

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELLA FERNANDA ANGELI

POLISSACARÍDEOS PROVENIENTES DA FARINHA DO BAGAÇO DE GUAVIRA
APRESENTAM ATIVIDADE ANTITUMORAL SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA
MURINO *IN VITRO*

CURITIBA

2023

RAFAELLA FERNANDA ANGELI

POLISSACARÍDEOS PROVENIENTES DA FARINHA DO BAGAÇO DE GUAVIRA
APRESENTAM EFEITO ANTITUMORAL SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA
MURINO *IN VITRO*

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.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Fabíola Iagher

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Katya Naliwaiko

CURITIBA

2023

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

Angeli, Rafaella Fernanda

Polissacarídeos provenientes da farinha do bagaço de guavira
apresentam atividade antitumoral sobre células de melanoma
murino *in vitro* / Rafaella Fernanda Angeli. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof(a). Dr(a). Fabíola Iagher.

Coorientadora: Prof(a). Dr(a). Katya Naliwaiko.

1. Câncer. 2. Melanoma. 3. Antineoplásicos. 4. Pectinas. 5.
Polissacarídeos. I. Iagher, Fabíola, 1975-. II. Naliwaiko, Katya,
1976-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



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

ATA Nº63

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

No dia vinte e cinco de janeiro de dois mil e vinte e três às 14:00 horas, na sala Auditório do Departamento de Fisiologia (Sala 103), Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **RAFAELLA FERNANDA ANGELI**, intitulada: **"POLISSACARÍDEOS PROVENIENTES DA FARINHA DO BAGAÇO DE GUAVIRA APRESENTAM ATIVIDADE ANTITUMORAL SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO IN VITRO."**, sob orientação da Profa. Dra. **FABIOLA IAGHER**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISIOLÓGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: **FABIOLA IAGHER** (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), **ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE** (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), **SANDRO JOSÉ RIBEIRO BONATTO** (SECRETARIA DO ESTADO DA EDUCAÇÃO 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, **FABIOLA IAGHER**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 25 de Janeiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

26/01/2023 13:19:02.0

FABIOLA IAGHER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/01/2023 22:53:24.0

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/01/2023 19:18:45.0

SANDRO JOSÉ RIBEIRO BONATTO

Avaliador Externo (SECRETARIA DO ESTADO DA EDUCAÇÃO 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 SI GA-UFPR, com a seguinte identificação única: 250800

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 250800



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISIOLÓGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **RAFAELLA FERNANDA ANGELI** intitulada: **"POLISSACARÍDEOS PROVENIENTES DA FARINHA DO BAGAÇO DE GUAVIRA APRESENTAM ATIVIDADE ANTITUMORAL SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO IN VITRO."**, 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, 25 de Janeiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

26/01/2023 13:19:02.0

FABIOLA IAGHER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/01/2023 22:53:24.0

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/01/2023 19:18:45.0

SANDRO JOSÉ RIBEIRO BONATTO

Avaliador Externo (SECRETARIA DO ESTADO DA EDUCAÇÃO DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço às pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe e meu pai, que sempre foram a minha base, torceram e rezaram por mim. Mesmo de longe, nunca deixaram de ser a minha força. Eles falam que tem orgulho de mim, mas, quem realmente tem orgulho por ter como família primordial duas pessoas tão esforçadas e exemplares, sou eu. Esse trabalho é todinho pra vocês.

Agradeço ao meu marido, Henrique, pelo companheirismo desse “tempo de luta”. Por ter vivido cada instante comigo, sendo suporte, sorrisos para comemorar e ombro para chorar.

Agradeço à minha querida orientadora, Professora Doutora Fabíola Iagher, pela oportunidade de trabalhar e aprender com ela. Uma professora admirada, muito além da teoria, para mim ela é exemplo de índole e uma inspiração.

Agradeço aos meus colegas do LabMetab, em especial ao nosso TeamCancer. Amanda e Suelen foram responsáveis por ensinar basicamente tudo o que eu sei sobre a prática de cultivo, nunca deixaram de compartilhar seus conhecimentos e viraram amigas de coração, companheiras para os momentos felizes e para os perrengues.

Agradeço aos técnicos e ao secretário do departamento de Fisiologia da UFPR, pela pronta ajuda para resolver os problemas, pelos papos e pelas risadas.

Agradeço aos colegas da UFPR pelas risadas e momentos compartilhados.

Agradeço à Professora Lucimara Cordeiro, da Universidade Federal do Paraná, por gentilmente ceder o polissacarídeo da farinha de guavira, utilizado nesta dissertação.

Agradeço ao Professor Glaucio Valdameri, por permitir de bom grado o uso dos equipamentos de seu laboratório.

Agradeço às pessoas responsáveis pela limpeza das salas de laboratório e corredores do departamento e da UFPR, em especial à Sueli.

Agradeço a todos os envolvidos no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da UFPR.

Agradeço a todos os outros professores e colegas que fizeram e fazem parte do caminho que estou trilhando.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná pela incrível jornada que estou tendo a oportunidade de vivenciar!

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

RESUMO

O melanoma é um tipo agressivo de câncer com incidência crescente em todo o mundo. Os quimioterápicos estão associados a diversos efeitos colaterais que reduzem a qualidade de vida dos pacientes submetidos ao tratamento, o que promove a procura por substâncias bioativas alternativas às atualmente disponíveis. Logo, os polissacarídeos emergiram como potencial possibilidade. Baseado nisso, esta pesquisa teve como objetivo avaliar *in vitro* a ação antitumoral de pectinas provenientes da farinha do bagaço de *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens* (fração CPW) sobre células da linhagem de melanoma murino B16F10. Os ensaios avaliaram a viabilidade, proliferação, capacidade migratória, potencial de formação de colônias e morte por apoptose ou necrose. Os resultados mostraram que os polissacarídeos nas concentrações de 5 e 100 µg/ml foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade das células tumorais (~20 a 40%, respectivamente, em relação ao grupo não tratado), com menor efeito citotóxico sobre células normais (BALB/c 3T3) que o quimioterápico Doxorubicina ($p < 0,05$). A redução da viabilidade observada se deve pelo menos em parte à redução da capacidade proliferativa das células tumorais tratadas com as duas concentrações polissacarídicas (~33 e 40%, respectivamente). Também foi observado o efeito de redução da capacidade de migração das células tumorais (redução de ~8 e 12%, respectivamente), e redução do número de novas colônias formadas (~30 e 70%, respectivamente). No ensaio por citometria de fluxo foi verificado que o tratamento com as duas concentrações polissacarídicas não aumentou o número de células mortas mas sim, o número de células viáveis, sugerindo estagnação do ciclo celular. Juntos, os resultados indicam que polissacarídeos solúveis (pectinas) da farinha do bagaço de guavira apresentam importante atividade antitumoral, que pode vir a ser utilizada no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Câncer; melanoma; antitumoral; pectinas; polissacarídeos.

ABSTRACT

Melanoma is an aggressive type of cancer with increasing incidence worldwide. Chemotherapy drugs are associated with several side effects that reflect on life quality of patients under treatment, which promotes the research for alternative bioactive substances for the currently available ones. Thus, polysaccharides emerged as a potential possibility. Based on that, this research aimed to evaluate *in vitro* the antitumor activity of pectins of *Campomanesia adamantium* and *Campomanesia pubescens* (CPW fraction) pomace flour on cells of murine melanoma lineage B16F10. The assays evaluated viability, proliferation rate, migratory ability, potential for colony formation and death by apoptosis or necrosis. The results showed that polysaccharides at concentrations of 5 and 100 µg/ml were capable of significantly diminish the viability of tumor cells (~20 to 40%, respectively, in relation to the untreated group), with less cytotoxic effect on normal cells (BALB/c 3T3) than the chemotherapy drug Doxorubicin ($p < 0.05$). The observed reduction in viability is due at least in part to the effect on the proliferative capacity of tumor cells treated with the two polysaccharide concentrations (~33 and 40%, respectively). Moreover, CPW fraction diminished the ability of tumor cells to migrate (~8 and 12%, respectively), and the number of new colonies formed (~30 and 70%, respectively). In the flow cytometry assay, it was verified that the treatment with the two polysaccharide concentrations did not increase the number of dead cells, but the number of viable cells, suggesting induction of cell cycle arrest. Together, the results indicated that soluble polysaccharides (pectins) from guavira pomace flour have important antitumor activity, which may be applied for the treatment of cancer.

Keywords: Cancer; melanoma; antitumor; pectins; polysaccharides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Tipos de câncer com maior incidência entre 2020-2022	13
FIGURA 2 – Cascata de invasão e metástase	16
FIGURA 3 – Surgimento e progressão do melanoma	17
FIGURA 4 – Representação de estruturas possíveis das pectinas	21
FIGURA 5 – <i>Campomanesia</i>	22
GRÁFICO 1 – Viabilidade celular avaliada pelo método <i>Neutral red</i> com a linhagem Balb/c 3T3	34
GRÁFICO 2 – Viabilidade celular avaliada pelo método <i>Neutral red</i> com a linhagem B16F10	35
GRÁFICO 3 – Viabilidade celular avaliada pelo método <i>Alamar blue®</i> com a linhagem Balb/c 3T3	36
GRÁFICO 4 – Viabilidade celular avaliada pelo método <i>Alamar blue®</i> com a linhagem B16F10	37
GRÁFICO 5 – Proliferação celular avaliada pelo ensaio de Cristal violeta	40
FIGURA 6 – Migração celular avaliada pelo método <i>Scratch</i>	42
GRÁFICO 6 – Migração de células da linhagem B16F10 após 12, 24 e 48 horas de tratamento	43
FIGURA 7 - Ensaio de formação de colônias	45
GRÁFICO 7 – Formação de colônias expressa em número absoluto	46
FIGURA 8 - Avaliação de apoptose/necrose de células tumorais por citometria de fluxo	48
GRÁFICO 8 – População de células necróticas ou apoptóticas expressa em porcentagem	49

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

µg	- Micrograma
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
NIH	- <i>National Institutes of Health</i>
OPAS	- Organização Panamericana de Saúde
CAFs	- <i>Cancer Associated Fibroblasts</i>
MMPs	- Metaloproteinases
MSH	- Hormônio estimulante de melanócitos
UV	- Ultravioleta
UV-A	- Ultravioleta espectro A
BRAF	- Oncogene responsável pela expressão da proteína B-Raf
B-Raf	- Proteína quinase integrante da via MAPK
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitógeno
DOX	- Doxorrubicina
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
GalA	- Ácido Galacturônico
HG	- Homogalacturonana
RG-I	- Ramnogalacturonana tipo I
RG-II	- Ramnogalacturonana tipo II
XG	- Xilogalacturonana
Gal-3	- Galectina-3
CPW	- Fração de polissacarídeos de guavira <i>Campomanesia Water Extraction</i>
B16F10	- Linhagem celular de melanoma murino
Balb/c 3T3	- Linhagem celular de fibroblastos murinos
RPMI 1640	- Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	- Soro Fetal Bovino
NR	- <i>Neutral Red</i>
CV	- Cristal Violeta
PBS	- <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	- Paraformaldeído
MP	- Membrana Plasmática
PS	- Fostatidilserina

PI	- Iodeto de Propídio
ANOVA	- Análise de Variância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
1.1	CÂNCER	12
1.2	PROGRESSÃO TUMORAL E METÁSTASE.....	14
1.3	FISIOPATOLOGIA DO MELANOMA.....	16
1.4	TRATAMENTOS E PRODUTOS NATURAIS	18
1.5	ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS PECTINAS	20
1.5.1	<i>Campomanesia</i>	22
1.6	JUSTIFICATIVA.....	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	MATERIAL E MÉTODO	27
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL	27
3.2	CULTIVO CELULAR E TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS	28
3.3	ESTUDO PILOTO.....	28
3.4	VIABILIDADE CELULAR.....	28
3.4.1	Vermelho neutro	29
3.4.2	<i>Alamar Blue®</i>	29
3.5	PROLIFERAÇÃO CELULAR	30
3.6	MIGRAÇÃO CELULAR.....	30
3.7	FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	31
3.8	PERCENTUAL DE CÉLULAS NECRÓTICAS OU APOPTÓTICAS	31
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	VIABILIDADE CELULAR – VERMELHO NEUTRO E <i>ALAMAR BLUE™</i>	34
4.2	PROLIFERAÇÃO CELULAR	39
4.3	ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR.....	42
4.4	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	45
4.5	PERCENTUAL DE CÉLULAS NECRÓTICAS OU APOPTÓTICAS	47
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 CÂNCER

Há cerca de 2,1 bilhões de anos a vida no planeta cruzou um limiar: a simplicidade dos seres unicelulares deu espaço para uma complexa variedade de formas e funções, inerente dos organismos multicelulares (PENNISI, 2018). A proliferação e a diferenciação celular são processos biológicos complexos que possibilitaram a ascensão da vida multicelular, tal qual conhecemos hoje. Esses processos requerem, concomitantemente, o estímulo e a repressão de inúmeros genes envolvidos no ciclo celular (NAVES, 2000). O controle da capacidade proliferativa deve ser extremamente preciso, dado que erros nesse sistema podem dar início à multiplicação descontrolada da célula, a qual sai da conformação usual de seu tecido de origem, gerando um corpo estranho, um tumor (WEINBERG, 2014).

De acordo com Klein (2000), os tumores surgem através de um processo evolutivo: o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas e consequente instabilidade genômica em uma única célula podem afetar genes relacionados ao crescimento e proliferação celular, ou inativar genes de controle, conhecidos como genes supressores de tumor. O câncer é, portanto, uma doença de base genética (KHAN et al, 2016). As alterações genéticas e epigenéticas podem favorecer o crescimento de clones e subclones cada vez menos responsivos aos mecanismos de controle intra e extracelulares de crescimento e diferenciação (KLEIN, 2000), gerando células que proliferam descontroladamente e perdem suas características originais. De acordo com o INCA (2020), “câncer” é o termo que se aplica a mais de 100 diferentes tipos de doenças. Estas podem ocorrer em qualquer tecido do corpo, formando tumores benignos, limitados ao local de origem, ou tumores malignos, capazes de migrar e se estabelecer em outros tecidos (NIH, 2021).

O impacto econômico do câncer é significativo e está aumentando. O custo anual total da doença em 2017 foi estimado em aproximadamente US\$ 1,16 trilhão nos países da América Latina (OPAS, 2018). Diversas iniciativas estão sendo desenvolvidas em todo o mundo tendo em vista a prevenção e tratamento do câncer: em 2022, o governo dos Estados Unidos lançou o projeto *Cancer Moonshot*, cujo objetivo é ampliar a divulgação de dados e fomentar a pesquisa sobre o câncer (NIH, 2022). No Brasil, a campanha “Câncer, dá pra prevenir?”, anunciada pelo INCA

(2022), tem o propósito de orientar a população sobre os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença.

Conforme Roy e Saikia (2016), o câncer foi uma das doenças mais temidas do século XX e apresenta incidência crescente no século XXI. A projeção é de 24 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes até o ano de 2030, em todo o mundo (IARC, 2020). A partir da quarta década de vida, mortalidade é duas vezes maior em mulheres e três vezes maior em homens. A morbidade associada ao câncer está relacionada principalmente à exposição aos fatores de risco que englobam fatores endógenos, como a predisposição genética, e fatores ambientais relacionados ao estilo de vida, incluindo o tabagismo, consumo excessivo de bebidas alcóolicas, dieta desbalanceada, sedentarismo, exposição prolongada à radiação ultravioleta e ionizante, além de infecções e parasitas (LEWANDOWSKA et al., 2019).

No Brasil, dados do último levantamento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer, em 2020, estimaram a ocorrência de 387.980 novos casos para o triênio de 2020-2022. O cálculo global corrigido para o sub-registro, segundo MATHERS et al. (2001), aponta a ocorrência de 685 mil novos casos. O câncer de pele não-melanoma é o mais incidente, com 177 mil novos casos estimados. Dentre os demais tipos, o câncer de próstata é o mais comum entre os homens e o câncer de mama é o de maior incidência entre as mulheres (INCA, 2020).

Localização primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%			Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

FIGURA 1 - Tipos de câncer com maior incidência entre 2020-2022: distribuição dos tipos de câncer mais incidentes estimados para o triênio 2020-2022, no Brasil, por gênero. Com exceção do câncer de pele não-melanoma (FONTE: Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2020).

Atualmente, o câncer é a segunda principal causa de morte no país, atrás apenas dos óbitos relacionados a doenças cardiovasculares. A distribuição da incidência varia de acordo com a região geográfica: a região Sudeste concentra mais

de 60% dos casos, seguida pelas Regiões Nordeste (27,8%) e Sul (23,4%). Existe também grande variação nos tipos de câncer entre as diferentes regiões do país. Nas regiões Sul e Sudeste, o padrão da incidência mostra a predominância dos cânceres de próstata e mama feminina, bem como o de pulmão e de intestino. A região Centro-Oeste incorpora em seu perfil o câncer do colo do útero e o de estômago entre os mais incidentes. Nas regiões Norte e Nordeste, a incidência de câncer de colo de útero e de estômago tem impacto importante, apesar de também apresentarem os cânceres de próstata e mama feminina como principais nessa população. A região Norte é a única do país onde as taxas de câncer de mama e colo do útero se equivalem entre as mulheres (INCA, 2020).

1.2 PROGRESSÃO TUMORAL E METÁSTASE

Em 2000, Hanahan e Weinberg publicaram o influente artigo “*The hallmarks of Cancer*”, no qual a complexa biologia tumoral foi sumarizada em seis principais características: 1) autossuficiência em sinais de crescimento; 2) insensibilidade a sinais antiproliferativos; 3) capacidade de evasão da apoptose; 4) potencial replicativo ilimitado; 5) angiogênese sustentada e 6) potencial invasivo e metastático. De acordo com Fouad e Aanei (2017), o surgimento do câncer é um processo dinâmico, dependente de alterações genéticas e/ou epigenéticas e da interação das células transformadas com o tecido no qual estão inseridas. A carcinogênese pode se iniciar ou terminar durante o tempo de vida de uma célula e as características (*hallmarks*) podem emergir ao longo dessa jornada.

Nos tecidos, as células são cercadas pela matriz extracelular e por células estromais – estes componentes celulares e não celulares, juntamente com as células tumorais, compõem o microambiente tumoral. A interação entre células e moléculas da matriz extracelular ocorre por intermédio de receptores e é necessária para a adesão e sinalização celular, regulando processos como a proliferação, diferenciação, migração e apoptose (WINKLER et al. 2020), logo, desempenha papel crítico também na progressão tumoral (WANG et al., 2017). Assim sendo, as características inerentes das células tumorais não existem isoladamente, mas subsistem em um rico microambiente, integrado por fibroblastos, células endoteliais, pericitos, células imunitárias e moléculas da matriz extracelular (PIETRAS e OSTMAN, 2010).

O primeiro passo na progressão tumoral é a invasão do estroma local e do parênquima de tecidos vizinhos (DONGRE e WEINBERG, 2019). À medida que as células tumorais se proliferam, o microambiente tumoral co-evolui para um estado ativo, por meio de sinalização parácrina dinâmica e bilateral, entre células e estroma; um dos efeitos dessa sinalização é a diferenciação dos fibroblastos estromais em fibroblastos associados ao câncer (do inglês – *Cancer associated fibroblasts* ou CAFs). A tumorigênese, a invasão de tecidos subjacentes e o processo de metástase dependem de modificações químicas e físicas na estrutura da matriz extracelular que são resultados de diferentes mecanismos de remodelação, incluindo alterações na deposição e composição dos componentes da matriz, secretados principalmente pelos CAFs. Células tumorais, CAFs e células imunitárias presentes no microambiente tumoral secretam proteases específicas, denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs), capazes de degradar componentes da matriz extracelular. A degradação proteolítica da matriz pode ter ação pró-tumorigênica: a ação das proteases degrada a matriz tecidual normal, a qual é gradualmente substituída por matriz tumoral, além de facilitar a mobilidade celular e liberar fatores de crescimento antes ligados às moléculas da matriz. Os fatores de crescimento, por sua vez, estimulam ainda mais o crescimento e proliferação tumoral. Todas essas modificações têm como objetivo criar uma matriz de suporte para a progressão tumoral que ativamente contribua para a patologia da doença (WINKLER et al. 2020).

A “cascata de invasão e metástase”, descrita por Dongre e Weinberg (2019), representada na Figura 2, descreve o comportamento das células que saem do local primário do tumor e, por fim, formam colônias metastáticas em tecidos à distância. Segundo esses autores, após a invasão do estroma adjacente, o processo seguinte corresponde ao intravasamento de células tumorais pelos vasos sanguíneos próximos ao tumor e sua disseminação pela circulação. As células capazes de sobreviver ao estresse circulatório podem extravasar para o parênquima de outros tecidos e, gradualmente, recrutar células e moléculas da matriz extracelular deste novo tecido, formando colônias metastáticas. A colonização de tecidos à distância do local de origem do tumor representa o último passo da progressão tumoral e está associado a mais de 90% da mortalidade associada ao câncer.

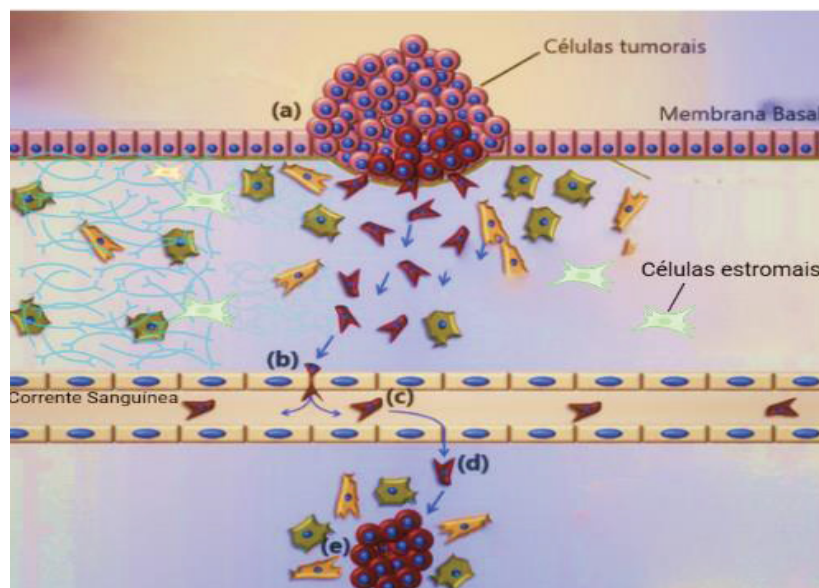


FIGURA 2 – Cascata de invasão e metástase. (a) A proliferação celular no nicho tumoral primário modifica a matriz extracelular, principalmente pela liberação de metaloproteinases. Essas células rompem a membrana basal e invadem tecidos ao redor do local de origem, com o recrutamento de células estromais. A movimentação das células tumorais é favorecida, (b) ocorre o intravasamento pelos vasos sanguíneos circundantes e (c) as células passam para a corrente sanguínea. Aquelas que são capazes de sobreviver ao estresse circulatório podem extravasar para tecidos à distância do tumor primário (d) e formar colônias metastáticas que compõem um novo microambiente tumoral (e) (FONTE: adaptado de Winker et al. 2020).

1.3 FISIOPATOLOGIA DO MELANOMA

Dentre os cânceres que acometem a pele, o melanoma é o que apresenta menor incidência, porém, gera preocupação devido a seu elevado potencial metastático. A mortalidade relacionada ao melanoma cutâneo chega a 65% (PAVRI et al., 2016). Nos últimos anos, ao mesmo tempo em que a incidência de diversos tipos de tumores está decaindo, a ocorrência de melanoma está aumentando com mais intensidade que qualquer outro tumor sólido (RASTRELLI et al., 2014).

O melanoma cutâneo é o tumor resultante da transformação maligna e proliferação descontrolada de melanócitos, presentes no estrato basal da epiderme. Os melanócitos são células derivadas da crista neural, responsáveis pela produção de dois tipos de pigmentos: a eumelanina e a feomelanina (WAGSTAFF et al. 2022). Os queratinócitos, também presentes no estrato basal, produzem o hormônio estimulante de melanócitos (MSH) que induz à proliferação dos melanócitos e a liberação de melanina (LEONARDI et al., 2018). Após a melanogênese, a melanina é

transportada para os queratinócitos por organelas especializadas denominadas melanossomos. Os melanossomos são estrategicamente distribuídos para os queratinócitos com maior exposição aos raios ultravioletas (UV), onde a melanina desempenha papel protetivo pela absorção da luz e prevenção de possíveis danos ao DNA, atuando como escudo contra a radiação UV (WAGSTAFF et al. 2022).

O surgimento e progressão do melanoma está representada na figura 3: os nevos são neoplasias melanocíticas benignas, enquanto os nevos displásicos ou atípicos são considerados lesões precursoras de melanoma cutâneo (REZZE; LEON; DUPRAT, 2010).

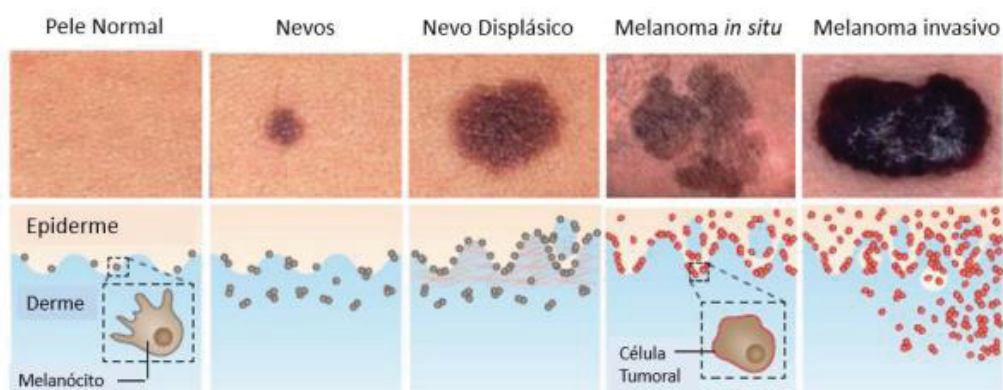


FIGURA 3 – Surgimento e progressão do melanoma. Imagens clínicas e representações das etapas de transformação da célula normal em um tumor invasivo (FONTE: Franco, Y. L., 2022/ adaptado de Shain e Bastian, 2016).

A transformação maligna dos melanócitos pode ocorrer de duas maneiras: por influência direta dos raios UV, principalmente os de espectro UV-A, capazes de lesar o DNA e induzir mutações em proto-oncogenes e/ou genes supressores tumorais; ou predisposição genética, relacionada com a formação de nevos benignos que, em mais de 80% dos casos, abrigam mutações no gene BRAF, responsável pela expressão da proteína B-Raf, componente da via de sinalização ativada por mitógeno (MAPK), superativa em diversos tipos de câncer. Esses nevos permanecem latentes graças à vigilância imunológica; no entanto, os raios UV podem determinar o aparecimento de mutações genéticas adicionais, modular a resposta imune, aumentar a produção de fatores de crescimento e levar à transformação maligna dos nevos (LEONARDI et al., 2018).

De acordo com Wagstaff e colaboradores (2022), apesar dos raios UV serem capazes de induzir à malignização de melanócitos, apenas uma pequena parcela dos

melanomas está relacionado à exposição à radiação ultravioleta. Clinicamente, existem quatro subdivisões do melanoma: melanoma extensivo superficial, o tipo mais comum; melanoma nodular, o subtipo mais agressivo; melanoma lentigo, o principal em pacientes idosos; e melanoma lentiginoso acral, a forma mais rara da doença e o único subtipo não associado à exposição solar (SCHADENDORF et al., 2018). Dentre os fatores de risco apontados por Wagstaff e colaboradores (2022), estão a presença de sardas, nevos e o histórico familiar da doença. A pele clara também é um fator de risco dado que menos melanina é produzida pelos melanócitos, reduzindo a proteção contra danos causados pelos raios UV.

1.4 TRATAMENTOS E PRODUTOS NATURAIS

Nos últimos 20 anos, o crescente conhecimento acerca da biologia molecular e tumoral mudou notavelmente os paradigmas do tratamento do câncer – antigamente, o câncer era classificado e tratado apenas de acordo com os órgãos de origem e suas características histomorfológicas, aplicando-se uma grande gama de agentes citotóxicos sem alvo molecular específico (ZUGAZAGOITIA et al., 2016). Essa falta de especificidade para células tumorais está associada aos efeitos colaterais observados durante o tratamento quimioterápico, capaz de afetar células normais de rápida proliferação, como as células epiteliais, sanguíneas, células da medula óssea, trato gastrointestinal e rins (SCHIRRMACHER, 2019). A quimioterapia é o protocolo de tratamento mais utilizado e, apesar de apresentar bons resultados quanto ao controle da proliferação das células tumorais, sua falta de especificidade está associada a inúmeros efeitos colaterais como alopecia, sonolência, vômito, parestesia, espasmos, imunossupressão, ataxia e infertilidade (CONDORELLI, 2018), além de possível resistência medicamentosa durante o decorrer do tratamento (ZUGAZAGOITIA et al., 2016). A Doxorubicina (DOX) é uma antraciclina, incorporada aos regimes quimioterápicos em meados dos anos 1970 e até os dias atuais é amplamente utilizada para o tratamento de diversos tipos de tumores. Apesar da sua eficácia antitumoral, a falta de especificidade da DOX a torna altamente danosa para as células normais mesmo em baixas concentrações, sendo a cardiotoxicidade o principal efeito colateral relacionado a este medicamento (AL-MALKY; AL HARTHI; OSMAN, 2020). Um estudo publicado em 1987 por Spittle já destacava a necessidade

de controlar os efeitos adversos da quimioterapia, objetivando melhora na qualidade de vida do paciente em tratamento.

Outras opções de tratamento incluem a cirurgia excisional, radioterapia, terapia hormonal e imunoterapia, a depender do tipo, localização e estágio de desenvolvimento da doença. Em alguns casos, o plano de tratamento engloba mais de um método, a fim de se obter o máximo de eficiência no controle das células doentes (WANG et al., 2018).

Conforme Onitilo & Wittig (2020), melanoma diagnosticado em estágio avançado ou metastático apresenta prognóstico ruim quando tratado com quimioterápicos tradicionais, sendo o tempo de sobrevida de apenas seis a oito meses para estes pacientes. Uma possível alternativa de tratamento para estes quadros é a imunoterapia. Uma das funções do sistema imunológico é monitorar e destruir células que apresentem proliferação aberrante e isto é possível graças a mecanismos que garantem a ativação e inativação adequadas das células imunitárias. As células imunitárias presentes no microambiente tumoral podem atuar de maneira dual, suprimindo ou favorecendo o desenvolvimento do tumor (LAZAROFF; BOLOTIN, 2022). O melanoma é conhecido como uma malignidade “altamente imunogênica” (PASSARELLI, et al., 2017), o que o torna alvo em potencial para a imunoterapia, que atua bloqueando as interações celulares que atenuam a resposta imunológica do hospedeiro e favorecem o crescimento das células tumorais. Apesar dos bons resultados obtidos, diversos pacientes apresentam resistência primária ou desenvolvem resistência ao tratamento após período inicial de resposta. Além disso, a imunoterapia, bem como a quimioterapia, está relacionada ao desenvolvimento de diversos efeitos colaterais, como psoríase, lúpus eritematoso, vitiligo, enterocolite, hepatite, entre outros (LAZAROFF; BOLOTIN, 2022).

A gravidade dos efeitos colaterais dos tratamentos contra o câncer vem mudando o foco de diversas pesquisas com a intenção de encontrar substâncias antitumorais alternativas, cujos efeitos colaterais sejam mínimos ou inexistentes (WEELDEN et al., 2019).

Produtos naturais e seus derivados são fontes de matéria-prima para aproximadamente 60% dos agentes quimioterápicos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), incluindo a Vincristina e Vinblastina (CARVALHO et al., 2019); estes produtos são provenientes de alcaloides de *Catharanthus roseus*, popularmente conhecida como vinca (MARTINO et al., 2018). A utilização de plantas como fontes

medicinais é uma prática milenar, presente na cultura de povos nativos de todas as partes do globo e passada de geração para geração. A partir dessas plantas são feitos chás, gargarejos e garrafadas, costumes corriqueiros até os dias de hoje. Atualmente, além da aplicação empírica, essas plantas vêm sendo fontes de pesquisas e utilizadas como matéria-prima para o desenvolvimento de fármacos (SILVA, 2020). As principais vantagens da utilização de produtos naturais comparados aos sintéticos incluem: menor gasto de desenvolvimento, acessibilidade ampliada e potencial redução de possíveis efeitos colaterais (WEELDEN et al., 2019). A revisão publicada por Sun e colaboradores em 2019 apontou as principais vias de sinalização moduladas por produtos derivados de plantas em células tumorais. Dentre as substâncias naturais destacam-se os polifenóis, alcaloides, saponinas e polissacarídeos, capazes de influenciar vias relacionadas com a morte celular por apoptose, mecanismos de proliferação, invasão e metástase. Os autores ainda apontam que as pesquisas mais atuais relacionadas à determinação da estrutura dos compostos naturais desempenham papel crítico no desenvolvimento de medicamentos com maior especificidade para as moléculas-alvo, o que seria capaz de reduzir os efeitos colaterais relacionados ao tratamento quimioterápico já empregado.

1.5 ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS PECTINAS

As pectinas são o segundo tipo de polissacarídeos mais abundantes na parede celular de plantas terrestres. São importantes fontes de fibras dietéticas, amplamente utilizadas na indústria como ingrediente funcional de alimentos processados e como agente geleificante e estabilizante (MAXWELL et al., 2012). A variada gama de possibilidades de utilização das pectinas se deve à sua estrutura dinâmica: é um polissacarídeo aniônico, composto por resíduos de ácido galacturônico (GalA) ligados a uma variedade de monossacarídeos neutros, como ramnose, arabinose e galactose (AMARAL et al., 2019). Dessa maneira, pode-se dizer que as pectinas são cadeias irregulares de carboidratos: o esqueleto (“core” ou “backbone”) é formado por ácido galacturônico, contendo uma porção insolúvel, acompanhada de galactanas, arabinanas e arabinogalactanas do tipo I e II. A macromolécula inclui homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I e II (RG-I e RG-II) e xylogalacturonana (XG), sendo a HG o principal componente da cadeia linear e RG-I, o principal constituinte das ramificações (Figura 3). As ramificações são

caracterizadas por ampla variedade estrutural, determinada pelos resíduos de monossacarídeos das cadeias laterais citados acima e o tipo de ligação presente entre eles (ZAITSEVA et al., 2020).

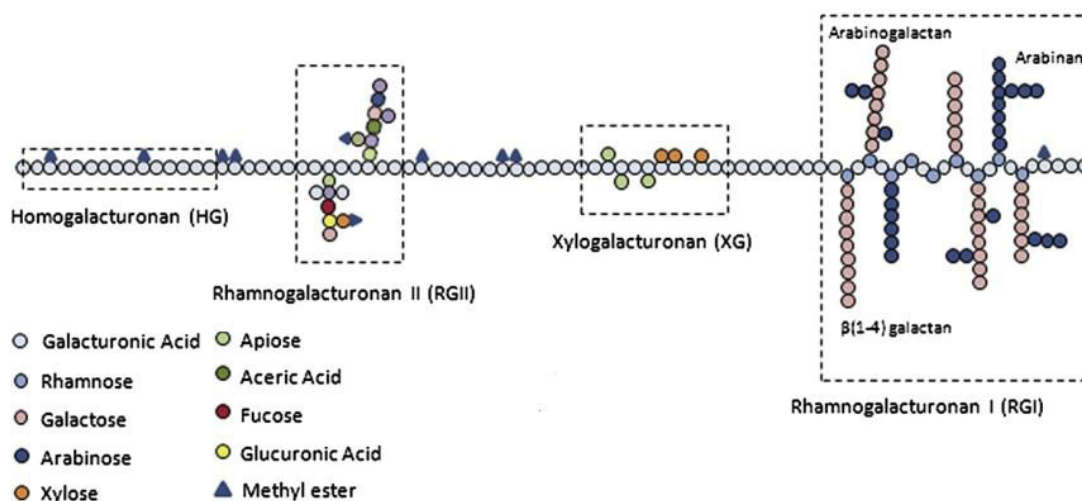


FIGURA 4 – Representação de estruturas possíveis das pectinas (FONTE: MAXWELL et al., 2012).

Em estudo desenvolvido por Guo e colaboradores (2022), diversos polissacarídeos naturais, isolados de diferentes fontes como cogumelos, algas e plantas demonstraram potencial antioxidante e antitumoral sem a manifestação de efeitos colaterais. No decorrer da última década, mais de cem polissacarídeos vêm sendo investigados *in vitro* e *in vivo*, exibindo potencial antitumoral contra diversas linhagens celulares. A atividade imunomodulatória também foi evidenciada e possui relevância significativa não apenas pela melhora na defesa do corpo contra células tumorais, mas também por possibilitar a utilização de polissacarídeos em conjunto com agentes quimioterápicos convencionais, diminuindo a imunossupressão causada pelos fármacos (KHAN et al., 2019).

Na revisão realizada por Yue e colaboradores (2022), são retratadas inúmeras pesquisas que demonstraram o potencial antitumoral de pectinas e a relação entre o efeito observado e as características estruturais dos polissacarídeos testados. De acordo com os autores, as fontes vegetais de origem e os métodos de extração propiciam uma farta variedade de estruturas químicas, que se diferenciam de acordo com a composição monossacarídica, ligações glicosídicas e grau de metilação e acetilação, que refletem seus efeitos biológicos.

Diversas evidências apontam que a atividade antitumoral das pectinas está relacionada com a ligação ou inibição da Galectina 3 (Gal-3) (YUE et al., 2022). Gal-3 é uma proteína da família das lectinas associada a processos de adesão, proliferação, diferenciação, angiogênese e metástase em diversos tumores, incluindo o melanoma (BROWN et al., 2012). Ainda de acordo com Yue e colaboradores (2022), as possíveis ações inibitórias das pectinas sobre a Gal-3 estão relacionadas, dentre outros, com o conteúdo de ácido galacturônico. A pectina em estudo foi isolada por Schneider, Iacomini & Cordeiro (2019), indicando a presença de polissacarídeos ricos em arabinana, cadeias de HG com alto grau de metilesterificação (90%) e unidades β -L-Araf, cuja ocorrência é escassa na literatura.

1.5.1 *Campomanesia*

O gênero *Campomanesia*, pertencente à família Myrtaceae, possui aproximadamente 30 espécies, 24 delas encontradas no Brasil (Figura 4). As espécies *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens*, também conhecidas como guavira ou guabiroba-do-campo, são amplamente encontradas no cerrado brasileiro, tendo como principais locais de cultivo as cidades de Aquidauana, Bonito, Campo Grande, Dourados e Ponta Porã. A polpa da guavira é bastante valorizada na indústria alimentícia, sendo utilizada para a produção de sucos e geléias. Apesar da casca, restos de polpa, pedúnculo e sementes serem considerados lixo agroindustrial, uma fração deste resíduo contendo polissacarídeos apresentou importante efeito antioxidante (SCHNEIDER et al., 2019).



FIGURA 5 – *Campomanesia* (FONTE: Flora do Brasil, 2022).

A maior parte dos estudos envolvendo *C. adamantium* e *C. pubescens* testaram os efeitos biológicos de extratos obtidos com diferentes solventes e os compostos fenólicos neles encontrados, mas não de polissacarídeos isolados da planta. Os estudos descritos a seguir mostram isso. Espécies pertencentes ao gênero *Campomanesia* geram extratos com atividade antiinflamatória, antidiarreica, antisséptica e antioxidante, atribuídas, principalmente, à presença de compostos fenólicos, flavonoides, chalconas e carotenoides (MARTELLO et al., 2016), além de presença de conteúdo mineral, fibras alimentares e substâncias bioativas, como a vitamina C, importante micronutriente envolvido em diversas funções biológicas dos organismos. Os flavonoides são compostos fenólicos com capacidade de eliminação de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica pelas espécies reativas de oxigênio. A presença de flavonoides na dieta humana pode reduzir o risco de desenvolvimento de cânceres e tumores (VISCARDI et al., 2016). Segundo Lima e Silva et al. (2018), o interesse nutricional nos compostos fenólicos se deve à grande contribuição dos fitoquímicos para a saúde humana, exibindo amplo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo atividades quimioprotetoras e quimioterápicas. Em estudo desenvolvido por Cardozo e colaboradores (2018), extratos obtidos das folhas de diferentes espécies de *Campomanesia* apresentaram efeitos benéficos para a saúde, incluindo atividade antiulcerogênica, antiprotozoária, anti-inflamatória, antioxidante e antiproliferativa em modelos animais e ensaios *in vitro*. Estes resultados corroboram a pesquisa realizada por Martello et al. (2016), em que o extrato hidroalcoólico de folhas de *Campomanesia adamantium* diminuiu danos ao DNA e aumentou taxa de apoptose sem se mostrar tóxico às células normais. Lima e Silva et al. (2018), ao avaliarem a capacidade antiproliferativa de extratos da polpa e casca da guavira contra células da linhagem B16F10, observaram, *in vitro*, atividade antitumoral do gênero *Campomanesia* contra a linhagem celular de melanoma.

Quanto aos efeitos das fibras alimentares (polissacarídeos) obtidas de frutos de *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens*, além do estudo publicado por Schneider et al. (2019) mencionado acima, estudo *in vivo*, desenvolvido por Zulin (2019) no Laboratório de Metabolismo Celular da Universidade Federal do Paraná, reportou a capacidade imunomoduladora e antitumoral em ratos portadores de tumor de Walker-256, suplementados com farinha do resíduo do fruto de guavira. Os resultados obtidos neste estudo *in vivo*, juntamente com os efeitos biológicos

observados por Schneider et al. (2019), nos impulsionaram a investigar se polissacarídeos obtidos do resíduo agroindustrial (farinha do bagaço) de *C. adamantium* e *C. pubescens* apresentam efeito antitumoral e quais mecanismos estariam envolvidos nas possíveis respostas celulares.

1.6) JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das principais causas de morte e se enquadra como um problema de saúde pública em todo o mundo. Apesar dos esforços observados acerca do desenvolvimento de fármacos que possibilitem a cura e o aumento da taxa de sobrevivência de pacientes acometidos, os tratamentos hoje existentes são custosos e causam diversos efeitos colaterais que impactam significativamente a qualidade de vida dos portadores da doença. Ainda, a exposição prolongada aos quimioterápicos convencionais pode levar à resistência medicamentosa e estes perdem o potencial terapêutico. Frente a isso, grande mobilização do meio científico vem ocorrendo com a finalidade de se obterem substâncias eficazes, acessíveis e com menor citotoxicidade contra as células normais. Neste quadro, encontram-se as pesquisas envolvendo produtos oriundos de fontes naturais.

Nos últimos anos, a relação direta entre o consumo de fibras alimentares e diversos benefícios à saúde evidenciou a importância das pectinas nos campos preventivo e terapêutico, e estas macromoléculas ascenderam no rol de substâncias investigadas. A diversidade da flora brasileira e o fato de que grande quantidade de plantas nativas ainda não foi investigada aumentam as possibilidades destas pesquisas. O cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, considerado a savana mais rica em diversidade do mundo (ICMBIO, 2021). No presente estudo, além da utilização de uma planta nativa do cerrado, foram testados polissacarídeos provenientes de restos agroindustriais compostos por porções da fruta, como casca, restos de polpa, pedúnculo e sementes, que são normalmente descartados, gerando toneladas de resíduos por ano.

Sabe-se também que frutas são ricas fontes de pectinas que apresentam diversas atividades biológicas descritas na literatura, como atividade antitumoral. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade de pectinas provenientes da farinha do bagaço (resíduo agroindustrial) de frutos de

Campomanesia adamantium e *Campomanesia pubescens* sobre o modelo experimental de células de melanoma murino.

2 OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o efeito antitumoral de polissacarídeos solúveis obtidos da farinha de bagaço de guavira sobre células de melanoma murino B16F10.

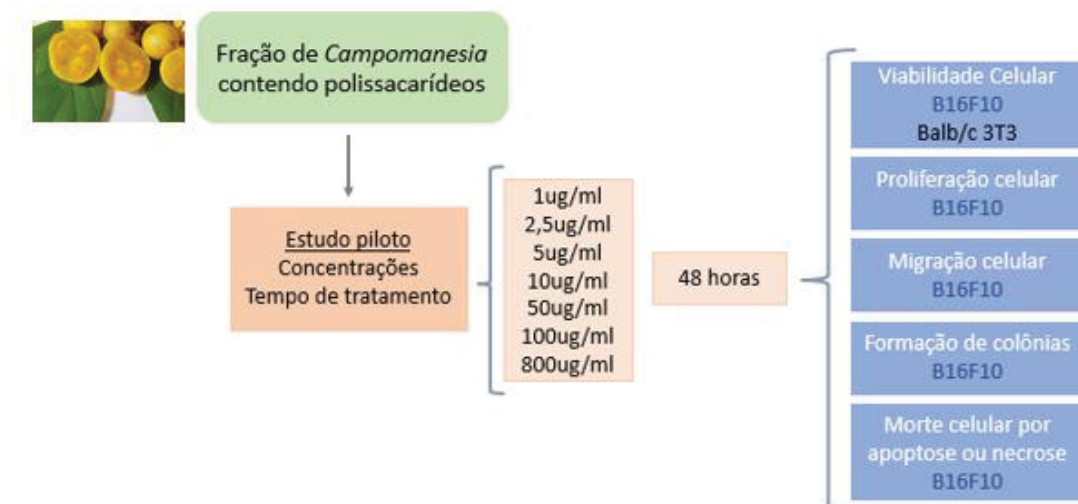
2.2) Objetivos específicos

Na presença da fração polissacarídica, avaliar as células tumorais quanto à (ao):

- Viabilidade;
- Potencial proliferativo;
- Capacidade de migração;
- Capacidade de formação de colônias;
- Percentual de células mortas por apoptose ou necrose.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1) Desenho experimental



No presente estudo, estiveram sob investigação os polissacarídeos solúveis provenientes da farinha do bagaço de guavira, constituída por restos de casca, polpa, pedúnculo e sementes das espécies *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens*. A farinha foi fornecida ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná por pesquisadores da Universidade de Campinas (UNICAMP). A fração CPW (*Campomanesia water extraction*) obtida é constituída por pectinas, mais especificamente por homogalacturonana altamente metilesterificada, arabinana com unidades de β -L-Arabinofuranose, e arabinogalactana (Schneider *et al.*, 2019).

As concentrações inicialmente avaliadas foram de 0; 1; 2,5; 5; 10; 50; 100 e 800 $\mu\text{g/ml}$, sobre as linhagens celulares B16F10 (melanoma murino) e Balb/c 3T3 (fibroblastos normais murinos). Estudo piloto foi inicialmente desenvolvido para determinar o tempo de tratamento e as concentrações que seriam avaliadas nos demais ensaios. Após avaliação dos resultados obtidos, o tempo estipulado para exposição das células ao tratamento foi definido em 48 horas e todas as concentrações primeiramente avaliadas foram mantidas para o ensaio de viabilidade celular. Os ensaios de proliferação, migração, formação de colônias e morte por apoptose ou necrose decorreram com a utilização das concentrações de 5 e 100 $\mu\text{g/ml}$.

Para avaliação da citotoxicidade das frações em suas variadas concentrações, as mesmas análises de viabilidade celular foram aplicadas em modelo

de células normais (células Balb/c 3T3 – fibroblastos murinos) e, com o objetivo de avaliar os resultados de viabilidade com substâncias já descritas na literatura, o quimioterápico Doxorubicina foi empregado como controle positivo para o primeiro ensaio.

3.2) Cultivo celular e tratamento com os polissacarídeos

Foram empregadas duas linhagens celulares para o desenvolvimento deste trabalho: a linhagem B16F10 – melanoma murino; e Balb/c 3T3 – fibroblastos normais murinos), ambas advindas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio de cultura líquido do tipo RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativo e estéril (LaborClin) e 1% antibiótico (Penicilina e Streptomicina 10.000 U/ml - Gibco) . As células foram incubadas para fixação durante 24 horas, em estufa com controle de temperatura (37°C), umidade (95%) e CO₂ (5%). Para os posteriores ensaios, as células foram desaderidas da placa inicial através da ação enzimática de Tripsina 0,25% (Gibco), durante cinco minutos. As células foram cultivadas na densidade requerida para cada ensaio, estipulada pelos protocolos e contadas em Câmara de Neubauer. Decorridas 24 horas da transferência das células para as placas dos ensaios, o tratamento com a fração polissacarídica foi realizado. Os polissacarídeos foram cedidos pela professora Lucimara Mach Côrtes Cordeiro, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. A fração CPW foi diluída em RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico, a fim de se obter as concentrações utilizadas nesta pesquisa.

3.3) Estudo piloto

O tempo de tratamento e as concentrações foram definidos levando em consideração os dados obtidos nos ensaios iniciais de viabilidade celular com *Neutral red* (descrito abaixo). Foram selecionadas cinco concentrações, sendo elas 0, 1, 2.5, 5, 10, 50, 100 e 800 µg/ml, tratadas durante três tempos diferentes: 24, 48 e 72h. Células B16F10 e Balb/c 3T3 foram submetidas ao ensaio. Todas as oito concentrações iniciais foram empregadas no segundo ensaio de viabilidade (método de *Alamar Blue*®) para confirmação dos resultados do estudo piloto com *Neutral red*.

A melhor reprodutibilidade dos resultados em ambos os ensaios de viabilidade foi obtida no tempo de tratamento de 48 horas.

3.4) Viabilidade celular

Os ensaios colorimétricos de Vermelho neutro (*Neutral red*) e *Alamar blue*® foram realizados para avaliação da viabilidade celular. As células das linhagens B16F10 e Balb/c 3T3 foram cultivadas em placas de 96 poços, respeitando a densidade ideal para cada linhagem (5×10^2 células/poço para a linhagem B16F10, e 2×10^3 células/poço para a linhagem Balb/c 3T3). Após incubação de 24 horas para fixação celular, os poços foram separados em grupo controle (não tratados) e tratados com a fração polissacarídica nas concentrações de 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 800 µg/ml. Para avaliação da viabilidade celular, foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina (DOX) como controle positivo, considerando que existem diversos dados na literatura sobre sua citotoxicidade. A Doxorrubicina foi utilizada nas concentrações de 1 µg/ml e 2,5 µg/ml. As análises foram procedidas 48h após o tratamento.

3.4.1) Vermelho neutro

O ensaio com Vermelho neutro (*3-amino-7-dimethyl-amino-2-methylphenazine hydrochloride*) é baseado na capacidade de células viáveis de incorporar o corante *neutral red* (NR) nos lisossomos. O ensaio seguiu o método proposto por Repetto et al (2008). Os poços foram aspirados para retirada de todo meio de cultura com os tratamentos, seguido de adição da solução de NR 0,04 mg/ml centrifugada, sem adição de SFB. As células em solução foram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, os poços foram novamente aspirados e receberam a solução de extração contendo etanol/ácido acético 50%/1%. As placas foram agitadas em agitador de placas por 10 minutos e em seguida a absorbância foi avaliada a 540 nm (endpoint) em equipamento TECAN Infinite M200.

3.4.2) *Alamar blue*®

O reagente de vitalidade celular *Alamar blue*® (*Invitrogen*™) consiste em uma solução pronta para uso à base de resazurina. A resazurina é um reagente de cor azul que é reduzido em resorufina nas mitocôndrias de células vivas. A resorufina, por sua

vez, apresenta cor vermelha altamente fluorescente, permitindo a quantificação de mudanças na viabilidade tanto por absorbância quanto por fluorescência. Para este ensaio, foi seguido o protocolo proposto por Kumar; Nagarajan; Uchil (2018). As células das linhagens B16F10 e Balb/c 3T3 foram cultivadas em placas escuras de 96 poços, respeitando a densidade ideal para cada linhagem (5×10^2 células/poço para a linhagem B16F10, e 2×10^3 células/poço para a linhagem Balb/c 3T3). Após o tempo de tratamento, os poços foram aspirados para completa remoção do meio contendo os polissacarídeos. Foram adicionados 180 µl de meio de cultura sem soro fetal bovino à cada poço contendo as células, seguido de 20 µl da solução de *Alamar blue*®. Neste momento, foi adicionado um grupo controle contendo apenas a solução de *Alamar blue*®. As células foram incubadas pelo período de 3 horas em estufa com temperatura, umidade e CO₂ controlados. Após o tempo de incubação, a fluorescência de cada poço foi avaliada no equipamento TECAN Infinite M200, com comprimento de onda de excitação de 560 nm e de emissão de 590 nm. Os resultados foram obtidos pela subtração da fluorescência dos poços com células do poço controle, contendo apenas *Alamar blue*®.

3.5) Proliferação celular

A ensaio de Cristal Violeta (CV) seguiu o protocolo proposto por Bonnekoh et al. (1989), no qual as células aderidas ao fundo da placa são fixadas e posteriormente coradas pelo corante cristal violeta, capaz de se acumular no núcleo e interagir com o DNA nuclear e proteínas. No momento da análise os poços foram aspirados para retirada de todo meio de cultura e tratamentos, e lavados duas vezes com PBS (Phosphate-buffered saline). As células foram fixadas em solução PFA (Paraformaldeído) 4% durante 10 minutos. Após a retirada do agente fixador, as células foram permeabilizadas em Metanol 2% por 10 minutos e então coradas com indicador metabólico Cristal Violeta (Merck® K91423040033). O corante foi eluído das células por solução de citrato de sódio. A leitura da absorbância foi avaliada após 24, 48 e 72h de tratamento, a 590 nm (endpoint) em equipamento TECAN Infinite M200.

3.6) Análise de migração celular

O ensaio de migração celular ou “scratch” seguiu uma adaptação do proposto por Liang, Park e Guan (2007). Este método é baseado na observação de que, após a criação de uma “lacuna” em uma monocamada de células, as células da borda se

moverão em direção à abertura, preenchendo a lacuna, até que novos contatos célula-célula sejam estabelecidos. Foram realizados dois plaqueamentos: o primeiro em placa de 24 poços, onde as células foram tratadas com a fração de polissacarídeo durante 48 horas. Após o tempo decorrido, as células foram desaderidas com o auxílio de Tripsina 0,25% e novamente cultivadas, agora em placa de 96 poços, na densidade de 2×10^3 células por poço. Neste momento, o meio de cultura utilizado continha 10% de soro fetal bovino (SFB) e as células permaneceram nesta solução durante 4 horas. O meio de cultura contendo 10% SFB foi descartado e novo meio, agora com 0,1% de SFB foi adicionado, para que a proliferação celular estimulada pela concentração de soro fetal bovino não interferisse na análise de migração das células. A placa foi incubada durante 24 horas. Após isso, a monocamada celular foi riscada, formando uma lacuna ou *scratch* (“ferida”, da tradução literal) com o auxílio de ponta de pipeta de 10 μ l. O meio de cultura foi descartado, os poços lavados duas vezes com PBS para a retirada de células soltas e foram adicionados 200 μ l de meio de cultura contendo 0,1% de SFB a cada poço. Os poços foram fotografados para registro do tempo zero. Após este processo, as células foram novamente fotografadas nos períodos de 12, 24 e 48 horas após a criação da lacuna. A distância das bordas foi avaliada por meio do software ImageJ, sendo a capacidade migratória relativa determinada pelo cálculo da porcentagem de área ocupada pelas células nos diferentes tempos.

3.7) Ensaio de formação de colônias

O ensaio seguiu adaptação do proposto por Yang (2012). Este ensaio possibilita a avaliação da capacidade de formação de colônias, partindo de pequena quantidade de células. Foram realizados dois plaqueamentos para a execução do ensaio; no primeiro, a linhagem B16F10 foi cultivada em placa de 24 poços na densidade de 2×10^3 células/poço. O tratamento com o polissacarídeo foi feito e as células, incubadas em estufa pelo período de 48 horas. As células que sobreviveram ao tratamento foram desaderidas com o auxílio de Tripsina 0,25% e novamente cultivadas em placa de 24 poços, adicionando uma baixa densidade de células em cada poço (1×10^2 células/poço). As células foram incubadas em estufa pelo período de 96 horas. Após o período de adesão, os poços foram aspirados para retirada de todo meio de cultura e lavados com água ultrapura. As células foram fixadas em solução PFA 4% durante 20 minutos. Após a retirada do agente fixador, as células

foram coradas pela adição do indicador metabólico Cristal Violeta (Merck® K91423040033) e incubadas por 20 minutos. O corante foi descartado e os poços lavados com água ultrapura e, então, fotografados com auxílio de lupa. As imagens obtidas foram submetidas à contagem de colônias no software ImageJ.

3.8) Percentual de células necróticas ou apoptóticas

A verificação da proporção de células apoptóticas ou necróticas foi feita seguindo o protocolo estabelecido por Koopman et al. (1994), avaliadas nos tempos de 48 após o tratamento com a fração polissacarídica, a partir do kit Elabscience® Annexin V-FITC/PI. Após o período de incubação, as soluções de células passaram por centrifugação a 1600 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células, ressuspensas em PBS. A solução passou por nova centrifugação com mesma intensidade e duração; o sobrenadante foi novamente descartado e as células, ressuspensas em tampão de ligação diluído em água deionizada na proporção de 1:10. Em seguida, a suspensão de células foi marcada com os reagentes Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI). A Anexina V é capaz de se ligar ao fosfolípideo de membrana fosfatidilserina (PS), translocado do folheto interno para a porção externa da membrana durante os estágios iniciais do processo de apoptose, evento conhecido como “*flip-flop*”. Já o PI é capaz de se intercalar em DNA, desde que a membrana celular (MP) tenha perdido a integridade. Devido a sua elevada massa molecular, não é capaz de atravessar a bicamada lipídica íntegra. Células cujas membranas perderam a integridade, como ocorre nos processos de necrose e durante a apoptose tardia, são capazes de incorporar o PI. Desta maneira, condicionar as células simultaneamente com Anexina V-FITC e com PI permite a discriminação de células intactas (FITC - PI -), no início da apoptose (FITC + PI -) ou em estágio final de apoptose (FITC + PI +). A suspensão de células permaneceu em repouso ao abrigo da luz por 10 minutos e a fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo FACSCalibur (lasers: 488 e 633 nm), no Laboratório de Imunologia Clínica do departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

3.9) Análise estatística

Os dados foram obtidos por meio de três experimentos independentes, realizados em triplicata. Desta forma, cada grupo apresentou N=9 para cada ensaio. A normalidade dos resultados obtidos foi avaliada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*.

Os dados considerados normais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias, seguida por pós-teste de *Tukey*. Foram considerados como significativos os resultados com valores de $p < 0,05$. Os dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, migração e morte por necrose e apoptose foram expressos como percentual em relação ao controle, enquanto os dados obtidos nos ensaios de proliferação e clonogênico foram expressos em valores absolutos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Viabilidade celular – Vermelho neutro e *Alamar blue*®

A análise da viabilidade celular em cultura é de grande importância para a pesquisa biomédica. Durante o desenvolvimento de novas drogas comerciais, a avaliação dos efeitos citotóxicos *in vitro* é imprescindível para quantificar as células que permanecem viáveis após exposição à substância testada, garantindo, desta maneira, segurança para os posteriores ensaios *in vivo*. Para que haja maior confiabilidade nos resultados e estes não sejam super ou subestimados, mais de um método de avaliação da viabilidade celular deve ser empregado, dado que a sensibilidade de cada método pode variar de acordo com a linhagem celular utilizada (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). Atendendo a este requisito, os primeiros ensaios visaram avaliar a viabilidade de células das linhagens B16F10 e Balb/c 3T3 expostas a diferentes concentrações de polissacarídeos provenientes da farinha do bagaço de guavira.

No ensaio de Vermelho neutro, apenas as concentrações mais altas da fração polissacarídica foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade de fibroblastos normais murinos (linhagem Balb/c 3T3) em comparação ao controle (Gráfico 1).

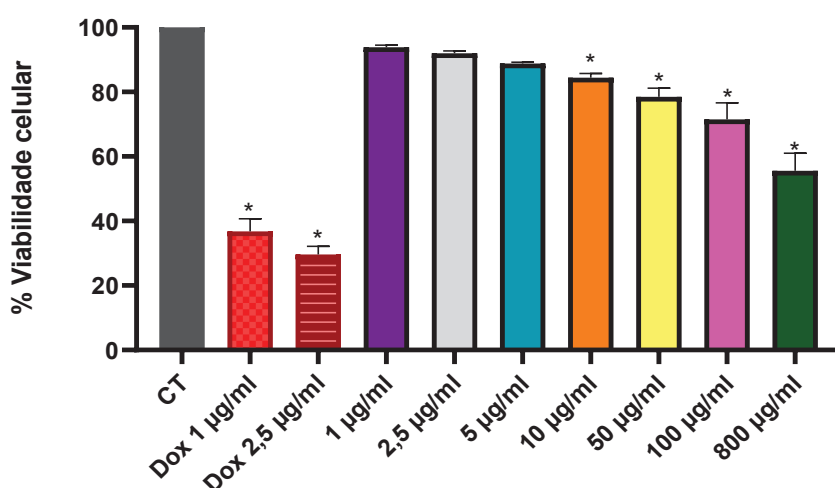


GRÁFICO 1 – Viabilidade celular avaliada pelo método *Neutral red* com a linhagem Balb/c 3T3.

Os dados são apresentados como porcentagem de viabilidade em relação ao controle (CT), $\pm$ SD. As células foram tratadas com solução contendo polissacarídeos de *C. adamantium* e *C. pubescens* nas concentrações de 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 800 µg/ml, ou tratadas

com Doxorrubicina nas concentrações de 1 µg/ml e 2,5 µg/ml, durante 48 horas. Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, realizados em triplicata técnica de cada uma das concentrações, em cada ensaio. Os dados estatísticos foram obtidos por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos por ANOVA *one-way* (* $p \leq 0,05$).

Quarenta e oito horas após o tratamento com 10 µg/ml, 84% das células normais permaneceram viáveis; 78% com a concentração de 50 µg/ml; 72% com a concentração de 100 µg/ml e 56% no tratamento com a concentração de 800 µg/ml. A Doxorrubicina, quimioterápico utilizado como controle positivo, reduziu significativamente a viabilidade celular nas duas concentrações utilizadas: em 1 µg/ml, 43% dos fibroblastos permaneceram viáveis, enquanto perante a concentração de 2,5 µg/ml, apenas 36% das células normais se mantiveram vivas após 48 horas.

No mesmo ensaio, conduzido com células de melanoma murino (linhagem B16F10) (Gráfico 2), todas as concentrações estudadas apresentaram redução significativa na viabilidade celular em relação ao grupo controle:

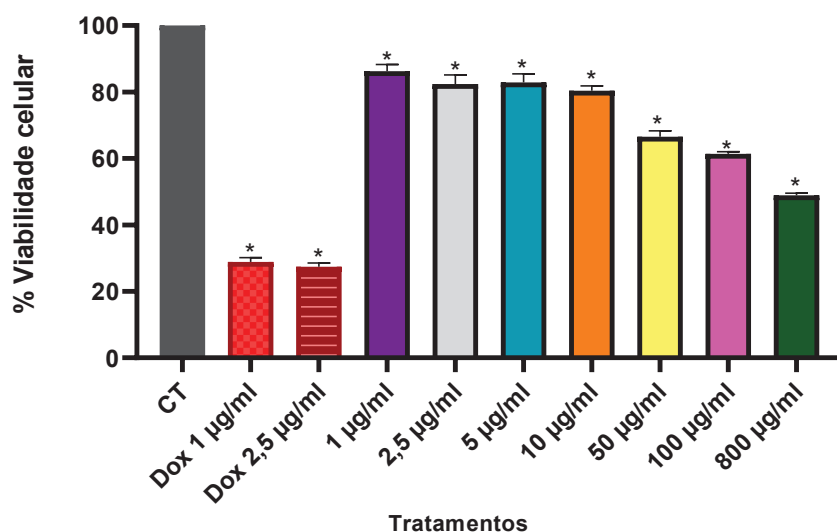


GRÁFICO 2 – Viabilidade celular avaliada pelo método *Neutral red* com a linhagem B16F10. Os dados são apresentados como porcentagem de viabilidade em relação ao controle (CT), $\pm$ SD. As células foram tratadas com solução contendo polissacarídeos de *C. adamantium* e *C. pubescens* nas concentrações de 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 800 µg/ml, ou tratadas com Doxorrubicina nas concentrações de 1 µg/ml e 2,5 µg/ml, durante 48 horas. Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, realizados em triplicata técnica de cada uma das concentrações, em cada ensaio. Os dados estatísticos foram obtidos por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos por ANOVA *one-way* (* $p \leq 0,05$).

O grupo tratado com a concentração de 1 µg/ml apresentou 86% de viabilidade; 82% com 2,5 µg/ml; 83% com 5 µg/ml; 80% com 10 µg/ml; e as diferenças mais ressaltadas nas maiores concentrações: 67% de viabilidade celular na concentração de 50 µg/ml, 61% com 100 µg/ml e 49% com o tratamento de 800 µg/ml. A Doxorubicina, como já relatado, apresenta acentuada toxicidade sobre células tumorais, sendo que 29% permaneceram viáveis após exposição à concentração de 1 µg/ml e 27% na concentração de 2,5 µg/ml.

O *Alamar blue* foi aplicado como segundo ensaio de viabilidade celular. Sobre os fibroblastos murinos normais (Gráfico 3), a fração polissacarídica foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de células viáveis em relação ao controle em todas as concentrações.

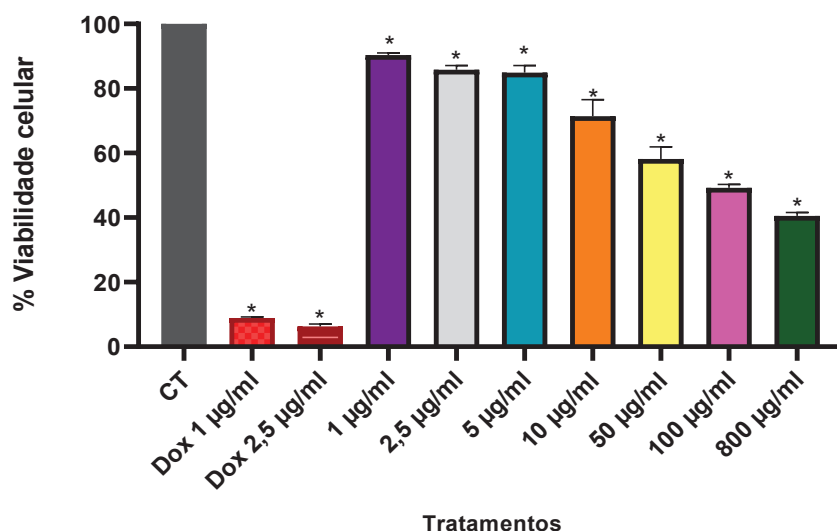


GRÁFICO 3 – Viabilidade celular avaliada pelo método *Alamar blue*® com a linhagem Balb/c 3T3.

Os dados são apresentados como porcentagem de viabilidade em relação ao controle (CT) , ± SD. As células foram tratadas com solução contendo polissacarídeos de *C. adamantium* e *C. pubescens* nas concentrações de 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 800 µg/ml, ou tratadas com Doxorubicina nas concentrações de 1 µg/ml e 2,5 µg/ml, durante 48 horas. Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, realizados em triplicata técnica de cada uma das concentrações, em cada ensaio. Os dados estatísticos foram obtidos por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos por ANOVA *one-way* (* p ≤ 0,05).

O percentual de viabilidade após os tratamentos foi de 90%, 85%, 84%, 71%, 58%, 49% e 41%, para as concentrações de 1, 2,5, 5, 10, 50, 100 e 800 µg/ml respectivamente. Ambas as concentrações de Doxorubicina diminuíram significativamente a viabilidade de células da linhagem Balb/c 3T3, sendo que 24%

das células permaneceram viáveis após o tratamento com 1 µg/ml e apenas 17%, na concentração de 2,5 µg/ml. Q

Quanto à linhagem B16F10 (Gráfico 4), o tratamento com os polissacarídeos foi capaz de interferir significativamente na viabilidade celular nas concentrações de 5, 10, 50, 100 e 800 µg/ml, observando-se o percentual de viabilidade de 78, 73, 57, 52 e 37% para cada concentração, respectivamente. Bem como observado no primeiro ensaio, o tratamento da linhagem tumoral com Doxorrubicina reduziu significativamente a viabilidade nas duas concentrações empregadas, em que 7% das células permaneceram viáveis com 1 µg/ml e somente 6% com 2,5 µg/ml.

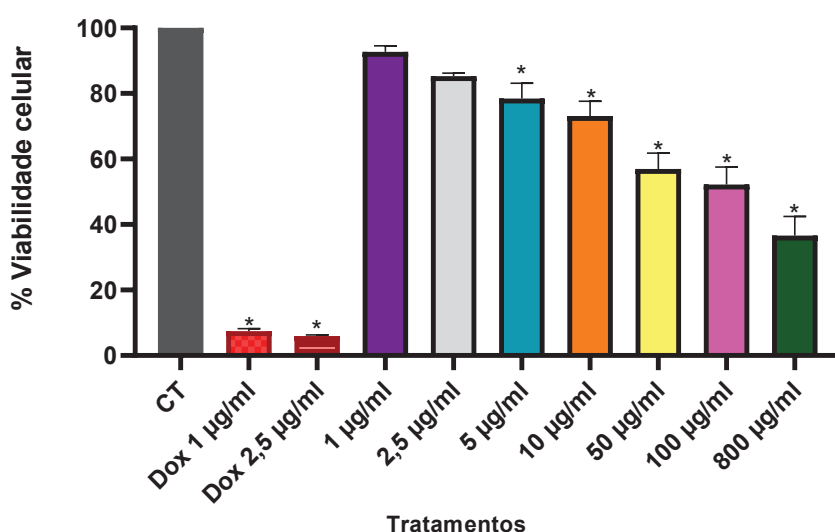


GRÁFICO 4 – Viabilidade celular avaliada pelo método *Alamar blue*® com a linhagem B16F10.

Os dados são apresentados como porcentagem de viabilidade em relação ao controle (CT) , $\pm$ SD. As células foram tratadas com solução contendo polissacarídeos de *C. adamantium* e *C. pubescens* nas concentrações de 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 800 µg/ml, ou tratadas com Doxorrubicina nas concentrações de 1 µg/ml e 2,5 µg/ml, durante 48 horas. Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, realizados em triplicata técnica de cada uma das concentrações, em cada ensaio. Os dados estatísticos foram obtidos por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos por ANOVA *one-way* (* $p \leq 0,05$).

As concentrações de 5, 10, 50, 100 e 800 µg/ml da fração CPW testada neste trabalho foram capazes de reduzir a viabilidade celular tumoral em ambos os ensaios empregados e, apesar de gerarem certo grau de toxicidade sobre os fibroblastos normais, este efeito foi menor que o quimioterápico utilizado como controle positivo, sugerindo ação antitumoral e menor possibilidade de desencadear efeitos colaterais. Os relatos presentes na literatura que suportam esses resultados são relatados a

seguir. Amaral e colaboradores (2019), em pesquisa realizada no departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, avaliaram o efeito citotóxico das frações originais e purificadas de pectinas provenientes de *Campomanesia xanthocarpa*, outra espécie de guavira. As análises utilizaram duas linhagens de glioblastoma, avaliadas pelas técnicas de MTT e cristal violeta. Após 48 horas de tratamento com concentrações variando entre 25 e 400 µg/ml, o resultado obtido foi a redução do número de células aderidas em 18%, mediante tratamento com as pectinas originais e 33% nos grupos tratados com as pectinas purificadas, para a primeira linhagem de glioblastoma testada (U251-MG). Com a linhagem T98G também foi observado a redução da viabilidade, de 20 e 38% para os grupos submetidos às pectinas originais e purificadas, respectivamente. Segundo os autores, estes resultados demonstraram que o efeito citotóxico das pectinas de *C. xanthocarpa* não foram seletivos e limitados às características de uma única linhagem.

Frações solúveis de polissacarídeos da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) foram analisados *in vitro* por Wiater et al. (2020). Utilizando linhagens HT-29 e SW620 de carcinomas de cólon, os autores relataram redução da viabilidade celular nas três maiores concentrações utilizadas – 200, 225 e 250 µg/ml – após 48 horas de tratamento, pelo ensaio de MTT. Este dado corrobora os resultados obtidos nesta pesquisa, em que a redução do número de células viáveis se mostrou de caráter dose-dependente em ambas as técnicas empregadas para análise. Segundo Chen e colaboradores (2017), existe correlação entre a diminuição da viabilidade e a concentração do polissacarídeo testado. Foram avaliadas três frações polisacarídicas de cogumelos *Flammulina velutipes* sobre três tipos celulares, entre eles as linhagens B16F10 e L929, de fibroblastos normais de camundongos. O percentual de células de melanoma murino reduziu à medida que a concentração da fração aumentou, atingindo os maiores níveis na concentração de 50 µg/ml; com as células L929, o impacto da mesma concentração sobre a viabilidade não foi significativo, indicando que as frações são pouco citotóxicas para as células normais. Ainda de acordo com os autores, é bem estabelecido na literatura que células tumorais apresentam níveis mais elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs), em comparação com células normais. Os resultados sugerem que frações polisacarídicas que reduzem a viabilidade de células tumorais agem aumentando ainda mais a concentração de EROs até um ponto que se torna insustentável, forçando a ativação de mecanismos

de morte celular por estresse oxidativo. Por este motivo os tratamentos seriam mais citotóxicos para as células tumorais, e menos para as células normais.

Como mencionado anteriormente, apesar dos bons resultados no controle das células tumorais, os medicamentos quimioterápicos geram diversos efeitos colaterais devido à ação inespecífica. Pensando nisso, Hsu et al. (2021) avaliaram a ação antitumoral de polissacarídeos de *Ganoderma lucidum* combinado com Cisplatina, e observaram efeito sinérgico, em que a associação intensificou o efeito do medicamento sobre células de tumor oral. Em conjunto, estes resultados elucidam o potencial antitumoral de polissacarídeos e sua baixa toxicidade sobre células normais, além de abrir possibilidades para a investigação da associação de terapias com possível redução dos efeitos colaterais.

4.2) Proliferação celular

Característica primordial das células tumorais é a capacidade proliferativa aumentada. Esse traço permite o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas e expande o potencial invasivo e metastático (HANAHAH, 2022). Desta maneira, a avaliação da proliferação celular é imprescindível quando o modelo experimental utilizado envolve células tumorais.

O ensaio de Cristal violeta (CV) é um método colorimétrico simples e rápido, que possibilita a quantificação de células em uma cultura pela sua ligação com o DNA e proteínas; pode ser utilizado para análise da viabilidade e, quando aplicado em tempos distintos, para avaliação da proliferação celular (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016).

O gráfico 5 apresenta a proliferação da linhagem B16F10 após a exposição aos polissacarídeos de *C. adamantium* e *C. pubescens* em três tempos distintos: 24, 48 e 72 horas, para os grupos controle (CT) e duas concentrações de tratamento: 5 e 100 µg/ml.

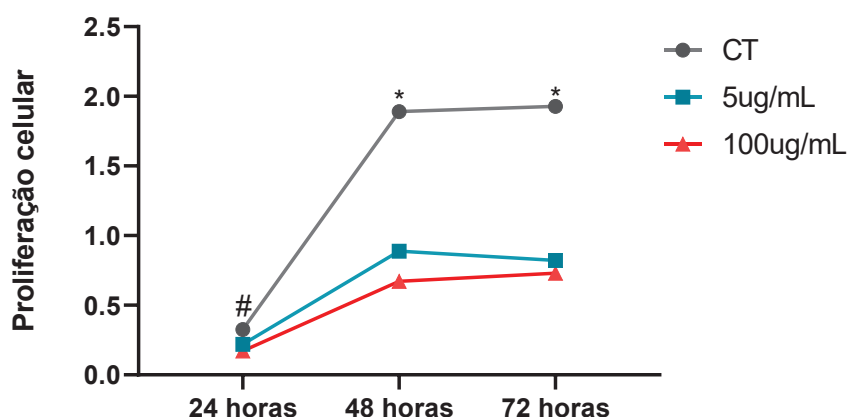


GRÁFICO 5 – Proliferação celular avaliada pelo ensaio de Cristal violeta. Os dados são apresentados como valor de absorbância medida a 590 nm, $\pm$ SD. As células da linhagem B16F10 foram tratadas com solução contendo polissacarídeos de *C. adamantium* e *C. pubescens* nas concentrações de 5 μ g/ml e 100 μ g/ml. A proliferação celular foi avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a exposição das células ao tratamento. Estes dados representam os resultados dos três tempos de avaliação e cada tempo foi composto por três experimentos independentes, realizados em triplicata técnica de cada uma das concentrações, em cada ensaio. Os dados estatísticos de cada tempo análise foram obtidos por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos por ANOVA *one-way* (# $p \leq 0,05$ CT vs 100 μ g/ml; * $p \leq 0,05$ CT vs 5 e 100 μ g/ml).

As concentrações de 5 e 100 μ g/ml da fração polissacarídica foram escolhidas para o ensaio de proliferação celular, bem como para os demais ensaios que serão apresentados na sequência. A concentração de 5 μ g/ml não provocou redução de viabilidade para as células normais no ensaio de *Neutral red*, e gerou pequena redução no ensaio de Alamar Blue®, mas decresceu significativamente a viabilidade das células tumorais nos dois ensaios. A concentração de 100 μ g/ml levou à redução de viabilidade nas duas linhagens, em ambos os ensaios, porém produziu menor efeito que o quimioterápico doxorrubicina. Além disso, a escolha de uma concentração menor (5 μ g/ml) e outra maior (100 μ g/ml) poderia gerar informações importantes para compreensão da ação dos polissacarídeos sobre as células tumorais.

Quanto ao ensaio de proliferação celular, não foi observada diferença estatisticamente relevante após 24 horas de tratamento com a solução de 5 μ g/ml, porém, a concentração de 100 μ g/ml foi capaz de reduzir em 13% a proliferação da linhagem B16F10, em relação ao controle. Ambos os tratamentos resultaram em valores significativos depois de 48 horas, com redução de 32,5% da taxa proliferativa para a concentração de 5 μ g/ml e 40% com 100 μ g/ml, em comparação ao grupo não

tratado. Resultado também observado no último tempo analisado, em que a diminuição da proliferação foi de 59 e 63% para as concentrações de 5 e 100 µg/ml, respectivamente.

Como o câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento, ou seja, pela proliferação celular acelerada e desordenada (INCA, 2020), pesquisas que objetivam investigar o comportamento de células tumorais necessitam envolver esse parâmetro. Tendo isso em vista, o potencial antiproliferativo de diversos polissacarídeos já foi evidenciado. Romdhane et al. (2020) testaram pectinas da laranja doce com alto grau de metilesterificação e ricas em ácido galacturônico (GalA) – semelhantes à fração CPW - em células de carcinoma de cólon (Caco-2) e carcinoma de laringe humana (Hep-2). O tratamento com a concentração de 10 µg/ml reduziu a taxa proliferativa da linhagem Caco-2 em 93% e da linhagem Hep-2 em 83%. Ainda neste estudo, os autores citam a associação entre o conteúdo de ácido galacturônico com o potencial antiproliferativo, mencionando outros artigos que apontaram que pectinas ricas em GalA são capazes de interromper o ciclo celular entre as fases G2 e M. Pectinas provenientes de toranja, avaliadas por Nuzzo e colaboradores (2021) demonstraram ação antioxidante, e potencial antiproliferativo, chamado pelos autores de “efeito citostático”, sobre células de neuroblastoma (SH-SY5Y). A dose de 1 mg/ml foi capaz de reduzir pela metade a proliferação tumoral após 24 horas. Nesse estudo também foi avaliado a fase do ciclo celular interrompida pelo tratamento e a conclusão, assim como a obtida no estudo mencionado anteriormente, é que a interrupção do ciclo ocorre entre as fases G2/M. Polissacarídeos pécticos de *Ficus pandurata* apresentaram ação antiproliferativa ao serem testados com células da linhagem HeLa (LV et al., 2020). Por meio do ensaio de MTT, foi verificada redução na proliferação tumoral de maneira dose e tempo-dependente, sendo que a maior concentração utilizada (200 µg/ml) reduziu a taxa proliferativa em 32% após 48 horas.

Em relação às espécies do gênero *Campomanesia*, os dados atualmente disponíveis apontam potencial antiproliferativo, testando, porém, extratos obtidos da planta. Salmazzo e colaboradores (2021) avaliaram extratos dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* em oito linhagens celulares tumorais e observaram atividade antiproliferativa em todas elas. Considerando frações polissacarídicas isoladas de *Campomanesia* nenhum artigo foi localizado, o que torna os resultados obtidos neste estudo fontes promissoras para futuras pesquisas que sejam capazes

de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na ação antiproliferativa destas pectinas.

4.3) Migração celular

A progressão tumoral está relacionada com diversos processos de reprogramação celular: o acúmulo de mutações que inicialmente originou as células tumorais pode desencadear mecanismos de transição epitélio-mesenquimal, nos quais as células epiteliais perdem seus traços originais e assumem características mesenquimais. Essas mudanças intensificam o potencial invasivo e migratório das células, graças à expressão de moléculas de ancoragem diferentes daquelas encontradas na conformação normal do tecido, o que faz com que as células alteradas apresentem menor adesão umas com as outras e com a matriz extracelular, ampliando a potencial movimentação dessas células para tecidos adjacentes, vasos sanguíneos e linfáticos, até atingirem tecidos distantes do original, onde podem se proliferar, resultando na formação de nódulos metastáticos (DONGRE e WEINBERG, 2019). Desse modo, a migração celular é um estágio crítico no processo de progressão tumoral. Com o objetivo de analisar este parâmetro, nesta pesquisa foi utilizado o ensaio de *Scratch*, também conhecido como *Wound Healing Assay*, um modo simples e acessível para avaliar a movimentação das células tumorais após tratamento com as concentrações da fração CPW. A Figura 6 corresponde às fotos tiradas no tempo inicial (zero), 12, 24 e 48 horas depois da confecção da lacuna

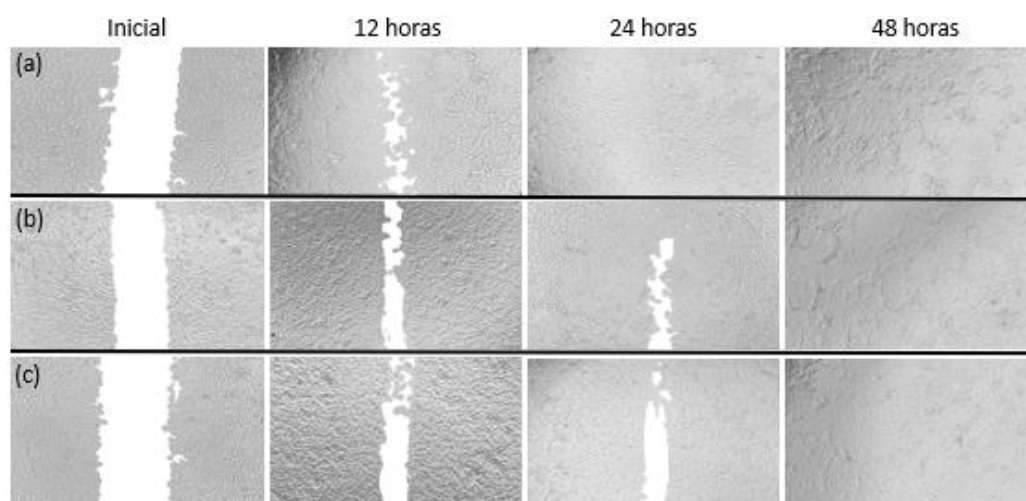


FIGURA 6 - Migração celular avaliada pelo método *Scratch*. A linhagem B16F10 foi submetida a análise de migração celular após 48 horas de tratamento: (a) grupo controle, sem adição da fração CPW; (b) tratamento com a concentração de 5 µg/ml, e (c) 100 µg/ml. As fotografias nos tempos 0, 12,

24 e 48 horas foram realizadas com o auxílio de microscópio óptico invertido BIOVAL® XDS-1B, em aumento de 10x (FONTE: A autora).

O gráfico 6 representa a migração celular da linhagem B16F10 nos tempos de 12, 24 e 48 horas, para o grupo controle (sem tratamento) e os tratados com as concentrações de 5 µg/ml e 100 µg/ml. O percentual de migração foi calculado pela diferença de área livre de células entre as fotografias iniciais e as fotografias dos demais tempos.

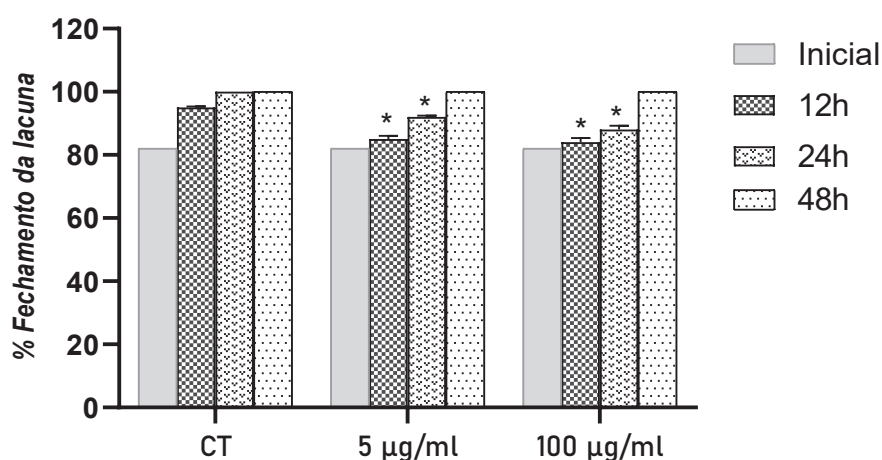


GRÁFICO 6 – Migração de células da linhagem B16F10 após 12, 24 e 48 horas de tratamento. Os dados são apresentados como porcentagem de fechamento da lacuna. As células foram tratadas com solução contendo polissacarídeos de *C. adamantium* e *C. pubescens* nas concentrações de 5 µg/ml e 100 µg/ml, durante 48 horas. Após isso, o tratamento foi removido e a lacuna (*scratch*) foi confeccionada, ilustrando o tempo inicial. A migração celular foi avaliada 12, 24 e 48 horas após a realização do *scratch*. Cada tempo foi composto por três experimentos independentes, realizados em triplicata técnica de cada uma das concentrações, em cada ensaio. Os dados estatísticos de cada tempo análise foram obtidos por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos por ANOVA *one-way* (* $p \leq 0,05$, em relação aos respectivos controles), $\pm$ SD.

Após 12 horas da realização da lacuna, as células do grupo controle já haviam preenchido 95% da área inicialmente livre de células, enquanto as células dos grupos tratados preencheram 85% e 84% da área inicial, para as concentrações de 5 µg/ml e 100 µg/ml, respectivamente, representando diferença significativa na migração dessas células em relação aos poços não tratados. Diferença estatisticamente significativa continuou sendo observada após 24 horas. Neste tempo, as células do grupo controle já haviam preenchido todo o espaço da lacuna. O tratamento de 5 µg/ml foi capaz de reduzir a migração em 8% (92% da área inicial foi preenchida por células)

e a concentração de 100 µg/ml diminuiu a migração em 12% (88% da área inicial foi preenchida). Após 48 horas, as células de ambos os grupos tratados preencheram a lacuna, correspondendo à ocupação de 100% da área total. Este resultado demonstra que a ação da fração CPW na diminuição da migração das células da linhagem B16F10 é dose-dependente, bem como nos resultados de viabilidade e proliferação, além de apresentar o potencial de reduzir a capacidade migratória destas células por mais de 24 horas.

Pectinas provenientes de *Angelica sinensis* demonstraram potencial anti-migratório em células humanas de neuroblastoma (linhagem SH-SY5Y), como publicado por Yang e colaboradores, em 2018. Por meio do ensaio de *Transwell*, foi observada redução de 30% no potencial migratório após 48 horas de tratamento com a fração AP, em comparação ao grupo controle. Foi analisado também o efeito do polissacarídeo sobre proteínas-quinase relacionadas às vias de sinalização PI3K-AKT e JAK/STAT, anormais em diversos tipos de câncer. De acordo com os autores, o tratamento com AP em concentrações variando entre 200 e 500µg/ml é capaz de inativar quinases relacionadas com as vias citadas.

Wu et al. (2019) avaliaram a capacidade migratória de células da linhagem de tumor de mama MCF7 após tratamento com polissacarídeos sulfatados da alga *Undaria pinnatifida* (fração SPUP) pelo ensaio do *Scratch*. Os resultados obtidos, assim como nesta pesquisa, foram expressos como a porcentagem de preenchimento da lacuna livre de células, e demonstraram redução na migração de maneira dose e tempo dependente, atingindo 39, 29 e 22% para as concentrações de 25, 100 e 200 µg/ml, respectivamente. Os tempos analisados foram de 24, 48 e 96 horas sendo a fração SPUP capaz de conter o restabelecimento dos contatos célula-célula durante todo o período. No mesmo estudo, os autores compararam a ação anti-migratória do polissacarídeo com o quimioterápico Cisplatina por meio do ensaio *Transwell* e observaram resultados estatisticamente semelhantes entre as substâncias testadas. Outro polissacarídeo com potencial anti-migratório foi identificado por Yang et al. (2020), também sobre células de tumor de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Após 24 horas de tratamento com a fração APS, proveniente de *Astragalus*, a migração de ambas as linhagens reduziu de maneira dose-dependente, sendo a diminuição de 32, 44 e 63% para as concentrações de 200, 400 e 800 µg/ml com as células MCF-7 e 19, 43 e 63% para as mesmas concentrações, com a linhagem MDA-MB-231. Indo além, foi avaliada a relação entre a redução da migração e moléculas relacionadas ao

processo de transição epitélio-mesenquimal. Os resultados indicaram menor expressão de vimetina e Snail (marcadores mesenquimais) e maior expressão de E-caderina, importante molécula de adesão celular, responsável por garantir a integridade do epitélio. Além disso, o tratamento com APS regulou para baixo a atividade das vias de sinalização Wnt/ β -catenina, associados a processos embrionários de proliferação e diferenciação e determinante da polaridade das células epiteliais, característica perdida durante o processo de transição epitélio-mesenquimal. Juntamente com todas as evidências previamente mencionadas, os resultados do presente estudo sugerem que a fração polissacarídica CPW pode servir como um agente terapêutico promissor na contenção da migração de células tumorais. Porém, os mecanismos de ação pelos quais as pectinas de *Campomanesia* exercem este efeito ainda precisam ser elucidados.

4.4) Formação de colônias

O ensaio de formação de colônias ou ensaio clonogênico, é baseado na capacidade de uma única célula, desprovida de contato com células vizinhas e seus produtos, crescer e formar colônias. Essencialmente, o teste analisa cada célula da população quanto à sua capacidade de sofrer divisão “ilimitada” e formar um grupo (ou *cluster*) de células. Uma colônia é definida como um *cluster* de, pelo menos, 50 células (FRANKEN et al., 2006). Este experimento mimetiza o processo de formação de nódulos metastáticos, no qual células oriundas de um tumor primário atingem tecidos diferentes dos originais e, neste novo local, dividem-se e formam colônias.

O tratamento com polissacarídeos provenientes de *C. adamantium* e *C. pubescens* apresentou potencial redutor na formação de colônias em relação ao controle nas concentrações de 5 e 100 $\mu\text{g/ml}$, como demonstrado na figura 6 e no gráfico 7.

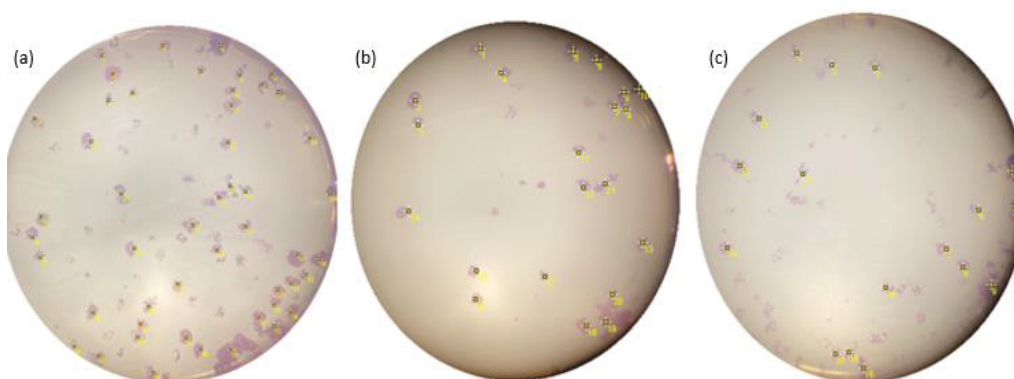


Figura 7 - Ensaio de formação de colônias. A linhagem B16F10 foi analisada quanto ao potencial de formação de colônias após 48 horas de tratamento: (a) grupo controle, sem adição da fração CPW; (b) tratamento com a concentração de 5 µg/ml, e (c) 100 µg/ml. As colônias estão demarcadas em amarelo. As fotografias foram realizadas com auxílio de lupa, e a contagem de colônias realizada no software ImageJ® (FONTE: A autora).

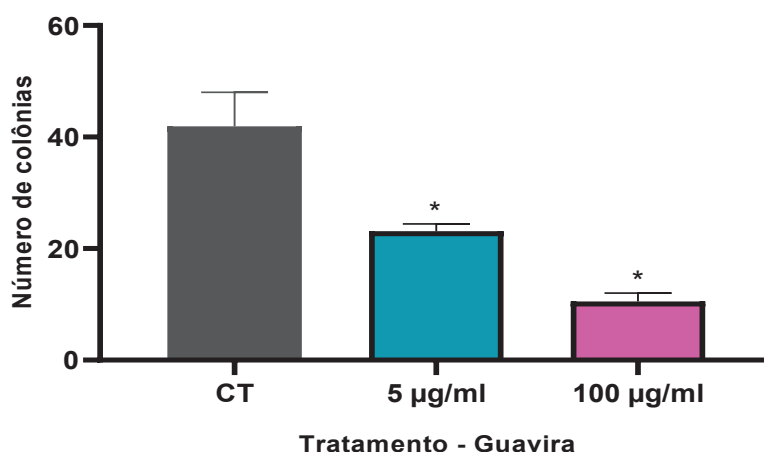


GRÁFICO 7 – Formação de colônias expressa em número absoluto. As células da linhagem B16F10 foram tratadas com solução contendo polissacarídeos de *C. adamantium* e *C. pubescens* nas concentrações de 5 µg/ml e 100 µg/ml durante 48 horas. Estes dados representam o número de colônias formados em três experimentos independentes, realizados em triplicata técnica de cada uma das concentrações, em cada ensaio. Os dados estatísticos foram obtidos por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a comparação entre o número de colônias formadas em cada grupo por ANOVA *one-way* (* $p \leq 0,05$), $\pm$ SD.

Os resultados são referidos como número total de colônias formadas. O grupo controle, não exposto ao tratamento, apresentou média de 42 colônias, enquanto os tratamentos, que reduziram significativamente o número de colônias, formaram 28 e 11 colônias, para as concentrações de 5 e 100 µg/ml, respectivamente. Sabe-se que o processo metastático envolve, dentre outros fatores, a proliferação de células do tumor primário em diferentes tecidos, distantes dos originais. A redução no número de colônias observada mediante tratamento com a fração péctica de *Campomanesia* é bastante promissor e sustentada na literatura pelos estudos mencionados a seguir. Efeitos sobre a formação de colônias em duas linhagens de tumor pancreático foram observados por Bian et al. (2020) após tratamento com polissacarídeos provenientes da raiz de *Polygala tenuifolia*. Neste estudo, a fração RP02-1 reduziu o número e o

tamanho das colônias tumorais de maneira dose-dependente nas linhagens AsPC-1 e BxPC-3 após 72 horas de tratamento. Na maior concentração testada (8,62 μ M), o tratamento foi capaz de inibir quase totalmente a formação de colônias em ambas as células tumorais.

Adami e colaboradores (2018), avaliaram o efeito antineoplásico de pectinas extraídas da pimenta verde (*Capsicum annuum*) sobre carcinomas mamários *in vitro* e *in vivo*. Em todas as linhagens celulares utilizadas para a avaliação *in vitro* - MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 – o tratamento na concentração de 0,1 mg/ml foi capaz de diminuir em média 26% o número de colônias formadas após 24 horas, em comparação ao grupo controle. *In vivo*, não foi avaliado o potencial de formação de metástase após o tratamento, o que mimetizaria com maior fidelidade a formação de colônias tumorais. Porém, os resultados obtidos foram promissores pois demonstraram redução no volume tumoral de 54%, na dose de 150 mg/kg, nos animais inoculados com células de carcinoma mamário de Ehrlich. Varghese et al. (2017) também investigaram o efeito de frações pécticas sobre a formação de colônias em cultura e *in vivo*. Galactomananas solúveis provenientes da casca da romã (fração PSP001) foram testadas *in vitro* sobre as linhagens A549, de carcinoma pulmonar e A375, células de melanoma humano maligno e, *in vivo*, utilizando ratos C57BL/6 (modelo de metástase pulmonar), submetidos à inoculação de células B16F10. Ainda nos experimentos com animais, foi testada a associação entre a fração PSP001 e o quimioterápico Vincristina. Os grupos tratados com o polissacarídeo apresentaram notável redução no número de colônias formadas de maneira dose-dependente, bem como os resultados obtidos com as pectinas de *Campomanesia*, fruto deste estudo. A diminuição na quantidade de colônias foi observada após 72 horas de tratamento com a concentração de 100 μ g/ml, sendo 82% de redução para a linhagem A375, 48% para A549 e 44% para B16F10, alcançando 90%, 83% e 70% com a concentração de 200 μ g/ml para as mesmas linhagens citadas acima, respectivamente. Na última parte do experimento, os autores observaram redução no número de nódulos pulmonares metastáticos com o uso da Vincristina, cujo efeito foi intensificado após associação com a fração polissacarídica (13% de colônias metastáticas com a Vincristina e 7% mediante associação do quimioterápico com PSP001, em relação ao controle).

4.5) Percentual de células necróticas ou apoptóticas

O desequilíbrio entre a taxa de proliferação e a morte celular em um tecido é uma das características determinantes para desenvolvimento de um tumor. Em condições fisiológicas, o processo de apoptose é fundamental para limitar a expansão de uma população celular, seja pela manutenção da homeostase tecidual ou pela eliminação de células potencialmente prejudiciais que apresentem danos ao DNA (MORANA; WOOD; GREGORY, 2022). De acordo com Hanahan (2022), a resistência à apoptose é uma das características adquiridas pelas células tumorais, como consequência do acúmulo de mutações. Levando em conta esta característica e considerando que a fração polissacarídica CPW foi capaz de reduzir o número de células tumorais viáveis em relação ao grupo não tratado, avaliamos se a diminuição da viabilidade estaria relacionada com indução do processo de apoptose. Para tal, o ensaio de apoptose ou necrose, utilizando o kit de marcadores Anexina-V e Iodeto de propídio (PI), avaliados por meio de citometria de fluxo, foi utilizado. Os resultados estão demonstrados na figura 7 e gráfico 8.

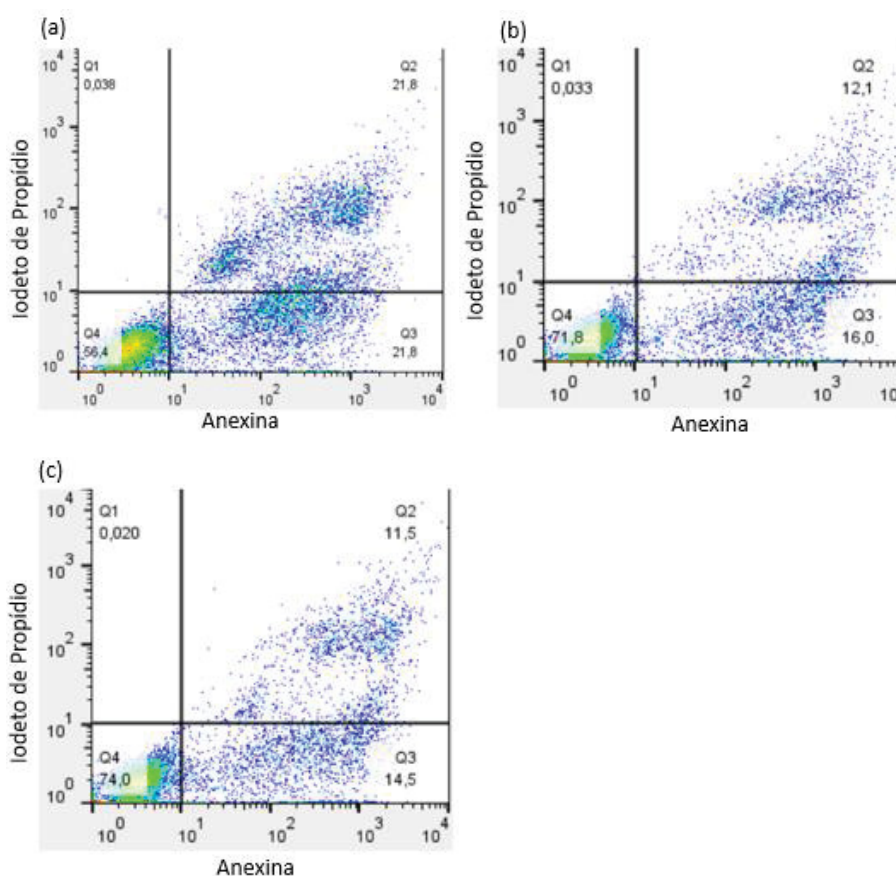


Figura 8 - Avaliação de apoptose/necrose de células tumorais por citometria de fluxo. A linhagem B16F10 foi analisada quanto ao tipo de morte celular 48 horas após o tratamento com a fração CPW. Em (a) grupo controle, sem adição do polissacarídeo; (b) tratamento com a concentração de 5 µg/ml e

(c) 100 µg/ml. Q1: população celular marcada apenas com PI, indicando células danificadas durante processamento ou morte por necrose; Q2: população duplamente marcada; Q3: população celular marcada apenas com Anexina, relativo à morte por apoptose; Q4: células sem marcação. Os gráficos correspondem ao mesmo ensaio e os dados resultantes da citometria de fluxo foram analisados por meio do *Software FlowJo®*.

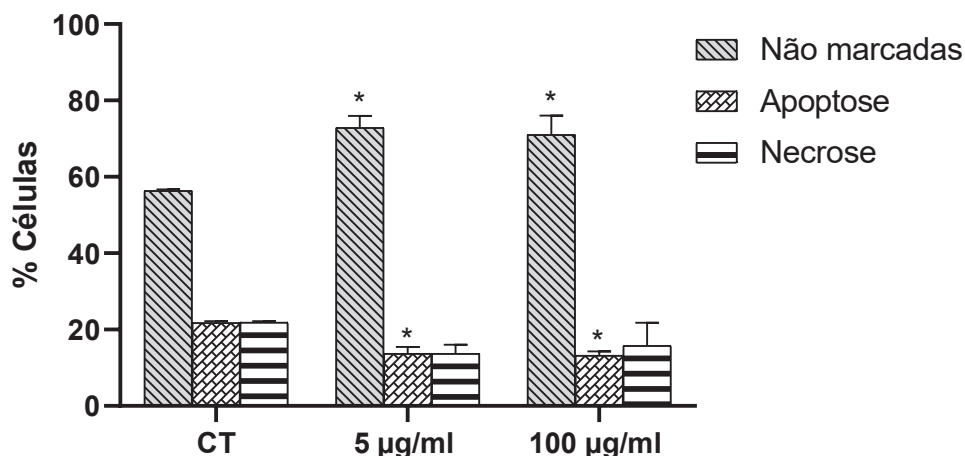


GRÁFICO 8 – População de células necróticas ou apoptóticas expressa em porcentagem. O gráfico ilustra o percentual de células B16F10 que morreram por necrose ou apoptose após 48 horas de tratamento com os polissacarídeos de *C. adamantium* e *C. pubescens*, no grupo sem tratamento e os tratados com as concentrações de 5 µg/ml e 100 µg/ml. Este resultado representa o percentual de cada tipo de morte celular em relação ao respectivo grupo controle, $\pm$ SD. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* e ANOVA *one-way* (* $p \leq 0,05$).

Os dados do citômetro são expressos em gráficos de quadrantes. Q1 representa a população celular marcada exclusivamente com PI, que pode ser considerada como células necróticas ou, de acordo com van Engeland et al. (1997), como células danificadas durante o processamento. No quadrante Q2, se encaixam as células em estágios finais da apoptose ou necrose, apresentando, portanto, afinidade por ambos marcadores; Q3 corresponde às células positivas apenas para Anexina, em processo inicial de apoptose e, em Q4, está a população com integridade de membrana, não marcada com nenhum dos indicadores.

Curiosamente, o grupo não submetido ao tratamento obteve as maiores taxas de morte celular por apoptose (21%), diferenciando-se significativamente dos grupos condicionados com a fração CPW nas concentrações de 5µg/ml (16%) e 100µg/ml (15%). Ao mesmo tempo, o tratamento com os polisacarídeos de guavira resultou em 70% da população celular se enquadrando em Q4, com a concentração de 5µg/ml e, para a concentração de 100µg/ml, 71% das células permaneceram neste quadrante.

No grupo controle, 57% das células se apresentaram negativas para ambos as moléculas fluorescentes. Ainda segundo o artigo de van Engeland et al. (1997), os autores assumem que a população celular que permanece neste quadrante corresponde às intactas, ou seja, células viáveis, o que se opõe aos resultados obtidos nesta pesquisa, onde o tratamento com a fração CPW reduziu significativamente o número de células viáveis em comparação ao grupo controle (ensaios de viabilidade). Esta aparente contradição pode sugerir que o tratamento com polissacarídeos de guavira gere interferência ou estagnação do ciclo celular, hipótese que precisa ser avaliada futuramente. Desta forma, a redução no número de células tumorais observada após tratamento com os polissacarídeos nas concentrações de 5 e 100 µg/ml parece ser devido à redução da capacidade proliferativa, e não ao aumento de morte celular.

Diversos polissacarídeos já foram apontados como indutores de apoptose em células tumorais, motivo pelo qual esta ideia foi inicialmente cogitada. Vayssade e colaboradores (2010) observaram potencial pró-apoptótico de ramnogalacturonanas provenientes da vagem do quiabo sobre a linhagem B16F10. Eles testaram as pectinas em duas técnicas diferentes de cultivo celular: cultura 2D, com plásticos de poliestireno usualmente empregados, formando uma monocamada de células; e 3D, tendo como substrado o hidrogel de poliHEMA, que permite o cultivo de células de maneira não dependente de ancoragem e a organização celular tridimensional. Após 48 horas, os grupos tratados apresentaram taxa de apoptose maior (7,3%) em comparação ao controle (3,3%) apenas nas células cultivadas em poliHEMA. Diferença estatisticamente relevante não foi observada no cultivo 2D. Os mesmos autores relataram aumento significativo no percentual de células com estagnação do ciclo celular entre a fase G2/M para ambas as técnicas de cultivo (9,2% para cultura 2D e 14,7% para a 3D) em relação ao grupo não tratado (8,4% e 7,8% para cultivo 2D e 3D, respectivamente). A atividade antitumoral do Fucoïdan, uma classe de polissacarídeos ricos em L-fucose oriundos da microalga *Fucus vesiculosus*, foi avaliada sobre a linhagem de colangiocarcinoma CL-6, tumor raro que acomete o epitélio biliar. O Fucoïdan foi capaz de induzir a apoptose das células CL-6 em todas as concentrações testadas (100, 200 e 300 µg/ml) e também gerou a estagnação no ciclo celular entre as fases G0 e G1, porém, não influenciou a taxa de células entre G2/M, como o estudo inicialmente citado (CHANTREE; NA-BANGCHANG; MARTVISET, 2021). Já os polissacarídeos de *Cordyceps cicadae* geraram parada na

fase S do ciclo em células da linhagem HeLa, após 48 horas de tratamento com as concentrações 600 e 1200µg/ml (XU et al., 2021). Considerando os dados expostos acima, o próximo passo para o entendimento da resposta das células da linhagem B16F10 mediante tratamento com a fração CPW seria a avaliação do ciclo celular. Dado que os mais variados polissacarídeos são capazes de gerar estagnação em diferentes fases, este ensaio, além de confirmar a hipótese levantada, esclareceria em qual fase ocorre a interrupção do ciclo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitem concluir que polissacarídeos solúveis obtidos da farinha de bagaço de guavira são capazes de reduzir a viabilidade de células tumorais B16F10, possivelmente devido à interferência na capacidade proliferativa. O mecanismo pelo qual isto ocorre necessita maior esclarecimento e pode estar relacionado com estagnação do ciclo celular. Além disso, os tratamentos foram capazes de reduzir a migração celular e a formação de colônias, o que indica potencial antimetastático.

Estas atividades biológicas observadas se tornam ainda mais relevantes se for considerado que o bagaço de guavira é um resíduo industrial usualmente descartado gerando toneladas de lixo anualmente e, evidentemente, desperdício de material com potencial farmacológico.

Sendo assim, novos estudos devem ser conduzidos para elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade antitumoral, e para o avanço da investigação em modelo *in vivo*.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base no resultado obtido no ensaio de apoptose/necrose por citometria de fluxo, o estudo da influência dos polissacarídeos de guavira sobre o ciclo celular contribuirá para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade antitumoral. Além disso, a investigação da expressão de proteínas nas células tumorais sob influência dos polissacarídeos poderá complementar os resultados obtidos neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Adami, E. R., Corso, C. R., Turin-Oliveira, N. M., et al. (2018). Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from green sweet pepper (*Capsicum annuum*) on mammary tumor cells in vivo and in vitro. *Carbohydrate Polymers*. v. 201, p. 280-292. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.08.071.
- Adan, A. Kiraz, Y. Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharmacy Biotechnol*. v. 17:14, p. 1213-1221. DOI: 10.2174/1389201017666160808160513.
- Al-Malky, H.S., Al Harthi, S.E., Osman, A.M. (2020). Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *J Oncol Pharm Pract*. v. 26:2, p. 434-444. DOI: 10.1177/1078155219877931.
- Amaral, S.D.C., Barbieri S.F., Ruthes A.C., et al. (2019). Cytotoxic effect of crude and purified pectins from *Campomanesia xanthocarpa* Berg on human glioblastoma cells. *Carbohydr Polym*. v. 15, p. 224. DOI : 10.1016/j.carbpol.2019.115140.
- Bian, W., Zeng, H, Tao, H., et al. (2020). A pectin-like polysaccharide from *Polygala tenuifolia* inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo by inducing apoptosis and suppressing autophagy. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 162, p. 107-115. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.054.
- Bonnekoh, B., Wevers, A., Jugert, F. (1989). Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. *Archives of Dermatological Research*. v. 281:7, p. 487–490. DOI: 10.1007/BF00510085.
- Brown, E. R., Doig, T., Anderson, N., et al. (2012). Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. *European Journal of Cancer*. v. 48, p. 865-874.
- Cardozo, C. M. L., Inada, A. C., Marcelino, G. (2018). Therapeutic potential of Brazilian cerrado campomanesia species on metabolic dysfunctions. *Molecules*. v. 23:9, 1–17. DOI: 10.3390/molecules23092336.

Carvalho, J. T. G., Baldivia, D. S., Leite, D. F. (2019). Medicinal plants from Brazilian cerrado: Antioxidant and anticancer potential and protection against chemotherapy toxicity. *Oxidative medicine and Cellular Longevity*. v. 19, p. 10-26.

Chantree, P., Na-Bangchang, K., Martviset, P. (2021). Anticancer Activity of Fucoidan via Apoptosis and Cell Cycle Arrest on Cholangiocarcinoma Cell. *Asian Pac J Cancer Prev*. v. 22, p. 209-217. DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.1.209.

Chen, G., Fu, Y., Yang, W., et al. (2017). Effects of polysaccharides from the base of *Flammulina velutipes* stipe on growth of murine RAW264.7, B16F10 and L929 cells. *Biol Micromolecules*. v. 17. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.090

Condorelli, R., Vaz-Luis, I. (2018). Managing side effects in adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*. v. 18:11, p. 1101–1112. DOI: 10.1080/14737140.2018.1520096.

Dongre, A., Weinberg, R.A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. v. 20:2, p. 69-84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4.

Flora do Brasil – Campomanesia. 2020. Disponível em: < <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublica> > Acesso em: 15 ago 2021.

Feoktistova, M. Geserick, P. Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*. v. 4. DOI: 10.1101/pdb.prot087379.

Fouad, Y.A., Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. v. 7:5, p.1016-1036.

Franco, Y. A. ESTUDO DO COMPOSTO STX, UM ANÁLOGO DO ESTRADIOL, EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Farmácia da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2022. Acesso em: 10 dez 2022.

Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., et al. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. v. 1:5, p. 2315-9. DOI: 10.1038/nprot.2006.339.

Guo, R., Chen, M., Ding, Y. et al. (2022). Polysaccharides as Potential Anti-tumor Biomacromolecules - A Review. *Frontiers in Nutrition*. v. 9. DOI: 10.3389/fnut.2022.838179

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* v. 12:1, p. 31-46. DOI: 10.1158/2159-8290.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* v. 100(1), p. 57-70. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

Hsu, W., Hua, W., Qiu, W., et al. (2021). A glucose-enriched polysaccharide from *Ganoderma lucidum*, suppresses tongue cancer cells via inhibition of EGFR-mediated signaling and potentiates cisplatin-induced apoptosis. *International Journal of Biological Macromolecules.* v. 193, p. 1201-1208. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.146.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Organização Mundial da Saúde – 2020. Disponível em: < <https://www.iarc.who.int/> > Acesso em 15 fev 2021.

ICMBIO – INSTITUTO CHICO MENDES DE BIOLOGIA. Ministério do Meio Ambiente – 2018. Disponível em: <icmbio.gov.br/cbc/conservacao-da-biodiversidade/biodiversidade.html> Acesso em 15 fev 2023.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde – O que é Câncer? 2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer> > Acesso em 15 fev 2021.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde – Dados sobre Câncer. 2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025> > Acesso em: 29 mai 2021.

Khan, F.A., Pandupuspitasari, N.S., Chun-Jie, H., et al. (2016). CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget.* v. 7:32, p. 52541-52552. DOI: 10.18632/oncotarget.9646.

Khan, T., Date, A. Chawda, H., et al. (2019). Polysaccharides as potential anticancer agents – A review of their progress. *Carbohydrate Polymers.* v. 210, p. 412-428.

Klein, G. (2000). Better understanding of the biology of cancer cells. *Lakartidningen.* v. 28, p. 3260-3264.

Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* v. 84:5, p. 1415– 1420.

Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D. (2018). Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay. Cold Spring Harb Protoc. v. 1. DOI: 10.1101/pdb.prot095489.

Lazaroff, J., Bolotin, D. (2022). Targeted Therapy and Immunotherapy in Melanoma. Dermatol Clin. v. 41, p. 65-77.

Leonardi, G. C., Falzone, L., Salemi, R., et al. (2018). Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. International Journal of Oncology. v. 52:4, p.1071-1080.

Lewandowska, A.M., Rudzki, M., Rudzki, S., et al. (2019). Environmental risk factors for cancer - review paper. Ann Agric Environ Med. v. 26:1, p. 1-7. DOI: 10.26444/aaem/94299.

Liang, C. C., Park, A. Y., Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nature Protocols. v. 2:2, p. 329–333. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.

Lima E Silva, M. C. B., Bogo, D., Alexandrino, C. A. F. (2018). Antiproliferative activity of extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and isolated compound dimethylchalcone against B16-F10 murine melanoma. Journal of Medicinal Food. v. 21:10, p. 1024–1034.

Lv, H., Hu, C., Xie, Z., et al. (2020). Purification, characterization and anti-tumor activity of a pectic-type polysaccharide isolated from *Ficus pandurata* H. International Journal of Biological Macromolecules. v. 153, p. 201-206. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.244.

Martello, M. D., David, N., Matuo, R. (2016). *Campomanesia adamantium* extract induces DNA damage, apoptosis, and affects cyclophosphamide metabolism. Genetics and Molecular Research. v. 15:2, p. 1–11. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr.15027678>.

Martino, E., Casamassima, G., Castiglione, S., et al. (2018). Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. Bioorg Med Chem Lett. v. 28:17, p. 2816-2826. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.06.044.

Mathers, C.D., Vos, T., Lopez, A.D., et al. (2001) National burden of disease studies: a practical guide. Edition 2.0 Geneva, World Health Organization, Global Programme on Evidence for Health Policy. Acesso em: 24 ago 2022.

Maxwell, E. G., Belshaw, N. J., Waldron, K. W., et al. (2012). Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide. Trends in Food Science & Technology. v. 24:2, p. 64–73.

Morana, O., Wood, W., Gregory, C.D. (2022). The Apoptosis Paradox in Cancer. *Int J Mol Sci.* v. 25, p.1328. DOI: 10.3390/ijms23031328.

Naves, M. M. V., Moreno, F. S. (2000). Diferenciação celular: importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do beta-caroteno / Cellular differentiation: importance in hepatocarcinogenesis and modulator role of beta-carotene. *Rev. bras. cancerol.* v. 46:4, p. 389-399.

NIH – NATIONAL CANCER INSTITUTE. USA GOV – Global data. 2021. Disponível em: < <https://medlineplus.gov/cancer> > Acesso em 12 set 2022.

Nuzzo, D., Scordino, M., Scurria, A., et al. (2021). Protective, Antioxidant and Antiproliferative Activity of Grapefruit IntegroPectin on SH-SY5Y Cells. *Int. J. Mol. Sci.* v. 22, p. 9368. DOI: 10.3390/ijms22179368.

Onitilo, A. A., Wittig, J. A. (2020). Principles of Immunotherapy in Melanoma. *Surgical Clinics of North America.* v. 100:1, p. 161-173.

OPAS Brasil – Organização Pan-Americana de Saúde. Organização mundial da Saúde. 2018. Disponível em: < <https://www.paho.org/pt/brasil> > Acesso em: 15 fev 2021.

Passarelli, A., Mannavola, F., Stucci, L.S. (2017). Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune scape. *Oncotarget.* v. 8, p. 106132-106142.

Pavri, S., Clune, J., Ariyan, S., et al. (2016). Malignant melanoma: Beyond the basics. *Plastic and Reconstructive Surgery.* v. 138:2, p. 330-340. DOI: 10.1097/PRS.0000000000002367

Pennisi, E. (2018). The momentous transition to multicellular life may not have been so hard after all. *Science News.* Published online on 2018, jun 28th. Acesso em: 24 ago 2022.

Pietras, K., Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* v. 316:8, p. 1324-31. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.045.

Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C., et al. (2014). Melanoma Risk Factor. Definitions. v. 1012, p. 1005–1011. DOI: 10.32388/7xj0gw.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/citotoxicity. *Nat Protoc.* v. 3, p. 1125–1131. DOI: 10.1038/nprot.2008.75.

Rezze, G. G., Leon, A., Duprat, J. (2010). Nevo displásico (Nevo atípico) An. Bras. Dermatol. v. 85:6, p. 863 – 891. DOI: 10.1590/S0365-05962010000600013

Romdhane, M. H., Beltifa, A., Mzoughi, Z., et al. (2020). Optimization of extraction with salicylic acid, rheological behavior and antiproliferative activity of pectin from *Citrus sinensis* peels. International Journal of Biological Macromolecules. v. 159, p. 547-556. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.125.

Roy, P., Saikia, B. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. Indian J Cancer. v. 53, p. 441-2.

Salmazzo, G. R., Verdan, M. H., Silva, H., et al. (2021). Chemical composition and antiproliferative, antioxidant and trypanocidal activities of the fruits from *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae). Natural Product Research. v. 35:5, p. 853-857. DOI: 10.1080/14786419.2019.1607333.

Schadendorf, D., van Akkooi, A. C. J., Berking, C., et al. (2018). Melanoma. The Lancet. v.392, p. 971–984. DOI:10.1016/s0140-6736(18)31559-9.

Schirrmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). International Journal of Oncology. v. 54:2, p. 407–419. DOI: 10.3892/ijo.2018.4661.

Schneider, V. S., Iacomini, M., Cordeiro, L. M.C. (2019). β -L-Araf-containing arabinan and glucuronoxylan from guavira fruit pomace. Carbohydrate Research. v. 481, p. 16-22. DOI: 10.1016/j.carres.2019.06.005.

Shain, A.H., Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. Nat Rev Cancer. v. 16:6, p. 345-58. DOI: 10.1038/nrc.2016.37.

Silva, TDS., Oliveira, P. (2020). *Momordica Charantia* L., Uma Planta Medicinal E Seu Potencial Antitumoral: Uma Revisão Sistemática / *Momordica Charantia* L., a Medicinal Plant and Its Antitumor Potencial: a Systematic Review. Brazilian Journal of Development. v. 6:11, p. 92949–92962. DOI: 10.34117/bjdv6n11-633.

Spittle, M. (1987). Significance of control of the side-effects of chemotherapy treatment. Cancer Treatment Reviews. v.14, p. 329–331.

Sun L.R., Zhou W., Zhang H.M., et al. (2019). Modulation of Multiple Signaling Pathways of the Plant-Derived Natural Products in Cancer. Front Oncol. v.8:9, p.1153. DOI: 10.3389/fonc.2019.01153.

van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., et al. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. v. 31:1, p.1-9. doi: 10.1002/(sici)1097-0320

Varghese, S., Joseph, M. M., Aravind, S. R., et al. (2017). The inhibitory effect of anti-tumor polysaccharide from *Punica granatum* on metastasis. *International Journal of Biological Macromolecules*. v.103, p. 1000–1010.

Vayssade, M., Sengkhampan, N., Verhoef, R., et al. (2010). Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytother Res*. v. 24:7, p. 982-9. DOI: 10.1002/ptr.3040.

Viscardi, D. Z., de Oliveira, V. S., & Arrigo, J. S. (2016). Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*,. v. 27:2, p. 220–227. DOI: 10.1016/j.bjp.2016.09.007.

Wagstaff, W., Mwamba, R. M., Grullon, K. (2022). Melanoma: Molecular genetics, metastasis, targeted therapies, immunotherapies, and therapeutic resistance. *Genes & Diseases*. v. 9:6, p. 1608-1623.

Wang, JJ., Lei, KF., Han, F., (2017). Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. v. 22:12, p. 3855–3864. DOI: 10.26355/eurrev-201806-15270.

Wang, S., Zhang, Z., Yang, Q. (2018). Emerging therapies for small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*. v.12, p. 47. DOI: 10.1186/s13045-019-0736-3.

Weelden, GV., Bobinski, M., Okla, K. (2019). Fucoidan Structure and Activity in Relation to Anti-Cancer Mechanisms. *Mar. Drugs*. v. 17, p. 32. DOI :10.3390/md17010032.

Weinberg, R. A. (2014). *The biology of cancer: Second Ed.* Nova York: Garland Science. v. 963.

Wiater A., Paduch R., Trojnar S., et al. (2020). The Effect of Water-Soluble Polysaccharide from Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) on Human Colon Carcinoma Cells Cultured In Vitro. *Plants*. V. 9 p. 103.

Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K.J., et al. (2020). Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat Commun*. v. 11, 5120.

Wu, J., Li, H., Wang, X., et al. (2019). Effect of polysaccharide from *Undaria pinnatifida* on proliferation, migration and apoptosis of breast cancer cell MCF7. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 121, p. 734-742. DOI: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.086.

Xu, J., Tan, Z., Shen, Z., (2021). *Cordyceps cicadae* polysaccharides inhibit human cervical cancer hela cells proliferation via apoptosis and cell cycle arrest. *Food and Chemical Toxicology*. v. 148. DOI: 10.1016/j.fct.2021.111971.

Yang, J., Shao, X., Jiang, J., et al. (2018). *Angelica sinensis* polysaccharide inhibits proliferation, migration, and invasion by downregulating microRNA-675 in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Cell Biol Int*. v. 42:7, p. 867-876. DOI: 10.1002/cbin.10954.

Yang, S., Sun, S., Xu, W., et al. (2020). *Astragalus* polysaccharide inhibits breast cancer cell migration and invasion by regulating epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Med Rep*. v. 21:4, p.1819-1832. DOI: 10.3892/mmr.2020.10983.

Yang, X. (2012). Clonogenic Assay to Test Cancer Therapies. *Bio-Protocol*. v. 2, p.187–189.

Yue, F., Xu, J., Zhang, S., et al. (2022). Structural features and anticancer mechanisms of pectin polysaccharides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 209, p. 825-839.

Zaitseva, O., Khudyakov, A., Sergushkina, M. et al. (2020). Pectins as a universal medicine. *Fitoterapia*. v. 146, 104676.

Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., et al. (2016). Current Challenges in Cancer Treatment, *Clinical Therapeutics*. v. 38:7, p. 1551-1566.

Zulin, N.B. A SUPLEMENTAÇÃO COM FARINHA DO BAGAÇO DO FRUTO DE *Campomanesia adamantium* PROMOVE IMUNOMODULAÇÃO E REDUÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL EM RATOS WISTAR PORTADORES DE TUMOR DE WALKER 256. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2019. Acesso em 07 mar 2021.