



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 Freitas¹, Maria Carolina Mariano Cesar², Denise Costa Arruda³

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-CH₃), 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

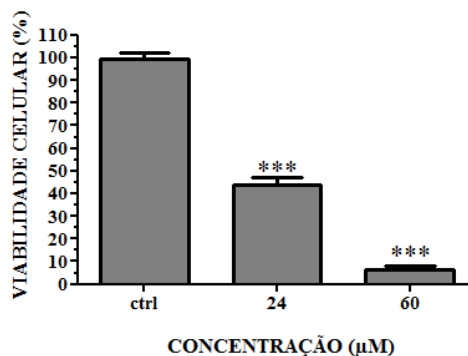


presença de Matrigel e migração celular foi utilizado o método Wound-healing as células SK-Mel-25 foram tratadas com uma concentração subtóxica (3,36 μM), foram capturadas imagens para determinar se ocorre inibição, as imagens foram analisadas no programa ImageJ (versão 1.4).

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 μM) e em 50% (24 μM). 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*. *** $p < 0,0001$.

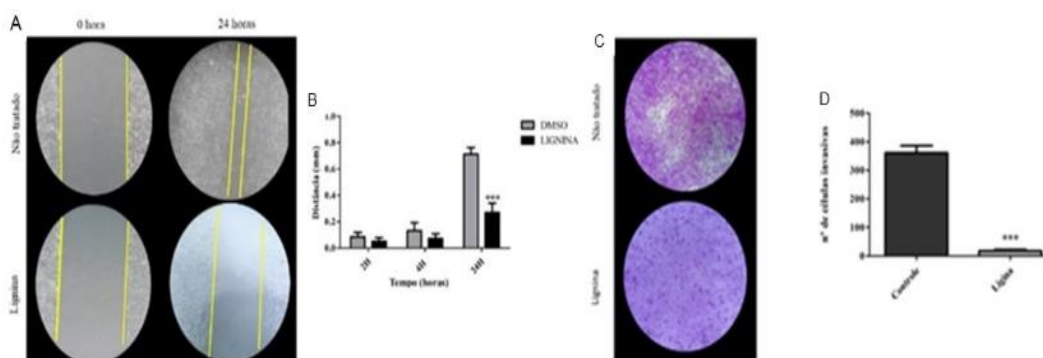


Para determinação da migração celular *in vitro*, foi realizado ensaio de *wound healing assay*, onde as células de melanoma humano SK-Mel-25 foram palqueadas e depois realizado uma lesão vertical e foi realizado o tratamento com 3,36 μM de lignina, as células não tratadas foram incubadas com meio DMEN 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 μM) 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.

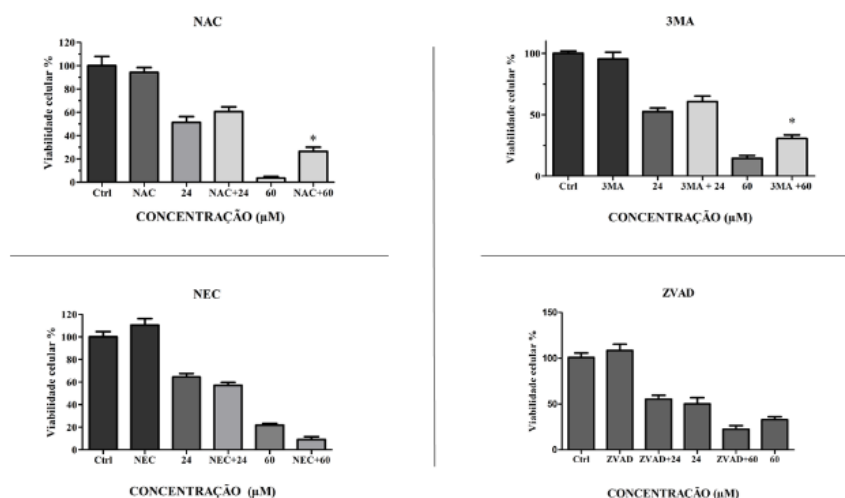
Figura 2. Wound healing assay/ Ensaio de Invasão celular com transwell e matrigel. Células de melanoma humano SK-Mel-25, foram plaqueadas $2,5 \times 10^5$ e tratadas com lignina [$3,36 \mu\text{M}$] e as células não tratadas receberam meio DMEN e DMSO 0,6%. A) Visualização das células em 0 horas e 24 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 μ M) e 60 μ 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 μ M e 60 μ 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>.