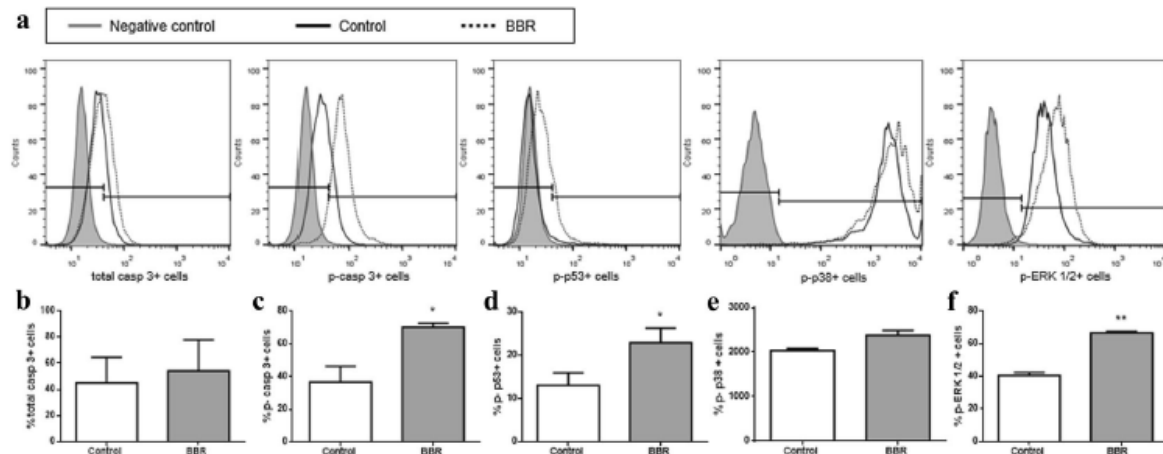


Fig. 4 Quantification by flow cytometry of total caspase 3, activated caspase 3, p-p53, p-p38 and p-ERK 1/2 upon treatment with 50 μ M berberine (BBR) for 24 h. **a** Histograms of the BBR effects (50 μ M; 24 h) in the quantification of total caspase 3, activated caspase 3, p-p53+, p-p38 and p-ERK 1/2 cells. **b** Quantification by flow cytometry of the percentage of total caspase 3, **c** activated caspase 3, **d** and

p-p53+ cells. **e** Effects of 24 h-BBR treatment (50 μ M) expression of p-p38 and **f** p-ERK 1/2 in SK-MEL-28 cells (*Student's t*-test; *Represents the difference between BBR treatment and control). Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Negative control are samples without labeling of primary and secondary antibodies

when we evaluated the content of total caspase 3 (Fig. 4b) and p-p38 (Fig. 4e), it was not possible to evidence

significant changes in their contents in relation to the untreated control. In addition, BBR significantly increases

p-ERK 1/2 expression (Fig. 4f) in SK-MEL-28 cells compared to untreated cells.

BBR interferes with cytokine levels

Analysis of cytokine levels (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A) (Fig. 5a) in the supernatant of BBR-treated cells (50 μ M; 24 h) revealed a significant increase in both pro- and anti-inflammatory cytokine expression, such as IL-2 (Fig. 5b), IL-4 (Fig. 5c), IL-6 (Fig. 5d), IL-10 (Fig. 5e), TNF (Fig. 5f), IFN- γ (Fig. 5g), and IL-17A (Fig. 5h), compared to untreated controls.

Discussion

We recently demonstrated that BBR decreases cell viability, inducing apoptosis in glioblastoma multiforme (GBM) cells in vitro [9]. In parallel, our research group demonstrated that BBR protects against induction of experimental Alzheimer's Disease, induced by streptozotocin in rats [29, 30]. In addition, BBR was tested with the objective of reversing the toxicity of an anticancer drug. BBR administration decreased

weight loss and mortality induced by ifosfamide in rats, with improved antioxidant profiles and protective effects on renal, hepatic, neural and cardiac functions [31].

When using different concentrations of BBR (20, 40, 80 and 160 μ M) for 48 h and 72 h in normal human bronchial epithelial cells, no cytotoxic effects were observed [32]. Furthermore, increasing concentrations (20, 40, 60, 80 and 100 μ g/mL) of both berberine chloride and barberry ethanolic extract did not show any inhibitory effect on viability of normal blood cells (PBMC) [33]. Using SK-MEL-28 melanoma cells, we determined the concentration, which decreased viability by 50% cell (IC50) as 50 μ M. For assessing cell viability, we used the MTT assay, which largely depends on mitochondrial respiration. Obtained results suggest that mitochondrial function may be dysregulated in the presence of BBR.

At this point, we investigated whether the function of mitochondria could be impaired due to ROS. In the evaluation, we found a highly elevated ROS level upon BBR treatment (**** $p < 0.001$). To explain the high rise in ROS, we quantified the antioxidant system of cells. SOD activity increased, together with the increase in the content of total TIOLS in the treatment with BBR. The cells have

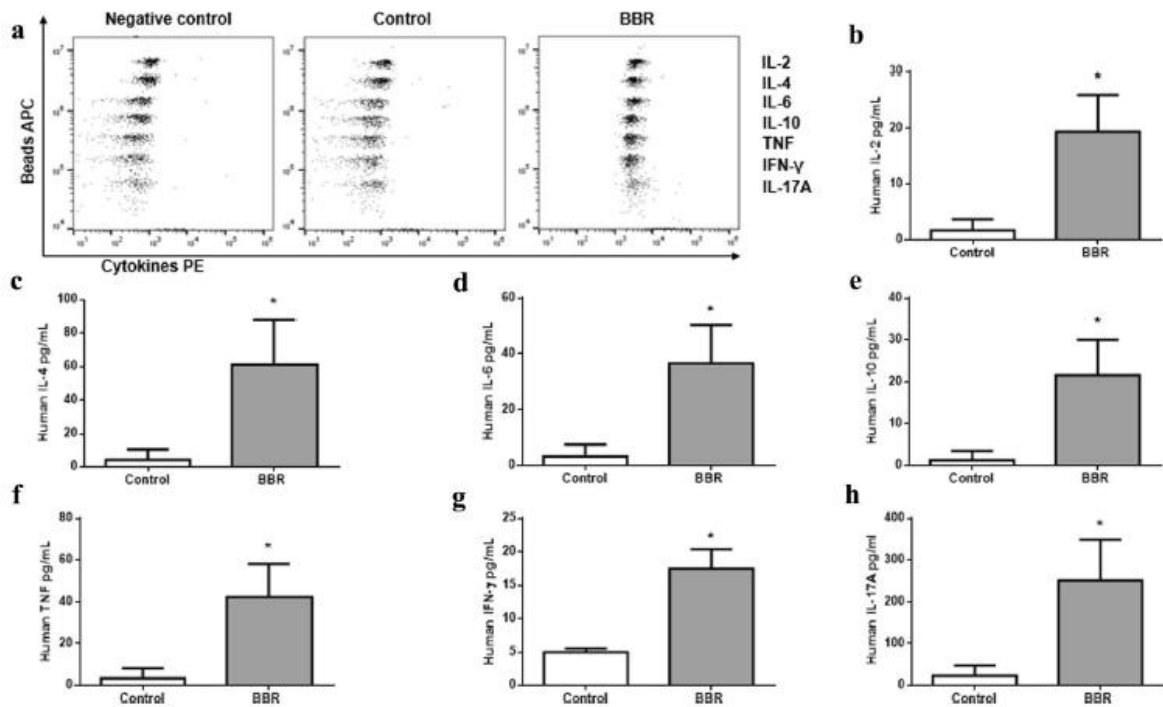


Fig. 5 Cytokine flow cytometry analysis. **a** Dot-plots of the effects of 24 h treatment with 50 μ M BBR on the levels of cytokines in supernatant of SK-MEL-28 cells. **b** Quantification of IL-2, **c** IL-4, **d** IL-6, **e** IL-10, **f** TNF, **g** IFN- γ and **h** IL-17A (*Student's t*-test; *Represents

the difference between BBR treatment and control). Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments, * $p < 0.05$. PE Phycoerythrin labeling. Negative control are samples without labeling of primary and secondary antibodies

an endogenous enzymatic and non-enzymatic system that maintain ROS at a physiological level. SOD is responsible for capturing the superoxide (O_2^-) converting it into hydrogen peroxide (H_2O_2) [17], whereas the glutathione system (TiOIS) reduces H_2O_2 in oxygen and water [34]. This suggests that the defense system of SK-MEL-28 tumor cells is attempting to decrease the intracellular ROS concentration, but not efficiently, since there was a significant increase in ROS in SK-MEL-28 cells treated with BBR. In addition, BBR is known to increase the production of ROS in PANC-1 and MIA-PaCa2 cells in human pancreatic cancer [35], being able to alter the potential of the mitochondrial membrane by the production of ROS with the release of cytochrome c, triggering apoptosis in cancer cells [10].

Then, we assessed whether the BBR 50 μ M concentration was only preventing proliferation by stopping the cell cycle, or also causing cell death. We demonstrated that the concentration of 50 μ M of BBR (24 h) both significantly increases the proportion of cells in the G1/G0 phase and decreased the percentage of cells in the S phase of the cell cycle, indicative of inhibition of cell proliferation, as it causes the death of melanoma tumor cells. In another study, with GBM and BBR, we found an increase in cells in the G1/G0 phase, such as an increase in apoptosis cells when treated with BBR [9], evidencing that the cells are stopped in G1/G0 due to cell death caused by BBR.

Cell death can occur by necrosis or apoptosis. Apoptosis is described as an active, regulated, and programmed process that prevents the onset of inflammation. Accidental and passive cell death necrosis, resulting from environmental disturbances with uncontrolled release of inflammatory cell content [36]. Thus, when we evaluated the type of cell death triggered by BBR, we found that SK-MEL-28 cells were dying through both apoptosis (early apoptosis) and necrosis. This cell death was accompanied by DNA damage (**** $p < 0.001$). BBR still has the ability to form complexes with DNA and RNA, causing damage to malignant cells [12]. A study with osteosarcoma showed that BBR was able to cause DNA fragmentation in cancer cells [37]. And, in another research with tumor cells, it was observed that BBR can cause damage to DNA through the production of ROS, this damage to DNA is responsible for generating cell death [14].

When there is DNA damage, the cell cycle stops (arrests) and a repair mechanism is initiated with the activation of p53 [38]. In fact, when we quantify p-p53 we find an increase in the activation of this protein, including the increase in cells in the G1/G0 phase. Indication that cell death was happening by activating p53. In addition, to finding an increase in p53 activation, we observed an increase in caspase 3 activation, another key protein in the apoptosis process. Apoptosis can be activated in two ways: by the extrinsic pathway, where the TNF recruits the FADD protein and caspases 8 and 10

in complexes, or by the intrinsic or mitochondrial pathway, when the ROS activates proximal Bax and Bak proteins -apoptotics, which inhibit Bcl-2, cytochrome c is released from the mitochondria and binds to Apaf-1 protein and caspase 9. This process activates effector caspases (Caspase-3, Caspase-6 and Caspase-7), which start the breakdown of proteins and cellular DNA culminating in apoptosis [39]. The expression of Bcl-2 and Bax, are regulated by p53. Bax, is upregulated by p53 [40, 41].

When Zheng et al. [42] tested BBR in lung cancer cells, they noted that there was an increase in p53, along with increased apoptosis and phosphorylation of p38 and ERK. The increase in p53 occurred via the p38 MAPK/FOXO3a pathway, without ERK involvement. Furthermore, when the inhibitor for p38 MAPK was used, there was a decrease in the cells in the S and G2 phases of the cell cycle, which did not happen for the ERK inhibitor. Furthermore, in the presence of a p53 inhibitor, BBR was not efficient in decreasing viability, and stopping the cell cycle. The p53 inhibitor blocked the effect of BBR [42].

ERK activation increases metabolism and cell division. Glycolysis and oxidative phosphorylation are enhanced, being strongly associated with the aggressiveness of cancer cells in terms of growth and metastasis [43]. In this study, we a large increase in ROS was induced by BBR. Considering that an accelerated cell metabolism would be necessary for large ROS production, we decided to analyze ERK. We obtained a significant increase in ERK and p38 in SK-MEL-28 cells treated with BBR, which can be a compensatory mechanism for tumor cells to stay alive in the face of BBR treatment.

One of the functions of ERK and p38 MAPK is to regulate the ectodomain release mediated by the tumor necrosis factor- α conversion enzyme (TACE). The release of this ectodomain is a critical mechanism for regulating the function of ligands and receptors anchored in the membrane, such as receptor 1 of TNF (TNF-R1) and TNF receptor 2 (TNF-R2). Moreover, the inhibition of TACE reverses the activation of NF- κ B induced by TNF- α . ERK and p38 MAP kinase are responsible for inducing the release of the TNF-R1 ectodomain via TACE, thus avoiding the TNF-R1-dependent NF- κ B signaling pathway. TACE inhibition increases apoptosis induced by TNF- α . Therefore, increased activation of ERK and p38 MAP increases TACE, which in turn downregulates TNF-R1, necessary for TNF- α binding, conferring resistance to apoptosis or delaying the onset of TNF- α -induced apoptosis [44].

The cell death process can trigger inflammation, generating increased expression of cytokines [36]. In view of that, we analyzed cytokine expression in conditions of BBR treatment, observing an increase in both pro- and anti-inflammatory cytokine levels. Cytokines are signaling proteins generally produced by immune cells, to

modulate signaling pathways responsible for maturation, differentiation, cell migration, cell survival and as well as antitumor responses [45]. Analysis of the type of cell death caused by BBR in SK-MEL-28 cells revealed both apoptosis and necrosis. Knowing that death by necrosis is linked to increased inflammation, we can suggest that the increase in pro-inflammatory cytokines occurred due to the process of necrosis. Simultaneously, there was an increase in anti-inflammatory cytokines, which can be a compensatory defense mechanism for cells.

Still, involved in apoptosis, TNF- α (a pro-inflammatory cytokine) is responsible for triggering the activation of the nuclear factor of the transcription factor- κ B (NF- κ B). When it binds to two different receptors, known as TNF-R1 and TNF-R2, thus inducing a variety of genes involved in inflammation, innate and adaptive immunity, survival and cell death, as well as the development and progression of cancer. Upon binding TNF- α to TNF-R1, the TNF-R1 domain interacts with the death domain of the adapter protein (TRADD), Fas adapter protein (FADD), activating caspases [44]. In our study, we showed that BBR increased TNF- α expression along with augmented caspase 3 activation, indicating that BBR may induce apoptosis by this route.

Conclusions

BBR has important antiproliferative effects, such as decreasing the viability of melanoma cells, inducing an arrest in G1/G0 phase with a decrease in the synthesis process (phase S). BBR increases the expression of cytokines, ROS and proteins linked to apoptosis in human melanoma cells, in addition to inducing melanoma cell apoptosis. BBR may be alone or in adjunct therapy a promising candidate for melanoma treatment, a cancer with great incidence and high lethality. We also emphasize that in vivo studies clinical trials are needed to demonstrate the effects of BBR, given the complexity of body metabolism.

Acknowledgements TVP is grateful for doctoral fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Programa de Excelência Acadêmica (CAPES/PROEX-Nº: 88882.182140/2018-01). MMP acknowledges grant support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS Proj. No. 20255100002535). HU acknowledges grant support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Proj. No. 2018/07366-4).

Author contributions Conceptualization: TVP; methodology: TVP, NBB, JSO, CEA, MO, MCS, VMM, HU, MMP, CMA; investigation: TVP, NBB, JSO, CEA, MO, MCS, VMM, HU, MMP, CMA; funding acquisition: TVP, MMP, HU; supervision: TVP, MMP, CMA; writing—original draft: TVP, HU, MMP, CMA; Writing—review and editing: TVP, HU, MMP, CMA.

Funding This study was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Programa de Excelência Acadêmica (CAPES/PROEX-Nº: 88882.182140/2018-01), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS Proj. No. 20255100002535) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Proj. No. 2018/07366-4).

Declarations

Conflict of interest The authors declare that there are no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Consent to participate and publish All authors reviewed and approved the final version for publication.

References

- Girouard SD, Murphy GF (2011) Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest* 91:647–664. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.50>
- O'Sullivan B, et al. (2015) UICC manual of clinical oncology. 9ª edição. <https://doi.org/10.1002/9781119013143>
- O'Sullivan J, O'Connor D (2018) The modern approach to targeting melanoma. In: Human skin cancers—pathways, mechanisms, targets and treatments. InTechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73489>
- Schadendorf D et al (2015) Melanoma. *Nat Rev Dis Prim* 1:15003. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>
- Akbani R et al (2015) Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 161:1681–1696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>
- Armstrong BK, Kricger A (1993) How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 3:395–401. <https://doi.org/10.1097/00008390-199311000-00002>
- D'Orazio J et al (2013) UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci* 14:12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Chen XW et al (2012) Interaction of herbal compounds with biological targets: a case study with berberine. *Sci World J*. <https://doi.org/10.1100/2012/708292>
- Palma TV et al (2020) Berberine induces apoptosis in glioblastoma multiforme U87MG cells via oxidative stress and independent of AMPK activity. *Mol Biol Rep* 47(6):4393–4400. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05500-9>
- Tillhon M et al (2012) Berberine: new perspectives for old remedies. *Biochem Pharmacol* 84(10):1260–1267. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.018>
- Jiang SX et al (2017) Berberine displays antitumor activity in esophageal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 23(14):2511–2518. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i14.2511>
- Ortiz LM et al (2014) Berberine, an epiphany against cancer. *Molecules* 19(8):12349–12367. <https://doi.org/10.3390/molecules190812349>
- Chen Y et al (2008) Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ Nat* 15(1):171–182. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402233>
- Chen TC et al (2009) Involvement of reactive oxygen species and caspase-dependent pathway in berberine-induced cell cycle arrest

- and apoptosis in C6 rat glioma cells. *Int J Oncol* 34(6):1681–1690. <https://doi.org/10.3892/ijo.00000299>
15. Dalle-Donne I et al (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. *J Cell Mol Med* 10(2):389–406. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x>
 16. Ahmed T et al (2015) Berberine and neurodegeneration: a review of literature. *Pharmacol Rep* 67(5):970–979. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.002>
 17. Sies H, Berndt C, Jones DP (2017) Oxidative stress. *Annu Rev Biochem* 86:715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
 18. Kou Y et al (2016) Berberine suppressed epithelial mesenchymal transition through cross-talk regulation of PI3K/AKT and RAR α /RAR β in melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 479(2):290–296. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.061>
 19. Wang X et al (2021) Berberine-photodynamic therapy sensitizes melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis through ROS-mediated P38 MAPK pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 418:115484. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115484>
 20. Mittal A, Tabasum S, Singh RP (2014) Berberine in combination with doxorubicin suppresses growth of murine melanoma B16F10 cells in culture and xenograft. *Phytomedicine* 21(3):340–347. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.002>
 21. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
 22. Singh NP et al (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
 23. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 49:1183–1186. <https://doi.org/10.1177/002215540104900912>
 24. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
 25. Spitz DR, Oberley LW (1989) Na assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 179(1):8–18. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90192-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90192-9)
 26. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
 27. Ellman GL (1959) Tissue Sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–72. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
 28. Boyne AF, Ellman GL (1972) A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem* 46:639–653. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90335-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90335-1)
 29. De Oliveira JS et al (2016) Berberine protects against memory impairment and anxiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic Alzheimer's-like dementia: involvement of acetylcholinesterase and cell death. *Neurotoxicology* 57:241–250. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.10.008>
 30. De Oliveira JS et al (2019) Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin. *Psychopharmacology* 236:641–655. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5090-6>
 31. Ilyas S et al (2021) Effect of *Berberis vulgaris* L. root extract on ifosfamide-induced in vivo toxicity and in vitro cytotoxicity. *Sci Rep* 11:1708. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80579-5>
 32. Qi HW et al (2014) Epithelial-to-mesenchymal transition markers to predict response of berberine in suppressing lung cancer invasion and metastasis. *J Transl Med* 24:12–22. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-2>
 33. El-Wahab AEA et al (2013) In vitro biological assessment of berberis vulgaris and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC Complement Alternat Med* 13:218. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-218>
 34. Weydert CJ, Cullen JJ (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 5(1):51–66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>
 35. Park SH et al (2015) Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines. *Braz J Med Biol Res* 48(2):111–119. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144293>
 36. Fink SL, Cookson BT (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73(4):1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
 37. Zhu Y et al (2014) Berberine induces apoptosis and DNA damage in MG-63 human osteosarcoma cells. *Mol Med Rep* 10(4):1734–1738. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2405>
 38. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810):307–310. <https://doi.org/10.1038/35042675>
 39. Adams JM, Cory S (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 19(5):488–496. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.05.004>
 40. Miyashita T et al (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6):1799–1805
 41. Miyashita T, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80(2):293–299. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90412-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90412-3)
 42. Zheng F et al (2014) p38 α MAPK-mediated induction and interaction of FOXO3a and p53 contribute to the inhibited growth and induced-apoptosis of human lung adenocarcinoma cells by berberine. *J Exp Clin Cancer Res* 33(1):36. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-36>
 43. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M (2020) ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21(10):607–632. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>
 44. Kataoka T (2009) Chemical biology of inflammatory cytokine signaling. *J Antibiot* 62:655–667. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.98>
 45. Kwaśniak K et al (2019) Scientific reports concerning the impact of interleukin 4, interleukin 10 and transforming growth factor β on cancer cells. *Cent Eur J Immunol* 44(2):190–200. <https://doi.org/10.5114/ceji.2018.76273>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5.2 MANUSCRITO:

Berberine alters the activity of the purinergic system and migration in human melanoma cells

Taís Vidal Palma^{a,*}, Nathiele Botari Bianchin^a, Charles Elias Assmann^a, Jucimara Baldisareli^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a, Vera Maria Morsch^a, Henning Ulrich^b, Micheli Mainardi Pillat^{c,*}, Cinthia Melazzo de Andrade^{a,*}.

^a Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicological, Center for Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

^b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil.

^c Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed: Taís Vidal Palma (taisvid@hotmail.com) or Micheli Mainardi Pillat (micheli.pillat@ufsm.br) or Cinthia Melazzo de Andrade, Ph.D. Department of Small Animal Clinic, Center of Rural Sciences Federal University of Santa Maria-RS, Room 121, Veterinary Hospital Building, Avenue Roraima n° 1000, Santa Maria, RS 97105900, Brazil. Fax number: +55-55-3220-8814; cmelazzoandrade1@gmail.com

Abstract

Purinergic signaling interacts with several molecules, modulating various cellular processes, such as proliferation, differentiation, and death in healthy and cancer cells. Melanoma is considered the most lethal form of skin cancer, accounting for the majority (75%) of skin cancer-related deaths. Berberine (BBR), an isoquinoline alkaloid, inhibits the complex I of the respiratory chain, stimulating AMP-activated protein kinase (AMPK). The present study sought to demonstrate by which

mechanisms BBR acts in the purinergic system in melanoma cells *in vitro*, contributing to a new therapeutic strategy for melanoma. Treatment with BBR or AMPK inhibitor (iAMPK) for 24h reduced cell migration compared to untreated control cells. Further, significant decreases in hydrolysis of ATP, ADP and AMP suggesting that both treatments have inhibited NTPDase/CD39 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 activities. While CD39 and CD73 expression levels did not change, it ADA1 expression significantly diminished under conditions of BBR treatment. While P2X7, P2Y11 and A2A expression levels did not change upon BBR treatment, a significant decrease of the A1 receptor was observed. Differential expression regulation of purinergic signaling suggest possible novel therapeutic targets in the treatment of melanoma, including its metastatic capacity.

Keywords: Melanoma; NTPdase; 5' nucleotidase; ADA1; Purinergic system; P2X7.

Introduction

Burnstock, in 1972, proposed that nucleotides would be responsible for extracellular signaling and titled this system as purinergic (BURNSTOCK, 1972). Afterwards, in 1976, Burnstock for the first time described purinergic receptors (BURNSTOCK, 1976), which were only differentiated in the following years (BURNSTOCK, 1978; VAN CALKER et al., 1979; BURNSTOCK E KENNEDY, 1985; LUSTIG et al., 1993; WEBB et al., 1993; BRAKE et al., 1994; VALERA et al., 1994; FREDHOLM et al., 2001). Divided into P1 and P2, the receptors of P1 subtype are adenosine receptors (A1, A2A, A2B and A3) couple to different G proteins, modulating phospholipase C or adenylate cyclase pathways. The nucleotide receptors intitled P2, include metabotropic and ionotropic receptors, P2Y and P2X respectively (DI VIRGILIO et al., 2018; CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020).

Purinergic signaling interacts with several signaling molecules, modulating several cellular processes, such as proliferation, differentiation, and death (BURNSTOCK; KNIGHT; GREIG, 2012). In addition, P1, P2X and P2Y purinoreceptors are expressed in all parts of the body, such as the nervous system, circulatory system, respiratory system, immune system, urinary system and others. Both the dysregulation of extracelular nucleotide levels or change of purinoreceptor expressions lead to several diseases, including neurological, rheumatic, cardiovascular, cancer and other

pathological conditions (HUANG et al., 2021). In addition, the tumor environment is rich in growth factors and cytokines, as well as in extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) and adenosine (ADO) (BELLEFEUILLE; MOLLE; GENDRON, 2019). Furthermore, different subtypes of P1 and P2 receptors are involved in skin cancer, acting in differentiation, apoptosis and proliferation of these cells (BURNSTOCK, 2017).

Melanoma is considered the most lethal form of skin cancer (GIROUARD; MURPHY, 2011), accounting for the majority (75%) of skin-related deaths (SCHADENDORF et al., 2015). The main risk factor involved for melanoma is ultraviolet (UV) radiation (SCHADENDORF et al., 2015; EMRI et al., 2018). In addition to acting on the development of melanoma, UV, especially UV-B, influences the amount of P2 receptor expression, decreasing P2X1, P2Y2 and P2X7 subtype levels (RUZSNAVSZKY et al., 2011). Melanoma presents difficult treatment with strong resistance of tumor cells due to their extremely invasive nature with high capacity to metastases, which reduces survival and increases mortality (AKBANI et al., 2015).

Berberine (BBR), 5,6 - dihydro - 9,10 - dimethoxy - benzo (g) -1,3 - benzodioxole (5, 6 - a) quinolizinium, chloride, an isoquinoline alkaloid, is a molecule found in several medicinal plants, such as Canadian Hydrastis and Coptis chinensis (CHEN et al., 2012; PALMA et al., 2020). BBR inhibits complex I of the respiratory chain, which prevents the production of mitochondrial ATP, with an increase in adenosine 5'-monophosphate (AMP), and consequent activation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) (TURNER et al., 2008). Interestingly, in several cancer lines *in vitro*, BBR increases ROS production and induces cell apoptosis (XIE et al., 2015; PALMA et al., 2020; WANG et al., 2021).

Since individuals with melanoma present a high mortality rate, it is necessary to research and develop new therapies against this tumor that contribute to the blockade or remission of cancer. As BBR showed promising antitumor properties, interfering with tumorigenesis and tumor progression in previous studies, the present study sought to demonstrate by which mechanisms BBR acts in the purinergic system in melanoma cells *in vitro*, contributing to a new therapeutic strategy for melanoma.

Materials and methods

Cell line, cell culture and BBR

The human cutaneous melanoma cell line (SK-MEL-28) (Code BCRJ: 0289 – ATCC: HTB-72), was acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ), Brazil. The melanoma cells were maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Life Technologies) culture medium plus 100 IU/ mL penicillin, 100 µg / mL streptomycin (Invitrogen) and 10% fetal bovine serum (FBS- Sigma-Aldrich). The cells were plated in plastic culture flasks (25 cm²) and incubated in a cell culture incubator at 37°C, 5% CO₂ in atmosphere and 95% humidity. BBR was purchased from Sigma-Aldrich and used at a concentration of 50 µM (concentration based on previous tests (PALMA et al., 2021)). Compound C (10 µM) was purchased from Cayman Chemicals Company (14050, 11967). For all treatments, BBR and compound C were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The maximum final concentration of DMSO was 0.05% in the culture medium.

Migration test

Evaluation of the migration capacity was carried out according to the methodology of Burk (1973). SK-MEL-28 cells were incubated in 24-well plates with DMEN medium supplemented with 10% SFB, until cell cultures were confluent. After that, a scratch was made with a sterile tip in the central region of the well for mechanical removal of the cells. Cells were exposed to BBR (50 µM) or Compound C (10 µM) alone or together for 24 hours. Cells were imaged under a microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss) at 0 and 24 hours and images were analyzed with Image J software. The area of cellular migration was calculated by subtracting the initial value from the final scratch area.

Purinergic system enzyme activities

Activities of NTPDase and 5'-NT enzymes were determined by the release of inorganic phosphate. After 24 h of treatment SK-MEL-28 cells were washed three times with phosphate-free incubation medium in the absence of substrate. The reaction was started by adding 200 µL of incubation medium containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM 4- (2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.4, 2 mM CaCl₂ for the NTPDase / CD39 assay and 2 mM MgCl₂ to determine ecto 5'-nucleotidase / CD73 activity. Afterwards, ATP, adenosine 5'-diphosphate (ADP) or AMP was added to the reaction medium to a final concentration of 2.0 mM, for 10 minutes at 37 °C. The reaction was stopped by adding 10% of ice-cold trichloroacetic acid. Inorganic phosphate (iP) release was measured by the malachite green method, using KH₂PO₄ as iP standard. Controls to correct non-

enzymatic nucleotide hydrolysis were performed by measuring the iP released in the same reaction medium incubated without cells. All assays were performed in triplicate. Enzyme activity was expressed as nmol iP released/min/mg protein. ADA activity was performed following methodology published by Giusti e Galanti (1984), based on the hydrolysis of ADO to inosine. Results were expressed as U/mg of protein.

Quantification of CD39, CD73, ADA1 and P2RX7, P2Y11, A1, A2A receptors

For quantification of CD39, CD73, ADA1 and P2RX7, P2Y11, A1 and A2A receptor expression in the presence of BBR (50 μ M- 24 h), K-MEL-28 cells were cultured in 6-well plates (2 x 10⁵ cells / well). For evaluate if the modulation pathway of the purinergic system is through AMPK, an inhibitor of this kinase (Compound C - 10 μ M) was used alone or together with the BBR. After the treatment period, the supernatant was discarded and the cells were removed from the wells with a trypsin / EDTA solution (0.2% / 0.02%). The trypsin activity was neutralized with the addition of medium with 10% SFB. Subsequently, cells were centrifuged and supernatants were discarded. Samples of individualized cells in suspension were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 minutes. Sequentially, the samples were incubated in PBS containing 3% FBS to block non-specific sites for 20 minutes. Subsequently, the cells were incubated in the same solution with the primary anti- CD39, CD73, ADA, and P2RX7, P2Y11, A1, A2A receptors (BD Pharmingen TM) at the dilutions indicated by the manufacturer. After 30 minutes of incubation with primary antibody at room temperature, the samples were incubated with the secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 or 645 for 30 minutes. Finally, the samples were resuspended in 500 mL of PBS for data acquisition in the flow cytometer BD FACSCalibur, with at least 30.000 events being acquired per sample and analyzed by FlowJo V10 software.

Statistical analysis

Data were analyzed by Graph Pad Prism software (version 6 Prism) with two-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. Differences among mean values were considered significant at $p \leq 0.05$. Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments.

Results

BBR and iAMPK inhibits migration of SK-MEL-28 cells

In order to test whether BBR is capable of reducing the migratory capacity of melanoma cells, we performed the Burk (1973) migration test. The cell monolayer was streaked and 50 μ M BBR was added. After 24h, BBR reduced about 95% of cellular migration compared to untreated control cells (Fig 1), modifying the morphology and adhesion of human melanoma cells. In addition, we used the AMPK inhibitor (iAMPK; Compound C - 10 μ M) to verify whether treatment with BBR influenced migration via AMPK inhibition. We found that inhibition of AMPK decreases the ability to migrate of melanoma cells, but does not modify the morphology of the cells. When we used the inhibitor concomitantly with the BBR treatment there was inhibition of migration capability.

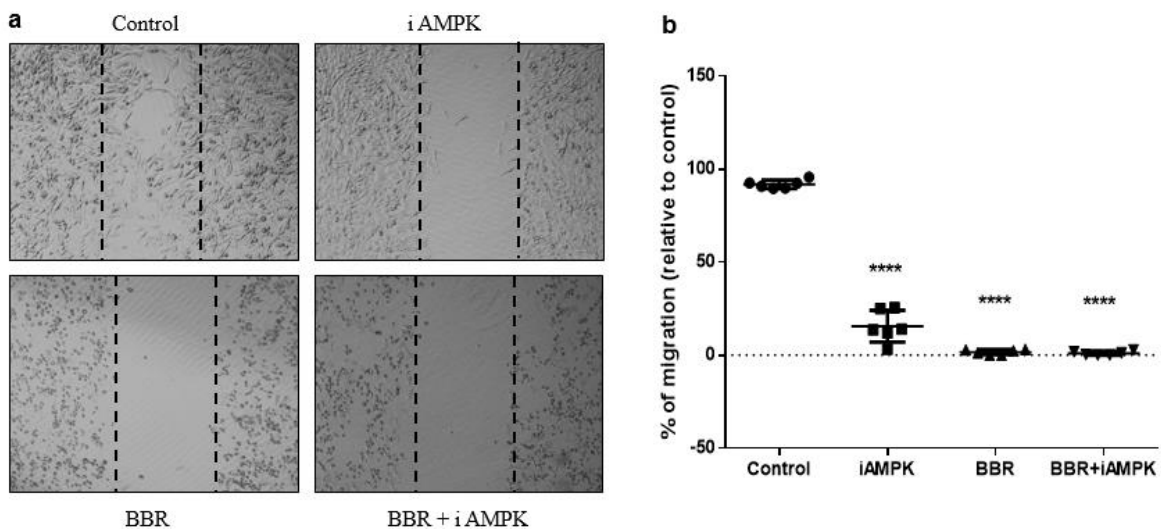


Fig. 1 Decreased migratory capacity of SK-mel-28 cells after exposure to berberine (BBR; 50 μ M) and AMPK inhibitor (iAMPK; Compound C - 10 μ M). (a) Images of the migratory capacity after 24 h of treatment with BBR-50 μ M and Compound C (10 μ M). (b) Effects of BBR (50 μ M; 24h) and Compound C (10 μ M; 24 h) treatment on migration of SK-mel 28 cells (* represents the difference in treatment compared to control). Data are shown as mean \pm SD, representative for six independent experiments, **** p <0.001.

BBR and iAMPK influence the activity of NTPDase, 5'-NT and ADA enzymes

We found significant ectonucleotide activity modulation by BBR at 50 μ M and iAMPK at 10 μ M. Fig. 2 displays the results of hydrolysis of ATP (a), ADP (b), AMP (c) and

ADA (d). The decrease in hydrolysis of ATP (a), ADP (b), and AMP (c) after exposure to 50 μM of BBR and iAMPK suggest that both treatments have changed NTPDase/CD39 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity, while this did not happen with the ADA activity (d).

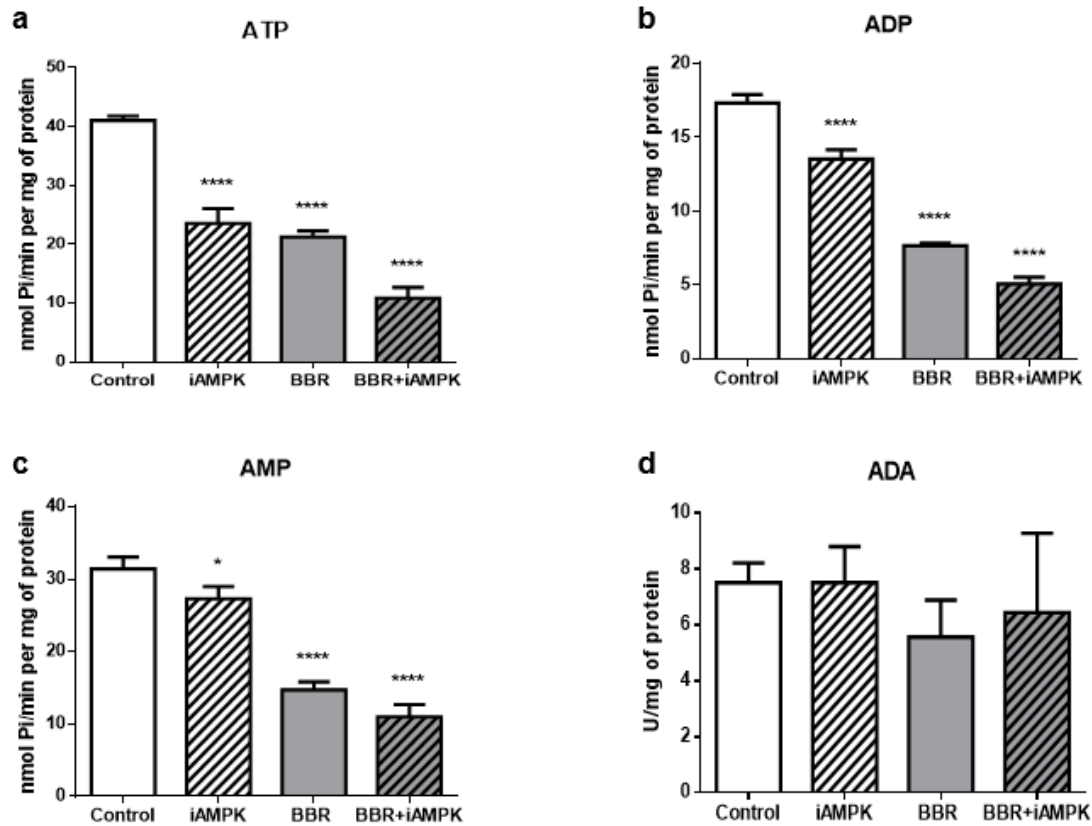


Fig. 2 Effects of berberine (BBR;50 μM) and iAMPK (Compound C -10 μM) on NTPDase-1/CD39, ecto-5'-nucleotidase/CD73 and ADA activity in SK-Mel-28 cells, using (a) ATP, (b) ADP, (c) AMP and (d) ADO (* represents the difference in treatment compared to control). Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments, * $p < 0,05$, **** $p < 0,001$.

Influence of BBR and iAMPK on the expression of NTPDase, 5'-NT, and ADA1

To determine the content of NTPDase, 5'-NT, and ADA1, we quantify the relative protein expressions by flow cytometry technique (Fig. 3 a, b, c). No changes were observed in the content of CD39 (Fig. 3 d) and CD73 (Fig. 3 e) upon treatment with BBR 50 μM , iAMPK alone or concomitantly with BBR for 24 h. In the quantification of ADA1 (Fig. 3 f), a significant decrease was observed when SK-Mel-28 cells were

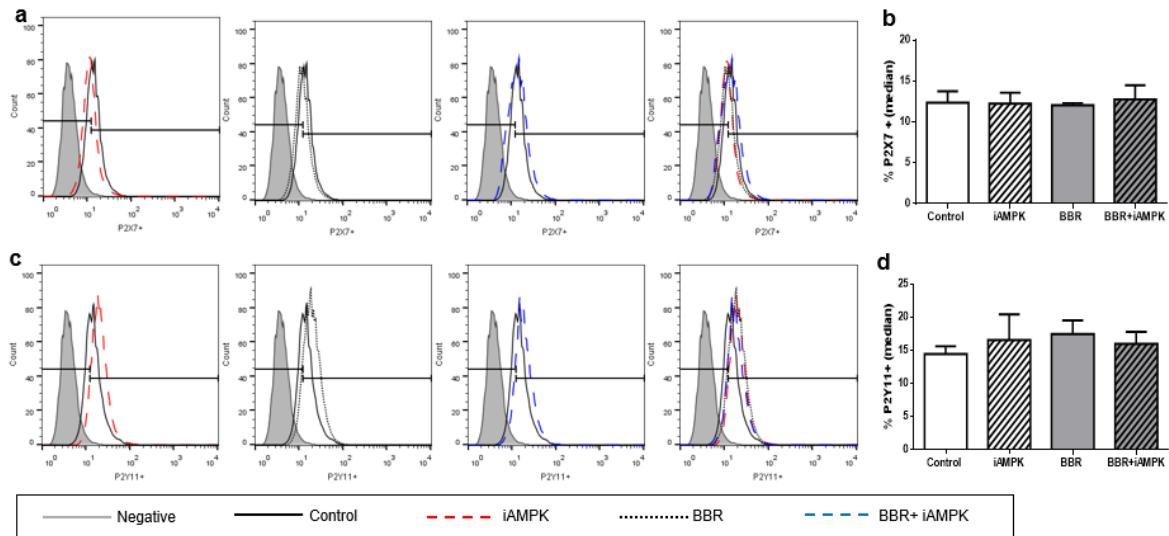


Fig. 4 Quantification of P2RX7 and P2Y11 receptors after treatment with 50 μ M berberine (BBR) and iAMPK (Compound C -10 μ M) for 24h. (a) Histograms of the BBR effects (50 μ M; 24h) in the quantification of P2RX7 by flow cytometry. (b) Quantification of the percentage of P2RX7 in SK-mel 28 cells. (c) Histograms of the BBR effects (50 μ M; 24h) in the quantification of P2Y11. (d) Quantification by flow cytometry of the percentage of P2Y11 in SK-mel 28 cells. Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments.

Effects of BBR and iAMPK on the expression of A1 and A2A receptors

When checking the level of adenosine receptors, A1 (Fig. 5 a) and A2A (Fig. 5 b), we found a significant decrease in the levels of A1 receptor for the treatment with BBR (** $p < 0.01$) in relation to the untreated control. The pre-treatment with iAMPK plus BBR presented similar effects, suggesting that reduction of A1 receptor levels triggered by BBR not depend on AMPK pathway.

In addition, the A2A adenosine receptor was quantified. In this analysis, we did not observe any change in the content of the receptor in relation to the control when using the BBR 50 μ M treatment for 24 hours. In fact, there were no changes when using iAMPK alone or concurrently with BBR treatment.

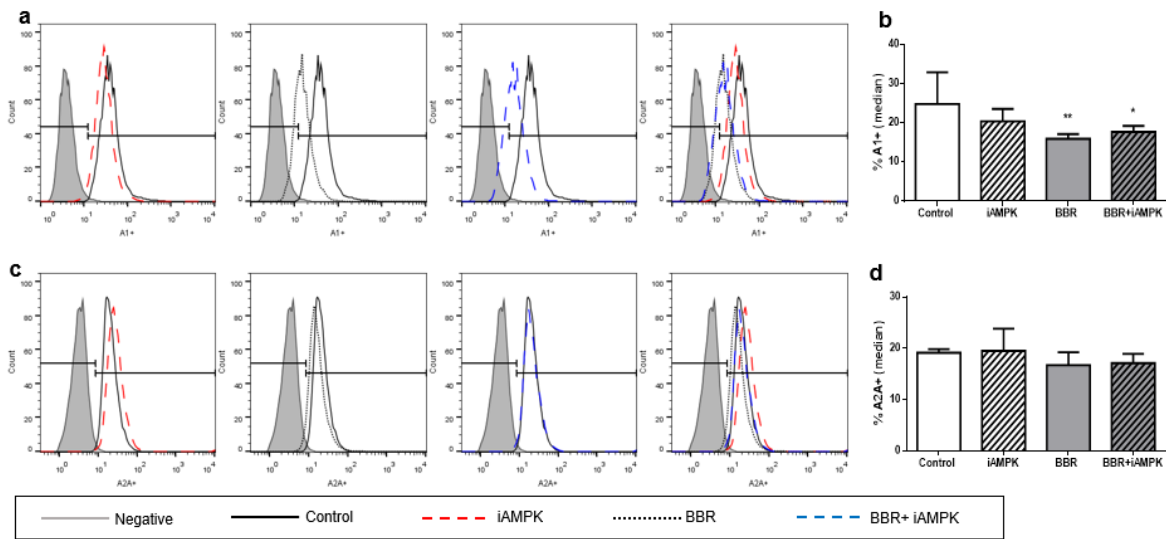


Fig. 5 Quantification of A1 and A2A receptors after treatment with 50µM berberine (BBR) and iAMPK (Compound C -10 µM) for 24h. (a) Histograms of the BBR effects (50µM; 24h) in the quantification A1 by flow cytometry. (b) Quantification of the percentage of A1 in SK-mel 28 cells. (c) Histograms of the BBR effects (50µM; 24h) in the quantification of A2A. (d) Quantification by flow cytometry of the percentage of A2A in SK-mel 28 cells (* represents the difference in treatment compared to control). Data are shown as mean ± SD, representative for three independent experiments. * p < 0,05, ** p < 0,01.

Discussion

The results found in this study show that human melanoma cells express ectoenzymes, P1 and P2 receptors in their membrane. Furthermore, we demonstrate that treatment with BBR and inhibition of AMPK influence the activity of ectoenzymes and cellular migration. Recently, in another study, we found that AMPK inhibition did not influence key proteins in the apoptosis of glioblastoma multiforme tumor cells, including did not even influence the induction of apoptosis in these tumor cells (PALMA et al., 2020). It is visible in the migration images that the inhibition of AMPK does not modify the morphology of the cells, its activity modulation seems to be only linked to the decrease in the migratory capabilities of melanoma cells. Eichner et al. (2019) studying lung cancer in a murine model, used animals with AMPK deletion. In their analysis, they demonstrated that AMPK deletion suppresses pulmonary

tumorigenesis, evidenced at the histological level, with a decrease in lung tumor burden (EICHNER et al., 2019)

AMPK is a heterotrimeric complex ($\alpha\beta\gamma$), with 12 possible combinations between the subunits. The α subunit is catalytic and β and γ are regulatory subunits. The regulation of ATP, ADP, and AMP levels is performed by the γ subunit, acting as an energy sensor of the cell (HERZIG; SHAW, 2018). Moreover, the α subunit is activated by oxidative modifications, resulting from oxidative stress (ZMIJEWSKI et al., 2010). In the study by Saito et al. (2015), a model with AMPK deletion a delay in leukemogenesis was observed (SAITO et al., 2015).

Cellular migration is important for embryonic development and tissue repair. Migration or metastatic activity in tumor tissue is responsible for forming secondary tumors (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020). In this study, it was possible to observe that, in addition to affecting migration, BBR also modified the cell morphology and adhesion capacity of human melanoma cells. It is known that BBR induces apoptosis in tumor cells by increasing ROS and key proteins (PALMA, et al., 2020). On the other hand, cancer cells can evade apoptosis by altering the components involved in the apoptotic pathway, during transcription, translation, and post-translation. Anti-apoptotic proteins are more expressed in cancer cells to overcome stress signals. This increased expression is related to recurrence, prognosis, and therapeutic resistance (GOLDAR et al., 2015).

The capability to form metastasis, acting on stages of metastasis, has been linked to purinergic signaling (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020). Furthermore, tumor cells can inhibit the immune response through the activity of the purinergic system, modulating the activity of CD39 (NTPDase) and CD73 (ecto-5'-nucleotidase), which are responsible for converting ATP into ADO (ARAB; HADJATI, 2019). When we evaluated the hydrolysis of ATP and ADP by NTPDase (CD39), we found elevated hydrolysis. Unlike after treating human melanoma cells with BBR for 24h, we obtained a significant reduction in the hydrolysis of these nucleotides. When the iAMPK was used to verify whether the CD39 activity was influenced by the AMPK pathway, we found a decrease in the hydrolysis of ATP and ADP. Therefore, we suggest that CD39 activity may be linked to the AMPK pathway. However, more investigations are needed to elucidate this pathway. Furthermore, treatment with BBR concomitant with iAMPK was used, where we observed that the inhibitor potentiated the effect of treatment with BBR.

Zmijewski et al. (2010) after incubating HEK 293 cells with H₂O₂ (250 μM) for 30 min, found an approximately 30–40% reduction in intracellular ATP levels. H₂O₂ is an AMPK activator, such as ROS. Another important finding shown in the study by Zmijewski et al. (2010) was that the activation and oxidation of the AMPKα subunit was present before there were changes in the concentrations of ADP and ATP or in the ATP / ADP ratio (ZMIJEWSKI et al., 2010). These data are in line with our results, from the perspective that, once activated, AMPK would increase the activity of ectoenzymes and decrease the extracellular concentration of ATP. Since, when we inhibited AMPK, there was a reduction in the hydrolysis of ATP and ADP.

In addition, we observed changes in the activity of ecto-5-nucleotidase (CD73) in AMP hydrolysis, with decreased hydrolysis after treatment with BBR for 24h. The use of iAMPK also reduced the activity of CD73, and when treatment with BBR with the inhibitor was used, there was a significant decrease in AMP hydrolysis. These results together show us that the activity of CD73 appears to be linked to the AMPK pathway, as well as to CD39. In addition to generating ADO, which plays an important role in tumor immunoescape, CD73 is also involved in adhesion, mediating invasive and metastatic properties of cancers, since its overexpression is associated with resistance to antitumor agents. In their analysis, Zhu et al. (2017), after silencing ecto-5'-nucleotidase (CD73) in lung cancer, found a decrease in tumor cell proliferation and migration (ZHU et al., 2017). In support of this, it was previously shown that mice deficient for CD73 have a reduced rate of induced fibrosarcoma growth and that anti-CD73 antibodies decreased tumor proliferation and metastasis in prostate cancer (STAGG et al., 2012).

As both the treatment with BBR and iAMPK resulted in a decrease in the hydrolysis of ATP, ADP, and AMP, we decided to also quantify the expression of the enzymes responsible for the hydrolysis. When quantifying CD39 and CD73, we did not identify modulations when human melanoma cells were treated with BBR-24 h or when the iAMPK was used alone or together with the treatment with BBR.

After CD39 and CD73 degrade ATP/ADP and AMP, respectively, generating ADO, ADA is responsible for the degradation of ADO into inosine, the final step of the enzyme chain (DI VIRGILIO et al., 2016; DWYER; KISHORE; ROBSON, 2020). We evaluated the activity of ADA in deaminating ADO and we found no significant modulations when we treated human melanoma tumor cells with BBR. Still, when using the iAMPK, we did not see changes in the ADA activity, in addition, when using

the iAMPK together with the BBR treatment, it did not interfere with the ADA activity either. After being converted from ADO to inosine by ADA, inosine can be captured by purinergic P1 receptors, this appears to be a cell tactic to remove pathological ADO concentrations. (ALLARD et al., 2020). Even when quantifying ADA1 we found a significant decrease when treating human melanoma cells with BBR.

We now know that purinergic receptors are classified into two groups, P1 and P2. P1 receptors are selective for ADO, whereas P2 receptors are selective for ATP, ADP and uridine 5'-triphosphate (UTP) (BURNSTOCK; KNIGHT; GREIG, 2012). Purinoceptors, P1, P2X and P2Y, are expressed in all parts of the human body and dysregulation of purinoceptor function leads to various diseases including neurological, rheumatic, cardiovascular and cancerous diseases. (HUANG et al., 2021). In our evaluation we found the expression of all evaluated receptors (P2X7, P2Y11, A1 and A2A receptors) in human melanoma cells.

Induction of P2X7 receptor activation through agonists has been shown to increase apoptosis in tumor cells (WHITE; BURNSTOCK, 2006). However, there is a discrepancy in some studies, showing that ATP release and P2X7 receptor activation would increase lung cancer cell migration, proliferation, and survival (TAKAI et al., 2014). According to Di Virgilio et al. (2016) the P2X7 receptor has bifunctionality, so when stimulated in high doses of ATP it would have cytotoxic effects, and when the basal stimulation would have a trophic effect (DI VIRGILIO et al., 2016). However, the tumor environment has high levels of extracellular ATP (DI VIRGILIO et al., 2016; DI VIRGILIO et al., 2018; BELLEFEUILLE; MOLLE; GENDRON, 2019) and P2X7, even so it does not present cytotoxic effects to the tumor (DI VIRGILIO et al., 2016). As we demonstrated here, human melanoma tumor cells have expression of the CD39 enzyme involved in ATP degradation, in addition to the presence of CD73 involved in the hydrolysis of AMP to ADO, thus the tumor cells are able to degrade ATP, avoiding cytotoxic effects.

ADO is known to bind to P1 receptors and stimulate tumor proliferation (PIETROBONO et al., 2020). This might be an explanation for ATP not having toxic effects in the tumor environment, since it would be degraded to ADO, stimulating cell proliferation by binding to P1 receptors. High levels of ATP are the biochemical prerequisite for the accumulation of ADO in the tumor environment (DI VIRIGILIO et al., 2016). The ATP-activated P2Y11 receptor also participates in increasing cell proliferation and migration (BELLEFEUILLE; MOLLE; GENDRON, 2019), as well as

differentiation of tumor cells (WHITE; BURNSTOCK, 2006). In this study, we quantified P2X7 and P2Y11 receptor expression. No significant changes in receptor expression after 24h upon treatment with BBR and in the use of the iAMPK. ATP-induced signaling by the P2Y11 receptor increases intracellular concentrations of $[Ca^{2+}]_i$ and induces cellular migration of human hepatocellular carcinoma cells (KHALID et al., 2017)

Following the study, P1 purinoreceptors, which are selective for ADO, were also evaluated. P1 receptors are coupled to G proteins, where A1 and A3 inhibit adenylate cyclase activity in an inhibitory way, and A2A and A2B in a stimulatory way, which causes increase in cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (BURNSTOCK; KNIGHT; GREIG, 2012). In this study, it was possible to verify that the A1 receptor had its expression decreased in human melanoma cells treated with BBR for 24h and there was no significant change in expression rates of this receptor when using the iAMPK alone to investigate the possible expression route via AMPK. However, there was a change in the treatment of BBR concomitant with the iAMPK, which we understand as an effect of BBR, since the isolated use of this inhibitor did not modulate A1 receptor expression. The A2A receptor did not change its expression levels in the presence of BBR or iAMPK alone or in combination of both. Activation of the A2A receptor is known to lead to metastasis and a poor prognosis for patients (LOI et al., 2013).

Conclusion

We show that BBR influences migration capacity, modifying the structure and adhesion of human melanoma cells, and that iAMPK only influences the migration capacity. Although we did not observe changes in the expression of CD39 and CD73, we found that within 24 hours of treatment with BBR it inhibited hydrolysis of nucleotides, since the increased hydrolysis of ATP, ADP, and AMP generates ADO, which is responsible by increasing tumorigenesis. In addition, both the use of the iAMPK and the treatment with BBR concomitantly with the iAMPK resulted in a reduction in nucleotide hydrolysis. We suggest that further investigation is needed to elucidate the finding, since human melanoma has a high incidence and metastatic capacity.

Author contributions: Conceptualization: TVP; Methodology: TVP, NBB, CEA, JB, MCS, VMM, HU, MMP, CMA; Investigation: TVP, NBB, CEA, JB, MCS, VMM, HU, MMP, CMA; Funding acquisition: TVP, MMP, HU; Supervision: TVP, MMP, CMA. Writing – original draft: TVP, HU, MMP, CMA; Writing – review and editing: TVP, HU, MMP, CMA.

Funding: TVP (88882.182140/2018-01) is grateful for doctoral fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Programa de Excelência Acadêmica (CAPES/PROEX- N°: 23038.005848/2018-31). MMP acknowledges grant support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS proj. No. 20255100002535) and by International Society for Advancement of Cytometry (ISAC Marylou Ingram Scholars Program). HU acknowledges grant support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP proj. No. 2018/07366-4).

Declarations

Conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical approval: Not applicable. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by the author.

Informed consent: Not applicable.

Consent for publication: All authors gave their consent for publication.

Data availability: Not applicable.

References

ALLARD, B. et al. The adenosine pathway in immuno-oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**. v. 17, p. 611–629, 2020. doi: 10.1038/s41571-020-0382-2

AKBANI, R. et al. Genomic classification of cutaneous melanoma. **Cell**. v.161, p.1681-1696, 2015. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.044

ARAB, S.; HADJAT, J. Adenosine Blockage in Tumor Microenvironment and Improvement of Cancer Immunotherapy. **Immune Network**. v.19(4): e23, 2019. doi: 10.4110/in.2019.19.e23

BELLEFEUILLE, S.D; MOLLE, C.M.; GENDRON, F.P. Reviewing the role of P2Y receptors in specific gastrointestinal cancers. **Purinergic Signal**. v.15(4), p. 451-463, 2019. doi: 10.1007/s11302-019-09678-x

BRAKE, A.J.; WAGENBACH, M.J.; JULIUS, D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. **Nature**. v.371(6497), p.519-23, 1994. doi: 10.1038/371519a0.

BURK, R.R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.70(2), p.369-72,1973. doi: 10.1073/pnas.70.2.369

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological. Reviews**. v.24, p.509–581, 1972.

BURNSTOCK G. Purinergic receptors. **Journal of Theoretical Biology**. v. 62(2), p. 491–503, 1976. doi: 10.1016/0022-5193(76)90133-8

BURNSTOCK G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L. (eds) *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. **New York: Raven Press**, p. 107–118, 1978.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. **Frontiers in Pharmacology**. v. 8, p. 661, 2017. doi: 10.3389/fphar.2017.00661

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?. **General Pharmacology**. v.16(5), p. 433–440, 1985. doi: 10.1016/0306-3623(85)90001-1

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E.; GREIG, V.H. Purinergic Signaling in Healthy and Diseased Skin. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 132(3), Part 1, p. 526-546, 2012. doi: 10.1038/jid.2011.344

CAMPOS-CONTRERAS, A.R.; DÍAZ-MUÑOZ, M.; VÁZQUEZ-CUEVAS, F.G. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. **Cells**. v.9(7), p. 1612, 2020. doi: 10.3390/cells9071612

CHEN, X.W. et al. Interaction of herbal compounds with biological targets: A case study with berberine. **Scientific World Journal**. v. 2012, p. 708292(31), 2012. doi: 10.1100/2012/708292

DI VIRGILIO, F. et al. P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading. **Current Opinion in Pharmacology**. v.29, p.17-25, 2016. doi: 10.1016/j.coph.2016.05.001

DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**. v.18, p.601–618, 2018. doi: 10.1038/s41568-018-0037-0

DWYER, K.M.; KISHORE, B.K.; ROBSON, S.C. Conversion of extracellular ATP into adenosine: a master switch in renal health and disease. **Nature Reviews Nephrology**. v.16(9), p.509-524, 2020. doi: 10.1038/s41581-020-0304-7

EICHNER, L.J. et al. Genetic Analysis Reveals AMPK Is Required to Support Tumor Growth in Murine Kras-Dependent Lung Cancer Models. **Cell Metabolism**. v.29 (2), p. 285–302, 2019. doi: 10.1016/j.cmet.2018.10.005

EMRI, G. et al. Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update. **Jounal Photochemistry Photobiology**. v.185, p.169-175, 2018. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.06.005

FREDHOLM, B.B. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological Reviews**. v.53(4), p.527-52, 2001.

GIUSTI, G; GALANTI, B. Colorimetric method. Adenosine deaminase. In: Bergemeyer HU (ed) **Methods of enzymatic analysis**. Verlag Chemie, Weinheim, p. 315-323, 1984.

GIROUARD, S.D.; MURPHY, G.F. Melanoma stem cells: not rare, but well done. **Laboratory Investigation**. v.91, p.647–664, 2011. doi: 10.1038/labinvest.2011.50

GOLDAR, S. et al. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 16(6), p. 2129-2144, 2015. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129

HERZIG, S.; SHAW, R.J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.19 (2), p. 121–135, 2018. doi: 10.1038/nrm.2017.95

HUANG, Z. et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. v. 6, n: 162, 2021. doi: 10.1038/s41392-021-00553-z

KHALID, M. et al. Carcinoma-specific expression of P2Y₁₁ receptor and its contribution in ATP-induced purinergic signalling and cell migration in human hepatocellular carcinoma cells. **Oncotarget**. v. 8, p. 37278-37290, 2017. doi: 10.18632 / oncotarget.16191

LOI, S. et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.110 (27), p.11091–11096, 2013. doi: 10.1073/pnas.1222251110

LUSTIG, K.D. et al. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.90(11), p. 5113–5117, 1993. doi: 10.1073/pnas.90.11.5113

PALMA, T.V. et al. Berberine induces apoptosis in glioblastoma multiforme U87MG cells via oxidative stress and independent of AMPK activity. **Molecular Biology Reports**. v.47(6), p. 4393-4400, 2020. doi: 10.1007/s11033-020-05500-9

PALMA T.V. et al. Berberine increases the expression of cytokines and proteins linked to apoptosis in human melanoma cells. **Molecular Biology Reports**. 2021 Dec 3, 2021. doi: 10.1007/s11033-021-07022-4

PIETROBONO, D. et al. High Adenosine Extracellular Levels Induce Glioblastoma Aggressive Traits Modulating the Mesenchymal Stromal Cell Secretome. **International Journal of Molecular Sciences**. v.21(20), p. 7706, 2020. doi: 10.3390/ijms21207706

RUZSNAVSZKY, O. et al. UV-B induced alteration in purinergic receptors and signaling on HaCaT keratinocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. B 105, p.113–118, 2011. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.07.009

SAITO, Y. et al. AMPK protects leukemia-initiating cells in myeloid leukemias from metabolic stress in the bone marrow. **Cell Stem Cell**. v.17(5), p. 585–596, 2015. doi: 10.1016/j.stem.2015.08.019

SCHADENDORF, D., et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**. v.1, Article number: 15003. 2015. doi: 10.1038/nrdp.2015.3

STAGG J. et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. **Cancer Research**. v.72, p.2190–2196, 2012. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0420

TAKAI, E. et al. Autocrine signaling via release of ATP and activation of P2X7 receptor influences motile activity of human lung cancer cells. **Purinergic Signalling**. v.10, p.487–497, 2014. doi: 10.1007/s11302-014-9411-x

TURNER, N. et al. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action. **Diabetes**. v. 57(5), p.1414-8, 2008. doi: 10.2337/db07-1552

VALERA, S. et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P_{2x} receptor for extracellular ATP. **Nature**. v.371, p.516–519,1994. doi: 10.1038/371516a0

VAN CALKER, D.; MÜLLER, M.; HAMPRECHT, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. **Journal of Neurochemistry**. v.33(5), p.999-1005, 1979. doi: 10.1111/j.1471-4159.1979.tb05236.x

WANG, X. et al. Berberine-photodynamic therapy sensitizes melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis through ROS-mediated P38 MAPK pathways. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.418, p.115484, 2021. doi: 10.1016/j.taap.2021.115484

WEBB, T.E. et al. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. **FEBS Letters**. v.324(2), p. 219-25, 1993. doi: 10.1016/0014-5793(93)81397-i

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and câncer. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.27(4), p.211-7, 2006. doi: 10.1016/j.tips.2006.02.004

XIE, J. et al. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. **Tumor Biology**. v.36(2), p.1279-1288, 2015. doi: 10.1007/s13277-014-2754-7

ZHU, J. et al. CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. **Molecular Cancer**. v.16, p. 34, 2017. doi: 10.1186/s12943-017-0591-1

ZMIJEWSKI, J.W. et al. Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**. v.285, p.33154-33164, 2010. doi: 10.1074/jbc.M110.143685

6 DISCUSSÃO

Em todo o mundo a incidência e mortalidade por cânceres estão crescendo rapidamente. O melanoma apresentou altas taxas de incidência e mortalidade, 287.723 (1,6%) e 60.712 (0,6%), respectivamente no ano de 2018 (BRAY et al., 2018), destacando-se como uma das principais causas de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo (LEE et al., 2021).

Apesar dos grandes avanços, tanto para identificação (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020) quanto nas terapias para o melanoma, utilizando cirurgia, radioterapia e quimioterapia, o manejo clínico desse tumor ainda representa um grande desafio (CHIU et al., 2021), visto que possui alta agressividade e alto poder metastático (DE LOGU et al., 2021; ALKARAKI et al., 2021; DIENER et al., 2021),

A pesquisa de produtos naturais e nutracêuticos vem aumentando e destacando-se, por apresentar menos efeitos colaterais e com grande potencial antitumoral (CHIU et al., 2021). Nesse sentido, destaca-se a BBR extraída de plantas medicinais como *Coptis chinensis* e *Berberis aristata* (CHEN, X.W. et al., 2012), possuindo capacidade de prevenir e reverter doenças (TILLHON et al., 2012; ZHANG et al., 2009; CHEN et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019). Em melanoma, esse composto mostra-se capaz de suprimir o tumor por induzir a apoptose (WANG et al., 2021).

Em nossa pesquisa encontramos que a BBR é eficiente em diminuir a viabilidade das células tumorais SK-MEL-28 de melanoma, aumentando o índice de dano ao DNA, acompanhado por aumento na morte celular, por necrose e apoptose. Evidenciamos que a BBR é eficiente em causar a morte celular em glioblastoma multiforme por aumento de ERO e resultar na parada do ciclo celular em G1/G0 (PALMA et al., 2020).

Também avaliamos o perfil antioxidante das células de melanoma, onde verificamos que havia um aumento de tios totais e SOD. No entanto, esse aumento não foi capaz de proteger as células frente a BBR, que resultou em grande produção de ERO. Esses dados são importantes, demonstrando que a BBR é eficaz contra a linhagem de melanoma pesquisada. Além disso, quando avaliamos as proteínas que estão envolvidadas na apoptose (p-p53 e caspase 3 ativa), verificamos que estavam aumentadas.

Estudo anterior já havia demonstrado que a BBR possui ação antitumoral em câncer de mama, além de apresentar efeitos antiangiogênicos, apoptóticos, inibidor da migração e da proliferação celular (BARZEGAR et al., 2015). Quando avaliamos a migração celular verificamos que a BBR tem alta capacidade de diminuir a migração das células de melanoma. Este dado é de grande importância, uma vez que as células de melanoma apresentam grande potencial metastático (ADAMS et al., 2021).

A BBR tem sido associada a ativação de AMPK, que é responsável por regular vias metabólicas (JIANG et al., 2017). A BBR, por inibir o complexo I da cadeia respiratória, impediria a produção de ATP mitocondrial, o que geraria aumento da adenosina 5'-monofosfato (AMP) e consequente ativação da AMPK (TURNER et al., 2008). Ao utilizar o inibidor de AMPK, observamos uma redução na capacidade de migração das células de melanoma, assim como foi verificada com a utilização da BBR, demonstrando que provavelmente exista uma ligação entre sua ativação e a capacidade de migração das células de melanoma. Por outro lado, estudo prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a inibição de AMPK em glioblastoma multiforme não modulou a indução de apoptose (PALMA et al., 2020).

Com relação às ectoenzimas, embora não tenhamos encontrado modificações no conteúdo das ectoenzimas CD39 e CD73, verificamos uma diminuição expressiva na atividade destas, quando da utilização do tratamento com BBR, assim como na presença de inibidor da AMPK. A diminuição da atividade das ectoenzimas e a não modulação de seu conteúdo pela BBR podemos sugerir que a explicação seja a diminuição da viabilidade, pois o tratamento de 50 μ M resultou em uma redução de aproximadamente 50% na viabilidade e de aumento na morte celular.

Quanto a avaliação dos receptores de nucleotídeos, somente encontramos uma diminuição no conteúdo de A_1 , quando as células foram tratadas com BBR. No entanto, nos demais receptores pesquisados, P_2X_7 , P_2Y_{11} e A_2A , não verificamos modificações na expressão. O que também vinculamos ao fato da BBR ter diminuído a viabilidade das células ao utilizarmos a concentração de 50 μ M, e outro ponto é que a dosagem foi realizada somente em 24 horas.

Ainda podemos vincular que a diminuição da migração possa estar ligada a diminuição na atividade das ectoenzimas, pois a migração é um importante evento da capacidade metastática das células tumorais, e o sistema purinérgico tem sido relacionado à metástase (CAMPOS-CONTRERAS; DÍAZ-MUÑOZ; VÁZQUEZ-CUEVAS, 2020).

Somados, todos os dados encontrados nesse estudo, aliados a estudos anteriores com outras linhagens de melanoma, conclui-se que a BBR diminui a migração das células tumorais (KOU et al., 2016). Além disso, a BBR foi capaz de aumentar a quimiossensibilidade (WANG et al., 2021) e diminuir a viabilidade, promovendo a morte celular (MITTAL; TABASUM; SINGH, 2014), considerações importantes, visto que os pacientes com melanoma apresentam resistência ao tratamento (JAGIELA; BARTNICKI; RYSZ, 2021).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados deste estudo, é possível concluir que a BBR em células SK-MEL-28 de melanoma cutâneo humano, promove uma diminuição da viabilidade celular após 24h de exposição. Em adição, a BBR causa danos ao DNA celular, aumento no número de células com parada na fase G1 do ciclo celular, aumento de ERO e de proteínas ligadas à apoptose em células de melanoma humano. Ainda, verificamos que a BBR parece agir aumentando a expressão das citocinas anti- e pró-inflamatórias. A BBR influencia a capacidade de migração, modificando a estrutura e adesão das células de melanoma humano, e que o iAMPK influencia apenas a capacidade de migração. Embora não tenhamos observado alterações na expressão de CD39 e CD73, o tratamento com BBR e o iAMPK reduziram a hidrólise de nucleotídeos, fato que pode explicar o efeito antitumoral desses compostos. Os resultados apresentados neste estudo são muito importantes, uma vez que o melanoma humano apresenta alta capacidade metastática e mortalidade. Sugerimos com esta pesquisa básica que a BBR pode ser uma promissora candidata ao tratamento do melanoma, tanto sozinha quanto como terapia adjuvante. Por fim, enfatizamos que estudos *in vivo* são necessários para demonstrar os efeitos do BBR, dada a complexidade do metabolismo corporal.

REFERÊNCIAS

ABUDUREYIMU, M. et al. Berberine Promotes Cardiac Function by Upregulating PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy in Heart Failure. **Frontiers in Physiology**. v.11, p. 565751, 2020. <https://doi.org/10.3889/fphys.2020.56575>

ADAMS, J.M. and CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Current Opinion in Immunology**. v. 19(5), p. 488-496, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.05.004>

ADAMS, R. et al. Chemokine Pathways in Cutaneous Melanoma: Their Modulation by Cancer and Exploitation by the Clinician. **Cancers**. v. 13(22), p.5625, 2021; <https://doi.org/10.3390/cancers13225625>

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v.105, p.121-126, 1984. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)

AHMED, T. et al. Berberine and neurodegeneration: A review of literature. **Pharmacology Reports**. v. 67(5), p. 970-979, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.002>

ALKARAKI, A. et al. Metabolic Plasticity in Melanoma Progression and Response to Oncogene Targeted Therapies. **Cancers**. v.13(22), p. 5810, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13225810>

ALLARD, B. et al. The adenosine pathway in immuno-oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**. v. 17, p. 611-629, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0382-2>

AMERICAN CANCER SOCIETY. **About Basal and Squamous Cell Skin Cancer**. Atlanta, 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2017**. Atlanta, 2017.

ARAB, S.; HADJAT, J. Adenosine Blockage in Tumor Microenvironment and Improvement of Cancer Immunotherapy. **Immune Network**. v.19(4), e23, 2019. <https://doi.org/10.4110/in.2019.19.e23>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248- 254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.**

BARZEGAR, E. et al. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences.** v.18(4), p. 334-342, 2015.

BELLEFEUILLE, S.D; MOLLE, C.M.; GENDRON, F.P. Reviewing the role of P2Y receptors in specific gastrointestinal cancers. **Purinergic Signalling.** v.15(4), p. 451-463, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09678-x>

BOYNE, A.F.; ELLMAN, G.L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. **Analytical Biochemistry.** v.46, p. 639-653, 1972. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90335-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90335-1)

BRAKE, A.J.; WAGENBACH, M.J.; JULIUS, D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. **Nature.** v.371(6497), p.519-523, 1994. <https://doi.org/10.1038/371519a0>.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, **Hoboken**, v. 68(6), p. 394-424, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BRIERLEY, J. et al. **TNM classification of malignant tumours.** 8^o edição. 2017.

BURK, R.R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.70(2), p.369-72, 1973. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.2.369>

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological. Reviews.** v.24, p.509-581, 1972.

BURNSTOCK G. Purinergic receptors. **Journal of Theoretical Biology.** v.62(2), p.491-503, 1976. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8)

BURNSTOCK G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L. (eds) *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach.* **New York: Raven Press**, p. 107-118, 1978.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. **Frontiers in Pharmacology.** v. 8, p. 661, 2017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00661>

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?. **General Pharmacology**. v.16(5), p. 433-440, 1985. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(85\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(85)90001-1)

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E.; GREIG, V.H. Purinergic Signaling in Healthy and Diseased Skin. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 132(3), p. 526-546, 2012. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.344>

BURR, A.; PAREKKADAN, B. Kinetics of MSC-based enzyme therapy for immunoregulation. **Journal of Translational Medicine**. v. 17, p. 263, 2019.

CAI, Y. et al. A New Therapeutic Candidate for Cardiovascular Diseases: Berberine. **Frontiers in Pharmacology**. v.12, p.631100, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.631100>

CAMPOS-CONTRERAS, A.R.; DÍAZ-MUÑOZ, M.; VÁZQUEZ-CUEVAS, F.G. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. **Cells**. v. 9(7), p. 1612, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9071612>

CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surgical Clinics of North America**. v. 100(1), p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005>.

CHAN, K.; DELFERT, K.; JUNGUER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. **Analytical Biochemistry**. v.157, p.375-380,1986. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90640-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90640-8)

CHEN, C.C. et al. Berberine Protects against Neuronal Damage via Suppression of GliaMediated Inflammation in Traumatic Brain Injury. **PLoS One**. v. 9(12), p. 115694(30), 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115694>

CHEN, L. et al. Crystal Structure-Guided Design of Berberine-Based Novel Chitinase Inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry**. v.35(1), p.1937-43, 2020. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1837123>

CHEN, T.C. et al. Involvement of reactive oxygen species and caspase-dependent pathway in berberine-induced cell cycle arrest and apoptosis in C6 rat glioma cells. **International Journal of Oncology**. v. 34(6), p. 1681-1690, 2009. https://doi.org/10.3892/ijo_00000299

CHEN, Y. et al. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. **Cell Death & Differentiation- Nature**. v. 15(1), p. 171-182, 2008. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402233>

CHEN, X.W. et al. Interaction of herbal compounds with biological targets: A case study with berberine. **Scientific World Journal**. v. 2012, p. 708292(31), 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/708292>

CHIU et al. Delivery Capacity and Anticancer Ability of the Berberine-Loaded Gold Nanoparticles to Promote the Apoptosis Effect in Breast Cancer. **Cancers (Basel)**. v.13(21), p. 5317, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13215317>.

CLARK, W.H.; FROM, L.; BERNARDINO, E.A.; MIHM, M.C. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Research**. v.29, p. 705-727, 1969.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 10(2), p. 389-406. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x>

DAVIS, L.E.; SHALIN, S.C.; TACKETT, A.J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer biology & Therapy**. v.20(11), p.1366-1379, 2019. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>

DE LOGU, F. et al. The TRPA1 Channel Amplifies the Oxidative Stress Signal in Melanoma. **Cells**. v.10(11), p. 3131. <https://doi.org/10.3390/cells10113131>.

DE OLIVEIRA, J.S. et al. Berberine protects against memory impairment and angiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic Alzheimer's-like dementia: involvement of acetylcholinesterase and cell death. **Neurotoxicology**. v. 57, p.241-250, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.10.008>

DE OLIVEIRA, J.S. et al. Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin. **Psychopharmacology**. v. 236, p.641-655, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5090-6>

DIENER, J. et al. Epigenetic control of melanoma cell invasiveness by the stem cell factor SALL4. **Nature Communications**. v. 12, p. 5056, 2021. <https://doi.org/s41467-021-25326-8>

DI VIRGILIO, F. et al. P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading. **Current Opinion in Pharmacology**. v.29, p.17-25, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.05.001>

DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**. v.18, p.601-618, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>

D'ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **International Journal Molecular Science**. v.14, p.12222-48, 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>

DUMMER, R. et al. Neoadjuvant talimogene laherparepvec plus surgery versus surgery alone for resectable stage IIIB–IVM1a melanoma: a randomized, open-label, phase 2 trial. **Nature Medicine**. v. 27, p.1789-1796, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01510-7>

- DWYER, K.M.; KISHORE, B.K.; ROBSON, S.C. Conversion of extracellular ATP into adenosine: a master switch in renal health and disease. **Nature Reviews Nephrology**. v.16(9), p.509-524, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0304-7>
- EICHNER, L.J. et al. Genetic Analysis Reveals AMPK Is Required to Support Tumor Growth in Murine Kras-Dependent Lung Cancer Models. **Cell Metabolism**. v.29 (2), p.285-302, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.10.005>
- ELLMAN, G.L. Tissue Sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.82, p. 70-72, 1959. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- EL-WAHAB, A.E.A. et al. In vitro biological assessment of berberis vulgaris and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.13, p. 218(13), 2013. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-218>
- EMRI, G. et al. Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update. **Journal Photochemistry Photobiology**. v.185, p.169-175, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.06.005>
- FANG, J. et al. Berberine-photodynamic induced apoptosis by activating endoplasmic reticulum stress-autophagy pathway involving CHOP in human malignant melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.552, p.183-190, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.02.147>
- FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**. v.73(4), p.1907-1916, 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- FIRUZI, O. et al. Parameters of oxidative stress status in healthy subjects: their correlations and stability after sample collection. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, p. 139148, 2006. <https://doi.org/10.1002/jcla.20122>
- FREDHOLM, B.B. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological Reviews**. v.53(4), p.527-52, 2001.
- GÁLVES, J.M. et al. Multiclass classification for skin cancer profiling based on the integration of heterogeneous gene expression series. **Plos One**. v.13(5), e0196836, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196836>
- GE, L. et al. Metformin Increases Sensitivity of Melanoma Cells to Cisplatin by Blocking Exosomal-Mediated miR-34a Secretion. **Journal of Oncology**. v.2021, e 5525231, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5525231>
- GIROUARD, S.D.; MURPHY, G.F. Melanoma stem cells: not rare, but well done. **Laboratory Investigation**. v.91, p. 647-664, 2011.
- GOLDAR, S. et al. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer

Development and Treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 16(6), p. 2129-2144, 2015. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2129>

GUISTI, G; GALANTI, B. Colorimetric method. Adenosine deaminase. In: Bergemeyer HU (ed) **Methods of enzymatic analysis**. Verlag Chemie, Weinheim, p. 315-323, 1984.

HABTEMARIAM, S. The Quest to Enhance the Efficacy of Berberine for Type-2 Diabetes and Associated Diseases: Physicochemical Modification Approaches. **Biomedicines**. v. 8(4), p.90-108, 2020. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8040090>

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 4th edition. **New York: Oxford University**, 2007.

HARTMAN, R. I. e LIN, J. Y. Cutaneous Melanoma-A Review in Detection, Staging, and Management. **Hematology Oncology Clinics of North America**. v. 33(1), p. 25-38, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.09.005>

HASSAN, M. et al. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 150845(23), 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/150845>

HE, W. et al. Berberine Inhibits Growth and Induces G1 Arrest and Apoptosis in Human Cholangiocarcinoma QBC939 Cells. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 119(4), p. 341348. 2012. <https://doi.org/10.1254/jphs.12052fp>

HEGEDÜS et al. Allosteric and ATP-Competitive MEK-Inhibition in a Novel Spitzoid Melanoma Model with a RAF- and Phosphorylation-Independent Mutation. **Cancers (Basel)**. v.13(4), p. 829, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13040829>

HERZIG, S.; SHAW, R.J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.19 (2), p. 121-135, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>

HUANG, C.; RADI, R.H.; ARBISER, J.L. Mitochondrial Metabolism in Melanoma. **Cells**. v.10(11), p.3197, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10113197>.

HUANG, Z. et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. v. 6, n: 162, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>

ILYAS, S. et al. Effect of *Berberis vulgaris* L. root extract on ifosfamide-induced in vivo toxicity and in vitro cytotoxicity. **Scientific Reports**. v.11, p.1708, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80579-5>

JACKSON, M. J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p. 1001-1006, 1999. <https://doi.org/10.1017/s0029665199001317>

JAGIELA, J.; BARTNICKI, P.; RYSZ, J. Nephrotoxicity as a Complication of Chemotherapy and Immunotherapy in the Treatment of Colorectal Cancer, Melanoma and Non-Small Cell Lung Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**. v.22(9), p. 4618, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22094618>

JIANG, S.X. et al. Berberine displays antitumor activity in esophageal cancer cells in vitro. **World Journal Gastroenterology**. v. 23(14), p. 2511-2518, 2017. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i14.2511>

JONES IV, A.R. et al. Extracellular Redox Regulation of Intracellular Reactive Oxygen Generation, Mitochondrial Function and Lipid Turnover in Cultured Human Adipocytes. **PLoS One**. v. 11(10), e0164011, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164011>

KATAOKA, T. Chemical biology of inflammatory cytokine signaling. **The Journal of Antibiotics**. v. 62, p.655-667, 2009. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.98>

KHALID, M. et al. Carcinoma-specific expression of P2Y₁₁ receptor and its contribution in ATP-induced purinergic signalling and cell migration in human hepatocellular carcinoma cells. **Oncotarget**. v.8, p. 37278-37290, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16191>

KOU, Y. et al. Berberine suppressed epithelial mesenchymal transition through cross-talk regulation of PI3K/AKT and RAR α /RAR β in melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.479(2), p.290-296, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.061>

KUNDRANDA, M.N.; NIU, J. Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future directions. **Drug Design, Development and Therapy**. v.9, p.3767-77. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S88023>

KYRIAKOU, S. et al. Chemical and Biological Characterization of the Anticancer Potency of *Salvia fruticosa* in a Model of Human Malignant Melanoma. **Plants**. v. 10(11), p. 2472, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10112472>

KWAŚNIAK, K. et al. Scientific reports concerning the impact of interleukin 4, interleukin 10 and transforming growth factor β on cancer cells. **Central European Journal Immunology**. v.44(2), p.190-200, 2019. <https://doi.org/10.5114/ceji.2018.76273>

LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.21(10), p.607-632, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; Ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1721, p. 9–15, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.09.006>

LEE, S.G. et al. Synergistic inhibitory effects of the oxyresveratrol and dacarbazine combination against melanoma cells. **Oncology Letters**. v.22(3), p. 667, 2021. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12928>

LIN, H. et al. Development and in-vitro evaluation of co-loaded berberine chloride and evodiamine ethosomes for treatment of melanoma. **International Journal of Pharmaceutics**. v.581, p.119278, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119278>

LIOCHEV, S.I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology Medicine**. v.60, p.1-4, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011>

LIU, J. et al. Berberine Inhibits Human Melanoma A375.S2 Cell Migration and Invasion via Affecting the FAK, uPA, and NF- κ B Signaling Pathways and Inhibits PLX4032 Resistant A375.S2 Cell Migration In Vitro. **Molecules**. v.23(8), p.2019, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23082019>

LOI, S. et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.110(27), p. 11091-11096, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222251110>

LÓPEZ, A. et al. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. **Revista Anacem**. v. 6 (1), p. 48-53, 2012.

LUSTIG, K.D. et al. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.90(11), p. 5113-5117, 1993. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5113>

MATTSON, M.P.; CHAN, S.L. Calcium orchestrates apoptosis. **Nature Cell Biology**. v. 5, p. 1041-1043, 2003. <https://doi.org/10.1038/ncb1203-1041>

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P.J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**. v. 349(6255), p. 1483-9, 2015. <https://doi.org/10.1126/science.aab4082>

MITTAL, A.; TABASUM, S.; SINGH, R.P. Berberine in combination with doxorubicin suppresses growth of murine melanoma B16F10 cells in culture and xenograft. **Phytomedicine**. v. 21(3), p.340-347, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.002>

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A silver staining method for singlecell gel assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, p. 1183-6, 2001. <https://doi.org/10.1177/002215540104900912>

OCH, A.; PODGÓRSKI, R.; NOWAK, R. Biological Activity of Berberine-A Summary Update. **Toxins (Basel)**. v.12(11), p.713-738, 2020. <https://doi.org/10.3390/toxins12110713>

ORTIZ, L.M. et al. Berberine, an epiphany against cancer. **Molecules**. v. 19(8), p. 1234912367, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules190812349>

O'SULLIVAN, et al. **UICC Manual of Clinical Oncology**. 9° edição. 2015.

PARK, S.H. et al. Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIAPaCa2 pancreatic cell lines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.48(2), p. 111-119, 2015. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144293>

PIETROBONO, D. et al. High Adenosine Extracellular Levels Induce Glioblastoma Aggressive Traits Modulating the Mesenchymal Stromal Cell Secretome. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 21(20), p. 7706, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21207706>

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 97, p. 55-74, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

QI, H.W. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition markers to predict response of Berberine in suppressing lung cancer invasion and metastasis. **Journal of Translational Medicine**. v. 24, p. 12-22, 2014. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-22>

QUIRBT, I. et al. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma. **Current Oncology**. v. 14 (1), p. 27-33, 2007. <https://doi.org/10.3747/co.2007.98>

REN, M. et al. Cell Cycle Regulation by Berberine in Human Melanoma A375 Cells. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v.169(4), p.491-496, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04916-4>

RUZSNAVSZKY, O. et al. UV-B induced alteration in purinergic receptors and signaling on HaCaT keratinocytes. **Journal Photochemistry and Photobiology**. v. 105(1), p.113-118, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.07.009>

SAITO, Y. et al. AMPK protects leukemia-initiating cells in myeloid leukemias from metabolic stress in the bone marrow. **Cell Stem Cell**. v.17(5), p. 585-596, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.019>

SCHADENDORF, D., et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**. v.1, Article number: 15003, 2015. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)

SCHETINGER, M. R. et al. Effects of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5). **Biological Trace Element Research**, v. 50, p. 209–19, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF02785411>

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte - RBME**. v. 10(10), p. 308-13, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922004000400008>

SCOLYER, R.A.; LONG, G.V.; THOMPSON, J.F. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. **Molecular Oncology**. v.5(2), p.124-136, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.03.002>

SHAIN, A.H.; BASTIAN, B.C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**. v.16, p.345-358, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>

SHEN, Z.Q. et al. Berberine Inhibits Colorectal Tumor Growth by Suppressing SHH Secretion. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.42(7), p.1190-4, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00514-2>

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D.P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**. v. 86, p. 715-748, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

SIM, J. et al. Inhibitory Effect of Chlorogenic Acid Analogues Comprising Pyridine and Pyrimidine on α -MSH-Stimulated Melanogenesis and Stability of Acyl Analogues in Methanol. **Pharmaceuticals**. v.14(11), p.1176, 2021. <https://doi.org/10.3390/ph14111176>

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-91, 1988. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

SLOMINSKI, A.T., et al. Vitamin D signaling and melanoma: role of vitamin D and its receptors in melanoma progression and management. **Laboratory Investigation**. v.97, p. 706-724, 2017. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.3>

SPECENIER, P. Efficacy of nab-paclitaxel in treating metastatic melanoma. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. v.20(5), p.495-500, 2019. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1569628>.

SPITZ, D.R.; OBERLEY, L.W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. **Analytical Biochemistry**. v.179(1), p.8-18, 1989. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90192-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90192-9)

STAGG, J. et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. **Cancer Research**. v.72, p.2190-2196, 2012. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0420>

TAKAI, E. et al. Autocrine signaling via release of ATP and activation of P2X7 receptor influences motile activity of human lung cancer cells. **Purinergic Signalling**. v.10, p.487–497, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9411-x>

TILLHON, M. et al. Berberine: New perspectives for old remedies. **Biochemical Pharmacology**. v. 84(10), p. 1260-7, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.018>

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**. v. 189(1-2), p. 41-54, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00151-3](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00151-3)

VALERA, S. et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P_{2x} receptor for extracellular ATP. **Nature**. v.371, p.516-519, 1994. <https://doi.org/10.1038/371516a0>

VAN CALKER, D.; MÜLLER, M.; HAMPRECHT, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. **Journal of Neurochemistry**. v.33(5), p.999-1005, 1979. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1979.tb05236.x>

VECHTOMOVA, Y.L. et al. UV Radiation in DNA Damage and Repair Involving DNA Photolyases and Cryptochromes. **Biomedicines**. v. 9(11), p. 1564, 2021. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111564>

VINCENT, H.K.; INNES, K.E.; VINCENT, K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 9(6), p. 813-839, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00692.x>

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**. v.408(6810), p. 307–310, 2000. <https://doi.org/10.1038/35042675>

WANG, X. et al. Berberine-photodynamic therapy sensitizes melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis through ROS-mediated P38 MAPK pathways. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 418, p.115484, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115484>

WEBB, T.E. et al. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. **FEBS Letters**. v.324(2), p. 219-25, 1993. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81397-i](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81397-i)

WEYDERT, C.J.; CULLEN, J.J. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**. v. 5(1), p. 51-66, 2010. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and câncer. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 27(4), p.211-7, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.02.004>

XIANG, K., et al. The First Comprehensive Phylogeny of Coptis (Ranunculaceae) and Its Implications for Character Evolution and Classification. **PLoS ONE**. v. 11(4), p. 0153127(17), 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153127>

XIE J. et al. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. **Tumor Biology**. v. 36(2), p. 1279-1288, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2754-7>

YAAR, R. et al. Animal models for the study of adenosine receptor function. **Journal of Cellular Physiology**, v. 202, p. 9-20, 2005. <https://doi.org/10.1002/jcp.20138>

YANG, X.; HUANG, N. Berberine induces selective apoptosis through the AMPK-mediated mitochondrial/caspase pathway in hepatocellular carcinoma. **Molecular Medicine Reports**. v. 8(2), p. 505-510, 2013. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1506>

ZHANG, W. et al. Berberine Protects Mesenchymal Stem Cells against Hypoxia-Induced Apoptosis *in Vitro*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 8, p. 1335-1342, 2009. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1335>

ZHENG, F. et al. p38 α MAPK-mediated induction and interaction of FOXO3a and p53 contribute to the inhibited growth and induced-apoptosis of human lung denocarcinoma cells by berberine. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. v.33(1), p.36, 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-36>

ZHU, Y. et al. Berberine induces apoptosis and DNA damage in MG-63 human osteosarcoma cells. **Molecular Medicine Reports**. v. 10(4), p. 1734-1738, 2014. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2405>

ZHU, J. et al. CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung câncer. **Molecular Cancer**. v.16, p.34, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0591-1>

ZMIJEWSKI, J.W. et al. Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. **Jounal of Biological Chemistry**. v.285, p. 33154-33164, 2010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143685>