

RESUMO EXPANDIDO  
XXVI Congresso de Iniciação Científica

## ESTUDO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR INDUZIDO PELA LIGNINA EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

Guilherme Souza Madruga<sup>1</sup>

Guilherme Mendes de Freitas<sup>2</sup>

Agnes Kobayashi Calvo de Sant'Ana<sup>3</sup>

Maria Carolina Mariano Cesar<sup>4</sup>

Denise Costa Arruda<sup>5</sup>

1. Discente do curso de Biomedicina; e-mail: [guilherme.madruga@icloud.com](mailto:guilherme.madruga@icloud.com)
2. Docente na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: [guilhermefreitas@umc.br](mailto:guilhermefreitas@umc.br)
3. Discente do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia; e-mail: [agneskcsantana@gmail.com](mailto:agneskcsantana@gmail.com)
4. Discente do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia; e-mail: [cesarcarolina1@hotmail.com](mailto:cesarcarolina1@hotmail.com)
5. Docente na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: [denisearruda@umc.br](mailto:denisearruda@umc.br)

**Área de Conhecimento:** Biologia Celular

**Palavras-Chave:** Melanoma, Lignina, Compostos Naturais

### Como citar:

Madruga GS, de Freitas GM, de Sant'Ana AKC, Cesar MCM, Arruda DC. Estudo do mecanismo de morte celular induzido pela lignina em células de melanoma murino. Revista Científica UMC [Internet]. 27 de outubro de 2023; 8(2):e080200034.

Disponível em: <https://seer.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/1895>

**Fluxo de revisão:** o presente resumo expandido foi revisado por pares pela comissão do evento.

Recebido em: 11/09/2023

Aprovado em: 26/10/2023

ID publicação: e080200034

DOI:

Licença CC BY 4.0 DEED

## INTRODUÇÃO

O melanoma é originado a partir da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina que se encontram na camada basal da epiderme. O melanoma é considerado o câncer de pele mais agressivo devido ao seu alto potencial metastático (GRAY-SCHOPFER et al., 2007). Em estágios iniciais, este tipo de câncer de pele, pode ser tratado com grande possibilidade de cura, entretanto, quando diagnosticado em estágios avançados, algumas células tumorais podem adquirir resistência aos tratamentos disponíveis. Por isso, torna-se necessário o estudo de novos compostos naturais com atividade antitumoral. Atualmente compostos naturais são utilizados para o tratamento contra vários tipos de câncer, como o paclitaxel, vimblastina e vincristina, que induzem morte celular por apoptose ou autofagia. (SELIMOVIC et al., 2013). A lignina é um biopolímero natural presente em plantas vasculares, derivada da via do fenilpropanóide, que foi extraída da casca do *Eucalyptus* sp. (NASEEM et al., 2016). Em trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório, foi demonstrado que a lignina apresentou efeito antitumoral, inibição da migração e invasão celular em células de melanoma murino (B16F10-Nex2) e melanoma humano (SK-MEL-25). Portanto, este trabalho tem o objetivo de elucidar os mecanismos de morte celular induzida pela lignina em células de melanoma.

## OBJETIVO

Investigar o mecanismo de morte celular induzido pela lignina derivada do eucalipto em células de melanoma murino, bem como, avaliar o efeito deste composto em células não tumorais.

## METODOLOGIA

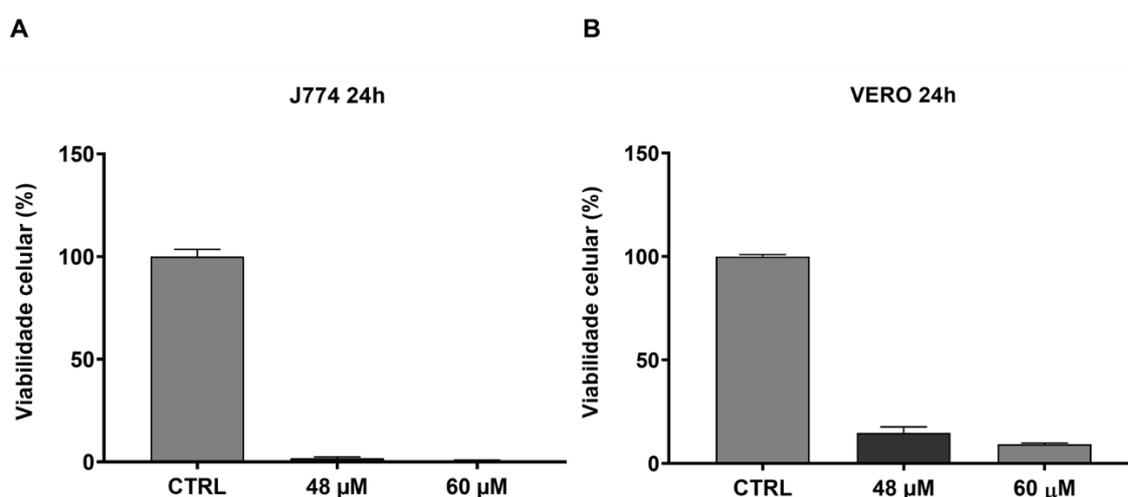
As células não tumorais J774 - linhagem de macrófagos derivadas de camundongos BALB/c e Vero - linhagem derivada do tecido epitelial do rim do macaco (*Cercopithecus sabaues*), foram cultivadas em placas de 96 poços, tratadas com lignina nas concentrações de 48 e 60  $\mu\text{M}$  com auxílio do corante de exclusão Trypan blue. Seguindo a mesma metodologia para avaliar a viabilidade em células de melanoma murino B16F10-Nex2, foi realizado o ensaio na presença dos inibidores de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Glutaciona Reduzida e N-acetil-L-cisteína), inibidor de pan-caspases (Z-VAD-FMK), que está relacionado à apoptose e o inibidor fosfatidilinositol 3-quinase de classe III (PI3K) (3-Metiladenina), que está relacionado à autofagia, nas concentrações de 24 e 60  $\mu\text{M}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar a seletividade da lignina em células tumorais, avaliamos o efeito citotóxico da lignina em células não tumorais J774 e Vero. Neste ensaio, foi possível observar que a lignina nas concentrações 48 e 60  $\mu\text{M}$ , foi citotóxica para as células não tumorais, quando comparadas as células não tratadas (Fig. 1). Diante disso, serão realizados ensaios utilizando outras linhagens celulares, bem como, células de cultura primária.

Ilieva e colaboradores (2014), observaram que após utilizarem a justicidina B uma lignina derivada da planta *Linum austriacum*, apresentou atividade citotóxica em linhagens tumorais, entretanto, esses estudos mostraram que a justicidina B não foi tóxica para os camundongos tratados, identificando que o composto natural é promissor para futuras terapias. Em razão a isso, para a melhor avaliação da toxicidade da lignina será realizado ensaios in vivo de toxicidade em camundongos C57BL/6, para verificar se o composto natural será tóxico para os camundongos.

**Figura 1** - Determinação do efeito da lignina na viabilidade celular de células J774 e Vero. Células J774 (A) e Vero (B) foram cultivadas ( $1 \times 10^4$ ) e tratadas com lignina nas concentrações de 48 e 60  $\mu\text{M}$  por 24h. A viabilidade celular foi estabelecida pelo teste de exclusão de Trypan Blue. Foram realizados dois experimentos em triplicata. Análise estatística: One-way ANOVA.



Para avaliação do mecanismo de morte induzido pela lignina, foi realizado o ensaio de viabilidade celular na presença de inibidores de espécies reativas de oxigênio (EROs), N-acetil-L-cisteína e glutatona reduzida; inibidor de pan-caspases, Z-VAD-FMK, que está relacionado à morte celular por apoptose e o inibidor de PI3K de classe III, 3-Metiladenina, que está relacionado à morte celular por autofagia. Células tratadas nas concentrações de 24 e 60  $\mu\text{M}$

de lignina, foram pré-incubadas com os inibidores. No ensaio de viabilidade celular na presença dos inibidores de EROs, foi possível observar que após 6h de tratamento, a glutathiona reduzida não inibiu o efeito citotóxico da lignina. Entretanto, ao utilizar o composto N-acetil-L-cisteína, o efeito da lignina foi inibido parcialmente em 70% e 46% nas concentrações de 24 e 60  $\mu\text{M}$ , respectivamente, após 6h de tratamento. Além disso, foi possível observar que o inibidor Z-VAD-FMK não apresentou efeito inibitório na citotoxicidade da lignina após 6h de tratamento. No entanto, ao utilizar o inibidor 3-Metiladenina o efeito citotóxico da lignina foi inibido parcialmente em 66% e 43% nas concentrações de 24 e 60  $\mu\text{M}$  após 6h de tratamento (Fig. 2).

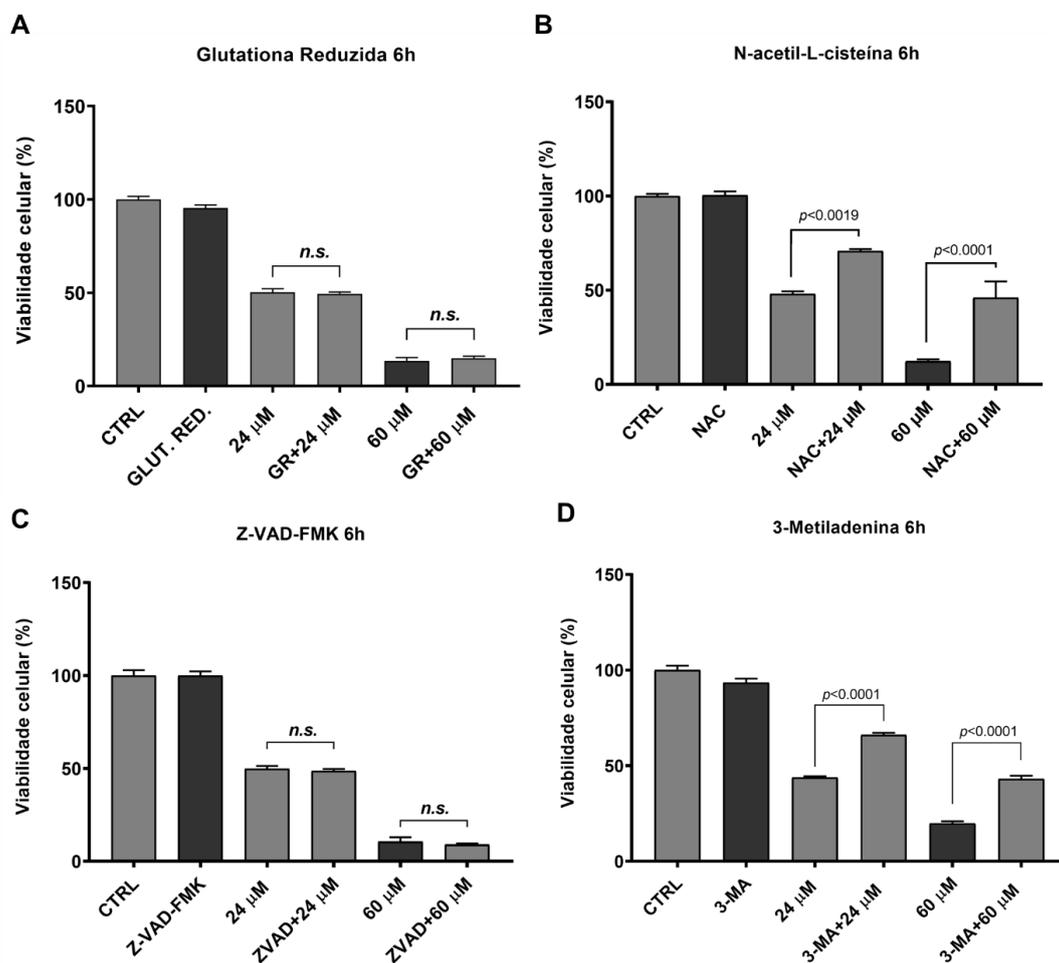
Halasi e colaboradores (2013), também evidenciaram que ao utilizar a N-acetil-L-cisteína foi possível constatar a inibição do processo de morte celular e aumento de EROs. Guo e colaboradores (2021), observaram que ao utilizarem a quercetina, composto natural derivada de vegetais e frutas, mostrou um aumento de autofagia em células de câncer de pulmão humano (A549 e H1299), entretanto ao utilizarem o inibidor de quinase PI3K de classe III, 3-Metiladenina, o efeito citotóxico do composto natural foi inibido parcialmente. Desse modo, os resultados obtidos em nosso trabalho indicam que o mecanismo de morte celular induzido pela lignina pode estar gerando morte celular por autofagia, além de aumento de espécies reativas de oxigênio.

Do mesmo modo, ao testar o efeito da lignina em 6h observamos que o efeito citotóxico da lignina não foi inibido pelo Z-VAD-FMK. Entretanto, outros resultados anteriores demonstraram que a lignina causa degradação de DNA em células B16F10-Nex2, ao realizar microscopia de fluorescência utilizando TUNEL. Além disso, foi visto um aumento de caspases -8 e -9 após 30 minutos de tratamento por ensaio colorimétrico. Desse modo, indicando que a lignina pode estar induzindo apoptose. Por isso, futuramente iremos avaliar se o inibidor Z-VAD-FMK será capaz de inibir o efeito citotóxico da lignina em menores tempos de tratamento, para melhor elucidação do mecanismo de morte.

Por fim, ao realizar o ensaio de viabilidade celular também foi possível observar alterações morfológicas induzidas pela lignina em células B16F10-Nex2 nas concentrações de 24 e 60  $\mu\text{M}$  por 24h. Foi possível observar a presença de vacúolos autofágicos e fusão celular (Figura 3 B e C), quando comparadas com as células não tratadas (Figura 3A). Gordobil e colaboradores (2019), utilizaram lignina kraft em células de hepatoma (MH-22A) e melanoma murino (B16), onde observaram que a lignina kraft induziu alterações morfológicas nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1 mg/mL e processos semelhantes a apoptose e necrose, respectivamente. Sendo assim, para confirmação de autofagia e analisar se outros

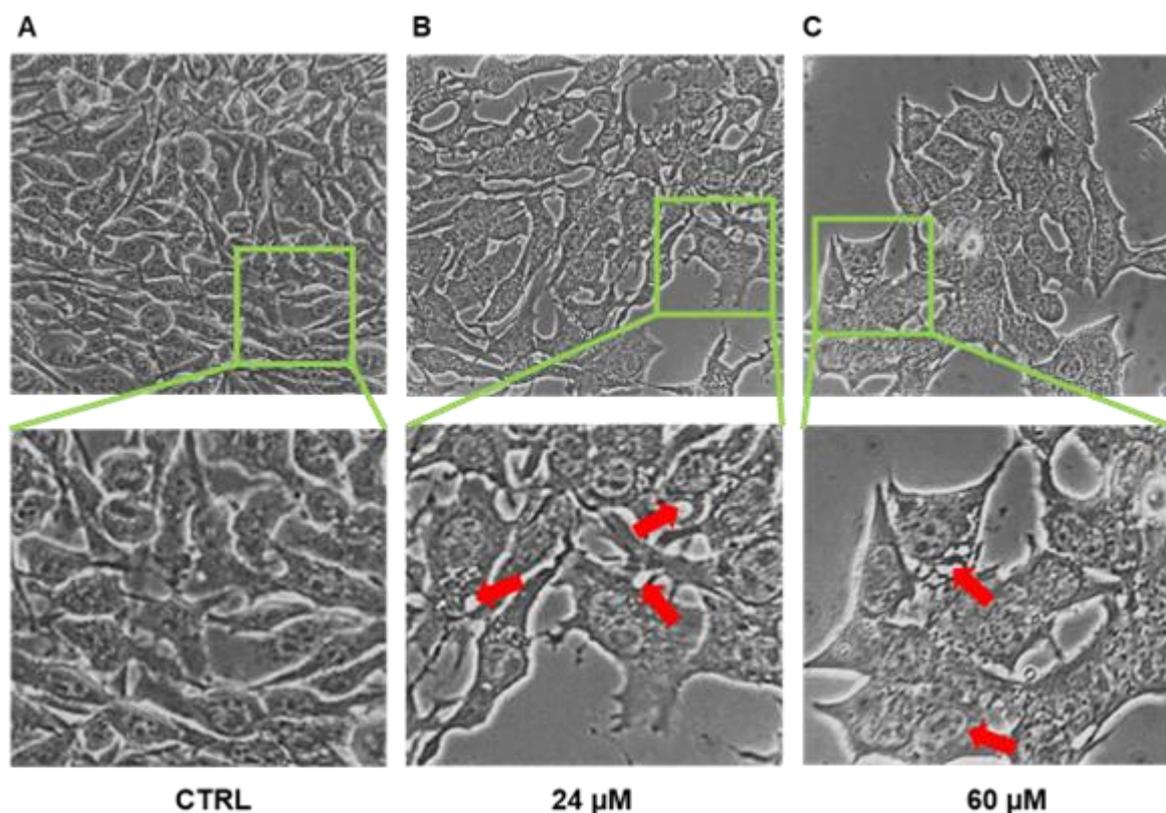
mecanismos de morte celular estão envolvidos, futuramente será realizado Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

**Figura 2** - Avaliação do mecanismo de morte celular e EROs da lignina em células B16F10-Nex2. Células B16F10-Nex2 foram cultivadas ( $5 \times 10^3$ ), posteriormente foram pré-incubadas com glutathiona reduzida (4 mM) (A), N-acetil-L-cisteína (10 mM) (B), Z-VAD-FMK (20 mM) (C) e 3-Metiladenina (2mM) (D), após período de incubação foram tratadas com lignina nas concentrações de 24 e 60  $\mu\text{M}$  por 6h. Controle de células cultivadas com meio RPMI-1640 e DMSO (CTRL). Células tratadas com o inibidor diluído em H<sub>2</sub>O MiliQ® (N-acetil-L-cisteína, 3-Metiladenina, Glutathiona reduzida e Z-VAD-FMK). Células cultivadas com o inibidor e lignina na concentração de 24  $\mu\text{M}$  (Inibidor + 24  $\mu\text{M}$ ). Células cultivadas com lignina na concentração de 24  $\mu\text{M}$  (24  $\mu\text{M}$ ). Células cultivadas com o inibidor e lignina na concentração de 60  $\mu\text{M}$  (Inibidor + 60  $\mu\text{M}$ ). Células cultivadas com lignina na concentração de 60  $\mu\text{M}$  (60  $\mu\text{M}$ ). A viabilidade celular foi estabelecida pelo teste de exclusão de Trypan Blue. Foram realizados dois experimentos em triplicata. Análise estatística: One-way ANOVA.



**Figura 3** - Alterações morfológicas de células B16F10-Nex2 após o tratamento com lignina. Células B16F10-Nex2 tratadas com lignina nas concentrações 24 e 60  $\mu\text{M}$  por 24 h. As imagens foram capturadas no tempo

de 24h, através do microscópio óptico invertido com auxílio do corante de exclusão Trypan blue, no aumento de 400x. Controle (A). 24  $\mu$ M (B). 60  $\mu$ M (C). Setas vermelhas indicam possíveis vacúolos autofágicos e fusão celular.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, neste trabalho observamos que a lignina foi citotóxica para as células não tumorais J774 e Vero após o tratamento de 24 h. No ensaio de viabilidade celular na presença do inibidor de espécies reativas de oxigênio N-acetil-L-cisteína e o inibidor de autofagia, inibiram parcialmente o efeito citotóxico da lignina após 6 horas de tratamento. Além disso, observamos alterações morfológicas semelhantes a autofagia, no qual, indicam que o mecanismo de morte da lignina pode estar envolvido com o processo autofágico e aumento de espécies reativas de oxigênios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GORDOBIL, O.; OBEREMKO, A.; SAULIS, G.; BAUBLYS, V.; LABIDI, J. In vitro cytotoxicity studies of industrial Eucalyptus kraft lignins on mouse hepatoma, melanoma and Chinese hamster ovary cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 135, p. 353-361, ago. 2019.
- GUO, H.; DING, H.; TANG, X.; LIANG, M.; LI, S.; ZHANG, J.; CAO, J. Quercetin induces pro-apoptotic autophagy via SIRT1 / AMPK signaling pathway in human lung cancer cell lines A549 and H1299 in vitro. *Thoracic Cancer*, v. 12, n. 9, p. 1415-1422, 11 mar. 2021.

- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 21 fev. 2007.
- HALASI, M.; WANG, M.; CHAVAN, T. S.; GAPONENKO, V.; HAY, N.; GARTEL, A. L. ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. *Biochemical Journal*, v. 454, n. 2, p. 201-208, 9 ago. 2013.
- ILIEVA, Y.; ZHELEZOVA, I.; ATANASOVA, T.; ZAHARIEVA, M. M.; SASHEVA, P.; IONKOVA, I.; KONSTANTINOV, S. Cytotoxic effect of the biotechnologically derived justicidin B on human lymphoma cells. *Biotechnology Letters*, [S.L.], v. 36, n. 11, p. 2177-2183, 22 jul. 2014.
- SELIMOVIC, D.; BADURA, H. E.; EL-KHATTOUTI, A.; SOELL, M.; PORZIG, B. B. O. W.; SPERNGER, A.; GHANJATI, F.; SANTOURLIDIS, S.; HAIKEL, Y.; HASSAN, M. Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms. *Apoptosis*, v. 18, n. 8, p. 980-997, 7 abr. 2013.
- NASEEM, A.; TABASUM, S.; ZIA, K. M.; ZUBER, Mohammad; ALI, Muhammad; NOREEN, Aqdas. Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 93, p. 296-313, dez. 2016