

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE E DOS MECANISMOS ANTITUMORAIS *IN VITRO* E *IN VIVO* DO FENILPROPANOÍDE LIGNINA DERIVADO DO EUCALIPTO (*Eucalyptus sp.*) EM MELANOMA MURINO

Guilherme Mendes de Freitas¹; Maria Carolina Mariano Cesar²; Denise Costa Arruda³

1. Estudante do curso de Biomedicina, e-mail: guimendesfradiologia@outlook.com
2. Doutoranda em Biotecnologia; e-mail: cesarcaraolina1@hotmail.com
3. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: denisearruda@umc.br

Área de conhecimento: Biologia Molecular

Palavra-chave: Melanoma; Lignina; compostos naturais; morte celular

INTRODUÇÃO

Os melanócitos são células presentes na camada basal da epiderme, responsáveis pela produção da melanina. O câncer de pele do tipo melanoma se origina a partir de mutações ocorridas nos melanócitos (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). Quando diagnosticado no início, a intervenção cirúrgica é recomendada. Neste caso, a quimioterapia é necessária se os pacientes apresentam alta taxa de remissão, porém, em estágios avançados, quando há ocorrência de metástase as células se tornam altamente resistentes ao tratamento, gerando prognóstico ruim para o paciente (HOEK *et al.*, 2008). Atualmente muitos quimioterápicos são produzidos a partir de compostos naturais e empregados no tratamento de vários tipos cânceres (YANG & HORWITZ, 2017), dentre esses quimioterápicos podemos destacar a Vincristina, Vinblastina e Paclitaxel. Por isso, há necessidade de estudos de novos compostos naturais com atividade antitumoral. A lignina foi extraída da casca do eucalipto (*Eucalyptus sp.*), é um biopolímero que possui uma estrutura 3-D com muitas ramificações e diferentes grupos funcionais como: hidroxila (OH), metoxila (-O-CH₃), carbonila (CO=) e carboxila (COOH) (WENG & CHAPPLE, 2010).

OBJETIVO

Determinar o efeito antitumoral da lignina em células de melanoma murino B16F10-Nex2, bem como, determinar o mecanismo de morte celular induzida por esse composto.

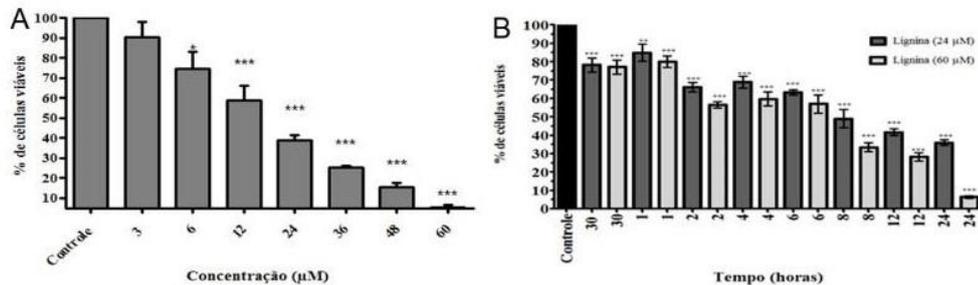
METODOLOGIA

As células B16F10-Nex2 de melanoma murino, foram tratadas com diversas concentrações de Lignina para a determinação da viabilidade celular. Além disso, foi determinado uma curva de tempo. Para isso, as células foram tratadas e após o tempo de incubação, as células foram coradas com *trypan blue* e contadas em câmara de Neubauer. Para avaliação da fragmentação do DNA as células plaqueadas em lamínulas de vidro e foram tratadas com 24 µM de lignina. As células foram coradas utilizando o Kit de TUNEL e com DAPI e analisadas em microscópio de fluorescência. Para avaliar a migração e invasão celular, as células foram tratadas com uma concentração subtóxica de lignina, 3 µM, capturando imagens para determinação do efeito inibitório e as imagens analisadas no programa ImageJ (versão 1.4).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

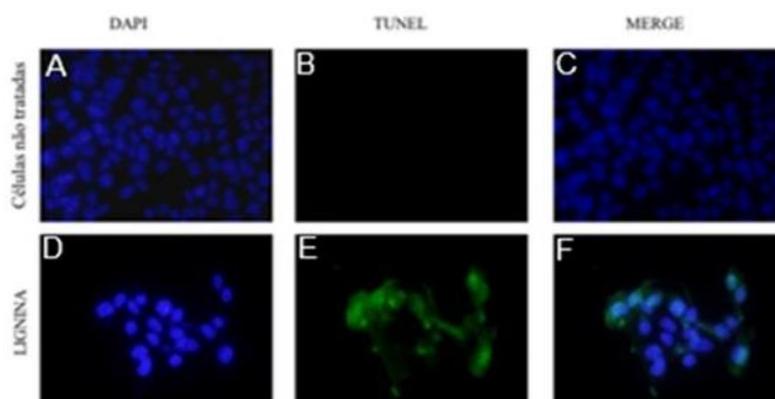
Células de melanoma murino B16F10-Nex2 foram tratadas com diferentes concentrações de lignina para determinação da viabilidade celular, após 24h de tratamento as células foram coradas com *Trypan-Blue* e as células viáveis foram contadas. A lignina mostrou diminuição da viabilidade celular e a EC50 calculada foi de $24 \mu\text{M} \pm 4,8$. No ensaio para verificar o menor tempo em que a lignina já apresenta atividade antitumoral, observamos que em 30 minutos já houve diminuição da viabilidade celular, e a viabilidade diminuiu com o tempo de tratamento (Figura 1). Estudos recentes de Song e colaboradores, 2008, e, Barapatre e colaboradores, 2016, utilizaram extratos de compostos naturais para avaliar atividade antitumoral e dentre os componentes desses extratos está presente a lignina, sendo visto efeitos sobre as células como morte e interferência no ciclo celular. Como foi visto que a lignina possui atividade antitumoral, as células de melanoma murino B16F10-NEX2, foram tratadas com lignina e incubadas com os reagentes do Kit de TUNEL e DAPI. É possível visualizar no experimento que as células tratadas foram marcadas com TUNEL, indicando que ocorreu fragmentação do DNA, o mesmo não foi visto nas células não tratadas (Figura 2). Purushotham e colaboradores (2016), utilizaram um extrato metanólico de *Andrographis nallamalayana* que havia presença de lignina em seus componentes em células B16F10 e observaram a fragmentação do DNA.

Figura 1: Viabilidade Celular em células B16F10-Nex2 tratadas com lignina e curva de tempo.



Células B16F10-Nex2 incubadas na presença de lignina por 24 horas. Células não tratadas (controle) foram incubadas na ausência de lignina e com 1% de DMSO e meio RPMI. (A) A viabilidade foi determinada por ensaio de contagem utilizando o corante de exclusão Trypan Blue. (B) Para a curva de tempo as células foram tratadas com a 24 µM e 60 µM. Os experimentos foram realizados em triplicata e 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$.

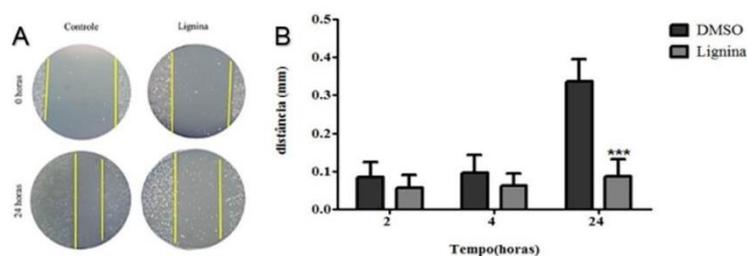
Figura 2: Determinação da fragmentação do DNA através do Ensaio de TUNEL.



A células B16F10-NEX2 foram tratadas com 24 μM de lignina e marcadas com o DAPI e TUNEL e realizada a leitura em um microscópio de fluorescência. (A e D): As células não tratadas e tratadas apresentam a marcação com DAPI; (B) as células não tratadas não apresentaram marcação por TUNEL; (E) Células tratadas com lignina apresentaram a fragmentação do DNA assim sendo marcadas por TUNEL. (C e F) MERGE sobreposição das imagens.

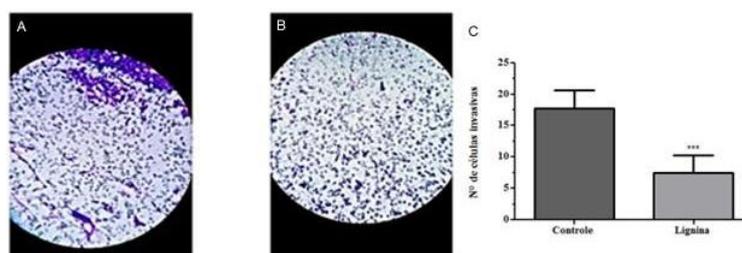
Após determinação da viabilidade celular e degradação do DNA, sendo realizado o experimento migração por *wound healing assay*, no qual é feita uma lesão vertical nas células para observar a migração celular. O tratamento foi realizado com lignina na concentração subtóxica de 3 μM . As células que receberam tratamento migraram uma distância significativamente menor que as células não tratadas. A motilidade celular é um ponto chave para o desenvolvimento do organismo. O processo de invasão é definido quando ocorre movimento celular através de uma matriz 3D, a célula se reestrutura para poder atravessar a matriz extracelular, desta forma as células adentram vasos sanguíneos e linfáticos migrando para outros órgãos se alojando e desenvolvendo um tumor secundário (JUSTUS *et al.*, 2014; KRAMER *et al.*, 2013). O ensaio de invasão foi realizado utilizando insertos transwell com uma membrana de matrigel. As células foram tratadas com 3 μM de lignina e as células não tratadas (controle) foram incubadas com 0,6% de DMSO e meio RPMI, foram fixadas e coradas e contadas as células não tratadas e as células tratadas realizou-se a análise estatística pelo GraphPad (versão 5.0), onde uma média de 8 células tratadas com lignina invadiram a membrana de matrigel e as células não tratadas (controle) invadiram uma média de 18 células, indicando que houve inibição significativa da invasão (Figura 4). Wang e colaboradores (2017), observaram inibição da invasão celular ao tratarem as células de câncer de ovário: OVCAR-3 e SKOV-3 com Celastrol, o ensaio de invasão realizado neste estudo é semelhante ao que utilizamos em nosso laboratório.

Figura 3. Ensaio de Invasão celular com células B16F10-NEX2 tratadas com lignina.



Células B16F10-Nex2 foram cultivadas após 24 horas foi feita a lesão vertical e incubadas com 3 μ M de lignina as células não tratadas (controle) foram incubadas na ausência de Lignina, com 0,6% de DMSO e meio RPMI. Foram capturadas imagens nos tempos 0, 2, 4 e 24 horas para análise da distância percorrida pelas células. **A)** as imagens representam três experimentos realizados independentes, comparando as imagens de 0 e 24h das células tratadas e não tratadas. **B)** Para determinar a distância percorrida foi utilizado o programa ImageJ, subtraindo os valores aferidos em 2h, 4h e 24h do valor aferido em 0h, para obter o valor percorrido pelas células. Foram realizados 3 experimentos em triplicata independentes.

Figura 4. Ensaio de Invasão com Transwell.



(A) células não tratadas (controle) com 0,6% de DMSO, **(B)**, células tratadas com Lignina 3 μ M. **(C)**. As células tratadas com concentrações subtóxicas de lignina invadiram significativamente menos o matrigel que as células não tratadas. O experimento foi realizado 3 vezes independentes em triplicata, realizado a contagem das células e tirado uma média, os dados foram analisados no GraphPad, demonstrando que a lignina impediu a invasão celular. *** $p < 0,001$.

CONCLUSÕES

A lignina apresenta atividade antitumoral nas células de melanoma murino B16F10-Nex2 e induz a degradação do DNA. Entretanto, ainda não possuímos resultados suficientes para determinar o mecanismo de morte celular envolvido no processo após o tratamento com lignina. Foi visto também que a lignina inibe de forma significativa a invasão e migração celular. Testes complementares serão realizados para determinar o mecanismo de morte celular e elucidar de qual maneira a lignina extraída do *Eucalyptus sp.* está interferindo na invasão e migração celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAPATRE A, MEENA AS, MEKALA S, DAS A, JHA H. *In vitro* evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*. **Int J Biol Macromol.** V.86. P.443. 2016.

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

Hoek, Keith S et al. "Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy." **Pigment cell & melanoma research** vol. 21,6, 2008.

KRAMER, N. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research.**, n.752, p. 10–24, 2013.

PURUSHOTHAM, G.*et al.* In vitro evaluation of anti-proliferative, anti-inflammatory and pro-apoptotic activities of the methanolic extracts of *Andrographis nallamalayana* Ellis on A375 and B16F10 melanoma cell lines. **Biotech**, 6, 212. 2016.

SONG, Y. *et al.* Identification of *Inonotus obliquus* and Analysis of Antioxidation and Antitumor Activities of Polysaccharides. **Curr Microbiol**, n.57, p. 454–462, 2008.

WANG, *et al.* Celastrol inibe a migração e invasão através do bloqueio da via NF- κ B em células de câncer de ovário. **Medicina experimental e terapêutica**, v. 14, n.1, p. 819-824, 2017.

WENG, J. K., CHAPPLE, C. The Origin and Evolution of Lignin Biosynthesis. **New Phytologist**. v. 187, n. 2, p. 273-285, 2010.

YANG, C.P. H. AND HORWITZ, S. B. Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18 , n. 1733, p.1-11, 2017.