

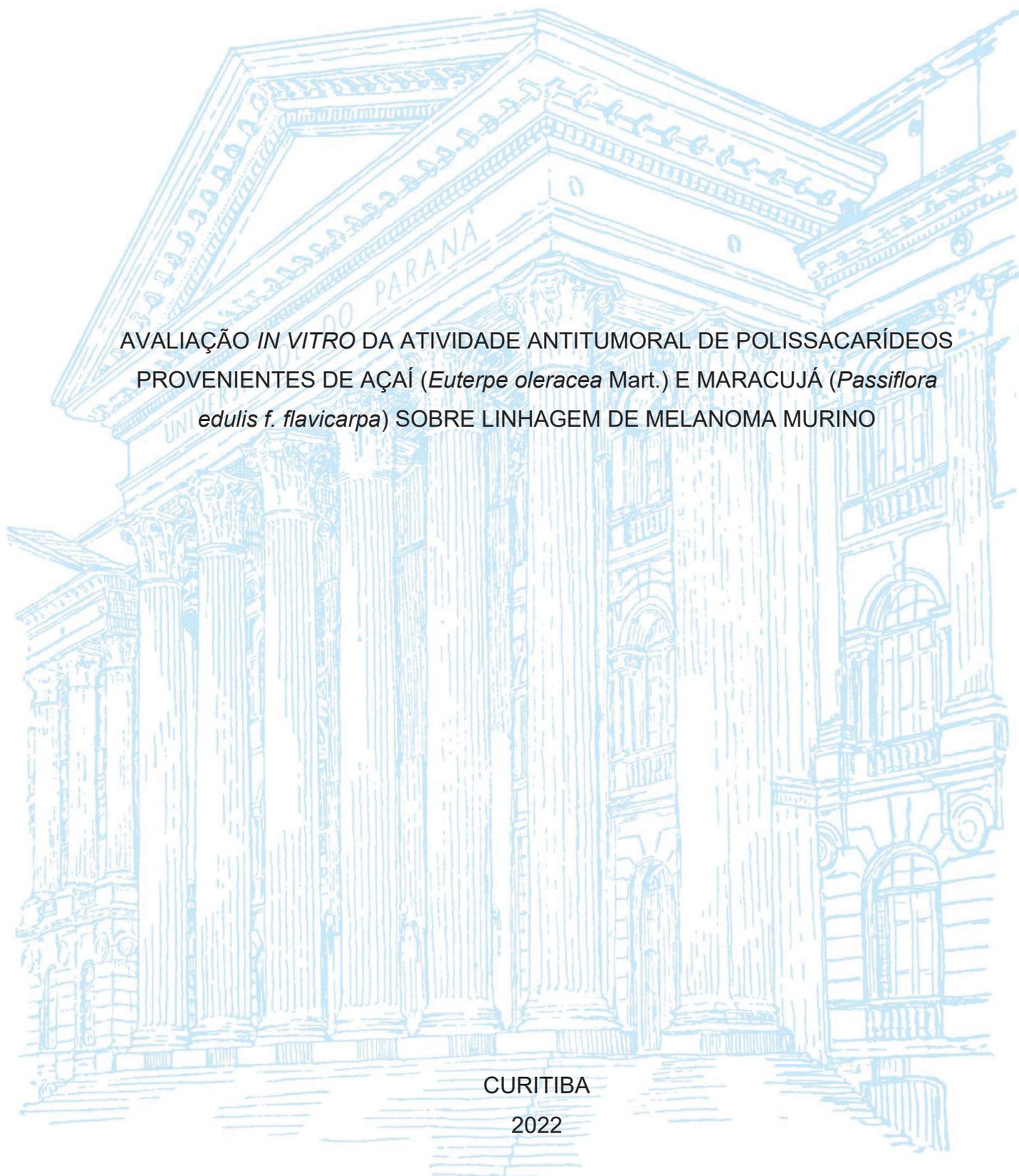
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUELEN CRISTINA SOARES BAAL

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS
PROVENIENTES DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E MARACUJÁ (*Passiflora
edulis f. flavicarpa*) SOBRE LINHAGEM DE MELANOMA MURINO

CURITIBA

2022



SUELEN CRISTINA SOARES BAAL

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS
PROVENIENTES DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E MARACUJÁ (*Passiflora
edulis f. flavicarpa*) SOBRE LINHAGEM DE MELANOMA MURINO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabíola Iagher

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Baal, Suelen Cristina Soares.

Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de polissacarídeos provenientes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) sobre linhagem de melanoma murino. / Suelen Cristina Soares Baal. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Fabíola Iagher.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Melanoma. 2. Polissacarídeos. 3. Açaí. 4. Maracujá. I. Título. II. Iagher, Fabíola. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA -
40001018072P4

ATA Nº54

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM FISILOGIA

No dia seis de abril de dois mil e vinte e dois às 14:00 horas, na sala Laboratório 03 do departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **SUELEN CRISTINA SOARES BAAL**, intitulada: "**Avaliação in vitro da atividade antitumoral de polissacarídeos provenientes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) sobre linhagem de melanoma murino.**", sob orientação da Profa. Dra. **FABÍOLA IAGHER**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: **DANIELA FIORI GRADIA** (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), **KATYA NALIWAICO** (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), **FABÍOLA IAGHER** (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela **APROVAÇÃO**. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 06 de Abril de 2022.

Assinatura Eletrônica

07/04/2022 16:31:34.0

DANIELA FIORI GRADIA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/04/2022 11:05:08.0

KATYA NALIWAICO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/04/2022 13:31:16.0

FABÍOLA IAGHER

Orientador - Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Setor de Ciências Biológicas - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3381-1588 - E-mail: ppgfisio@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: 172540

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 172540



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA -
40001016072P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de SUELEN CRISTINA SOARES BAAL intitulada: "Avaliação in vitro da atividade antitumoral de polissacarídeos provenientes de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) e maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) sobre linhagem de melanoma murino.", sob orientação da Profa. Dra. FABIOLA IAGHER, 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 mestra 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, 06 de Abril de 2022.

Assinatura Eletrônica

07/04/2022 16:31:34.0

DANIELA FIORI GRADIA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/04/2022 11:05:08.0

KATYA NALIWAIKO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/04/2022 13:31:18.0

FABIOLA IAGHER

Orientador - Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Setor de Ciências Biológicas - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1588 - E-mail: ppgfisio@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: 172540

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 172540

Ao meu querido amigo Rodrigo Piske Rudolf (*in memoriam*) e a tantos outros que perderam suas vidas lutando contra os males causados por esta doença, dedico este trabalho na esperança de que ele possa contribuir para que aqueles que amamos permaneçam ao nosso lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me ceder a capacidade de aprender e executar.

Agradeço a minha família por estar sempre comigo, em especial ao meu irmão Igor por acreditar em mim e me incentivar, sendo meu parceiro em todos os momentos.

Às minhas tias Elis, Dulceli e Mari por terem sempre cuidado de mim e por terem me ensinado o quanto nós mulheres somos capazes de conquistar. Obrigada por todos os almoços de domingo que se tornaram tão especiais como momentos de calma e descontração em meio a tantos dias turbulentos.

Agradeço a Carol por ter me mostrado e caminhado comigo por caminhos que jamais imaginei caminhar, por sonhar comigo e sempre me lembrar de que eu sou capaz.

Ao querido amigo e professor Amilton da Rocha Leal Junior, por todos estes anos de amizade desde as épocas da graduação. Agradeço infinitamente ter sido sua aluna e, sob seu grande incentivo, ter dado início a esta caminhada que agora veio a resultar neste trabalho. Obrigada por acreditar em mim e por me inspirar sempre.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a. Dr^a Fabíola Iagher, por me receber de braços abertos, me oferecendo seus conhecimentos e a oportunidade de trabalhar. Sou infinitamente grata por esta parceria que criamos e pela oportunidade de conviver com uma pessoa tão especial.

Aos professores Dr. Luiz Claudio Fernandes e Dr^a Katya Naliwaiko por igualmente terem me acolhido me fazendo sempre sentir incluída em todas as atividades desenvolvidas pelo laboratório e por todos os ensinamentos e lições recebidas, agradeço de coração.

Agradeço a prof^a Dr^a Márcia Helena Appel pela amizade, pela parceria e por me socorrer em tantos momentos que nem sei ao certo quantos foram. Obrigada por me ensinar tanto e me permitir conviver com você.

Aos meus queridos amigos do LabMetab, Amanda, Rafaella, Daiana, Matheus e Stéphanie, alguns dos melhores presentes que a UFPR me deu, por aguentarem todas as minhas lamentações todas as vezes que os experimentos deram errado, por me alegrarem, e por viverem comigo também momentos felizes. Sou muito grata por ter vocês comigo. *“Alguém já passou o café? Não tem nada pra comer nesse lugar”*

Agradeço ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética – LabCho, em especial à prof^a Dr^a Jaqueline Carvalho de Oliveira, Carol e Ana Flávia, por compartilharem seus conhecimentos comigo, me ensinando muito mais que o necessário para a execução de parte deste trabalho.

À prof^a Dra^a Lucimara Mach Cortes Cordeiro pela parceria, por nos ceder e pela caracterização das frações de polissacarídeos utilizados no presente estudo.

À prof^a Dra^a Fernanda Fogagnoli Simas Tosin e ao prof^o Dr. Edvaldo da Silva Trindade, do Departamento de Biologia Celular, por concederem as linhagens utilizadas neste estudo, bem como por partilharem seus conhecimentos.

Ao técnico do Departamento de Fisiologia Fábio Roberto Caetano, agradeço pelas conversas/lamentações rápidas, por sempre ser tão prestativo às minhas várias solicitações, pelo auxílio na utilização dos equipamentos e claro, por encher meus olhos com todas as suas receitas de MasterChef.

Agradeço ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Roberto Alves Guimarães, por todo o auxílio prestado durante estes dois anos, sempre disposto a responder minhas dúvidas e solicitações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, por me permitir aprender e me acolher durante a execução deste trabalho com toda sua estrutura, bem como a todos os professores e colegas que compõem este programa, por partilharem conhecimento e companheirismo.

À Universidade Federal do Paraná, o local que escolhi para ser minha segunda casa. Sou grata por fazer parte desta comunidade que valoriza a educação, o ensino, o conhecimento científico e acima de tudo, que valoriza a verdade. Sou envaidecida de poder fazer parte desta universidade já histórica, de impacto ímpar em nossa sociedade.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa.

À Fundação Araucária e ao Programa de Pesquisa para o SUS – PPSUS pelo financiamento desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos aqueles que caminharam comigo durante este trajeto. Vocês foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho e ao meu desenvolvimento pessoal.

*“Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.” (ARTHUR SCHOPENHAUER, *Parerga und Paralipomena*, 1851.)*

RESUMO

O câncer é a segunda principal causa de morte em humanos em todo o mundo. No Brasil, o câncer de pele do tipo melanoma corresponde a cerca de 3% das neoplasias malignas registradas, sendo este considerado o tipo mais grave de câncer de pele. O Brasil possui alta biodiversidade de compostos naturais de grande potencial biotecnológico que podem desempenhar importante papel na prevenção e tratamento de doenças, como o câncer. Com base nisso, esta pesquisa avaliou *in vitro* a atividade antitumoral de frações de polissacarídeos obtidos da casca e polpa de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) – FA - e da casca de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Maracujá) – FM -, sobre a linhagem de melanoma murino B16F10. A avaliação de citotoxicidade dos polissacarídeos foi realizada em modelo de células normais de fibroblasto murino BALB/c 3T3. O tratamento com a FA nas concentrações 5 e 10 µg/ml exerceu efeitos citotóxicos na linhagem tumoral sem exercer atividade citotóxica e redução da viabilidade de células normais. Além disto, o tratamento com esta fração resultou em diminuição da proliferação das células de melanoma nas duas concentrações estudadas (5 e 10 µg/ml) em todos os tempos de exposição avaliados (24, 48, 72h). Resultados significativos também foram observados ao avaliarmos os impactos de FA sobre a capacidade clonogênica da linhagem tumoral, onde o tratamento com a dosagem mais alta (10 µg/ml) diminuiu o número médio de colônias. FM não apresentou efeitos sobre a viabilidade das células tumorais, e aumentou a viabilidade das células normais. Apenas a concentração de 100 µg/ml foi eficiente em reduzir a proliferação da linhagem tumoral, sendo este efeito observado apenas em 48h de tratamento. A análise clonogênica demonstrou um resultado semelhante ao obtido nos grupos tratados com a fração obtida de Açaí, em que o grupo tratado com a maior concentração em estudo (100 µg/ml) apresentou redução significativa do número médio de colônias. Nenhuma das frações estudadas (FA e FM) exerceu influência sobre a capacidade de migração da linhagem tumoral. A análise da expressão de *MAPK1* demonstrou que o tratamento com a menor concentração de FA (5 µg/ml) e com a menor concentração de FM (100 µg/ml) resultou na diminuição da expressão do gene, enquanto somente o tratamento com FA na concentração (5 µg/ml) apresentou impacto sobre a expressão de *PARP1*, tendo sido observada redução significativa da expressão. Estes resultados demonstram os efeitos promissores destas frações polissacarídicas sobre células tumorais, contudo mais estudos *in vitro*

e *in vivo* são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na interação biológica entre células tumorais e estas moléculas.

Palavras-chave: Melanoma. Polissacarídeos. Açai. Maracujá. B16F10.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death in humans worldwide. In Brazil, melanoma corresponds about 3% of registered malignant neoplasms, which is considered the most serious type of skin cancer. Brazil has a high biodiversity of natural compounds with high biotechnological potential that can play an important role in prevention and treatment of diseases such as cancer. Based on this, this research evaluated *in vitro* the antitumor activity of fractions of polysaccharides obtained from the bark and pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) and the bark of *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Passion fruit), on the murine melanoma lineage B16F10. The evaluation of the cytotoxicity of the polysaccharides was performed in a normal murine fibroblast cell line model BALB/c 3T3. Treatment with Açaí polysaccharide fraction at concentrations of 5 and 10 µg/ml was able to exert cytotoxic effects on the tumor lineage without exerting cytotoxic activity and reducing the viability of normal cells. Furthermore, treatment with this fraction resulted in decreased proliferation of melanoma cells at the two concentrations studied (5 and 10 µg/ml) at all exposure times evaluated (24, 48, 72h). Positive results were also observed when evaluating the impacts of the Açaí polysaccharide fraction on the clonogenic capacity of the tumoral cells line, where the treatment with the highest dose (10 µg/ml) decreased the mean number of colonies. The polysaccharide fraction obtained from Passion Fruit showed no effects on the viability of tumor cells, and increased the viability of normal cells. Only the concentration of 100 µg/ml was efficient in reducing the proliferation of the tumoral cell line, and this effect was observed only after 48h of treatment. The clonogenic analysis showed a similar result to that obtained in the groups treated with the fraction obtained from Açaí, in which the group treated with the highest concentration under study (100 µg/ml) showed a significant reduction in the average number of colonies. None of the fractions studied (Açaí and Passion Fruit) exerted an influence on the migration capacity of the tumoral cell line. The analysis of *MAPK1* expression showed that the treatment with the lowest concentration of the Açaí polysaccharide fraction (5 µg/ml) and with the lowest concentration of the fraction obtained from Passion Fruit (100 µg/ml) resulted in a decrease in gene expression, while only the treatment with the fraction obtained from Açaí at the concentration (5 µg/ml) had an impact on *PARP1* expression, with a significant reduction in expression. These results demonstrate the promising effects of these polysaccharide fractions on tumor cells, however more *in vitro* and *in vivo* studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the biological interaction between tumor cells and these molecules.

Keywords: Melanoma. Polysaccharides. Açaí. Passion Fruit. B16F10.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Tipos de câncer de maior incidência no mundo no ano de 2020	19
FIGURA 2 – Ilustração esquemática das estruturas presentes na parede celular vegetal.	24
FIGURA 3 – Esquema da estrutura das pectinas.....	25
FIGURA 4 – Frutos pretos de Açaí.....	27
FIGURA 5 – Frutos de Maracujá.....	28
FIGURA 6 – Capacidades adquiridas do câncer.....	30
FIGURA 7 – Localização genômica de <i>MAPK1</i>	31
FIGURA 8 – Localização genômica de <i>PARP1</i>	32
FIGURA 9 – Viabilidade de células tumorais B16F10 pelo ensaio de NR.....	45
FIGURA 10 – Viabilidade de células normais BALB/c 3T3 pelo ensaio de NR.	46
FIGURA 11 – Citotoxicidade em células tumorais B16F10 pelo ensaio de MTT.	47
FIGURA 12 – Citotoxicidade em células normais BALB/c 3T3 pelo ensaio de MTT.	48
FIGURA 13 – Ensaio de Proliferação Celular por Cristal Violeta da linhagem celular B16F10 após o tratamento com FA.	49
FIGURA 14 – Ensaio de Proliferação Celular por Cristal Violeta da linhagem celular B16F10 após o tratamento com FM.....	50
FIGURA 15 – Ensaio de Migração Celular dos grupos tratados com FA.	51
FIGURA 16 – Ensaio de Migração Celular dos grupos tratados com FM.	52
FIGURA 17 – Capacidade de Migração Celular dos grupos tratados com FA pela metodologia de <i>Scratch</i>	53
FIGURA 18 – Capacidade de Migração Celular dos grupos tratados com FM pela metodologia de <i>Scratch</i>	54
FIGURA 19 – Procedimento de contagem de colônias.....	55
FIGURA 20 – Capacidade Clonogênica pela metodologia de CV após o tratamento com FA.....	56
FIGURA 21 – Capacidade Clonogênica pela metodologia de CV após o tratamento com FM.....	57
FIGURA 22 – Gráfico de enriquecimento de vias.....	58
FIGURA 23 – <i>Up Set Plot</i>	59
FIGURA 24 – Expressão Relativa de <i>MAPK1</i> e <i>PARP1</i> após o tratamento com FA.....	61
FIGURA 25 – Expressão Relativa de <i>MAPK1</i> e <i>PARP1</i> após o tratamento com FM.....	62

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Composição monossacarídica e polissacarídica das frações FA e FM	36
QUADRO 2 – Genes afetados em células tumorais por diferentes gêneros de plantas frutíferas	59

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

μg - Micrograma

ABC - *ATP-binding cassette transporters*

Ac.COOH – Ácido Acético Glacial

ACTB – *Actin Beta*

AKT1 - *Serine/Threonine Kinase 1*

BAD - *BCL2 Associated Agonist of Células Death*

BAX - *BCL2 Associated X*

BCL2 - *BCL2 Apoptosis Regulator*

BRCA - *DNA Repair Associated*

CASP3 – *Caspase 3*

CASP8 – *Caspase 8*

CASP9 – *Caspase 9*

CCND1 - *Cyclin D1*

CDKN1A - *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*

cDNA - Complementary DNA

CO₂ – Dióxido de Carbono

Ct – Ciclo de Quantificação

CV – Cristal Violeta

DNA – Ácido Desoxirribunucleico

DEPC - Dietil Pirocarbonato

EtOH – Etanol

FA – Fração de Polissacarídeos Obtidos de Açaí

FM – Fração de Polissacarídeos Obtidos de Maracujá

GC-MS - *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*

GpP – Glicoproteína-P

h - Horas

HPRT1 - *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*

HPSEC - *High Pressure Size Exclusion Chromatography*

MAPK1 - *Mitogen-Activated Protein Kinase 1*

MAPK14 - *Mitogen-Activated Protein Kinase 14*

MAPK3 - *Mitogen-Activated Protein Kinase 3*

MAPK8 - *Mitogen-Activated Protein Kinase 8*

MDR – *Multiple Drug Resistance*

ml - Mililitro

MMP9 - Matrix Metalloproteinase 9

MTT – Brometo de 3- (4,5-dimetil)Difenil Tetrazólio

NFKB1 - Nuclear Factor Kappa B Subunit 1

nm - Nanometro

NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*

NPCARE - Natural Products-CAnceR gene REgulation

NR – *Neutral Red*

PARP1 - Poly [ADP-ribose] polymerase 1

PBS - Phosphate Buffered Saline

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PFA - Paraformaldeído

PRKCA - Protein Kinase C Alpha

PTGS2 - Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2

RELA – Transcription Factor p65

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

RT-qPCR - *Reverse Transcriptase Quantitative PCR*

SFB – Soro Fetal Bovino

TNFSF10 - TNF Superfamily Member 10

TP53 - Tumor Protein p53

UV – Ultra Violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CÂNCER	18
2.2 MELANOMA	20
2.3 TRATAMENTO	21
2.4 POLISSACARÍDEOS VEGETAIS E SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL	23
2.5 AÇAÍ	26
2.6 MARACUJÁ	28
2.7 EXPRESSÃO DE <i>MAPK1</i> E <i>PARP1</i> E SUA RELAÇÃO COM A PROGRESSÃO TUMORAL	29
3 JUSTIFICATIVA	33
4 OBJETIVOS	34
4.1. Objetivo geral	34
5 MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1 DESENHO EXPERIMENTAL	35
5.2 CULTIVO CELULAR	36
5.3 DILUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	37
5.4 ESTUDO PILOTO	37
5.5 VIABILIDADE CELULAR	38
5.6 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	39
5.7 CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR	39
5.8 CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO CELULAR	40
5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	40
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6 RESULTADOS	44
6.1 ESTUDO PILOTO	44
6.1.1 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (<i>EUTERPE OLERACEA</i>) E DE MARACUJÁ (<i>PASSIFLORA EDULIS</i>) SOBRE A VIABILIDADE CELULAR POR NR	44

6.1.2 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (<i>EUTERPE OLERACEA</i>) E DE MARACUJÁ (<i>PASSIFLORA EDULIS</i>) SOBRE A VIABILIDADE CELULAR POR MTT.....	46
6.4 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (<i>EUTERPE OLERACEA</i>) E DE MARACUJÁ (<i>PASSIFLORA EDULIS</i>) SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	49
6.4 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (<i>EUTERPE OLERACEA</i>) E DE MARACUJÁ (<i>PASSIFLORA EDULIS</i>) SOBRE A CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR	51
6.5 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (<i>EUTERPE OLERACEA</i>) E DE MARACUJÁ (<i>PASSIFLORA EDULIS</i>) SOBRE A CAPACIDADE CLONOGÊNICA CELULAR	54
6.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	57
7. DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

O câncer constitui um importante problema de saúde pública, uma vez que corresponde a segunda principal causa de morte em humanos no mundo, ocasionando cerca de 9,6 milhões de óbitos em 2018 (OPAS, 2018).

Melanoma é o nome dado ao câncer de pele originado em decorrência de mutações genéticas em melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina, pigmento que proporciona a coloração da pele (HARTMAN & LIN, 2019). O câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente no Brasil correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos, contudo, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas registradas (INCA, 2021). De acordo com o Atlas de Mortalidade do Câncer – SIM, no ano de 2019 foram registradas 1.978 mortes pela doença no país, sendo 1.159 em homens e 819 em mulheres. Devido a sua grande agressividade decorrente de sua alta capacidade metastática, o melanoma é considerado o tipo mais grave dentre os tumores de pele, podendo apresentar uma taxa de mortalidade em torno de 70% (PRADO *et al*, 2019). Apesar da alta mortalidade, quando detectado nas fases iniciais, o prognóstico da doença seja considerado bom (INCA, 2021).

A escolha do tipo de abordagem a ser utilizada no tratamento do câncer depende principalmente da natureza e da extensão do tumor (ALMEIDA, 2012), sendo a ressecção (cirurgia), a radioterapia e a quimioterapia as opções mais frequentes (LEAL *et al.*, 2012; THANVI, 2014). Uma vez que apenas um terço dos pacientes alcança a cura por meio de medidas ditas locais como a radioterapia e a cirurgia, cerca de 60-70% dos pacientes acometidos por neoplasias necessitam de uma abordagem de tratamento sistêmica, como a quimioterapia. Entretanto, sabe-se que mesmo possuindo o objetivo primário de destruir somente as células tumorais, sabe-se que o tratamento quimioterápico, por possuir atuação não específica, causa danos não somente às células malignas, mas também às células normais, em especial às células de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e imunológicas (KWON, 2007).

O impacto econômico relacionado ao crescimento da doença tem se tornado cada vez mais expressivo. Os gastos relacionados ao tratamento do câncer aumentaram de 470 milhões para 3,3 bilhões de reais entre os anos de 1999 e 2015,

sendo que cerca de dois terços destes gastos estão relacionados somente à quimioterapia (BOUZAS,2016). Levando em conta não somente o impacto econômico, como também a ineficiência dos tratamentos disponíveis em muitos casos de câncer, a pesquisa por novas moléculas ou conjunto de compostos obtidos de fontes naturais tem crescido consideravelmente (ZHANG *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2017).

O Brasil possui alta biodiversidade de plantas com compostos bioativos naturais de alto potencial biotecnológico para a indústria farmacêutica (ALESSANDRA-PERINI, 2018). Dentre estes compostos, uma grande variedade de polissacarídeos e complexos polissacarídeos-proteínas extraídos de variadas fontes naturais, têm atraído especial atenção de pesquisadores em virtude de seus efeitos imunomoduladores e anti tumorais (OOI, 2000). Além destes fatores, segundo Wang (2018), os polissacarídeos naturais apresentam baixa toxicidade e efeitos colaterais em células normais.

Levando em consideração o conhecimento de que frutas são ricas fontes de uma variada gama de polissacarídeos, e sabendo-se que tais polímeros apresentam diversas atividades biológicas, o presente estudo tem objetivo de avaliar *in vitro* a atividade de polissacarídeos provenientes da casca e polpa de Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e da casca de Maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), na linhagem de melanoma murino B16F10.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

Câncer é o termo genérico utilizado para descrever um conjunto de diversas doenças causadas pelo crescimento celular acelerado e desordenado (INCA, 2019). Estas células podem ainda possuir a capacidade de migrar para tecidos e órgãos adjacentes, processo conhecido como metástase, a principal causa de morte por câncer (FERLAY *et al.*, 2014). Podendo ter origem em diversos tipos celulares, os tumores podem ser classificados como carcinomas, originados a partir de tecidos epiteliais; sarcomas, originados a partir de tecidos conjuntivos; e leucemias, originadas a partir de células sanguíneas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Estes tumores podem ser considerados benignos, quando revestidos por tecido fibroso, possibilitando sua remoção sem maiores danos ao organismo; ou malignos, por poderem expressar formas secundárias de tumor e metástase decorrentes de sua capacidade de invadir a corrente sanguínea e vasos linfáticos (INCA, 2018).

Fatores externos e internos estão relacionados ao desenvolvimento de cânceres, podendo estes fatores agirem de forma isolada ou em sequência, promovendo a carcinogênese (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Os fatores externos mais comumente associados ao desenvolvimento de câncer são aqueles relacionados aos hábitos e costumes, bem como ao ambiente no qual o indivíduo está inserido. Dentre os fatores predisponentes para o desenvolvimento do câncer, pode-se citar o consumo de tabaco e álcool, exposições a produtos químicos, radiação e infecções. Em contrapartida, os fatores internos referem-se a fatores genéticos, hormonais, imunitários e alterações metabólicas.

O câncer constitui um importante problema de saúde pública, uma vez que corresponde à segunda principal causa de morte em humanos no mundo, ocasionando cerca de 9,6 milhões dos óbitos em 2018 (OPAS, 2018). Os tipos de câncer de maior incidência no mundo (Figura 1) são o de mama (11,7%), o de pulmão (11,4%), colorretal (10%) e próstata (7,3%) (SUNG *et al.*, 2021).

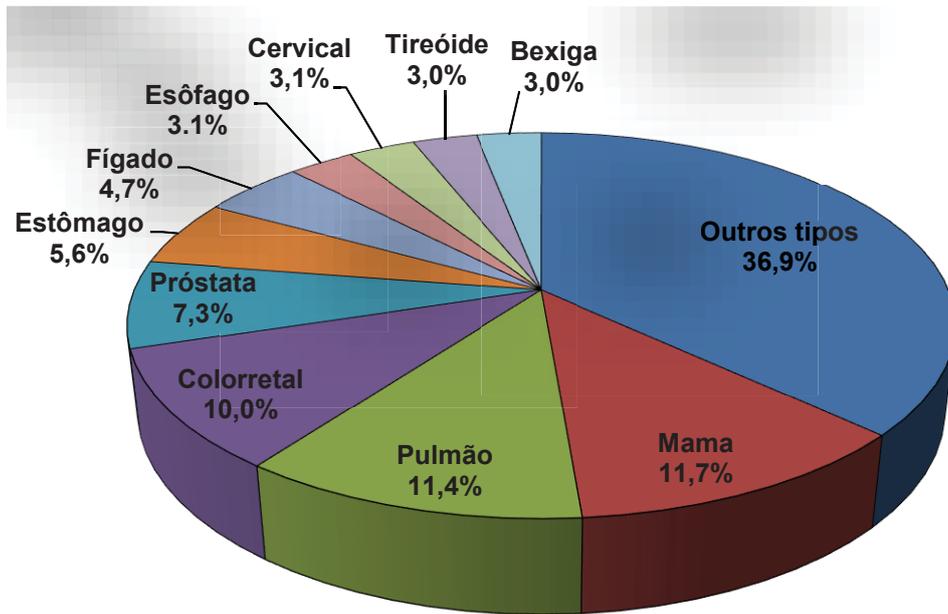


FIGURA 1: Tipos de câncer de maior incidência no mundo no ano de 2020. (FONTE: Adaptado de Sung, H. *et al.* 2021)

De acordo com dados do INCA (2020), o câncer é a segunda maior causa de mortes no Brasil, estimando-se para cada ano do triênio 2020-2022 o surgimento de aproximadamente 625 mil casos da doença. Destes novos casos previstos, estima-se que 177 mil estarão relacionados ao câncer de pele não melanoma, seguido pelos cânceres de próstata e mama com 66 mil casos cada, colorretal com 41 mil casos, pulmão com 30 mil casos e cânceres de estômago com 21 mil casos (BRAY *et al.*, 2018). Já em relação ao câncer de pele melanoma, tipo de tumor cutâneo de maior gravidade e mortalidade devido a sua grande capacidade de formação de metástases, estima-se que no Brasil ocorrerão 4.200 novos casos entre os homens e 4.250 em mulheres. Estes valores são correspondentes a uma estimativa de risco de 4,03% a cada 100 mil homens e 3,94% a cada 100 mil mulheres (BRAY *et al.*, 2018).

O impacto econômico relacionado ao crescimento da doença tem se tornado cada vez mais expressivo. Segundo Bouzas (2016), no Brasil os gastos relacionados ao tratamento do câncer aumentaram de 470 milhões para 3,3 bilhões de reais entre os anos de 1999 e 2015, sendo que cerca de dois terços destes gastos estão relacionados somente à quimioterapia. Já para o cenário mundial, as estimativas da *American Cancer Society* são de que estes valores aumentem de 290 para 458 bilhões

de dólares entre os anos de 2010 e 2030. Por conta disto, a busca por tratamentos eficientes e de menor custo têm apresentado um apelo cada vez mais significativo.

2.2 MELANOMA

Melanoma é o nome dado ao câncer de pele originado em decorrência de mutações gênicas em melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina, pigmento que proporciona a coloração da pele (HARTMAN & LIN, 2019). Este tipo de câncer pode se manifestar em qualquer parte do corpo, como pele e mucosas, revelando-se em forma de manchas, pintas ou sinais. Embora mais frequente em adultos brancos, o melanoma também afeta indivíduos de pele negra, atingindo comumente as áreas mais claras do corpo, como as palmas das mãos e as solas dos pés (INCA, 2021).

O principal fator associado ao desenvolvimento de melanoma é a exposição à radiação ultravioleta (UV), uma vez que esta exposição pode resultar em processos relacionados à progressão tumoral como danos ao DNA, mutações gênicas, aumento do estresse oxidativo e indução da resposta inflamatória, além de imunossupressão (PETTERS *et al.*, 2019; GORDON, 2013).

A exposição aos raios UV se dá durante os períodos de exposição solar, ou ainda durante a exposição a soldagens e ao bronzear artificial (CARR; SMITH; WERNBERG, 2019). Estudos demonstram que o aumento da exposição ocupacional ao sol e, portanto, à exposição UV, estão relacionados a um aumento do risco de desenvolvimento de melanoma (PEREIRA, 2017; PETTERS *et al.*, 2019).

No Brasil, o câncer de pele é o tipo mais frequente de câncer correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos, contudo, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas registradas (INCA, 2021). De acordo com o Atlas de Mortalidade do Câncer – SIM, no ano de 2019 foram registradas 1.978 mortes pela doença no país, sendo 1.159 entre homens e 819 entre mulheres.

Existem quatro principais subtipos de melanoma (RASTRELLI *et al.*, 2014):

1. Melanoma extensivo superficial: Tipo mais comum de melanoma, correspondendo a 70% dos casos da doença. Neste subtipo, ocorre

inicialmente um crescimento radial e depois o crescimento vertical (invasivo);

2. Melanoma nodular: Apresenta lesões de crescimento rápido, podendo ser elevadas ou polipoides, de coloração azul ou preta, que apresentam fase inicial de crescimento vertical. Este subtipo possui incidência de 15-30%;
3. Melanoma lentigo maligno: Acomete mais comumente idosos que passaram por exposição crônica ao sol. Inicialmente se manifesta semelhante a uma sarda, e evolui crescendo e tornando-se mais escura, com formato assimétrico, exibindo fase de crescimento vertical. O melanoma lentiginoso maligno corresponde a 4-10% dos casos de melanoma;
4. Melanoma acral lentiginoso: Corresponde a <5% dos casos da doença, e suas lesões se manifestam de forma mais comum nas solas dos pés e palma das mãos, além das superfícies subungueais e, em alguns casos, as lesões podem se manifestar nas regiões mucosas.

Devido a sua grande capacidade de formação de metástases, sendo os principais locais de recorrência cérebro, pulmões e fígado (DUNKI-JCOBS *et al.*, 2013), o melanoma é considerado o tipo mais grave dentre os tumores de pele, podendo apresentar uma taxa de mortalidade em torno de 70% (PRADO *et al.*, 2019). Isto faz com que, quando detectado nas fases iniciais, o prognóstico da doença seja considerado bom (INCA, 2021), sendo possível, em muitos casos, a remoção do tumor. Ao alcançar o estágio metastático, a taxa de sobrevivência dos pacientes é bastante baixa, sendo o tempo de vida estimado entre seis e nove meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

2.3 TRATAMENTO

A escolha do tipo de abordagem a ser utilizada no tratamento do câncer depende principalmente da natureza e da extensão do tumor (ALMEIDA, 2012), sendo a ressecção (cirurgia), a radioterapia e a quimioterapia as opções mais frequentes (LEAL *et al.*, 2012; THANVI, 2014). Uma vez que apenas um terço dos pacientes alcança a cura por meio de medidas ditas locais como a radioterapia e a cirurgia, cerca

de 60-70% dos pacientes acometidos por neoplasias necessitam de uma abordagem de tratamento sistêmica, como a quimioterapia, em virtude do desenvolvimento precoce de micro metástases, sendo esta, portanto, considerada a principal forma de tratamento (LEMKE, 2012).

A quimioterapia consiste na administração de agentes químicos denominados quimioterápicos, para destruição de células tumorais. Estes agentes podem ser administrados via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal e de forma tópica (INCA, 2018).

Mesmo possuindo o objetivo primário de destruir somente as células tumorais, sabe-se que o tratamento quimioterápico, por possuir atuação não específica, causa danos não somente às células malignas, mas também às células normais, em especial às células de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e imunológicas (KWON, 2007). De acordo com Schein (2006), os efeitos tóxicos da quimioterapia são dependentes da dose, do modo de ação e interação entre os agentes quimioterápicos utilizados, sendo, portanto, os efeitos colaterais mais observados em pacientes submetidos a este tipo de tratamento: náuseas, vômitos, alopecia, diarreia ou constipação, perda de cabelo e maior susceptibilidade a infecções (OLIVEIRA, 2002; BUSHATSKY *et al.*, 2017). Além disto, o tratamento quimioterápico traz importante impacto social sobre os pacientes, estando associado frequentemente a dor, sofrimento, medo e ameaça, repercutindo de forma substancial em seu cotidiano (CUNHA *et al.*, 2017).

Apesar de amplamente utilizada, a quimioterapia apresenta diversos obstáculos, entre eles o desenvolvimento de resistência às substâncias utilizadas no tratamento. A resistência a estes medicamentos varia de paciente para paciente, podendo se manifestar nos estágios iniciais do tratamento, dando origem ao fenômeno de resistência “*de novo*”, ou ser desenvolvida ao decorrer do processo de tratamento pela eliminação de células mais sensíveis ao tratamento (NASCIMENTO, 2016). De acordo com Kappelmayer *et al.* (2004) e Szakács *et al.* (2006), é possível então, observar-se resistência genética induzida pelo próprio tratamento ou ainda a resistência como evento espontâneo.

O fenótipo MDR (*Multiple Drug Resistance*) tem sido frequentemente associado a alterações no metabolismo de drogas, bem como a redução de apoptose, aumento na eficiência de reparo de DNA, dentre outras alterações no ciclo celular (SZAKÁCS

et al., 2006). Segundo Kuete *et al.* (2016), este fenótipo está associada à superexpressão de gpP (glicoproteínas transmembrana-P), que atua reduzindo os níveis celulares de drogas citotóxicas, por meio de um aumento do efluxo de drogas citotóxicas hidrofóbicas. Este efluxo ocorre por meio de um sistema dependente de energia, mediado por transportadores da superfamília *ATP-binding cassette transporters* (ABC). Dentre os 48 membros desta superfamília, 16 transportadores são associados a doenças humanas, sendo os transportadores ABCB1 (glicoproteína-P/MDR1), ABCC1 (MRP1) e ABCG2 (BCRP1) os mais amplamente associados a resistência a drogas em pacientes com câncer (LI *et al.*, 2015).

Considerando a ineficiência dos tratamentos disponíveis em muitos casos de câncer, a pesquisa por novas moléculas ou conjunto de compostos obtidos de fontes naturais tem crescido consideravelmente (ZHANG *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2017).

2.4 POLISSACARÍDEOS VEGETAIS E SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL

O Brasil possui alta biodiversidade de plantas com compostos bioativos naturais de alto potencial biotecnológico para a indústria farmacêutica (ALESSANDRA-PERINI, 2018). Dentre estes compostos, uma grande variedade de polissacarídeos e complexos polissacarídeos-proteínas extraídos de variadas fontes naturais, tem atraído especial atenção de pesquisadores em virtude de seus efeitos imunomoduladores e antitumorais (OOI, 2000), e por sua baixa toxicidade e efeitos colaterais em células normais (WANG *et al.*, 2018).

Os polissacarídeos são moléculas formadas por carboidratos poliméricos, sendo estes compostos longas cadeias de unidades monossacarídicas que permanecem unidas por intermédio de ligações glicosídicas (GUO *et al.*, 2017). Estes polissacarídeos diferem entre si no tipo de unidade, em seu grau de ramificação, no tipo de ligação presente, bem como no comprimento de suas cadeias, podendo, portanto, apresentar diferentes composições e funções (LEHNINGER, 2018).

Aos polissacarídeos presentes na lamela média e nas paredes celulares primária e secundária de todas as plantas, dá-se o nome de pectinas (Figura 2). Estas pectinas apresentam estrutura química heterogênea, sendo sua heterogeneidade dependente da origem, de sua localização na planta e do método utilizado para sua extração

(DRANCA; OROIAN, 2018). As pectinas têm como principal constituinte estrutural resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) (MÜLLER-MAATSCH *et al.*, 2016).

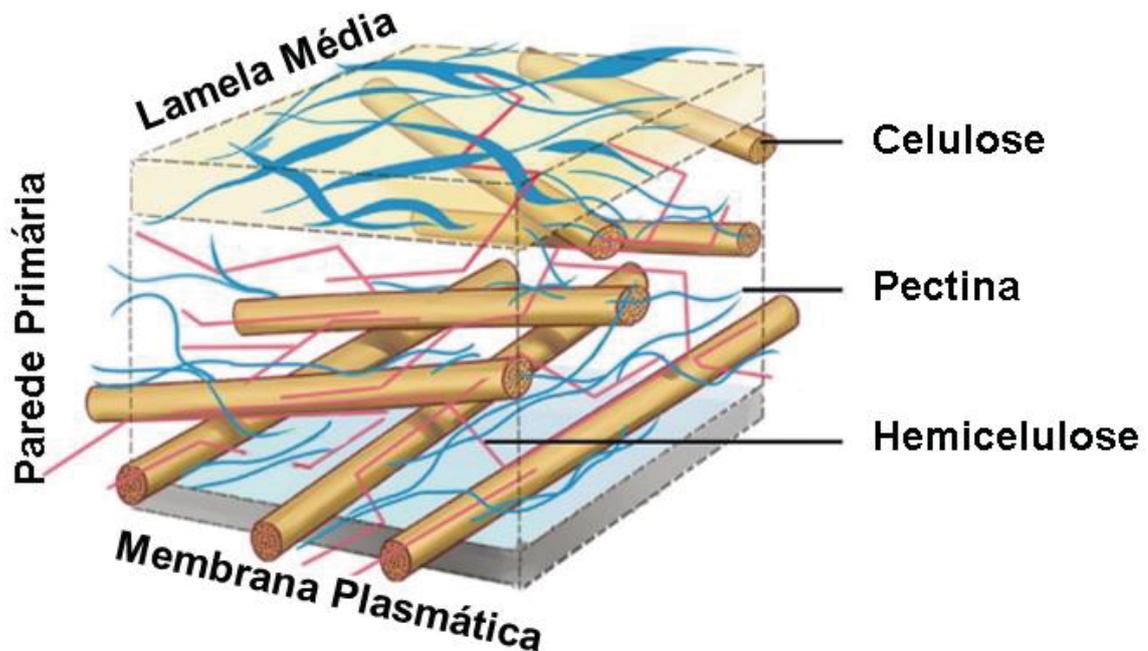


FIGURA 2 – Ilustração esquemática das estruturas presentes na parede celular vegetal.
(FONTE: Adaptado de ZHAO *et al.*, 2019)

Para que um polissacarídeo seja considerado pectina, deve conter em sua composição pelo menos 65% de ácido galacturônico (MÜLLER-MAATSCH *et al.*, 2016), cadeia linear formada por monômeros de ácido galacturônico, chamada homogalacturonano, e/ou ramnogalacturonano I formado pelos resíduos de ácido galacturônico que foram parcialmente substituídos por resíduos de α -L-ramnose em posição α (1 \rightarrow 2). Além disto, pode conter em sua composição ramnogalacturonano II que apresenta ligadas em sua estrutura principal, várias cadeias laterais contendo xilose, arabinose, glicose, fucose, manose ou galactose (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). A Figura 3 demonstra um esquema da estrutura das pectinas.

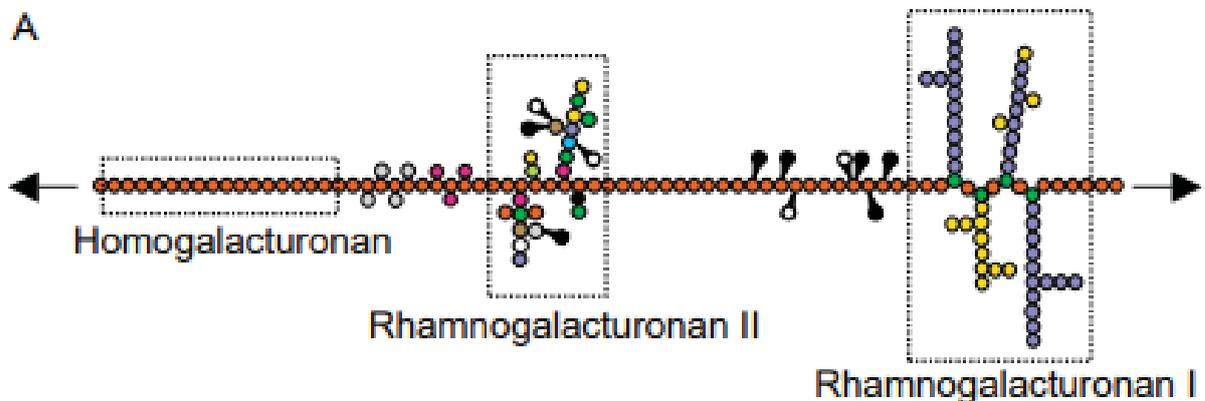


FIGURA 3 – Esquema da estrutura das pectinas. (FONTE: Adaptado de Willats; Knox; Mikkelsen, 2006)

De acordo com Marenha (2015), as pectinas são bastante conhecidas por sua atividade antitumoral. A hidrólise da pectina resulta em polímeros contendo ácido galacturônico, galactose e arabinose, mistura que pode atuar inibindo a proliferação celular de tumores, bem como metástases, além de sua conhecida atividade imunomodulatória (COURTS, 2013; MORRIS *et al.*, 2013).

Polissacarídeos extraídos de frutas, ricas fontes destes compostos, têm sido alvos de diversos estudos para avaliação de seu potencial de utilização no tratamento de doenças como o câncer. Ao avaliarem a atividade antitumoral de polissacarídeos provenientes de Acerola (*Malpighia emarginata*) sobre linhagem celulares de carcinoma de células escamosas orais (HSC-S) e carcinoma da glândula submandibular humana (HSG), Motohashi *et al.* (2004) observaram que o tratamento com polissacarídeos exerceu alta atividade citotóxica sobre as células tumorais em comparação com as células normais. Os mesmos autores também observaram que, em comparação ao controle positivo tratado com verapamil, os grupos tratados com polissacarídeos apresentaram uma maior inibição da função das glicoproteínas-P (gpP) em células tumorais MDR, sugerindo, portanto, sua possível aplicação quimioterápica.

Estudos avaliando o potencial antitumoral de polissacarídeos extraídos de Maçã (*Malus domestica*) demonstraram sua alta capacidade de prevenir a ocorrência de câncer de mama em ratos (LIU *et al.*, 2005). Delphi e Sepehri (2016), em estudos *in vitro* utilizando a linhagem celular de câncer de mama murino 4T1, observaram indução da apoptose, bem como inibição do crescimento celular, redução da fixação

celular e fragmentação da cromatina no grupo tratado com 0,1% de ácido α -D-galacturônico. Já em estudo complementar *in vivo* utilizando camundongos BALB/c, os mesmos autores observaram possível inibição de tumores por meio da superexpressão do gene *TP53* e aumento do número de células apoptóticas. Ao avaliarem os efeitos de pectina extraída de frutas cítricas ricas em homogalacturonana e rhamnogalacturonana I e II, polissacarídeos presentes na maioria das frutas, sobre a linhagem celular de melanoma murino B16F10, Kang *et al.*, (2006), observaram a inibição da proliferação das células tumorais no grupo tratado em relação ao grupo controle. Tais fatos demonstram o potencial do uso de polissacarídeos no tratamento de tumores.

2.5 AÇAÍ

A *Euterpe oleracea* Mart., conhecida popularmente como Açaí (Figura 4), é uma palmeira amplamente distribuída na região amazônica brasileira, sendo considerada nesta região, como a principal espécie do gênero *Euterpe* (OLIVEIRA; FARIAS; PENA, 2007). Tendo em vista sua utilização diversificada, sendo utilizada tanto pela indústria de alimentos, quanto na fabricação de cosméticos e fármacos, o Açaí tem se tornado um popular suplemento nutricional, devido aos seus já conhecidos efeitos sobre o metabolismo e sobre a estimulação do sistema imune (HOLDERNESS *et al.*, 2011). Por apresentar atividade anti-inflamatória e antioxidante, bem como por estimular a atividade antiproliferativa celular, o Açaí é considerado de alto valor biotecnológico e farmacêutico (SILVA *et al.*, 2014).



FIGURA 4 – Frutos pretos de Açai. (FONTE: Embrapa, 2021)

Embora grande parte da sua atividade antioxidante esteja relacionada aos seus componentes polifenóis, como as antocianinas e os flavonóides (NERI-NUMA *et al.*, 2018), outros compostos abundantemente presentes na fruta, como os polissacarídeos têm sido amplamente investigados quanto a seu potencial imunomodulador. Em estudo realizado, Holderness *et al.* (2011) observaram que os tratamentos contendo polissacarídeos provenientes de Açai estimularam a atividade de monócitos e macrófagos. Em estudo conduzido pelos mesmos pesquisadores em modelo *in vivo*, após a administração intraperitoneal ou intratraqueal de polissacarídeos de Açai, foi possível observar aumento do recrutamento de neutrófilos nos respectivos tecidos analisados, destacando seu potencial para uso como terapia profilática contra doenças infecciosas. Além disto, Silva *et al.* (2014), em estudos *in vitro*, observaram que células da linhagem de carcinoma mamário MCF-7 tratadas com polissacarídeos extraídos de Açai, tiveram a autofagia induzida pelo aumento da expressão de LC3B-II.

Com base nisso, outros estudos vêm sendo desenvolvidos e apresentando dados consistentes sobre a atividade antitumoral destes polissacarídeos, demonstrando seus impactos sobre a redução na incidência, proliferação e no tamanho de tumores em diversos modelos experimentais da doença (ALEXANDRA-PERINI *et al.*, 2018). Apesar dos efeitos já conhecidos de compostos presentes no

Açaí, poucos estudos desenvolvidos avaliam o efeito antitumoral de seus polissacarídeos, sendo muito mais comuns estudos avaliando os efeitos de extratos da fruta e de outras partes da planta sobre células tumorais (FREITAS *et al.*, 2016; MONGE-FUENTES *et al.*, 2017; MARTINEZ *et al.*, 2018).

2.6 MARACUJÁ

Passiflora edulis f. flavicarpa, também conhecida como Maracujá (Figura 5), é um dos frutos mais cultivados no mundo. Este fruto, do qual já se conhece a variedade de propriedades farmacêuticas relacionadas a extratos das diferentes partes biologicamente ativas da planta (SILVA *et al.*, 2012), é utilizado, em sua maioria, na produção de sucos e possui significativa importância econômica no Brasil, seu maior produtor mundial (EPAGRI, 2020).



FIGURA 5 – Frutos de Maracujá. (FONTE: Embrapa, 2016)

A casca do maracujá, principal resíduo gerado durante o processamento da polpa, corresponde a cerca de 60% do fruto, e por ser rica fonte de fibras, em especial,

pectinas, vem sendo cada vez mais utilizada como coproduto alimentar (FERNANDES *et al.*, 2008).

Além de ser rica em compostos associados à atividade ansiolítica, anti-inflamatória e antioxidante, outros compostos como os polissacarídeos extraídos do fruto, têm apresentado alto potencial antitumoral.

Estudos *in vitro* conduzidos por Silva *et al.* (2012) avaliando o impacto destes polissacarídeos sobre modelo celular de melanoma, leucemia e câncer de cólon, demonstraram a inibição do crescimento tumoral, bem como aumento de leucócitos totais e normalização da percentagem de linfócitos e neutrófilos em modelos *in vivo*, sinalizando que estes polissacarídeos podem exercer influência sobre os mecanismos primários de defesa. Em estudo semelhante, Mota *et al.* (2018), observaram em modelos *in vivo* e *in vitro*, que extratos da fruta foram altamente citotóxicos sobre células de carcinoma mamário, estando este efeito associado à produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, que levam a dano mitocondrial, oxidação de proteínas e DNA, e apoptose.

Assim como para o açaí, apesar do potencial antitumoral já demonstrado, são escassos estudos envolvendo polissacarídeos desta fruta, sendo mais comuns estudos envolvendo outros extratos da planta (KUETE *et al.*, 2016; MOTA *et al.*, 2018; YAMAMOTO *et al.*, 2019).

2.7 EXPRESSÃO DE MAPK1 E PARP1 E SUA RELAÇÃO COM A PROGRESSÃO TUMORAL

Sabe-se que o câncer é uma doença resultante do acúmulo progressivo de diversas mutações gênicas, além de alterações em vias de proteínas envolvidas com o crescimento celular. Estas alterações resultam em falhas no funcionamento ou ainda a ausência de mecanismos envolvidos no processo de apoptose, fator que gera proliferação celular desordenada (OLIVEIRA, 2018). Diversas evidências demonstram que o processo de tumorigênese envolve várias etapas e que essas etapas refletem mudanças genéticas que favorecem a transformação de células normais em células malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Levando isto em consideração, Hanahan & Weinberg (2000) propuseram seis alterações fisiológicas ou de seis “*hallmarks*” que

em conjunto controlam o crescimento maligno, conforme disposto na Figura 6. De acordo com os autores, estes *hallmarks* expressam a capacidade bem sucedida destas células de burlarem mecanismos de defesa anticâncer presentes no organismo.

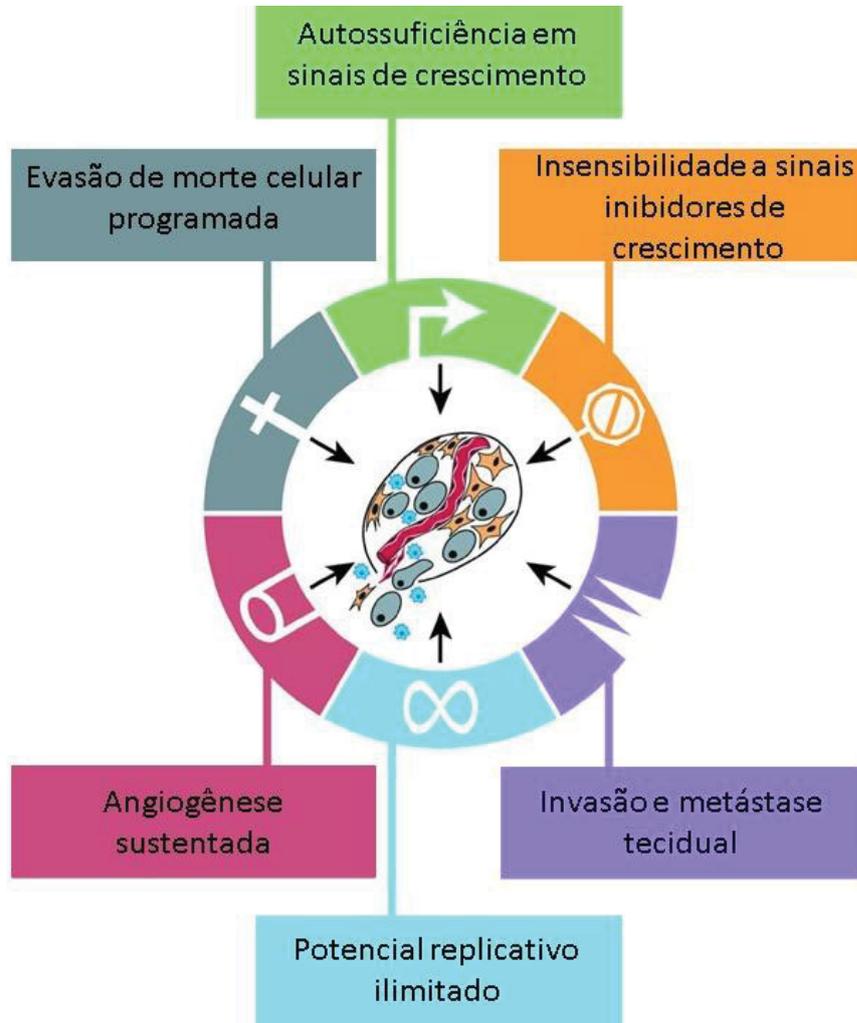


FIGURA 6 – Capacidades adquiridas do câncer. (FONTE: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2000)

Dentre todas as capacidades apresentadas pelas células tumorais, a capacidade de sustentar a proliferação celular de forma crônica é considerada fundamental, isto pois a manutenção do número de células, bem como a manutenção da estrutura e funcionamento do tecido normal, é coordenada por um rigoroso sistema de controle da produção e liberação de fatores promotores de crescimento, progressão e divisão celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Diversos genes e cascatas de sinalização estão envolvidos no processo de proliferação celular. Localizado em 22q11.22 (Figura 7) (GENECARDS, 2017), o gene

MAPK1 (*Mitogen-activated protein kinase 1*) atua na codificação de uma das proteínas pertencentes a família MAP quinase que atua em diversos processos de sinalização celular como a proliferação, a diferenciação, regulação transcricional e desenvolvimento celular (MCG, 2019).

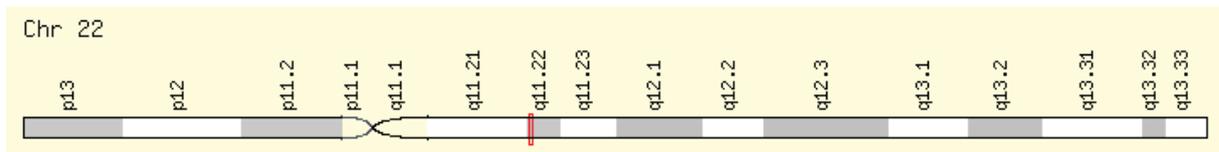


FIGURA 7 – Localização genômica do gene *MAPK1*. (FONTE: GeneCards, 2017)

Alterações em *MAPK1* estão presentes em 0,82% de todos os tumores (AACR, 2017). Ao realizarem uma coleta de 30 pares de amostras clínicas de pacientes com câncer de mama como parte de um estudo que visava avaliar os efeitos do miR-20a/*MAPK1*/*c-Myc* sobre a carcinogênese de mama e a quimiorresistência, Si *et al.* (2017) verificaram que os níveis de *MAPK1* eram significativamente mais elevados nos tecidos tumorais em comparação com os tecidos de mama normais do mesmo paciente. Os mesmos autores verificaram ainda, que o silenciamento do *MAPK1* prejudicou a proliferação de células de câncer de mama além de reduzir sua resistência ao tratamento. Em contrapartida, a superexpressão do gene resultou em maior proliferação das células tumorais e aumento da quimiorresistência. Outro estudo realizado por Bashanfer *et al.* (2018) verificou que a supressão do gene *MAPK1*, induziu a apoptose em células de leucemia em virtude de alterações mitocondriais estimuladas pela maior expressão de *TP53* e *TNFSF10* e da desregulação de *JUN*. Em melanoma, *MAPK1* está alterado em 1,84% dos pacientes (AACR, 2017).

Localizado na posição 1q42.12 (Figura 8), o *PARP1* (Poly [ADP-ribose] polymerase 1) é o gene responsável pela codificação da proteína PARP1. Assim como *MAPK1*, este gene está envolvido na regulação do processo de proliferação celular, além dos processos de diferenciação, transformação tumoral e recuperação de danos ao DNA por meio da proteína por ele codificada (MCG, 2019). Este gene apresenta alterações em 1,36% de todos os tumores, sendo a frequência de alteração do gene em pacientes de melanoma de 3,03% (AACR, 2017).

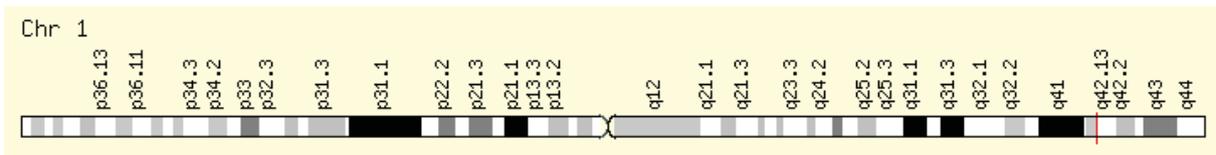


FIGURA 8 – Localização genômica do gene *PARP1*. (FONTE: GeneCards, 2017)

Diversos estudos já demonstraram que o gene *PARP1* e/ou a proteína PARP1 são superexpressos em uma variada gama de tumores. Salemi *et al.* (2013) realizaram um estudo visando comparar os níveis de expressão de PARP1 entre o tecido tumoral e o tecido normal de próstata. Este estudo demonstrou que o tecido tumoral de próstata apresentava uma maior expressão de PARP1 do que o tecido normal, relacionando sua expressão ao processo de carcinogênese. Semelhantemente, ao avaliarem a regulação da expressão de *PARP1* e de sua proteína em câncer de endométrio, Bi *et al.* (2013), verificaram uma superexpressão tanto do gene quanto da proteína em tecidos tumorais de endométrio. Esta superexpressão não foi observada pelos mesmos autores ao analisarem estas expressões em tecidos normais de endométrio. Estes e outros achados indicam uma correlação positiva entre a superexpressão de PARP1 e, portanto, de *PARP1* e a oncogênese (PAZZAGLIA & PIOLLI, 2019).

Nos últimos anos o *PARP1* e sua proteína tem atraído a atenção de muitas pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos tratamentos quimioterápicos. Diversos destes estudos visam avaliar os efeitos da inibição da atividade de PARP sobre o desenvolvimento tumoral. Atualmente inibidores de PARP têm sido utilizados com sucesso no tratamento de tumores de mama triplo-negativos com presença de mutação em *BRCA1/2*, sendo sua utilização baseada na diminuição na taxa de reparo proporcionada pela inibição de PARP (ASHWORTH & LORD, 2017). Ao avaliarem os efeitos de uma combinação do inibidor de PARP PJ37 e cisplatina ou temozolamida sobre a linhagem de melanoma murino B16F10, Cseh *et al.* (2019) verificaram que o tratamento com a combinação inibidor de PARP + cisplatina, e inibidor de PARP + temozolamida foram eficazes em reduzir a viabilidade das células tumorais em comparação com o tratamento dos compostos isolados.

Apesar dos estudos envolvendo inibidores de PARP, ainda não se sabe sobre os efeitos de polissacarídeos sobre sua expressão. Sendo assim, um dos objetivos

deste trabalho foi avaliar a expressão do gene PARP1 em resposta ao tratamento com diferentes concentrações das frações de polissacarídeos extraídos de Açaí e Maracujá.

3 JUSTIFICATIVA

O crescimento exponencial nos casos de câncer em todo o mundo mesmo frente à adoção de inúmeras estratégias preventivas, tem mobilizado fortemente o meio científico. A baixa efetividade dos tratamentos quimioterápicos decorrente do desenvolvimento de resistência aos químicos utilizados, a apresentação de inúmeros efeitos colaterais prejudiciais ao bem estar dos pacientes, e também os altos custos relacionados ao tratamento da doença, têm evidenciado a necessidade da busca por tratamentos alternativos eficazes, de baixo custo e que apresentem menores riscos à integridade dos pacientes.

A diversidade da flora brasileira tem sido alvo de inúmeras pesquisas focadas no aproveitamento do potencial biotecnológico de compostos naturais. Diversos estudos apontam para o potencial de polissacarídeos obtidos de plantas no tratamento de uma variedade de doenças, dentre elas o câncer. Levando em consideração o conhecimento de que frutas são ricas fontes de uma variada gama de polissacarídeos, e sabendo-se que tais polímeros apresentam diversas atividades biológicas, o presente estudo teve objetivo de avaliar *in vitro* a atividade de polissacarídeos provenientes da casca e polpa de Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e da casca de Maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), sobre o modelo experimental de células de melanoma murino.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a atividade antitumoral de frações de polissacarídeos obtidos da casca e polpa de *Euterpe oleracea* Mart. e da casca de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, sobre a linhagem de melanoma murino B16F10.

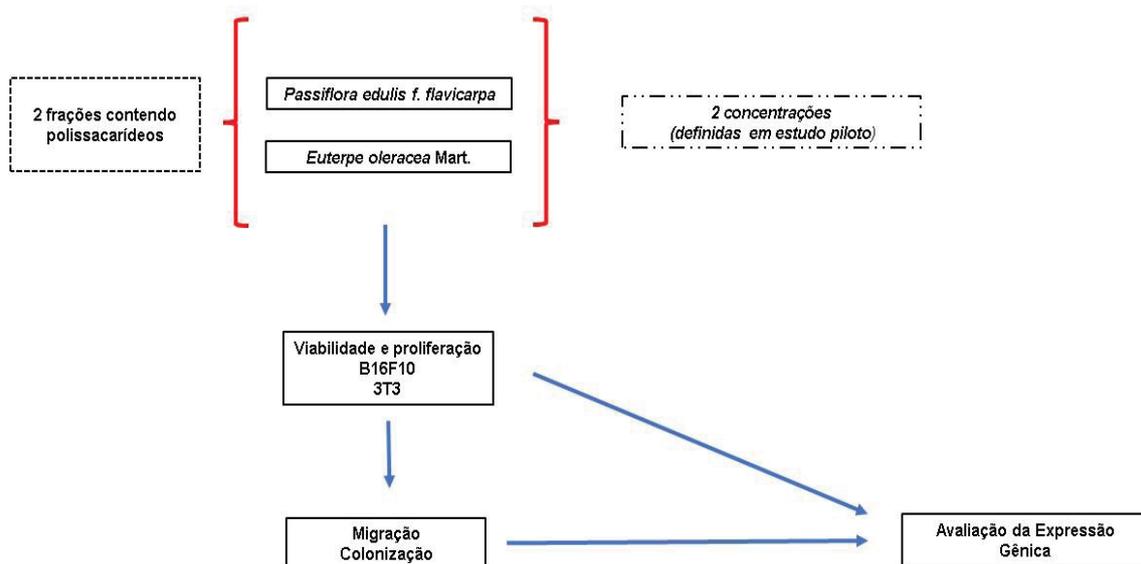
4.2. Objetivos específicos

Avaliar, *in vitro*, a atividade antitumoral de polissacarídeos obtidos da casca e polpa de Açaí e Maracujá sobre os seguintes parâmetros de células B16F10:

- Viabilidade celular;
- Capacidade proliferativa;
- Capacidade de migração celular;
- Capacidade de formação de colônias; e
- Expressão gênica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL



No presente estudo, estiveram sob investigação duas frações de polissacarídeos provenientes da casca e polpa de Açaí. (*Euterpe oleracea* Mart) – Fração **FA** - e da casca de Maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) – Fração **FM** - gentilmente cedidas pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. Estas frações passaram por um estudo piloto para determinação do efeito de diferentes concentrações sobre a viabilidade de as linhagens celulares tumoral de melanoma murino (B16F10) e não tumoral de fibroblasto murino (BALB/c 3T3). Com base nos resultados obtidos nas análises de viabilidade, foram selecionadas duas concentrações de cada uma das frações em estudo para utilização nas demais análises realizadas neste estudo e que sofram realizadas a fim de se obter informações sobre seus impactos sobre outros importantes parâmetros tumorais, como capacidade proliferativa, capacidade de migração, e capacidade clonogênica.

Além disto, também foi realizada uma análise transcriptômica envolvendo ferramentas de bioinformática, visando verificar os efeitos destas frações sobre a expressão de genes de interesse.

A caracterização química das frações utilizadas, foi realizada pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, que possui os equipamentos necessários para as análises de *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR), *High Pressure Size Exclusion Chromatography* (HPSEC), *Gas chromatography– mass spectrometry* (GC-MS), dentre outras. A composição das frações utilizadas neste estudo encontra-se no Quadro 1.

Fração	Monossacarídeos	Polissacarídeos
FA	Arabinose	Homogalacturonana
	Galactose	Arabinogalactana II
	Glucose	Ramnogalacturonana I
FM	Arabinose	Homogalacturonana Metil- esterificada
	Galactose	
	Glucose	

QUADRO 1 – Composição monossacarídica e polissacarídica das frações FA e FM. **FONTE:** Adaptado de CANTU-JUNGLES *et al.* (2016); ABOUD *et al.* (2019).

5.2 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares B16F10 (melanoma murino) e BALB/c 3T3 (fibroblasto murino) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas do Departamento de Biologia Celular da UFPR obtidas por meio de parceria com o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, e mantidas de acordo com as recomendações específicas para cada uma. Estas linhagens foram cultivadas em meio de cultura líquido do tipo RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L). As células foram então mantidas em incubadora em temperatura de 37°C, 90% de umidade, e com injeção de 5% de CO₂. O tempo de incubação das linhagens foi

ajustado em 72h. Todas as análises neste estudo foram realizadas em triplicata biológica.

5.3 DILUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A diluição dos polissacarídeos foi realizada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L). Após a diluição as soluções foram homogeneizadas por 5 minutos em temperatura ambiente e então filtradas em filtros de 0.22 μm (Millipore). As soluções foram homogeneizadas antes de cada experimento realizado.

Em cada experimento, o grupo controle passou pelos mesmos procedimentos dos grupos tratados, recebendo RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico em substituição ao tratamento recebido pelos demais grupos em mesmo volume.

5.4 ESTUDO PILOTO

Para a determinação das concentrações a serem utilizadas nos ensaios realizados no presente estudo, foi realizado um estudo piloto comparando os efeitos de cinco diferentes concentrações de FA e FM sobre as linhagens celulares tumoral (B16F10) e normal (BALB/c 3T3) pelo ensaio de viabilidade de MTT (abaixo descrito). Após avaliação dos resultados obtidos, foram selecionadas duas destas concentrações para dar prosseguimento às demais análises. As concentrações foram escolhidas levando em consideração seus efeitos sobre a redução da viabilidade das linhagens celulares, tendo sido selecionadas aquelas que obtiveram uma diminuição da viabilidade da linhagem tumoral e que apresentaram menores danos às células normais.

As linhagens celulares foram plaqueadas em placa de 96 poços respeitando a densidade adequada para cada linhagem de 5×10^2 células/poço para a linhagem B16F10, e 2×10^3 células/poço para a linhagem BALB/c 3T3. Foi respeitado o período de 24h pós plaqueamento para a ocorrência da fixação celular. Após este período, foi realizado o tratamento com as frações dos polissacarídeos nas concentrações 0

(controle), 2.5, 5, 10, 100 e 800 µg/ml. A análise de MTT foi procedida 72h após o tratamento.

5.5 VIABILIDADE CELULAR

Para a avaliação dos parâmetros de viabilidade foram realizados os ensaios colorimétricos de Redução de Brometo de Difeniltetrazólio (MTT) e de *Neutral Red* (NR). As células das diferentes linhagens foram colocadas em placas de 96 poços, sendo distribuídas em grupos controle (0 µg/ml) e tratados com fração polissacarídica (5, 10 µg/ml para FA e 10, 100 µg/ml para FM). O plaqueamento celular respeitou a densidade adequada para cada linhagem de 5×10^2 células/poço para a linhagem B16F10, e 2×10^3 células/poço para a linhagem BALB/c 3T3. Foi respeitado o período de 24h pós plaqueamento para a ocorrência da fixação celular. Após este período, foi realizado o tratamento com as frações dos polissacarídeos nas concentrações em estudo. As análises foram procedidas 72h após o tratamento.

5.5.1 Ensaio de Redução de Brometo de Difeniltetrazólio (MTT)

Para o ensaio de MTT foi utilizada a metodologia proposta por Mosmann (1983). Os poços foram aspirados para retirada do sobrenadante e então foi realizada a adição da solução de MTT 5mg/ml (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) em pH 7,4 sobre as células. Estas foram incubadas por um período de 3,5 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi novamente descartado e a solução de extração DMSO adicionada para dissolução dos Cristais de Formazan. A placa foi agitada e após completa solubilização foi realizada leitura em equipamento TECAN® Infinite M200 a 540 nm.

5.5.2 Ensaio de *Neutral Red* (NR)

O ensaio de NR foi realizado de acordo com o método proposto por Repetto *et al.* (2008). Após o período de fixação celular, os poços foram devidamente aspirados para retirada de todo meio de cultura e tratamento e então foi realizada a adição da

solução de NR (0,04 mg/ml) centrifugada e livre de SFB. As células em solução, foram incubadas por 2 horas em estufa à 37° C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, os poços foram novamente aspirados e receberam a solução de extração EtOH/Ac.COOH (50% / 1%). As placas foram agitadas em agitador de placas por aproximadamente 10 minutos e em seguida avaliadas em equipamento TECAN® Infinite M200 a 540 nm.

5.6 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A condução do ensaio foi realizada de acordo com o recomendado por Bonnekoh *et al.* (1989). No momento da análise os poços foram aspirados para retirada de todo meio de cultura e tratamento, e lavados com PBS. As células foram fixadas por solução PFA (Paraformaldeído) 4% durante o período de 10 minutos. Após a retirada do agente fixador, as células foram permeabilizadas em Metanol 2% por 10 minutos e então coradas pela adição do corante Cristal Violeta (CV). O corante foi eluído das células por solução de citrato de sódio. A leitura foi realizada em equipamento TECAN® Infinite M200 a 590 nm.

5.7 CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR

A migração celular foi avaliada por meio de ensaio bidimensional de "scratch" (LIANG *et al.*, 2007). Para a execução da análise são realizados dois plaqueamentos. No primeiro plaqueamento, destinado ao tratamento das células com os polissacarídeos em estudo, a linhagem B16F10 foi plaqueada em placa de 24 poços na densidade de 5×10^3 células/poço, tendo sido respeitado o período de fixação celular de 24h. Após este período, foi procedido o tratamento com os polissacarídeos em estudo, e logo depois as células são incubadas em estufa pelo período de 72h. Após o período de incubação, as células que sobreviveram ao tratamento foram soltas e novamente plaqueadas em placa de 96 poços. As células foram então incubadas em estufa pelo período de 24h para fixação celular. Após o período de fixação, a proliferação celular foi inibida com a utilização de meio de cultura RPMI carenciado

em SFB (1%) e a monocamada de células é riscada com ponteira (*scratch*) 20 horas após o início do tratamento de inibição. Foram realizadas fotos de todos os poços nos períodos 0h e 24h após a realização do *scratch*. A análise das imagens foi realizada via software *ImageJ*®, sendo a capacidade migratória relativa determinada pelo cálculo da porcentagem de área livre de células proposto por Borges *et al.* (2015).

5.8 CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO CELULAR

O ensaio visou avaliar a capacidade de formação de colônias celulares pelo método descrito por Boia-Ferreira *et al.* (2017). Para a execução da análise, foram realizados dois plaqueamentos. No primeiro plaqueamento, destinado ao tratamento das células com os polissacarídeos em estudo, a linhagem B16F10 foi plaqueada em placa de 24 poços na densidade de 2×10^3 células/poço. Após o período de 24h para fixação celular, foi procedido o tratamento e logo depois as células foram incubadas em estufa pelo período de 72h. Após o período de incubação, as células que sobreviveram ao tratamento foram soltas e novamente plaqueadas em placa de 24 poços na densidade de 1×10^3 células/poço. As células foram novamente incubadas em estufa pelo período de 24h para fixação celular. Após o período de fixação os poços foram aspirados para retirada de todo meio de cultura e lavados com PBS. As células foram fixadas por solução PFA 4% durante o período de 10 minutos. Após a retirada do agente fixador, as células foram coradas pela adição do corante CV e incubadas por 10 minutos. Após a incubação o corante foi descartado e os poços lavados com água ultrapura e então fotografados com auxílio de lupa. As imagens obtidas foram submetidas a contagem de colônias no software *ImageJ*®. Os resultados são apresentados como número médio de colônias na área do poço.

5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para definição dos genes a serem avaliados durante o estudo, foi realizada análise transcriptômica de dados disponíveis em bancos de dados públicos, visando elucidar os efeitos de compostos provenientes de plantas sobre o perfil de expressão

gênica em diferentes células tumorais. Estes ensaios foram realizados em parceria com o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

5.9.1 Análise transcriptômica

Para a análise transcriptômica foi utilizado o banco de dados NPCARE (CHOI *et al.*, 2017). Neste banco de dados estão organizados dados de 6.578 compostos naturais e 2.566 frações de extratos isolados de mais de 1.900 espécies, incluindo plantas, fungos e bactérias. Estes extratos apresentaram atividade antitumoral e foram validados em 1.107 linhagens celulares de 34 tipos de câncer.

Primeiramente os dados foram filtrados de acordo com gênero de apenas plantas frutíferas, sendo que após a primeira filtragem restaram 9 gêneros que foram novamente filtrados, agora de acordo com as espécies contidas em cada gênero, sendo excluídas aquelas espécies consideradas tóxicas e aquelas que não possuíam informações sobre ação em genes potencialmente desregulados em tumores.

Com os dados filtrados selecionamos os genes potencialmente desregulados em tumores tratados com compostos provenientes das espécies selecionadas e estes foram submetidos à análise de enriquecimento de vias, utilizando o banco de dados *Gene Set Enrichment Analysis* (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>), tendo como base a assinatura gênica “*Cancer Hallmarks*”, que compreende 50 assinaturas gênicas de mecanismos celulares essenciais na progressão tumoral. As vias enriquecidas foram selecionadas de acordo com o valor de p ajustado $<0,01$.

5.9.2 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

O isolamento de RNA das amostras de células B16F10 foi realizado pela utilização do reagente TRIzol® (BIORAD) de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras de RNA extraídas foram então convertidas em cDNA com a utilização *kit iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR* (BIORAD). Em microtubo apropriado para termociclador foram adicionados 4 µL de *iScript RT Supermix 5x*, 18

μL de água ultrapura para 1 μL de amostra de RNA (1000ng), formando um mix de 20 μL por reação. As reações foram levadas ao termociclador (*Applied Biosystems*®), onde foram incubadas em 3 ciclos: 1º ciclo de 5 min a 25°C, 2º ciclo de 20 min a 46°C e, 3º ciclo de 1 min a 95°, de acordo com o protocolo de utilização do produto.

5.7.3 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas com utilização do *one-step RT-PCR SYBR*® *Green kit* (BIORAD) e os primers apropriados para cada reação, abaixo listados:

<i>MAPK1</i> -Foward	TGGCATCAATGACATCATCC
<i>MAPK1</i> -Reverse	TGCTGAGGTGCTGTGTCTTC
<i>PARP1</i> -Foward	GCAGCGAGAGTATTCCCAAG
<i>PARP1</i> -Reverse	TCCAGAAGCAGGAGAAGTGG
<i>ACTB</i> -Foward	CTGTATTCCCCTCCATCGTG
<i>ACTB</i> -Reverse	GGGTCAGGATACCTCTCTTGC
<i>HPRT1</i> -Foward	GTTGGGCTTACCTCACTGCT
<i>HPRT1</i> -Reverse	TAATCACGACGCTGGGACTG

Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e analisados em aparelho QuantStudio™ 5 (*Applied Biosystems*®). Para cada reação foi realizado controle RT- (sem conversão de RNA em cDNA).

A quantificação relativa foi avaliada levando em consideração a comparação do ciclo em que o nível de fluorescência alcançou o limiar pré-estabelecido (ct) do gene alvo em comparação com os controles endógenos utilizados β -actina (*ACTB*) e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*HPRT1*).

Para os cálculos de expressão de cDNA da linhagem celular de câncer em estudo, foi utilizada uma amostra calibradora contendo a amostra controle. Para a quantificação dos genes alvo, os resultados obtidos na análise foram normalizados

em relação aos genes endógenos e em relação ao calibrador por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos por média \pm desvio padrão e analisados por meio do software GraphPad Prism e do programa RStudio. Para a determinação dos testes a serem realizados nas variáveis quantitativas, os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homoscedasticidade pelo teste de Bartlett. Os dados considerados normais foram submetidos ao teste de *One-Way* ANOVA para apenas uma variável, ou ao teste de *Two-Way* ANOVA quando foram avaliadas mais de uma variável, seguidos de pós-teste de Tuckey-HSD. Quando os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Foram considerados significativos resultados com valores de $p < 0,05$.

Para a análise de enriquecimento de vias utilizou-se o método de *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) considerando significativo valor de $p < 0,01$.

6 RESULTADOS

6.1 ESTUDO PILOTO

A busca por novos compostos a serem utilizados no tratamento de uma vasta gama de doenças, dentre elas o câncer, têm sido feita visando observar tanto seus efeitos positivos quanto seus efeitos negativos sobre os organismos. Sabe-se que diversas moléculas já utilizadas na terapia convencional como quimioterápicos, exercem efeitos deletérios tanto para células tumorais quando para células normais em decorrência de sua inespecificidade. Desta forma, dentre os parâmetros mais importantes a serem avaliados para a introdução de novos compostos e moléculas em tratamentos, estão o impacto destes sobre a viabilidade celular e também seu potencial citotóxico.

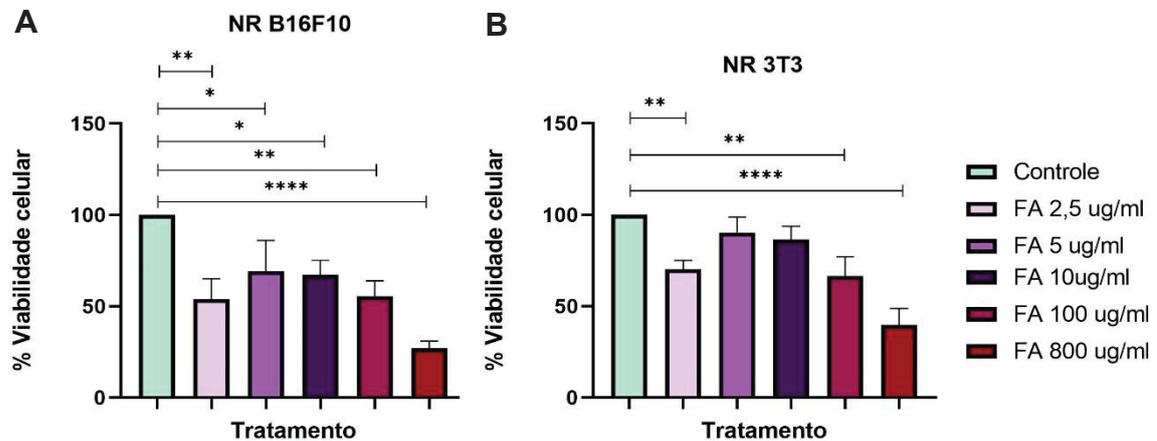
Visando verificar os efeitos sobre a viabilidade das linhagens celulares tumoral (B16F10) e normal (BALB/c 3T3), e determinar as concentrações a serem utilizadas no presente estudo, realizamos os ensaios de MTT e NR para avaliar os efeitos de cinco diferentes concentrações das frações polissacarídicas em estudo.

6.1.1 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) E DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) SOBRE A VIABILIDADE CELULAR POR NR

Os resultados obtidos na análise NR demonstraram uma redução significativa da viabilidade da linhagem celular tumoral nos grupos tratados com todas as concentrações (2.5, 5, 10, 100 e 800 $\mu\text{g/ml}$) de FA (Figura 9A), tendo os grupos tratados com as concentrações 2.5, 100 e 800 $\mu\text{g/ml}$ apresentado redução de viabilidade superior (46, 44.5 e 72.9% respectivamente) a apresentada pelos grupos tratados com as concentrações 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ (30.6 e 32.8% respectivamente).

Já para a linhagem não tumoral (Figura 9B), a análise demonstrou uma redução significativa da viabilidade destas células nos grupos tratados com as concentrações 2.5, 100 e 800 $\mu\text{g/ml}$ (29.7, 33.6 e 60.2% respectivamente), não tendo sido observada redução significativa da viabilidade celular nos grupos tratados com as concentrações 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$.

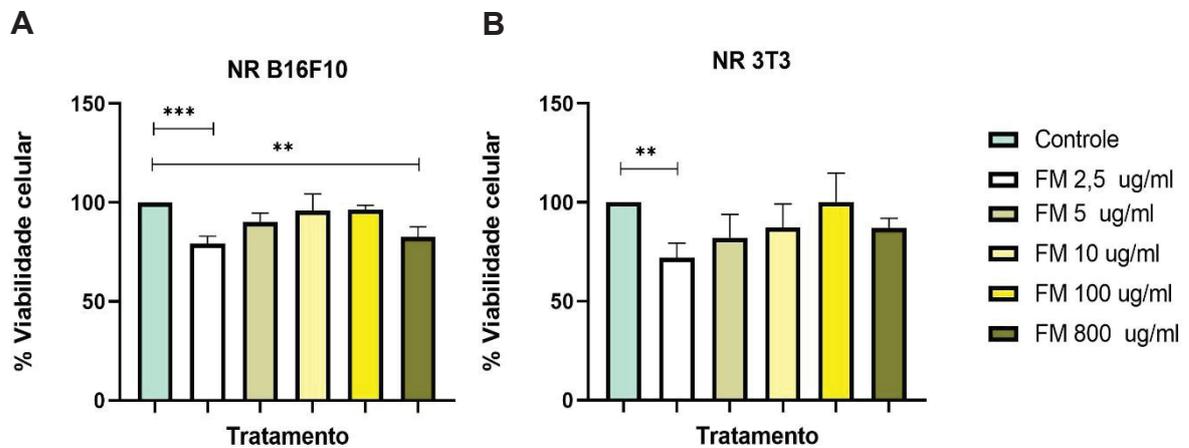
FIGURA 9 – Viabilidade de células tumorais B16F10 e normais BALB/c 3T3 após tratamento com FA pelo ensaio de NR.



L: Porcentagem de viabilidade de células tumorais B16F10 (**A**) e de células normais BALB/c 3T3 (**B**), tratadas com a fração FA nas concentrações 2.5, 5, 10, 100 e 800 µg/ml pelo ensaio de NR. O período de exposição aos tratamentos foi de 72h. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. Dados são apresentados em relação ao grupo controle.

Ao avaliarmos os efeitos do tratamento com diferentes concentrações de FM pela mesma metodologia, observamos que o tratamento com as concentrações 2.5 e 800 µg/ml resultou em redução significativa (20.8 e 17.5% respectivamente) da viabilidade de células tumorais (Figura 10A), enquanto somente o tratamento com a concentração 2.5 µg/ml (27.8%) resultou em redução significativa da viabilidade da linhagem de células normais (Figura 10B).

FIGURA 10 – Viabilidade de células tumorais B16F10 e normais BALB/c 3T3 após tratamento com FM pelo ensaio de NR.



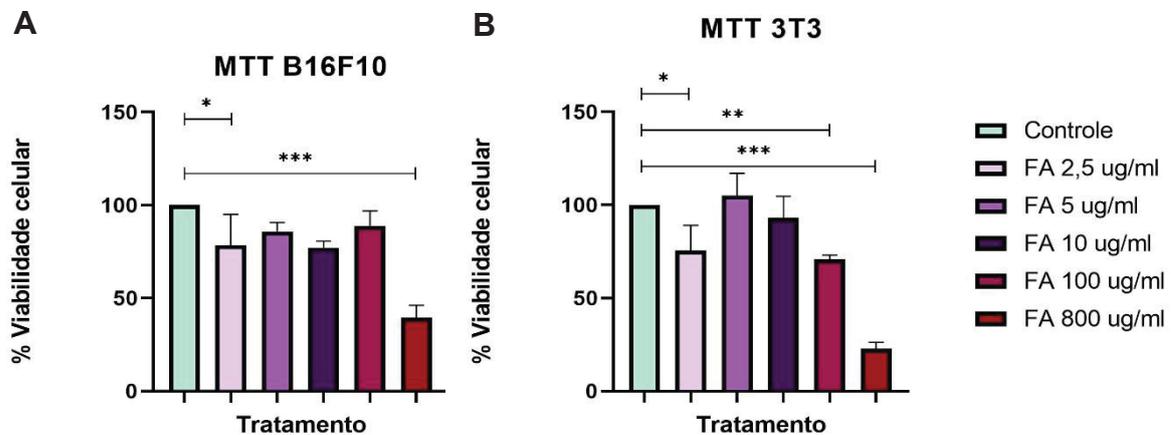
L: Porcentagem de viabilidade de células tumorais B16F10 (**A**) e de células normais BALB/c 3T3 (**B**), tratadas com a fração FM nas concentrações 2.5, 5, 10, 100 e 800 µg/ml pelo ensaio de NR. O período de exposição aos tratamentos foi de 72h. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. Dados são apresentados em relação ao grupo controle.

6.1.2 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) E DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) SOBRE A VIABILIDADE CELULAR POR MTT

Visando confirmar os resultados obtidos no ensaio de viabilidade por NR avaliamos os efeitos das cinco concentrações das frações polissacarídicas em estudo também pelo ensaio de MTT.

A Figura 11 (A e B) demonstra os efeitos de FA concentrações sobre a viabilidade das linhagens celulares B16F10 e BALB/c 3T3 pelo ensaio de MTT.

FIGURA 11 – Viabilidade de células tumorais B16F10 e normais BALB/c 3T3 após tratamento com FA pelo ensaio de MTT.

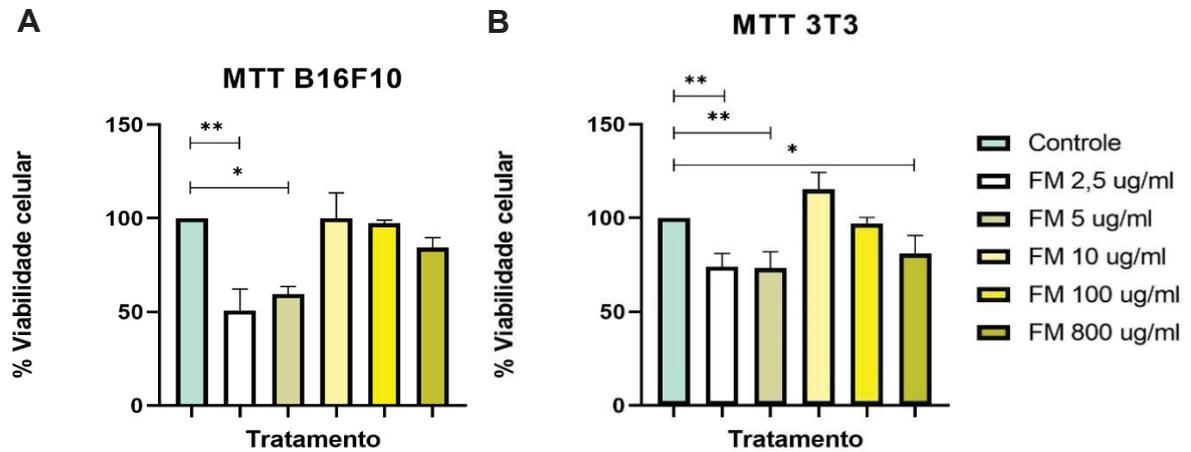


L: Porcentagem de viabilidade de células tumorais B16F10 (**A**) e de células normais BALB/c 3T3 (**B**), tratadas com a fração FA nas concentrações 2.5, 5, 10, 100 e 800 µg/ml pelo ensaio de *MTT*. O período de exposição aos tratamentos foi de 72h. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. Dados são apresentados em relação ao grupo controle.

A análise de MTT demonstrou uma redução significativa da viabilidade da linhagem B16F10 somente nos grupos tratados com as concentrações 2.5 e 800 µg/ml (21.6 e 60.5 respectivamente) de FA (Figura 11A), não tendo sido observada redução significativa da viabilidade nos demais grupos (5, 10, 100 µg/ml). Diferentemente, a avaliação dos efeitos de FA sobre a viabilidade da linhagem BALB/c 3T3 demonstrou uma redução significativa da viabilidade celular nos grupos tratados com as concentrações 2.5, 100 e 800 µg/ml (24.6, 29.1 e 77.2% respectivamente) (Figura 11B).

Já para os grupos tratados com FM, observamos que o tratamento com as concentrações 2.5 e 5 µg/ml resultou em redução significativa (49.1 e 40.5% respectivamente) da viabilidade da linhagem celular tumoral (Figura 12A), enquanto para a linhagem celular não tumoral, o tratamento com as concentrações 2.5, 5 e 800 µg/ml promoveram redução significativa (26.0, 26.8 e 18.9% respectivamente) de sua viabilidade (Figura 12B).

FIGURA 12 – Viabilidade de células tumorais B16F10 e normais BALB/c 3T3 após tratamento com FM pelo ensaio de MTT.



L: Porcentagem de viabilidade de células tumorais B16F10 (**A**) e de células normais BALB/c 3T3 (**B**), tratadas com a fração FM nas concentrações 2.5, 5, 10, 100 e 800 $\mu\text{g/ml}$ pelo ensaio de *MTT*. O período de exposição aos tratamentos foi de 72h. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. Dados são apresentados em relação ao grupo controle.

Levando em consideração o conjunto de resultados obtidos tanto na análise de NR quanto na análise de MTT, podemos observar que para grupos tratados com FA, as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ apresentam maior segurança quanto a seus efeitos sobre células não tumorais em comparação com as demais concentrações, uma vez que seus efeitos sobre a viabilidade das células normais utilizadas neste modelo, não foram considerados estatisticamente significativos em nenhum dos ensaios realizados. Já para os grupos tratados com FM, observamos que as concentrações 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ foram as únicas a não demonstrarem efeitos estatisticamente significativos de redução da viabilidade da linha celular não tumoral pela análise de MTT. Embora tenha havido diferenças entre os resultados obtidos na análise de NR e MTT da linhagem BALB/c 3T3 dos grupos FM, os resultados sugerem as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ como as mais seguras quanto a seus efeitos sobre a viabilidade do modelo de células não tumorais nas condições deste estudo.

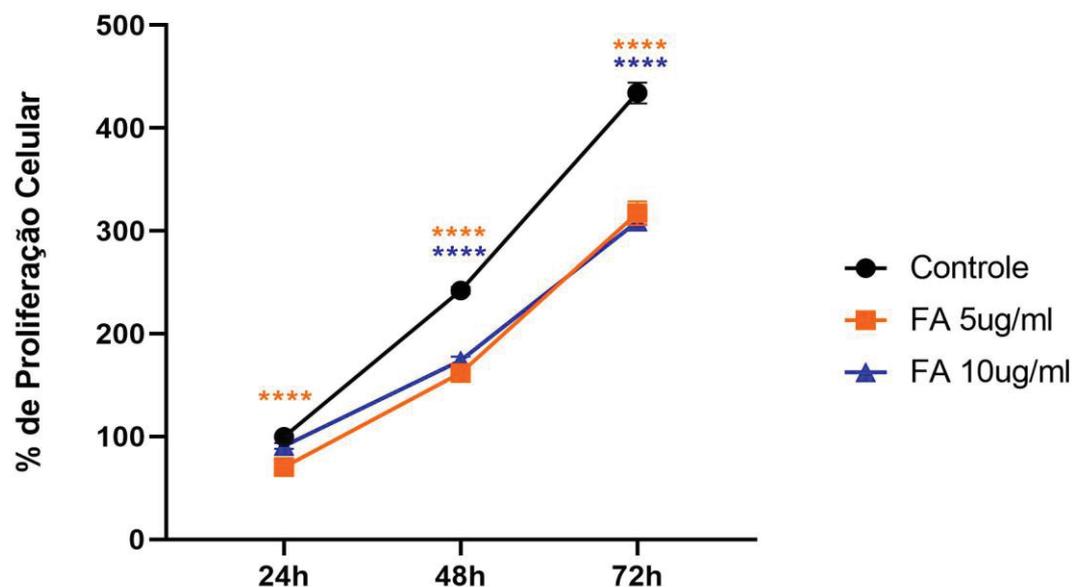
De acordo com estes resultados, as concentrações de escolha para o prosseguimento do presente estudo foram 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ para o tratamento com FA, e 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ para o tratamento com FM.

6.4 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) E DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR

Sabendo-se que o câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento, ou seja, pela proliferação celular acelerada e desordenada de um determinado grupo de células (INCA, 2019), foi realizado neste estudo o ensaio de proliferação celular pela metodologia de CV visando verificar os efeitos moduladores das frações polissacarídicas em estudo sobre este parâmetro celular na linhagem tumoral B16F10.

Os efeitos de FA sobre a capacidade de proliferação celular estão expressos no Figura 13.

FIGURA 13 – Ensaio de Proliferação Celular por Cristal Violeta da linhagem celular B16F10 após o tratamento com FA.

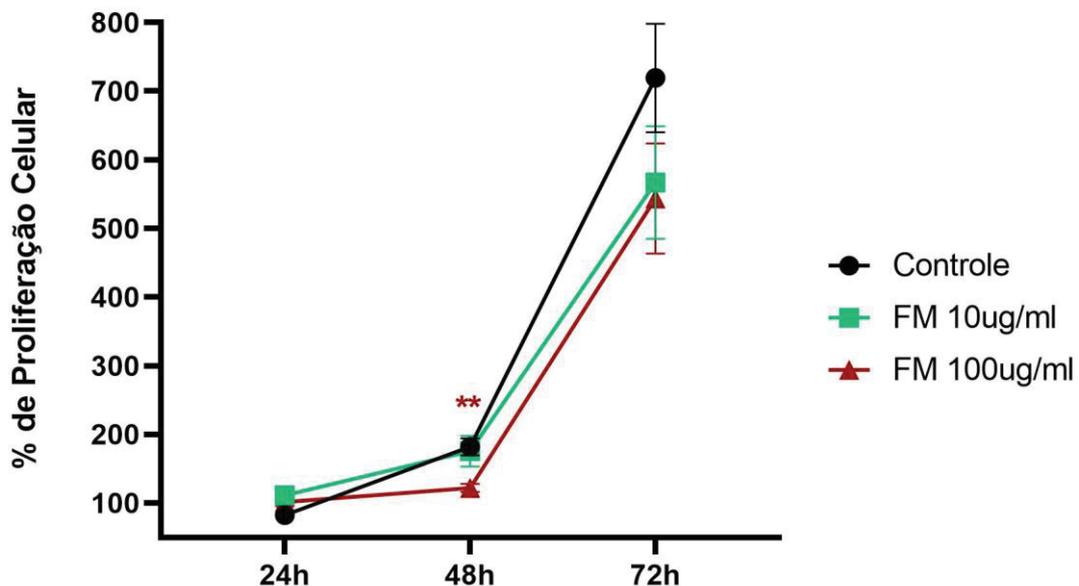


L: Percentual de Proliferação Celular por CV da linhagem celular B16F10 após o tratamento com FA nas concentrações 5 e 10 µg/ml. O período de exposição aos tratamentos e de avaliação foi de 24, 48 e 72h. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de Two-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0.05$. Dados são apresentados em porcentagem relação ao grupo controle.

A exposição da linhagem celular à FA resultou, em 24h, na redução significativa da taxa de proliferação celular no grupo tratado com a concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ em comparação ao grupo controle (29, 56%). Além disto, a exposição a ambas as concentrações em estudo (5 e 10 $\mu\text{g/ml}$) de FA, resultou em redução significativa da proliferação celular em comparação com o grupo controle nos períodos de exposição de 48 (33,58% e 28,09% respectivamente) e 72h ao tratamento (26,96% e 28,77%).

Já para a análise da capacidade proliferativa da linhagem B16F10 exposta ao tratamento com FM, é possível observar, conforme descrito no gráfico 10, uma redução significativa (32,88%) da taxa de proliferação destas células no grupo tratado com a concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ da fração, quando em comparação com o grupo controle, após 48h de incubação.

FIGURA 14 – Ensaio de Proliferação Celular por Cristal Violeta da linhagem celular B16F10 após o tratamento com FM.



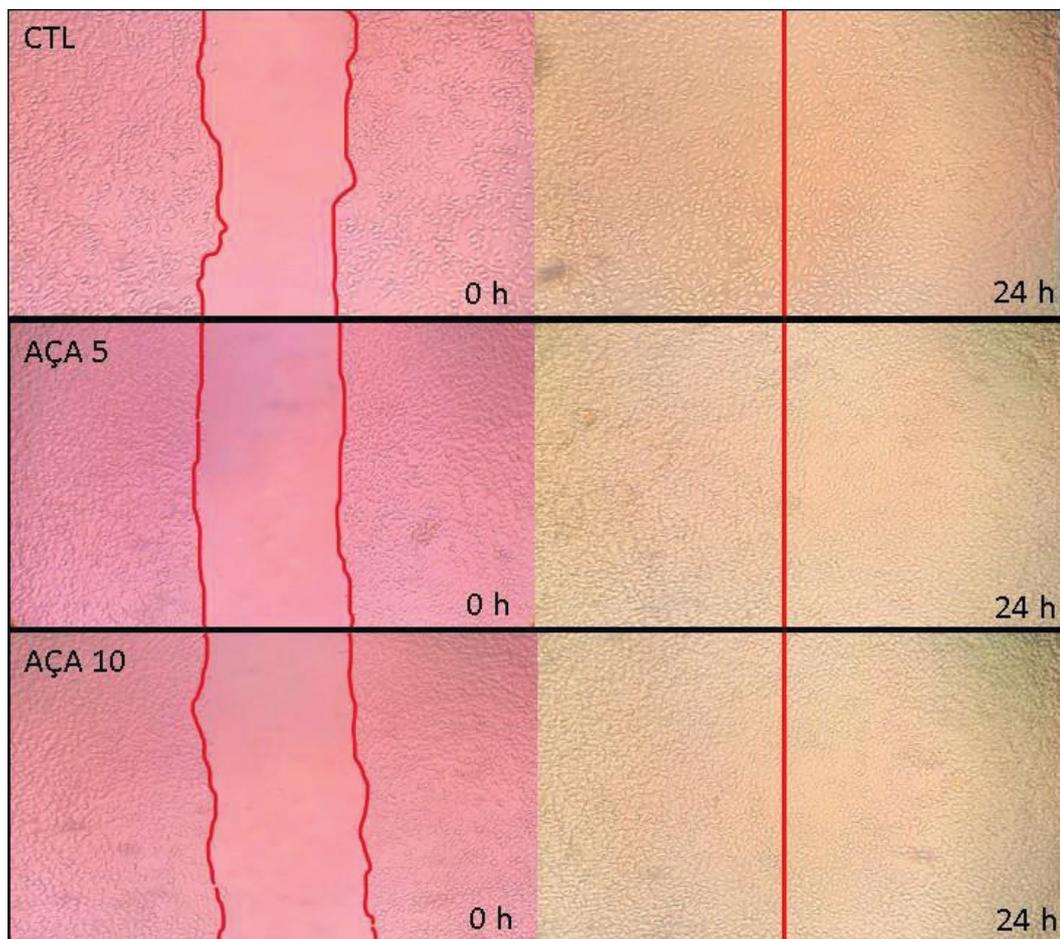
L: Percentual de Proliferação Celular por CV da linhagem celular B16F10 após o tratamento com FM nas concentrações 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$. O período de exposição aos tratamentos e de avaliação foi de 24, 48 e 72h. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de Two-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0.05$. Dados são apresentados em porcentagem em relação ao grupo controle.

6.4 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAI (*Euterpe oleracea*) E DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) SOBRE A CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR

A migração celular é considerada um estágio crítico no processo de progressão tumoral. Isto se deve ao fato de que a migração de células tumorais permite que estas atinjam outros órgãos e tecidos mesmo estes estando distantes do local do tumor primário, dando origem ao processo denominado metástase. Tendo em vista os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular em células B16F10, e com o objetivo de avaliar os efeitos das frações de polissacarídeos em estudo sobre a capacidade migratória das células sobreviventes às 72h de exposição ao tratamento, foi realizado o ensaio de capacidade de migração celular por *Scratch*.

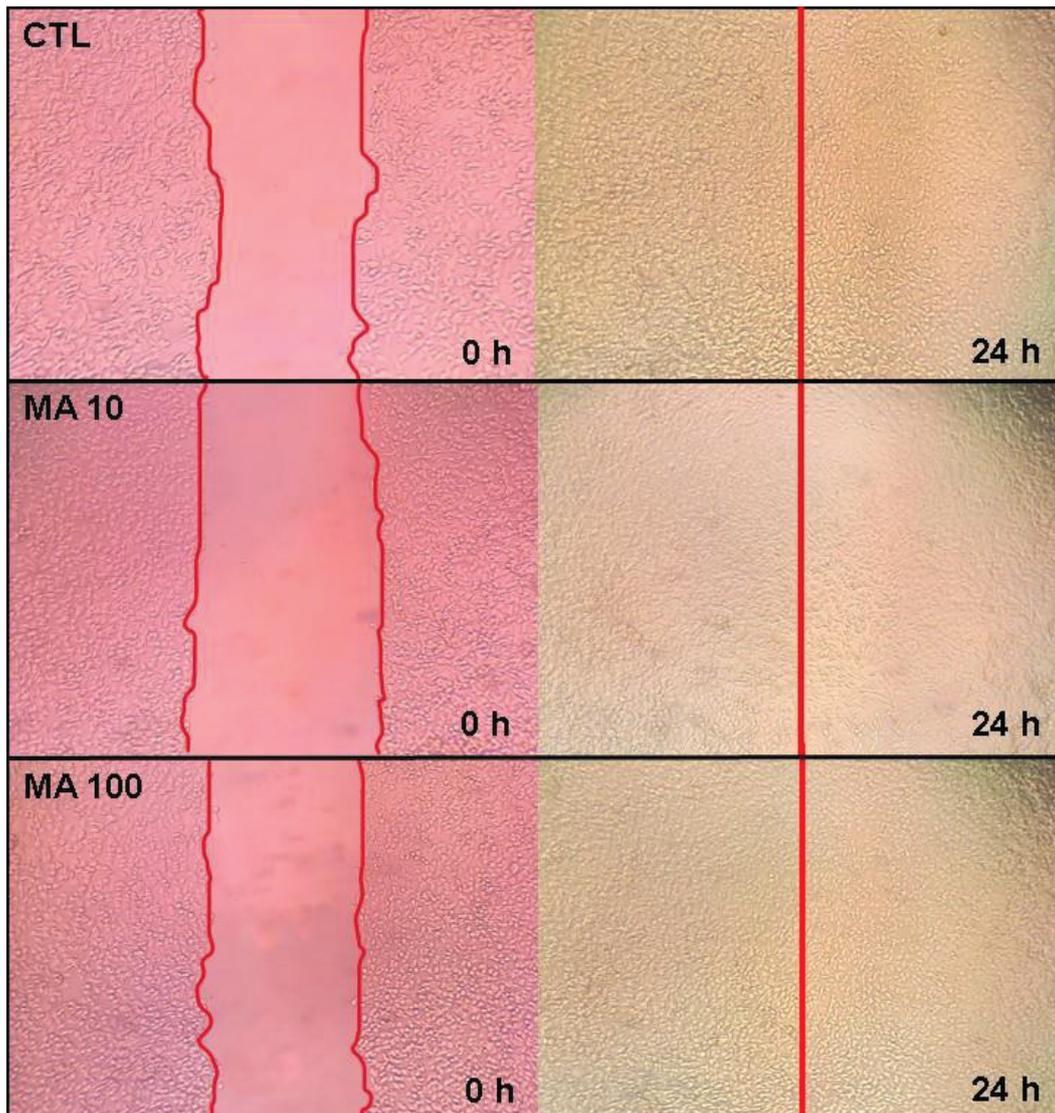
As Figuras 6 e 7 correspondem a fotos de uma mesma replicata biológica, realizadas nos tempos 0h e 24h após a realização do *scratch*.

FIGURA 15 – Ensaio de Migração Celular dos grupos tratados com FA.



L: Após o período de exposição de 72h ao tratamento com as concentrações 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ de FA e a retirada do tratamento, a linhagem B16F10 foi submetida a análise de Migração por *Scratch*. As fotografias nos tempos 0 e 24h foram realizadas com o auxílio do microscópio óptico invertido BIOVAL® XDS-1B (aumento de 10x). **FONTE:** A autora.

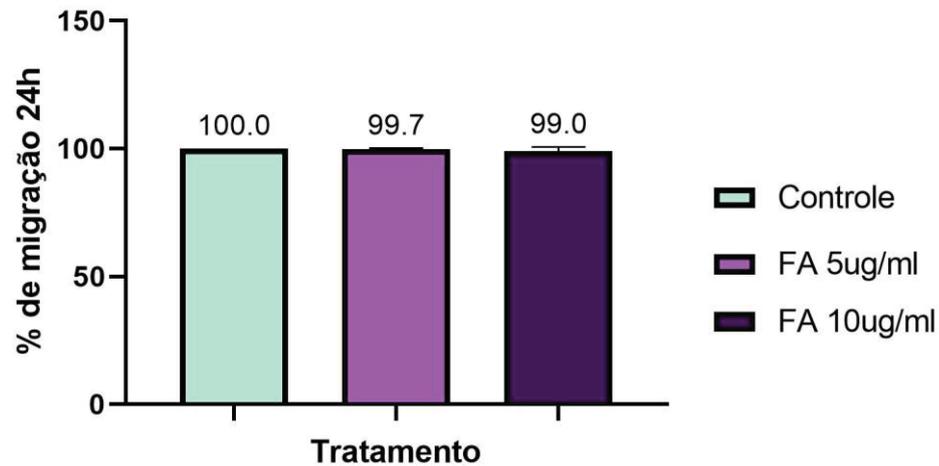
FIGURA 16 – Ensaio de Migração Celular dos grupos tratados com FM.



L: Após o período exposição de 72h ao tratamento com as concentrações 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de FM e a retirada do tratamento, a linhagem B16F10 foi submetida a análise de Migração por *Scratch*. As fotografias nos tempos 0 e 24h foram realizadas com o auxílio do microscópio óptico invertido BIOVAL® XDS-1B (aumento de 10x). **FONTE:** A autora.

A Figura 17 demonstra os efeitos de FA nas concentrações 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ sobre a capacidade migratória da linhagem celular B16F10.

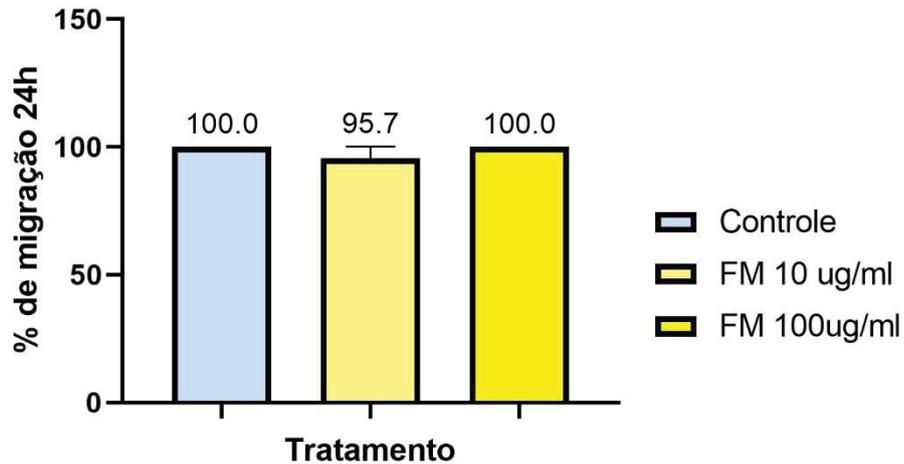
FIGURA 17 – Capacidade de Migração Celular dos grupos tratados com FA pela metodologia de *Scratch*.



L: A linhagem celular B16F10 foi tratada com FA nas concentrações 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$. O período de exposição aos tratamentos foi de 72h e a capacidade de migração avaliada 24h após a abertura da ferida. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0.05$. Os dados são apresentados como porcentagem de invasão do espaço determinado na placa de cultura em 24h.

Os resultados obtidos no ensaio de *scratch* não demonstraram diferença significativa na migração entre os grupos tratados com diferentes concentrações de FA e o grupo controle. Os resultados também não demonstraram diferença significativa entre os grupos tratados (5 e 10 $\mu\text{g/ml}$) para a linhagem B16F10. De maneira semelhante, não foram observadas diferenças significativas no percentual de migração celular nos grupos tratados com as concentrações 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ FM nas concentrações em comparação ao grupo controle ou na comparação entre os grupos tratados (Figura 18).

FIGURA 18 – Capacidade de Migração Celular dos grupos tratados com FM pela metodologia de *Scratch*.



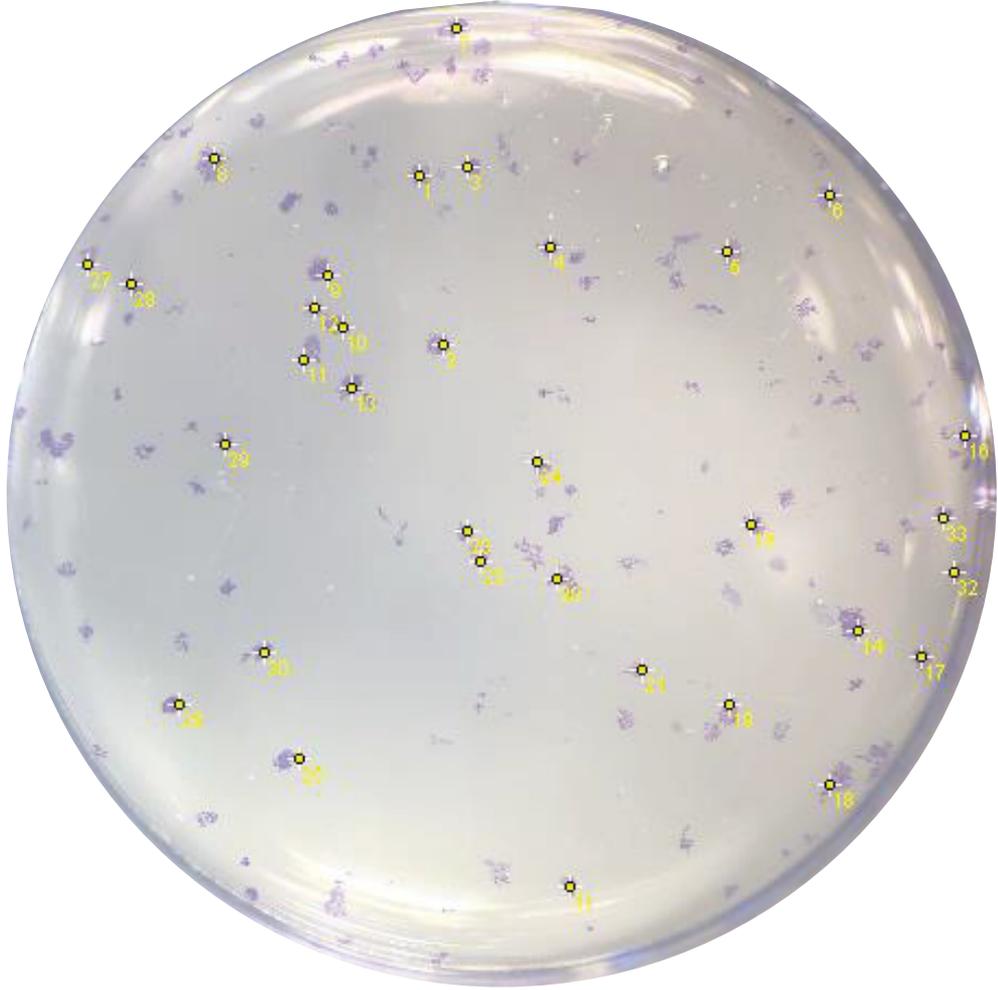
L: A linhagem celular B16F10 foi tratada com FM nas concentrações 10 e 100 µg/ml. O período de exposição aos tratamentos foi de 72h e a capacidade de migração avaliada 24h após a abertura da ferida. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0.05$. Os dados são apresentados como porcentagem de invasão do espaço determinado na placa de cultura em 24h.

6.5 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) E DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) SOBRE A CAPACIDADE CLONOGÊNICA CELULAR

O ensaio clonogênico, ou ensaio de capacidade de formação de colônias, tem por objetivo investigar a capacidade de uma única célula de proliferar e, a partir disto, dar início a uma nova colônia. Neste ensaio, avaliamos se, as células que não tiveram sua viabilidade afetada pelo tratamento com as frações polissacarídicas estudadas, sofreram alguma alteração em sua capacidade de formar colônias.

A Figura 19 corresponde a imagem realizada durante a contagem de colônias no *software ImageJ*® realizada nesta análise.

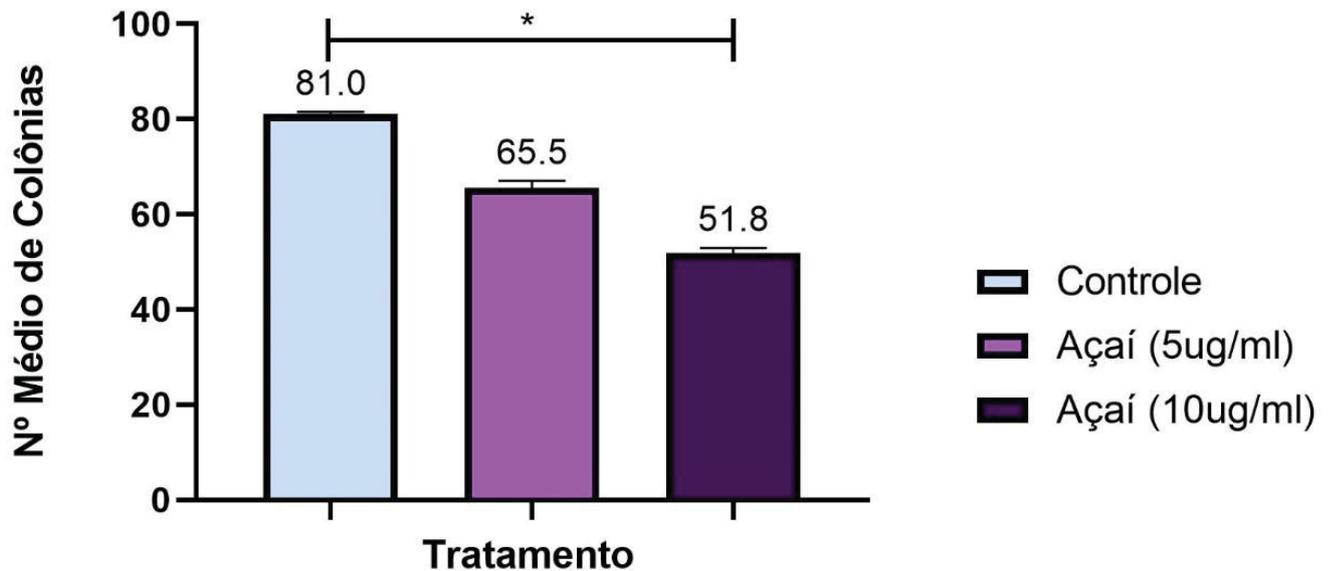
FIGURA 19 – Procedimento de contagem de colônias.



L: Após o período de exposição de 72h ao tratamento e a retirada do tratamento, a linhagem B16F10 foi incubada por 96h e então submetida à análise de número de colônias por CV. As fotografias foram realizadas com auxílio de lupa, e a contagem de colônias realizada no software *ImageJ*®. **FONTE:** A autora.

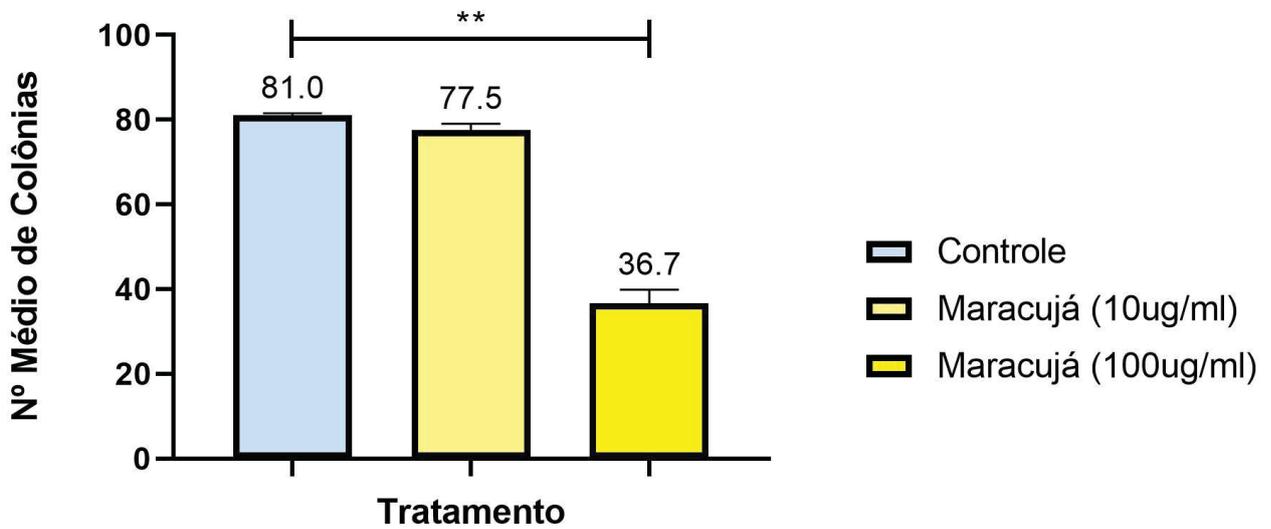
Os resultados dos efeitos de FA nas concentrações 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ sobre a capacidade clonogênica da linhagem celular B16F10 estão expressos na Figura 20.

FIGURA 20 – Capacidade Clonogênica pela metodologia de CV após o tratamento com FA



L: A linhagem celular B16F10 foi tratada com FA nas concentrações 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$. O período de exposição aos tratamentos foi de 72h e a capacidade de formação de colônias avaliada 96h após a retirada do tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn, $p < 0.05$. Os resultados expressam o número médio de colônias presente na área do poço.

Os resultados obtidos no ensaio clonogênico demonstraram redução significativa na formação de colônias no grupo tratado com FA na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ em comparação ao grupo controle (36% de redução). Os resultados não demonstraram diferença significativa entre os grupos tratados (5 e 10 $\mu\text{g/ml}$). De maneira semelhante, o grupo tratado com maior concentração (100 $\mu\text{g/ml}$) de FM apresentou redução significativa no número médio de colônias formadas em comparação com o grupo controle (54% de redução), não tendo havido diferença significativa entre os grupos tratados (10 e 100 $\mu\text{g/ml}$), conforme demonstrado na Figura 21.

FIGURA 21 – Capacidade Clonogênica pela metodologia de CV após o tratamento com FM.

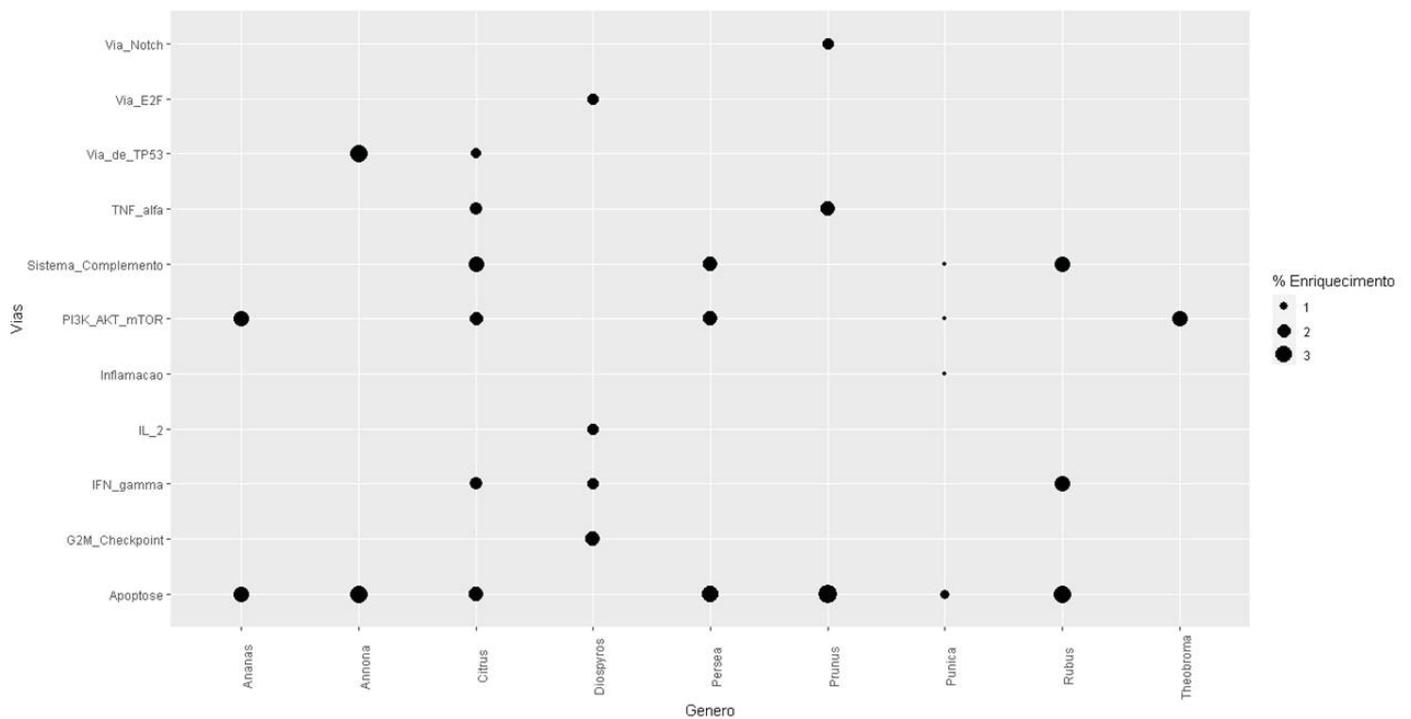
L: A linhagem celular B16F10 foi tratada com FM nas concentrações 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$. O período de exposição aos tratamentos foi de 72h e a capacidade de formação de colônias avaliada 96h após a retirada do tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn, $p < 0.05$. Os resultados expressam o número médio de colônias presente na área do poço.

6.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

6.6.1 Análise transcriptômica

Os resultados obtidos na análise de enriquecimento de vias estão demonstrados na Figura 22.

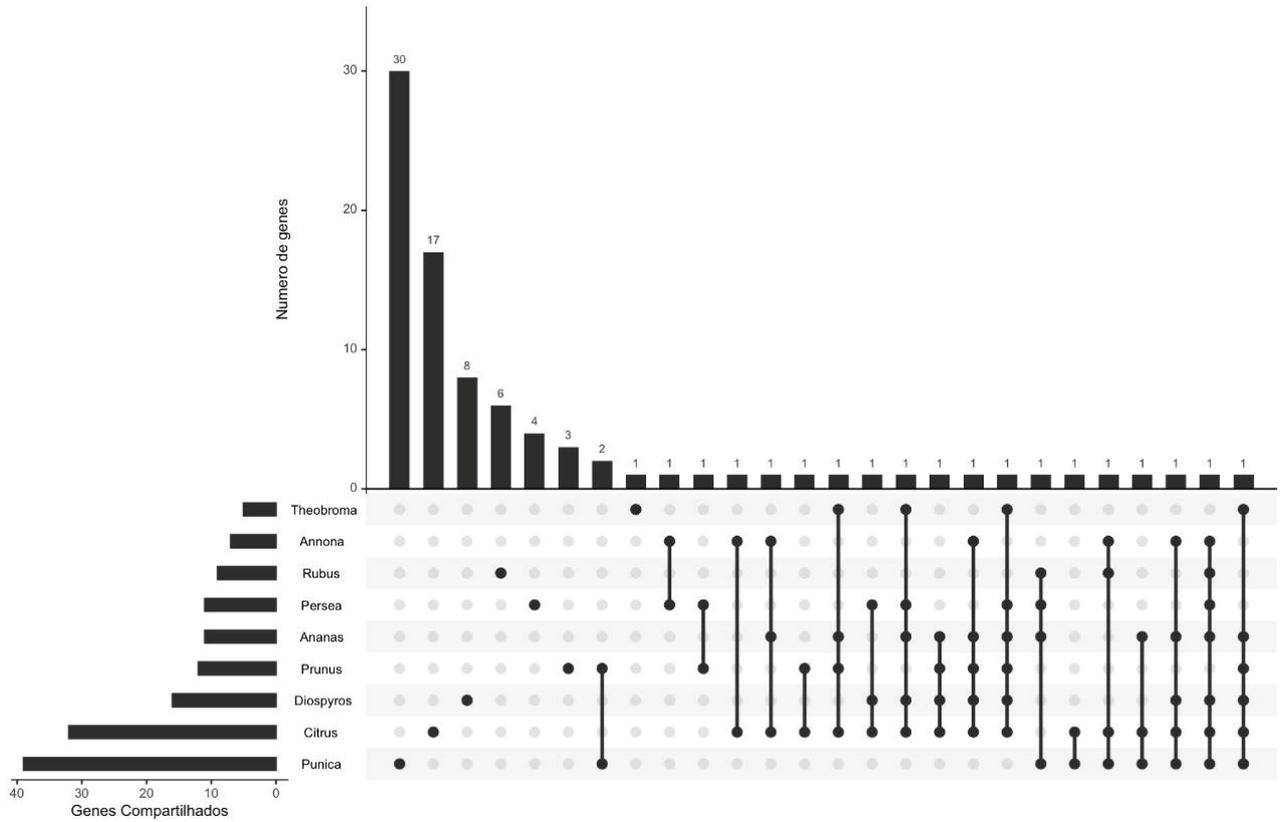
FIGURA 22 – Gráfico de enriquecimento de vias.



L: Vias enriquecidas ($p < 0,01$) em tumores tratados com compostos provenientes das espécies dos gêneros analisados.

A partir dos resultados obtidos na análise de enriquecimento de vias, avaliou-se os genes representantes das vias de enriquecimento e suas distribuições de ocorrência nos gêneros analisados. Para melhor visualização foi gerado um diagrama denominado *Up Set Plot* (Figura 23).

FIGURA 23 – Up Set Plot



L: *Up set plot* ilustrando o número genes diferencialmente expressos em diversos tipos de tumor, indicando os gêneros que apresentaram os mesmos genes desregulados após o tratamento.

A maioria dos genes desregulados nas linhagens tumorais avaliadas, foram especificamente relacionados a um único gênero dentre os estudados. Foram encontrados genes compartilhados entre os gêneros conforme demonstrado no Quadro 2.

Genus		Gene
Ananas Annona Citrus Diospyros Persea Punica Rubus	1	<i>CASP3</i>
Ananas Citrus Diospyros Persea Prunus Theobroma	1	<i>MAPK1</i>
Ananas Citrus Prunus Punica Theobroma	1	<i>MAPK8</i>
Ananas Annona Citrus Diospyros Punica	1	<i>BCL2</i>
Annona Citrus Diospyros Punica Rubus	1	<i>PARP1</i>
Ananas Citrus Diospyros Persea Theobroma	1	<i>MAPK3</i>

Ananas Annona Citrus Diospyros Prunus	1	<i>TP53</i>
Ananas Annona Citrus Punica	1	<i>BAX</i>
Ananas Persea Punica Rubus	1	<i>CASP9</i>
Ananas Citrus Prunus Theobroma	1	<i>MAPK14</i>
Ananas Citrus Diospyros Rubus	1	<i>PTGS2</i>
Ananas Citrus Punica	1	<i>AKT1</i>
Citrus Diospyros Persea	1	<i>CASP8</i>
Citrus Punica	1	<i>NFKB1</i>
Prunus Punica	2	<i>RELA</i> <i>PRKCA</i>
Annona Citrus	1	<i>CDKN1A</i>
Annona Persea	1	<i>BAD</i>
Citrus Prunus	1	<i>MMP9</i>
Persea Prunus	1	<i>CCND1</i>

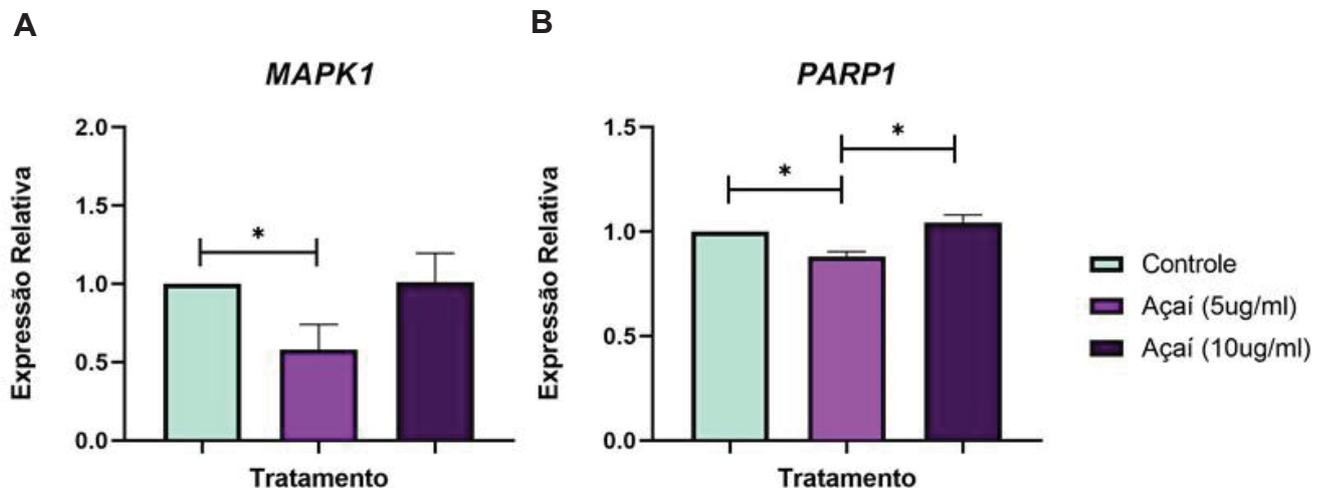
QUADRO 2 – Genes desregulados em células tumorais, avaliados em estudos com diferentes gêneros de plantas frutíferas.

Tendo como base os resultados obtidos na análise de genes influenciados por tratamentos com gêneros disponíveis após a filtragem, selecionamos para análise pelo método de RT-qPCR, após o período de tratamento de 72h, os genes *MAPK1* e *PARP1* por serem afetados por mais gêneros em comum e por estarem envolvidos em processos de proliferação e mecanismos de reparo celular.

6.6.2 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA

A Figura 24 demonstra os efeitos do tratamento com FA sobre a expressão relativa de *MAPK1* (A) e *PARP1* (B).

FIGURA 24 – Expressão Relativa de *MAPK1* e *PARP1* após o tratamento com FA.



L: A linhagem celular B16F10 foi tratada com FA nas concentrações 5 e 10 µg/ml e avaliadas quanto a expressão relativa de *MAPK1* (A) e *PARP1* (B). O período de exposição aos tratamentos foi de 72h. Após o tratamento as células foram coletadas e o RNA extraído para a avaliação da expressão relativa. Os resultados obtidos foram normalizados e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,0001$. Os dados expressam a expressão diferencial em relação ao controle.

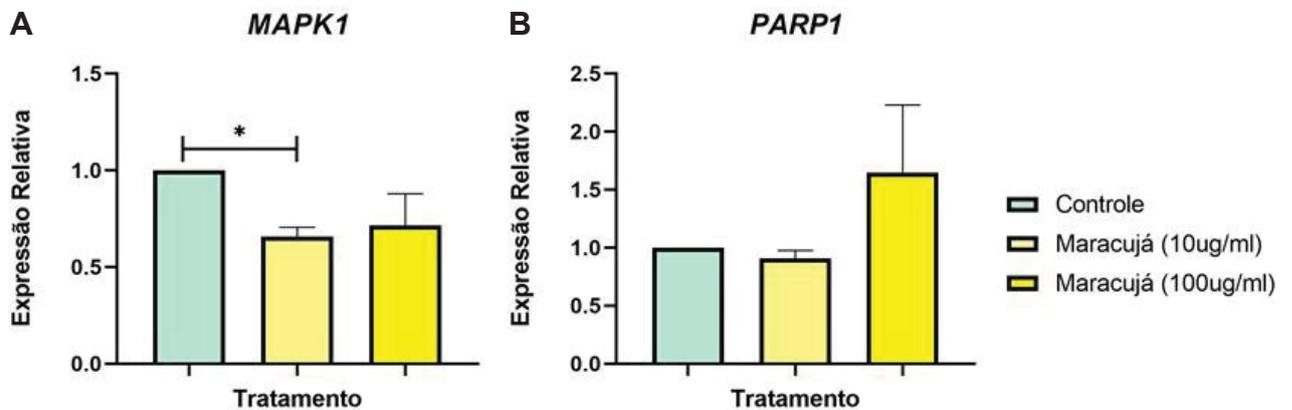
O ensaio de avaliação dos efeitos de FA sobre a expressão gênica demonstrou que esta fração foi eficiente em reduzir a expressão de *MAPK1* (A) no grupo tratado com a menor concentração (5 µg/ml) em comparação ao grupo controle (42% de redução). Os resultados não demonstraram diferença significativa entre os grupos tratados 5 e 10 µg/ml na redução de *MAPK1*. De maneira semelhante, o grupo tratado com maior concentração (5 µg/ml) da fração de polissacarídeos apresentou redução significativa na expressão relativa de *PARP1* (B) em comparação com o grupo controle (11,95 % de redução), tendo também havido diferença significativa entre os grupos tratados 5 e 10 µg/ml, no qual o grupo tratado com a menor concentração apresentou menor expressão de *PARP1*(16,45% menor) uma vez que

os resultados apresentados pelo grupo tratado com 10 µg/ml apresentou resultados semelhantes aos obtidos pelo grupo controle.

6.6.3 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA

Os resultados obtidos no ensaio de expressão gênica dos grupos tratados FM estão expressos na Figura 25 (A e B)

FIGURA 25 – Expressão Relativa de *MAPK1* e *PARP1*, após o tratamento com FM



L: A linhagem celular B16F10 foi tratada com FM nas concentrações 10 e 100 µg/ml avaliada quanto a expressão relativa de *MAPK1* (A) e *PARP1* (B). O período de exposição aos tratamentos foi de 72h. Após o tratamento as células foram coletadas e o RNA extraído para a avaliação da expressão relativa. Os resultados obtidos foram normalizados e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A média dos tratamentos foi comparada pelo teste de One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,0001$. Os dados expressam a expressão diferencial em relação ao controle.

A avaliação da expressão gênica dos grupos tratados com FM demonstrou que, semelhantemente ao observado nos grupos tratados com FA, o grupo tratado com a menor concentração (10 µg/ml) apresentou uma menor expressão de *MAPK1* (A) em comparação ao grupo controle (34,2% de redução). Os resultados não demonstraram diferença significativa entre os grupos tratados 10 e 100 µg/ml na redução de *MAPK1*. O tratamento com as diferentes concentrações FM não exerceu efeitos significativos sobre a expressão relativa de *PARP1* (B).

7. DISCUSSÃO

Por ser a segunda principal causa de morte entre humanos no Brasil e no mundo, sendo responsável por milhões de mortes todos os anos, o câncer é considerado um importante problema de saúde pública (OPAS, 2018).

Devido ao crescimento exponencial dos casos de câncer no mundo, o impacto econômico da doença tem se tornado igualmente expressivo, tendo sido estimado um aumento de cerca de 158% nos valores gastos no tratamento da doença para o ano de 2030 em relação ao ano de 2010 (*American Cancer Society, 2015*). Dentre os tratamentos disponíveis atualmente, a quimioterapia é a opção mais frequentemente adotada em virtude de sua atuação sistêmica e do desenvolvimento precoce de micro metástases em alguns pacientes (LEMKE, 2012). Apesar de sua utilização frequente, sabe-se que, devido sua ação inespecífica, diversas células além das células tumorais são afetadas pela ação dos quimioterápicos, resultando em diversos efeitos colaterais que afetam a qualidade de vida dos pacientes de forma significativa (KWON, 2007; OLIVEIRA, 2002; BUSHATSKY *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2017).

Além de apresentar impacto expressivo sobre a saúde geral, alguns pacientes podem apresentar resistência às substâncias utilizadas como quimioterápicos, podendo esta resistência ocorrer de maneira espontânea ou em decorrência do próprio processo de tratamento (NASCIMENTO, 2016). Estes fatores associados têm levantado cada vez mais a necessidade da busca por outras moléculas que possam atuar como terapia ou como adjuvante no tratamento de tumores, que sejam de fácil obtenção e de menor custo (ZHANG *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2017).

Devido à alta diversidade de compostos bioativos provenientes de uma variedade de plantas presente no Brasil, dentre os quais estão uma variada gama de polissacarídeos, a indústria farmacêutica tem demonstrado crescente interesse no potencial biológico destes compostos no tratamento de muitas de doenças (ALESSANDRA-PERINI, 2018; OOI, 2000). As pectinas, conjunto de polissacarídeos presentes na lamela média e nas paredes celulares vegetais, já possuem sua atividade antitumoral conhecida, sendo seus polímeros, ricos em ácido galacturônico, galactose e arabinose, também já reconhecidos por atuarem na inibição de importantes parâmetros tumorais como proliferação, migração e colonização, sendo

estes últimos responsáveis pela formação de metástases, a maior causa de morte por câncer (OOI, 2000; MARENDA, 2015; COURTS, 2013; MORRIS *et al.*, 2013)

Apesar de diversos estudos já comprovarem os efeitos antitumorais de polissacarídeos extraídos de frutas, ricas fontes destes compostos, poucos estudos focam nos efeitos antitumorais de polissacarídeos extraídos de Açaí e Maracujá, sendo a maior parte das pesquisas focadas nas já conhecidas atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e imunomodulatórias dos extratos das plantas (HOLDERNESS *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

No presente estudo, para avaliarmos os efeitos de uma fração de polissacarídeos extraídos de Açaí (FA) e de uma fração extraída de Maracujá (FM) sobre importantes parâmetros de progressão tumoral como viabilidade, proliferação, migração e colonização celular, além dos possíveis efeitos citotóxicos causados pelas frações, fizemos uso da linhagem celular B16F10, sendo este considerado um importante modelo para a avaliação dos efeitos de novas drogas para o tratamento de melanoma em virtude da não manifestação das duas principais mutações de ganho de função mais comuns no melanoma – BRAF e NRAS – pela linhagem (CASTLE *et al.*, 2012). FA foi caracterizada como rica em homogalacturonana, arabinogalactana II e ramnogalacturonana I (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2016), enquanto a caracterização de FM revelou ser composta por homogalacturonana metil-esterificada (ABBOUD *et al.*, 2019).

Em nosso estudo piloto, demonstramos os efeitos de FA e FM sobre a viabilidade das células da linhagem tumoral B16F10, e observamos que FA foi capaz de reduzir a viabilidade da linhagem tumoral em todas as concentrações avaliadas (Figura 9 A e 11 A). Já FM afetou viabilidade da linhagem B16F10 somente em 3 das concentrações estudadas (Figura 9 B e 11 B). Além disto, apesar de termos observado que algumas das concentrações avaliadas nos ensaios de viabilidade causaram uma redução da viabilidade da linhagem não tumoral, as concentrações escolhidas para dar prosseguimento aos demais ensaios não reduziram a viabilidade das células normais, efeito este considerado desejável no desenvolvimento de novos tratamentos que visam menores efeitos colaterais (Figuras 10 A e B, e 11 A e B).

Diversos estudos comprovam os efeitos positivos sobre redução da viabilidade de células tumorais exercidos por polissacarídeos. Avaliando os efeitos de diferentes concentrações de uma fração de polissacarídeos extraída de frutas cítricas

enlatadas rica em arabinose e galactose sobre a viabilidade da linhagem celular MCF-7, Li *et al.* (2019) observaram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, onde o tratamento com a fração de polissacarídeos resultou em redução da viabilidade das células tumorais de forma dose dependente, onde a maior concentração utilizada no estudo (2000 µg/ml) exerceu maior influência sobre este parâmetro.

Amaral *et al.* (2019) avaliando os impactos do tratamento com duas frações de polissacarídeos extraídas da polpa de guabiroba (*Camponesia xanthocarpa*) ricas em homogalacturonana e ramnogalacturonana I sobre a viabilidade da linhagem U251-MG (glioblastoma humano), observaram que o tratamento com as concentrações mais altas em estudo (100-400 µg/ml) resultou em maior atividade citotóxica e menor viabilidade celular. Apesar disto, em nosso estudo não observamos o mesmo efeito no tratamento com 100 µg/ml de polissacarídeos obtidos de maracujá. Além disto, os mesmos autores observaram que o tratamento com as menores concentrações em estudo (25 e 50 µg/ml) obtiveram resultados semelhantes aos observados no tratamento com as maiores concentrações. As menores concentrações utilizadas por estes autores se assemelham às concentrações utilizadas em nosso estudo, pois, apesar da concentração de 10 µg/ml da fração proveniente de açaí ser considerada maior em relação a concentração mais baixa utilizada de 5 µg/ml, ambas as concentrações podem ser consideradas baixas em comparação ao utilizado em outros estudos com a mesma finalidade. Levando em consideração aspectos farmacológicos, a presença de citotoxicidade e a redução de viabilidade em baixas concentrações é algo extremamente desejado (COBS-ROSAS *et al.*, 2015).

Sabe-se que o câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento, ou seja, pela proliferação celular acelerada e desordenada de um determinado grupo de células (INCA, 2019). Por conta disto, foi realizado neste estudo o ensaio de proliferação celular pela metodologia de CV visando verificar os efeitos moduladores das frações polissacarídicas em estudo sobre este parâmetro celular na linhagem tumoral B16F10. Aqui avaliamos o efeito das frações polissacarídicas em três tempos de exposição ao tratamento: 24h, 48h e 72h. Verificamos que tratamento com FA foi eficiente em reduzir a proliferação celular nos tempos 48 e 72h independentemente da concentração utilizada, mas que no tempo 24h, apenas a menor concentração foi significativamente eficiente (Figura 13). Os mesmos resultados não foram observados nos grupos tratados com FM, onde apenas a maior concentração (100 µg/ml) foi capaz

de reduzir a taxa de proliferação, sendo este efeito observado apenas em 48h de exposição (Figura 14).

Assim como para a viabilidade celular, a literatura já descreve os efeitos positivos dos polissacarídeos sobre a redução da proliferação em células tumorais. Ao avaliarem *in vitro* os efeitos do uso de concentrações crescentes (10 e 100 µg/ml) de frações ricas em polissacarídeos provenientes de cogumelos *Rametes versicolor* e *Grifola frondosa* sobre a linhagem celulares de câncer de cólon humano LoVo, Roca-Lema *et al.* (2019) verificaram que o tratamento com a menor dosagem do extrato rico em polissacarídeos de *T. versicolor* resultou numa inibição significativa da proliferação celular às 48h de exposição ao tratamento. Já nos grupos tratados o extrato proveniente de *G. frondosa*, os autores observaram resultados positivos também durante 48h de exposição, onde ambos os tratamentos resultaram em redução da proliferação da linhagem celular, contudo uma maior redução desta atividade foi observada no grupo tratado com a dosagem de 100 µg/ml. Outro estudo desenvolvido por Wei *et al.* (2019) avaliando os efeitos de polissacarídeos extraídos de goma de pêssego rica em arabinogalactana, verificou que o tratamento com as frações contendo estes compostos foram capazes de inibir significativamente a proliferação da linhagem celular de câncer de fígado humano HepG2 e da linhagem de tumor mamário MCF-7.

Além da capacidade proliferativa, outros fatores favorecem fortemente o processo de progressão tumoral, como a capacidade destas células migrarem deixando o tumor primário e colonizarem outros tecidos, processo este denominado metástase. Estatísticas demonstram que nove em cada dez mortes em decorrência do desenvolvimento de tumores, são resultado da formação de metástase (LAMBERT, PATTABIRAMAN & WEINGERG, 2016). Atualmente a Dacarbazina é o principal quimioterápico utilizado no tratamento de melanomas metastáticos (DOMINGUES *et al.*, 2019), contudo, sua ação oferece aos pacientes apenas uma taxa de sobrevida média de 6 a 9 meses, além de uma já conhecida gama de efeitos colaterais deletérios à saúde geral dos pacientes (OLIVEIRA, 2002; BUSHATSKY *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2017). Outros fatores como o desenvolvimento de resistência ao tratamento quimioterápico (NASCIMENTO, 2016) também influenciam diretamente a eficiência do tratamento e, portanto, exercem influência sobre a taxa de sobrevida dos pacientes. Este fato corrobora a necessidade da busca por novos agentes capazes

de agir sobre estes parâmetros envolvidos no processo de formação de metástases, e os polissacarídeos têm se tornado fortes candidatos. Ao avaliarem os efeitos de polissacarídeos extraídos dos frutos de *Mangifera indica* (mangueira) sobre a migração celular das linhagens celulares humanas A549 (adrenocarcinoma alveolar basal), A375 (melanoma), HCT116 (carcinoma colorretal), e MCF-7 (carcinoma mamário), Varghese *et al.* (2019) verificaram que o tratamento com diferentes frações de polissacarídeos de mangueira foi capaz de inibir significativamente a taxa de migração dessas células. O mesmo resultado foi observado pelos autores ao avaliarem os efeitos das mesmas frações sobre a linhagem celular de melanoma murino B16F10. Estudos realizados avaliando a utilização de pectinas ricas em ramnogalacturonana demonstraram que este tratamento foi capaz de diminuir a taxa de migração celular em fibroblastos (FAN *et al.*, 2018).

Apesar destes promissores resultados demonstrados em outros estudos, neste trabalho não observamos alterações significativas na taxa de migração celular da linhagem B16F10 após o tratamento com as frações de polissacarídeos em estudo, tendo os resultados sido semelhantes aos apresentados pelo grupo controle (Figuras 17 e 18). Apesar disto, a influência dos polissacarídeos estudados sobre a taxa de migração não pode ser descartada, pois, neste estudo, a avaliação da taxa de migração foi feita com base na comparação apenas entre as horas 0 e 24 após a realização do *scratch*, não fornecendo bases sobre se houve ou não algum atraso do processo de migração durante as horas iniciais após a abertura da “ferida”. Além disto, outras técnicas podem ser empregadas para a avaliação da capacidade migratória, cujos resultados poderiam demonstrar uma outra perspectiva, contudo, estes ensaios não foram abordados em nosso estudo.

Como citado anteriormente, o processo de formação de metástase envolve, além da capacidade de migração, a capacidade de, a partir da proliferação de uma única célula, ocorrer a formação de uma colônia em um outro tecido que não o local de origem do tumor primário. A realização de estudos visando observar os efeitos dos polissacarídeos sobre a capacidade clonogênica de células tumorais tem demonstrado resultados promissores. Varghese *et al.* (2019) observaram que polissacarídeos extraídos de mangueira são capazes de reduzir a formação de colônias em diferentes tipos de tumores, dentre eles o melanoma murino da linhagem B16F10. Para avaliarem os efeitos de uma fração de polissacarídeos pécticos obtidos

de *Capsicum annuum* rica em homogalaturonana metil-esterificada, sobre a capacidade de colonização celular, Adami e *al.* (2018) utilizaram células de linhagens de tumores mamários (MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436), e observaram que o tratamento reduziu, de forma dose dependente, a formação de colônias dos grupos tratados, tendo os grupos tratados com 100 µg/ml apresentado a maior redução. Estes resultados corroboram os obtidos em nosso estudo, em que observamos que FA e FM, reduziram de forma significativa a formação de colônias quando utilizadas em sua maior concentração (10 µg/ml para FA e 100 µg/ml para FM), reforçando seu efeito dose dependente (Figuras 20 e 21). Além disto, os resultados obtidos no ensaio clonogênico realizado, também ajudam a corroborar os resultados obtidos em nosso ensaio de proliferação, uma vez que o processo de colonização é intimamente dependente da capacidade de proliferação apresentados pelas células que foram capazes de invadir um determinado tecido.

Com o objetivo de avaliar a nível molecular genes relacionados com a proliferação celular, processo que foi diminuído após o tratamento com os polissacarídeos, foram extraídos dados do banco de dados NPCARE. Este banco de dados, armazena informações a respeito de genes que tiveram seus níveis de expressão alterados em diversos tipos de tumores após tratamento com compostos naturais. Inicialmente, filtrou-se os compostos que foram extraídos de espécies frutíferas, resultando na seleção de nove gêneros (Figura 22). A partir destes dados, foram comparados os genes que apareceram desregulados em tumores que foram avaliados em estudos com tratamentos naturais, e compartilhados entre os gêneros por meio da realização de um diagrama do tipo *Up Set Plot* (Figura 23). Após a intersecção destes dados, foram selecionados os genes *MAPK1* e *PARP1*, por estarem compartilhados em seis e cinco grupos, respectivamente. Destaca-se aqui, que *CASP3* e *BCL2* não foram selecionados para esta análise pois observa-se na literatura uma maior relação biológica destes genes com o processo de apoptose, que não foi avaliado neste trabalho (JIANG *et al.*, 2020).

A análise de expressão gênica dos genes *MAPK1* demonstrou que o tratamento com a menor concentração de FA (Figura 24 A) e de FM (Figura 25 A) reduziram a expressão deste gene em comparação ao grupo controle. A literatura demonstra a importância de *MAPK1* sobre o funcionamento da cascata de sinalização mediada pela proteína MAPK1 por ele sintetizada, onde uma maior expressão deste

gene resulta em maior taxa de proliferação celular, processo que favorece o estabelecimento tumoral (MCG, 2019; SI *et al.*, 2017; BASHANFER *et al.*, 2018; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Avaliando os efeitos das mesmas frações sobre a expressão de *PARP1*, observamos efeitos distintos entre as concentrações e entre as frações estudadas. O tratamento com a menor concentração de FA resultou em redução da expressão do gene em comparação ao grupo controle (Figura 24 B). Atualmente os inibidores de PARP vem sendo uma importante opção no tratamento de uma variedade de tumores (ASHWORTH & LORD, 2017), uma vez que a diminuição da expressão desta proteína em virtude da diminuição da expressão do gene *PARP* diminui o processo de reparo e, portanto, resulta em morte celular. Além disto, pacientes com tumores com altos níveis de expressão de PARP têm demonstrado melhora significativa em seu tempo geral de sobrevida e de progressão da doença após serem submetidos a tratamento com inibidores de PARP (BAO *et al.*, 2015). Sendo assim, este resultado demonstra uma aplicação terapêutica desta fração em baixas concentrações como inibidor natural de PARP. Apesar deste resultado, para que este efeito seja confirmado são necessários mais estudos avaliando os efeitos desta fração sobre a via de sinalização envolvendo este gene.

Não se observou relação biológica entre o tratamento com FM e a expressão de *PARP1* (Figura 25 B).

Os achados deste trabalho abrem novas perspectivas sobre o tratamento de tumores com polissacarídeos obtidos de plantas de grande importância comercial no Brasil, levando em consideração a busca não somente por moléculas com propriedades aplicáveis na indústria farmacêutica, mas o bem-estar dos pacientes e o aproveitamento de resíduos agroindustriais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As frações de polissacarídeos obtidas de Açai e Maracujá apresentaram resultados promissores sobre o modelo utilizado neste estudo. Estas frações apresentaram resultados positivos em quase todos os parâmetros avaliados (viabilidade, proliferação, formação de colônias e expressão gênica de *MAPK1* e *PARP1*).

Apesar de não terem exercido efeitos sobre a migração celular no ensaio desenvolvido neste estudo nos tempos de avaliação utilizados, mais períodos de avaliação precisariam ser analisados para o melhor monitoramento do tempo de fechamento da “ferida”.

Em nosso estudo, verificamos que as frações de polissacarídeos apresentaram efeito dose dependente na maioria dos parâmetros avaliados, tendo a concentração mais baixa FA apresentado os resultados mais promissores, o que é desejável do ponto de vista farmacológico, enquanto FM obteve resultados mais promissores em sua concentração mais alta.

Os resultados positivos observados por este trabalho demonstram a potencial aplicabilidade destes compostos no tratamento de tumores. Desta forma, a realização de novos estudos visando elucidar os mecanismos envolvidos na influência destas frações sobre células tumorais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, podem trazer novas perspectivas sobre sua potencial aplicação como tratamento ou como terapia adjuvante para pacientes portadores de tumor.

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**, [S.L.], v. 54, p. 552-558, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.003>.
- ALESSANDRA-PERINI, J. *et al.* Anticancer Potential, Molecular Mechanisms and Toxicity of Euterpe oleraceas Extract (açai): A Systematic Review. **Plos One**, v.13, 2018.
- ALMEIDA, R. C. C. R. **Perfil e Condições Bucais de Pacientes Oncológicos do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas** [Monografia de Especialização]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2012.
- AMARAL, S. C. *et al.* Cytotoxic effect of crude and purified pectins from *Campomanesia xanthocarpa* Berg on human glioblastoma cell lines. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 224, p. 115140, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115140>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Global Cancer Facts & Figures 2015. 3a ed. **American Cancer Society**: Atlanta, 2015.
- BAO, Z. *et al.* Effectiveness and safety of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 7629-7639, 22 set. 2015. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.5367>
- BASHANFER, S. A. *et al.* Disruption of MAPK1 expression in the ERK signalling pathway and the RUNX1-RUNX1T1 fusion gene attenuate the differentiation and proliferation and induces the growth arrest in t(8;21) leukaemia cells. **Oncology Reports**, v. 41, p. 2027-2040, 12 dez. 2018. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2018.6926>.
- BI, F.; LI, D.; YANG, Q. Hypomethylation of ETS Transcription Factor Binding Sites and Upregulation of PARP1 Expression in Endometrial Cancer. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2013, p. 1-5, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/946268>.
- BOIA-FERREIRA M. *et al.* TCTP as a Therapeutic Target in Melanoma Treatment. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 5, p. 656-665, 2017.
- BONNEKOH, B. *et al.* Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. **Archives of Dermatological Research**, v. 281, p. 487–490, 1989.
- BORGES, B. E. *et al.* The Flavo-oxidase QSOX1 Supports Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation: Evidence for a Role in Neointima Growth. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 7, p.1334-1346, 2015.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, nov. 2018.

BUSHATSKY, M. *et al.* Qualidade de vida em mulheres com câncer de mama em tratamento quimioterápico. **Cienc Cuid Saude**, v. 16, n. 3, p. 1-7, jul/set. 2017.

CANTU-JUNGLES, T. M. *et al.* Extraction and characterization of pectins from primary células walls of edible açai (*Euterpe oleraceae*) berries, fruits of a monocotyledon palm. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 158, p. 37-43, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.090>.

CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surgical Clinics of North America*, Marshfield, v. 100, n. 1, p. 1-12, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005>

COBS-ROSAS, M. *et al.* Assessment of antiproliferative activity of pectic substances obtained by different extraction methods from rapeseed cake on cancer células lines. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 117, p. 923-932, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.027>.

COLEY-NAUTS, H., SWIFT, W. E., COLEY, B. L. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, MD, revised in the light of modern research. **Cancer Research**, 1946; 6: 205-216.

CSEH, A. M. *et al.* PARP Inhibitor PJ34 Protects Mitochondria and Induces DNA-Damage Mediated Apoptosis in Combination With Cisplatin or Temozolomide in B16F10 Melanoma Cells. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 10, n. [], p. 1-15, 7 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.00538>.

CUNHA, F. F. *et al.* Oncologic Patients Representations About the Antineoplastic Chemotherapy Treatment. **Journal Research Fundamental Care Online**, v. 9, n. 3, p. 840-847, jul/set. 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.9789/2175-5361.2017.v9i3.840-847>. Acesso em: 02 abr. 2020.

DOMINGUES, B.; LOPES, J.; SOARES, P.; POPULO, H. Melanoma treatment in review. **Immuno Targets and Therapy**, v. Volume 7, p. 35-49, 2018.

DUNKI-JABOCS, E. M. *et al.* Current Management of Melanoma. **Current Problems in Surgery**. United States, p. 351-382. abr. 2013.

EMBRAPA. **Boas práticas na cadeia de produção de açai**. Informativo Embrapa, Brasília, p. 1-10, 16 out. 2021. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1135385>. Acesso em: 04 dez. 2021.

EMBRAPA. Maracujá: o produtor pergunta, a embrapa responde. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 1-348, 2016.

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Maracujá amarelo com polpa mais colorida e maracujá roxo são novidades da**

pesquisa da Epagri. 2020. Disponível em: <https://www.epagri.sc.gov.br/index.php/2020/04/22/maracuja-amarelo-com-polpa-mais-colorida-e-maracuja-roxo-sao-novidades-da-pesquisa-da-epagri/>. Acesso em: 10 nov. 2021.

FAN, Y. *et al.* The roles and mechanisms of homogalacturonan and rhamnogalacturonan I pectins on the inhibition of células migration. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 106, p. 207-217, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.004>.

FREITAS, D. S. *et al.* Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the Euterpe oleracea Mart. seed in the MCF-7 células line. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 714-721, jun. 2017.

Genecards: The Human Gene Database. **MAPK1 Gene - Mitogen-Activated Protein Kinase 1**. 2017. Disponível em: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAPK1>. Acesso em: 16 mar. 2022.

GORDON, Randy. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. **Seminars In Oncology Nursing**, Alabama, v. 29, n. 3, p.160-169, ago. 2013.

GUO, M. Q. *et al.* Polysaccharides: structure and solubility. **Solubility Of Polysaccharides**, [S.L.], p. 7-21, 29 nov. 2017. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71570>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [S.L.], v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, [S.L.], v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HARTMAN, R. I.; LIN, J. Y. Cutaneous Melanoma - A Review in Detection, Staging, and Management. **Hematology/Oncology Clinics Of North America**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 25-38, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2018.09.005>.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde – **Câncer de Pele Melanoma**, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em 25 mar 2020.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde – **O que é Câncer?** 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em 30 mar 2020.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde – **Incidência de câncer no Brasil**, 2018. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer>>. Acesso em 30 mar. 2020.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde – **Estimativa 2020 Incidência de Câncer no Brasil**, 2020. Disponível em:

<http://www.oncoguia.org.br/pub/3_conteudo/2020/estimativa_cancer_2020.pdf>.

Acesso em: 01 abr. 2020.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde – **Tratamento do Câncer**, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento/quimioterapia>>. Acesso em 02 abr. 2020.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde – **Como Prevenir o Câncer**, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/como-prevenir-o-cancer>>. Acesso em 03 abr. 2020.

INCA - **Instituto Nacional do Câncer. Câncer de Pele Melanoma**. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>. Acesso em: 14 set. 2021.

JIANG, M. *et al.* The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. **Cell Death Discovery**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-11, 28 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41420-020-00349-0>.

KAPPELMAYER, J. *et al.* Progress in Defining Multidrug Resistance in Leukemia. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 4, n. 2, p. 209–17, mar. 2004.

KOOPMAN, G. *et al.* Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Células Undergoing Apoptosis. **Blood**, v. 84, p 1415-1420, 1994.

KUETE, *et al.* Cytotoxicity of Methanol Extracts of *Annona muricata*, *Passiflora edulis* and Nine other Cameroonian Medicinal Plants Towards Multi-Factorial Drug-resistance Cancer Células Lines. **Springer Plus**, v.5, p.1666, 2016.

KWON Y. Mechanism-based Management for Mucositis: Option for Treating Side Effects Without Compromising the Efficacy of Cancer Therapy. **Onco Targets Ther**, v. 2016, n. 9, p. 2007-2016, abr. 2016. Review.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Células**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 2016

LEAL, V. D., FERREIRA LA, SANTOS MN, FIGUEIREDO PTDS. Tratamento odontológico em pacientes oncológicos. **Oral Sciences**, v. 4, n. 2, p. 37-42, jul/dez 2012.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 7ª Edição, 2018. Ed. Artmed.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS D. A. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 7a ed. Philadelphia, LWW, 2012.

LI, J. *et al.* Pectic oligosaccharides hydrolyzed from citrus canning processing water by Fenton reaction and their antiproliferation potentials. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 124, p. 1025-1032, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.166>.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–33, jan. 2007.

MAGALHÃES, D. O. L. *et al.* Interações realizadas por genes líderes do câncer de mama: uma abordagem computacional. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1-11, 16 maio 2019. Revista Eletronica Acervo Saude. <http://dx.doi.org/10.25248/reas.e301.2019>.

MARTINEZ, R. M. *et al.* Açai (Euterpe oleracea Mart.) Seed Extract Induces Células Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Célulass. **Food**, v. 178, n. 7, p. 1-9, out. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer: Sintomas, Causas, Tipos e Tratamentos**, 2019. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer>>. Acesso em 30 mar. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ipilimumabe para tratamento de pacientes com melanoma metastático: relatório técnico**. 391. ed. Brasília: 2018. 37 p.

MONGE-FUENTES, V. *et al.* Photodynamic therapy mediated by acai oil (Euterpe oleracea Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. **Journal Of Photochemistry And Photobiology**, v. 166, p. 301-310, jan. 2017. 35 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for célulasular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, N. S. R. S. *et al.* In vivo Antitumor Activity of By-products of Passiflora edulis f. flavicarpa Deg. Rich in Medium and Long Chain Fatty Acids Evaluated Through Oxidative Stress Markers, Células Cycle Arrest and Apoptosis Induction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 557-565, 2018.

MY CANCER GENOME (org.). **Biomarkers - MAPK1**. 2019. Disponível em: <https://www.mycancergenome.org/content/gene/mapk1/>. Acesso em: 16 mar. 2022.

NERI-NUMA, I. A. *et al.* Small Brazilian Wild Fruits: Nutrients, Bioactive Compounds, Health-promotion Properties and Commercial Interest. **Food Research International**, v.103, p.345–360, 2018.

OLIVEIRA, M. do S. P. de; FARIAS NETO, J. T.; PENA, R. da S. **Açaí: técnicas de cultivo e processamento**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2007. 104 p.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma Nova Alternativa para o Tratamento de Tumores Sólidos. **Química Nova**, v.25, n.6, p.976-984, 2002.

OOI, V. E.; LIU, F. Immunomodulation and Anti-cancer Activity of Polysaccharide-proteins Complexes. **Current Medicinal Chemistry**, v.7, p.715-729, 2000.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. Organização Mundial da Saúde – **Câncer**, 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>. Acesso em: 01 abr. 2020

PAZZAGLIA, S.; PIOLI, C. Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: pathological and therapeutic implications in cancer and non-cancer diseases. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 41, 22 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9010041>.

PETERS, C. E. *et al.* Carga de câncer de pele não melanoma atribuível à exposição ocupacional ao sol no Canadá. **Arquivos internacionais de saúde ocupacional e ambiental**, v. 92, n. 8, pág. 1151-1157, 2019.

PRADO, G. *et al.* What's New in Melanoma. *Dermatologic Clinics*, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 159-168, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2018.12.005>.

RASTRELLI, *et al.* Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. **In Vivo**, Belmar, v. 28, n. 6, p. 1005-1011, 14 nov. 2014. Disponível em: <https://iv.iarjournals.org/content/28/6/1005>. Acesso em: 06 jan. 2022.

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

ROCA-LEMA, D. *et al.* *In Vitro* Anti-proliferative and Anti-invasive Effect of Polysaccharide-rich Extracts from *Trametes Versicolor* and *Grifola Frondosa* in Colon Cancer Célulass. **International Journal of Medical Sciences**, [S.I.], v. 16, n. 2, p. 231-240, jan. 2019. <https://doi.org/10.7150/ijms.28811>

SALEMI, M. *et al.* Poly (ADP-ribose) polymerase 1 protein expression in normal and neoplastic prostatic tissue. **European Journal of Histochemistry**, [S.L.], v. 57, n. 13, p. 80-82, 15 abr. 2013. PAGEPress Publications. <http://dx.doi.org/10.4081/ejh.2013.e13>.

SCHEIN, C. F. *et al.* Side Effects of Chemotherapy in Hospitalized Cancer Patients. **Disc. Scientia, Santa Maria**, v. 7, n. 1, p. 101-107, jun. 2006.

SI, W. *et al.* A miR-20a/MAPK1/c-Myc regulatory feedback loop regulates breast carcinogenesis and chemoresistance. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 406-420, 10 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.176>.

SILVA, D. C. *et al.* Polysaccharides Isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and Antitumor Properties. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.139-145, 2012.

SILVA, D. F.; VIDAL, F. C.; SANTOS, D.; COSTA, M. C. *et al.* Cytotoxic Effects of *Euterpe oleracea* Mart. in Malignant Células Lines. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 175, 2014.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal of Clinicians**, [s. l], v. 71, n. 3, p. 209-249, 04 fev. 2021. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 5 jan. 2022.

SZAKÁCS, G. *et al.* Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nature reviews. Drug Discovery*, v. 5, n. 3, p. 219–34, mar. 2006.

THANVI, J.; BUMB, D. Impact of Dental Considerations on the Quality of Life of Oral Cancer Patients. **Indian Journal of Medical and Pediatric Oncology: Official Journal of Indian Society of Medical & Pediatric Oncology**, v. 35, n. 1, p. 66-70, jan. 2014.

The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery*. 2017;7(8):818-831. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0151

VARGHESE, Sheeja *et al.* Immunostimulatory plant polysaccharides impede cancer progression and metastasis by avoiding off-target effects. **International Immunopharmacology**, [S.l], v. 73, p. 280-292, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.025>

VIEIRA, G. T. *et al.* Avaliação citotóxica do extrato de *Croton urucurana* Baill contra linhagens de células leucêmicas humanas U937 e THP1. **Ciência e Natura**, v.39, n.3, p. 512-519, 2017.

WANG, Y. *et al.* Ginger Polysaccharides Induced Células Cycle Arrested and Apoptosis in Human Hepatocélulasular Carcinoma HepG2 Célulass. **International Journal of Biological Micromolecules**, v.123, p.81-90, 2018.

WEI, C. *et al.* Structural characterization and anti-proliferative activities of partially degraded polysaccharides from peach gum. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 203, p. 193-202, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.029>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – **International Agency for Research on Cancer**, (2018). Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em 5 abr. 2020.

YAMAMOTO, T. *et al.* Effect of piceatannol-rich passion fruit seed extract on human glyoxalase I-mediated cancer células growth. **Biochemistry And Biophysics Reports**, v. 20, p. 1-8, ago. 2019.

ZHANG, Z. *et al.* Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 células via mechanism involving the ROS-dependent JNK activation and mitochondrial mediated pathways. **PlosOne**, v.11, n.6, p.e27441, 2011.

ZHAO, Y. *et al.* Advances in Imaging Plant Células Walls. **Trends In Plant Science**, [s. l], v. 24, n. 9, p. 867-878, 27 jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.009>