

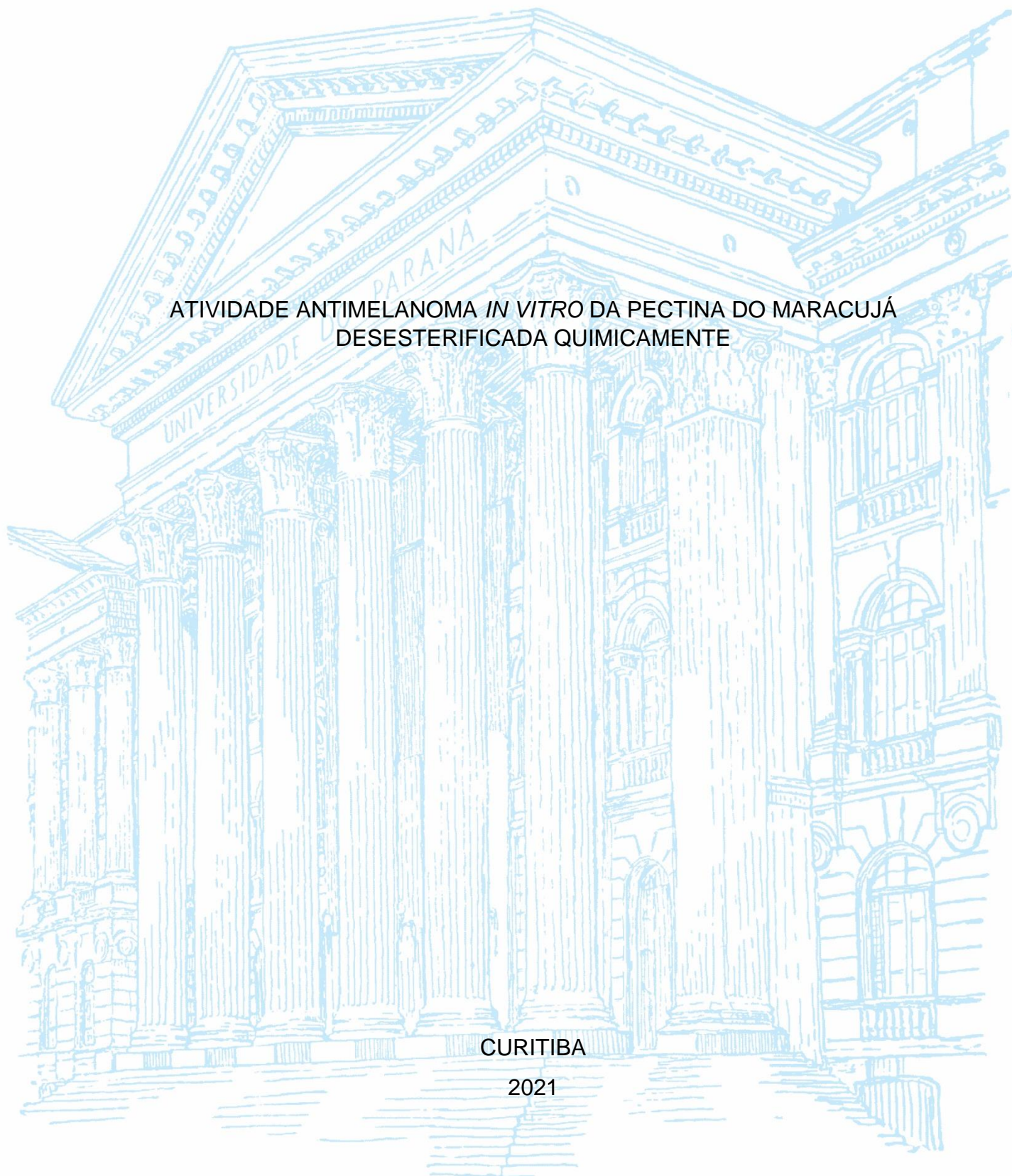
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA LAÍS GONÇALVES RIBEIRO

ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VITRO* DA PECTINA DO MARACUJÁ
DESESTERIFICADA QUIMICAMENTE

CURITIBA

2021



CAMILA LAÍS GONÇALVES RIBEIRO

ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VITRO* DA PECTINA DO MARACUJÁ
DESESTERIFICADA QUIMICAMENTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

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

Coorientador: Prof. Dr. Daniel de Lima Bellan

CURITIBA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

CAMILA LAÍS GONÇALVES RIBEIRO

ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VITRO* DA PECTINA DO MARACUJÁ DESESTERIFICADA QUIMICAMENTE

Trabalho de Conclusão de Curso II do Curso de Graduação em Biomedicina. Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção de aprovação na disciplina TCC II.



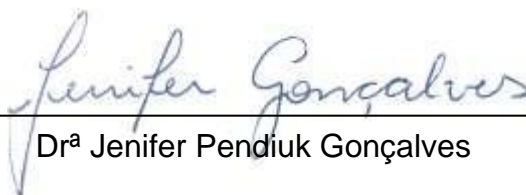
Profª Drª Fernanda Fogagnoli Simas (ORIENTADORA)

Universidade Federal do
Paraná Setor de Ciências
Biológicas Departamento de
Biologia Celular



Profª Drª Marília Locatelli Correa Ferreira Universidade

Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular



Drª Jenifer Pendiuk Gonçalves

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia
Celular

Curitiba, 16 de dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer imensamente aos meus pais (Carla e Alvacir), ao meu irmão (Bruno) e sua namorada (Karoline). Mãe, você é meu maior exemplo de mulher, de mãe, de profissional. Eu nunca vou me esquecer dos seus olhos cheios de lágrimas em frente ao Prédio Histórico, nada é tão nosso quanto os nossos sonhos, lembra? Pai, você é definitivamente o melhor pai que poderia existir, sempre se preocupando comigo e fazendo de tudo para me ver bem (inclusive bem alimentada!), você transborda amor e empatia, meu grande exemplo. Bu, meu melhor amigo, meu confidente. Eu admiro e amo tanto você que quase não cabe em mim. Obrigada por sempre me ouvir, aconselhar e sobretudo por ser paciente comigo e ser meu exemplo de ser humano desde sempre. Vocês apostaram em todos os meus sonhos, possibilitaram que eu estivesse aqui hoje e nunca mediram esforços para que eu conquistasse todos eles. Vocês são minha base. Amo muito vocês!

Agradeço ao meu namorado, Lucas, e toda a sua família (Claudia, Luan, Jessica, Nara e Rafael). Obrigada por ouvir todas as minhas angústias, inseguranças e medos durante esta jornada, por ser meu companheiro fiel e por sempre acreditar em mim e vibrar pelas vitórias junto comigo. Além de acordar 6 horas da manhã em finais de semana e feriados para me levar ao laboratório. Amo e admiro muito você!

À minha mãe científica, Dr^a. Fernanda Fogagnoli Simas, que deu uma chance à uma garota 4 anos atrás que não tinha muito conhecimento a oferecer ainda, mas que sonhava com a pesquisa acadêmica.

Ao meu coorientador, Dr. Daniel de Lima Bellan, que topou essa aventura que é o TCC sem pestanejar e aguentou todas as minhas dúvidas e inúmeras mensagens. Serei eternamente grata.

Aos professores Dr^a. Carolina Camargo, Dr. Edvaldo Trindade e Dr^a. Célia Franco que somaram imensamente para o meu trabalho e para o desenvolvimento do meu pensamento crítico e científico. Também à Prof.^a Dr^a. Lucimara Mach Cortes Cordeiro por extrair, caracterizar e gentilmente ceder o polissacarídeo nativo da casca do maracujá, utilizado neste trabalho, bem como a Ma. Keila Vaz da Luz, por ter confiado sua amostra para uso, à Prof.^a Dr^a. Lucélia Donatti e ao Prof. Dr. Gláucio Valdameri pelo empréstimo dos equipamentos laboratoriais. Agradeço também aos

demais colaboradores do Setor de Ciências Biológicas, essenciais ao desenvolvimento do projeto.

A todos os meus companheiros de laboratório que me ajudaram muito nesse processo, inclusive compartilhando resultados, conselhos, cafés e boas risadas. Obrigada por nunca desistirem de mim: Bruna, Keila, Anderson, Aline, Yasmin, Alecsandra, Stellee, Gabriel, Jacqueline, Jéssica e João.

À Mariane pelas longas conversas sobre o TCC, por me apoiar sempre, tranquilizar-me e dividir a pipoca e o café comigo. Você sempre foi referência e base para mim. Minha irmã do coração. Obrigada por tanto!

À Bárbara por sempre confiar em mim, sempre me incentivar e, sobretudo, por ser a minha companheira na Universidade, colaboradora na vida e até na ciência. Minha cientista preferida!

À Nicoli por estar perto mesmo estando a mais de 100 quilômetros de distância. Você conheceu todas as minhas fases durante esses 9 anos de amizade e nunca deixou de me apoiar em nenhuma delas. Você brilha, minha advogada preferida!

Aos meus segundos pais e padrinhos, Roger e Paola, por sempre acreditarem em mim, participarem de tudo e por me darem tanto amor e carinho ao longo desses 21 anos. Sem vocês eu não estaria aqui. Obrigada por me presentear com dois grandes amores da minha vida, a Bibi e a Isa. Espero ser exemplo para elas assim como vocês são para mim.

À Vera por ser uma mãe para mim. Sempre me apoiando e me dando asas para voar mais longe e conquistar o mundo. Você é exemplo de força.

Aos meus avós, Glaci, Margarida, José e Armelindo (*in memoriam*) por serem pilares da minha vida, por sempre zelarem por mim e transbordarem amor e respeito por todos. Vocês são incríveis.

Um navio está seguro no porto, mas não
é para isso que os navios foram criados

John A. Shedd

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele extremamente metastático que tem origem nos melanócitos, células não-tumorais presentes na epiderme. Os pacientes diagnosticados com melanoma metastático apresentam baixa taxa de sobrevida (entre 6 e 12 meses), visto que as terapias atuais apresentam inúmeros efeitos adversos, além de não melhorarem significativamente a qualidade de vida. Para aprimorar o tratamento dos pacientes, polissacarídeos extraídos de diferentes fontes, como plantas e fungos, têm sido estudados e apresentam potencial ação antitumoral sobre diversos tipos de câncer. Dentre eles, destaca-se o maracujá (*Passiflora edulis*) como potencial fonte de polissacarídeos, além de apresentar alta biodisponibilidade no Brasil. A polpa do maracujá é utilizada pela indústria, mas sua casca é considerada resíduo industrial, sendo descartada. Estudos recentes demonstraram potencial antitumoral da homogalacturonana extraída da casca do maracujá em diversos tipos de câncer e um potencial ainda maior quando desesterificada quimicamente. Após nosso grupo de pesquisa ter avaliado a ação da homogalacturonana nativa no melanoma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimelanoma *in vitro* da homogalacturonana na sua forma desesterificada (HGD). Células de melanoma murino (B16-F10) e fibroblastos não tumorais (Balb/3T3) foram expostos a diferentes concentrações da HGD (1, 10, 100 e 1000 µg/mL) por 72 horas, sendo avaliados viabilidade e proliferação celular nas duas linhagens celulares, e outros dois parâmetros de malignidade tumoral: capacidade clonogênica e ciclo celular. Após o tempo de tratamento, células de melanoma tratadas com a pectina HGD, nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL, proliferaram menos do que as células não tratadas. Efeito não observado na linhagem de células não tumorais. Além disso, células de melanoma tratadas com HGD (1000 µg/mL) formaram colônias menores do que o grupo controle, no entanto nenhuma diferença foi observada no ciclo celular da B16-F10. Portanto, os resultados observados apresentam interessantes efeitos da HGD contra as células de melanoma para serem posteriormente compreendidos e explorados como um potencial polissacarídeo antitumoral.

Palavras-chave: Câncer. Antimelanoma. Pectina. Homogalacturonana. Maracujá.

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer extremely metastatic originating from melanocytes, non-tumor cells of the epidermis. Patients diagnosed with metastatic melanoma have a low survival rate (between 6 and 12 months) and the available therapies have many adverse effects and do not provide a significant improvement in quality of life. To improve patient care and ensure a higher survival rate, polysaccharides extracted from different sources, such as plants and fungi, have been studied and have been shown to present a potential antitumor action on different types of cancer. Among them, the passion fruit (*Passiflora edulis*) is a rich source of polysaccharides in addition to having high bioavailability in Brazil. Passion fruit pulp is used by the industry, but its peel is considered industrial waste, being discarded. Recent studies have been shown the antitumor potential of homogalacturonan extracted from passion fruit peel and a biggest potential when it is chemically de-esterified. After our research group evaluated the action of native homogalacturonan in melanoma, the purpose of this project was to evaluate the *in vitro* antimelanoma activities of a homogalacturonan extracted from passion fruit peel (*Passiflora edulis*) using its de-esterified form (HGD). Murine melanoma cells (B16-F10) and non-tumor fibroblasts (Balb/3T3) were exposed to different concentrations of HGD (1, 10, 100 and 1000 µg/mL) for 72 hours. Cell viability and proliferation were analyzed in both cell lines. Tumor malignancy related parameters were analyzed using B16-F10 cells: colony formation and cell cycle. After treatment exposure, melanoma cells treated with HGD, at concentrations of 100 and 1000 µg/mL, proliferated less than untreated cells. This effect was not observed in the non-tumor cell line. Besides that, melanoma cells treated with HGD (1000 µg/mL) formed smaller colonies than the control group, however no differences were observed in B16-F10 cell cycle. Therefore, the observed results show an interesting effect of HGD against melanoma cells to be further comprehend and explored as a potential antitumor polysaccharide.

Keywords: Cancer; Antimelanoma; Pectin; Homogalacturonan; Passion fruit.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 CÂNCER | 14 |
| 2.2 MELANOMA..... | 17 |
| 2.2.1 Tratamentos para o melanoma..... | 19 |
| 2.3 POLISSACARÍDEOS E SUAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS..... | 20 |
| 2.4 PECTINAS – ESTRUTURA E ATIVIDADE ANTITUMORAL..... | 22 |
| 2.5 PECTINA EXTRAÍDA DA CASCA DO MARACUJÁ AMARELO (<i>Passiflora edulis</i>)..... | 24 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 25 |
| 4 OBJETIVOS | 27 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL | 27 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 27 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 5.1 OBTENÇÃO DA PECTINA DA CASCA DO MARACUJÁ..... | 28 |
| 5.2 DESESTERIFICAÇÃO | 28 |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PECTINA DESESTERIFICADA (HGD)..... | 29 |
| 5.4 LINHAGENS E CULTIVO CELULARES..... | 30 |
| 5.5 TRATAMENTO – PREPARO DO POLISSACARÍDEO | 30 |
| 5.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR | 31 |
| 5.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR | 32 |
| 5.8 ENSAIO DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA | 33 |
| 5.9 ENSAIO DE CICLO CELULAR | 34 |
| 5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 6.1 CARACTERIZAÇÃO DA PECTINA DESESTERIFICADA..... | 36 |
| 6.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR | 37 |
| 6.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS..... | 39 |
| 6.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR | 40 |
| 6.5 GEL À BASE DE PECTINA DE BAIXO GRAU DE METILESTERIFICAÇÃO | 41 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 44 |
| REFERÊNCIAS..... | 45 |

1 INTRODUÇÃO

O termo câncer é cunhado de forma a englobar mais de 200 doenças diferentes que compreendem o crescimento exacerbado e acelerado de células mutadas. Essas podem invadir órgãos e tecidos distantes, ocasionando as chamadas metástases (INCA, 2020; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

Dentre os diversos tipos de câncer, o melanoma é um tipo de câncer de pele decorrente do acúmulo de mutações nos melanócitos – células não-tumorais da epiderme responsáveis pela produção de melanina, pigmento que dá sua coloração. Apesar de esse tipo de câncer representar apenas 1% de todos os cânceres de pele, é responsável por cerca de 90% de todas as mortes pelo mesmo tipo de câncer, devido à sua alta capacidade metastática (EDDY; CHEN, 2020).

A taxa de sobrevivência de pacientes diagnosticados com melanoma depende do nível de estadiamento do tumor, sendo muito maior na ausência de tumores secundários. Com relação ao seu tratamento, uma das primeiras intervenções é a cirurgia de excisão local ampla do tumor primário (EDDY; CHEN, 2020). Além disso, podem ser realizadas radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e terapia direcionada, utilizando-se diversos medicamentos aprovados por agências reguladoras nacionais e internacionais (NIH, 2021). No entanto, apesar de novos medicamentos terem sido aprovados desde 2011 para o tratamento do melanoma – como o Ipilimumab e o Vemurafenib – os pacientes continuam apresentando baixa taxa de sobrevivência e diversos efeitos adversos devido à alta toxicidade desses fármacos (RALLI et al., 2020).

Assim, surge a necessidade da investigação de novas moléculas que sejam promissoras no tratamento antimelanoma. Nas últimas décadas, polissacarídeos extraídos de fontes naturais, como fungos, algas e plantas, têm mostrado ação antitumoral, sendo pouco ou não citotóxicos e modulando vias associadas a malignidade tumoral, como a via BRAF (resultado da mutação no gene BRAF, promovendo maior crescimento celular e a inibição de morte celular), via NRAS (resultado da mutação no gene RAS, promovendo crescimento celular, proliferação e disfunção do ciclo celular) e a via KIT (resultado da mutação no gene KIT, promovendo crescimento celular, proliferação e migração celular) (BELLAN et al., 2020a, 2020b; BISCAIA et al., 2017; DAVIS et al., 2018; SOHRETOGLU; HUANG, 2018; SONG et

al., 2011; WASSER, 2011). Dentre os polissacarídeos investigados, destaca-se neste trabalho as pectinas – um dos polissacarídeos presentes na parede celular vegetal. Frutos são fontes abundantes de pectinas e, apesar deste grupo de polissacarídeos ser muito diverso, todas as pectinas possuem em comum em sua estrutura ácido galacturônico na sua cadeia principal. Homogalacturonanas, um tipo de pectina, são homopolissacarídeos compostos por unidades de ácido galacturônico unidas por ligações do tipo α -(1→4). Tais unidades podem estar metil-esterificadas, em maior ou menor proporção, dependendo da fonte de onde são extraídas. (ZHANG; XU; ZHANG, 2015). As pectinas são classificadas de acordo com o seu grau de metil-esterificação (DE), que pode ser de alto grau (HM) quando apresenta mais de 50% de ramificações metil-éster em sua estrutura química, e de baixo grau (LM) quando apresenta menos de 50% desse tipo de ramificação (BRANDÃO; ANDRADE, 1999).

As características estruturais das pectinas, especialmente das homogalacturonanas, permitem que, em condições adequadas, elas formem géis ou soluções com diferentes viscosidades. A formação do gel depende principalmente de três fatores: concentração de pectina (e seu DE) e de açúcar, a presença de agentes ligantes, a temperatura e o pH da solução. Quando a solução apresenta pectinas HM, uma alta concentração de açúcar e um pH < 3,5, há formação de ligações de hidrogênio e ação de forças hidrofóbicas que ocasionam em um gel estável. Já quando a solução apresenta pectinas LM, íons Ca^{+2} e um pH de 8,5, aproximadamente, os grupos carboxila livres estão em maior concentração e sua interação com os íons cálcio favorece a formação de géis mais compactos (GAWKOWSKA; CYBULSKA; ZDUNEK, 2018). A propriedade de formação de géis tem grande valor na indústria de alimentos, onde elas são utilizadas como estabilizantes de sucos naturais e agentes gelificantes na produção de geleias e gelatinas (NAQASH et al., 2017). Além do seu valor econômico, as pectinas vêm sendo intensamente estudadas com relação às suas atividades biológicas, destacando-se aqui seu potencial antitumoral em diferentes tipos de câncer, como câncer de cólon, leucemia e melanoma (HAYASHI; GILLEN; LOTT, 2000; SILVA et al., 2012; TAMIELLO et al., 2018). Além disso, alguns estudos buscam entender melhor a relação estrutura química da pectina com suas propriedades antitumorais.

Pectinas com baixo grau de metil-esterificação, em geral, mostraram-se mais promissoras como antitumorais do que aquelas cujo grau de metil-esterificação é

maior (JIANG; ELIAZ; SLIVA, 2013). O uso de pectina cítrica modificada (MCP) – uma pectina LM – no estudo de diversos tipos de câncer, como câncer de próstata, de pulmão, de fígado e de cólon foi capaz de modular diversos parâmetros de progressão tumoral como morte e proliferação celular (HAO et al., 2013; LECRERE et al., 2015; PRADO et al., 2019). A MCP foi comparada inclusive com a pectina cítrica não modificada (PC) no câncer de próstata. A PC não apresentou efeitos, enquanto que a MCP foi antitumoral (HAO et al., 2013).

Apesar de estudos mostrarem o potencial bioativo de pectinas, grande quantidade deste polissacarídeo é desperdiçada pela indústria a partir do não aproveitamento dos bagaços e cascas de frutas. O Brasil vem se destacando ao decorrer dos últimos anos na produção de frutas cítricas, por exemplo. Só em 2015 foram produzidas quase 19 milhões de toneladas, sendo que, aproximadamente, dois milhões de toneladas de cascas são desperdiçadas anualmente (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2017; GROHMANN et al., 1999; NAIR S et al., 2018; SINGH et al., 2020). Um exemplo de fruto que contém alto teor de pectinas em sua casca é o maracujá amarelo, fruta muito presente em áreas tropicais, sendo nativa do Brasil (COELHO et al., 2018). Devido a origem natural desse polissacarídeo, bem como sua alta biodisponibilidade ela foi selecionada como objeto deste trabalho. A sua forma nativa possui alto grau de metil-esterificação e já foi estudada quando à sua propriedade antimelanoma (LUZ, 2021). Com o intuito de verificar se o grau de metil-esterificação é importante para a atividade desta pectina, neste trabalho ela foi utilizada na forma desesterificada quimicamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

A partir de uma única célula, o organismo humano se desenvolve e, na fase adulta, é constituído por mais de 34 trilhões de células (NATIONAL GEOGRAPHIC, 2013). Para atingir esse número, as células realizam um importante processo denominado de mitose. No entanto, alguns pontos cruciais desse processo podem falhar e, se não forem corrigidos pelo sistema de reparo presente, resultam em mutações (ALBERTS et al., 2011, 3ª edição, p. 211-217). Além dessa falha, existem alguns outros fatores de risco que podem levar ao acúmulo de mutações, tais como: tabagismo, alcoolismo, exposição à radiação ultravioleta, má alimentação e a falta de exercícios físicos. Essas mutações podem ter consequências severas para o organismo, favorecendo o desenvolvimento de diversas doenças como o câncer (LEWANDOWSKA et al., 2019).

Câncer refere-se a um conjunto de mais de 200 doenças que têm como característica em comum o crescimento acelerado e exacerbado de células. Assim, essas células podem formar tumores malignos e invadir órgãos e tecidos distantes, ocasionando as chamadas metástases (causa principal de morte por câncer) (INCA, 2020a; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; WHO, 2021). Pode-se classificar o câncer de acordo com o seu tecido de origem, localização, tipo celular e extensão em um organismo facilitando, assim, sua denominação e o direcionamento para o tratamento mais adequado (WANG; LEI; HAN, 2018).

Existem diversos sistemas para classificar a extensão anatômica de um câncer, dentre eles o mais utilizado é o sistema TNM, sendo T a extensão do tumor primário, N a ausência ou presença e a extensão de metástase no sistema linfático (linfonodos regionais) e M a ausência ou presença de metástases distantes. Essas letras podem ser acompanhadas por números, como T0, T1, T2 para auxiliar na classificação da neoplasia (FOSP, 2021). Além disso, dependendo da sua origem, o câncer pode receber uma nomenclatura singular. Por exemplo, aqueles originados em células do tecido epitelial – como mucosa ou pele – são denominados carcinomas, enquanto os originados em tecidos conjuntivos – como cartilagem, osso ou músculo – são denominados de sarcomas (INCA, 2020).

Apesar dos diferentes tipos de classificações e, portanto, diferentes tipos de tumores malignos, existem algumas características comuns a eles e que são essenciais para a sua progressão, as chamadas: *Hallmarks of Cancer* (FIGURA 1). Hanahan e Weinberg (2000) descreveram seis principais capacidades selecionadas em células tumorais ao longo da progressão do tumor: manutenção da sinalização proliferativa; evasão de vias de sinalização supressoras de crescimento; resistência à morte celular; indução de angiogênese; imortalidade replicativa; e ativação de invasão celular e metástase. Posteriormente, outras características foram adicionadas às *Hallmarks*, sendo elas: evasão do sistema imune, promoção de inflamação pelo tumor, mutações e instabilidades genômicas e reprogramação energética celular. Todos esses processos são fundamentais para que o tumor possa se desenvolver no seu local primário, desprender-se do local de origem, atingir a corrente sanguínea e/ou os vasos linfáticos, e ocasionar metástases em tecidos adjacentes e órgãos distantes (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DAS *HALLMARKS OF CANCER*, CRUCIAIS PARA A VIABILIDADE E PROGRESSÃO TUMORAL



FONTE: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Atualmente, o câncer é um problema de saúde pública mundial, visto sua grande incidência populacional, além da sua alta taxa de mortalidade que, apenas em 2020, alcançou aproximadamente 9.9 milhões de mortes mundiais (SUNG et al., 2021). No Brasil, os tipos de câncer mais comuns nesse mesmo ano foram: câncer de mama, de pulmão e de cólon, sendo pulmão e cólon as maiores causas de morte por câncer em 2020. A incidência e o tipo de câncer entre homens e mulheres também pode variar, sendo as mulheres brasileiras mais acometidas pela doença em 2020 e com menor taxa de mortalidade quando comparadas com a dos homens. Os óbitos de mulheres se relacionam de forma descendente ao câncer de mama, traqueia, brônquios e pulmões, cólon e reto. Nos homens se relacionam ao câncer de traqueia, brônquios e pulmões, próstata, cólon e reto (INCAa, 2021). Estima-se para 2040 mais de 30 milhões de novos casos mundiais e uma taxa de mortalidade de cerca de 16 milhões (mais prevalente em homens), sendo que apenas no Brasil estima-se para o mesmo ano 995 mil novos casos, com taxa de mortalidade de 470 mil (também mais prevalente em homens) (WHO, 2021b).

Para garantir uma maior taxa de sobrevivência aos pacientes acometidos pelo câncer, diversos tratamentos foram desenvolvidos ao longo dos anos, incluindo três principais, mais antigos e acessíveis economicamente: remoção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia (INCA, 2021b). Se detectado precocemente, e na ausência de metástases no organismo do paciente, a remoção cirúrgica é o tratamento de primeira escolha, visto ser o mais eficaz na cura do paciente. No entanto, na presença de metástase, o tratamento torna-se apenas paliativo, sendo empregados alguns tratamentos para sintomas decorrentes do câncer, como a dor crônica (PORTENOY, 2011). Além disso, o emprego de outras intervenções como quimioterapia e terapia-alvo ocasionam em muitos efeitos adversos ao organismo e podem perder eficácia ao passo que as células-tumorais mais resistentes permanecem no organismo e dificultam o tratamento do câncer. (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

Ademais, deve-se considerar também os efeitos colaterais do câncer que vão além de sua fisiologia. Estima-se que 22,4% dos casos de câncer ocorrem na população adulta entre 21 e 55 anos de idade, faixa de idade na qual é recorrente a presença de filhos menores de idade (WEAVER et al., 2010). O câncer é um conjunto de doenças que promove um enorme impacto social, portanto, atingindo a família do

paciente afetado. Esse impacto pode resultar em problemas psicossociais nas crianças, tais como: confusão, tristeza, ansiedade e raiva (VISSER et al., 2004; WEAVER et al., 2010), além de atingir também a vida do paciente que pode apresentar: ansiedade, depressão, comportamentos suicidas, disfunção sexual, desordens neuro cognitivas entre outros (CARUSO et al., 2017).

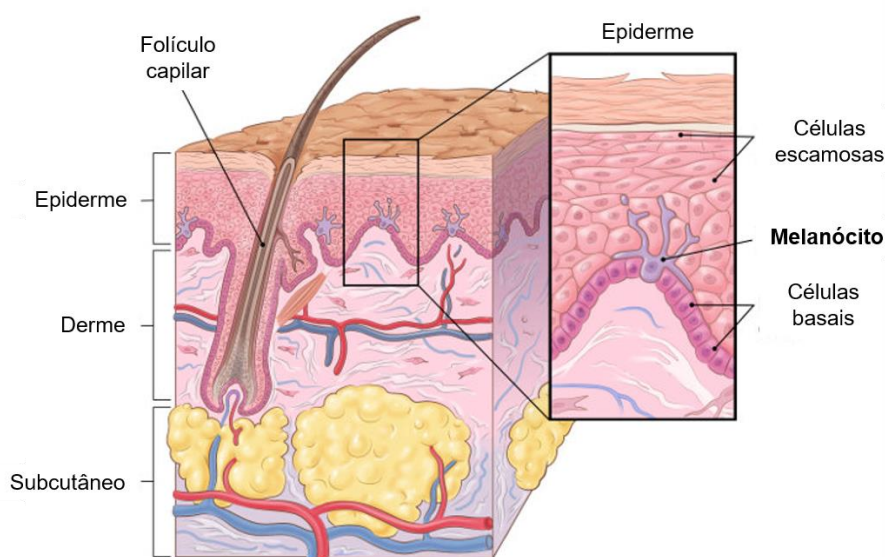
Dentre os diferentes tipos de câncer, o câncer de pele representa 27% de todos os tumores malignos no Brasil, sendo o mais frequente no Brasil e no mundo. Pode-se dividi-lo em dois tipos: melanoma e não melanoma. O primeiro apresenta-se em menor proporção – cerca de 8,4 mil novos casos por ano no Brasil – no entanto, é a forma mais grave de câncer de pele, visto sua alta capacidade metastática (INCA, 2020b).

2.2 MELANOMA

O melanoma é um tipo de câncer de pele maligno que decorre da proliferação exacerbada de melanócitos – células não-tumorais da camada basal da epiderme responsáveis pela produção de melanina, pigmento que confere sua coloração (FIGURA 2) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021; SABAG; YAKOBSON; SILBERSTEIN, 2020). Seu aparecimento se dá por meio de manchas, sinais ou pintas, estando associados a diferentes fatores de risco, modificáveis ou não: bronzeamento artificial, medicamentos, exposição à luz ultravioleta, genética, histórico familiar, idade, raça, gênero, status socioeconômico entre outros (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

De forma global, 15 a 25 indivíduos a cada 100 mil desenvolverão o melanoma maligno (SCHADENDORF et al., 2015). Caucasianos, por exemplo, são cerca de 20 vezes mais atingidos pelo melanoma do que pessoas de pele escura, bem como ruivos têm maior risco de desenvolver o melanoma do que morenos, visto a diferença na quantidade e tipo de melanina presente na pele (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021; SCHADENDORF et al., 2015).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DO MELANÓCITO NA EPIDERME, PRIMEIRA CAMADA DA PELE



FONTE: Adaptado de American Cancer Society (2021).

Existem diferentes vias que podem estar mutadas no melanoma, dentre essas vias destaca-se: a do gene *CDKN2A*, presente em 40% dos pacientes com melanoma familiar e responsável pela codificação de dois supressores de tumor: *p16INK4A* e *p14ARF*; a via da sinalização MAP kinase, presente em 70% dos pacientes com melanoma adquirido ao decorrer da vida e associada à sobrevivência celular, por exemplo; e a *BRAF*, presente em 50% dos pacientes com melanoma adquirido, associada à via proliferativa. A partir do acúmulo de diversas mutações nessas vias, células transformadas adquirem resistência celular (à morte e à supressão de sinais proliferativos) e a capacidade de se proliferar de forma exacerbada (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Além disso, células tumorais promovem a evasão do sistema imune através de um microambiente tumoral imunossupressor, alterando o perfil de produção de citocinas e a expressão de receptores associados ao reconhecimento e ativação imunológica (KORNEEV et al., 2017; WU; DAI, 2017). A expressão do Ligante de Morte Celular Programada 1 (PD-L1) pelos melanócitos malignizados, por exemplo, possibilita a ligação à Proteína de Morte Celular Programada 1 (PD-1) expressa pelas células T efectoras presentes no tecido tumoral. Essa ligação do PD-L1 ao receptor PD-1 ocasiona na inativação das células T efectoras e, posteriormente, na inativação também de células T, B e Natural Killer (NK), essenciais na resposta do Sistema Imune

(SI) frente a um tumor. No microambiente tumoral, a expressão do antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico pelos linfócitos T reguladores promove a inibição de células T CD8 citotóxicas (DOMINGUES et al., 2018).

Essas características presentes nos melanócitos malignizados, aliadas a outras *Hallmarks of cancer*, promovem a progressão do melanoma, levando-o aos diferentes estadiamentos. Assim, o melanoma pode ser classificado, de acordo com o sistema TNM, em 3 níveis principais: *T-tumor*, *N-nodal* e *M-metastases*. Quando o melanoma se apresenta ainda em forma de tumor primário (*T-tumor*), sem migração e invasão de outros tecidos, ele pode ser removido cirurgicamente de forma simples, agregando ao paciente uma maior taxa de sobrevida (em torno de mais de 5 anos em cerca de 98% dos pacientes). No entanto, essa taxa decresce de forma expressiva quando o melanoma é diagnosticado em fases mais avançadas (sobrevida em torno de 6 a 12 meses), visto sua alta agressividade, heterogeneidade, histopatologia variável e a falta de tratamentos mais eficazes (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; SCHADENDORF et al., 2015).

2.2.1 Tratamentos para o melanoma

Atualmente, a excisão local ampla do tumor ainda é considerada a técnica padrão ouro para tratamento do melanoma. No entanto, o bom prognóstico aliado a essa técnica depende do nível de estadiamento do tumor, que deve se encontrar ainda localizado em seu local de origem. Além da excisão, utiliza-se primordialmente a combinação da radioterapia e quimioterapia. Até 2010, os únicos tratamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) eram a Dacarbazina e a Interleucina-2 em alta dose (JENKINS; FISHER, 2021; WINDER; VIRÓS, 2017).

Nos últimos 11 anos houve avanço significativo no tratamento para o melanoma. Um exemplo são as terapias alvo que buscam o bloqueio de alvos moleculares presentes nas células tumorais que promovem o crescimento e a propagação dessas, como fatores de crescimento, moléculas de sinalização, proteínas do ciclo celular, moléculas que promovem angiogênese e moduladores de apoptose (LEE; TAN; OON, 2018). Outro ponto relevante no desenvolvimento de tratamentos mais eficientes para o melanoma metastático foi o advento da imunoterapia. Especificamente, o estudo dos checkpoints imunológicos – moléculas

expressas na superfície de células do SI que auxiliam na homeostase e no controle de processos inflamatórios do organismo – favoreceram o desenvolvimento de imunoterapias, por exemplo, possibilitando a aprovação pela FDA de mais de 10 medicamentos antimelanoma nos últimos anos, dentre eles destacam-se: Nivolumab e Ipilimumab, anticorpos monoclonais anti-PD1 e anti-CTLA4, respectivamente. Portanto, esses medicamentos desenvolvidos baseiam-se na interferência na interação entre a célula tumoral e a célula do SI, permitindo o revigoramento principalmente de linfócitos T citotóxicos, essenciais no combate ao tumor (LEONARDI et al., 2020).

No entanto, apesar dos avanços na imunoterapia e na terapia-alvo, observa-se na clínica uma resistência natural ou adquirida ao decorrer do tratamento com esses medicamentos, ocasionando na regressão dos pacientes com melanoma e maiores chances de recidiva, além da grande quantidade de efeitos adversos observados, como a inflamação de diversos órgãos – hepatite, pancreatite, miocardite, colite, encefalite – erupções cutâneas, distúrbios bolhosos autoimunes, prurido dentre outros (LACOUTURE; SIBAUD, 2018; POSTOW; SIDLOW; HELLMANN, 2018; WINDER; VIRÓS, 2018). Este cenário incita a busca por novas moléculas bioativas, menos tóxicas e mais eficientes contra o melanoma metastático, visto a inviabilidade dos tratamentos atuais principalmente com relação aos seus efeitos adversos e alto custo (GORRY; MCCULLAGH; BARRY, 2020). Uma das opções altamente exploradas na literatura são os polissacarídeos.

2.3 POLISSACARÍDEOS E SUAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS

Com a dificuldade de encontrar terapias mais efetivas no tratamento não só do melanoma como de outros cânceres, estudos surgem principalmente desde a segunda metade do século XX de modo a testar polissacarídeos, extraídos de fontes naturais, que ocasionem nenhuma ou pouca resistência farmacológica (atingindo as células tumorais de forma mais direta, específica e eficaz), citotoxicidade e efeitos adversos aos pacientes (DABA; EZERONYE, 2003; MANLUSOC et al., 2019; ZHANG et al., 2007).

Polissacarídeos pécticos com diferentes pesos moleculares (64 kDa, 25kDa, 10 kDa, 5,3 kDa e 4 kDa) e composição, incluindo glucose, manose, arabinose,

rhamnose, galactose, xilose e ácido urônico principalmente extraídos da casca da fruta coreana hallabong foram capazes de inibir angiogênese e migração celular em células de câncer de mama *in vitro* (PARK et al., 2016). A fração de polissacarídeos solúveis em água, extraída do cogumelo *G. lucidum*, composta por glucanas α/β (1->3), (1->6), glicoproteínas e heteropolissacarídeos, apresentou efeitos anti-proliferativos, antiangiogênicos, pró-apoptóticos em células tumorais de câncer de mama e de cólon (SOHRETOGLU; HUANG, 2018). Uma glucana $\beta(1\text{-}>6)$ -ligada e duas manogalactanas provenientes do cogumelo Shiitake (*Lentinus edodes*) também demonstraram atividade anti-proliferativa *in vitro* em sarcoma (JEFF et al., 2013).

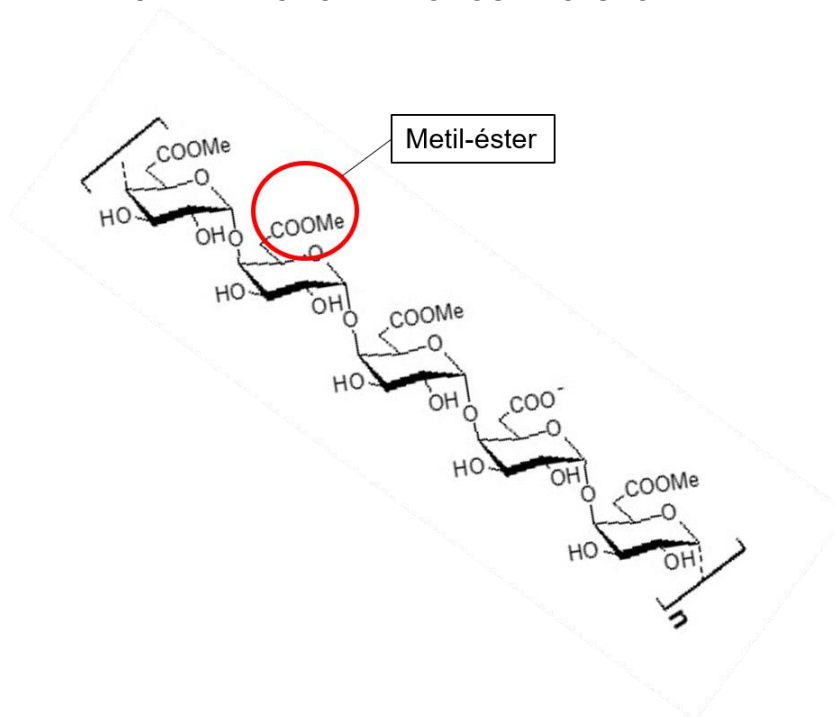
O Grupo de Pesquisa em Células Inflamatórias e Neoplásicas da UFPR vem explorando a atividade antimelanoma *in vitro* e *in vivo* de polissacarídeos obtidos de fontes naturais, obtendo promissores resultados. Uma manogalactana parcialmente metilada extraída do cogumelo *Pleurotus eryngii* não foi citotóxica e reduziu a invasão de células de melanoma B16-F10 *in vitro* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (BISCAIA et al., 2017). Um polissacarídeo extraído da alga verde *Gayralia brasiliensis* também apresentou efeito não citotóxico e freou a progressão do melanoma *in vitro* com células de B16-F10 (BELLAN et al., 2020a). Ademais, uma galactana sulfatada extraída da alga verde *Codium isthmocladum* foi capaz de reduzir o tamanho e o volume do tumor *in vivo* em camundongos injetados com células de melanoma B16-F10, também não sendo citotóxica (BELLAN et al., 2020b).

As atividades biológicas dos polissacarídeos têm sido correlacionadas às suas estruturas químicas (originais ou posteriormente modificadas) e às suas respectivas massas molares. A síntese de derivados de fucoidanas de baixo peso molecular e seu uso *in vitro* reduziu a proliferação de células WI-38, MCF-7 e HeLa, sem causar citotoxicidade e de forma dose-dependente (10-1000 $\mu\text{g/mL}$) (KASAI et al., 2015). A laminarina, extraída da alga *Laminaria digitata* e, posteriormente, sulfatada, diminuiu a proliferação de células LoVo de câncer de cólon *in vitro* de forma concentração-dependente no tempo de tratamento de 72 horas (JI; JI; MENG, 2013). Portanto, a descoberta e o estudo de novos polissacarídeos são proeminentes no tratamento do câncer, modulando vias de malignidade importantes da doença (XU; XU, 2016).

2.4 PECTINAS – ESTRUTURA E ATIVIDADE ANTITUMORAL

Pectinas são polissacarídeos heterogêneos estruturais presentes na parede celular e nas camadas intercelulares de plantas (BRANDÃO; ANDRADE, 1999; ZAITSEVA et al., 2020). Estruturalmente, podem possuir 4 subestruturas pécticas diferentes: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana-I (RG-I), xilogalacturonanas e ramnogalacturonana-II (RG-II), sendo a HG a mais abundante (cerca de 65%) e a RG-II a menos abundante. A cadeia principal das pectinas HGs é composta por unidades de ácido galacturônico ligadas por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ (FIGURA 3) (CANTERI et al., 2012; ZHANG; XU; ZHANG, 2015). As pectinas podem ser classificadas também de acordo com seu grau de metil-esterificação (DE), sendo considerada com alto DE se apresentar mais de 50% de metil éster em sua estrutura, e com baixo DE se apresentar menos de 50% (BRANDÃO; ANDRADE, 1999).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DE UMA CADEIA PÉCTICA DE HOMOGALACTURONANA



FONTE: Adaptado de Brandão e Andrade (1999).

A pectina está presente em diversos frutos – como maçã, laranja, limão, maracujá, banana, goiaba, abacaxi entre outros – e apresenta muito valor na indústria alimentícia (CANTERI et al., 2012). Também é efetiva na estabilização de sucos naturais de fruta e na acidificação de bebidas baseadas no leite (NAQASH et al., 2017).

Além das propriedades físico-químicas das pectinas, que despertam grande interesse industrial, deve-se destacar que elas apresentam atividades biológicas, como atividade antitumoral. Já foi descrito na literatura o uso da pectina comercial combinada com o óleo de peixe em uma dieta *in vivo* para promover uma ação pró-apoptótica no câncer de cólon, ocasionando a redução do tumor (CHO et al., 2012). Também, a pectina extraída do jambu (*Syzygium jambos*) foi eficaz na redução do tumor de Erlich *in vivo* nas doses de 150 e 250 mg/kg (TAMIELLO et al., 2018). Nangia-Makker et al. (2002) comprovaram atividade antiangiogênica *in vitro* e *in vivo* da pectina comercial extraída de frutos cítricos em células de câncer de mama e câncer de cólon (NANGIA-MAKKER et al., 2002). Quando administrada a pectina comercial extraída de frutos cítricos via oral em ratos essa também foi potencialmente capaz de inibir metástase espontânea *in vivo* em câncer de próstata (PIENTA et al., 1995).

Procura-se entender as interações entre as pectinas e o microambiente tumoral, bem como a potencial ação dessas como inibidoras do crescimento tumoral. Uma das principais interações diz respeito ao potencial de interação das pectinas compostas por galactose com a galectina-3. As galectinas são proteínas pertencentes à família das lectinas e participam de inúmeros processos celulares, tais como adesão, reconhecimento e sinalização (NELSON.; COX, 2014). Em tumores, inclusive no melanoma, observa-se uma alta expressão principalmente de galectinas 1 e 3 (ELOLA et al., 2018). Uma das formas de interação refere-se a ligação entre os domínios reconhecedores de carboidratos presentes na estrutura de galectinas com as pectinas, impedindo que a galectina fique livre e exerça suas funções pró-tumorais (por meio de sinais regulatórios), como supressora da resposta imune, pró-metastática, pró-migratória, pró-angiogênica e estimuladora de crescimento (CARDOSO et al., 2016; LIU; RABINOVICH, 2005; RUVOLO, 2016).

Além dessas interações estruturais, destaca-se também a relação entre o DE da pectina e sua ação antitumoral. Alguns estudos indicam que a pectina com baixo

DE apresenta ação antitumoral mais pronunciada (PRADO et al., 2019). A pectina cítrica modificada comercial (MCP) reduziu *in vivo* a colonização pulmonar de células de melanoma B16-F10 e inibiu a adesão *in vitro* dessas mesmas células de forma não citotóxica (INOHARA; RAZ, 1994). A MCP reduziu também metástase hepática de câncer de cólon, linhagem celular CT-26, *in vivo* em camundongos nas concentrações de 1%, 2,5% e 5% em água potável (peso / volume) (LIU et al., 2008). A pectina modificada quimicamente à quente (HFCP) diminuiu *in vitro* a proliferação de células de hepatocarcinoma (HepG2) e de câncer de pulmão (A549) (LECLERE et al., 2015).

2.5 PECTINA EXTRAÍDA DA CASCA DO MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora edulis*)

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) é um fruto típico de regiões tropicais, sendo nativo do Brasil. Seu uso é amplo na culinária, muito consumido diretamente, em *drinks*, saladas de frutas, sorvetes, sucos entre outros alimentos. Além do potencial alimentício, o maracujá amarelo também é conhecido popularmente por ter propriedades terapêuticas na ansiedade e na insônia. Cerca de 10 a 20% do fruto é composto pela pectina, caracterizada como uma homogalacturonana com 92% da cadeia principal composta por ácido galacturônico. Apesar do DE variar de acordo com a técnica utilizada na extração da pectina, variando com o pH e com o tempo, tem-se que a pectina do maracujá amarelo é de alto DE, em torno de 70%, além de apresentar peso molecular de 53 kDa (ABBOUD et al., 2019; LIEW; CHIN; YUSOF, 2014; YAPO; KOFFI, 2006).

O maracujá amarelo é rico em fibras, sendo capaz de diminuir significativamente lesões ulcerativas gástricas e evitar a diminuição dos níveis de glutathione e muco da parede gástrica, essenciais para manter a homeostasia do trato gastrointestinal (ABBOUD et al., 2019). Outras atividades biológicas do maracujá amarelo são: antioxidante, antimicrobiano, analgésico e anti-inflamatório. No entanto, ainda não existem testes que utilizem a pectina do maracujá no tratamento antimelanoma. Aliado a isso, o potencial farmacológico de um composto biologicamente ativo desta fonte é também de grande interesse econômico, visto que a pectina seria obtida de um produto descartado na cadeia de produção (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2017; GROHMANN et al., 1999; NAIR S et al., 2018; SINGH et al., 2020). Desta forma, o presente trabalho avaliou o potencial biológico da pectina desesterificada em linhagem de melanoma murino.

3 JUSTIFICATIVA

O melanoma é um tipo câncer de pele maligno extremamente metastático. Se esse se encontra ainda localizado como tumor primário, sua excisão promove uma taxa de sobrevivência maior que 5 anos em mais de 90% dos pacientes. Quando metastizado, as opções mais relevantes de tratamento para os pacientes são quimioterapia – utilizando-se principalmente a dacarbazina – radioterapia, terapias alvo e imunoterapia. No entanto, além dessas terapias serem de alto custo também apresentam muitos efeitos adversos ao paciente, como erupções cutâneas, inflamação de diversos órgãos (fígado, pâncreas, intestino etc), náuseas, dores de cabeça, entre outros, além de serem extremamente caros, induzirem resistência após um período de uso e ainda dependerem de um panorama imunológico e genético que varia de paciente para paciente. A junção de todos esses efeitos mais o grande impacto causado pela doença nas famílias, ocasiona em consequências também psicossociais ao paciente e àqueles que estão ao seu redor.

Dessa forma, a ciência corre contra o tempo na busca de compostos mais eficazes, menos citotóxicos, com maior biodisponibilidade e mais acessíveis aos pacientes. Dentre esses compostos, destacam-se os polissacarídeos, agentes com efeitos antitumorais já descritos na literatura em câncer de mama, de cólon, de próstata, melanoma entre outros, atuando como moduladores de vias de malignidade essenciais para a progressão tumoral, como angiogênese, imortalidade replicativa, sustentação do sinal proliferativo, ativação de invasão e metástase.

As pectinas são exemplos de polissacarídeos presentes em paredes celulares de plantas. Elas são reconhecidas comercialmente por suas atividades físico químicas que as fazem aplicáveis em diferentes tipos de indústrias e têm potencial de apresentar atividade antimelanoma, considerando-se estudos prévios em outros modelos que apontaram para tal atividade. Também, correlaciona-se na literatura o DE da pectina com a sua atividade antitumoral, sendo que estudos apontam que quanto menor o DE da pectina, maior sua atividade antitumoral. Estudos prévios do Grupo de Pesquisa realizados pela Mestre Keila Taiana Vaz Da Luz demonstraram que a pectina extraída da casca do maracujá amarelo com alto DE não modulou parâmetros de progressão do melanoma (dados não publicados). Portanto, visto os resultados encontrados na literatura e os dados do grupo de pesquisa, o objetivo deste

trabalho foi avaliar se, ao retirar grupos metil-éster, a pectina apresentaria efeitos antitumorais *in vitro* no melanoma. Além disso, para avaliação da atividade biológica de uma molécula, nesse caso a pectina modificada, é relevante o uso de outros modelos celulares, permitindo uma avaliação mais ampla e segura da atividade da molécula. Dessa forma, a pectina modificada foi testada também em fibroblastos, células não tumorais da epiderme.

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavinocarpa*) é um fruto típico de regiões tropicais, nativo do Brasil e fonte abundante de pectinas em sua casca, a qual corresponde à maior parte do peso da fruta e que é, atualmente, um resíduo descartado pela indústria sem valor agregado. A ausência de estudos sobre a atividade antimelanoma com pectinas extraídas da casca do maracujá, aliada à necessidade de se obter compostos que possam atuar na terapêutica do melanoma, justificam a escolha deste polissacarídeo como objeto de estudo neste trabalho. Com base no interesse em estudar melhor a atividade antitumoral dependente ou não do DE, a pectina extraída da casca do maracujá foi desesterificada e utilizada neste trabalho para avaliação da sua ação em parâmetros de malignidade do melanoma para, futuramente, comparar tais dados com dados prévios do Grupo de Pesquisa que avaliou esta pectina na sua forma nativa (alto DE).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimelanoma *in vitro* da pectina extraída da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) desesterificada (HGD).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente a pectina após desesterificação;
- Avaliar a viabilidade e proliferação das células não tumorais (fibroblastos Balb/3T3) e tumorais (melanoma B16F10) após tratamento com a HGD;
- Avaliar a capacidade de formação de colônias das células de melanoma murino frente ao tratamento com a HGD;
- Analisar se o tratamento com HGD altera o ciclo celular de células de melanoma murino.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

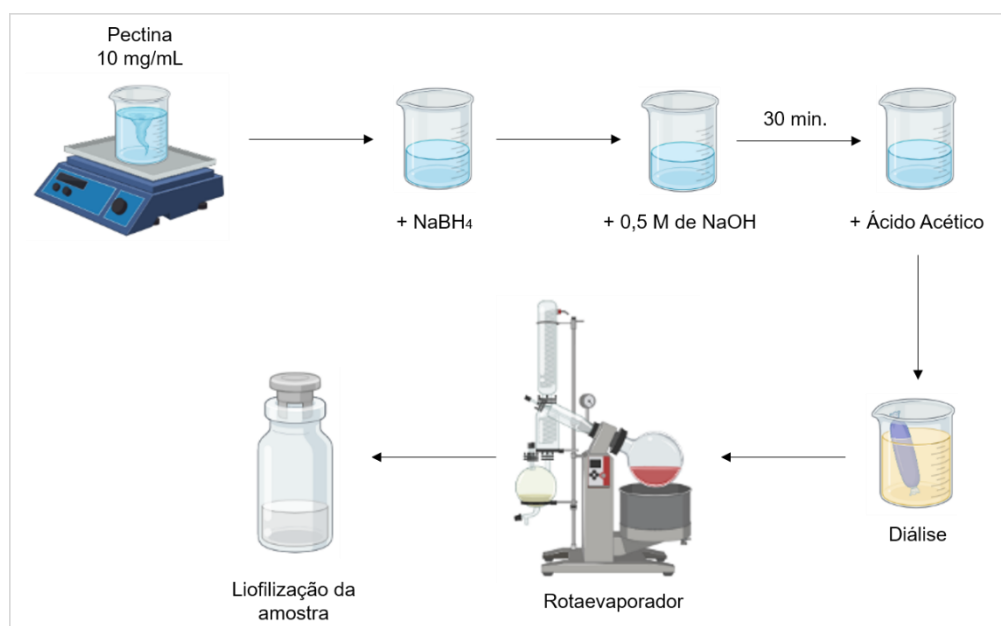
5.1 OBTENÇÃO DA PECTINA DA CASCA DO MARACUJÁ

A pectina utilizada neste trabalho foi extraída da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*), purificada e caracterizada pelo grupo de pesquisa de química de carboidratos, sob coordenação da Prof.^a Dr.^a Lucimara Mach Cortes Cordeiro, do Departamento de Bioquímica da UFPR. A extração foi aquosa a quente (100°C) por 2h adaptada de ABOUD et al. (2019). A mestre Keila Taiana Vaz da Luz cedeu gentilmente uma amostra dessa pectina para posterior desesterificação e uso na execução deste projeto.

5.2 DESESTERIFICAÇÃO

Para remover os grupos metil éster da pectina extraída da casca do maracujá, utilizou-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M (adaptado de GRASDALEN; EINAR BAKØY; LARSEN, 1988). A pectina foi solubilizada em água destilada (20 mg/mL) por 30 minutos a 50°C em um agitador magnético. Em temperatura ambiente, adicionou-se o agente redutor borohidreto de sódio até a solução atingir pH 11 e, então, o NaOH 1 M (em água destilada) foi adicionado, resultando na concentração final de NaOH de 0,5 M. A solução foi agitada novamente por 30 minutos e adicionou-se ácido acético até a solução atingir pH 6. A amostra foi dialisada em membrana de 12-14 kDa por 2 dias, com auxílio de um agitador magnético, concentrada em um rotaevaporador, congelada e liofilizada (FIGURA 4). O rendimento obtido foi de 53,6%.

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO DE DESESTERIFICAÇÃO



FONTE: A autora (2021).

5.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PECTINA DESESTERIFICADA (HGD)

Com o intuito de avaliar a eficiência do processo de desesterificação da pectina do maracujá, espectros de RMN mono (¹H) e bidimensionais (HSQC-DEPT) foram realizados. Para isso, HGD foi solubilizada em água deuterada (20 mg/mL). Os experimentos foram realizados na temperatura 70°C e o espectro de RMN-1H foi obtido após 256 scans. O grau de metil esterificação (DE) da pectina foi calculado de acordo com o proposto por Grasdalen et al. (1988). Neste método, as integrais dos sinais referentes ao H1 e H5 das unidades esterificadas e não-esterificadas são analisadas e utilizadas para o cálculo do DE conforme a seguinte equação:




$$DE = \left(\frac{I_A - I_B}{I_A + I_B} \right) \times 100$$

Onde I_A se refere à intensidade de ressonância dos sinais de H-1 de todas as unidades de GalA (formas -COO⁻ e COOCH₃) e o H-5 das unidades de GalA esterificadas (~δ 5.12 a δ 4.76). I_B se refere à intensidade de ressonância dos sinais de H-5 das unidades de GalA não esterificadas (~δ 4.58 a δ 4.52).

5.4 LINHAGENS E CULTIVO CELULARES

Utilizou-se duas linhagens celulares murinas para os testes (QUADRO 1): células de melanoma (B16-F10 BCRJ, 0046) e fibroblastos não-tumorais (BALB/3T3 clone A31 ATCC®, CCL-163™). Ambas as linhagens foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Gibco), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e com os antibióticos penicilina (1 U/mL) e streptomina (1 µg/mL) (*Life Technologies*). As células foram incubadas a 37° C e 5% de CO₂ e, após atingirem a confluência de área de superfície aderida (70% para fibroblastos e 90% para as de melanoma), foram subcultivadas e plaqueadas para os respectivos experimentos.

QUADRO 1 – LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS E SUA ORIGEM

| ORIGEM | LINHAGEM TUMORAL | LINHAGEM NÃO-TUMORAL |
|---|---|---|
|  |  Células de melanoma B16-F10 |  Fibroblastos BALB/3T3 clone A31 |

FONTE: A autora (2021).

NOTA: Para investigação da atividade biológica da pectina desesterificada, foram utilizadas duas linhagens celulares murinas para efeito de comparação entre uma linhagem tumoral e uma não-tumoral (controle).

5.5 TRATAMENTO – PREPARO DO POLISSACARÍDEO

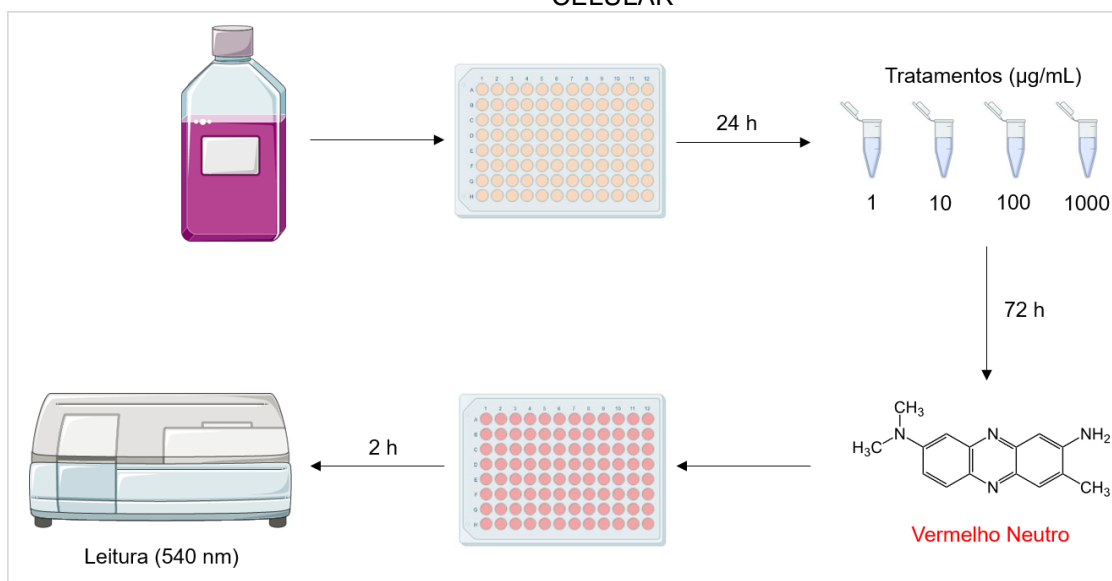
A HGD foi solubilizada em água ultrapura (UP) autoclavada na concentração de 5 mg/mL, *overnight* em agitador magnético a 50°C. A solução foi filtrada em membrana 0.22 µm para esterilização. A partir de uma diluição seriada em água UP, foram preparadas as outras concentrações de HGD: 1, 10, 100 e 1000 µg/mL. Como controle veículo, utilizou-se água UP.

5.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para análise da viabilidade celular, foi utilizado o teste de vermelho neutro que tem como princípio avaliar a viabilidade, ou seja, a integridade das endomembranas, a partir da absorção e retenção do corante vermelho neutro pelas células viáveis em vesículas ácidas. Quando o vermelho neutro ultrapassa uma bicamada lipídica e encontra-se em um ambiente ácido – como nos lisossomos – sua estrutura química sofre protonação e, portanto, uma modificação da sua carga líquida, ficando retido nesses ambientes ácidos. A partir disso, é possível mensurar em absorbância a quantidade de corante internalizado e, assim, inferir sobre a alteração ou não da viabilidade das células frente a um tratamento específico (ICCVAM, 2006; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Neste ensaio, as células de melanoma B16-F10 e fibroblastos Balb/3T3 foram plaqueadas em placas de 96 poços – 500 e 2000 células/poço, respectivamente – com DMEM 10% SFB. Após 24 horas as células foram tratadas com a HGD nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL por 72h. No penúltimo dia de tratamento, foi preparada a solução de vermelho neutro a 0,04 mg/mL em meio de cultura DMEM sem SFB seguido de incubação a 37°C e 5% CO₂ por 24h. No último dia de tratamento (72h), a solução de vermelho neutro foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos para precipitação dos cristais. O meio dos poços foi retirado sendo então adicionado 100 µL/poço de vermelho neutro na placa de 96 poços, seguindo-se de incubação a 37°C e 5% de CO₂ por 2h. Após esse período, o sobrenadante foi retirado dos poços e o corante extraído com solução contendo etanol:água:ácido acético (50:49:1 v/v). As absorbâncias foram adquiridas em leitor de microplaca (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, United States) no comprimento de onda de 540 nm (FIGURA 5).

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO DE ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR



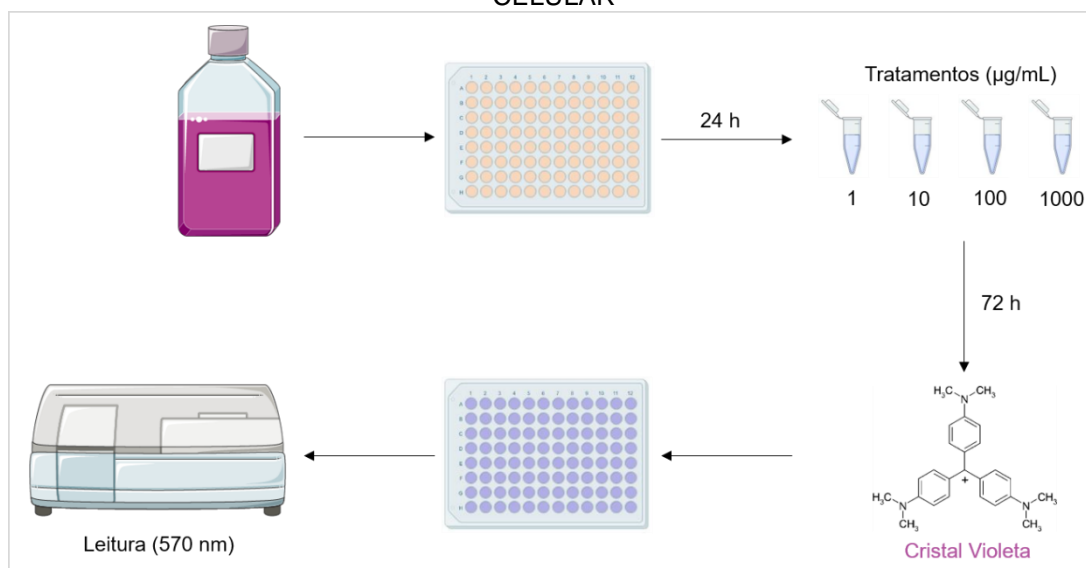
(A AUTORA, 2021).

5.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Com o objetivo de avaliar a proliferação celular frente ao tratamento com a HGD, utilizou-se o corante cristal violeta que tem como princípio a coloração de ácidos nucleicos presentes nas células. Dessa forma, é possível determinar a quantidade de células aderidas de forma proporcional a intensidade da coloração, mensurada também em absorbância (BONNEKOH et al., 1989; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

Para isso, após a leitura de vermelho neutro, a solução de extração foi descartada, seguido de lavagem dos poços 1x com água ultrapura (100 μL /poço) e, na mesma placa, adicionou-se o corante cristal violeta a 0,25 mg/mL. Após 20 minutos, o corante foi retirado, os poços lavados 2x com água ultrapura e o corante eluído com uma solução de ácido acético em água ultrapura (33:67 v/v). As absorbâncias foram mensuradas em leitor de microplaca (BioTek®Instruments, Inc., Winooski, United States) no comprimento de onda de 570 nm (FIGURA 6).

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO DE ANÁLISE DE DENSIDADE CELULAR



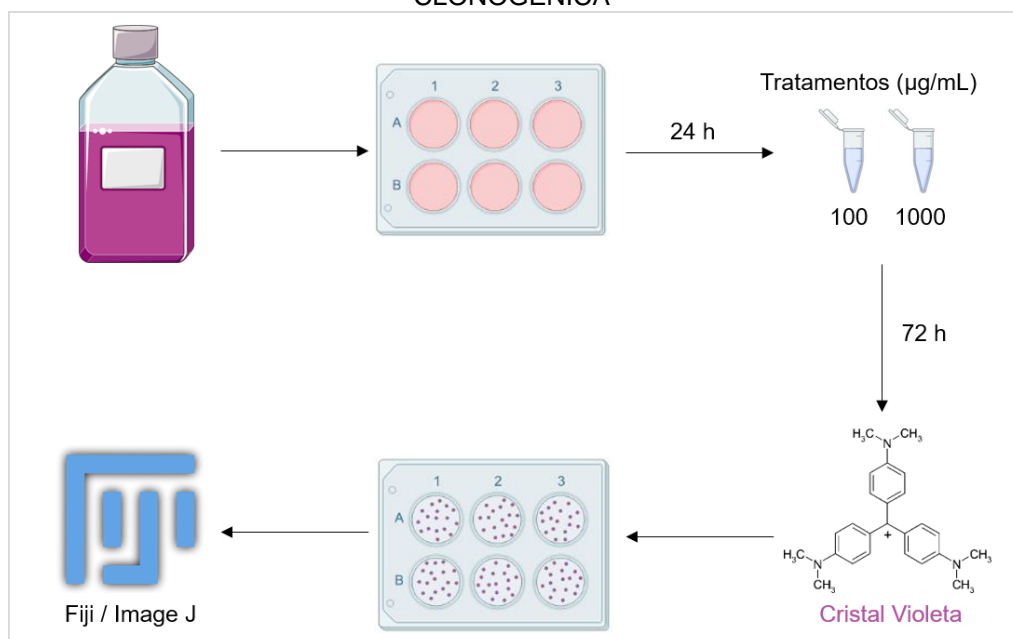
FONTE: A autora (2021).

5.8 ENSAIO DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA

Com a finalidade de investigar se o tratamento com HGD afeta a capacidade clonogênica a partir de uma única célula individualizada, utilizou-se novamente o corante cristal violeta para coloração das colônias e posterior quantificação dessas e de suas respectivas áreas de crescimento.

Para atingir o objetivo adaptou-se o método proposto por Franken e colaboradores (2006). Portanto, as células de melanoma B16-F10 foram plaqueadas com DMEM 10% SFB em placas de 6 poços, de forma individualizada e em baixa confluência (400 células/poço). Após 24h, as células foram tratadas com a HGD nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL. Posteriormente ao período de tratamento de 72h, as colônias formadas foram fixadas com uma solução contendo etanol:água:ácido acético (50:48:2 v/v) e então coradas com cristal violeta 0,25 mg/mL. As colônias coradas foram fotografadas no aplicativo NoteBloc® versão 2.6 e analisadas no programa Fiji Image J® (FIGURA 7).

FIGURA 7 – ESQUEMA EXPERIMENTAL DO MÉTODO DE ANÁLISE DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA



FONTE: A autora (2021).

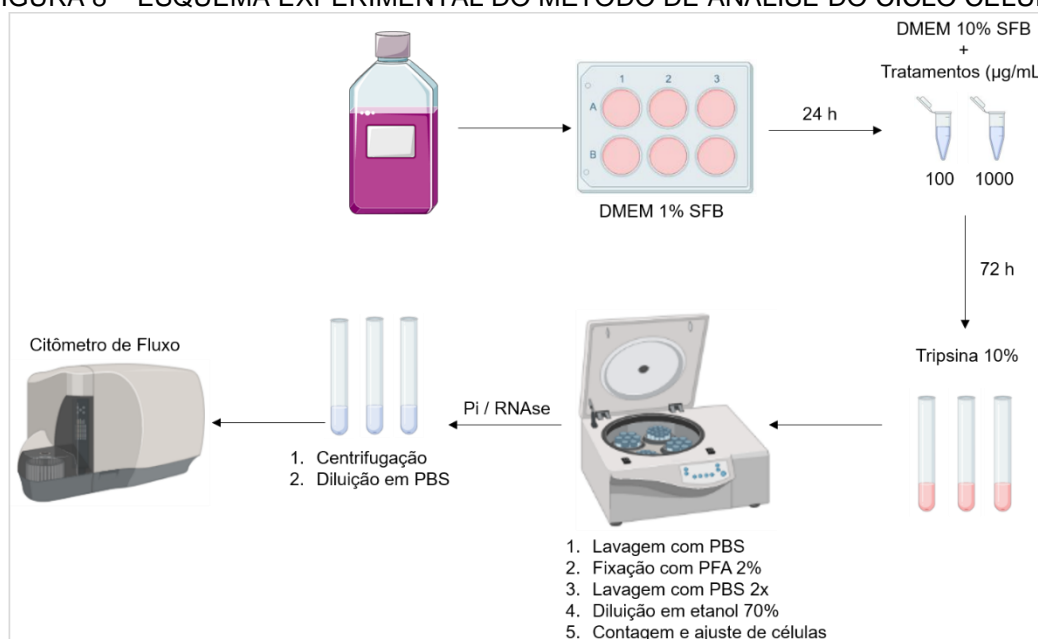
5.9 ENSAIO DE CICLO CELULAR

Para análise do ciclo celular utilizou-se o agente fluorescente iodeto de propídeo (PI), um intercalante de nucleotídeos que permite avaliar as diferentes fases do ciclo celular em que estão as células e inferir se o tratamento retarda o ciclo celular, e, portanto, a velocidade de proliferação celular, ou não. Para que apenas o DNA fosse avaliado, empregou-se o uso da RNase para eliminar os RNAs presentes.

O protocolo executado foi seguido conforme determinações do fabricante, empregando o kit BD PI RNase (BD Biosciences). Para isso, as células de melanoma B16-F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços (12.000 células/poço) em DMEM com 1% de SFB. Depois de 24h, o meio foi trocado por outro, contendo 10% de SFB, e as células foram tratadas com a HGD nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL. Após o período de tratamento (72h), o meio de cultura foi removido, os poços lavados 1x com PBS a 37°C e as células desaderidas com tripsina 10% por 3 minutos e em estufa a 37°C. A enzima foi inativada com DMEM contendo 5% SFB e o conteúdo dos poços foi repassado para tubos de citometria. As suspensões de células foram centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS para lavagem, seguindo-se novamente com centrifugação nas mesmas condições. As células foram fixadas por 30 minutos com paraformaldeído

2%, seguindo-se de duas lavagens com PBS após centrifugação. Utilizou-se etanol 70% para ressuspender as células por no mínimo 24 h a -20°C. Por fim, as células foram contadas, ajustando seu número para 25×10^4 em 150 μL de solução tampão de Pi/RNase e incubadas por 15 minutos. Foram lavadas 1x com PBS por centrifugação, ressuspensas em 400 μL de PBS e adquiridas em citômetro de fluxo BD FACS Calibur™. Os dados foram analisados no software *Flowing®* (FIGURA 8).

FIGURA 8 – ESQUEMA EXPERIMENTAL DO MÉTODO DE ANÁLISE DO CICLO CELULAR



Fonte: A autora (2021).

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software®, Inc.), sendo feito no mínimo três experimentos independentes por ensaio e considerando grupos estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Para o ensaio de viabilidade, proliferação e ciclo celular foi aplicado o teste de T não pareado com correção de Welch's, enquanto que para o ensaio de formação de colônias realizou-se o teste ANOVA de primeira via com teste de Friedman.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

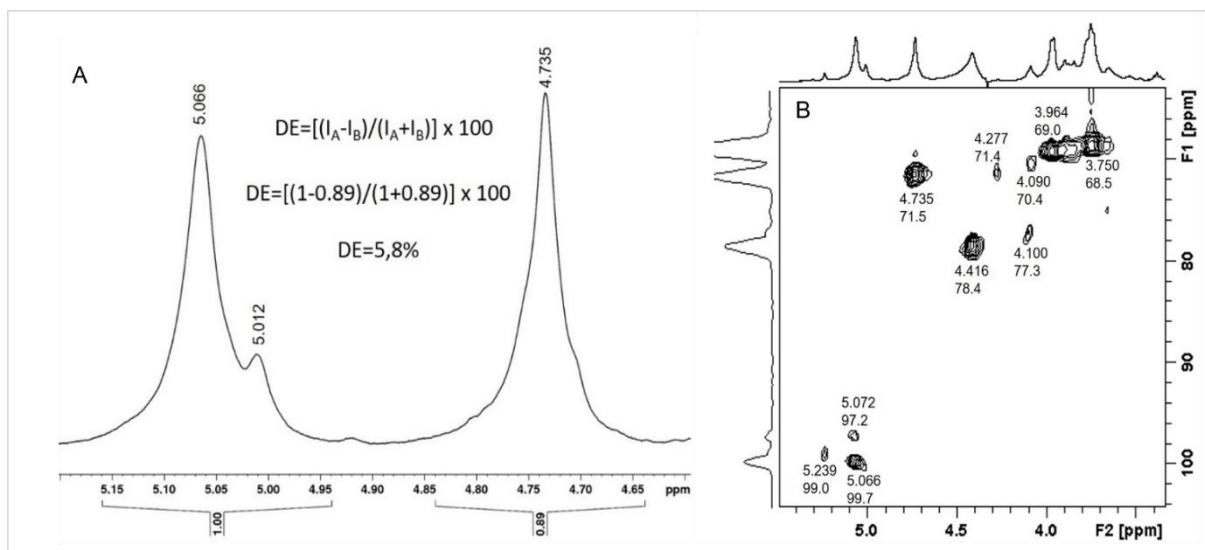
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA PECTINA DESESTERIFICADA

A pectina HGD foi caracterizada como uma homogalacturonana com baixo grau de metil esterificação. Após análise do espectro de RMN-¹H (FIGURA 9a) foi possível calcular que o DE deste polissacarídeo era de apenas 5,8%, contrastando com o DE de 95% da pectina extraída da casca do maracujá (JASKI et al., 2021, fase final de redação). Este resultado comprova a eficiência do processo de desesterificação.

O espectro de HSQC (FIGURA 9b) mostrou correlações ¹H/¹³C típicas de uma cadeia composta por unidades de α-D-GalpA (1→4)-ligadas. Os sinais em δ 5,066/99,7 e δ 5,239/99,0 podem ser atribuídos ao H-1/C-1 das unidades de α-D-GalpA (não esterificadas) e o sinal em δ 5,072/97,2 ao H-1/C-1 de unidades de α-L-Rhap (BARBIERI et al., 2019), sendo estas últimas também observadas como componente monossacarídico minoritário na pectina nativa extraída da casca do maracujá (ABBOUD et al., 2019). Os sinais em δ 4,416/78,4 e δ 4,100/77,3 são referentes ao H-4/C-4 das unidades de α-D-GalpA 4-O-ligadas e ao H-2/C-2 das unidades de α-L-Rhap 2-O-ligadas, respectivamente. Os sinais em 3,750/68,5, 3,964/69,0 e 4,735/71,5 podem ser atribuídos ao H-2/C-2, H-3/C-3 e H-5-C-5, respectivamente, das unidades de α-D-GalpA 4-O-ligadas (ABBOUD et al., 2019; BARBIERI et al., 2019).

O rendimento de 53,6% resultante pode ser devido a diversos fatores, principalmente a perda dos grupos metil éster da estrutura da pectina. Também, pode estar relacionado a perda residual de amostra durante o processo, com as trocas de recipientes, por exemplo.

FIGURA 9: ESPECTROS DE RMN-1H (A) E DE HSQC (B) DA PECTINA HGD



Fonte: A autora (2021).

6.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

A resistência à morte celular, bem como a evasão de genes supressores de crescimento e a manutenção do sinal proliferativo são exemplos de parâmetros de malignidade inerentes à progressão do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dessa forma, novos tratamentos para o câncer foram desenvolvidos e, concomitantemente, a relação entre eles e sua respectiva citotoxicidade tem sido estudada. A quimioterapia e a radioterapia, principais tratamentos disponíveis para a população mundial, apresentam alta toxicidade e, geralmente, de forma não seletiva, ou seja, além de atuarem sobre o tecido tumoral, também têm ação sobre tecidos não-tumorais, atingindo células saudáveis – o que pode ocasionar em efeitos adversos severos aos pacientes (PAIVA et al., 2010).

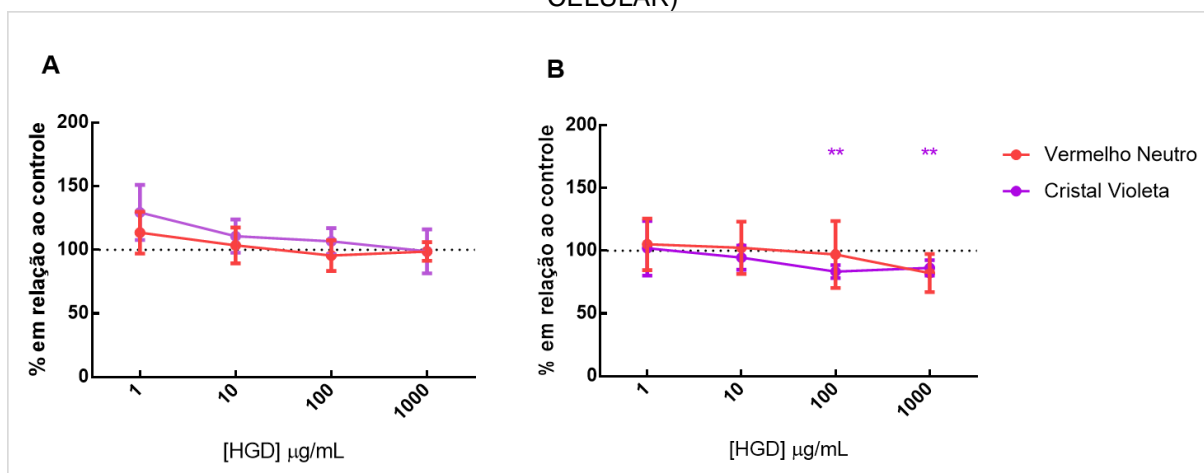
Realizamos um *screening* inicial com quatro concentrações (1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) de HGD para analisar se o polissacarídeo poderia ser potencialmente citotóxico para as células não-tumorais, nesse caso, fibroblastos murinos (Balb/3T3), e também para as células-tumorais murinas (B16-F10), se poderia ser citotóxico seletivo ou modular a proliferação/densidade celular dessas. A partir dos resultados obtidos, tem-se que a HGD não foi capaz de alterar a viabilidade de nenhuma das linhagens no período de tratamento de 72 h, portanto não foi citotóxico, mas foi capaz de reduzir a densidade/proliferação de células-tumorais em cerca de 17% na

concentração de 100 µg/mL e em cerca de 14% na concentração de 1000 µg/mL (FIGURA 10).

Diversos polissacarídeos já foram descritos na literatura e apresentam atividades semelhantes. Um polissacarídeo contendo frutose, xilose, manose, glucose e galactose extraído da planta *Curcuma kwangsiensis* na concentração de 50 µg/mL foi eficaz na redução da proliferação de células de carcinoma nasofaríngeo (CNE-2) em 23,48% (ZENG et al., 2012). Polissacarídeos sulfatados extraídos das algas marrons *Saccharina japonica* e *Undaria pinnatifida* (200 a 1000 µg/mL) também foram capazes de reduzir a proliferação de células tumorais de câncer de mama (T-47D) e melanoma (SK-MEL-28) de forma concentração dependente, reduzindo 46% e 34%, respectivamente (VISHCHUK; ERMAKOVA; ZVYAGINTSEVA, 2011).

Também, um polissacarídeo extraído do fungo *Dictyophora indusiata* e complexado com zinco reduziu a proliferação de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama, na concentração de 250 µg/mL e no tempo de tratamento de 48 h (LIAO et al., 2015). Por último, um polissacarídeo obtido do fungo *L. rugosiceps* apresentou efeito antiproliferativo em câncer de fígado (células de hepatoma HepG-2) e em câncer de mama (células MCF-7), na concentração de 2000 µg/mL em 48 h (LI et al., 2020).

FIGURA 10 – ANÁLISE DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR (CITOTOXICIDADE CELULAR)



FONTE: A autora (2021).

NOTA: Células Balb/3T3 (A) e células B16-F10 (B) foram expostas à HGD nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL por 72 h para então finalização pelos ensaios de vermelho neutro e cristal violeta. Os resultados representam a média de pelo menos 3 experimentos biológicos independentes. A linha tracejada representa o controle experimental. Dados mostrados como média ± DP. (B) HGD 100 µg/mL. **p<0,0013 e HGD 1000 µg/mL **p<0,0066.

Uma pectina ramnogalacturonana, que possui também homogalacturonana, reduziu *in vitro* a proliferação de células de câncer de cólon nas concentrações de 200, 500 e 1000 µg/mL, no tempo de tratamento de 48 h, reduzindo ainda mais a proliferação após esse tempo (MAXWELL et al., 2015). Também, uma pectina cítrica modificada contendo homogalacturonana e ramnogalacturana em sua estrutura, com baixo DE, reduziu a proliferação *in vitro* de células de câncer colorretal (Caco-2) na concentração de 1000 µg/mL, no tempo de tratamento de 48 h (CAO et al., 2020).

Desta forma, em concentrações e estrutura química semelhantes às encontradas na literatura, a redução da proliferação celular induzida por HGD é um promissor ponto inicial do estudo de suas atividades antitumorais, visto que outros polissacarídeos já descritos e que apresentaram essa capacidade também modularam outras dinâmicas de malignidade associadas à progressão tumoral, como diminuição da capacidade invasiva e migratória das células tumorais.

6.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

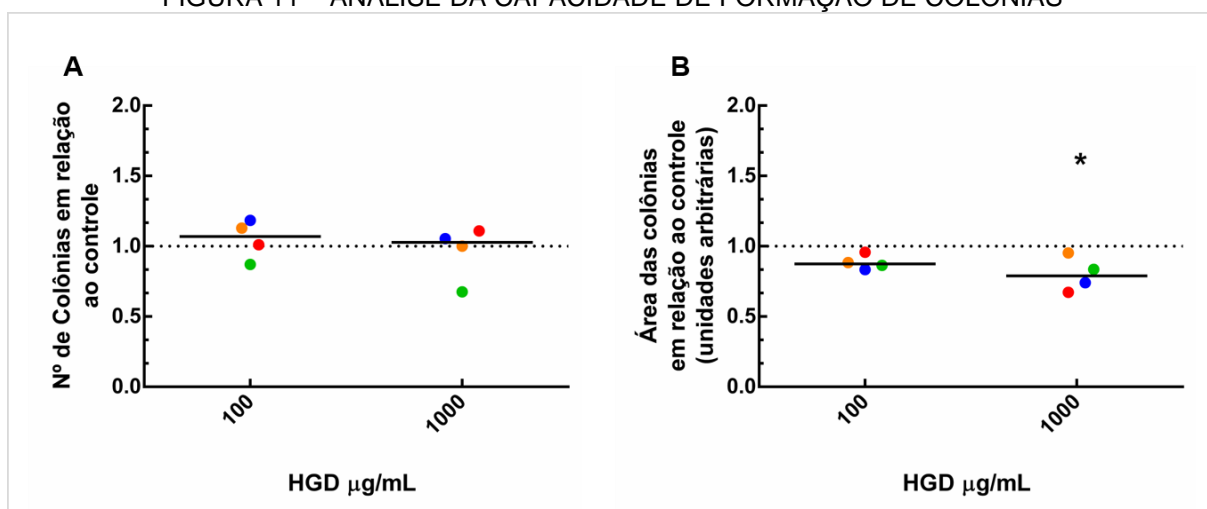
Outro parâmetro essencial a ser avaliado é a capacidade das células tumorais em formar colônias. Sabe-se que, para que a célula continue o seu processo metastático, é necessário que ela tenha capacidade de originar clones e, conseqüentemente, formar colônias a partir de uma única célula individualizada (STEEG, 2016).

Então, a partir dos resultados obtidos até o momento e dos dados encontrados na literatura, as duas maiores concentrações de HGD, que diminuíram a densidade das células de melanoma murino B16-F10 (100 e 1000 µg/mL), foram selecionadas. As células foram individualizadas e, após o período de tratamento de 72 h, avaliou-se tanto o número de colônias quanto a área dessas. A HGD não reduziu o número de colônias, mas reduziu em aproximadamente 20% as áreas respectivas na concentração de 1000 µg/mL (FIGURA 11), resultado obtido a partir da quantificação de pelo menos 200 colônias individuais de cada grupo experimental e em cada replicata biológica.

Já foi descrito na literatura atividades de polissacarídeos que foram capazes de reduzir parâmetros envolvidos na formação de colônias de células tumorais. Polissacarídeos isolados das algas *Saccharina japonica* e *Undaria pinnatifida* também foram capazes de reduzir em 48 h a formação de colônias na concentração de 200

µg/mL, no câncer de mama (células T-47D) e no melanoma (células SK-MEL-28) (VISHCHUK; ERMAKOVA; ZVYAGINTSEVA, 2011). Um extrato natural tradicional utilizado na medicina chinesa, denominado Ruyiping, foi capaz de reduzir o número de colônias de células de câncer de mama (MDA-MB-231 e MDA-MB-468) em 96h de tratamento, sendo as células tratadas com 40% de extrato em meio de cultura, posteriormente avaliadas pela coloração com cristal violeta (LI et al., 2019).

FIGURA 11 – ANÁLISE DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS



FONTE: A autora (2021).

NOTA: Células B16-F10 foram expostas à HGD nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL por 72 h para então coloração com cristal violeta. Os resultados representam a mediana de 4 experimentos biológicos independentes, avaliados: n° médio de colônias (A) e área média das colônias (B). A linha tracejada representa o controle experimental.

Assim, a partir dos achados na literatura e os encontrados neste trabalho, em concentrações semelhantes às utilizadas, tem-se outro ponto crucial para a continuidade da investigação da atividade da HGD em células tumorais, visto sua ação anti-proliferativa e a redução da área das colônias.

6.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Decorrente dos resultados encontrados nos experimentos anteriores, onde observa-se diminuição de densidade celular, mas não de viabilidade, bem como diminuição da área das colônias, optou-se por investigar o ciclo celular das células tratadas com a HGD. O ciclo celular é outro parâmetro essencial para a evolução do câncer. As células tumorais que têm seu ciclo celular acelerado, conseguem formar tumores em tempos mais curtos, bem como ocasionar metástases (HANAHAN;

WEINBERG, 2011). Assim, o objetivo foi investigar se a HGD seria capaz de retardar o ciclo celular em alguma de suas fases (G0/G1, S, G2/M).

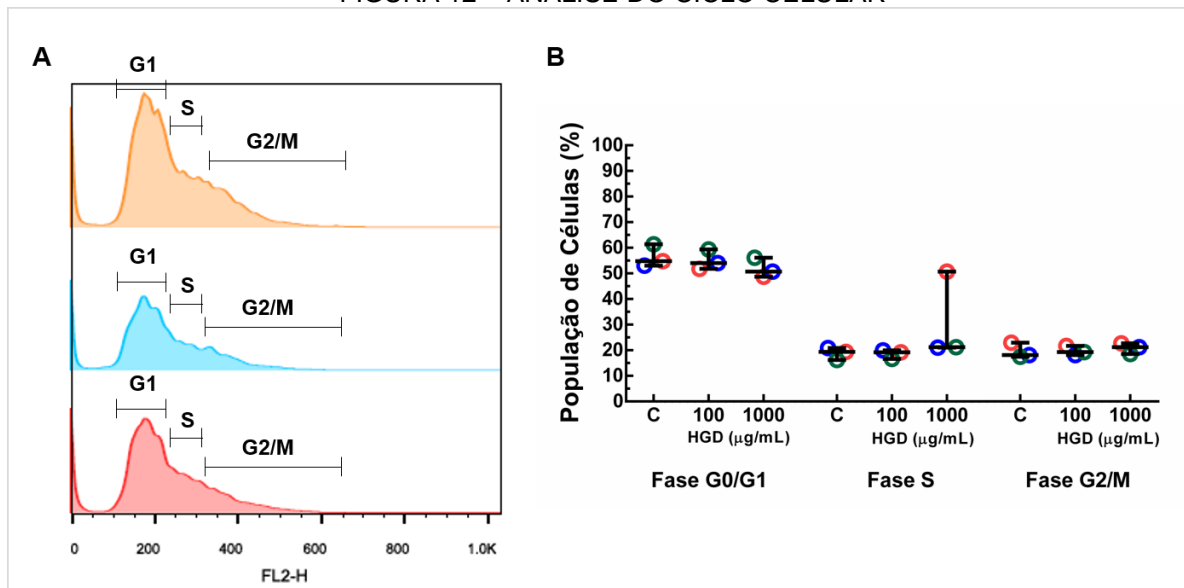
Não foi observada nenhuma alteração no ciclo celular das células de melanoma B16-F10 tratadas com a HGD nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL, no tempo de tratamento de 72 h (FIGURA 12). Na literatura alguns polissacarídeos foram capazes de modular esse parâmetro de malignidade tumoral. Um polissacarídeo extraído do fungo *Dictyophora indusiata*, na concentração de 250 µg/mL, retardou a fase S do ciclo celular de células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) (LIAO et al., 2015). Enquanto que um extrato natural tradicional chamado de Ruyiping, utilizado na medicina chinesa, retardou a fase G2 das células de câncer de mama MDA-MB-231 e MDA-MB-468 no período de tratamento de 24h (LI et al., 2019).

Desta forma, apesar dos achados na literatura, a HGD não foi capaz de alterar o ciclo celular das células tumorais em nenhuma das duas concentrações testadas. Portanto, sabe-se que a diminuição da proliferação celular pela HGD observada não tem relação com o retardo do ciclo celular, mas sim com algum outro mecanismo/parâmetro que deve ser melhor investigado a partir de outras metodologias. O estudo da interação célula-célula e célula-matriz sob efeito do polissacarídeo é uma das alternativas a serem analisadas, por meio do ensaio de adesão celular, corroborando em estudos futuros para a análise da atividade antiproliferativa da HGD.

6.5 GEL À BASE DE PECTINA DE BAIXO GRAU DE METILESTERIFICAÇÃO

Durante a realização dos experimentos, quando as células foram tratadas com a HGD na concentração de 1000 µg/mL, observou-se a formação instantânea de um gel sobre a monocamada de células (FIGURA 13). Buscou-se na literatura a relação entre a estrutura química da pectina e a formação de géis e viu-se que quando a pectina apresenta baixo grau de metil-esterificação (LM), portanto maior quantidade de carboxilas livres, ela consegue interagir com íons cálcio complexando e formando géis (JANTRAWUT et al., 2019; SLAVUTSKY; BERTUZZI, 2019). O meio de cultura utilizado neste trabalho, DMEM, tem em sua composição íons cálcio e, assim, permite a formação do gel quando em contato com a HGD (Cat. No. 12800-017, Gibco).

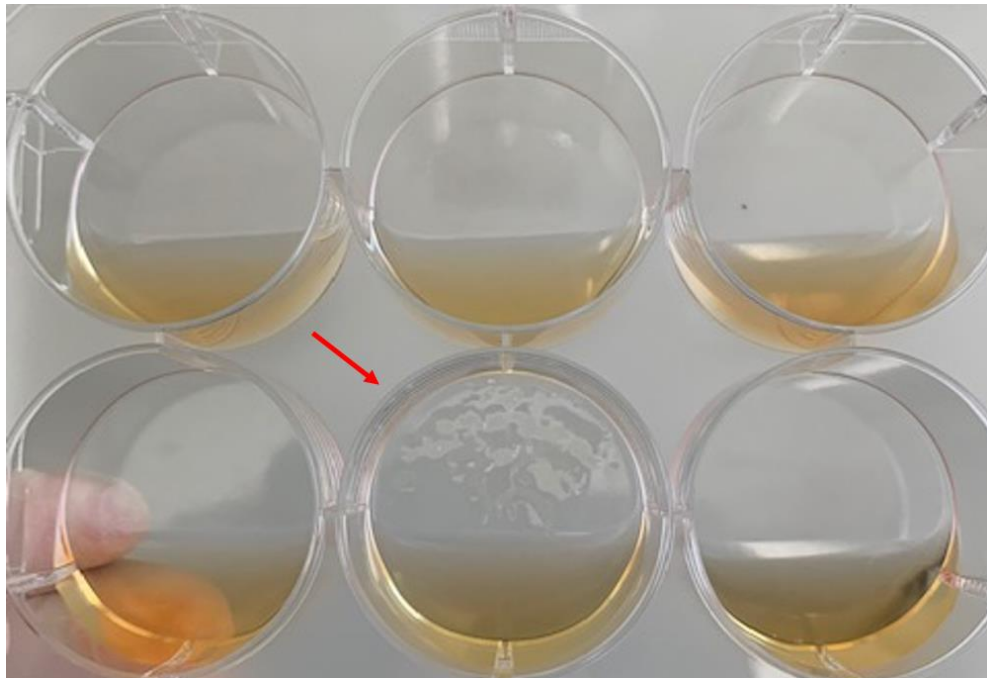
FIGURA 12 – ANÁLISE DO CICLO CELULAR



FONTE: A autora (2021).

NOTA: Células B16-F10 foram expostas à HGD nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL por 72 h para então marcação com iodeto de propídeo e leitura em citômetro de fluxo. Os resultados representam a média de 3 experimentos biológicos independentes, avaliadas a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, S e G2/M. (A) Histograma representando os picos das células do grupo controle e tratadas. Pi = Iodeto de Propídeo. (B) Gráfico representando a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular, sendo comparadas ao grupo controle (C).

FIGURA 13 – GEL FORMADO COM A PECTINA DE BAIXO GRAU DE METILESTERIFICAÇÃO



FONTE: A autora (2021).

NOTA: Poço com gel formado indicado pela seta vermelha na figura.

A partir dessa observação, alguns questionamentos surgiram sobre os resultados obtidos, tendo em vista que as células necessitam interagir entre si e com

o meio para progredir e, principalmente, proliferar, levantando o questionando de que, talvez, o gel esteja se formando em âmbito microscópico, nas superfícies celulares e, assim, essas interações estejam sendo prejudicadas, levando a menor proliferação celular.

Também, é importante ressaltar que o pH da solução após o tratamento pode interferir nas atividades celulares se este for alterado significativamente. Dessa forma, o pH foi medido e não foi observada nenhuma alteração entre a solução tratada com a HGD e o controle.

Além disso, a formação desse gel empregando o polissacarídeo HGD pode possibilitar a exploração de alternativas farmacológicas interessantes, como demonstrado na literatura. Gazzi e colaboradores (2020) demonstraram que é possível construir um gel de pectina e incorporar em sua estrutura nanocápsulas contendo um fármaco específico, podendo interagir com células tumorais de melanoma (SK-MEL-28) que ali aderirem, modificando parâmetros de malignidade e auxiliando no tratamento desse tipo de câncer (GAZZI et al., 2020). Assim, havendo potencial ação antitumoral da HGD, por exemplo, combinada com outro fármaco antitumoral, o tratamento de pacientes oncológicos poderia ser aprimorado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pectina extraída da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) e desesterificada alterou parâmetros de progressão tumoral, pois reduziu a proliferação de células de melanoma (B16-F10) – nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL – e a área de colônias originadas a partir de uma única célula isolada – na concentração de 1000 µg/mL. No entanto, ela não alterou o ciclo celular nas concentrações testadas. Frente aos resultados obtidos, deve-se dar continuidade ao trabalho investigando outros parâmetros de malignidade tumoral que possam ajudar a embasar os resultados encontrados, como o ensaio de morte e adesão celular. Ademais, deve-se investigar a interferência do gel formado na concentração de 1000 µg/mL sobre a densidade/proliferação dessas, bem como investigar o potencial uso do gel de pectina em combinação com outras drogas para tratamento do melanoma.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, K. Y. et al. Gastroprotective effect of soluble dietary fibres from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel against ethanol-induced ulcer in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 54, n. February, p. 552–558, 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Key statistics for melanoma skin cancer. 2021. **American Cancer Society**, p. 1–5, 2021.
- BARBIERI, S. F. et al. Pectins from the pulp of gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): Structural characterization and rheological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, p. 250–258, 2019.
- BELLAN, D. L. et al. Non-Cytotoxic Sulfated Heterorhamnan from *Gayralia brasiliensis* Green Seaweed Reduces Driver Features of Melanoma Metastatic Progression. **Marine Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 194–206, 2020a.
- BELLAN, D. L. et al. Green does not always mean go: A sulfated galactan from *Codium isthmocladum* green seaweed reduces melanoma metastasis through direct regulation of malignancy features. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, n. August, p. 116869, 2020b.
- BISCAIA, S. M. P. et al. Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, n. May, p. 95–104, 2017.
- BONNEKOH, B. et al. Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. **Archives of Dermatological Research**, v. 281, n. 7, p. 487–490, 1989.
- BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros**, v. 9, n. 3, p. 38–44, 1999.
- CANTERI, M. H. G. et al. Pectin: From raw material to the final product. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.
- CAO, J. et al. Modified citrus pectins by UV/H₂O₂ oxidation at acidic and basic conditions: Structures and in vitro anti-inflammatory, anti-proliferative activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, n. July, p. 116742, 2020.
- CARDOSO, A. C. F. et al. Galectin-3 determines tumor cell adaptive strategies in stressed tumor microenvironments. **Frontiers in Oncology**, v. 6, n. MAY, p. 1–12, 2016.
- CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surgical Clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 1–12, 2020.
- CARUSO, R. et al. The burden of psychosocial morbidity related to cancer: patient and family issues. **International Review of Psychiatry**, v. 29, n. 5, p. 389–402, 2017.
- CHO, Y. et al. A chemoprotective fish oil/pectin diet enhances apoptosis via Bcl-2 promoter methylation in rat azoxymethane-induced carcinomas. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 12, p. 1387–1393, 2012.

COELHO, E. M. et al. Physico-chemical properties, rheology and degree of esterification of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel flour. **Journal of the Science of food and agriculture**, v. 98, n. 1, p. 166-173, 2018.

DABA, A. S.; EZERONYE, O. U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 835–847, 2003.

DAVIS, E. J. et al. Melanoma: What do all the mutations mean? **Cancer**, v. 124, n. 17, p. 3490–3499, 2018.

DAVIS, L. E.; SHALIN, S. C.; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology and Therapy**, v. 20, n. 11, p. 1366–1379, 2019.

DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 7, p. 35–49, 2018.

EDDY, K.; CHEN, S. Overcoming immune evasion in melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 1–48, 2020.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Citrus fruit fresh and processed – Statistical Bulletin 2016. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2017.

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

FUNDAÇÃO ONCOCENTRO DE SÃO PAULO (FOSP). TMN Classificação de Tumores Malignos. Disponível em: < <http://www.fosp.saude.sp.gov.br/fosp/diretoria-adjunta-de-informacao-e-epidemiologia/tnm/>> Acesso em: 25 de nov. de 2021.

GAWKOWSKA, D.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. **Polymers**, v. 10, n. 7, 2018.

GAZZI, R. P. et al. New pectin-based hydrogel containing imiquimod-loaded polymeric nanocapsules for melanoma treatment. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1829–1840, 2020.

GORRY, C.; MCCULLAGH, L.; BARRY, M. Economic Evaluation of Systemic Treatments for Advanced Melanoma: A Systematic Review. **Value in Health**, v. 23, n. 1, p. 52–60, 2020.

GRASDALEN, H; KNUTSEN, S.; HAUGEN, F.; NERDAL, W. Evidence for double helical kappa-carrageenan in aqueous LiI-solution and model for iodide binding. *J Biomol Struct Dyn.*, v. 10, n. 5, p. 785-91, 1988.

GRASDALEN, H.; EINAR BAKØY, O.; LARSEN, B. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H-n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 184, n. C, p. 183–191, 1988.

GROHMANN, K. et al. Purification of citrus peel juice and molasses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 4859–4867, 1999.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HAO, M. et al. Comparative studies on the anti-tumor activities of high temperature and pH modified citrus pectins. **Food & Function**, v. 4, p. 960-971, 2013.

HAYASHI, A.; GILLEN, A. C.; LOTT, J. R. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in balb-c mice. **Alternative Medicine Review**, v. 5, n. 6, p. 546–552, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Câncer de pele: saiba como prevenir, diagnosticar e tratar, 2020. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/noticias/cancer-de-pele-saiba-como-prevenir-diagnosticar-e-tratar>> Acesso em: 27 de nov. de 2021b.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estatísticas de câncer, 2021. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 25 de nov. de 2021a.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). O que é câncer? 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 25 de nov. de 2021a.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Tratamento do câncer, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento>>. Acesso em: 25 de nov. de 2021b.

ICCVAM. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method. **ICCVAM Test Method Evaluation Report Appendix**, v. 07–4519, n. November, p. 1–35, 2006.

INOHARA, H.; RAZ, A. Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. **Glycoconjugate Journal**, v. 11, n. 6, p. 527–532, 1994.

JANTRAWUT, P. et al. Fabrication and characterization of low methoxyl pectin/gelatin/carboxymethyl cellulose absorbent hydrogel film for wound dressing applications. **Materials**, v. 12, n. 10, 2019.

JASKI, A. C.; ABOUD, K. Y.; CORDEIRO, L. M. C.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; SIMAS, F. F. Poly(vinyl alcohol)/pectin hydrogels based on citrus and passion fruit peel pectins: comparative microstructure, rheological behavior and gelling process, 2021 (fase final de redação).

JEFF, I. B. et al. Purification and in vitro anti-proliferative effect of novel neutral polysaccharides from *Lentinus edodes*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, n. 1, p. 99–106, 2013.

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

JI, C. F.; JI, Y. BIN; MENG, D. Y. Sulfated modification and anti-tumor activity of laminarin. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, n. 5, p. 1259–1264, 2013.

JIANG, J.; ELIAZ, I.; SLIVA, D. Synergistic and additive effects of modified citrus pectin with two polybotanical compounds, in the suppression of invasive behavior of human breast and prostate cancer cells. **Integrative Cancer Therapies**, v. 12, n. 2, p. 145–152, 2013.

KASAI et al. Systematic synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their effect on cancer cells. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 42, p. 10556-10568, 2015.

KO, Y. C. et al. Inhibitory effects of tangeretin, a citrus peel-derived flavonoid, on breast cancer stem cell formation through suppression of Stat3 signaling. **Molecules**, v. 25, n. 11, 2020.

KORNEEV, K. V. et al. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. **Cytokine**, v. 89, p. 127–135, 2017.

LACOUTURE, M.; SIBAUD, V. Toxic Side Effects of Targeted Therapies and Immunotherapies Affecting the Skin, Oral Mucosa, Hair, and Nails. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 19, n. s1, p. 31–39, 2018.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 2017.

LECLERE, L. et al. Heat-modified citrus pectin induces apoptosis-like cell death and autophagy in HepG2 and A549 cancer cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–24, 2015.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 188–196, 2018.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (Review). **International Journal of Oncology**, v. 57, n. 3, p. 609–618, 2020.

LEWANDOWSKA, A. M. et al. Environmental risk factors for cancer - review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1–7, 2019.

LI, Y. et al. Structural characterization, antiproliferative and immunoregulatory activities of a polysaccharide from *Boletus Leccinum rugosiceps*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 106–118, 2020.

LI, Z. et al. Antitumor effects of ruyiping on cell growth and metastasis in breast cancer. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 34, n. 5, p. 297–305, 2019.

LIAO, W. et al. Preparation and Characterization of *Dictyophora indusiata* Polysaccharide-Zinc Complex and Its Augmented Antiproliferative Activity on Human Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 29, p. 6525–6534, 2015.

LIEW, S. Q.; CHIN, N. L.; YUSOF, Y. A. Extraction and Characterization of Pectin from Passion Fruit Peels. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 231–236, 2014.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29–41, 2005.

LIU, H. Y. et al. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 48, p. 7386–7391, 2008.

LUZ, K. T. V. Atividade antimelanoma de pectinas da ameixa e do maracujá. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2021.

MAXWELL, E. G. et al. Rhamnogalacturonan i containing homogalacturonan inhibits colon cancer cell proliferation by decreasing ICAM1 expression. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 546–553, 2015.

- NAIR S, A. et al. Citrus peels prevent cancer. **Phytomedicine**, v. 50, p. 231–237, 2018.
- NANGIA-MAKKER, P. et al. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 24, p. 1854–1862, 2002.
- NAQASH, F. et al. Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 227–239, 2017.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH) (EUA). Drugs Approved for Melanoma. 19 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/melanoma>>. Acesso em: 28 de nov. de 2021.
- PAIVA, M. D. E. et al. Complicações Orais Decorrentes da Terapia Antineoplásica Oral. **Arquivos em Odontologia**, v. 46, n. 1, p. 48–55, 2010.
- PARK, J. Y. et al. Polysaccharides from Korean Citrus hallabong peels inhibit angiogenesis and breast cancer cell migration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 522–529, 2016.
- PIENTA, K. J. et al. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 5, p. 348–353, 1995.
- PORTENOY, R. K. Treatment of cancer pain. **The Lancet**, v. 377, n. 9784, p. 2236–2247, 2011.
- POSTOW, M. A.; SIDLOW, R.; HELLMANN, M. D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 2, p. 158–168, 2018.
- PRADO et al. Migration and proliferation of cancer cells in culture are differentially affected size of modified citrus pectin. **Carbohydr Polym.**, v. 211, p. 141-151, 2019.
- RALLI, M. et al. Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, 2020.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.
- RUVOLO, P. P. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 3, p. 427–437, 2016.
- SABAG, N.; YAKOBSON, A.; SILBERSTEIN, E. Recent Changes and Innovations in Melanoma Treatment: A Review. **Israel Medical Association Journal**, v. 22, p. 704–710, 2020.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. April, p. 1–20, 2015.
- SCHINDELIN, J. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p.676-682, 2012.
- SILVA, D. C. et al. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 139–145, 2012.

SINGH, B. et al. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. **Food Research International**, v. 132, n. November 2019, p. 109114, 2020.

SLAVUTSKY, A. M.; BERTUZZI, M. A. Formulation and characterization of hydrogel based on pectin and brea gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 784–791, 2019.

SOHRETOGLU, D.; HUANG, S. Ganoderma lucidum Polysaccharides as An Anti-cancer Agent. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 667–674, 2018.

SONG, K. S. et al. Protein-bound polysaccharide from Phellinus linteus inhibits tumor growth, invasion, and angiogenesis and alters Wnt/ β -catenin in SW480 human colon cancer cells. **BMC Cancer**, v. 11, 2011.

STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 4, p. 201–218, 2016.

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 for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAMIELLO, C. S. et al. Structural features of polysaccharides from edible jambo (*Syzygium jambos*) fruits and antitumor activity of extracted pectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1414–1421, 2018.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, p. 10–14, 2011.

VISHCHUK, O. S.; ERMAKOVA, S. P.; ZVYAGINTSEVA, T. N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: Isolation, structural characteristics, and antitumor activity. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 17, p. 2769–2776, 2011.

VISSER, A. et al. The impact of parental cancer on children and the family: A review of the literature. **Cancer Treatment Reviews**, v. 30, n. 8, p. 683–694, 2004.

WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 12, p. 3855–3864, 2018.

WASSER, S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1323–1332, 2011.

WEAVER, K. E. et al. Parental cancer and the family: A population-based estimate of the number of US cancer survivors residing with their minor children. **Cancer**, v. 116, n. 18, p. 4395–4401, 2010.

WINDER, M.; VIRÓS, A. Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 249, p. 91-108, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 25 de nov. de 2021a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer tomorrow, 2021. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=1&single_unit=5000&sexse=2&populations=76&group_populations=1&multiple_populations=1>. Acesso em: 26 de nov. de 2021b.

WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer Letters**, v. 387, p. 61–68, 2017.

XU, H.; XU, X. Polysaccharide, a Potencial Anti-cancer Drug with High Efficacy and Safety. **Journal of Oncology Reseach and Treatments**, v. 1, n. 2, p. 1-2, 2016.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow passion fruit rind - A potential source of low-methoxyl pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2738–2744, 2006.

ZAITSEVA, O. et al. Pectins as a universal medicine. **Fitoterapia**, v. 146, n. March, p. 104676, 2020.

ZENG, J. et al. Apoptosis-induced anti-tumor effect of Curcuma kwangsiensis polysaccharides against human nasopharyngeal carcinoma cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1067–1072, 2012.

ZHANG, M. et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 4–19, 2007.

ZHANG, W.; XU, P.; ZHANG, H. Pectin in cancer therapy: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 258–271, 2015.

ZIMMER, C. How many cells are in your body? National Geographic, 2013. Disponível em: <<https://www.nationalgeographic.com/science/article/how-many-cells-are-in-your-body>>. Acesso em: 24 de nov. de 2021.