



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



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

Guilherme Mendes de Freitas<sup>1</sup>, Maria Carolina Mariano Cesar<sup>2</sup>, Denise Costa Arruda<sup>3</sup>

1. Estudante - curso de Biomedicina, e-mail: guimendes.freitas@outlook.com;
2. Doutoranda em Biotecnologia - UMC; e-mail: cesarcarolina1@hotmail.com;
3. Professora - UMC; e-mail: denisearruda@umc.br.

**Área de conhecimento:** Biologia Molecular.

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

### INTRODUÇÃO

O câncer de pele do tipo melanoma, se desenvolve a partir de mutações em melanócitos que são células encontradas na camada basal da epiderme, especializadas na produção de melanina. Quando ocorre processo metastático, as células de melanoma se altamente resistente a quimioterapia. Por esse motivo existe a necessidade de pesquisa para o desenvolvimento de outros quimioterápicos que possam atuar como adjuvantes para os tratamentos atuais. Além disso alguns quimioterápicos desenvolvidos a partir de compostos naturais já são empregados no tratamento, caso de Vincristina, Vimblastina e Paclitaxel (TESTA *et al.*, 2017; YANG & HORWITZ, 2017). A lignina, utilizada neste trabalho foi extraída do eucalipto (*Eucalyptus sp.*), sendo um biopolímero, formado por diversos grupos funcionais na sua composição, como: hidroxila (OH), metoxila (-O-CH<sub>3</sub>), carbonila (CO=) e carboxila (COOH) (WENG & CHAPPLE, 2010).

### OBJETIVO

Determinar a mecanismo de morte induzido pela lignina em células de melanoma murino. Nas células de melanoma humano SK-Mel-25, determinar se há diminuição da viabilidade celular e se ocorre inibição da migração e invasão celular, após tratamento com lignina.

### METODOLOGIA

As células B16F10-Nex2, foram tratadas com a concentração de 24 µM e 60 µM de lignina para avaliação do mecanismo de morte induzido na presença dos inibidores de morte (Zvad-fmk, 3MA, NAC e NEC), as células foram coradas com Trypan blue e contadas em câmara de Neubauer. As células de melanoma humano SK-Mel-25, foram tratadas com 24 µM e 60 µM para determinação da ação da lignina sobre a viabilidade celular. Para avaliação da invasão foi realizado através da utilização de Transwell na

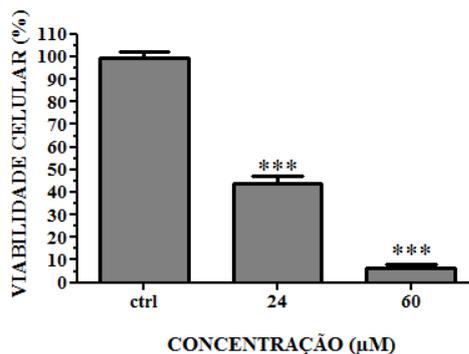


presença de Matrigel e migração celular foi utilizado o método Wound-healing as células SK-Mel-25 foram tratadas com uma concentração subtóxica (3,36  $\mu\text{M}$ ), foram capturadas imagens para determinar se ocorre inibição, as imagens foram analisadas no programa ImageJ (versão 1.4).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de viabilidade celular demonstraram que a lignina induziu as células de melanoma humano SK-Mel-25 à morte em uma concentração dose-dependente, onde as duas concentrações testadas diminuíram significativamente a viabilidade celular das células de melanoma humano em 90% (60  $\mu\text{M}$ ) e em 50% (24  $\mu\text{M}$ ). SONG e colaboradores, (2008), a partir um composto natural, produziu um extrato que possuía lignina entre outros componentes que demonstrou diminuição da viabilidade celular das mais diversas linhagens tumorais (figura 1).

**Figura 1. Viabilidade celular com células SK-Mel-25** Demonstração da atividade do composto lignina sobre as células SK-Mel-25 após tratamento por 24h. É observado diminuição significativa da viabilidade celular. Foram realizados 3 experimentos individuais em triplicata, onde as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio do corante de exclusão *Trypan blue*. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

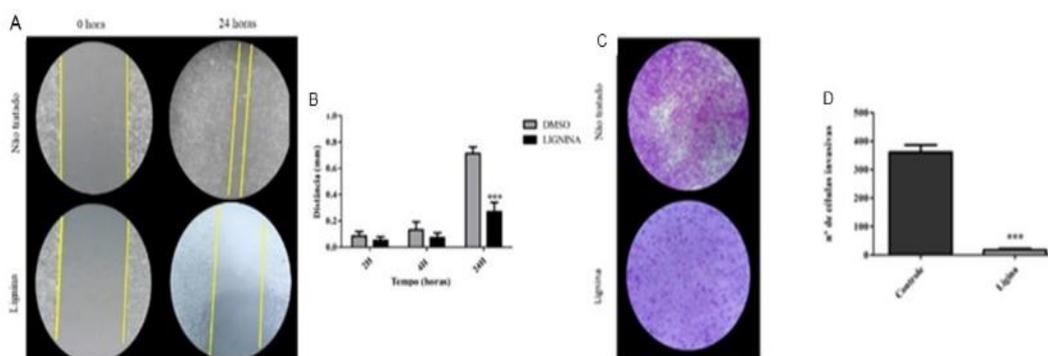


Para determinação da migração celular *in vitro*, foi realizado ensaio de *wound healing assay*, onde as células de melanoma humano SK-Mel-25 foram palqueadas e depois realizado uma lesão vertical e foi realizado o tratamento com 3,36  $\mu\text{M}$  de lignina, as células não tratadas foram incubadas com meio DMEN mais DMSO 0,6%, visualmente é visto diferença entre a migração das células não tratadas e células tratadas (Figura 2A). Foi realizada análise através do ImageJ, medindo a distância percorrida no tempo de 0 a 24 horas, assim foi determinado que as células não tratadas migraram 0,713 mm e as células que receberam tratamento migraram 0,269 mm, com as células tratadas migrando 62,28% a menos que as células não tratadas (Figura 2B). O ensaio de invasão celular foi realizado utilizando inserto *transwell* com uma membrana de matrigel previamente preparada para receber as células SK-Mel-25. As células foram tratadas com uma concentração subtóxica de lignina (3,36  $\mu\text{M}$ ) e as células não tratadas receberam meio DMEN sem soro fetal bovino (SFB) e DMSO 0,6% (Figura 2A). Foram retiradas fotografias dos poços e depois foi analisado no *GraphPad* e visto que as células tratadas invadiram em média 94,91% a menos que as células. Onde as células não tratadas invadiram 361 por média e as células tratadas com lignina invadiram 18,4 em média (figura 2B). Estudos recentes se utilizam de compostos naturais e



empregaram metodologias semelhantes a que utilizamos para avaliar os efeitos sobre células de SK-Mel-25. Como o caso de Bich Loan e colaboradores (2019), utilizaram de ricina-lipossoma, obtida da mamona, sendo determinado que a invasão e migração celular foram inibidas após tratamento com o composto.

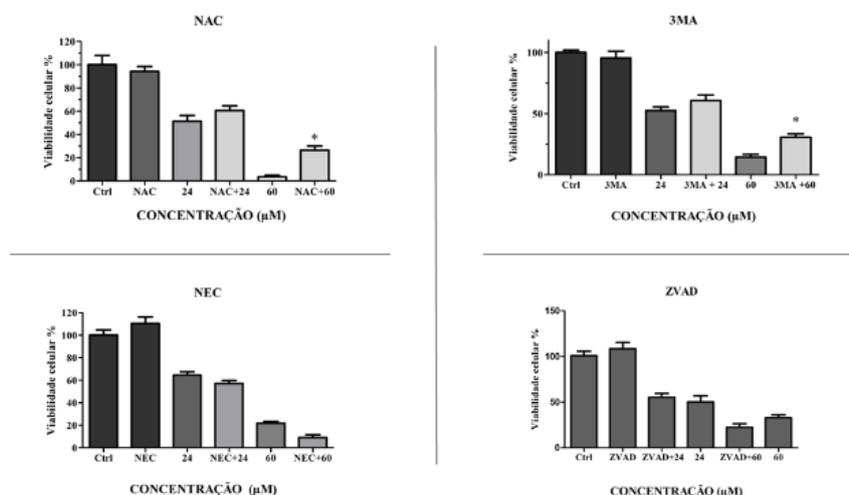
**Figura 2. Wound healing assay/ Ensaio de Invasão celular com transwell e matrigel.** Células de melanoma humano SK-Mel-25, foram plaqueadas  $2,5 \times 10^5$  e tratadas com lignina [ $3,36 \mu\text{M}$ ] e as células não tratadas receberam meio DMEN e DMSO 0,6%. A) Visualização das células em 0 horas e 24 horas comparando não tratado e tratado. B) Apresentação da distância percorrida pelas células em milímetros durante o período de 24 horas. C) Imagem capturada das células que invadiram a membrana, é visto uma maior concentração na imagem das células não tratadas, quando comparadas as tratadas. D) Apresentação do número de células invasivas, sendo significativa a diferença. \*\*\* $p < 0,0001$ .



O inibidor de autofagia, 3-metiladenina (3MA), apresentou inibição significativa da atividade do composto ( $60 \mu\text{M}$ ), em células de melanoma murino B16F10-Nex2, quando comparado as células que receberam somente tratamento com lignina (figura 2A) Esse inibidor é amplamente utilizado, desempenhando o papel de inibir a PI3K de classe III e VPS34, inibindo assim autofagia (RAVANAN, *et al.*, 2017). As células incubadas com o inibidor N-acetil-cisteína (NAC) para espécies reativas de oxigênio, apresentaram inibição significativa da atividade do composto lignina sobre as células de melanoma murino na concentração de  $60 \mu\text{M}$  (figura 2B) diminuição parcial significativa da produção de espécies reativas de oxigênio, que poderiam estar sendo geradas devido a um estresse causada por conta do tratamento, já que o inibidor sintético NAC age eliminando os radicais livres formados por meio da ação do potencial redox tióis e aumento de glutathione intracelular (HALASI *et al.*, 2013). O Inibidor de necroptose, Necrostatina (NEC) e o Inibidor de apoptose Zvad-fmk não apresentaram inibição de forma parcial ou total em nenhuma das concentrações testadas (figura 2C e 2D). O NEC é inibidor da necroptose, tendo atividade específica sobre RIPK1, causando efeito protetor as células ao processo de necroptose induzida por TNF, não foi visto uma diferença significativa entre os tratamentos (TAKAHASHI, *et al.*, 2012).



**Figura 3. Inibidores de morte e EROS.** A) Células B16F10-NEX2 foram tratadas com EC50% (24  $\mu$ M) e 60  $\mu$ M de lignina mais inibidor de autofagia, 3MA, por 12h, havendo inibição parcial do efeito da lignina sobre as células. B) As células foram tratadas com 24  $\mu$ M e 60  $\mu$ M de lignina mais inibidor de EROS, Nac, por 12h e houve inibição parcial do efeito do composto sobre as células. C) As células foram tratadas com lignina mais inibidor de Necroptose, NEC, por 12h e não apresentou inibição da atividade do composto em nenhuma das duas concentrações testadas. D) As células foram tratadas com lignina e mais inibidor Zvad por 12 horas, não foi visto efeito inibitório na ação da lignina sobre a célula. Foram feitos 3 experimentos independentes e em triplicata para cada um dos inibidores. \* $p < 0,05$ .



## CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta resultados que indicam que a lignina é capaz de inibir a invasão e migração celular em células SK-MEL-25 em uma concentração subtóxica e em doses maiores é capaz de diminuir a viabilidade celular significativamente. Além de que em células de melanoma murino B16F10-Nex2, a lignina teve sua ação inibida pelos inibidores de autofagia (3-MA) e espécies reativas de oxigênio (NAC). Necessitando assim de mais estudos para elucidar completamente como a lignina interage com as células utilizadas até o momento.

## REFERÊNCIAS

TESTA, U.; CASTELLI, G. and PELOSI, E. Melanoma: Anormalidades Genéticas, Progressão Tumoral, Evolução Clonal e Células Iniciadoras de Tumores. **Med. Sci.** 2017, 5, 28.

WENG, J. K. and 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**. Volume 18. N° 1733. P 1-11, 2017.

SONG *et al.* Identification of *Inonotus obliquus* and analysis of Antioxidation and Antitumor Activities of Polysaccharides. **Curr Microbiol**. V. 57:454–462, 2008.



## REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



Bich Loan NT, Trung NN, Le Na NT, Thang ND. Anticancer Activities of Ricin-Liposome Complexes on SKMEL-28 Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 1;20(7):2117-2123. 2019.

TAKAHASHI, N *et al.* "Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models." *Cell death & disease* vol. 3,11 e437. 29 Nov. 2012.

HALASI, MARIANNA *et al.* "ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors." *The Biochemical journal* vol. 454,2: 201-8, 2013.

RAVANAN, P., SRIKUMAR, I. F., & TALWAR, P. (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life sciences*, 188, 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.029>.