

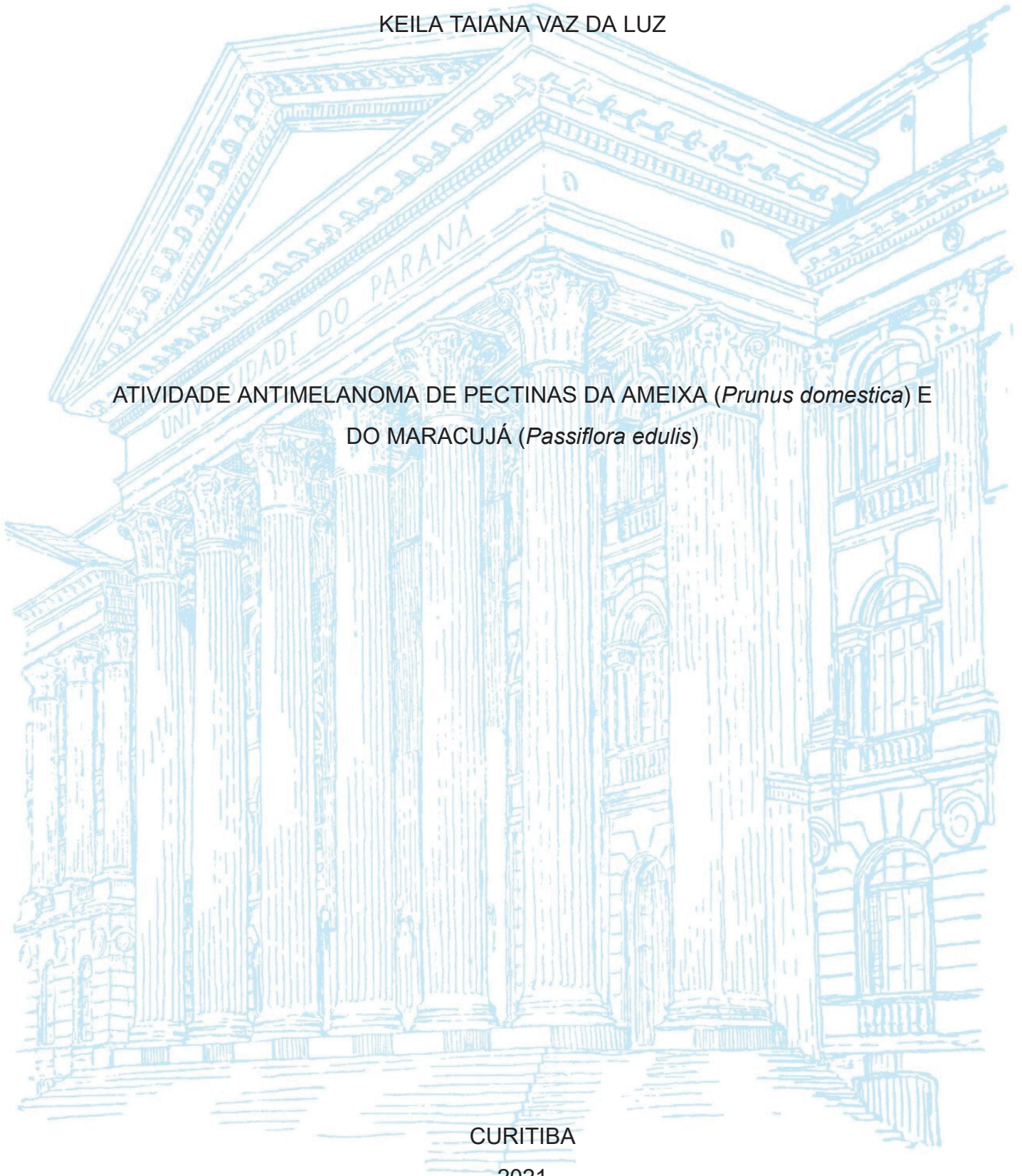
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KEILA TAIANA VAZ DA LUZ

ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE PECTINAS DA AMEIXA (*Prunus domestica*) E
DO MARACUJÁ (*Passiflora edulis*)

CURITIBA

2021



KEILA TAIANA VAZ DA LUZ

ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE PECTINAS DA AMEIXA (*Prunus domestica*) E
DO MARACUJÁ (*Passiflora edulis*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Fogagnoli Simas.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carolina Camargo de Oliveira.

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Luz, Keila Taiana Vaz da
Atividade antimelanoma da ameixa (*Prunus domestica*) e do maracujá
(*Passiflora edulis*). / Keila Taiana Vaz da Luz. – Curitiba, 2021.
86 p.: il.

Orientadora: Fernanda Fogagnoli Simas.
Coorientadora: Carolina Camargo de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Melanoma. 2. Pectina. 3. Antineoplásicos. I. Título. II. Simas,
Fernanda Fogagnoli, 1979-. III. Oliveira, Carolina Camargo de, 1979-. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 616.99477



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KEILA TAIANA VAZ DA LUZ** intitulada: **ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE PECTINAS DA AMEIXA (*Prunus domestica*) E DO MARACUJÁ (*Passiflora edulis*)**, sob orientação da Profa. Dra. FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

27/08/2021 11:36:28.0

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

26/08/2021 16:04:32.0

JENIFER PENDIUK GONÇALVES

Avaliador Externo (PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR UFPR)

Assinatura Eletrônica

26/08/2021 16:02:21.0

FRANCISCO FILIPAK NETO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 108693

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 108693

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser a força na minha fraqueza e por estar comigo TODOS os dias.

Às minhas dedicadas professoras que cumpriram tão bem com a missão de ensinar. À professora Dr^a. Fernanda, por me aceitar, sem nenhuma experiência em laboratório, por acreditar que conseguiria, por toda paciência no meu desenvolvimento, e pelo ensino teórico (as muitas horas dedicadas a me explicar os “porquês”) e prático. À professora Dr^a. Carolina por me “adotar” logo depois, por toda orientação, por me acompanhar no cultivo e me ensinar que tudo é possível de ser aprendido. Obrigada por toda a dedicação e empenho na orientação!

À professora Dr^a. Lucimara por confiar em nosso trabalho e ceder as moléculas para essa pesquisa. Ao professor Dr. Edivaldo pelos apontamentos e sugestões nas nossas reuniões que contribuíram para o melhor desenvolvimento do trabalho. À professora Dr^a. Lucélia e professor Dr. Gláucio pelo empréstimo dos equipamentos laboratoriais. Aos demais professores do programa que contribuíram com o meu processo de aprendizagem.

Aos meus companheiros de laboratório que me ensinaram tanto... tenho comigo desde as primeiras lembranças. À Açucena, por me acompanhar na preparação das primeiras alíquotas. À Maíra pela ajuda no início e por ler meu primeiro texto do projeto. À Stellee por fazer a primeira correção do meu projeto e colaborar no ensaio da galectina. Ao Odair por permitir acompanhar vários de seus experimentos. Ao Gustavo por sempre fazer perguntas para instigar o conhecimento e me lembrar de cuidar da minha saúde mental. À Jenifer por me ensinar o ensaio de invasão e por todas as dicas e trocas de ideias que contribuíram muito. Ao Daniel por todo suporte tecnológico, com todos aqueles programas computacionais difíceis e todas as dúvidas esclarecidas, além da ajuda com os experimentos. Ao João por ensinar de forma leve e divertida e por estar sempre disposto a ajudar mesmo que de última hora. Ao Gabriel e Jéssica por todos os favores. À Camila por me deixar acompanhar todos os seus passos e me ensinar com todo carinho. À Victória por todas as conversas de ciência e da vida. À Yasmin pelas dicas/conselhos de sempre e pelas caronas. À Aline por toda calma, paciência e gentileza na hora de ensinar,

além de todos os favores. À Bruna por cada pequena e grande ajuda por ter escolhido fazer parte desse projeto e da minha vida. Ao Anderson que além de me ensinar muitas atividades laboratoriais, me ensinou que preciso ser forte, obrigada por sua amizade. À Débora pelas tardes de boas conversas e pela ajuda com as células. À Sabrina Hochheim pelas experiências compartilhadas. À Sabrina Fonseca por todas as palavras motivacionais, você não faz ideia de como foram importantes.

À Taynah, por me ensinar que UFPR é uma universidade para todos!

Ao Josué, por me mostrar o caminho de ingresso à pós-graduação da UFPR e pelo incentivo para fazer o processo seletivo.

Aos meus avaliadores Dr^a. Jenifer e professor Dr. Francisco por aceitarem avaliarem esse trabalho.

Aos meus pais, Claudinei e Derci, que sempre me incentivaram estudar, e agora não foi diferente. Obrigada pelas orações, obrigada pelas preocupações e obrigada pelo cuidado.

Ao meu marido, Igor, por suportar tantos momentos, tantos fardos que nunca foi sua escolha, pela compreensão, apoio, por acreditar em mim e por todo cuidado.

À minha família, afilhados, compadres e amigos que estão contentes com a minha conquista.

À minha segunda família (Bonfim), especialmente a Terezinha e minhas irmãs de coração Werica e Wellida por me ouvirem, me apoiarem, orarem e torcerem muito.

À Aurora, o melhor presente que ganhei, que me fez valorizar pequenas coisas e olhar a vida com outros olhos... E sim, também contribuiu nessa etapa por ser a distração em momentos difíceis.

Aos meus alunos do Colégio Monte Horebe por terem orgulho da “prof” estudar câncer e por todas as cartinhas que escreveram me motivando e aos alunos de hoje que também estão orgulhosos com a minha conquista e fazem minhas noites serem mais leve. Crianças vocês são incríveis!

À Alexandra Elbakyan, vocês sabem o motivo.

Ao CTAF, especialmente ao Israel por toda ajuda.

À CAPES pela bolsa de mestrado. Ao CNPq e CAPES pelo financiamento desse projeto.

À UFPR, pelos 2 anos e meio de intenso aprendizado.

RESUMO

O melanoma metastático é um tipo de câncer de pele altamente refratário e resistente às terapias disponíveis. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimelanoma, *in vitro*, de pectinas extraídas de ameixa seca (*Prunus domestica*) e da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*). As pectinas testadas foram previamente purificadas e caracterizadas, sendo as extraídas da ameixa caracterizadas como arabinogalactanas tipo I (AGI-78kDa e AGI-12kDa), que diferem entre si pela massa molecular média, e a do maracujá caracterizada como homogalacturonana com alto grau de metil esterificação (HG-143kDa, grau de metil esterificação 91%). Células de melanoma murino e humano (B16-F10 e CHL-1, respectivamente) e fibroblastos não tumorais murinos e humanos (BALB/3T3 e CCD-1059Sk, respectivamente), foram expostos a diferentes concentrações dessas pectinas por 72 horas e a ação destas na proliferação e viabilidade celular foi avaliada. Além disso, nas linhagens de melanoma, foram analisadas a influência das pectinas na indução de morte celular e na alteração de parâmetros como morfologia, capacidade clonogênica, invasão, adesão e migração celular. As arabinogalactanas do tipo I extraídas da ameixa, na maior concentração testada (1000 µg/mL), mostraram-se seletivamente citotóxicas para as linhagens tumorais, sendo que a AGI-78kDa induziu a morte destas células. Em concentrações não citotóxicas (100 µg/mL) as arabinogalactanas alteraram a morfologia e outros parâmetros células de melanoma relacionados com a metástase tumoral. Já a homogalacturonana, dos ensaios realizados, alterou a morfologia das células de melanoma, reduziu a formação de colônias de melanoma humano e influenciou na capacidade migratória de células de melanoma murino. As pectinas, principalmente as AGIs, mostram-se promissoras no tratamento do melanoma metastático e a atividade antimelanoma *in vitro* é possivelmente devido à estrutura química, passível de interação com galectinas celulares e interferindo na ação delas em diversos processos da progressão tumoral.

Palavras-chave: Melanoma. Pectina. Arabinogalactana. Homogalacturonana. Antitumoral.

ABSTRACT

Metastatic melanoma is a refractory and highly resistant type of skin cancer. In this study, we evaluated the *in vitro* antimelanoma activity of pectins extracted from prune (*Prunus domestica*) and yellow passion fruit peel (*Passiflora edulis*). Tested pectins were previously purified and characterized. Prune ones were classified as type I arabinogalactans (AGI-78kDa and AGI-12kDa) with different averages molecular masses. Yellow passion fruit's was characterized as a highly methyl esterified homogalacturonan (HG-143kDa with 91% of methyl esterification). Murine and human melanoma cells (B16-F10 and CHL-1, respectively) and non-tumor murine and human fibroblasts (BALB/3T3 and CCD-1059Sk, respectively) were exposed to a range of pectins concentrations for 72 hours, and then cell proliferation and viability were evaluated. In addition, for melanoma cells, the pectins influence in cell death induction, morphology alteration, clonogenic capacity, invasion, adhesion and migration were evaluated. The higher concentration of type I arabinogalactans from prune (1000 µg/mL) induced selective cytotoxicity in melanoma cell lines, with AGI-78kDa inducing cell death. In a non-cytotoxic concentration (100 µg/mL) arabinogalactans modified tumor cell morphology and other malignancy parameters. For homogalacturonan, we observed morphology alteration in melanoma cells, reduction in colony formation in human melanoma cells and modified migratory capacity in murine melanoma cells. Pectins, mostly AGIs, are promising for metastatic melanoma treatment. It's *in vitro* antimelanoma activity possibly due to the chemical structure, making it capable of interacting with galectins, interfering with their actions in several tumor progression processes.

Keywords: Melanoma. Pectin. Arabinogalactan. Homogalacturonan. Antitumor.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	9
OBJETIVOS	11
Objetivo geral	11
Objetivos específicos	12
REVISÃO DE LITERATURA	12
CÂNCER	12
Melanoma	15
Tratamentos para o melanoma cutâneo	19
Polissacarídeos e suas propriedades antitumorais	21
Glectinas no contexto tumoral	24
PECTINAS – ESTRUTURA E ATIVIDADES ANTITUMORAIS	28
Pectina da ameixa seca (<i>Prunus domestica</i>)	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
LINHAGENS E CULTIVO	37
TRATAMENTO – PREPARO DOS POLISSACARÍDEOS	38
ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR	39
ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	40
ANÁLISE DE MORTE CELULAR	41
ANÁLISE DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA	42
ANÁLISE DA MORFOLOGIA	43
ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR	43
ANÁLISE DE MIGRAÇÃO CELULAR	45
ANÁLISE DA CAPACIDADE INVASIVA DAS CÉLULAS	46
REPETIÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	48
AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR	52
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA	56
AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR	59
AVALIAÇÃO DA ADESÃO DAS CÉLULAS	65
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS	67
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INVASIVA DAS CÉLULAS	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
REFERÊNCIAS	75

ANEXO 1 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PECTINAS	85
ANEXO 2 – INTERAÇÃO DAS PECTINAS COM A GALECTINA-3	89

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Pectinas são polissacarídeos encontrados na parede de células vegetais e estão abundantemente presentes em frutos. Apresentam em sua estrutura química ácido galacturônico e monossacarídeos neutros, como galactose, arabinose e ramnose, que variam em quantidades dependendo da fonte de onde são extraídas e do período de maturação do fruto. Neste contexto, as pectinas podem ser classificadas como homogalacturonanas, homopolímeros de cadeias lineares formadas por unidades de ácido galacturônico, e ramnogalacturonanas, do tipo I e II, que são heteropolímeros em cujas cadeias principais estão presentes unidades de ácido galacturônico e de ramnose. As ramnogalacturonanas do tipo I podem apresentar arabinogalactanas como cadeias laterais, as quais são compostas por unidades de arabinose e galactose (CANTERI et al., 2012; KHOTIMCHENKO, 2020). Apesar de serem amplamente conhecidas por suas propriedades gelificantes e espessantes e suas aplicações na indústria alimentícia (BRANDÃO; ANDRADE, 2005; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006), vários estudos descrevem o potencial terapêutico das pectinas.

Em pesquisas farmacêuticas, já são encontradas pectinas com diferentes efeitos, entre eles imunomodulação, gastroproteção e ação antitumoral (MINZANOVA et al., 2018; ZAITSEVA et al., 2020). No contexto das atividades antitumorais, que são o foco deste trabalho, pectinas (homogalacturonanas e ramnogalacturonanas) podem induzir morte em células tumorais (CHENG et al., 2011; DELPHI et al., 2015; KUMAR et al., 2020; LV et al., 2020; PRADO et al., 2017), inibir seu crescimento (AMARAL et al., 2019; DAMMAK et al., 2019; LIN et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2020) e progressão tumoral (PRADO et al., 2019; JIANG; ELIAZ; SLIVA, 2013a; LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013; YANG et al., 2018; ZHANG et al., 2019). Dentre os tipos de cânceres aos quais as pectinas têm apresentado atividades interessantes, destaca-se o melanoma. Pectinas extraídas de diversas fontes, como o milho (JAYARAM; KAPOOR; DHARMESH, 2015), quiabo (VAYSSADE et al., 2009) e *Decalepis hamiltonii* (VENKATESHAIAH et al., 2017) vêm mostrando potencial de ação antimelanoma por reduzir a proliferação de células

tumorais e ainda interferir em processos relacionados com a metástase tumoral *in vitro* e *in vivo*.

Nesse contexto, o Grupo de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da UFPR vem trabalhando na investigação da atividade antimelanoma de polissacarídeos. Resultados promissores, de atividades antitumorais sem efeitos adversos aparentes, têm sido descritos para polissacarídeos de diferentes fontes, especialmente aqueles obtidos de cogumelos comestíveis (BISCAIA et al., 2017; MILHORINI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019) e de algas marinhas (BELLAN et al., 2020). Tendo em vista o potencial antimelanoma de pectinas, neste trabalho foram avaliadas de maneira pioneira no Grupo, as propriedades antimelanoma de pectinas extraídas de frutos. As pectinas obtidas através de uma extração semelhante àquela feita quando se prepara um chá quente de ameixa seca (CANTU-JUNGLES et al., 2014), bem como a pectina extraída a partir da casca do maracujá (ABBOUD et al., 2019), uma fonte abundante de pectinas e que atualmente não possui valor agregado, uma vez que são oriundas do resíduo industrial de produtos produzidos a partir da polpa do fruto, já foram avaliadas quanto às suas estruturas químicas e suas propriedades gastroprotetoras. Porém, até o momento, nenhum estudo foi realizado com vistas a investigar suas potenciais atividades antimelanoma.

O melanoma é um tipo de câncer de pele altamente refratário em seu estágio metastático, com elevada taxa de mortalidade (cerca de 57.043 mortes por ano no mundo todo) (IARC, 2021). Nesse estágio, a resposta aos tratamentos existentes é baixa, especialmente para os melanomas geneticamente classificados como triplo negativos, considerando as mutações mais comuns (MACKIEWICZ; MACKIEWICZ, 2017). Além de não serem eficazes, os tratamentos disponíveis no Sistema Único de Saúde brasileiro, baseados principalmente pelo uso da quimioterapia com dacarbazina, provocam muitos efeitos adversos nos pacientes por não serem seletivos e apresentarem toxicidade aos tecidos sadios (CORREA et al., 2020).

Polissacarídeos isolados da ameixa seca (*Prunus domestica*) e da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) compreendem pectinas com características estruturais com potencial ação antitumoral. Da ameixa foram caracterizadas arabinogalactanas tipo I com estrutura química fina muito semelhantes e com

diferentes massas moleculares (12 kDa e 78 kDa). Uma homogalacturonana com alto grau de metil esterificação (91%), com M_w de 143 kDa, foi isolada do maracujá. Apesar de outras propriedades biológicas já terem sido descritas para estas pectinas, a atividade antimelanoma destas ainda não foi estudada nem descrita na literatura, justificando, portanto, os objetivos deste trabalho.

Considerando a baixa responsividade das terapias atuais e o grande potencial farmacológico de polissacarídeos de fontes naturais, principalmente pectinas, tanto arabinogalactanas como homogalacturonanas são interessantes de serem investigadas quanto aos seus efeitos antitumorais. Pectinas ricas em arabinose e galactose, por se ligarem em galectinas, que estão relacionadas a diversos parâmetros de malignidade das células tumorais, têm sido apontadas como as mais promissoras pectinas com atividade antitumoral (PRADO et al., 2019; JAYARAM; KAPOOR; DHARMESH, 2015; VAYSSADE et al., 2009). As homogalacturonanas, por sua vez, apresentam tais propriedades por outros mecanismos (MAXWELL et al., 2016) e podem induzir morte em células tumorais (CHENG et al., 2011; LV et al., 2020) de maneira independente da galectina-3 (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013). A massa molar dessas pectinas também é uma questão importante a ser considerada, uma vez que diferenças na massa podem interferir na ação da molécula (PRADO et al., 2019; PRADO et al., 2017). Com isso, a hipótese deste trabalho é que pectinas extraídas da ameixa seca e do maracujá amarelo atuam seletivamente sobre células de melanoma modificando padrões associados com o fenótipo metastático das células *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos antimelanoma das pectinas do tipo arabinogalactanas tipo I extraídas de ameixa seca (*Prunus domestica*) e da homogalacturonana extraída do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) em células de melanoma murino e humano.

1.1.2 Objetivos específicos

Avaliar a citotoxicidade e a influência das pectinas na proliferação de células de melanoma murino (linhagem B16-F10) e humano (linhagem CHL-1), ambas triplo negativas para as principais mutações encontradas no melanoma, e em fibroblastos murinos (BALB/3T3 clone A31) e humanos (CCD-1059Sk) não tumorais, bem como a seletividade dos efeitos encontrados;

Analisar se as pectinas alteram os parâmetros de malignidade de células de melanoma murino e humano: perfil clonogênico, adesão, migração e invasão celular; Avaliar se as pectinas estudadas afetam a morfologia das células de melanoma murino e humano.

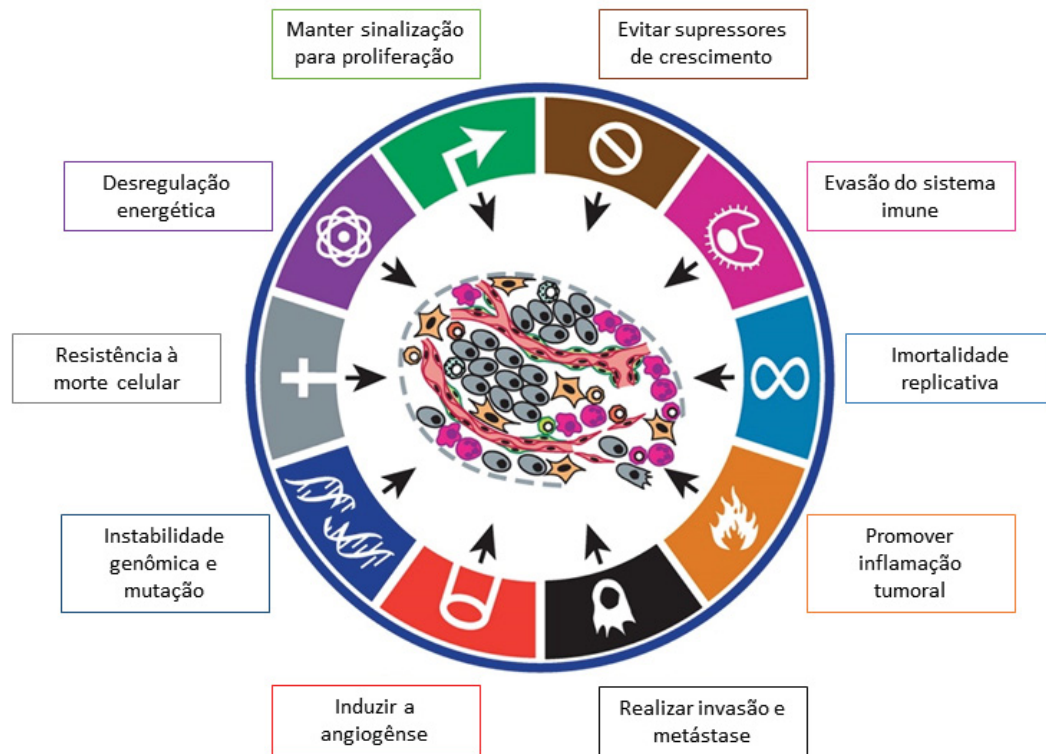
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer, também chamado de tumor maligno, é um conjunto de doenças que têm em comum a proliferação exacerbada de células em decorrência do acúmulo de mutações genéticas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, no ano de 2018, o câncer foi responsável por 9,6 milhões de óbitos no mundo todo, tornando-se a segunda principal causa de morte (WHO, 2021).

Células tumorais apresentam algumas características em comum (FIGURA 1) como a capacidade de produzir fatores que estimulam a proliferação, a falha na resposta aos supressores de crescimento e a resistência à morte celular e isso permite que elas se proliferem de maneira exacerbada. Além disso, são capazes de induzir a angiogênese, invadir outros tecidos e disseminar para outras partes do organismo pelo processo metastático (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Juntamente a essas seis características estão outras como a propriedade das células tumorais em reprogramar seu metabolismo energético, evadir da ação do sistema imunológico, promover a inflamação como suporte na promoção tumoral e ainda apresentar alta instabilidade genômica, que gera grande diversidade genética no tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

FIGURA 1. HALLMARKS DO CÂNCER.

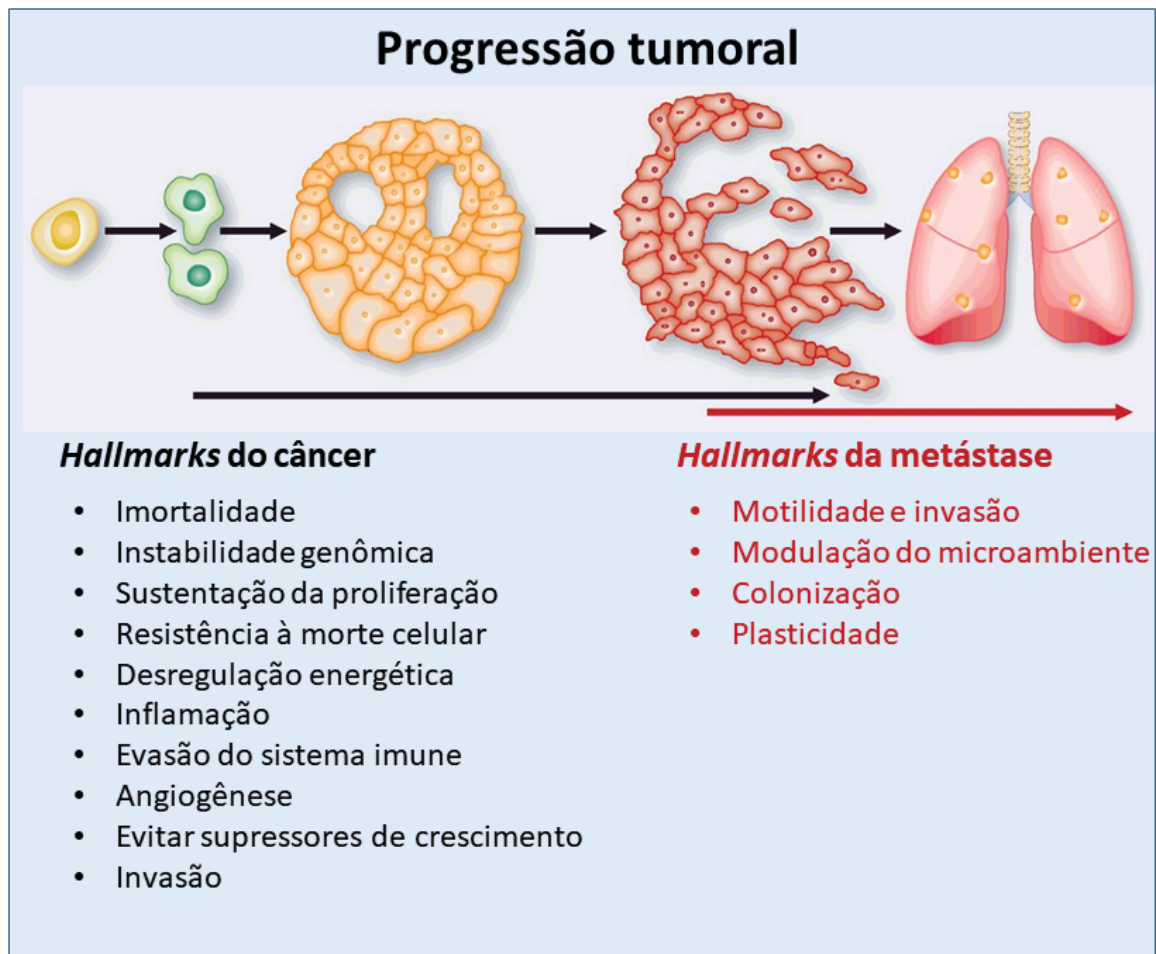


A imagem mostra as dez marcas registradas do câncer.
 FONTE: adaptado de: Hanahan; Weinberg, (2011).

Alterações no microbioma, deposição irregular de matriz extracelular e participação de adipócitos (MACCARTHY-MORROGH; MARTIN, 2020) também vem sendo apontados como possíveis fatores que contribuem para o desenvolvimento tumoral. Da mesma forma, alterações que afetam todo o sistema como conexões entre o tumor primário, inflamação generalizada, imunidade baixa, alterações metabólicas e desenvolvimento de caquexia, propensão à trombose e alterações neuroendócrinas (PAUL, 2020) também são implicadas no processo.

Recentemente foram relacionadas diretamente ao processo de metástase, (FIGURA 2) quatro características necessárias para o estabelecimento do tumor secundário: motilidade e invasão, modulação do microambiente, colonização e plasticidade (WELCH; HURST, 2019).

FIGURA 2. HALLMARKS DO CÂNCER E HALLMARKS DA METÁSTASE.

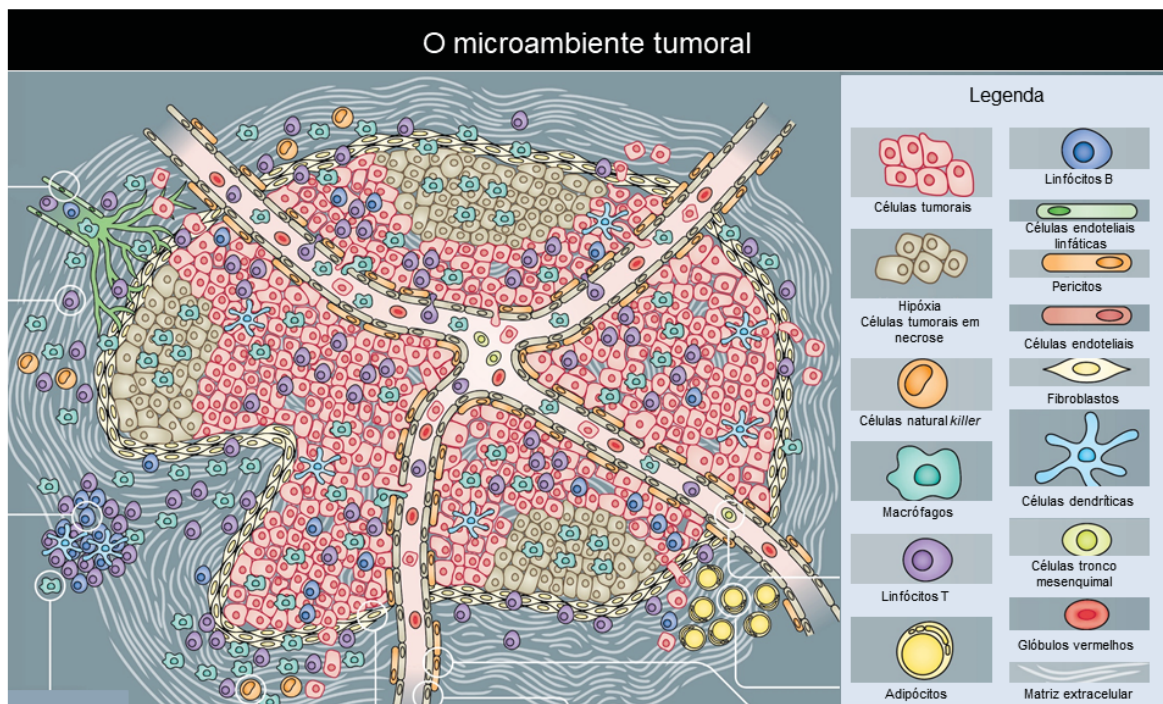


FONTE: Adaptado de Welch; Hurst, (2019).

Atualmente, sabe-se que não são apenas essas células mutadas que determinam a progressão da doença, mas a formação de um microambiente tumoral com interações entre diferentes tipos celulares e moleculares (CHAMMAS, 2010; SIMICZYJEW, *et al.*, 2020). Apesar de serem responsáveis pelo início da carcinogênese, as células tumorais são incapazes de sozinhas, darem progressão à doença e por isso recrutam também células não-tumorigênicas que em associação à matriz extracelular formam o microambiente tumoral (TME, do inglês *tumor microenvironment*) (FIGURA 3). As células não tumorais recrutadas para o TME, ainda que em baixa quantidade (cerca de 0,5% da massa tumoral), são cruciais na formação do mesmo. Já foram identificadas células do sistema imunológico, vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos, pericitos e adipócitos. O conjunto dessas células juntamente com a matriz extracelular, dependo das condições do ambiente e

da sinalização celular envolvida, propiciam a progressão tumoral (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012; HANAHAN; COUSSENS, 2012). O tipo celular e proporção dessas células varia de acordo com o tumor. O conjunto de todas elas formando o microambiente dinâmico propicia tanto o crescimento do tumor, angiogênese, como também processos envolvidos na metástase, como a migração e invasão (ANDERSON; SIMON, 2020; GEORGESCU et al., 2020).

FIGURA 3. O MICROAMBIENTE TUMORAL.



Células tumorais e não tumorais presentes na formação do microambiente tumoral. FONTE: Adaptado de: Balkwill; Capasso; Hagemann, (2012).

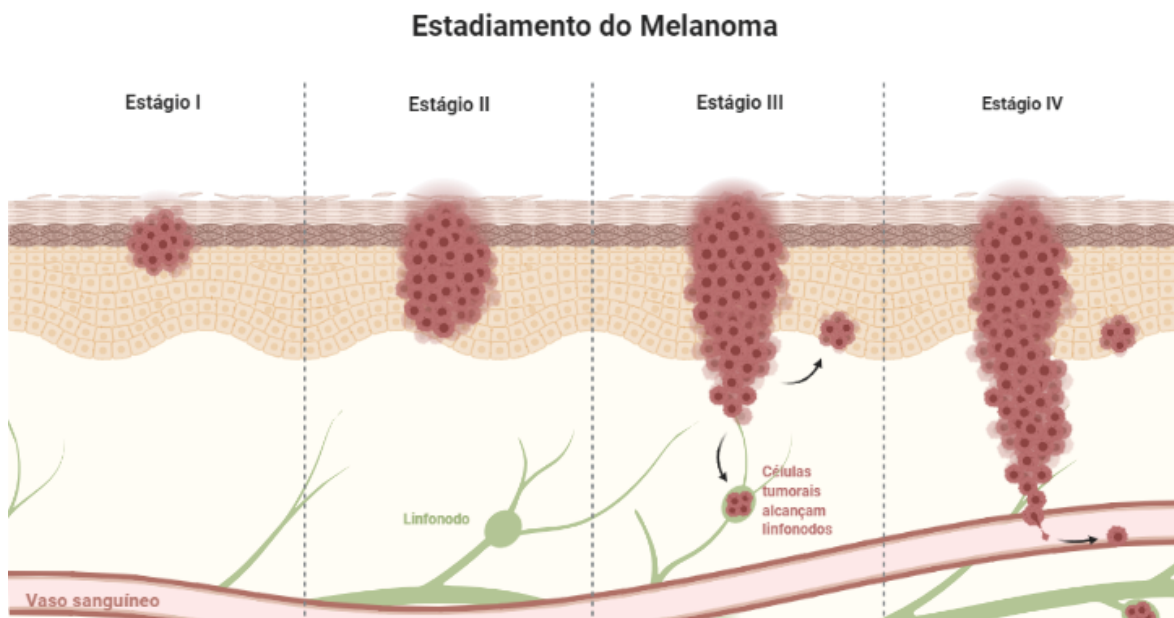
2.1.1 Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos, células localizadas na camada basal da epiderme que são produtoras de melanina (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; LEONARDI et al., 2018) Apenas 1% dos cânceres de pele são do tipo melanoma, mas é o que tem maior taxa de mortalidade (ONCOGUIA, 2020). As causas das mutações celulares que levam ao melanoma incluem fatores ambientais com potencial mutagênico principalmente a exposição solar, em especial os raios ultravioleta e fatores do portador como o alto número e tipos de nevos, pigmentação da pele (pele mais clara e com sardas

apresentam maior risco), idade e ainda fatores genéticos. A interação desses fatores pode culminar na maior probabilidade de desenvolvimento da doença (BERWICK et al., 2016).

De acordo com as características do tumor, o melanoma pode ser classificado em quatro estágios (FIGURA 4). Os estágios I e II são definidos como não metastáticos. Já no estágio III, os pacientes apresentam metástases nos linfonodos e o último estágio (IV) é o mais refratário, com ocorrência de metástase em órgãos distantes (WARD et al., 2017).

FIGURA 4. ESTADIAMENTO DO MELANOMA.



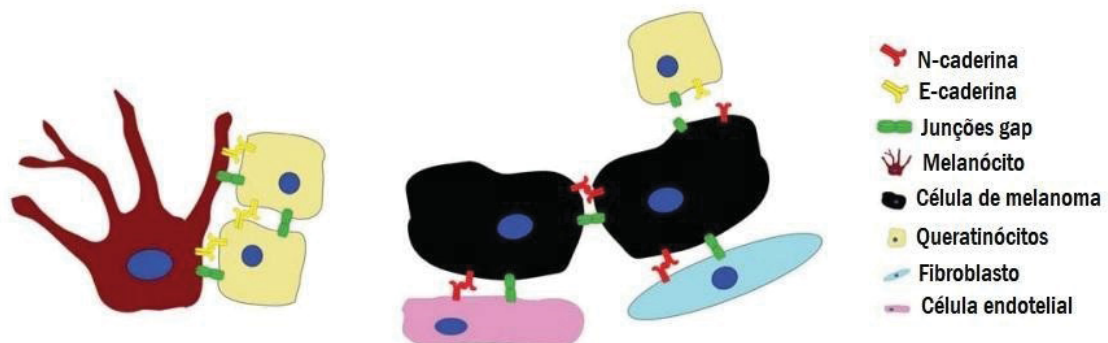
Esquema representativo da progressão do melanoma até o estágio metastático. FONTE: Adaptado de: Biorender, (2021).

Como a maioria das células somáticas, os melanócitos normais possuem um potencial proliferativo finito, ou seja, após um certo número de divisões celulares o ciclo celular é interrompido e as células entram em senescência. Porém algumas mutações em genes específicos promovem a imortalização dessa célula possibilitando o desenvolvimento do tumor (BENNETT, 2003). De acordo com as características genéticas, o melanoma pode ser classificado como *BRAF* mutado, *RAS* mutado, *NF1* mutado e triplo negativo - *triple-WT* (que não apresenta mutações em *BRAF*, *RAS* ou *NF1*) (AKBANI et al., 2015). As mutações mais comuns

acontecem nos genes *BRAF*, *RAS* e *NF1* (YAMAMOTO et al., 2020). A mutação no gene *BRAF* é a alteração genética mais frequente em melanomas, que leva a expressão alterada da proteína BRAF e assim aumenta a capacidade proliferativa e sobrevivência da célula. Essas mutações são levadas em consideração na classificação do tipo de melanoma e na identificação da melhor linha de tratamento (SUN et al., 2020). Os tratamentos mais promissores para melanomas com as mutações citadas concentram-se em terapias alvo, que apresentam maior eficácia por atuarem de forma específica nas alterações decorrentes dessas mutações. Para o melanoma triplo negativo, por ser um grupo heterogêneo com mutações raras e menos frequentes, os tratamentos disponíveis ainda têm muita refratariedade (MACKIEWICZ; MACKIEWICZ, 2017). Para além das terapias alvo, as imunoterapias possuem uma boa taxa de resposta no melanoma triplo negativo, auxiliando no reconhecimento das células tumorais pelo sistema imune (RALLI et al., 2020).

A proliferação dos melanócitos normais é regulada pelos queratinócitos do tecido epitelial. Quando os melanócitos sofrem mutações em genes específicos, desencadeiam uma série de reações que perturbam o equilíbrio homeostático, provocando a perda da adesão e comunicação com os queratinócitos (FIGURA 5). Assim, esse escape, dentre outros fatores, contribui para a progressão do melanoma (HAASS; SMALLEY; HERLYN, 2004).

FIGURA 5. INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA ENTRE MELANÓCITOS E QUERATINÓCITOS E CÉLULAS DE MELANOMA COM CÉLULAS ADJACENTES.



Melanócitos interagem com queratinócitos através de e-caderinas e junções comunicantes. Células de melanoma perdem a interação com os queratinócitos e passam a interagir com fibroblastos e células endoteliais por expressarem n-caderinas. FONTE: Adaptado de: Haass; Smalley; Herlyn, (2004).

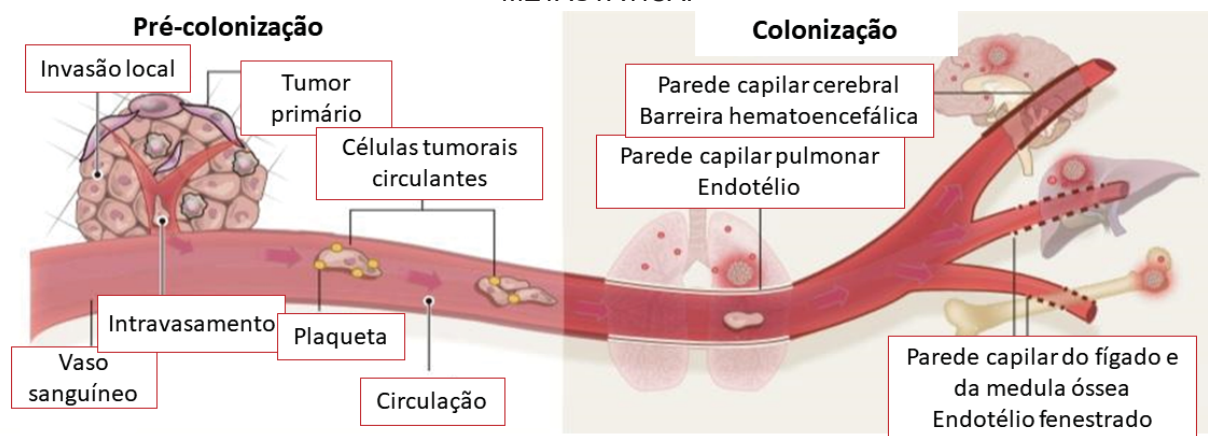
Outro fator de destaque na progressão tumoral do melanoma é a metástase, que inclui diversas etapas até a formação de um tumor secundário (FIGURA 6) e que é a principal causa de morte em pacientes com câncer (MASSAGUÉ; OBENAU, 2016). Uma das etapas de grande importância na metástase do melanoma é o mecanismo similar à transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial–mesenchymal transition*). Os melanócitos perdem a polaridade, o fenótipo epitelial, as interações célula-célula com os queratinócitos e assumem particularidades mesenquimais. Tais características são consequência de alterações nos fatores de transcrição, na expressão das moléculas de adesão e de microRNAs, além da reorganização do citoesqueleto e produção de enzimas de degradação da matriz extracelular (HODOROGEA et al., 2019).

O processo de degradação da matriz extracelular é causado por enzimas com função proteolítica, as metaloproteinases de matriz (MMPs, do inglês *matrix metalloproteinases*), que são fundamentais na progressão tumoral (RIBEIRO et al., 2008), especialmente as classificadas como gelatinases (MMP-2 e MMP-9) que degradam o colágeno IV da lâmina basal (FIGUEIREDO, 2017). Logo na fase inicial do melanoma há superexpressão de MMPs (HOFMANN et al., 2000), e a atuação delas influencia o crescimento tumoral, além de processos envolvidos na metástase, como migração e invasão (MORO; MAUCH; ZIGRINO, 2014). Dessa forma, a inibição de MMPs tem sido um alvo de estudo na busca por interromper a progressão desse e de outros tipos de cânceres (NAPOLI et al., 2020).

As mudanças abordadas acima permitem o início do processo metastático, que acontece quando as células atravessam a membrana basal, invadem o estroma e migram para os vasos sanguíneos. A migração pode acontecer em uma única célula isolada, em um grupo de células que estão frouxamente ou não estão aderidas, mas seguem um mesmo percurso, ou ainda em grupos de células fortemente aderidas entre si. Estudos mostram que as células cancerosas do tecido epitelial humano tendem a migrar coletivamente. Acredita-se que grupos de células podem ser mais resistentes à ação do sistema imunológico (CLARK; VIGNJEVIC, 2015). As metástases tendem a ocorrer primeiramente para os linfonodos que realizam a drenagem da área próxima de onde está localizado o tumor primário. Posteriormente, em melanoma cutâneo, a disseminação pode ocorrer principalmente

para órgãos como pulmões e cérebro (BALCH et al, 2009; SHAIN; BASTIAN, 2016). O sucesso do estabelecimento do tumor no novo ambiente depende de uma série de fatores relacionados à característica do tecido alvo e da formação de novos vasos sanguíneos para que o novo tumor receba o suporte nutricional adequado (LIMONTA, 2019). Um desenho esquemático do processo de progressão do melanoma está mostrado na FIGURA 6.

FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DA PROGRESSÃO TUMORAL E COLONIZAÇÃO METASTÁTICA.



FONTE: Adaptado de Massagué; Obnauf, (2016).

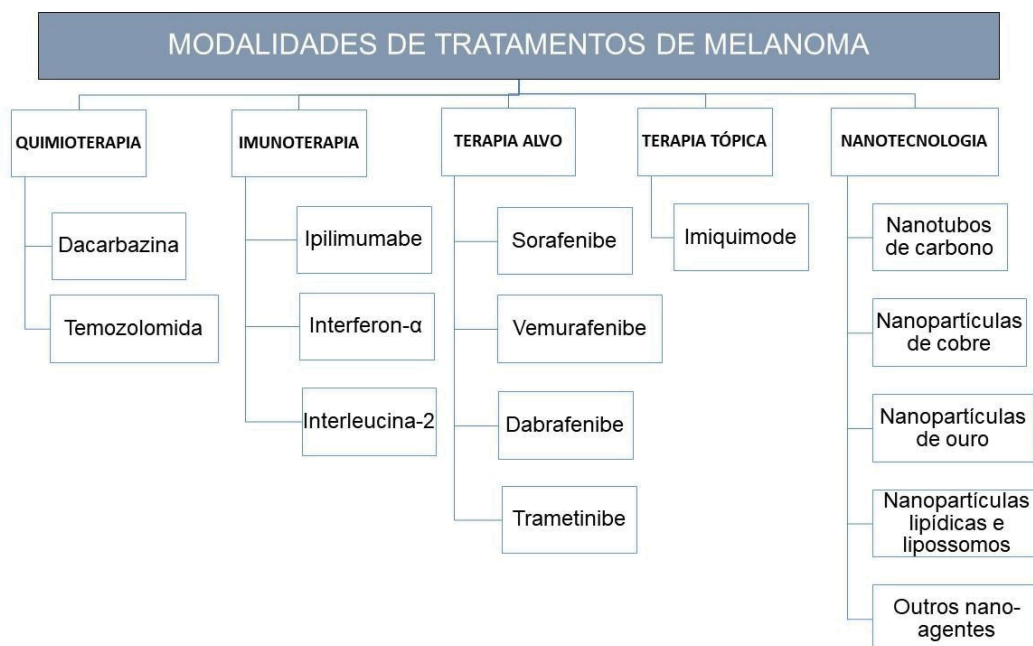
2.1.1.1 Tratamentos para o melanoma cutâneo

Pensando na dinâmica do melanoma, quando o tumor é detectado precocemente e está em uma única região, ele pode ser completamente removido com processos cirúrgicos. Contudo em sua fase metastática a taxa de responsividade dos pacientes é baixa e mesmo com novas modalidades terapêuticas ainda há grandes desafios, como por exemplo, os mecanismos de resistências (DOMINGUES et al., 2018).

As abordagens terapêuticas comumente utilizadas incluem quimioterapia, imunoterapia e terapia alvo (BATUS et al., 2013) (FIGURA 7). Os quimioterápicos dacarbazina e temozolomida são agentes alquilantes do DNA que, apesar de apresentarem pouca eficácia, são os métodos mais utilizados. A quimioterapia não tem ação específica nas células tumorais, atinge também os tecidos saudáveis e

provoca inúmeros efeitos adversos (MISHRA et al., 2018). Novas combinações de drogas e terapias estão sendo testadas, além disso, existem muitas pesquisas promissoras envolvendo imunoterapia e também pesquisas baseadas em nanotecnologia. Tais combinações apresentaram melhores resultados no tratamento por atingirem diferentes alvos e se complementarem (DOMINGUES et al., 2018; MISHRA et al., 2018) Tratamentos imunoterápicos e terapias alvo, em casos de melanoma que apresentam mutações no gene *BRAF*, tem apresentado sucesso. A inibição da via da oncoproteína BRAF traz melhoras significativas nos pacientes com melanoma *BRAF* mutado (JENKINS; FISHER, 2020). Porém, existem pacientes para os quais as terapias alvo não se mostram eficazes e isso pode estar relacionado tanto à resistência adquirida por meio de mutações como por processos de plasticidade celular em resposta aos próprios tratamentos (KOZAR et al., 2019). Além disso, observa-se elevado risco de reincidência do tumor em estágios avançados mesmo após longos períodos de tratamentos imunológicos adjuvantes e terapias direcionadas (BOULVA et al., 2021). Em seu estágio metastático o melanoma continua sendo um desafio terapêutico pois as taxas de resposta às modalidades de tratamento existentes são baixas (MISHRA et al., 2018).

FIGURA 7. MODALIDADES DE TRATAMENTO DE MELANOMA.

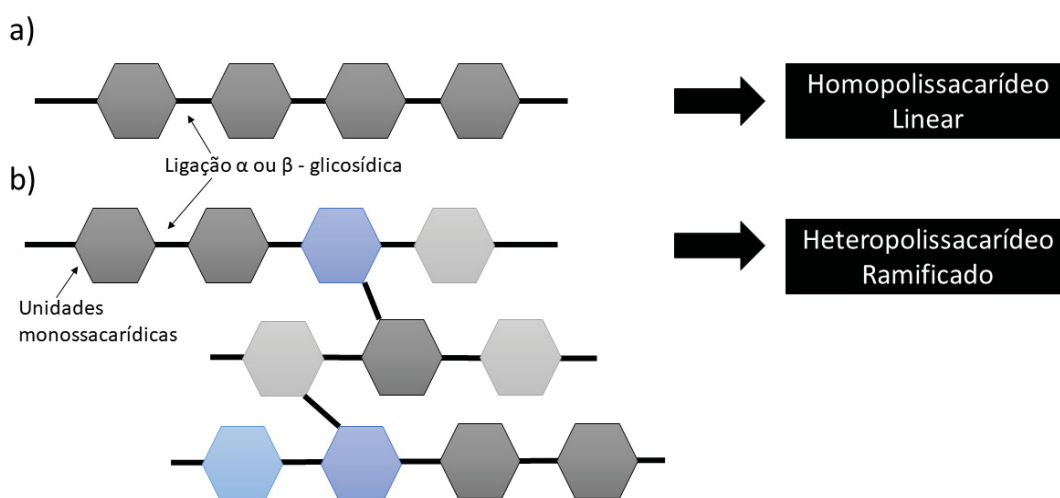


A imagem mostra, em categorias, as principais modalidades terapêuticas antimelanoma aplicadas clinicamente e em fase de estudo. FONTE: Adaptado de Mishra et al., (2018).

2.1.2 Polissacarídeos e suas propriedades antitumorais

Polissacarídeos são macromoléculas constituídas por unidades monossacarídicas iguais (homopolissacarídeos) ou diferentes (heteropolissacarídeos) unidas por ligações α - ou β - glicosídicas (FIGURA 8) (ZAITSEVA et al., 2020).

FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS.



a) homopolissacarídeo. b) heteropolissacarídeo. As diferentes cores representam diferentes monossacarídeos. FONTE: Adaptado de: Zaitseva et al, (2020).

Polissacarídeos de diferentes fontes têm sido apontados na literatura como potenciais tratamentos antitumorais ou como adjuvantes em terapias antitumorais convencionais. As atividades antitumorais de polissacarídeos estão associadas à capacidade de tais biomoléculas atuarem em mecanismos regulatórios, reconhecimento celular, transdução de sinais e imunomodulação. O potencial terapêutico dos polissacarídeos está diretamente ligado à estrutura química fina e massa molar (CARLOTTO et al., 2020; XU; XU, 2016). Com a grande diversidade desses biopolímeros na natureza, há muito o que se explorar dessas moléculas na relação estrutura-atividade.

Apesar de a maioria dos trabalhos investigarem o potencial de polissacarídeos através de ação citotóxica sobre células tumorais, esses também apresentam ação antitumoral não relacionada à citotoxicidade (BARBOSA et al., 2020). Nosso Grupo de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas estudou a

atividade antimelanoma de uma manogalactana parcialmente metilada, extraída do cogumelo comestível *Pleurotus eryngii*, e mostrou interessantes ações deste composto tanto *in vitro* como *in vivo*. Este polissacarídeo reduziu a invasão celular e o crescimento tumoral sem induzir citotoxicidade *in vitro* e sem alterar os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais (BISCAIA et al., 2017). Uma fucomanogalactana extraída do cogumelo comestível *Macrocybe titans* inibiu a migração de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 sem apresentar efeitos citotóxicos (MILHORINI et al., 2018). Já a fucomanogalactana isolada do cogumelo *Hypsizygus marmoreus* não alterou nem a proliferação nem a morfologia das células de melanoma murino (B16-F10) mas reduziu a capacidade de formação de colônias e a migração celular (OLIVEIRA et al., 2019). Polissacarídeos de algas marinhas também têm sido alvos de estudos. A galactana sulfatada, extraída da alga verde *Codium isthmocladum*, em concentrações não citotóxicas, interfere na formação de colônias e no fenotipo invasivo de células B16-F10 (*in vitro*) e, *in vivo*, reduz significativamente o tamanho do tumor e os focos de metástase pulmonar (BELLAN et al., 2020). Por atuarem em parâmetros celulares associados à malignidade tumoral e não apresentarem efeitos citotóxicos, os polissacarídeos têm se mostrado bons candidatos à terapia contra o melanoma.

Outros polissacarídeos, por sua vez, atuam como agentes citotóxicos seletivos para as células tumorais. A combinação de arabinogalactanas e curcumina induziu apoptose em células de câncer de mama por aumentar a expressão da proteína pró-apoptótica p53 e não apresentou efeito significativo no crescimento de células não tumorais (MOGHTADERI; SEPEHRI; ATTARI, 2017).

A alteração do fenótipo invasivo e metastático de células tumorais também é um dos efeitos de polissacarídeos de diferentes fontes. O polissacarídeo extraído dos frutos de ginseng, composto de galactose, glucose, ramnose e arabinose na proporção de 6,1: 2,0: 1,1: 3,2, inibiu significativamente o crescimento tumoral e a metástase pulmonar *in vivo* e melhorou a atividade de células do sistema imunológico (WANG et al., 2015).

Dentre os polissacarídeos vegetais mais estudados quanto às atividades antitumorais estão as arabinoxilanas e arabinogalactanas. Arabinoxilanas (AXs) são constituintes da parede celular de células vegetais e parecem promover seus efeitos

antitumorais através de modulação do sistema imune. AX de farelo de trigo foi testada em camundongos com sarcoma (células tumorais S180). Os resultados mostraram que o polissacarídeo inibiu o crescimento do tumor e melhorou a resposta imune (CAO et al., 2011). AXs extraídas de farelo de trigo foram hidrolisadas enzimaticamente (usando xilanases e arabinofuranosidases) em várias combinações para produzir polímeros com diferentes detalhes estruturais. As AXs produzidas foram testadas *in vitro*, em linhagens celulares de câncer de cólon (Caco-2 e HT-29). Os resultados mostraram que as AXs ricas em unidades de arabinose apresentaram melhor efeito antitumoral (MENDIS; LECLERC; SIMSEK, 2017). As atividades foram relacionadas a propriedades estruturais das moléculas como composição monossacarídica, grau de ramificação e massa molar (FADEL et al., 2018; MENDIS; LECLERC; SIMSEK, 2017). Outras AXs são apresentadas como adjuvantes em terapias, como a AXs extraídas do farelo de arroz, que tiveram efeito quimiossensibilizador *in vitro* em células de câncer de mama (células MCF-7 e 4T1), sugerindo seu potencial para ser aplicada de forma conjunta a outros quimioterápicos, possibilitando reduzir a dosagem de drogas tóxicas com graves efeitos colaterais, como o paclitaxel (GHONEUM et al., 2004). Uma revisão de literatura, descreveu evidências suficientes mostrando que AXs são imunomoduladores eficazes e alternativas promissoras para complementar as terapias convencionais do câncer (OOI et al., 2018).

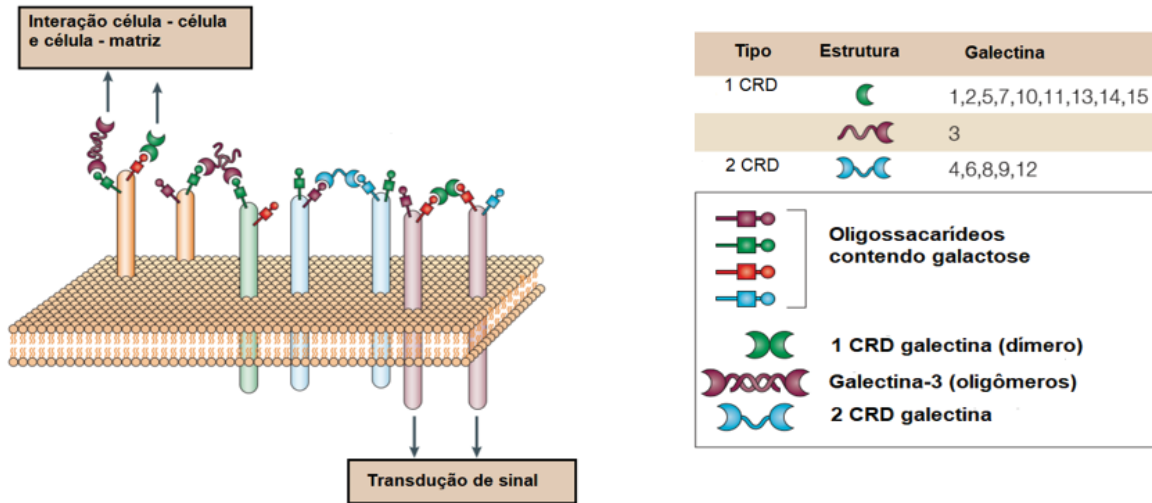
Para o grupo das arabinogalactanas (AGs) os efeitos antitumorais são diversos. AGs extraídas de flores de *Panax notoginseng*, uma espécie utilizada na medicina tradicional asiática, apresentou potencial de inibição da angiogênese (*in vivo*) em câncer pancreático (BxPC-3). Além disso, reduziu a migração de células endoteliais (HMEC-1) *in vitro* (WANG et al., 2015). Em modelo *in vivo* de carcinoma pulmonar, os camundongos quando tratados com AGs de *Tinospora cordifolia* tiveram o tumor reduzido pois o tratamento provocou apoptose nas células tumorais (MOHAN; KOUL, 2018). Uma AG I extraída da orquídea *Anoectochilus formosanus* mostrou efeitos imunomoduladores em camundongos com câncer de cólon, aumentou a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, culminando na redução do tamanho e peso do tumor (YANG et al., 2014). AG II de goma de pêssego, composta por manose, ramnose, ácido galacturônico, galactose, xilose e

arabinose, com massa molecular de 85 kDa inibiu o crescimento de células de câncer de mama e fígado (MCF-7 e HepG-2) e essa ação provavelmente está relacionada a capacidade dessa molécula em ligar com galectina-3 (WEI et al., 2019). AG do fruto de *Lycium barbarum*, composta por arabinose e galactose e cuja massa é 91,2 kDa, altamente ramificada, apresentou efeito antiproliferativo seletivo apenas em linhagens de células tumorais (MCF-7 e HeLa), não atuando da mesma forma em células não-tumorais do fígado (L02) (GONG et al., 2020).

2.1.3 Galectinas no contexto tumoral

Galectinas são potenciais alvos moleculares de polissacarídeos no contexto tumoral. Elas são uma família de lectinas que participam de vários processos celulares como reconhecimento, sinalização e adesão (NELSON, DAVID L.; COX, 2014). Esse grupo difere das demais lectinas pela capacidade de reconhecer β -galactose e sua estrutura é composta por domínios reconhecedores de carboidratos (CRDs, do inglês *carbohydrate-recognition domains*). Ao interagir com glicoproteínas da superfície celular que possuem β -galactose em sua estrutura, as galectinas desencadeiam vários processos de sinalização transmembrana (FIGURA 9), podem unir células adjacentes e mediar adesão de células com proteínas da matriz extracelular. Já foram descritos 15 tipos de galectinas, porém as galectinas especialmente relacionadas aos processos de sinalização tumoral são as galectinas 1 e 3 (Gal-1 e Gal-3, respectivamente) e estas são normalmente superexpressas em células tumorais (LIU; RABINOVICH, 2005). Tais galectinas regulam uma variedade de eventos nas células tumorais que permitem a proliferação, sobrevivência, migração, inflamação, angiogênese e evasão do sistema imune (ELOLA et al., 2018).

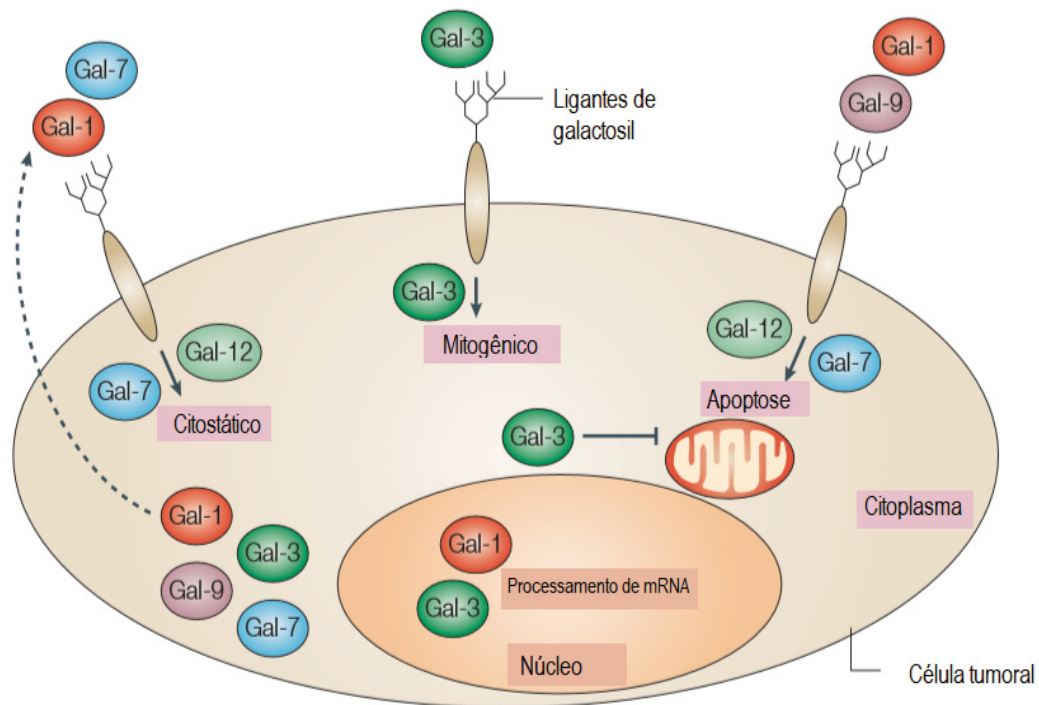
FIGURA 9. GALECTINAS.



Galectinas e seus CRDs. Esquema da forma como galectinas interagem com polissacarídeos ricos em unidades de β -galactose através dos seus domínios CRDs. FONTE: Adaptado de Liu; Rabinovich, (2005).

O envolvimento das galectinas em todas as características-chave (*hallmarks*) tumorais que propiciam o crescimento e a progressão tumoral está esquematizado na FIGURA 10. Galectinas podem atuar no ambiente intra- e/ou extracelular (FIGURA 11) e a expressão alterada delas culmina no desencadeamento do processo metastático e no crescimento do tumor (modulando a transformação tumoral, a apoptose e a progressão das células no ciclo celular) (LIU; RABINOVICH, 2005). Tendo em vista o papel importante das galectinas na progressão tumoral elas se tornam alvos moleculares interessantes na terapia antitumoral (GIROTTI et al., 2020).

FIGURA 11. GALECTINAS DENTRO E FORA DA CÉLULA.



Ação das galectinas dentro e fora da célula – regulação do crescimento tumoral. Galectinas modulam processos como mitose, apoptose e progressão do ciclo celular. FONTE: Adaptado de Liu; Rabonovich, (2005).

Em células de melanoma murino, já foram observadas alterações na expressão de gal-3. A maior expressão dessa lectina foi associada com o fenótipo metastático. Quando comparada a expressão de gal-3 em B16-F10 e B16-F1, observou-se que a linhagem mais metastática expressa mais gal-3 (WANG, 2012). No nosso grupo de pesquisa, foram realizados testes de presença de gal-3 em B16-F10. A análise por microscopia de fluorescência confocal constatou que a expressão delas é intracelular e que, portanto, podem estar provocando tais processos supracitados (BRAZ-JUNIOR, 2020).

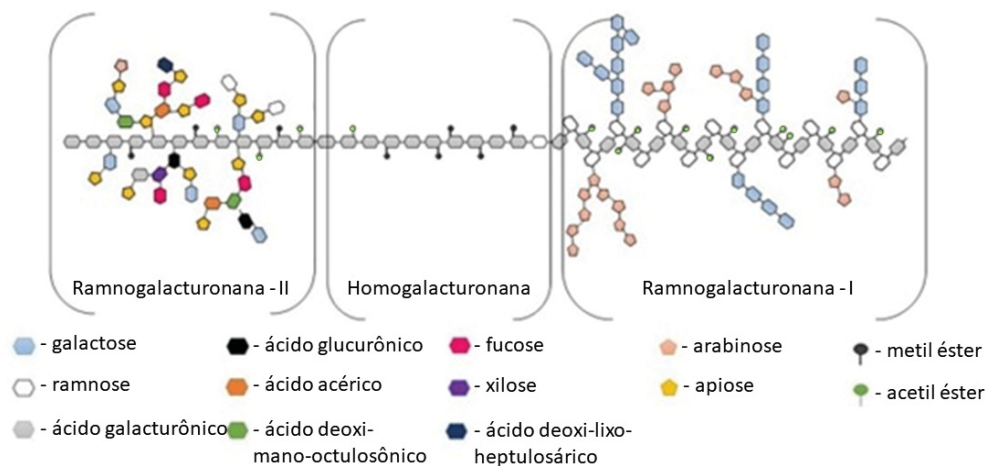
Polissacarídeos, especialmente aqueles que possuem unidades de β -galactose, como algumas pectinas, têm potencial de se ligar aos domínios de reconhecimento de carboidratos das galectinas e, desta forma, inibir a atuação destas nas vias de sinalização pró-tumoral.

2.2 PECTINAS – ESTRUTURA E ATIVIDADES ANTITUMORAIS

Pectinas são polissacarídeos presentes na parede celular vegetal, sendo muito abundantes em frutos. São amplamente utilizados na indústria por apresentarem propriedades gelificantes (BRANDÃO; ANDRADE, 2005; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2010; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

As pectinas possuem estrutura química diversa, porém, com a característica comum de apresentar ácido galacturônico como um de seus constituintes monossacarídicos (KHOTIMCHENKO, 2020). As pectinas podem ser classificadas como homogalacturonanas (HGs) (polímeros lineares) e ramnogalacturonanas (RGs) (polímeros ramificados com cadeias laterais de galactose e arabinose – RGI - ou de monossacarídeos raros – RGII - as quais estão ligadas às unidades de ramnose da cadeia principal) (FIGURA 12). A estrutura química fina das pectinas é altamente heterogênea e varia principalmente de acordo com a espécie, período de coleta e grau de maturação do fruto (CANTERI et al., 2012; KHOTIMCHENKO, 2020; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO DAS POSSIBILIDADES ESTRUTURAIS (MAIS COMUNS) DAS PECTINAS.



FONTE: Adaptado de Khotimchenko, (2020).

Além de suas propriedades físico-químicas interessantes, a literatura mostra que as pectinas apresentam diferentes propriedades biológicas, dentre elas, propriedades antitumorais (QUADRO 1). Observa-se que tais propriedades estão

associadas com a estrutura química fina e com a massa molar destes polímeros, destacando a importância do conhecimento das estruturas químicas e outras propriedades das pectinas para se entender seus efeitos biológicos (ZAITSEVA et al., 2020).

A pectina cítrica modificada por hidrólise parcial (MCP, do inglês *modified citrus pectins*) possui massa molar maior que 100 kDa e, quando tem sua massa molar reduzida, é melhor absorvida, quando administrada *in vivo*, do que a pectina cítrica nativa. Além disso, sua bioatividade se torna potencializada. MCP possui menor teor de ácido galacturônico e maior proporção dos monossacarídeos neutros arabinose e galactose (FRACASSO, 2015). Uma revisão de literatura mostra que a pectina cítrica modificada exerce atividade antitumoral em diferentes linhagens celulares e modelos *in vivo*. Efeitos antimetastáticos e apoptóticos são os mais descritos e, apesar de não se saber a estrutura química exata necessária para desencadear essas ações, sugere-se que há vários segmentos bioativos na estrutura da pectina cítrica modificada (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013). A MCP combinada a outros medicamentos (ProstaCaid e BreastDefend) inibiu fenótipos metastáticos como a migração de células tumorais de próstata e de mama de forma concentração dependente e tal propriedade foi correlacionada com seu potencial inibidor de galectina-3 (JIANG; ELIAZ; SLIVA, 2013). Em outro estudo com células de câncer de ovário, MCP na concentração 1% sensibilizou as células cancerosas para o tratamento com paclitaxel. O tratamento em combinação reduziu a viabilidade e diminuiu a adesão das células tumorais (HOSSEIN et al., 2013).

Além da pectina cítrica, o potencial antitumoral de ramnogalacturonanas e homogalacturonanas de diferentes fontes vem sendo descrito. Em estudo *in vitro* comparando a atividade antitumoral de pectinas obtidas de beterraba no tratamento de câncer de cólon (1 mg/mL por um período de até 120 h), observou-se que frações compostas por ramnogalacturonanas tipo I (RGI) eram mais bioativas, na ação antiproliferativa que aquelas compostas por homogalacturonanas. As cadeias laterais, ricas em arabinose e galactose, presentes na RGI foram importantes na ação antitumoral, porém a remoção delas reduziu, mas não aboliu, o efeito da RGI, sugerindo que as cadeias laterais podem potencializar o efeito, mas que a cadeia principal de RGI e HG também podem ser bioativas (MAXWELL et al., 2016).

A pectina da maçã teve ação antitumoral em células de câncer de mama (MDA-MB-231). O tratamento com tal pectina (1-5 mg/mL) induziu apoptose e interrupção do ciclo celular (DELPHI et al., 2015). O tratamento de camundongos (BALB/c) com câncer de mama (células 4T1) com a pectina da maçã provocou aumento da apoptose das células tumorais e, portanto, diminuição da incidência de focos metastáticos (DELPHI; SEPEHRI, 2016).

Uma RGI com cadeias laterais de arabinogalactana extraída da casca da melancia mostrou-se citotóxica para células Hep-2 de carcinoma laríngeo humano e tal efeito foi tempo e concentração-dependente (DAMMAK et al., 2019). A RGI extraída de Goji Berry (*Lycium ruthenicum*), composta por ramnose, ácido galacturônico, galactose, xilose e arabinose nas proporções 14,4: 17,7: 26,6: 16,4: 24,9 e cuja massa molar é de 114,8 kDa, inibiu a invasão de células cancerosas do pâncreas (BxPC-3) quando tratadas com 8,71 μ M por 48 horas (ZHANG et al., 2019). Pectinas extraídas de Ginseng (*Panax ginseng*), espécie tradicional na medicina chinesa, apresentaram efeitos antitumorais significativos contra células de câncer de cólon, diminuindo a proliferação e aumentando a apoptose. A pesquisa mostrou que pectinas do tipo homogalacturonanas (HG) tinham maior potencial de inibição da proliferação das células tumorais quando comparadas com o tratamento com arabinogalactanas (CHENG et al., 2011). HG obtida da espécie *Ficus pandurata*, com massa molar de 83,3 kDa, induziu apoptose em células de câncer uterino (HeLa) após 48 horas de tratamento com 200 μ g/mL da pectina (LV et al., 2020).

Interessantemente, pectinas demonstraram ter citotoxicidade seletiva para linhagens celulares tumorais. Uma fração rica em pectinas extraída do fruto brasileiro gabioba, composta por HGs e RG-I, com cadeias laterais longas compostas por arabinose e galactose, com massa molar 29,2 kDa, apresentou efeito citotóxico (25 – 400 μ g/mL) em linhagem de glioblastoma humano e tal efeito não foi observado para a linhagem de fibroblastos não tumorais (NIH-3T3). A fração pectica promoveu alterações na morfologia das células de glioblastoma (U251-MG) além de alterar sua capacidade proliferativa. Os autores sugerem que o efeito antitumoral dessas pectinas possivelmente está associada ao conteúdo de galactose e arabinose de suas cadeias laterais (AMARAL et al., 2019).

Pesquisas *in vitro* analisaram a atividade de RGI isoladas de flores de *Lonicera japonica*, em células humanas de câncer de pâncreas (BxPC-3 e PANC-1), e verificaram seu potencial terapêutico, uma vez que estas, na concentração de 1000 µg/mL, inibiram a proliferação celular com baixa citotoxicidade em células normais de fígado (linhagem LO2) (LIN et al., 2016).

Durante o processo de amadurecimento de frutos ocorrem modificações estruturais nas suas pectinas constituintes devido à ação de pectinases. Prado et al. (2017) investigaram a influência e a correlação entre a massa molar das pectinas, as quais são obtidas de forma dependente do grau de amadurecimento dos frutos, com as propriedades antitumorais destas. Em células de câncer de cólon (HCT116 e HT29) e próstata (PC3), a fração péctica mais ativa foi aquela extraída três dias após a colheita do mamão (3PP), que tinha cadeias de HG e RGI menores, além de RGI estar associadas às cadeias laterais de AGII. Entre os efeitos observados *in vitro* o principal foi o de desencadear a morte das células após 24 h de exposição a 0,2% da 3PP. A pectina interferiu na interação entre as células tumorais e proteínas da matriz extracelular, diminuindo a adesão e promovendo a apoptose/necroptose. O estudo mostrou que a atividade antitumoral da pectina 3PP era dependente da presença de arabinogalactana do tipo II através de um mecanismo independente da ligação em galectina-3, sugerindo que tais tipos de pectinas podem atuar em outros alvos moleculares para exercer suas ações antitumorais (PRADO et al., 2017).

Após estudo da literatura observou-se que a ação antitumoral de pectinas é diretamente ligada às suas características como a massa molar, grau de metil esterificação, estrutura química fina, composição e proporção monossacarídica. Por esse motivo modificações estruturais como hidrólises parciais têm sido realizadas para avaliar correlações entre estrutura e função. O comprimento e quantidade de cadeias laterais, assim como a relação entre HG e RGI são importantes na ligação dos polímeros à galectina-3, um alvo molecular importante que medeia as propriedades antitumorais das pectinas (WU et al., 2020). O enriquecimento da estrutura das pectinas com cadeias laterais, compostas por galactose, pode aumentar as suas atividades antitumorais e imunoestimulantes (DING; CUI, 2020). O tratamento térmico para a redução do tamanho molecular da pectina cítrica mostrou que a desesterificação de HG, o aumento na proporção de AGI e a diminuição de

cadeias de RGI aumentaram a atividade antitumoral. A pectina com massa molar entre 30 e 10 kDa com HG desesterificada inibiu a migração, a agregação e a proliferação de células tumorais humanas (câncer de cólon HCT116 e HT29 e próstata PC3). Os efeitos da pectina cítrica dependem das suas características estruturais e da linhagem celular testada (DOPRADO et al., 2019). Interessantemente, algumas pectinas são mais bioativas quando em concentrações menores, como é o caso daquelas extraídas de amora onde a concentração mais baixa (10 µg/mL) induziu apoptose enquanto a concentração maior (80 µg/mL) não apresentou efeito em células de câncer de fígado (HepG-2) (KUMAR et al., 2020).

Vários estudos relacionam a ação antitumoral das pectinas com sua capacidade de se ligar à galectinas, especialmente galectinas-3. A ação está diretamente ligada com suas estruturas químicas e, em grande parte, citam que o potencial inibidor de galectina-3 é decorrente das cadeias laterais das pectinas, ricas em galactose e arabinose (PRADO et al., 2019; JAYARAM; KAPOOR; DHARMESH, 2015; VAYSSADE et al., 2009). Uma ramnogalacturonana de 120 kDa com cadeias laterais de galactose, derivado de pectinas cítricas, liga-se a Gal-1, e essa ligação é ainda mais forte do que a que ocorre comumente entre Gal-1 e lactose, que é inclusive usado como controle positivo em testes de ligação a galectinas (MILLER et al., 2009). Um ensaio clínico de fase I utilizando *belapectin*, uma pectina tipo RG-I com cadeias laterais de arabinogalactanas, em combinação com imunoterápico pembrolizumabe, tem mostrado resultados promissores. O tratamento com o referido polissacarídeo tem como alvo galectinas extracelulares ligando-se a Gal-1 e Gal-3, com mais afinidade por Gal-3 (THERAPEUTICS, 2021). Essas interações são importantes, uma vez que quando se conectam às galectinas e preenchem os CRDs elas impedem que as galectinas interajam com outros componentes celulares e desencadeiam processos pró-tumorais.

No que se refere à ação de pectinas no melanoma, modelo que foi utilizado nesta dissertação, estas já apresentaram atividade antimetástica e pró apoptótica por diversas vias, entre elas através de inibição da galectina-3. Uma RGI rica em cadeias laterais de AGs extraída do milho (*Zea mays* L.), composta por galactose, arabinose, ácido urônico, manose, xilose e ramnose (54:20:10:4:3:1), foi testada *in vitro* em células da linhagem B16-F10 e *in vivo* em camundongos portadores de

melanoma. *In vitro*, o tratamento com 20 µg/mL inibiu o crescimento, invasão e adesão das células. *In vivo*, o tratamento com 200 mg/kg além de reduzir significativamente o tamanho do tumor sólido, inibiu a metástase pulmonar. Os autores sugeriram que o bloqueio da metástase do melanoma no pulmão é resultante da ação inibitória sobre a galectina-3 (JAYARAM; KAPOOR; DHARMESH, 2015). Ramnogalacturonanas do tipo RGI extraídas do quiabo, contendo cadeias laterais de galactose, alteraram a morfologia e adesão celular, reduziram a proliferação e induziram a apoptose em culturas 2D e 3D de células de melanoma (B16-F10) e tais resultados estão associados à ligação deste polissacarídeo à galectina-3 (VAYSSADE et al., 2009). Pectinas ricas em galactose $\beta(1\rightarrow4)$ ligadas obtidas a partir da raiz da planta *Decalepis hamiltonii*, uma espécie utilizada na medicina tradicional indiana, na concentração de 20 µg/mL reduziu a adesão e invasão das células de melanoma B16-F10 e *in vivo* reduziu os nódulos metastáticos nos pulmões, por se ligar e inibir a atividade da galectina-3. As análises moleculares revelaram que a inibição da galectina-3 por este polissacarídeo levou à regulação negativa de MMPs e do complexo proteico NFκB (VENKATESHAIAH et al., 2017).

QUADRO 1. PECTINAS E ATIVIDADES ANTITUMORAIS.

Fonte	Estrutura química	Modelo celular	Efeito	Referência
Gabiroba (fruto)	HG e RGI c/ cadeias laterais de Ara e Gal e baixa Mw	Glioblastoma (U251-MG) e fibroblasto não tumoral (NIH-3T3)	- proliferação # morfologia Sem efeitos na célula normal	AMARAL et al., 2019
<i>Lonicera japônica</i> (flores)	RGI	Câncer pâncreas (BxPC e PANC-1) e células normais (LO2)	- proliferação Baixa citotoxicidade célula normal	LIN et al., 2016
Beterraba	HG e RGI	Câncer de cólon	RGI + bioativa que HG	MAXWELL et al., 2016
Maçã (fruto)	Ácido péctico comercial	Câncer de mama	+ apoptose + parada do ciclo	DELPHI et al., 2015
Maçã (fruto)	Ácido péctico comercial	Camundongos BALB/c com 4T1 (câncer mama)	+ apoptose e por isso - metástase	DELPHI et al., 2016
Melancia (casca)	AG ligada a RGI	Câncer laríngeo (Hep2)	+ Citotoxicidade (efeito dependente da concentração e tempo)	DAMMAK et al., 2019
<i>Panax ginseng</i>	HG	Câncer cólon (HT-29)	- Proliferação + apoptose	CHENG et al., 2011
Jabuticaba	HG	Câncer cólon (HCT116)	- Viabilidade Inibe gal-3	SANSONI et al., 2020
Mamão (polpa)	-HG -RGI +AGII	Câncer cólon (HCT116 e HT-29) e câncer próstata (PC3)	+ morte celular - adesão Efeito dependente de AGII	PRADO et al., 2017
PCM	HG desesterificado -RGI +AGI	Câncer cólon (HCT116 e HT-29) e câncer próstata (PC3)	- Migração - agregação (adesão) - proliferação	DOPRADO et al., 2019
PCM + ProsCaid e BreastDefende	Pectina comercial	Câncer próstata e câncer mama	- Metástase Inibe gal-3	JIANG; ELIAZ; SLIVA, 2013
PCM + Paditaxel	Pectina comercial	Câncer de ovário	- viabilidade – adesão (sensibilizou as células para o tratamento)	HOSSEIN et al., 2013
Milho	Gal, Ara, GalA, Man, Xyl e Rha (54:20:10:4:3:1)	Melanoma (B16F10) +in vivo	- Invasão - metástase - tamanho tumor Inibe gal-3	JAYARAM; KAPOOR; DHARMESH, 2015
Quiabo	RGI c/ cadeias curtas de galactana	Melanoma (B16F10) 2D e 3D	- proliferação + apoptose #morfologia #adesão Interage.com gal-3	VAYSSADE et al., 2009
<i>Decalepis hamiltonii</i> (raiz)	Rica em Gal $\beta(1 \rightarrow 4)$	Melanoma (B16F10) +in vivo	- metástase – colonização pulmonar Regulação negativa de MMPs e complexo NFkB e Inibe gal-3	VENKATESHAIAH et al., 2017
<i>Lycium ruthenicum</i> (fruto)	RGI com massa 114,8 kDa	células cancerosas do pâncreas (BxPC-3)	- invasão	ZHANG et al., 2019
<i>Ficus pandurata</i> (figueira)	HG com massa 83,3kDa	câncer de cólon uterino (HeLa)	+ apoptose	LV et al., 2020
Amora		câncer de fígado (HepG-2)	+ apoptose	KUMAR et al., 2020

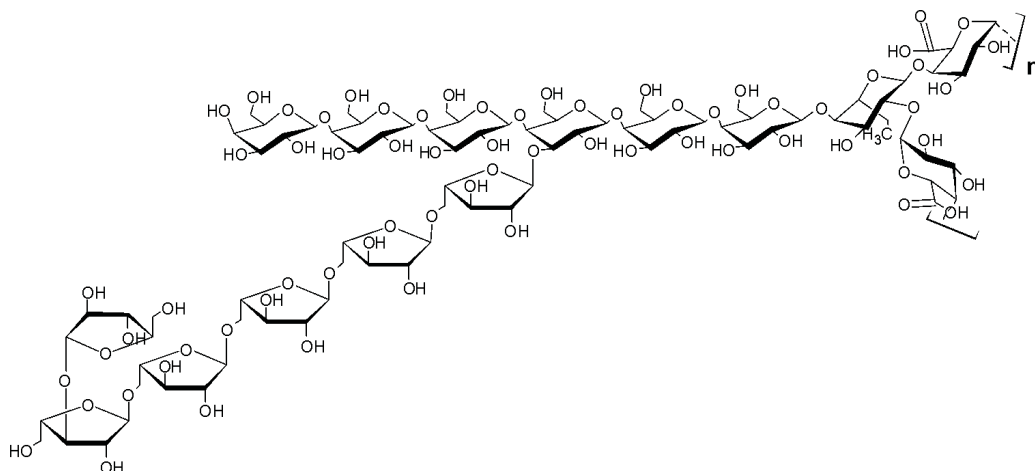
FONTE: a autora.

2.2.1 Pectina da ameixa seca (*Prunus domestica*)

A ameixa é a fruta da espécie *Prunus domestica*. É uma fruta consumida diretamente ou como ingrediente de sucos, purês, misturada com cereais, em receitas com carnes e como substituto de gorduras (STACEWICZ-SAPUNTZAKIS et al., 2001). Ameixas, além de serem ricas fontes de fibras, apresentam um amplo potencial farmacológico com efeitos notáveis como hipotensores, hipoglicêmico, hepatoprotetores, antioxidantes, anti-hiperlipidêmico, antitumoral, anti osteoporose, ansiolítico e antibacteriano (SULTANA et al., 2020). Após o processo de secagem as propriedades físicas e químicas podem ser alteradas e as atividades biológicas aprimoradas (SILVAN; CIECHANOWSKA; RODRIGUEZ, 2020).

Dentre os polissacarídeos que constituem a ameixa seca, Cantu-jungles e colaboradores, (2014) extraíram, purificaram e caracterizaram quimicamente pectinas com estruturas interessantes que despertaram o interesse atual nos estudos de suas atividades antitumorais. Duas das frações isoladas, AGI-50R e AGI-50E, foram caracterizadas como arabinogalactanas do tipo I (FIGURA 13), cuja cadeia principal é formada por unidades de β -Galp (1 \rightarrow 4) ligadas e com cadeias laterais ricas em α -L-Araf (FIGURA 13). A fração AGI-50R apresentava uma massa de 62 kDa com composição monossacarídica de arabinose, galactose, ramnose e ácido galacturônico na proporção de 48:31:11:10. Já a AGI-50E apresentava menor massa, 17 kDa, e composição monossacarídica de arabinose, galactose, ramnose e ácido galacturônico nas proporções 40:50:5:5. Uma vez que as estruturas descritas apresentam características promissoras para serem testadas como agentes antitumorais e que ainda não foram encontrados na literatura artigos científicos sobre as propriedades antitumorais destas pectinas, tais frações foram prospectadas para serem estudadas neste trabalho.

FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS ARABINO GALACTANAS EXTRAÍDAS DA AMEIXA SECA (*Prunus Domestica*).



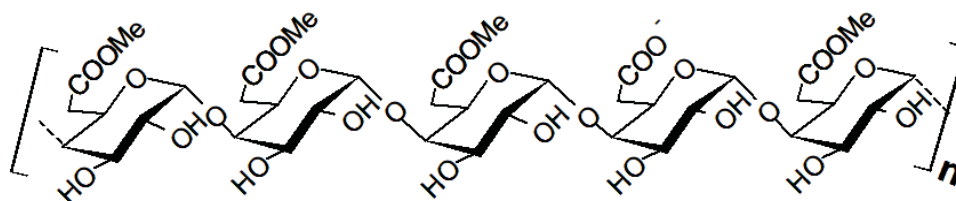
AGI-50R, M_w 62 kDa, composta por arabinose, galactose, ramnose e ácido galacturônico nas proporções 48:31:11:10. AGI-50E, M_w 17 kDa, composta por arabinose, galactose, ramnose e ácido galacturônico nas proporções 40:50:5:5. β -Galp (1 \rightarrow 4) ligadas com cadeias laterais de α -L-Araf. FONTE: a autora.

2.2.2 Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*)

O maracujá (*Passiflora edulis*) é uma espécie nativa do Brasil. A polpa é amplamente consumida nas mais diversas receitas e em especial utilizado na produção de sucos. A casca é considerada uma importante fibra alimentar (LÓPEZ-VARGAS et al., 2013) porém, atualmente, não possui valor agregado e é considerada um subproduto industrial, visto que a maior parte da produção do maracujá está relacionada a utilização da polpa (MARTINS et al., 2018). Apesar disso, algumas pesquisas buscam otimizar o uso da casca do maracujá, como para a produção de ração para animais (AGUIAR et al., 2020), farinhas, que são inseridas em vários produtos comerciais e receitas pelas suas propriedades como estabilizante, emulsificante, espessante e geleificante (COELHO et al., 2017). Existem diferentes métodos para extração da pectina da casca. No método mais convencional, por meio aquoso, ácido ou básico, o rendimento médio das pectinas correspondem a cerca de 15% da massa da casca seca do maracujá (FREITAS et al., 2020).

Abboud e colaboradores (2019) extraíram e purificaram, da casca do maracujá, uma homogalacturonana com massa molar de 53 kDa, composta por 92% de ácido galacturônico e 7% de monossacarídeos neutros (arabinose, galactose e glucose nas proporções 3:2:2) (FIGURA 14). As unidades de GalA são α -(1 \rightarrow 4)-ligadas e apresentam alto grau de metil esterificação (70% DE). Nenhum trabalho mostrando o efeito antimelanoma desta pectina foi encontrado na literatura e, devido ao potencial antitumoral de pectinas do tipo homogalacturonanas, este polissacarídeo foi prospectado para este trabalho.

FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA HOMOGALACTURONANA EXTRAÍDA DA CASCA DO MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora Edulis*).



O polissacarídeo possui M_w 53 kDa, composto por ácido galacturônico, arabinose, galactose e glucose nas proporções 92:3:2:2 e cadeia de GalA α -(1 \rightarrow 4)-ligadas com grau de metil-esterificação de 70%. FONTE: a autora.



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS E CULTIVO

Os testes foram realizados em células de melanoma, classificados como triplo negativos para as principais mutações, sendo uma murina (B16-F10 BCRJ, 0046) e uma humana (CHL-1 ATCC®, CRL-9446™) e fibroblastos não-tumorais murinos (BALB/3T3 clone A31 ATCC®, CCL-163™) e humanos (CCD-1059Sk BCRJ, 0061) (QUADRO 2), cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco), com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, e com os antibióticos 1 U/mL de penicilina e 1 μ g/mL de streptomina (Life Technologies), incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após as células atingirem a confluência da área de superfície onde estão

aderidas (70% para fibroblastos e 90% para as de melanoma), foram realizados os subcultivos e plaqueamento dos experimentos.

QUADRO 2. LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS.

Linhagens celulares	Linhagens de melanoma	Linhagens não-tumorais (Fibroblastos)
	B16-F10	BALB/3T3 Clone A31
	CHL-1	CCD-1059Sk

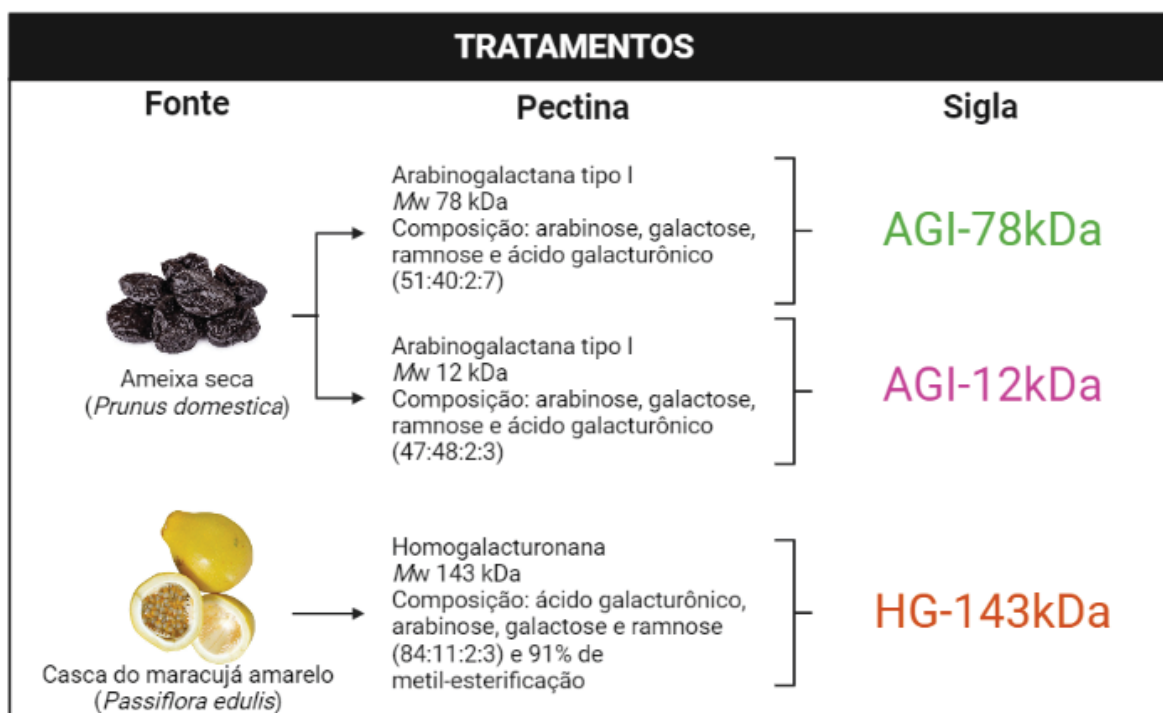
A avaliação da atividade antimelanoma das pectinas foi investigada em duas linhagens tumorais, uma murina e uma humana, ambas classificadas como triplo negativas para as principais mutações. Como controle não tumoral, foram utilizadas duas linhagens de fibroblastos, uma murina e uma humana. FONTE: a autora.

3.2 TRATAMENTO – PREPARO DOS POLISSACARÍDEOS

As pectinas utilizadas foram extraídas, purificadas e caracterizadas pela equipe da Prof^a. Dr^a. Lucimara Mach Cortes Cordeiro, do Grupo de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica da UFPR. Para obtenção das pectinas da ameixa seca foi utilizada a metodologia descrita previamente por CANTU-JUNGLES et al. (2014) e a pectina do maracujá foi obtida a partir de extração aquosa a quente adaptada de ABOUD et al. (2019) (ANEXO 1). Os polissacarídeos (FIGURA 15) foram solubilizados em meio DMEM numa solução-mãe de 5 mg/mL sob agitação magnética a 50°C por 24 horas e posteriormente foram esterilizados por filtração em membrana de poliestireno com 0,22 µm de poro (Merck). A partir dessa solução, foram preparadas outras concentrações menores por meio de diluições seriadas. Para os ensaios de citotoxicidade os fibroblastos murinos foram tratados com oito concentrações

diferentes (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL) de cada polissacarídeo e as demais linhagens com as quatro maiores concentrações (1, 10, 100 e 1000 µg/mL). A capacidade de indução de morte celular foi avaliada utilizando as duas maiores concentrações (100 e 1000 µg/mL). Posterior à análise desses ensaios foi selecionada uma concentração não citotóxica (100 µg/mL) para investigar possíveis alterações nos perfis de malignidade das células tumorais. Em todos os testes, as células ficaram expostas aos tratamentos por um período de 72 horas.

FIGURA 15. TRATAMENTOS UTILIZADOS.



Foram testadas duas arabinogalactanas tipo I, extraídas da ameixa seca, com diferença na massa molar média e uma homogalacturonana, extraída da casca do maracujá amarelo. FONTE: a autora.

3.3 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o teste do vermelho neutro, que tem como princípio avaliar a viabilidade/integridade das endomembranas pela capacidade da célula em absorver e reter o corante vermelho neutro nos

lisossomos. Nas células viáveis, o corante difunde através das membranas celulares e quando chega em vesículas ácidas sofre protonação e fica retido no interior dessas estruturas e dessa forma é possível mensurar a quantidade de corante internalizado (ICCVAM, 2006; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt), sendo 500 células/poço no caso das células B16-F10, 2000 células/poço no caso das células BALB/3T3 e CHL-1 e 4000 células/poço para as células CCD-1059Sk. Após 24 horas as células foram tratadas com os polissacarídeos, exceto as células do grupo controle que receberam apenas o meio de cultura DMEM. Testes iniciais foram feitos nos fibroblastos murinos, os quais foram expostos a oito diferentes concentrações dos polissacarídeos (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; e 1000 µg/mL) enquanto para as demais linhagens celulares houve a exposição às quatro maiores concentrações (1; 10; 100; e 1000 µg/mL) durante 72 horas. No penúltimo dia de tratamento, foi preparada uma solução de vermelho neutro (Sigma-aldrich) 0,04 mg/mL em meio de cultura DMEM, e esta foi incubada a 37 °C por 24 horas. Posteriormente a solução foi centrifugada por 15 minutos a 2000 rpm para a precipitação dos cristais. Para a finalização do experimento o meio de cultura das células foi trocado pela solução de vermelho neutro (100 µL/poço) e as células voltaram a ser incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 2 horas. Passado esse período, foi retirado o sobrenadante dos poços e o corante retido no interior das células viáveis foi extraído com 100 µL de solução contendo etanol:água:ácido acético (50:49:1 v/v). A placa foi agitada para homogeneização por 10 minutos e a absorbância foi medida em leitor de microplacas (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, United States) no comprimento de onda de 540 nm.

3.4 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A influência dos polissacarídeos na proliferação celular foi avaliada pela coloração com cristal violeta das células aderidas nos poços ao final do tempo de tratamento. O método cristal violeta determina a quantidade de células aderidas,

sugerindo uma avaliação da proliferação celular, pois essa metodologia se baseia na coloração de ácidos nucleicos dessas células, portanto, a intensidade da coloração é proporcional a quantidade de células presentes no poço (BONNEKOH et al., 1989; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

Após serem utilizadas para a determinação de viabilidade celular pelo método do vermelho neutro, as células (mantidas fixadas na placa de cultura devido à solução de extração do vermelho neutro) foram coradas com 100 µL/poço do cristal violeta (0,25 mg/mL em água) (Sigma-aldrich). A coloração foi realizada após retirada da solução de extração e lavagem dos poços com água ultrapura. Após 20 minutos, a solução de cristal violeta foi retirada, a placa foi lavada duas vezes com água ultrapura e o corante foi eluído com ácido acético (Merck) 33% (v/v). A placa foi agitada para a homogeneização e a absorbância foi mensurada em leitor de microplacas (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, United States), no comprimento de onda de 570 nm.

3.5 ANÁLISE DE MORTE CELULAR

O ensaio de morte celular permite a quantificação de células viáveis e mortas (apoptose ou necrose) através da marcação dessas com anexina V e 7-AAD. A Anexina V tem afinidade por fosfatidilserina presente na face intracelular da membrana, e essa é externalizada quando a célula está em apoptose, possibilitando a marcação. O 7-AAD por ser intercalante de DNA, marca as células com membrana plasmática rompida. Dessa forma, através da marcação é possível identificar células em processos de necrose (HINGORANI et al., 2011).

As células B16-F10 e CHL-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt) em um volume total de 1,6 mL de meio de cultura DMEM completo com 12000 células/poço e 40000 células/poço, respectivamente. Após 24 horas as células foram tratadas com os polissacarídeos (nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL) por 72 horas. Os poços controle de apoptose receberam 10 mM de camptotecina 24 horas antes do final do tempo de tratamento. Para a finalização

do experimento, o meio presente nos poços foi transferido para tubos de citometria e as células, após serem desaderidas com EDTA (Merck) 2 mM em PBS por 5 minutos, foram adicionadas juntamente com seus respectivos meios de cultura. Os tubos foram mantidos em banho de gelo pelas etapas posteriores. As células foram centrifugadas, lavadas com PBS e marcadas com 2,5 µL de anexina V e 5 µL de 7-AAD (BD biosciences). Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente no escuro, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação às células, sendo estas posteriormente homogeneizadas e analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (Bencton, Dickinson and Company, BD).

3.6 ANÁLISE DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA

A capacidade de formação de colônias foi analisada pelo ensaio de formação de colônias publicado por Franken e colaboradores (2006). Esse ensaio avalia a capacidade de uma única célula proliferar formando clones ao seu redor de forma bidimensional.

Para avaliar a capacidade de formação de colônias, as células de melanoma murino e humano foram plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt) em baixa confluência (400 células/poço) de forma que aderissem na placa distantes uma das outras e, em seguida, foram expostas aos polissacarídeos (100 µg/mL) durante 72 horas (células murinas B16-F10) ou 120 horas (células humanas CHL-1) (FRANKEN et al., 2006). Após o período de tratamento, o meio de cultura foi removido e as colônias formadas foram fixadas (etanol:água:ácido acético 50:49:1 v/v), lavadas uma vez com água ultrapura e coradas com 100 µL/poço do cristal violeta (Sigma-aldrich) (0,25 mg/mL) por 30 minutos. A solução foi retirada, a placa foi lavada duas vezes com água ultrapura e secas ao ar. As colônias foram fotografadas e analisadas quanto ao número e à área média das colônias (área/número) utilizando o *software* Fiji ImageJ (SCHINDELIN et al., 2019).

3.7 ANÁLISE DA MORFOLOGIA

Para avaliar se os tratamentos, mesmo em concentração não citotóxica (100 µg/mL), seriam capazes de alterar a estrutura morfológica das células, estas foram observadas em microscopia de fluorescência após marcação fluorescente de seus núcleos e citoesqueleto de actina com DAPI (Thermo Fischer Scientific) e com ActinRed (Invitrogen), respectivamente. As imagens obtidas das células tratadas foram comparadas com as do grupo controle.

As células foram plaqueadas em 400 µL de meio de cultura DMEM com 10% de SFB em placas de 24 poços (Sarstedt) sobre lamínulas de vidro de 15 mm de diâmetro. Para a linhagem B16-F10 foram plaqueadas 1900 células/poço e para CHL-1 8490 células. A placa foi incubada em atmosfera úmida a 37°C e com 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com os polissacarídeos na concentração de 100 µg/mL e voltaram a ser incubadas por mais 72 horas. Passado o tempo de tratamento, o meio de cultura foi removido, as células nas lamínulas foram fixadas com 2% de paraformaldeído (PFA) (E.M.S.) diluído em tampão fosfato-salino (do inglês, PBS) por 30 minutos e em seguida foram lavadas uma vez com PBS e incubadas por 30 minutos com solução de marcação contendo ActinRed e DAPI (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). Para a montagem das lâminas, as lamínulas foram retiradas do fundo dos poços da placa, lavadas com PBS e montadas em lâminas de vidro com 10 µL de fluormount-G (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência através do microscópio confocal (Nikon).

3.8 ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR

Para esse ensaio foram utilizados dois desenhos experimentais. O primeiro consistiu no pré-tratamento das células com as pectinas e posterior plaqueamento em placa revestida com matrigel® (Gibco, Thermo Fischer Scientific). Com esse desenho, objetivou-se avaliar se os tratamentos atuavam

modulando diretamente as células de forma a modificar sua adesão. As células B16-F10 e CHL-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt) (12.000 células B16-F10/poço e 45.000 células CHL-1/poço) e tratadas com 100 µg/mL das pectinas, incubadas por 72 horas à 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente as células foram soltas com EDTA (Merck) e plaqueadas (2.400 células /poço para ambas linhagens), em quadruplicatas, em placa de 96 poços com os poços previamente revestidos com 50 µl matrigel® (20 µg/mL). Após 2 horas e 30 minutos na incubadora, os poços foram lavados com PBS a 37°C e as células aderidas foram fixadas com 100 µl de uma solução contendo álcool etílico, água ultrapura e ácido acético glacial (50:49:1) por 20 minutos. Após lavagem com água ultrapura as células aderidas foram coradas com 100 µl de cristal violeta (Sigma-aldrich) (0,25 mg/mL) por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de corante foi retirado por meio de lavagem com água ultrapura e corante do interior das células foi eluído com 100 µL de ácido acético (Merck) 33%. A absorbância foi mensurada em leitor de microplacas (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, United States) no comprimento de onda de 570 nm. O valor da absorbância está diretamente relacionado ao número de células presente no poço. Ou seja, quanto maior for a absorbância, maior é a quantidade de células aderidas na superfície do matrigel®.

O segundo desenho experimental objetivou avaliar se os polissacarídeos atuavam por meio da interação com a matriz extracelular, aqui representada pela matrigel®. Para tal, uma placa de 96 poços (Sarstedt) foi revestida com matrigel® e adicionada de 100 µg/mL de cada um dos compostos estudados, sendo posteriormente incubada por 72 horas. Após esse período, as células B16-F10 e CHL-1 não tratadas foram plaqueadas, em quadruplicatas técnicas (2.400 células/poço para ambas linhagens), e incubadas por 2 horas e 30 minutos à 37°C e 5% de CO₂. Os passos que se seguiram para a finalização do ensaio foram iguais aos realizados no primeiro desenho experimental.

3.9 ANÁLISE DE MIGRAÇÃO CELULAR

A influência dos polissacarídeos na migração celular das células de melanoma murino (B16-F10) foi avaliada pelo método do *scratch in vitro*, no qual uma monocamada de células pré-tratadas com as pectinas foi submetida a um risco (*scratch*) promovendo uma abertura nesta. A monocamada foi então tratada com as pectinas e o espaço aberto foi avaliado ao longo do tempo para inferir sobre a velocidade de migração celular para o espaço vazio da placa (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

As células B16-F10 foram soltas das garrafas de cultura com EDTA (Merck) 2 mM e plaqueadas em placas de quatro poços (35 mm de diâmetro) com fundo de vidro (Greiner Bio-one) numa densidade de 1750 células/poço em 500 uL de meio de cultura DMEM com 10% de SFB, sendo incubadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂ até formar uma monocamada. Posteriormente as células foram tratadas com os polissacarídeos na concentração de 100 µg/mL. O grupo controle, por sua vez, não recebeu nenhum tratamento, apenas o meio de cultura DMEM sem soro (veículo em que os tratamentos foram diluídos). O período de tratamento foi de 72 horas. O meio de cultura foi então descartado, a monocamada de células foi lavada com meio sem soro a 37°C e foi adicionado em cada poço 250 µL de meio com mitomicina C (Sigma-aldrich) a 10 µg/mL. Após 2h de incubação com mitomicina, foi feito o risco na monocamada com o auxílio de uma ponteira de 10 µL. Em seguida, foi feita uma lavagem na monocamada com meio sem SFB a 37°C para retirar os debris celulares. Tendo então uma área livre de células em cada poço, foi adicionado meio DMEM sem SFB com os polissacarídeos (100 µg/mL) e levadas para obter imagem no microscópio de varredura a laser confocal (Nikon) até que as células migrassem de forma que houvesse o fechamento da área livre de todos os grupos. Tal período teve duração de 16 horas. As imagens obtidas foram analisadas no programa *T scratch* (GEBÄCK. *et al.*, 2009) comparando o tempo de fechamento das áreas livres de células dos grupos tratados com o grupo controle.

3.10 ANÁLISE DA CAPACIDADE INVASIVA DAS CÉLULAS

Para avaliar a capacidade de invasão após tratamento com as pectinas, as células foram submetidas ao ensaio de invasão em insertos *transwell* contendo matrigel®. O método busca simular o processo de invasão das células tumorais. As células são induzidas através de um gradiente quimioatrativo (gerado pelo SFB) a passar para o lado oposto do inserto. Para alcançar o meio com soro as células precisam degradar a matriz presente, migrar e ultrapassar a membrana porosa e aderir no lado oposto ao qual foram plaqueadas (BROOKS et al., 2003).

As células foram plaqueadas (B16-F10 40 mil células/poço e CHL-1 20 mil células/poço) em meio sem SFB em insertos do tipo *transwell* (Greiner Bio-One) com membranas de policarbonato com poros de 8 µm, revestidos com matrigel® (2,6 mg/mL), juntamente com o tratamento, em placas de 24 poços (Sarstedt). Nos poços das placas de 24 poços, ou seja, na parte externa dos insertos, foi adicionado meio de cultura DMEM com 10% de SFB para gerar o gradiente quimioatrativo. Após a incubação, foi retirado o meio dos poços e dos insertos e as membranas foram fixadas com 2% de paraformaldeído (PFA) (E.M.S.) em PSB por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foram lavadas uma vez com PBS e marcadas com DAPI (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific), diluído em PBS com saponina 0,01%, por 30 minutos a temperatura ambiente. Essa marcação permitiu visualizar, em azul, os núcleos celulares que atravessaram o inserto. O interior dos insertos foi limpo com cotonetes molhados com PBS para remoção das células que não atravessaram a matrigel®. A membrana foi retirada, lavada e montada em uma lâmina com 10 µL de Fluormount-G (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). As lâminas foram então analisadas em scanner de lâminas Axio Imager Z2, no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência - CTAF. Em seguida foi feita a contagem das células que invadiram a matrigel® e analisado o número de núcleos por área, utilizando os programas VSViewer e Fiji ImageJ (SCHINDELIN et al., 2019).

3.11 REPETIÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios de citotoxicidade e adesão foram feitos em quadruplicatas técnicas, os demais ensaios em duplicatas técnicas. Foram realizados no mínimo três experimentos independentes para cada ensaio e os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software®, Inc.) aplicando testes estatísticos de acordo com as especificidades de cada experimento e teste de outliers. Em todos os casos os grupos tratados foram considerados estatisticamente diferentes do controle quando $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

A avaliação da viabilidade e proliferação celular é de extrema importância para moléculas prospectadas como possíveis tratamentos. Há um tempo, as terapias antitumorais concentravam-se em agentes que atuavam via citotoxicidade, tais quais a quimioterapia (SCHIRRMACHER et al., 2018). Hoje em dia sabe-se que compostos não citotóxicos, mas que atuem de certa forma inibindo a progressão tumoral são ainda mais interessantes no tratamento de câncer, ou ainda compostos que atuem de forma específica induzindo citotoxicidade apenas em células tumorais (KHAN et al., 2019; MILHORINI et al., 2018). A ação antitumoral independente de citotoxicidade ou a citotoxicidade seletiva a células tumorais, é interessante do ponto de vista farmacológico uma vez que compostos antitumorais com baixa ou nenhuma toxicidade a células normais e maior eficácia podem reduzir os efeitos adversos de terapias antitumorais (BELLAN *et al.*, 2020; BISCAIA *et al.*, 2017) ou mesmo apresentar efeito antitumoral intrínseco (GONÇALVES et al., 2020; GONÇALVES et al., 2021).

A citotoxicidade de um composto depende muito da sua origem e concentração. Segundo o protocolo ICCVAM, (2016) a citotoxicidade deve ser avaliada na maior concentração solúvel da amostra, seguida de mais sete diluições seriadas. Nesse sentido, para os ensaios de viabilidade e densidade celular, escolhemos uma das linhagens não tumorais (BALB/3T3) e testamos todas essas concentrações preconizadas (0,0001 a 1000 µg/mL) em um período de 72 horas de tratamento. Tendo em vista os resultados, para as demais linhagens celulares utilizamos as quatro maiores concentrações (1, 10, 100 e 1000 µg/mL) e mesmo tempo de tratamento.

Os polissacarídeos (AGI-78kDa, AGI-12kDa e HG-143kDa), nas concentrações entre 0,0001 e 1000 µg/mL, testados em fibroblastos murinos não

tumorais (BALB/3T3), não alteraram nem a viabilidade nem a proliferação dessas células. Fibroblastos humanos não tumorais (CCD-1059Sk), quando tratados com as quatro maiores concentrações das três moléculas, permaneceram com viabilidade igual às células do grupo controle, e um aumento de 36,4% na retenção do corante vermelho neutro foi observado nas células tratadas com a maior concentração de AGI-12kDa (FIGURA 16a).

Quando tratadas com 1000 µg/mL de AGI-78kDa e AGI-12kDa, houve redução na capacidade proliferativa das células de melanoma murino (25% e 53,7%, respectivamente) e humano (91,3% e 58,6%, respectivamente) (FIGURA 16b). Os poços das células tratadas apresentaram menor quantidade de células do que o grupo controle. Nessa mesma concentração, a AGI-12kDa reduziu em 22,8% a retenção de vermelho neutro nas células de melanoma murino enquanto a AGI-78kDa reduziu em 83% a retenção de vermelho neutro nas células de melanoma humano (FIGURA 16b). Interessantemente, tais atividades não foram observadas nos fibroblastos não tumorais murino e humano (BALB/3T3 e CHL-1), sugerindo que ambas arabinogalactanas da ameixa seca apresentam efeito antiproliferativo seletivo para as células tumorais. As células de melanoma, tanto murino quanto humano, tratadas com HG-143kDa não apresentaram nenhuma alteração na viabilidade nem na proliferação (FIGURA 16 a e b).

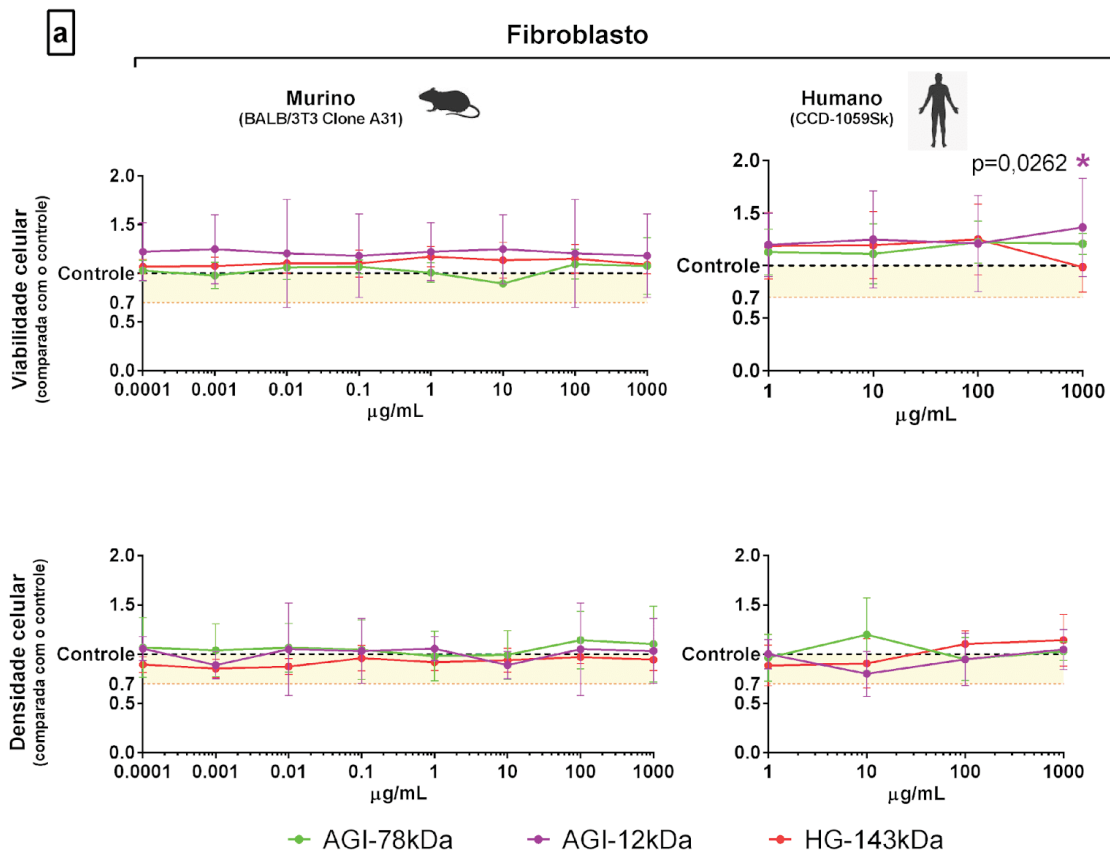
Tais resultados apresentados estão de acordo com dados de literatura de pectinas, diversos estudos mostram que em concentrações maiores, algumas pectinas de frutos testadas em linhagens tumorais apresentaram efeitos citotóxicos, como da jabuticaba (NASCIMENTO et al., 2020), do mamão (PRADO et al., 2017), da melancia (DAMMAK et al., 2019) e pectinas cítricas comerciais (PRADO et al., 2019; HOSSEIN et al., 2013). Em alguns casos, quando além de células tumorais, usaram células não tumorais como parâmetro comparativo, esse efeito também ocorreu de forma seletiva à linhagem tumoral (AMARAL et al., 2019; LIN et al., 2016). No trabalho de Amaral e colaboradores (2019) uma fração rica em pectinas extraída da polpa da gabioba, composta de homogalacturonanas e ramnogalacturonanas com cadeias laterais de arabinose e

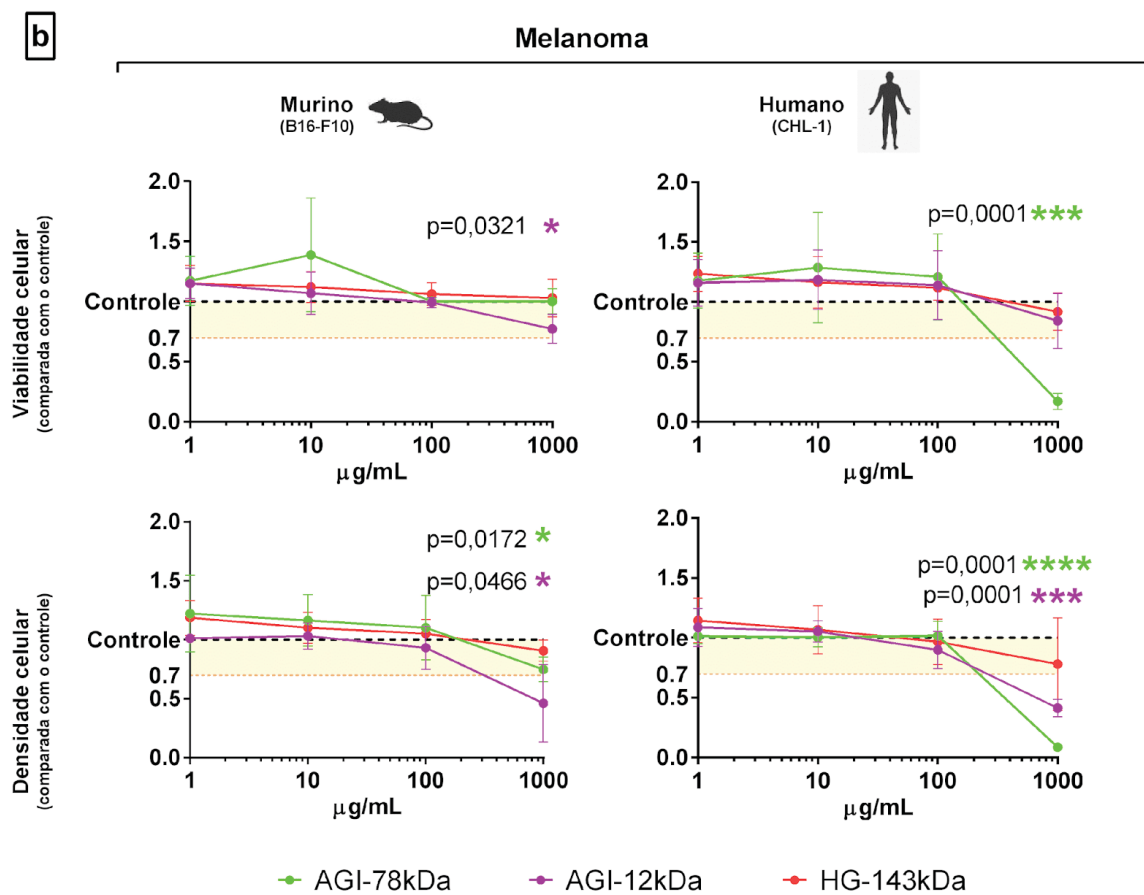
galactose, apresentou efeito citotóxico em células de glioblastoma humano (U251-MG) e não foi citotóxica a fibroblastos não tumorais (NIH-3T3).

Os resultados distintos encontrados provavelmente são decorrentes das diferenças presentes entre as moléculas testadas, principalmente entre as AGIs e HG. As arabinogalactanas AGI-78kDa e AGI-12kDa possuem estruturas químicas finas muito semelhantes e diferem na sua massa molar (ANEXO 1). Em contrapartida, a homogalacturonana HG-143kDa apresenta estrutura química fina e massa molar diferente daquela observada para as arabinogalactanas (ABBOUD et al., 2019). Diferenças estruturais de pectinas (e polissacarídeos de maneira geral) em relação à massa, composição e proporção monossacarídica, apesar de pequenas, podem alterar as propriedades biológicas das moléculas (CARLOTTO et al., 2020; CHENG et al., 2011; DING; CUI, 2020; PRADO et al., 2019; WU et al., 2020; ZAITSEVA et al., 2020). Além disso, já existem estudos mostrando que em relação a ação antitumoral, pectinas ricas em arabinose e galactose apresentam maiores efeitos antitumorais do que aquelas que não apresentam essa composição (AMARAL et al., 2019; MAXWELL et al., 2016).

Para as menores concentrações testadas das pectinas, que não se mostraram citotóxicas nem mesmo em linhagens tumorais, uma possível ação antitumoral não deve ser descartada, pois podem atuar em mecanismos moleculares interferindo em processos relacionados com o perfil metastático e inibir a progressão tumoral independente da ação citotóxica. No caso das AGIs da ameixa seca, por apresentarem certas características estruturais, as concentrações menores ainda são interessantes de serem investigadas. Segundo a literatura, especificidades da molécula, como a presença de galactose e arabinose, tornam-as possíveis ligantes de galectinas (PRADO et al., 2019; JAYARAM; KAPOOR; DHARMESH, 2015) e, por meio dessa interação, potenciais moduladores de várias características tumorais (*halmarks* do câncer) (GIROTTI et al., 2020).

FIGURA 16. ANÁLISE DE VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR.





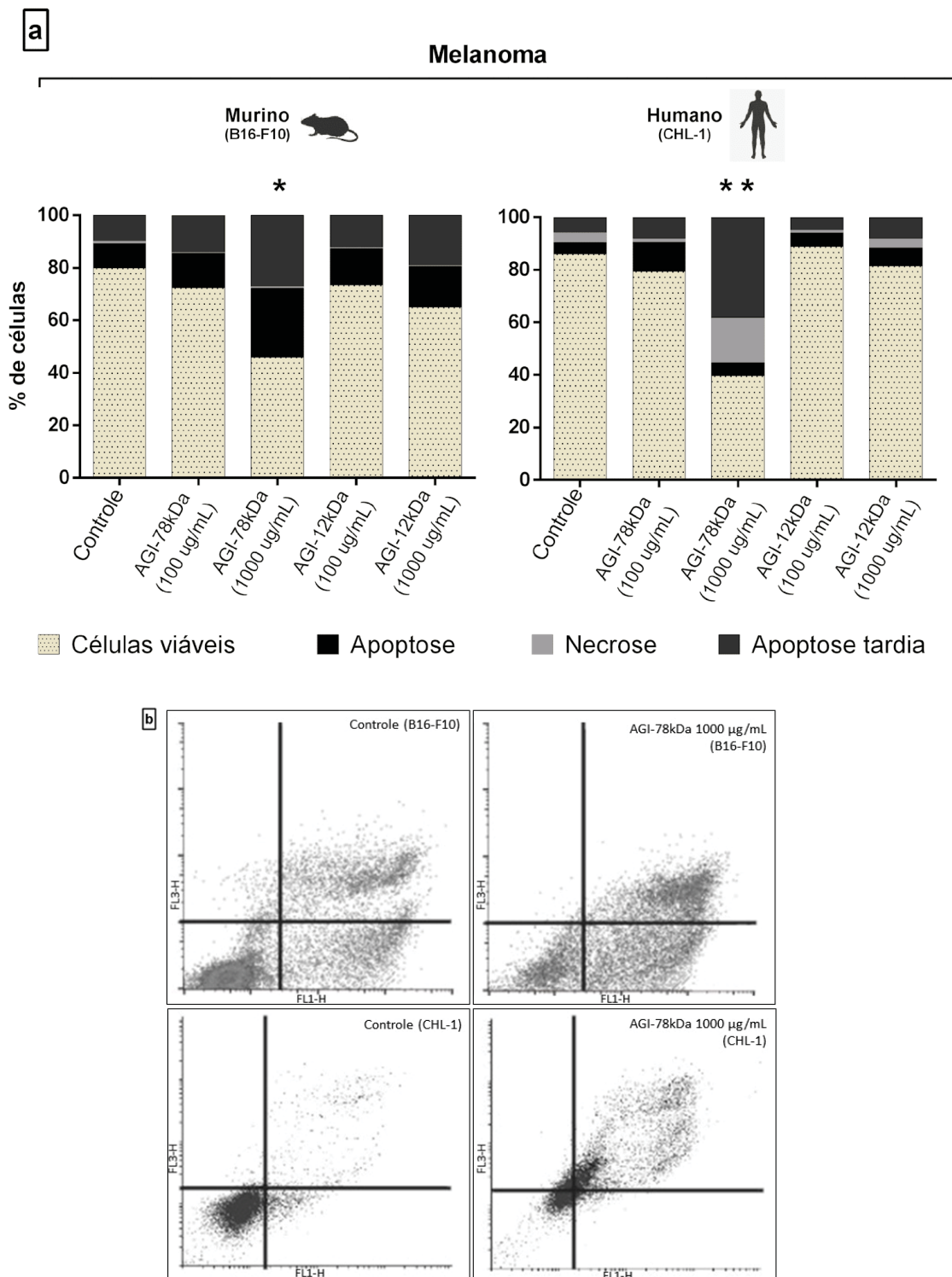
a) Células não tumorais - fibroblastos. b) Células tumorais – melanoma. As células foram expostas aos polissacarídeos AGI-78kDa, AGI-12kDa e HG-143kDa por 72 horas. A incorporação e retenção do vermelho neutro (viabilidade celular) foi determinada por análise colorimétrica assim como a coloração por cristal violeta (densidade celular). Os gráficos mostram dados normalizados em relação ao controle (linha tracejada preta). A análise estatística foi feita comparando as médias dos grupos tratados com o grupo controle pelo teste t não pareado com correção de Welch's. O resultado foi considerado significativo quando o $p < 0,05$.

4.2 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR

A indução de apoptose por altas concentrações (1000 µg/mL) de pectinas da beterraba em células de câncer de cólon (MAXWELL et al., 2016), e do quiabo em câncer de mama e melanoma (VAYSSADE et al., 2009) já foi relatada. Uma vez que a maior concentração testada (1000 µg/mL) das pectinas AGI-78kDa e AGI-12kDa reduziu tanto a densidade das células de melanoma humano, como murino, foi investigado se esses polissacarídeos, nessa concentração, estariam induzindo morte celular. O tratamento das células de melanoma (B16-F10 e

CHL-1) com 1000 µg/mL de AGI-78kDa provocou morte celular FIGURA 17). Células de melanoma murino (B16-F10) e humano (CHL-1) não tratadas com o polissacarídeo mostraram 80% e 86% de viabilidade (células não marcadas com Anexina V nem com 7-AAD), respectivamente (FIGURA 17). No grupo tratado com AGI-78kDa (1000 µg/mL), esse percentual foi reduzido para 46,5% e 40%, para as células B16-F10 e CHL-1, respectivamente. Em contrapartida, 54% das células B16-F10 e 60% das células CHL-1 tratadas estavam marcadas com Anexina V e/ou 7-AAD (FIGURA 17), indicando que o polissacarídeo induziu a morte celular. Na menor concentração testada de AGI-78kDa (100 µg/mL), assim como nas duas concentrações testadas de AGI-12kDa (100 e 1000 µg/mL), mais de 65% do total de células analisadas, estavam sem marcação com anexina V e 7-AAD, indicando que não houve perda de viabilidade com esses tratamentos nessas concentrações.

FIGURA 17. ANÁLISE DE MORTE CELULAR.



a) Os gráficos mostram a porcentagem média de células de três experimentos independentes. As células (B16-F10 e CHL-1) foram expostas a 100 µg/mL ou 1000 µg/mL dos polissacarídeos AGI-78kDa e AGI-12kDa por 72 horas. Após o tratamento, foram marcadas com anexina V e 7-AAD e os dados foram adquiridos por citometria de fluxo. A análise estatística foi feita

comparando as médias dos grupos tratados com o grupo controle através do teste T não pareado e o resultado foi considerado significativo quando o $p < 0,05$. * $p=0,0234$ para B16-F10 e ** $p=0,0037$ para CHL-1. b) A figura mostra os dados da citometria de fluxo, controle e AGI-78kDa de ambas linhagens testadas.

Arabinogalactanas extraídas de *Decalepis hamiltonii*, com composição monossacarídica semelhante à da AGI-78kDa (Ara:Gal:Rha 66:27:7), na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, induziram apoptose em células de melanoma B16-F10 (VENKATESHAI AH; ESWARAI AH, 2017). Em modelo *in vivo*, de carcinoma pulmonar, camundongos tratados também com arabinogalactanas, porém extraídas do caule de *Tinospora cordifolia*, uma planta da Índia, apresentaram redução do tumor decorrente da maior taxa de apoptose nas células tumorais, comparado aos que não receberam tratamento (MOHAN; KOUL, 2018). Porém, percebe-se que o efeito de morte celular provocado por arabinogalactanas nem sempre é relacionado apenas à composição monossacarídica. As arabinogalactanas AGI-78kDa e AGI-12kDa, ambas compostas por arabinose, galactose, ramnose e ácido galacturônico, tiveram efeitos diferentes na indução de morte das células de melanoma. Como a massa molar desses polímeros é diferente (ANEXO 1), possivelmente esta característica possa estar associada aos efeitos observados. Um trabalho recente mostra a influência da massa molar na bioatividade de pectinas, como a pectina cítrica, modificada por temperatura e separada por ultracentrifugação, que em diferentes massas apresenta diferença no potencial antitumoral. A fração com massa menor que 30 kDa foi mais bioativa na inibição da proliferação, migração e adesão de células câncer de cólon e próstata. Característica como menor massa está associada com maior atividade de PCM e os efeitos antitumorais eram potencializados por pectinas com tipo AGI menos ramificadas (PRADO et al., 2019). Já no caso de arabinogalactanas extraída de serragem de conífera (*Juniperus convallium*), as diferenças tanto na massa molecular quanto na proporção monossacarídica interferiram na atividade (LI et al., 2019). Porém para AGIs da ameixa seca, o efeito de indução de morte em células de melanoma é provocado pela molécula com maior massa.

Considerando que ambas as células testadas são classificadas como melanoma triplo selvagem (AKBANI et al., 2015) e, portanto, são modelos de estudo dos melanomas metastáticos mais maligno e refratários às terapias atualmente disponíveis, destaca-se o potencial terapêutico de AGI-78kDa para ser utilizado nesse tipo de melanoma, uma vez que mostrou-se a mais ativa e seletiva dentre as moléculas testadas.

Diante dos resultados expostos, temos que ambas as arabinogalactanas da ameixa, na concentração de (1000 µg/mL), diminuíram a proliferação celular das células de melanoma (murina e humana) (FIGURA 16) e que, no caso da AGI-78kDa, esse efeito é ocasionado pela indução de morte celular (FIGURA 17). Com o intuito de investigar as ações dos polissacarídeos em parâmetros celulares relacionados à malignidade tumoral, a concentração de 100 µg/mL, que não foi citotóxica, foi selecionada.

4.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA

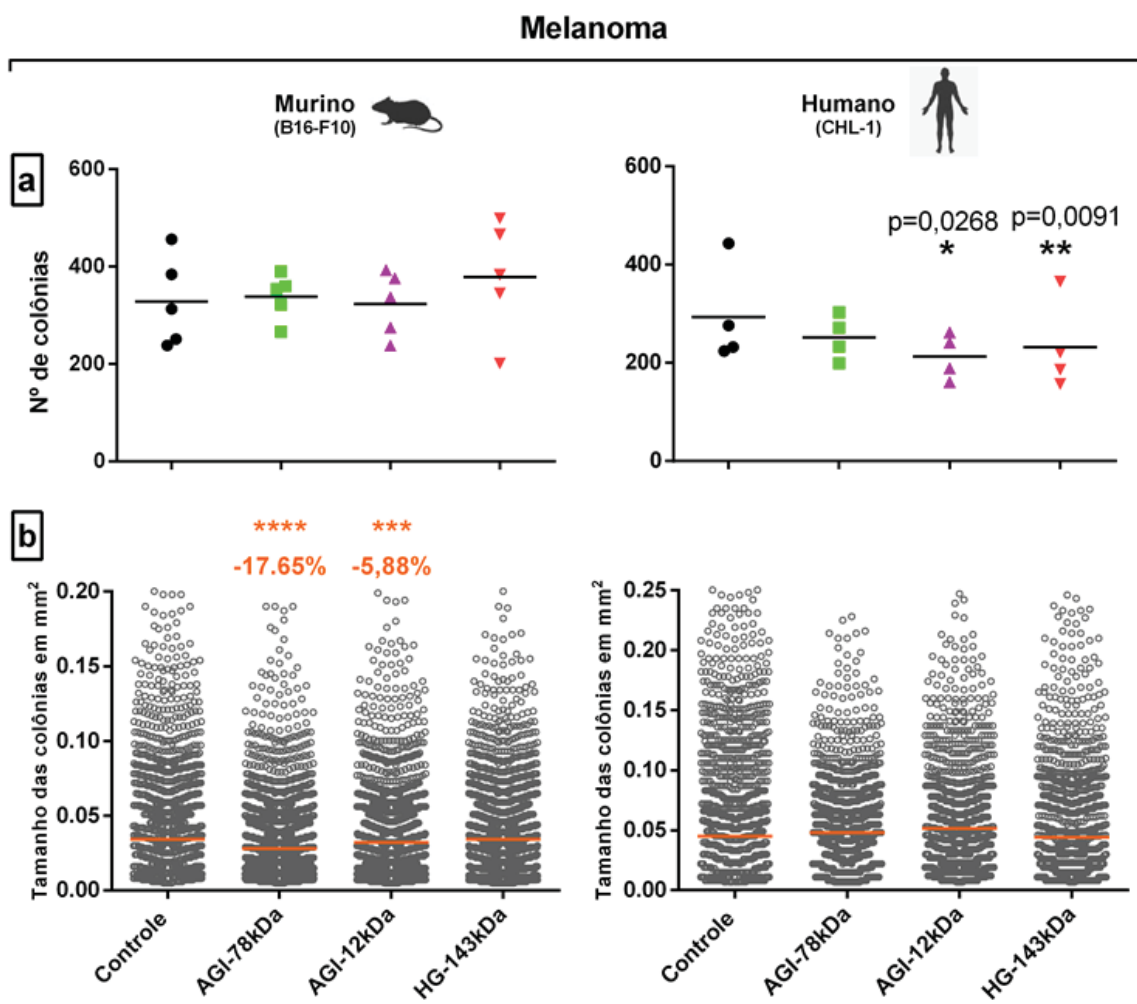
A análise do perfil clonogênico mostra a capacidade de uma única célula proliferar e formar uma colônia (MENYHÁRT et al., 2016). Esse experimento pode ser associado, em partes, com o que acontece no processo da metástase quando a célula tumoral, ao evadir da corrente sanguínea, consegue se proliferar num tecido secundário, distante do seu local de origem e, portanto, de células semelhantes a ela.

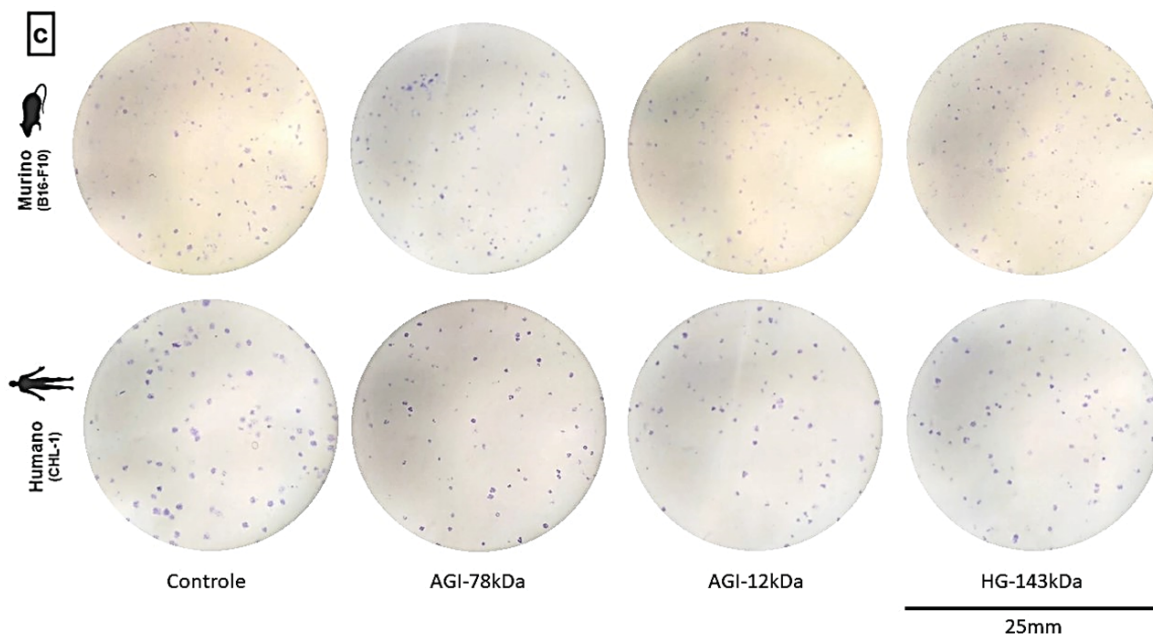
Ao comparar a quantidade de colônias formadas a partir das células tratadas com 100 µg/mL dos diferentes polissacarídeos com a quantidade de colônias formadas a partir das células não tratadas (grupo controle) observa-se que as células de melanoma humano (CHL-1) tratadas com AGI-12kDa e HG-143kDa deram origem a um número significativamente menor de colônias em relação ao controle) (FIGURA 18a). Em contrapartida, AGI-78kDa não provocou redução estatisticamente significativa no número de colônias formadas pelas células de melanoma humano. Para as células de melanoma murino (B16-F10),

nenhum dos polissacarídeos reduziu, de forma estatisticamente significativa, a capacidade clonogênica das células (FIGURA 18a). A literatura relata arabinogalactanas da romã (*Punica granatum*), porém do tipo II, cuja estrutura química fina é substancialmente diferente das testadas aqui e cuja massa molar é de 110 kDa, reduzindo a capacidade clonogênica de células de melanoma humano e murino (A375 e B16-F10) quando tratadas com 100 e 200 µg/mL de tal polissacarídeo (VARGHESE et al., 2017).

O tamanho das colônias formadas pelas células de melanoma murino (B16-F10) foi afetado quando essas receberam tratamento AGI-78kDa e AGI-12kDa. O tamanho das colônias foi estatisticamente menor do que aquelas formadas por células de melanoma não tratadas (FIGURA 18b). Como os polissacarídeos AGIs, na concentração de 100 µg/mL, não alteraram a proliferação celular, a diminuição da área das colônias formadas a partir de células tratadas com tais polissacarídeo pode refletir a diferença do crescimento de células isoladas, sinalização e adesão entre células (MENYHÁRT et al., 2016). Esses resultados corroboram com os encontrados na literatura de tratamentos com polissacarídeos que, apesar de não alterarem a proliferação das células quando cultivadas em alta densidade, comprometem a capacidade de formação de colônias quando essas células são cultivadas individualmente (OLIVEIRA et al., 2019). Compostos que alteram o perfil clonogênico são promissores, uma vez que podem atuar no tratamento e na prevenção da formação de metástases tumorais que, no caso de melanoma metastático, é o maior desafio.

FIGURA 18. ANÁLISE DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA DAS CÉLULAS.





a) Número de colônias. b) Tamanho das colônias. c) imagens das colônias. As células (B16-F10 e CHL-1) foram expostas 100 µg/mL dos polissacarídeos AGI-78kDa, AGI-12kDa e HG-143kDa por 72 horas. Após o tempo de tratamento, as colônias formadas foram fotografadas e analisadas no programa ImageJ (FIJI). A análise estatística do número de colônias foi realizada pelo teste t com correção de Welch's e do tamanho das colônias pelo teste Mann-Whitney e diferenças cujo $p < 0.05$ foram consideradas significativas. Os gráficos mostram a média (traço preto) de cinco experimentos independentes com células de melanoma murino e quatro experimentos independentes com células de melanoma humano. Já nos gráficos do tamanho das colônias a linha em laranja representa a mediana.

4.4 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

Mudanças morfológicas ocorrem com frequência nas células tumorais uma vez que essas apresentam grande plasticidade, o que lhes confere capacidade de adaptação e progressão tumoral (TADDEI et al., 2014). O estudo comparativo da morfologia das células tratadas com os polissacarídeos com aquelas não tratadas é interessante para que se possa identificar possíveis alterações relacionadas com o fenótipo metastático dessas células.

As células de melanoma murino (B16-F10) sem tratamento (grupo controle) apresentam morfologia bem característica (FIGURA 19), sendo que a maioria delas se encontram bem espalhadas, com a proporção citoplasma/núcleo elevada e, mesmo quando agrupadas, é possível definir o limite de cada célula.

Algumas das células visualizadas no grupo controle apresentam fibras de estresse bem evidentes, o que é esperado para uma célula em movimento. A superfície dessas células apresenta algumas regiões contendo protruções de membrana que possivelmente são invadopódios marcados com bastante intensidade. Podem ser observadas regiões pontuais de adesão célula-célula e espaços entre essas adesões. Nos pontos de adesão entre as células a marcação da actina é mais intensa, como esperado em regiões de adesão celular. Algumas poucas células apresentam regiões citoplasmáticas contendo alta concentração de actina (FIGURA 19). Os núcleos das células do grupo controle estão bem individualizados e, em sua maioria, com formato arredondado, podendo ser observado um núcleo em cada célula.

As células de melanoma murino tratadas com as pectinas (FIGURA 19), diferem em algumas características apontadas no grupo controle. As células que receberam tratamento AGI-78kDa apresentam regiões citoplasmáticas contendo alta concentração de filamentos de actina (destacadas com setas brancas na FIGURA 19). As células tratadas com AGI-12kDa estão mais espalhadas e com mais contato célula-célula. Nas células tratadas com HG-143kDa também apresentam diferenças na distribuição dos filamentos de actina. Observam-se menos fibras de estresse e os filamentos de actina estão mais concentrados nas bordas das células. As células tratadas com essa pectina apresentam espaços maiores entre as regiões de interação, reduzindo a área de contato célula-célula, e possuem a razão citoplasma/núcleo aparentemente menor do que as células do grupo controle.

As células de melanoma humano (CHL-1) sem tratamento (grupo controle) (FIGURA 20), apresentam formato irregular, com partes espalhadas e com filamentos de actina organizados em forma de redes bem distribuídas no citoplasma, com pontos de adesão marcados com um pouco mais intensidade. Nas bordas podem ser visualizados invadopódios. Quando aglomeradas não fica claro o limite de cada célula e os seus núcleos apresentam formato irregular.

Dentro de uma mesma célula pode-se observar mais de uma região marcada com DAPI, sugerindo a presença de micronúcleos.

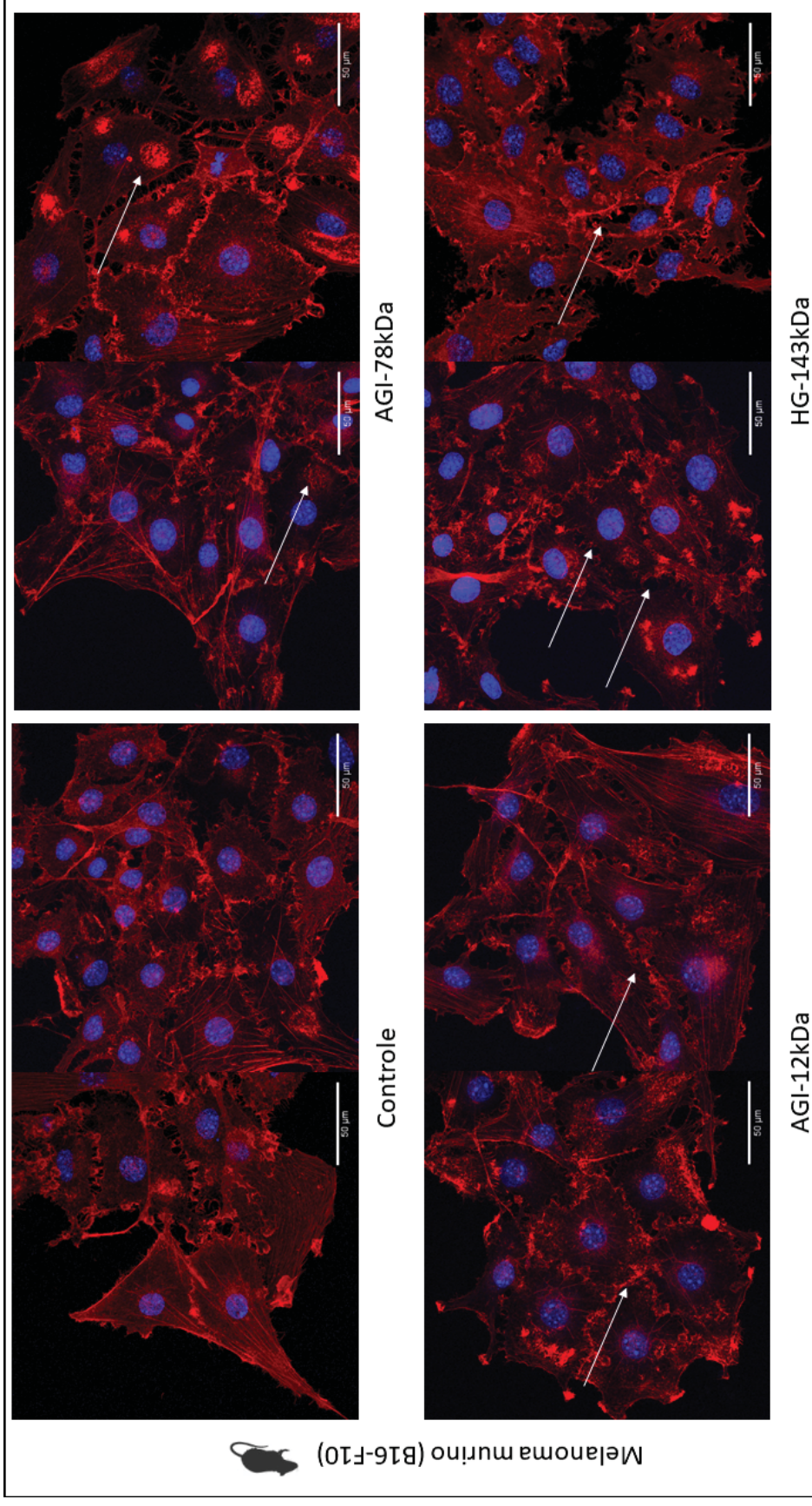
Quando as células de melanoma humano (CHL-1) foram tratadas com AGI-78kDa, elas aparentemente apresentaram marcação dos filamentos de actina menos intensa e localizada na região central próxima ao núcleo (FIGURA 20). Já as tratadas com AGI-12kDa aparentam ter mais fibras de estresse e menos invadopódios. Nas células tratadas com HG-143kDa podem ser observadas alterações morfológicas mais significativas. O tratamento influenciou no tamanho das células, as células estão maiores, mais espalhadas, apresentando razão citoplasma/núcleo maior do que aquela observada nas células do grupo controle (FIGURA 20). Além disso, nessas células CHL-1 tratadas com HG-143kDa, a distribuição dos filamentos de actina é mais reticular, com fibras de estresse distribuídas para diversas direções, sendo que nas bordas a marcação da actina é mais evidente. Por fim, os núcleos dessas células além de maiores parecem possuir formato mais regular.

As organizações de estruturas importantes para o processo de progressão tumoral como os lamelipódios, filopódios, fibras de estresse e junções de adesão célula-célula depende do remodelamento de filamentos de actina e, desta forma, é interessante avaliar se as pectinas testadas neste trabalho interferem no padrão de organização desses filamentos (ALBERTS *et al.*, 2017). A remodelação dos filamentos de actina interfere diretamente, por exemplo, na migração celular, que é uma das características fundamentais no processo de metástase. Redução na quantidade de fibras de estresse, diminuição do número de adesões focais e aumento na formação de filopódios permitem que as células tenham maior potencial migratório (LI; ABUARAB; SIVAPRASADARAO, 2016). Células de melanoma com capacidade migratória reduzida e, portanto, menos malignas, apresentam morfologias mais arredondadas, com mais junções célula-célula, maior número de lamelipódios e maior quantidade de fibras de estresse (formadas por actina-F polimerizada, reduz a capacidade de migração e o torna menos malignas (NAFFA, 2021). Aparentemente, quando há formação de

mais fibras de estresse, as células apresentam maior contração estática e menos motilidade (PELLEGRIN; MELLOR, 2007). Portanto, as alterações morfológicas encontradas nas células de melanoma tratadas com as pectinas da ameixa e do maracujá refletem um fenótipo de possíveis alterações na capacidade migratória dessas células.

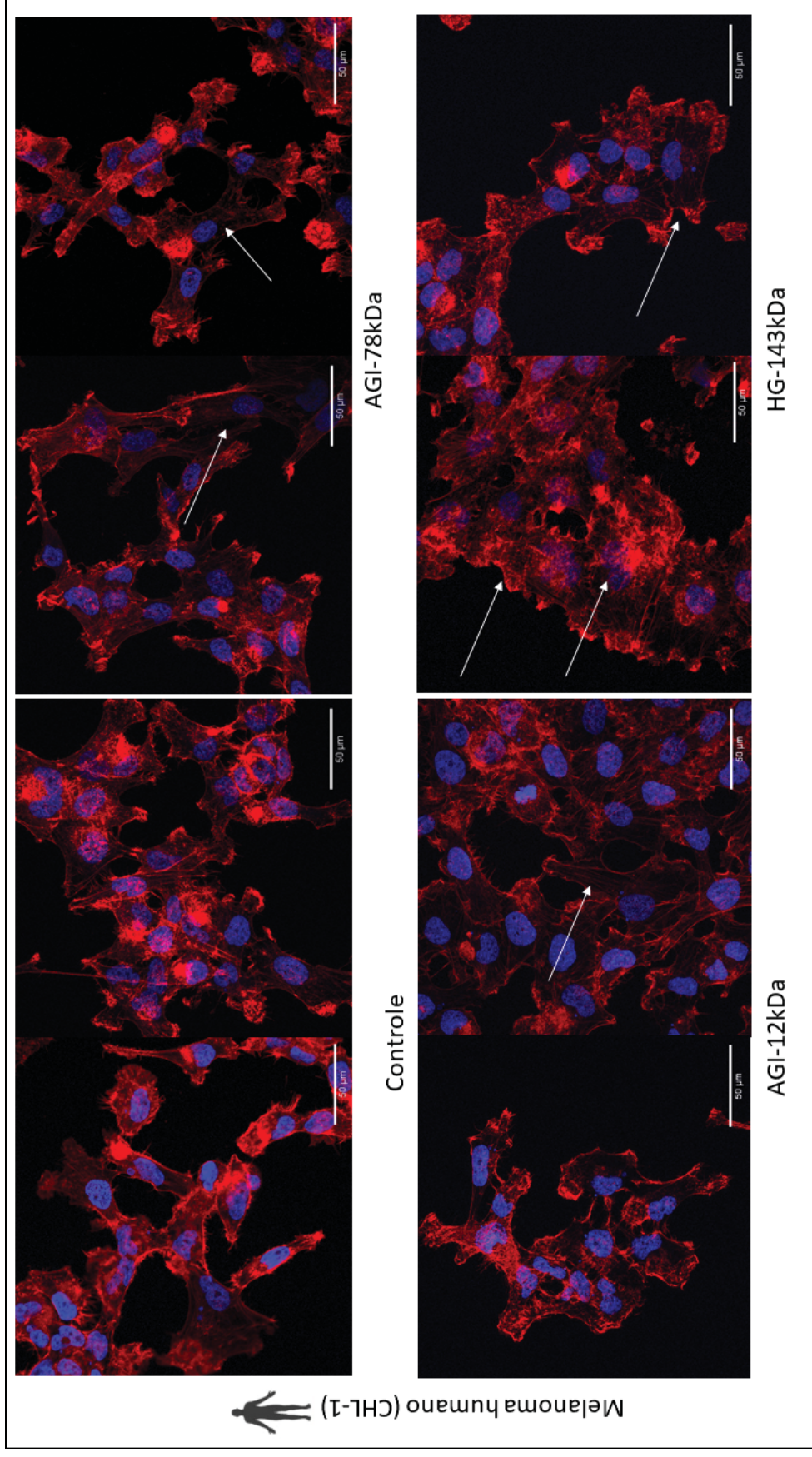
Os dados de literatura que mostram a influência de pectinas na morfologia de células de melanoma são escassos. Foi encontrada a descrição morfológica de células de melanoma tratadas com uma RGI de quiabo. Esse polissacarídeo, que possui cadeias laterais de galactose e com massa molar maior do que 100 kDa, alterou a morfologia de células de melanoma murino B16-F10 quando cultivadas por 48 horas na presença deste composto. As células apresentaram alteração de formato, de espaiadas para arredondadas, e diminuição de junções de adesão célula-célula. Entretanto, tal padrão morfológico é, possivelmente, consequência da indução de morte celular pelo tratamento das células com a RGI do quiabo (VAYSSADE et al., 2010), mas que não foi observada nessa pesquisa, pois a concentração testada não induz morte nas células.

FIGURA 19. MORFOLOGIA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16-F10).



Imagens obtidas através de microscopia confocal, na objetiva de 60x. As células foram expostas a 100 µg/mL dos polissacarídeos AGI-78kDa, AGI-12kDa e HG-143kDa por 72 horas. Os núcleos foram marcados com DAPI (em azul) e o citoesqueleto de actina com ActinRed (em vermelho). As setas brancas mostram as alterações morfológicas. A análise qualitativa foi feita observando as características de dez imagens de cada grupo, comparando o grupo controle com os grupos tratados.

FIGURA 20. MORFOLOGIA DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO (CHL-1).



Imagens obtidas através de microscopia confocal, na objetiva de 60x. As células foram expostas a 100 μg/mL dos polissacarídeos AGI-78kDa, AGI-12kDa e HG-143kDa por 72 horas. Os núcleos foram marcados com DAPI (em azul) e o citoesqueleto de actina com ActinRed (em vermelho). As setas brancas mostram as alterações morfológicas. A análise qualitativa foi feita observando as características de dez imagens de cada grupo, comparando o grupo controle com os grupos tratados.

4.5 AVALIAÇÃO DA ADESÃO DAS CÉLULAS

A adesão é uma das propriedades das células tumorais que sofrem alteração durante a progressão tumoral. Em melanoma a adesão das células influencia sinalização, motilidade e capacidade invasiva, as quais, por sua vez, propiciam o processo metastático. Mudanças nas proteínas de superfície celular alteram a capacidade adesiva das células e contribuem para esse processo (SMART; OLEKSAK; HARTSOUGH, 2020). As células de melanoma passam pela transição epitélio-mesenquimal, que é um dos fatores que levam estas células a sair do tecido epitelial e entrar no tecido conjuntivo adjacente. Dentre as alterações que ocorrem nesta transição destacam-se as alterações nas moléculas de adesão, a reorganização das proteínas do citoesqueleto e a produção de enzimas para degradação da matriz extracelular (HODOROGEA et al., 2019). Essas características permitem à célula migrar e invadir outros tecidos.

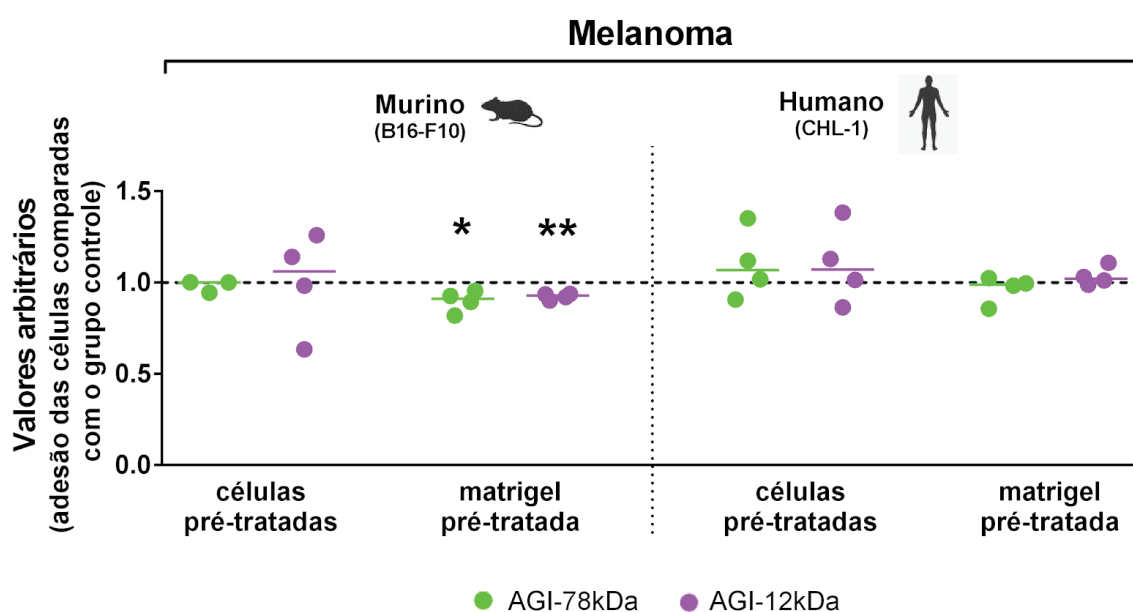
A análise mostra que nenhuma das AGIs (100 µg/mL) alterou a adesão das células de melanoma humano em nenhum dos desenhos experimentais. As células tratadas, assim como a matrigel® tratada apresentam resultados similares aos do grupo controle que não receberam tratamento. Em melanoma murino, tanto a AGI-78kDa, como a AGI-12kDa reduziram a capacidade adesiva das células à matrigel® pré-tratada (FIGURA 21). Porém, quando o pré-tratamento foi direcionado apenas as células não houve alteração.

Algumas pectinas são capazes de reduzir a adesão de células tumorais, como aquela extraída da espécie vegetal indiana *Decalepis hamiltonii*, uma arabinogalactana composta por ramnose (7): arabinose (66): galactose (27). Quando testada na concentração de 100 µg/mL, tal arabinogalactana reduziu em 50% a adesão das células de melanoma B16-F10 na matrigel® (VENKATESHAIAH; ESWARAI AH, 2017). Pectinas cítricas modificadas diminuíram as propriedades adesivas das células de câncer de pâncreas (Panc-1) (SCHÖLL-NADERER et al., 2020) e a combinação dessas mesmas pectinas com outros medicamentos (BreastDefend e ProstaCaid) reduziram a adesão de células

de câncer de próstata e mama (JIANG; ELIAZ; SLIVA, 2013). Em outro estudo, a pectina cítrica modificada, quando combinada com paclitaxel, um quimioterápico, diminuiu 39% da adesão em células de câncer de ovário humano (HOSSEIN et al., 2013).

As pectinas da ameixa seca, AGI-78kDa e AGI-12kDa, alteraram a adesão apenas de células de melanoma murino. Porém, a metástase é um processo multifatorial (CLARK; VIGNJEVIC, 2015; MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016) e a alteração da capacidade adesiva das células é apenas uma das formas de atuação de pectinas em células tumorais, mas não a única que está relacionada com o processo de inibição da metástase tumoral.

FIGURA 21. ANÁLISE DE ADESÃO DAS CÉLULAS.



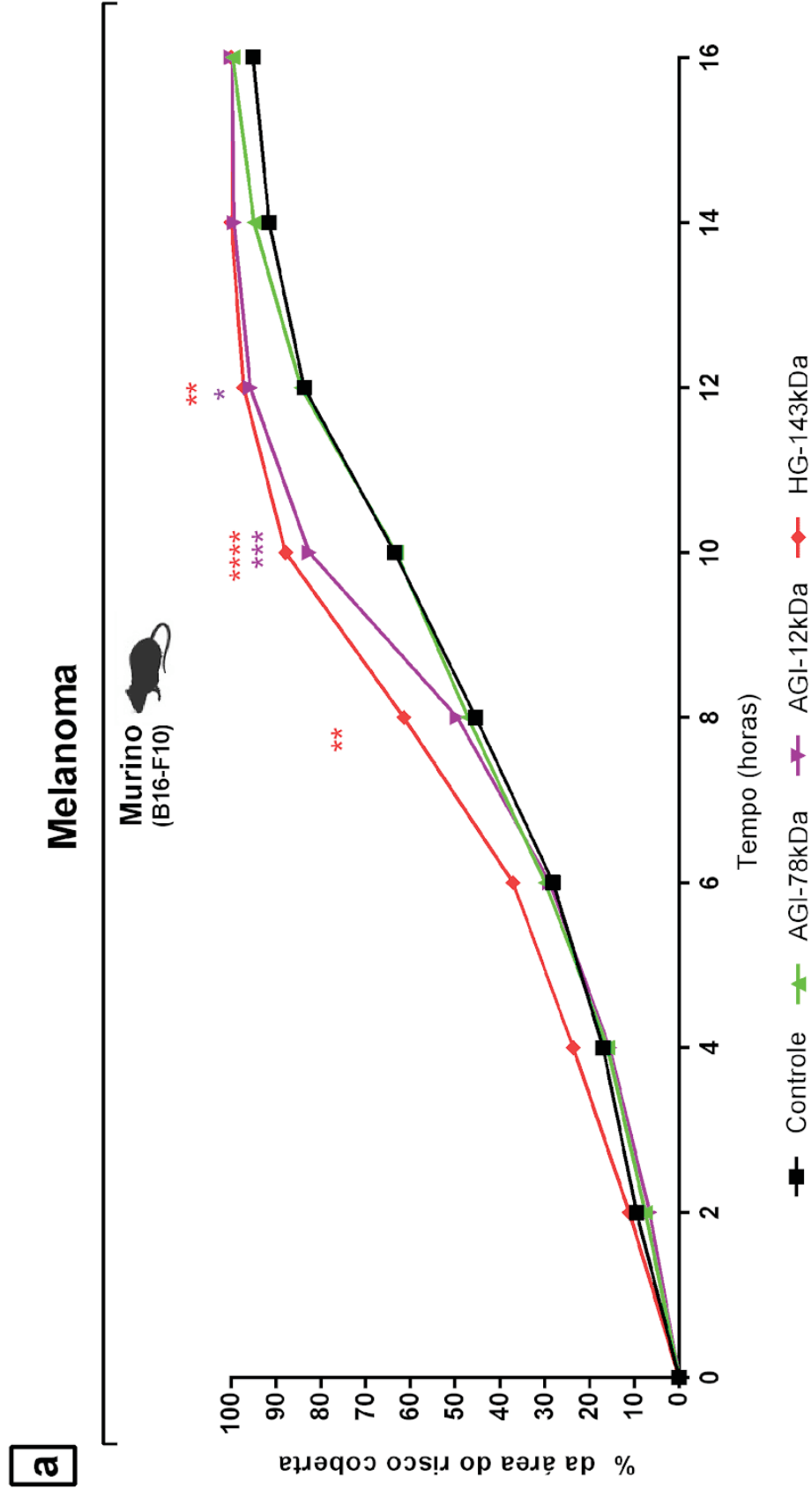
Células pré-tratadas e matrigel® pré-tratada. As células ou a matrigel foram expostos a 100 µg/mL dos polissacarídeos AGI-78kDa e AGI-12kDa por 72 horas. As células foram fixadas, coradas com cristal violeta, o corante foi eluído e a absorbância foi analisada em 570 nm. A análise estatística através do teste t com correção de Welch' mostrou diferença entre as medianas dos valores de absorbância da matrigel® pré-tratada em relação ao grupo controle nas células B16-F10. Os gráficos mostram dados normalizados, os traços representam a média de quatro experimentos independentes e os grupos controle estão representados pelas linhas tracejadas em preto.

4.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS

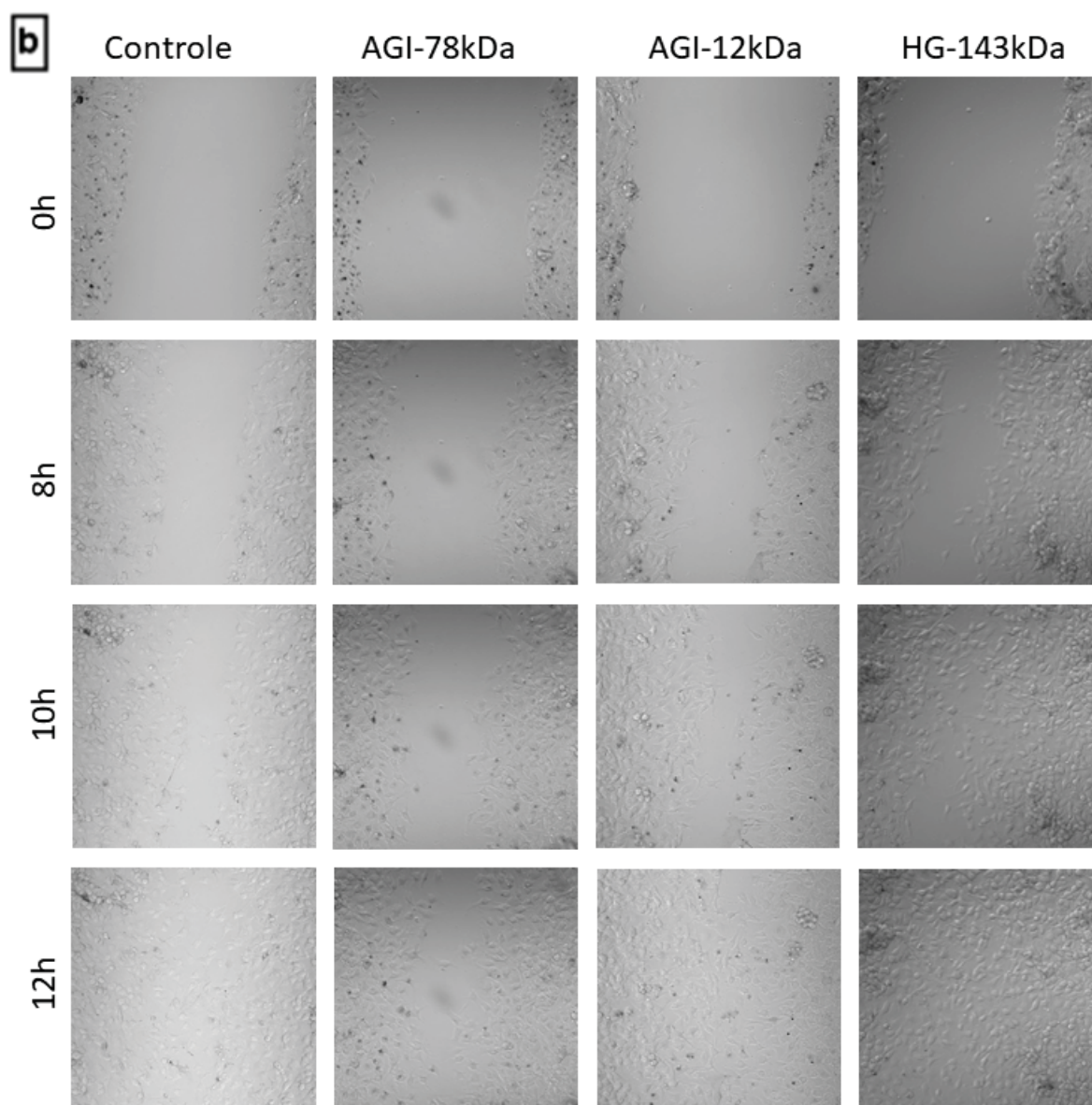
Um dos processos mais importantes na metástase é a migração (CLARK; VIGNJEVIC, 2015). Na literatura encontramos algumas pectinas que influenciam na capacidade migratória de células tumorais. A pectina cítrica modificada retardou a migração de células de câncer de mama (ZUH, et al., 2020) e essa pectina, porém com massa menor (10 kDa), inibiu a migração de células de câncer de cólon e próstata (PRADO et al., 2019). A migração de células tumorais de cólon e próstata também foi inibida por pectinas do mamão (PRADO et al., 2017). Em células de melanoma murino e humano (B16-F10 e A375, respectivamente) o tratamento com 100 µg/mL da pectina extraída da romã (AGII) reduziu a migração (VARGHESE et al., 2017). Tratamentos que retardam a migração são de grande interesse, pois a redução ou inibição da capacidade migratória é uma das formas, porém não a única, de intervir na invasão e inibir processo metastático das células tumorais (MASSAGUÉ; OBENAU, 2016).

A capacidade migratória das células de melanoma murino (B16-F10), quando tratadas com 100 µg/mL das pectinas (AGI-78kDa, AGI-12kDa e HG-143kDa) foi avaliada. O gráfico mostra resultados de três experimentos independentes (FIGURA 21). Quando tratadas com HG-143kDa e AGI-12kDa as células migram mais rápido do que as células que não receberam tratamento (15% e 13%, respectivamente, no tempo de 12 horas). No caso da HG-143kDa essa alteração pode estar relacionada com as mudanças morfológicas induzidas por esse tratamento. Como já citado na análise morfológica, as diminuições de fibras de estresse e adesões focais, assim como o aumento de filopódios (características observadas na análise morfológica, FIGURA 19), aumentam o potencial migratório (LI; ABUARAB; SIVAPRASADARAO, 2016). Já o tratamento com as AGI-78kDa, não alterou a velocidade de migração das células.

FIGURA 21. ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR.



a) Migração de células de melanoma murino (B16-F10) ao longo do tempo. O gráfico mostra dados de três experimentos independentes, o grupo controle (linha em preto) e os tratamentos (AGI-78kDa, AGI-12kDa e HG-143kDa (100 µg/mL)).



b) Imagens das células no processo de migração (tempo 0 horas e nos tempos de fechamento da área aberta).

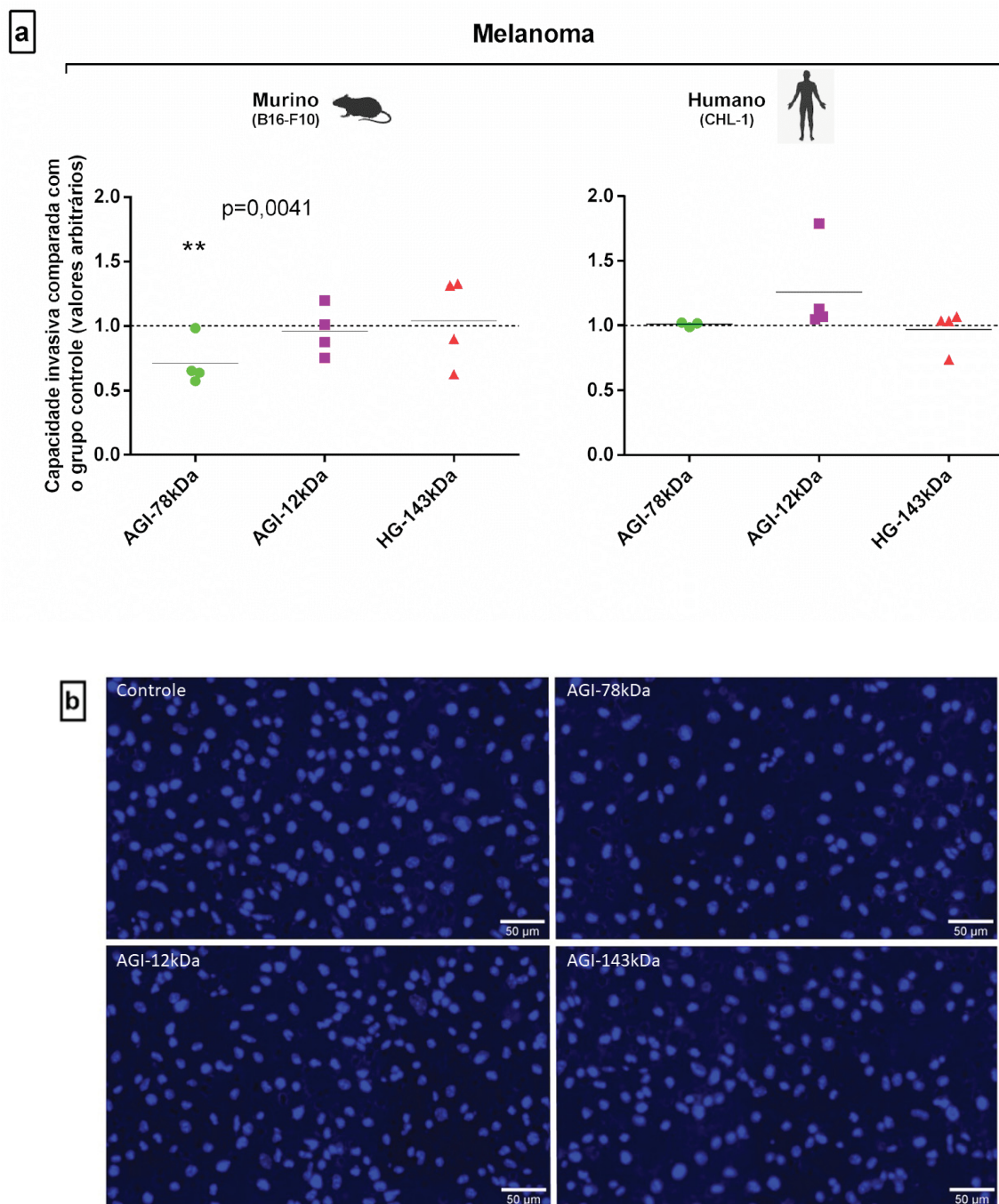
4.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INVASIVA DAS CÉLULAS

A capacidade invasiva das células é um parâmetro importante a ser avaliado no contexto tumoral pois ela está diretamente relacionada com o processo da metástase (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016). As células de melanoma murino tratadas com AGI-78 kDa (100 µg/mL) apresentaram capacidade invasiva diminuída quando comparadas às células não tratadas. Na linhagem de melanoma humano esse efeito não foi observado. Os demais tratamentos não alteraram a capacidade invasiva das células (FIGURA 22).

A inibição da capacidade invasiva de células tumorais por pectinas semelhantes às testadas neste trabalho já é relatada na literatura. A AGI extraída do milho, que é composta por galactose, arabinose, ácido galacturônico, manose, xilose e ramnose (54:20:10:4:3:1) quando adicionada na concentração 20 µg/mL, inibiu a invasão de células de melanoma murino B16-F10. Os autores atribuem tal atividade à capacidade dessa pectina em inibir a ação da galectina-3 no processo metastático (JAYARAM; KAPOOR; DHARMESH, 2015). AGI da espécie vegetal *Decalepis hamiltonii*, na concentração de 100 µg/mL, reduziu a invasão de células de melanoma murino (B16-F10). Esse efeito foi devido a capacidade de tal molécula atuar inibindo metaloproteinases (VENKATESHIAH et al., 2017). Pectinas extraídas da maçã, ricas em galactose e arabinose, na concentração 1000 µg/mL, diminuíram a capacidade invasiva de células de câncer colorretal (HT-29) como consequência da inibição de galectina-3 (WIKIERA et al., 2021).

A ação inibitória da invasão de AGI-78kDa possivelmente está ligada ao bloqueio de galectinas, pois essa molécula apresenta galactose que é um ligante de galectinas (ANEXO 2). Galectinas já foram identificadas como reguladoras do processo de invasão, por diversas vias, como por exemplo superexpressão de genes para MMPs (GIROTTI et al., 2020). Uma dessas galectinas é a Galectina-1, que contribui com o processo da invasão de células tumorais, por regular a expressão de metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9) e reestruturação do citoesqueleto de actina (WU et al., 2009). Dado que corrobora com os resultados apresentados, uma vez que AGI-78kDa altera a invasão e morfologia de células B16-F10.

FIGURA 22. ANÁLISE DA CAPACIDADE INVASIVA DAS CÉLULAS.



a) Invasão de células de melanoma. As células (B16-F10 e CHL-1) foram expostas a 100 µg/mL dos polissacarídeos AGI-78kDa, AGI-12kDa e HG-143kDa por 72 horas. Ao final do experimento as células foram marcadas com DAPI, as lâminas foram montadas e observadas em scanner de lâminas Axio Imager Z2. A contagem das células que invadiram (núcleos/área (mm²)) foi feita utilizando os programas VSViewer e Fiji (ImageJ). Foi removido um *outlier* da amostra AGI-78kDa da CHL-1. A análise estatística foi feita nos dados normalizados, comparando as médias dos grupos tratados em relação ao controle. Teste t não pareado com correção de Welch's e o resultado foi considerado significativo quando o $p < 0,05$. Os gráficos mostram as médias dos núcleos por área, em relação ao controle, de quatro experimentos independentes. b) Imagens de células de melanoma murino que invadiram o inserto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pectinas estudadas possuem atividades antimelanoma interessantes (FIGURA 23). As AGIs extraídas da ameixa, na maior concentração testada induzem citotoxicidade seletiva às linhagens tumorais. No caso da AGI-78kDa esse efeito é devido à capacidade de a molécula provocar morte das células de melanoma. Em concentração não citotóxica, as AGIs atuam em fenótipos relacionados com a metástase tumoral, como redução da adesão e da capacidade clonogênica e ainda, no caso da AGI-78kDa, inibição da invasão das células de melanoma. Além disso, tais polissacarídeos alteraram sutilmente a morfologia das células tumorais. Já a HG modificou os padrões morfológicos das células de melanoma murino e humano, reduziu a capacidade clonogênica das células de melanoma humano e interferiu na migração das células de melanoma murino, porém ainda são necessários mais ensaios para avaliação do potencial dessa molécula. O sucesso das AGIs na atividade antimelanoma *in vitro* é possivelmente devido à estrutura química, por possuírem galactose em sua composição podendo interagir com galectinas celulares (ANEXO 2) e interferindo na ação delas em diversos processos da progressão tumoral. Os efeitos diferenciados entre a AGI-78kDa e a AGI-12kDa podem estar associados à diferença na massa molar.

FIGURA 23. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO ANTIMELANOMA DE PECTINAS EXTRAÍDAS DA AMEIXA SECA E DA CASCA DO MARACUJÁ.

RESULTADOS

H = Humano M = Murino

Ensaio	AGI-78kDa	AGI-12kDa	HG-143kDa	
CITOTOXICIDADE SELETIVA	Viabilidade	↓ H	↓ M	=
	Densidade	↓ HM	↓ HM	=
	Morte	↑ HM	=	
ALTERAÇÃO DA MORFOLOGIA	Morfologia	≠ HM	≠ HM	≠ HM
	Colônias	↓ M	↓ HM	↓ H
ALTERAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS COM A METÁSTASE	Invasão	↓ M	=	=
	Adesão	↓ M	↓ M	
	Migração	=	↑ M	↑ M
LIGAÇÃO À GALECTINA-3	Galectina	Liga	Liga	

Fonte: A autora (2021).

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando os resultados expostos, na busca por um possível alvo de ação das AGIs, os testes de ligação com galectinas celulares devem ser continuados.

Além disso, poderão ser realizados testes de metaloproteinases uma vez que AGI-78kDa reduziu a capacidade invasiva das células cultivadas sobre a matrigel® e quando cultivadas sem a presença de matrigel® para análise da capacidade migratória não houveram alterações, indicando, portanto, que a redução da capacidade invasiva é independente de processos estruturais (como remodelação do citoesqueleto) envolvidos na migração. Sendo assim, outro processo importante na invasão é a degradação da matriz extracelular por metaloproteinases e, portanto, justifica-se a importância de investigá-las futuramente.

Para a HG-143kDa, é interessante a investigação dessa molécula desesterificada, pois estudos mostram que a retirada do metil-éster propicia sítios de ligação na molécula para interagir com a célula, potencializando sua ação antitumoral.

6 REFERÊNCIAS

ABBOUD, K. Y. et al. Gastroprotective effect of soluble dietary fibres from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel against ethanol-induced ulcer in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 54, n. August 2018, p. 552–558, 2019.

AGUIAR, S. C. de *et al.* Feed intake of sheep receiving ration with addition of passion fruit peel meal. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 1, n. 1, p. 58, 23 maio 2020.

AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma Resource Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 2015.

ALBERTS, Bruce *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 6. ed.: Artmed, 2017.

AMARAL, C. et al. Cytotoxic effect of crude and purified pectins from *Campomanesia xanthocarpa* Berg on human glioblastoma cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, n. July, p. 1-9, 2019.

ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current Biology**, v. 30, n. 16, p. 921–R925, 2020.

BALCH, C. M. *et al.* Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199-6206, 20 dez. 2009

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 2012.

BARBOSA, J. S. *et al.* In Vitro Antitumor Potential of Sulfated Polysaccharides from Seaweed *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*. **Marine Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 77-89, 10 nov. 2020.

BATUS, M. et al. Optimal management of metastatic melanoma: Current strategies and future directions. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 14, n. 3, p. 179–194, 2013.

BELLAN, D.L. *et al.* Green does not always mean go: a sulfated galactan from *codium isthmocladum* green seaweed reduces melanoma metastasis through direct regulation of malignancy features. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, p. 1-12, dez. 2020.

BELLAN, D. L. *et al.* Non-Cytotoxic Sulfated Heterorhamnan from *Gayralia brasiliensis* Green Seaweed Reduces Driver Features of Melanoma Metastatic Progression. **Marine Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 194-206, 22 jan. 2020.

BENNETT, D. C. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility

genes. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3063–3069, 2003.

BERWICK, M. *et al.* Melanoma Epidemiology and Prevention. **Melanoma**, p. 17-49, 25 nov. 2015.

BISCAIA, S. M. P. *et al.* Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, n. August, p. 95–104, 2017.

BONNEKOH, B. *et al.* Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. **Archives of Dermatological Research**, v. 281, n. 7, p. 487–490, 1989.

BOULVA, K. *et al.* Contemporary Neoadjuvant Therapies for High-Risk Melanoma: a systematic review. **Cancers**, v. 13, n. 8, p. 1-15, 15 abr. 2021.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros**, v. 9, n. 3, p. 38–44, 2005.

CANTERI, M. H. G. *et al.* Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.

CANTU-JUNGLES, T. M. *et al.* Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. **Food Chemistry**, v. 146, p. 492–499, 2014.

CAO, L. *et al.* Antitumor and immunomodulatory activity of arabinoxylans: A major constituent of wheat bran. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 160–164, jan. 2011.

CARDOSO, A. C. F. *et al.* Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. **Frontiers in Oncology**, v. 6, n. May, p. 1–12, 2016.

CARLOTTO, J. *et al.* Polysaccharide fractions from *Handroanthus heptaphyllus* and *Handroanthus albus* barks: structural characterization and cytotoxic activity. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 849-856, dez. 2020.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249-257, set. 2000.

CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. **Revista Médica**, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.

CHENG, H. *et al.* Comparative studies of the antiproliferative effects of ginseng polysaccharides on HT-29 human colon cancer cells. **Medical Oncology**, v. 28, n. 1, p. 175–181, 18 mar. 2011.

CLARK, A. G.; VIGNJEVIC, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 36, p. 13–22, 2015.

COELHO, E. M. *et al.* Passion fruit peel flour – Technological properties and application in food products. **Food Hydrocolloids**, v. 62, n. 1, p. 158-164, jan. 2017.

COMPAGNO, Daniel *et al.* Delineating the. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 4, p. 6-9, abr. 2013.

CÓRDOVA, K. R. V. *et al.* CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA CASCA DO MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) OBTIDA POR SECAGEM. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 221-230, 31 dez. 2005.

CORREA, F. de M. *et al.* Terapia-alvo versus dacarbazina no tratamento de primeira linha do melanoma avançado não cirúrgico e metastático: análise de impacto orçamentário na perspectiva do sistema único de saúde, 2018-2020*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 28, n. 2, p. 1-11, jul. 2019.

CROCI, D. O. *et al.* Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors. **Cell**, v. 156, n. 4, p. 744-758, fev. 2014.

DAMMAK, M. I. *et al.* Partial characterization and antitumor activity of a polysaccharide isolated from watermelon rinds. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 632-641, set. 2019.

DELPHI, L. *et al.* Pectic-Oligosaccharides from Apples Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest in MDA-MB-231 Cells, a Model of Human Breast Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 13, p. 5265–5271, 3 ago. 2015.

DELPHI, L.; SEPEHRI, H. Apple pectin: A natural source for cancer suppression in 4T1 breast cancer cells in vitro and express p53 in mouse bearing 4T1 cancer tumors, in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 637–644, dez 2016.

DING, H.; CUI, S. W.. Pectin Bioactivity. **Pectin: Technological and Physiological Properties**, p. 165-188, 2020.

DOMINGUES, B. *et al.* Melanoma treatment in review. **Immunotargets And Therapy**, v. 7, p. 35-49, jun. 2018.

ELOLA, M. T. *et al.* Galectins: Multitask signaling molecules linking fibroblast, endothelial and immune cell programs in the tumor microenvironment. **Cellular Immunology**, v. 333, n. March, p. 34–45, 2018.

FADEL, A. *et al.* Arabinoxylans from rice bran and wheat immunomodulatory potentials: a review article. **Nutrition and Food Science**, v. 48, n. 1, p. 97–110, 2018.

FIGUEIREDO, C.; SILVA, A. C. A.e. Role of Metalloproteinases in Melanoma Growth and Progression. **Proteases In Human Diseases**, v. 1, n. 1, p. 91-102, 2017.

FRACASSO, A. F. **Modificação Química de Pectina Cítrica: Implicações Estruturais, Físicas e Reológicas**. 2015. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, dez. 2006.

FREITAS, C. M. P. *et al.* Extraction of Pectin from Passion Fruit Peel. **Food Engineering Reviews**, v. 12, n. 4, p. 460-472, 4 set. 2020.

GEBÄCK, T. *et al.* TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. **Biotechniques**, v. 46, n. 4, p. 265-274, abr. 2009.

GEORGESCU, S. R. *et al.* Tumour Microenvironment in Skin Carcinogenesis. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, p. 123-142, 2020.

GHONEUM, M. *et al.* Modified arabinoxylan from rice bran, MGN-3/biobran, sensitizes metastatic breast cancer cells to paclitaxel in vitro. **Anticancer Research**, [s. /], v. 34, n. 1, p. 81-87, jan. 2004.

GIROTTI, M. R. *et al.* Sweetening the hallmarks of cancer: galectins as multifunctional mediators of tumor progression. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 217, n. 2, p. 1-14, 24 dez. 2019.

GONG, G. *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Arabinogalactan derived from Lycium barbarum fruit inhibits cancer cell growth via cell cycle arrest and apoptosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 639–650, 2020.

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

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **Journal of Molecular Histology**, v. 35, n. 3, p. 309–318, 2004.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Netherlands Heart Journal**, v. 18, n. 9, p. 399, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HINGORANI, R. et al. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerserTM System. n. August, 2011.

HODOROGEA, A. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Skin Cancers: a review. **Analytical Cellular Pathology**, p. 1-11, 16 dez. 2019.

HOFMANN, Uta B. et al. Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 3, p. 337-344, set. 2000.

HOSSEIN, G. et al. Synergistic Effects of PectaSol-C Modified Citrus Pectin an Inhibitor of Galectin-3 and Paclitaxel on Apoptosis of Human SKOV-3 Ovarian Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 12, p. 7561–7568, 31 dez. 2013.

IARC, International Agency For Cancer Research -. **Estimated number of deaths in 2020, worldwide, both sexes, all ages**. Disponível em:

https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysisstable?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1. Acesso em: 04 mar. 2021.

ICCVAM. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method. **ICCVAM Test Method Evaluation Report: In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests**, November, 2006.

JAYARAM, S.; KAPOOR, S.; DHARMESH, S. M. Pectic polysaccharide from corn (*Zea mays* L.) effectively inhibited multi-step mediated cancer cell growth and metastasis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 235, p. 63–75, jun. 2015.

JENKINS, R. W.; FISHER, D. E. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 1, p. 23-31, jan. 2021.

JIANG, J.; ELIAZ, I.; SLIVA, D. Synergistic and Additive Effects of Modified Citrus Pectin With Two Polybotanical Compounds, in the Suppression of Invasive Behavior of Human Breast and Prostate Cancer Cells. **Integrative Cancer Therapies**, v. 12, n. 2, p. 145-152, 24 abr. 2013.

KHAN, T. et al. Polysaccharides as potential anticancer agents—A review of their progress. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, p. 412-428, abr. 2019.

KHOTIMCHENKO, M. et al. Pectin polymers for colon-targeted antitumor drug delivery. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 1110-1124, set. 2020.

- KOZAR, I. *et al.* Many ways to resistance: how melanoma cells evade targeted therapies. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews On Cancer**, v. 1871, n. 2, p. 313-322, abr. 2019.
- KUMAR, R. V. *et al.* Characterization, biological evaluation and molecular docking of mulberry fruit pectin. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, dez. 2020.
- LECLERE, L.; VAN CUTSEM, P.; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. **Frontiers In Pharmacology**, v. 4, p. 1-8, 2013.
- LEONARDI, G. *et al.* Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (review). **International Journal Of Oncology**, v. 52, p. 1071-1080, 27 fev. 2018.
- LIANG, C. *et al.* In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, fev. 2007.
- LI, B. *et al.* Structural Characterization and Anti-Proliferation Activities Against Tumor Cells of an Arabinogalactan from *Juniperus convallium*. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1850-1863, 14 maio 2019.
- LI, F.; ABUARAB, N.; SIVAPRASADARAO Reciprocal regulation of actin cytoskeleton remodelling and cell migration by calcium and zinc: role of trpm2 channels. **Journal Of Cell Science**, p 1-41, jan. 2016.
- LIANG, C.; PARK, A.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, fev. 2007.
- LIMONTA, P. *et al.* New insights in melanoma biology: running fast towards precision medicine. **Seminars In Cancer Biology**, v. 59, p. 161-164, dez. 2019.
- LIN, L. *et al.* Structural elucidation of a pectin from flowers of *Lonicera japonica* and its antipancreatic cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 130-137, jul. 2016.
- LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29-41, 2005.
- LÓPEZ-VARGAS, J. H. *et al.* Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 756-763, maio 2013.
- LV, H. *et al.* Purification, characterization and anti-tumor activity of a pectic-type polysaccharide isolated from *Ficus pandurata* H. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 201-206, jun. 2020
- MACCARTHY-MORROGH, L.; MARTIN, P. The hallmarks of cancer are also the

hallmarks of wound healing. **Science Signaling**, v. 13, n. 648, p. 1-12, 8 set. 2020.

MACKIEWICZ, J.; MACKIEWICZ, A. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. **Współczesna Onkologia**, v. 2018, n. 1, p. 68-72, 2018

MARTINS, M. D. *et al.* Valorization of passion fruit peel by-product: xylanase production and its potential as bleaching agent for kraft pulp. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 172-180, out. 2018

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, jan. 2016

MAXWELL, E. G. *et al.* Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 923–929, jan. 2016.

MENDIS, M.; LECLERC, E.; SIMSEK, S. Arabinoxylan hydrolyzates as immunomodulators in Caco-2 and HT-29 colon cancer cell lines. **Food & Function**, v. 8, n. 1, p. 220–231, 2017.

MENYHÁRT, O. *et al.* Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews On Cancer**, v. 1866, n. 2, p. 300-319, dez. 2016

MILHORINI, S. DA S. *et al.* Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. Novembro 2017, p. 50–56, 2018.

MILLER, M. C. *et al.* The carbohydrate-binding domain on galectin-1 is more extensive for a complex glycan than for simple saccharides: implications for galectin glycan interactions at the cell surface. **Biochemical Journal**, v. 421, n. 2, p. 211-221, 26 jun. 2009.

MINZANOVA, S. *et al.* Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: a review. **Polymers**, v. 10, n. 12, p. 1407-1438, 19 dez. 2018.

MISHRA, H. *et al.* Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2283–2302, 2018.

MOGHTADERI, H.; SEPEHRI, H.; ATTARI, F. Combination of arabinogalactan and curcumin induces apoptosis in breast cancer cells in vitro and inhibits tumor growth via overexpression of p53 level in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 582–594, abr. 2017.

MOHAN, V.; ASWAKANI K.; Anticancer potential of *Tinospora cordifolia* and arabinogalactan against benzo(a)pyrene induced pulmonary tumorigenesis: a study in relevance to various biomarkers. **Journal Of Herbmec Pharmacology**, v. 7, n. 4,

p. 225-235, 6 out. 2018.

MORO, N.; MAUCH, C.; ZIGRINO, P. European Journal of Cell Biology Metalloproteinases in melanoma. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 1–2, p. 23–29, 2014.

NAFFA, R. *et al.* The Plasma Membrane Ca²⁺ Pump PMCA4b Regulates Melanoma Cell Migration through Remodeling of the Actin Cytoskeleton. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1-25, 17 mar. 2021.

NAPOLI, S. *et al.* Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1151-1174, 7 maio 2020.

NASCIMENTO, R. S. do *et al.* The purification of pectin from commercial fruit flours results in a jaborcaba fraction that inhibits galectin-3 and colon cancer cell growth. **Food Research International**, v. 137, n. 1, p. 1-8, nov. 2020.

NELSON, DAVID L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. 2014. Artmed.

OLIVEIRA, Ruberney S. *et al.* Structure elucidation of a bioactive fucomannogalactan from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, p. 1-9, dez. 2019.

ONCOGUIA. **Estatística para Câncer de Pele Melanoma**. 2020. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistia-para-cancer-de-pele-melanoma/7066/186/>. Acesso em: 03 abr. 2021.

OOI, S. L. *et al.* Evidence-Based Review of BioBran/MGN-3 Arabinoxylan Compound as a Complementary Therapy for Conventional Cancer Treatment. **Integrative Cancer Therapies**, v. 17, n. 2, p. 165–178, 17 jun. 2018.

PAUL, D. *et al.* The systemic hallmarks of cancer. **Journal Of Cancer Metastasis And Treatment**, v. 2020, p. 1-31, 28 ago. 2020.

PRADO, S. B. R. do *et al.* Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16564, 29 dez. 2017.

PRADO, S. B. R. do *et al.* Migration and proliferation of cancer cells in culture are differentially affected by molecular size of modified citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, p. 141-151, maio 2019.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

RIBEIRO, R. I. M. de A. *et al.* Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p. 115-121, abr. 2008.

RUVOLO, P. P. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 3, p. 427–437, 2016.

SCHINDELIN, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-682, 28 jun. 2012.

SCHIRRMACHER, V. *et al.* From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). **International Journal Of Oncology**, v. 54, p. 407-419, nov. 2018.

SCHÖLL-NADERER, M. *et al.* Plant-derived saccharides and their inhibitory potential on metastasis associated cellular processes of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Carbohydrate Research**, v. 490, p. 1-9, abr. 2020.

SILVAN, J. M. *et al.* Modulation of Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Properties by Drying of *Prunus domestica* L. Plum Juice Extracts. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 119-132, 15 jan. 2020.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345-358, 29 abr. 2016.

SIMICZYJEW, A. *et al.* The Influence of Tumor Microenvironment on Immune Escape of Melanoma. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8359-8387, 7 nov. 2020.

SMART, J.A.; OLEKSAK, J. E.; HARTSOUGH, E. J. Cell Adhesion Molecules in Plasticity and Metastasis. **Molecular Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 25-37, 1 out. 2020.

STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M. *et al.* Chemical Composition and Potential Health Effects of Prunes: a functional food?. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 251-286, jul. 2001.

SULTANA, N. *et al.* *Prunus domestica*: a review. **Asian Journal Of Pharmacognosy Asian**, v. 4, n. 3, p. 21-29, jan. 2020.

SUN, J. *et al.* Principles of Targeted Therapy for Melanoma. **Surgical Clinics Of North America**, v. 100, n. 1, p. 175-188, fev. 2020.

TADDEI, M. *et al.* Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. **Cell Communication And Signaling**, v. 12, n. 1, p. 02-12, 2014.

THERAPEUTICS, Galectin. **Develop Proprietary Galectin Inhibitors**. Disponível em: <https://galectintherapeutics.com/develop-proprietary-compounds/>. Acesso em: 10 fev. 2021.

VARGHESE, S. *et al.* International Journal of Biological Macromolecules The

inhibitory effect of anti- tumor polysaccharide from *Punica granatum* on metastasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1000–1010, 2017.

VAYSSADE, M. *et al.* Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 7, p. 982-989, 9 dez. 2009.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, n. March 2014, p. 10–4, 2011.

VENKATESHAIAH, S. U. *et al.* Antimetastatic pectic polysaccharide from *Decalepis hamiltonii*; galectin-3 inhibition and immune-modulation. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 34, n. 2, p. 141–154, 2017.

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; PETKOWICZ, C. L. DE O. Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 312–317, 2010.

WANG, Y. G. *et al.* Galectin-3 increases the motility of mouse melanoma cells by regulating matrix metalloproteinase-1 expression. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 44, n. 6, p. 387–393, 2012.

WANG, P. *et al.* An arabinogalactan from flowers of *Panax notoginseng* inhibits angiogenesis by BMP2/Smad/Id1 signaling. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 328–335, maio 2015.

WANG, Y. *et al.* Extraction , characterization of a Ginseng fruits polysaccharide and its immune modulating activities in rats with Lewis lung carcinoma. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 215–221, 2015.

WARD, W. H. *et al.* Clinical Presentation and Staging of Melanoma. **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**, p. 79-89, 5 dez. 2017.

WEI, C. *et al.* Structural characterization and anti-proliferative activities of partially degraded polysaccharides from peach gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, n. September 2018, p. 193–202, 2019.

WELCH, D. R. *et al.* Defining the Hallmarks of Metastasis. **Cancer Research**, v. 79, n. 12, p. 3011-3027, 3 maio 2019.

WHO, World Health Organization -. **Cancer**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 03 fev. 2021.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 97–104, 2006.

WU, D. *et al.* Structure-activity relationship of Citrus segment membrane RG-I pectin

against Galectin-3 : The galactan is not the only important factor. **Carbohydrate Polymers**, v. 245, n. May, p. 116526, 2020.

XU, H.; XU, X. Polysaccharide, a Potential Anti-Cancer Drug with High Efficacy and Safety. **Journal of Oncology Research and Treatments**. v. 1, n. 2, p. 1–2, 2016.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Higher methylation subtype of malignant melanoma and its correlation with thicker progression and worse prognosis. **Cancer Medicine**, v. 9, n. 19, p. 7194-7204, 14 maio 2020.

YANG, L.-C. *et al.* Structurally characterized arabinogalactan from *Anoectochilus formosanus* as an immuno-modulator against CT26 colon cancer in BALB/c mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 647–655, abr. 2014.

YANG, S. *et al.* Biomedicine & Pharmacotherapy Hinoki flavone induces apoptosis in melanoma cells through the ROS- mitochondrial apoptotic pathway and impairs cell migration and invasion. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, n. February, p. 101–110, 2018.

YAZAWA, E. M. *et al.* Melanoma cell galectin-1 ligands functionally correlate with malignant potential. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1849–1862, 2015.

ZAITSEVA, O. *et al.* Pectins as a universal medicine. **Fitoterapia**, v. 146, p. 1-23, out. 2020.

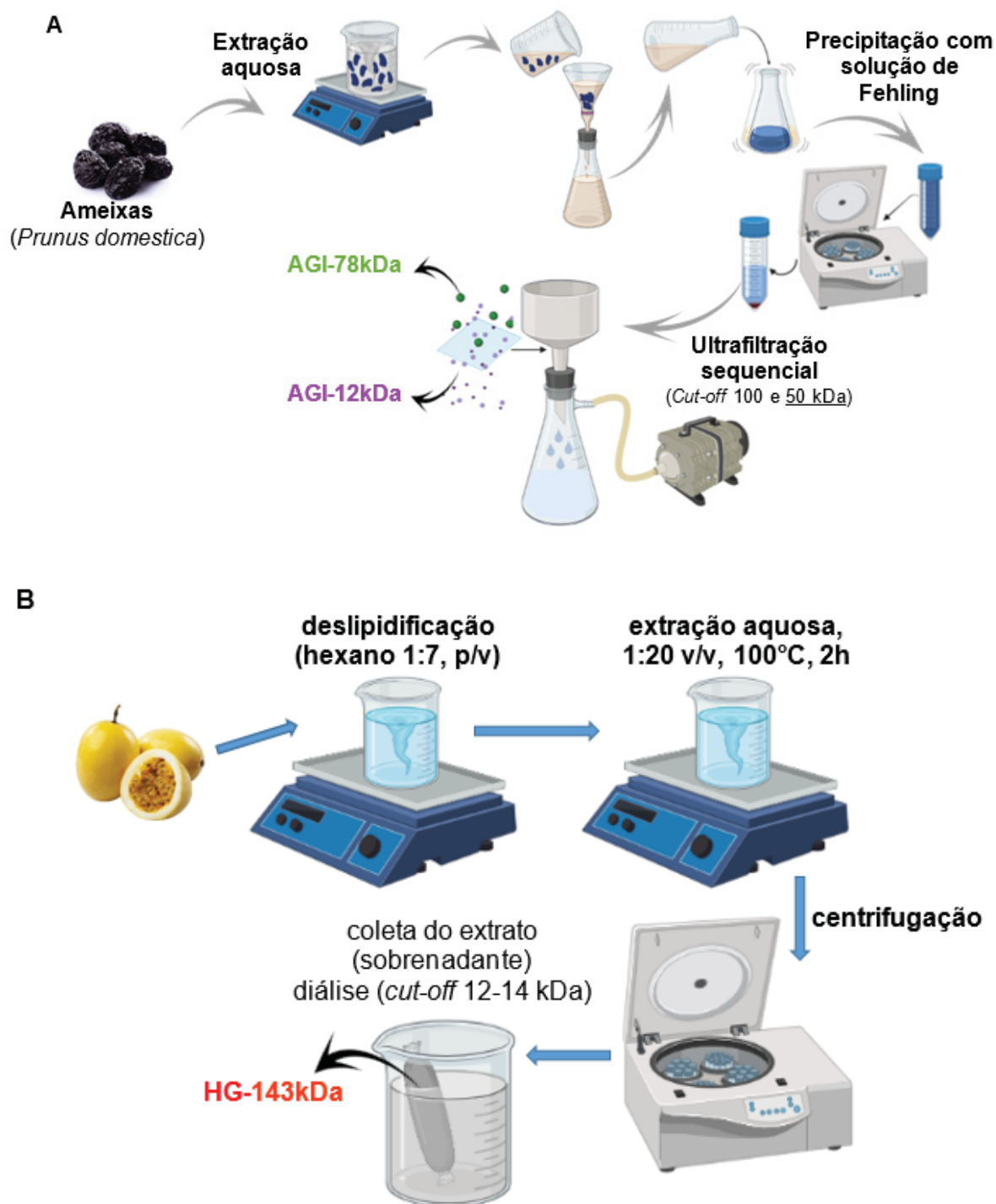
ZHANG, S. *et al.* Isolation and structural characterization of a pectin from *Lycium ruthenicum* Murr and its anti-pancreatic ductal adenocarcinoma cell activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, p. 1-10, nov. 2019.

ZHU, L. *et al.* Abstract 4918: modified citrus pectin slows migration of triple negative breast cancer cells in an impedance-based scratch assay. **Tumor Biology**, 13 ago. 2020.

ANEXO 1 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PECTINAS

As extração e purificação das pectinas da ameixa seguiu o protocolo descrito por CANTU-JUNGLES et al. (2014) (Figura S1-A) e a extração da pectina da casca do maracujá foi realizada por um método adaptado simplificado baseado em ABOUD et al. (2019) (Figura S1-B). Os procedimentos de extração, bem como de caracterização estrutural que validaram a estrutura química das pectinas foram executados pela equipe coordenada pela Profa. Dra. Lucimara Mach Cortes Cordeiro do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. A confirmação de que as pectinas extraídas para a execução deste projeto possuíam a mesma estrutura química daquelas previamente publicadas foi feita através de experimentos de ressonância magnética nuclear (mono- e bidimensionais) (dados não mostrados) e da análise da composição monossacarídica (Tabela S1). Além disso, a homogeneidade das amostras foi verificada por cromatografia líquida por exclusão de tamanho acoplada a detector de índice de refração (HPSEC-RI; Figura S2) e a massa molar das pectinas foi calculada com base em uma curva de calibração de dextranas (Sigma-Aldrich) com massas molares conhecidas. O valor da massa molar foi utilizado para construção das siglas das pectinas.

FIGURA S1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DAS PECTINAS



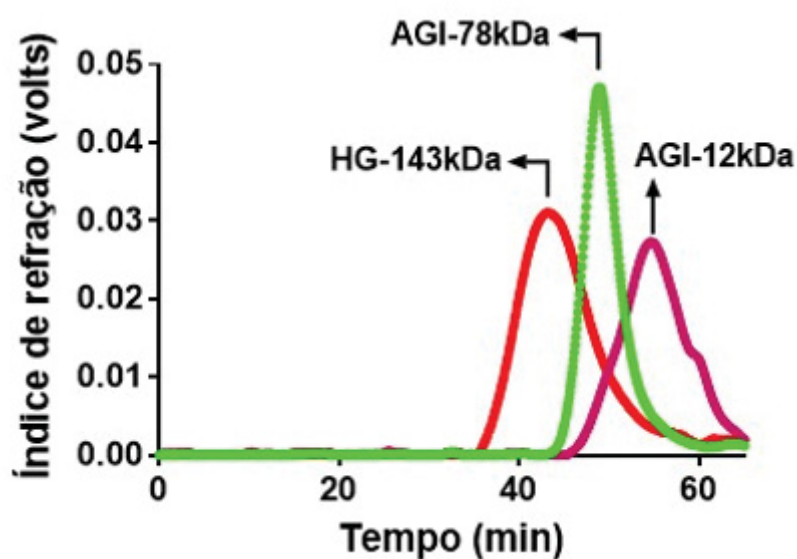
A) pectinas da ameixa seca. B) e do maracujá. FONTE: a autora.

TABELA S1: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS PECTINAS AGI-78kDa, AGI-12kDa e HG-143kDa

Amostras ^a	% relativo de monossacarídeos				Grau de metilesterificação ^c
	Ramnose	Arabinose	Galactose	Ácido galacturônico ^b	
AGI-78kDa	2	51	40	7	nd.
AGI-12kDa	2	47	48	3	nd.
HG-143kDa	3	11	2	84	91%

^a amostras previamente hidrolisadas com TFA 2M, 8h, 100°C, reduzidas com NaBH₄ e acetiladas para análise dos componentes monossacarídicos neutros por GC-MS. ^b Teor de ácidos urônicos foi determinado pelo método colorimétrico de FILIZETTI COZZI e CARPITA (1991). ^c Grau de metilesterificação foi determinado pelo método descrito por GRASDALEN et al. (1988) baseado no espectro de RMN-¹H.

FIGURA S2: PERFIL DE HOMOGENEIDADE DAS PECTINAS APÓS ANÁLISE POR HPSEC-RI.



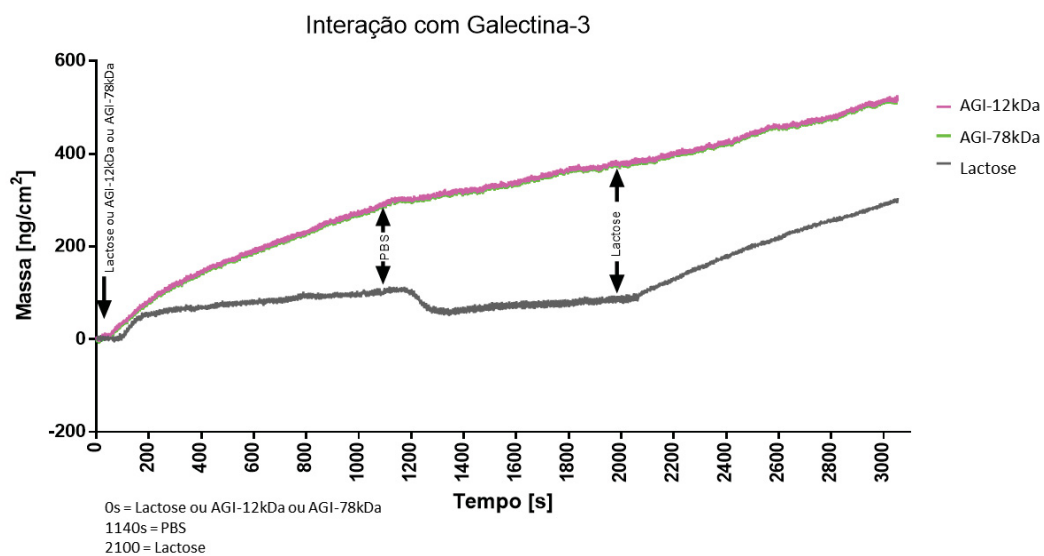
Os valores de massa indicados acima dos picos foram obtidos com base na curva de calibração utilizando dextranas comerciais.

ANEXO 2 – INTERAÇÃO DAS PECTINAS COM A GALECTINA-3

Um ensaio preliminar para avaliar a interação das arabinogalactanas com galectina-3 (Gal-3) foi realizado em uma microbalança de cristal de quartzo (QCM-D). Para isso, a Gal-3 foi imobilizada num sensor de ouro e, posteriormente, a lactose (10.000 $\mu\text{g/mL}$), que funciona como o controle positivo, e/ou os polissacarídeos (100 $\mu\text{g/mL}$) a serem testados foram injetados em fluxo contínuo sobre o sensor. Neste sistema é mensurada a massa de polissacarídeos ligada a Gal-3, através da análise da adsorção/dessorção de massa em tempo real com altíssima sensibilidade ($\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$). Os dados extraídos do QCM-D foram então analisados pelo *Software* QSense DFind, as medidas foram disponibilizadas e os gráficos foram realizados no programa GraphPad Prisma.

Após a análise dos dados pode-se observar (FIGURA S3) que houve interação dos dois polissacarídeos com a Gal-3, e como esperado, também houve interação com a lactose. A AGI-12kDa adsorveu 279,86 ng/cm^2 , a AGI-78kDa adsorveu 280,84 ng/cm^2 e a lactose adsorveu 98,95 ng/cm^2 . A diferença de massa da ligação entre os polissacarídeos e a lactose é esperada, visto a grande diferença de massa molecular entre essas moléculas. No início, após a estabilização do sistema, as moléculas foram adicionadas por fluxo e a interação foi quantificada. Após a reestabilização do sistema utilizando PBS, foi adicionada lactose em todos os sensores para confirmação da interação.

FIGURA S3. INTERAÇÃO COM GALECTINA-3.



A figura acima mostra a interação do polissacarídeo AGI-78kDa e AGI-12kDa (100 μ g/mL) e a interação com lactose 10.000 μ g/mL (controle positivo) com a galectina-3. A massa (ng/cm²) foi mensurada em função do tempo (s).