UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
GUILHERME MENDES DE FREITAS

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE E DOS MECANISMOS ANTITUMORAIS DO FENILPROPANÓIDE LIGNINA DERIVADO DO EUCALIPTO (*Eucalyptus sp.*) EM MELANOMA MURINO

Mogi das Cruzes, SP

2023

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
GUILHERME MENDES DE FREITAS

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE E DOS MECANISMOS ANTITUMORAIS DO FENILPROPANÓIDE LIGNINA DERIVADO DO EUCALIPTO (*Eucalyptus sp.*) EM MELANOMA MURINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.
Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde.

Orientadora: Professora Dra. Denise Costa Arruda

Mogi das Cruzes, SP

2023

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica
Universidade de Mogidas Cruzes - Biblioteca Central

Freitas, Guilherme Mendes
F866d Determinação da atividade e dos mecanismos antitumoriais do fenilpropanóide lignina derivado do eucalipto (*Eucalytus sp*.) em melanoma murino / Guilherme Mendes Freitas. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Denise Costa Arruda.

1.Melanoma 2. Morte celular 3. Lignina 4. Microambiente tumoral 5. Eucalyptus I. Arruda, Denise Costa II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título.

CDD 616.99477

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier CRB-8/10077

Tel.: (11) 4798-7000
080019 2001
ww.v.umc.br

ATAS

ATA DA SESSP,O PUBLICA DE APRESENTAC.A.O DE DISSERTAC.A.O DE 1v!ESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA illllVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

As quatorze horas do dia dezessete de fevere.iro de dois mil e vinte e tre:5, pela Univmidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de disserti,i.o intitulada "DETERMINAC-A.O DA ATIVIDADE E DOS lv!ECANISMOS ANTITUMORAIS DO FENILPROPANOIDE LIGNINA DERIVADO DO EUCALIPTO *(Eucalyptus sp.)*EM lv!ELANOMA MURINO", para obten_,.o do graudemestre pelo(a) candidato(a) Guilherme Mendes de Freitas. Tendosido o numerodecreditosalcan,ados pelo(a) mesmo(a)no totalde50(cinquenta), a saber: 26 unidades decredito em disciplinas de p6s-gradua_,.o e 24 unidades decredito nopreparodadisserta,ao,o(a) aluno(a) perfazassimosrequisitO'Sparaobten,i.o do **grau de mestre. A comissio examinadora estava constituida dos senhores professores doutores Denise Costa Anuda, e I\.fawicio Ferreira Marcondes** Machado, da Universidade de Mogi das Cf\12es, e Adjaci Ochoa Fernandes, da **Universidade.i\.nhembi Morumbi Sob apresidetlcia daprimeira, comeorientadora da disserta,;3o. Asessao ptlblica da defesa da disserta,;io foi aberta pela senhora** presidenta da comissao que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresenta,ao oral da disserta,ao. Ao final da **apresentac§o dadisserta ao,** s.eguiram-s.e **asargui Oes pelos membros da comissio examinadora. A segu.ir a comissio, em s.essao secreta, confonne julgame nto** discriminado porcadamembro, considerou o(a) candidato(a)

Anrovado (aprovado(a) /reprovado(a)) por **unanimidade** (unanimidade/maioria)

MogidasCf\12es, 17 defevereiro de2023.

Comissa'.o Examinadora	**Julgamento**
Prof. Dr. Adjaci OchOJ.Fernandes	**Aprovado** (aprovado(a) / reprovado(a))
Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))
Prof'Dr Denise Costa Arruda	**Aprovado** (aprovado(a) / reprovado(a))

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu Orisà Obaluaye, a vó Joana da Angola e a todos os espíritos de luz por sempre serem tão presentes em minha vida, me dando sabedoria, discernimento, inteligência e compreensão. Aos meus pais, madrinha e familiares pelo apoio, incentivo e amor que sempre tiverem por mim. Essa é uma conquista de todos nós.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Olodumarê, por minha vida e Obaluaye, por ter escolhido meu orí e por ser vivo no meu destino, sei que tudo tem um propósito maior e tudo mudou quando eu compreendi o meu que “Eu sou Obaluaye e Obaluaye sou Eu”.

Agradeço, aos meus pais, Fernando Cesar e Maria Cristina por serem tão incríveis e por todo o amor e respeito que existe no nosso lar, a minha madrinha, Maria Heloisa, por todo o apoio para que eu pudesse fazer a graduação e chegar ao mestrado, a toda minha família materna pelo convívio, amizade e união que possuímos. Por tudo que todos nós passamos, sabemos que nunca nada foi fácil essa etapa sem nenhuma dúvida é uma conquista de todos, pois todos tiveram sua importância nessa trajetória e agradeço a Yasmin, por chegar inesperadamente em minha vida e trazer novo sentindo e por todo apoio nessa reta final.

Agradeço a professora Denise Costa Arruda por todos os ensinamentos e orientações. Sendo sem sombra de dúvidas uma das melhores oportunidades que recebi na vida. Agradeço pelos 4 anos que estive no LABEC entre iniciação cientifica e mestrado.

Agradeço as minha colegas de Laboratório, Maria Carolina, Juliana Machado, Fernanda Cunha, Caroline Ramos,0 Agnes Kobayashi e Jociele Gonçalves. As quais tornaram todo esse período mais agradável e divertido. Pela nossa união para que todos conseguissem gerar resultados, sou muito feliz pelas amizades que construí nesse período, que levarei para toda vida. Obrigado em especial a Maria Carolina que além de ter sido minha coorientadora durante o período de I.C., se tornou a minha melhor amiga, uma irmã, obrigado por tudo.

Agradeço a Mariana Trujilho e Laura Maffeis pela incrível amizade e apoio incondicional que demos uns aos outros e por formamos esse trio incrível durante a pós-graduação.

À Universidade de Mogi das Cruzes, CNPq, Fapesp e CAPES pela concessão de bolsa, estrutura e verba para a realização da pesquisa.

Aos colegas dos laboratórios LaBiTA, CIIB, Genômica Estrutural e LAGOAA, por compartilhar reagentes, materiais e equipamentos para a realização do trabalho.

Aqueles citados aqui, esse é apenas um pequeno reconhecimento por terem sido essenciais para a realização deste trabalho.

É necessário compreensão de que nessa vida, não fazemos nada sozinhos, sempre iremos necessitar de ajuda.

A vocês que chegaram até aqui, meu Mukuyu, meu Kolofé e meu Motumbá.

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele com baixa incidência, entretanto, é considerado o mais grave por apresentar altos níveis de desenvolvimento metastático. A formação tumoral do melanoma ocorre após transformação maligna dos melanócitos, que são células produtoras de melanina. O tratamento do melanoma é realizado com cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Entretanto, algumas células podem apresentar resistência a essas terapias, além disso, os quimioterápicos são altamente tóxicos. Portanto, a procura por novas terapias que apresentam eficácia e seletividade às células tumorais, gera interesse por parte dos pesquisadores. No presente estudo, foi avaliado a atividade antitumoral da lignina extraída da casca do eucalipto (*Eucalyptus* sp.). Alguns trabalhos demonstram a atividade antitumoral de extratos de plantas contendo a lignina, entretanto, nenhum trabalho mostrou a lignina extraída de eucalipto. O objetivo do nosso estudo foi investigar a atividade antitumoral da lignina em células de melanoma murino e humano. Foi observado em nosso estudo que, a lignina induz diminuição significativa da viabilidade de células B16F10-Nex2 e SK-MEL-25. Para investigarmos os mecanismos de morte celular, tratamos as células com lignina na presença de inibidor de apoptose, Z-VAD-*fmj*(inibidor de pan-caspases); de autofagia, 3-MA (inibidor de PI3K de classe III); de necroptose, necrostatina (inibidor de RIPK1) ou na presença do inibidor de espécies reativas de oxigênio (NAC). Foi observado inibição da atividade da lignina na presença de 3-MA e NAC em células B16F10-Nex2. Além disso, após incubação das células de B16F10-Nex2 com lignina, foi observado ativação de caspases 8 e 9 e degradação do DNA. Também foi observado que, em uma concentração subtóxica de 3 μM, a lignina apresentou inibição da migração e invasão celular, bem como, diminuição na formação de colônias em células de melanoma murino. O nosso trabalho demonstra que a lignina apresenta efeito antitumoral em células de melanoma humano e murino, bem como, interfere nos mecanismos de migração e invasão celular, que estão diretamente envolvidos com processos metastáticos. Esses resultados demonstram que a lignina é um composto promissor para descoberta de novos compostos antitumorais.

Palavras-chave: melanoma; B16F10-Nex2; SK-MEL-25; lignina; morte celular.

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer with low incidence; however, it is considered the most serious because it has high levels of metastatic development. This type of skin cancer occurs after the malignant transformation of melanocytes, which are cells located in the basal layer of the epidermis. Melanoma is treated with radiotherapy, chemotherapy, and monoclonal agents. However, some cells may show resistance to these therapies, in addition, chemotherapy drugs are highly toxic. Therefore, the search for new therapies that are effective and selective for tumor cells generates interest on the part of researchers. In the present study, the antitumor activity of lignin extracted from eucalyptus bark (Eucalyptus sp.) was evaluated during the pulp production process. In the literature, there are studies that demonstrate the antitumor activity of plant extracts that have a mixture of compounds associated with lignin. The objective of this work was to investigate the antitumor activity of lignin in murine and human melanoma cells. In this study, it was observed that the decrease in lignin induction is significant for the viability of B16F10-Nex2 and SK-MEL-25 cells. To investigate cell death switches, we used lignin in the presence of apoptosis inhibitor, Z-VAD-*fmk* (pan-caspase inhibitor), autophagy, 3-MA (PI3K class III inhibitor), necroptosis, NEC (RIPK1 inhibitor) or in the presence of reactive oxygen species inhibitor (NAC). Lignin activity was observed in the presence of 3-MA and NAC in B16F10-Nex2 cells. Furthermore, after incubation of B16F10-Nex2 cells with lignin, caspase activation and DNA degradation were observed. In addition to inducing toxicity in murine and human melanoma cells, lignin, at a subtoxic concentration of 3 μM, showed cell migration and invasion, as well as a decrease in colony formation in murine melanoma cells. Our work demonstrates that lignin has an antitumor effect on human and murine melanoma cells, as well as interfering with cell migration and invasion, which are directly involved in metastatic processes. These results demonstrate that lignin is a promising compound for the discovery of new antitumor compounds.

Keywords: melanoma; B16F10-Nex2; SK-MEL-25; lignin; cell death.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estágios do melanoma 15
Figura 2. Esquema da via Biosintética da lignina.....20
Figura 3. Estrutura química de uma lignina de madeira macia 21
Figura 4. Via extrínseca e intrínseca da Apoptose 23
Figura 5. Representação simplificada da via da Necroptose.....25
Figura 6. Representação da via da Autofagia.....26
Figura 7. Viabilidade celular com B16F10-Nex2 tratadas com lignina.....35
Figura 8. Curva de tempo com B16F10-Nex2. 36
Figura 9. Viabilidade Celular em SK-Mel-25 tratadas com lignina.....36
Figura 10. Inibidor de morte celular 3-MA 37
Figura 11. Inibidor de morte NEC 12h 38
Figura 12. Inibidor de morte ZVAD-*fmk* 38
Figura 13. Inibidor de Espécies Reativas de Oxigênio.....39
Figura 14. Determinação da ativação de caspase após tratamento com lignina.....40
Figura 15. Fragmentação do DNA em células de melanoma murino após tratamento com lignina 41
Figura 16. Migração celular com células B16F10-Nex2.....42
Figura 17. Migração celular com célula SK-Mel-25.....42
Figura 18. Invasão celular com membrana de Matrigel utilizando células de melanoma murino. 43
Figura 19. Invasão celular com membrana de Matrigel utilizando células de melanoma humano.....44
Figura 20. Ensaio de Clonogenicidade 45

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

DNA (*deoxyribonucleic acid*- ácido desoxirribunucleico)

ATP (*adenosine triphosphate*- Trifosfato de adenosina)

ZVAD-*fmk*(*N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone*- N -benziloxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona)

NADPH (*Nicotidine Adenine Dinucleotide Phosphate*- Fosfato de dinucleotideo de nicotidna e adenina)

NADH (*Nicotine Adenine Dinucleotide*- Dinucleotideo de nicotina e adenina)

MITF (*Microphthalmine Transcription Factor – Factor de transcrição associado à microftalmina)*

RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*- Fibrossarcoma rapidamente acelerado)

ERK (*Extracellular Signal-regulated Kinase* – Quinase regulada por sinal extracelular)

MAPK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*- Proteína quinase quinase ativada por mitógeno)

MEK (*MAP Activating Kinase* – Quinase ativadora de MAP quinase)

TNF *(Tumor necrosis fator*- Fator de necrose tumoral)

TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*- Receptor Do Fator De Necrose Tumoral),

EROs (Espécies reativas de oxigênio),

FADD (*Fas Associated Via Death Domai*n- Fas Associado Via Domínio de Morte)

TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated Death*- Morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1)

dATP (*Deoxyadenosine triphosphate*- Trifosfato de desoxiadenosina)

CARD (*Caspase Activation And Recruitment Domains*- Domínios De Ativação E Recrutamento De Caspases)

RIP1K (*Receptor-interacting protein kinase 1*- Proteína quinase 1 que interage com o receptor)

RIP3K (*Receptor-interacting protein kinase 3*- Proteína quinase 3 que interage com o receptor)

RIP1 *(Receptor Interacting Protein*- Receptor De Proteína De Interação)

RIP3 *(Receptor Interacting Protein*- Receptor De Proteína De Interação)

MLKL (*Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase*- Domínio de quinase de linhagem mista como pseudoquinase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....13

1.1 CÂNCER E MELANOMA.....13

1.2 COMPOSTOS NATURAIS E CÂNCER.....17

1.3 LIGNINA.....18

1.4 MORTE CELULAR.....21

1.4.1 Apoptose.....22

1.4.2 Necrose e necroptose.....24

1.4.3 Autofagia.....25

2. OBJETIVOS.....28

2.1 OBJETIVOS GERAIS.....28

2.2 OBJETIVOS ESPECIFÍCOS.....28

3. MÉTODOS.....29

3.1 LINHAGENS CELULARES.....29

3.2 LIGNINA.....29

3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA LIGNINA.....30

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIGNINA ATRAVÉS DE UMA CURVA DE TEMPO.....30

3.5 ENSAIO COM INIBIDORES DE MORTE E EROs.....30

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS CASPASES.....31

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA POR BRADFORD.....31

3.8 ENSAIO DE TUNEL.....32

3.9 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....32

3.10 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR.....33

3.11 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS 33
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA 34
4. RESULTADOS 35
4.1 VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10-NEX2 E HUMANO SK-MEL-25 35
4.2 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE PROMOVIDA PELA LIGNINA 37
4.3 EFEITOS DA LIGNINA NA PRESENÇA DE INIBIDOR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) 39
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CASPASES APÓS TRATAMENTO COM LIGNINA EM CELULAS B16F10-NEX2 39
4.5 ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS B16F10-Nex2 APÓS TRATAMENTO COM LIGNINA 40
4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR POR "WOUND HEALING ASSAY" COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO E HUMANO 41
4.7 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR COM MEMBRANA DE MATRIGEL EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO E HUMANO 43
4.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS COM CELULAS B16F10-Nex2 44
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA 51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 52

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER E MELANOMA

A formação tumoral ocorre devido a mutações aleatórias ou induzido por fatores epigenéticos. Os tipos de mutações são: translocações, substituições, deleções ou inserções de bases nitrogenadas. Estas alterações levam ao acúmulo de danos no ácido desoxirribonucleico (DNA- *Deoxyribonucleic Acid*). As mutações podem ser aleatórias ou induzidas, como por exemplo: danos e instabilidade genética induzida por fatores físicos, como radiação ultravioleta, substâncias carcinogênicas como o gás mostarda ou por fatores biológicos como os oncovírus. Entretanto, uma única alteração isolada não acarreta a formação tumoral. Para que haja o desenvolvimento tumoral, são necessárias duas ou mais modificações genéticas que irão causar interferências nos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular (HAUNG; ZHOU, 2021; YOLANDE *et al.*, 2018).

As mutações que ocorrem no DNA induzem eventos que ativam protooncogenes, genes responsáveis por regularem a expressão gênica que, ao apresentar desregulação, leva ao aumento da proliferação (ZHOU, *et al.*, 2022). Além disso, algumas mutações podem levar a inibição de supressores tumorais (HANAHAN *et al.*,2022).

Segundo Hanahan (2022), as células tumorais apresentam características comuns entre si, como: sinalização proliferativa e ativação de oncogenes, inativação dos supressores tumorais, resistência aos mecanismos de morte celular, imortalidade, ativação da invasão e metástase, alteração do metabolismo celular, instabilidade genômica, escape do sistema imune, processo inflamatório promotor do desenvolvimento tumoral e indução de angiogênese.

A angiogênese ocorre como parte do mecanismo de sobrevivência das células tumorais, permitindo a suplementação de oxigênio e nutrientes para a massa tumoral. Este processo se inicia com a liberação para o meio extracelular de proteínas de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*- VEGF) e Fator De Crescimento Fibroblástico Básico (*Basic Fibroblast Growth Factor*- bFGF) pelas células tumorais. Dessa maneira, ocorre formação de novos vasos que promovem a irrigação e proliferação celular (ZHOU, *et al.*,2022; OZEL, *et al.*,2022).

Atualmente o câncer é a segunda doença com maior índice de mortalidade, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares (HYUNA, *et al.*,2020). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o triênio de 2020-2022 o surgimento aproximadamente 625 mil novos casos de câncer no Brasil, o INCA determinou que o câncer mais frequente entre os homens do país é o de próstata, seguido por cólon e reto e pulmão. Já nas mulheres, o câncer com maior

incidência foi o câncer de mama, seguido de cólon e reto e colo de útero. Além disso, o INCA estimou para o triênio 2020-2022 cerca de 8.500 novos casos de melanoma, dos quais 4.200 atingirão os homens e 4.250 as mulheres no território nacional (INCA, 2019; HOEK, *et al.*,2008).

O câncer de pele do tipo melanoma não apresenta alta incidência na população, entretanto, possui a maior taxa de mortalidade quando comparado a outros tipos de cânceres de pele. Além disso, apresenta altos índices de desenvolvimento metastático, agravando o quadro dos pacientes (GRAY-SCHOPFER, *et al.*,2007).

O melanoma é uma doença que tem como origem a transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina. O melanoma é um câncer de pele altamente agressivo que, em estágios avançados, algumas células se tornam resistentes aos tratamentos convencionais. Dentre os cânceres de pele, o melanoma representa apenas 3% dos casos, mas se destaca ao causar, aproximadamente, 80% das mortes relacionadas aos cânceres de pele (VELLIS, *et al.*,2021).

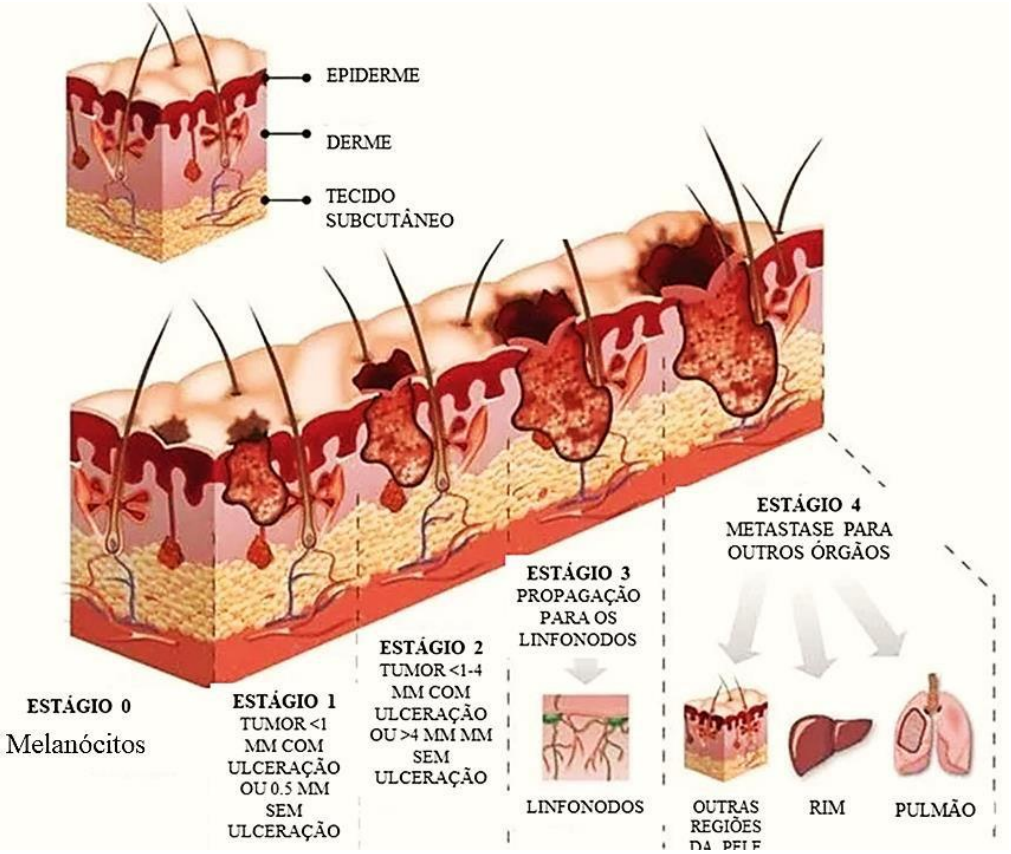
Os melanócitos são células que surgem da crista neural e migram para a pele, mucosa e meninges durante o desenvolvimento embrionário. A maioria dos melanócitos é encontrada na junção epidérmica-dérmica da pele. As células melanocíticas presentes na pele são responsáveis pela produção de melanina, pigmento que apresenta duas importantes funções: proteger o DNA de células vizinhas contra os raios ultravioletas (raios UV), além de gerar cor aos olhos, pelos e pele (KOZOVSKA, *et al.*,2016; TESTA, *et al.* 2017).

A progressão do melanoma ocorre gradualmente por diversas etapas, nas quais os melanócitos sofrem mutações, adquirindo características invasivas e migratórias, gerando metástases em órgãos secundários. A primeira alteração que ocorre nos melanócitos é a formação de nevos benignos. O aumento no número de células do nevo leva a formação de nevos displásicos. Se houver alguma mutação nas células dos nevos displásicos, leva a formação do primeiro estágio do desenvolvimento do melanoma, com o crescimento de progressão radial, restrito à região da epiderme. Na fase seguinte, chamado de crescimento vertical, as células desenvolvem a capacidade de invadir a derme, atingindo vasos sanguíneos e linfáticos e, consequentemente, migram pelo organismo e formam tumores secundários em órgãos distantes, como pulmão, cérebro, rim e outras regiões da pele (Figura 1) (VELLIS, *et al.*,2021).

O melanoma apresenta quatro estágios de desenvolvimentos. Os estágios I e II são iniciais e podem ser removidos do paciente por cirurgia e os pacientes apresentam altas taxas

de remissão (HOEK, *et al.*,2008). Já nos estágios III e IV são vistos crescimentos verticais dos tumores. A progressão tumoral ocorre devido a desregulação da homeostase através de mutações que beneficiam a produção de fatores de crescimentos autócrinos ou a ativação constitutiva de cascatas de sinalização de fatores de crescimento, proliferação, imortalidade, e bloqueio das respostas dos fatores inibitórios de crescimento, o que leva à invasão da derme nesse estágio (HAASS; HERLYN, 2005; HOEK *et al.*,2008).

Figura 1. Estágios do melanoma.



Fonte: Adaptado de MOQADAM *et al.*,2018.
Estágios do melanoma. Estágio 0, os melanócitos que sofreram mutações e estão ainda presentes na epiderme, começam a se proliferar nessa região. Estágio 1, a formação de tumores e em alguns casos esses tumores podem apresentar ulceração. Estágio 2, as células se encontram na fase de crescimento radial, há aumento do perímetro do tumor. No estágio 3, as células passam a invadir a derme, havendo o crescimento vertical desse tumor, com isso as células invadem vasos sanguíneos, linfáticos e consequentemente no quarto estágio, há o desenvolvimento do processo metastático onde as células do tumor primário formam um tumor secundário em outros órgãos.

A motilidade celular é processo vital para o desenvolvimento do organismo, em processos patológicos, como o câncer, a migração proporciona o desenvolvimento tumoral e formação de metástases (JUSTUS, 2014; SCHWAB; STOCK, 2014). O crescimento da massa tumoral leva à algumas respostas do organismo na região do microambiente tumoral, como o: aumento da pressão intersticial; condições de hipóxia das células que estão presentes no interior do tumor; exposição direta das células ao sistema imunológico, levando algumas

células à morte; desenvolvimento de mecanismo que auxilia na capacidade da progressão tumoral, iniciando o crescimento do tumor invasivo devido a perda da adesão celular (KRAKHMAL, *et al.*,2015).

A migração celular ocorre pela polimerização e despolimerização da β-actina, levando à alteração da estrutura das células, permitindo processo migratório pela matriz extracelular (SCHWAB; STOCK, 2014; OZEL, *et al.*,2022).

O desenvolvimento do melanoma está ligado a fatores ambientais, como: exposição aos raios UV, que induz mutação no DNA, e, leva a formação de dímeros de timina. Além disso, fatores genéticos também podem levar ao desenvolvimento tumoral (RASTRELLI, *et al.*,2014; BANDARCHI, *et al.*,2019).

A via das Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) é uma via de sinalização intracelular que regula o crescimento, diferenciação, proliferação e migração celular (AROZARENA *et al.*,2011). A ativação dessa via inicia-se com a ativação da proteína *Rat sarcoma vírus* (RAS) que desempenha o papel de ativar a proteína RAF. Existem 3 proteínas da família RAF, que são: ARAF, CRAF e BRAF. Quando a RAF é ativa por RAS, leva, consequentemente, à ativação de Quinase ativadora de MAP quinase (MEK) e Quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (AROZARENA *et al.*,2011).

As mutações que levam ao desenvolvimento do melanoma, em mais de 80% dos casos, estão ligadas a mutação em BRAF, gene envolvido com a proliferação celular, onde há substituição de uma valina na posição 600 por um ácido glutâmico. Essa mutação em $BRAF^{V600E}$, leva a ativação constitutivamente da via das MAPK e consequentemente induz ao aumento da proliferação celular (AROZARENA *et al.*,2011; MATALLANAS, *et al.*,2011).

Além da mutação em BRAF, a mutação em RAS ocorre em 15 a 30% dos casos e é a segunda mutação de maior incidência no melanoma, ocorre a substituição de glutamina por leucina na posição 61, $N\text{-}RAS^{Q61L}$. Essa mutação leva a ativação constitutiva da proteína RAS que leva ao aumento da proliferação celular por ativação constitutiva na via MAPK (MOORE, *et al.*,2020; RANDIC, *et al.*,2021).

O tratamento de melanoma é realizado através de cirurgias para remoção dos tumores nos estágios iniciais além da utilização de quimioterapia e imunoterapia. Dentre os quimioterápicos utilizados na terapêutica alguns medicamentos foram desenvolvidos a partir de compostos naturais como por exemplo, a Vincristina, a Vinblastina e o Paclitaxel (HOEK *et al.*,2008;YANG; HORWITZ, 2017; YVON *et al.*,1999).

1.2 COMPOSTOS NATURAIS E CÂNCER

Vincristina, Vimblastina e Paclitaxel quimioterápicos são empregados no tratamento de vários tipos de cânceres, como de mama, de ovário, de testículo, de melanoma, de pulmão, de linfomas e de leucemias (YANG; HORWITZ, 2017; SELIMOVIC *et al.*,2013; YVON *et al.*,1999).

Vinblastina e vincristina são metabólitos secundários da *Catharanthus roseus* uma pequena planta distribuída em regiões tropicais (KURIAKOSE *et al.*,2016). A Vinblastina causa inibição da polimerização de microtúbulos do fuso mitótico pela ligação à subunidade beta dos dímeros de tubulina acarretando a parada da divisão celular na fase de metáfase. A vincristina tem seu efeito relacionado à concentração administrada; baixas doses causam estabilização dos microtúbulos. Altas doses causam interrupção da polimerização e indução da despolarização dos microtúbulos, além disso, induzem parada do ciclo celular e pode ocasionar morte celular como, apoptose ou autofagia (SELIMOVIC *et al.*,2013; SAID; TSIMBERIDOU 2014).

O paclitaxel é produzido a partir da casca da árvore *Taxus brevifolia*, promove a interrupção do ciclo celular na fase G2/M, inibindo a mitose e levando a célula à apoptose. O mecanismo de ação do paclitaxel envolve a estabilização dos microtúbulos e ocasiona sua desorganização em relação a dinâmica normal. O Paclitaxel é empregado para o tratamento de diversos tipos de cânceres como em tumores sólidos, principalmente no câncer de mama e de ovário (YVON *et al.*,1999; YANG; HORWITZ, 2017).

Vários estudos mostram o efeito antitumoral de compostos naturais ainda em estágios de pesquisa inicial. A tetrametilpirazina (TMP) é um alcaloide e compotos ativo da *Ligusticum chuanxiong hort*, uma erva amplamente utilizada na região asiática, principalmente na China. Este composto apresenta as mais diversas ações, como: antioxidante, anti-inflamatório, regulação da autofagia, indução da apoptose, regulação da angiogênese, supressão do dano mitocondrial, redução da proliferação e migração de células musculares lisas. Além disso, o TMP promove apoptose através de regulação da p53 e gera parada na fase G0/G1 em células de leucemia linfoblástica aguda, células de osteosarcoma e células de câncer de pulmão (LIN, *et al.*,2022).

Outros compostos naturais, como os terpenos, também demonstram efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo*. O estudo de Cvetanova e seus colaboradores (2021) demonstra que um sesquiterpeno, a lactona desoxielefantopina que foi previamente isolada de *Elephantopus scaber* e seu derivado, DETD-35 apresentaram potencial de supressão da metástase pulmonar

de melanoma mutante em $BRAF^{V600E}$ em camundongos. Estudo de Farhan e seus colaboradores (2021) utilizaram a artemisinina, medicamento antimalárico e com ampla utilização em outros tipos de cânceres, em estudo com células de melanoma uveal, foi proposto ação do medicamento sobre a via PI3K/AKT/mTOR ocasiona inibição da migração, invasão e proliferação celular.

Lahmadi e colaboradores (2021) demonstraram o efeito antitumoral de óleos essenciais de duas espécies de eucalipto, *Eucalyptus torquata Luehm*. e *Eucalyptus salmonophloia F. Muell*., presentes na Tunísia. Estes estudos mostraram que os óleos essenciais do eucalipto possuem efeitos antitumorais nas linhagens celulares de carcinoma de mama MDA-MB-231 e linhas celulares de câncer colorretal SW620, esse estudo demonstra a diminuição da viabilidade celular após tratamento com esse composto. Alzoubi e colaboradores (2021) utilizaram um extrato das folhas de *Silybum marianum* para tratamento de câncer de pele. Este estudo mostrou que o extrato da planta foi capaz de induzir significativamente a diminuição da formação de tumores e números de tumores no experimento *in vivo* realizado. Nesse mesmo estudo foi avaliado o extratos de folhas de *Eucalyptus camaldulensis* e sendo observado a diminuição do desenvolvimento de tumores nos animais.

1.3 LIGNINA

A lignina, dentre os polímeros aromáticos produzidos pelas plantas, é o mais abundante na natureza. Sua função está ligada ao crescimento e desenvolvimento das plantas, desempenhando papel no suporte mecânico e auxiliando o transporte de água e solutos por meio do sistema vascular da planta, é considerada uma barreira importante na defesa passiva e ativa ao fornecer proteção contra invasão de patógenos (DIXON; BARROS, 2019; LIU *et al.*,2018).

A lignina tem em sua composição três monômeros: álcool ρ -cumarílico (unidade H-lignina), álcool coniferílico (unidade G-lignina) e álcool sinapil (unidade S-lignina). É visto que a diferença de proporção dos monômeros geram diferentes tipos de lignina nas plantas e madeiras. O processo de lignificação das plantas é complexo sendo, regulado por intermédio de três etapas sequenciais: a via do ácido xiquímico (via metabólica primária), via geral dos fenilpropanóides e via do ramo da lignina (RAMOS *et al.*,2001; KARTHÄUSER, *et al.*,2021).

Na via do ácido xiquímico ocorrem sete reações enzimáticas que levam a conversão do fosfo-enol-piruvato (PEP) e da D-eritrose-4-fosfato (E4P) em corismato, sendo precursor de

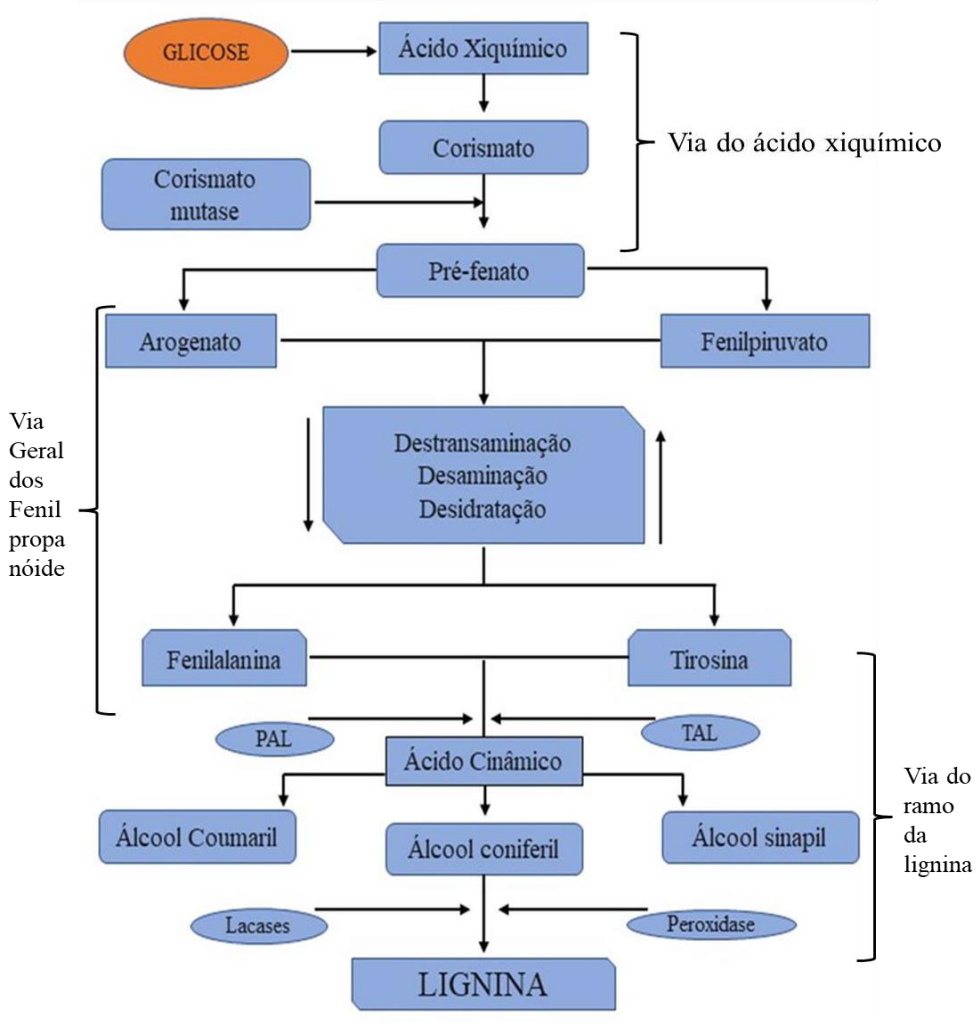
aminoácidos aromáticos, entre eles: fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr) (ROGERS; CAMPBELL, 2004; MAEDA; DUDAREVA, 2012; YOON *et al.*,2015).

A partir do corismato iniciam-se duas vias que originaram Phe e Tyr. Trata-se da via do arogenato, onde o pré-fenato é transaminado em L-arogenato e na sequência ocorre a desidratação/descarboxilação originando a *Phe*, ou desidrogenação/descarboxilação originando *Tyr*, sendo essas conversões catalisados pela arogenato desidratase (ADT) ou a arogenato desidrogenase (ADH), respectivamente (MAEDA; DUDAREVA, 2012).

A via do Fenilpiruvato ocorre de forma reversa a via anterior, onde o pré-fenato é submetido inicialmente a desidrogenação/desidratação/descarboxilação pela pré-fenil desidratase (PDT) ou desidrogenação/descarboxilação pela pré-fenil desidrogenase (PDH), seguido por uma transaminação dos produtos da via formando Phe e Tyr (MAEDA; DUDAREVA, 2012).

Dessa forma, os aminoácidos fenilalanina e tirosina sofrem ação de enzimas específicas, a Fenilalanina amônia-liase (PAL) e a tirosina amônia-liase (TAL), respectivamente, e dando origem ao ácido cinâmico que sofre reações que levam à formação de três diferentes monolignóis: o álcool p-coumaryl, o álcool coniferílico ou o álcool sinapílico, que são incorporados ao polímero de lignina (Figura 2) (DEL RIO, *et al.*,2017; ROGERS; CAMPBELL, 2004).

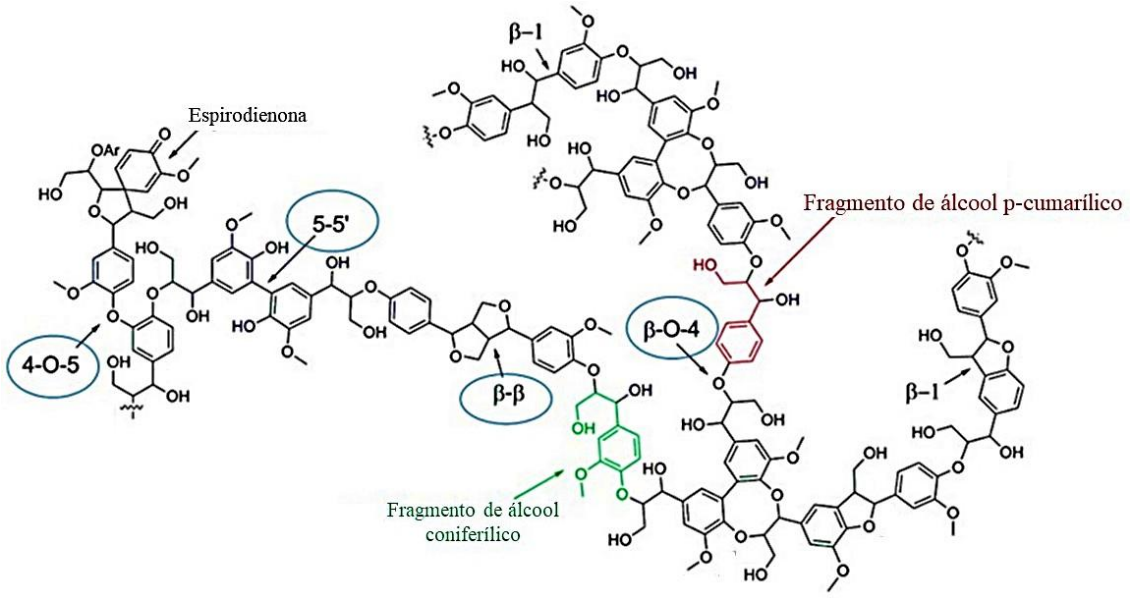
Figura 2. Esquema da via Biosintética da lignina.



Fonte: Próprio Autor
A via Biosintética da lignina tem como início a utilização da molécula de glicose, passando pela via ácido xiquímico/ dos fenilpropanóides e do ramo geral da Lignina.

Há uma grande dificuldade em isolar um único produto da lignina, devido sua composição química ser heterogênea. Essa dificuldade está relacionada à complexidade das ligações químicas e distribuições dos monômeros fenilpropanóides presentes na estrutura das ligninas. Os monômeros se diferenciam por metoxilação entre os carbonos 3 e 5 (C3 e C5, respectivamente), onde o álcool *p*-coumarílico não apresenta grupos metoxílicos. O álcool coniferílico apresenta metoxilação no C3 e álcool sinapílico apresenta metoxilação no C3 e C5. Além disso, outra diferença se dá pela presença dos grupos monolignóis, 4-hidroxifenil (H), guaicil (G) e siringil (S), outra diferença é que a concentração destes monômeros varia de acordo com a planta. (Figura 3) (VINARDELL; MITJANS, 2018).

Figura 3. Estrutura química de uma lignina de madeira macia.



Fonte: Adaptado VINARDELL & MITJANS, 2018.
Apresentação da estrutura de lignina de madeira macia. Indicando os fragmentos de álcool coniferílico (verde) e fragmento de álcool p-cumarilico (vermelho), os círculos em azul indicando as ligações que ligam os componentes.

Estudos recentes, como o trabalho de Ghagane e colaboradores (2017), utilizaram extratos naturais nos quais havia a presença de lignina entre os princípios ativos, neste trabalho foi utilizado o extrato da folha de *Leea indica*, que contém lignina, como um dos compostos ativos, em células do câncer de próstata humana: DU-145 e PC-3, o tratamento com o extrato dessa planta levou as células à apoptose. Paschke e colaboradores (2009), utilizaram o extrato da casca da *Ulmus levais* demosntraram efeito antitumoral em carcinoma endometrial: RL95-2 *in vitro*. Cunha e colaboradores (2014), com extrato do fruto e das folhas de *Garcina mangostana*, observaram efeito antitumoral do extrato etanoico contendo lignina que induziu morte celular por apoptose em células de melanoma murino B16F10.

Garg e colaboradores (2022), indicaram que a lignina um promissor carreador de quimioterápicos para o combate ao câncer. Além disso, é visto na literatura a utilização de três extratos de lignina de diferentes pesos moleculares obtidos do eucalipto através da extração com solvente com acetato de etila, sendo observado o efeito antioxidante desses extratos, demonstrando uma maior aplicabilidade da lignina (WEI, *et al.* 2021).

1.4 MORTE CELULAR

A morte celular programada promove a homeostase no organismo e sua supressão está envolvida com desenvolvimento de doenças, como o câncer. Sua regulação ocorre em nível molecular com

ativação de mecanismos celulares específicos e vias de sinalização intracelular, possibilitando ativação e desenvolvimento do processo que levará à morte celular (OU *et al.*,2017; SIPIETER *et al.*,2014).

Os tipos de morte celular mais estudados são: apoptose, autofagia, necrose, necroptose.

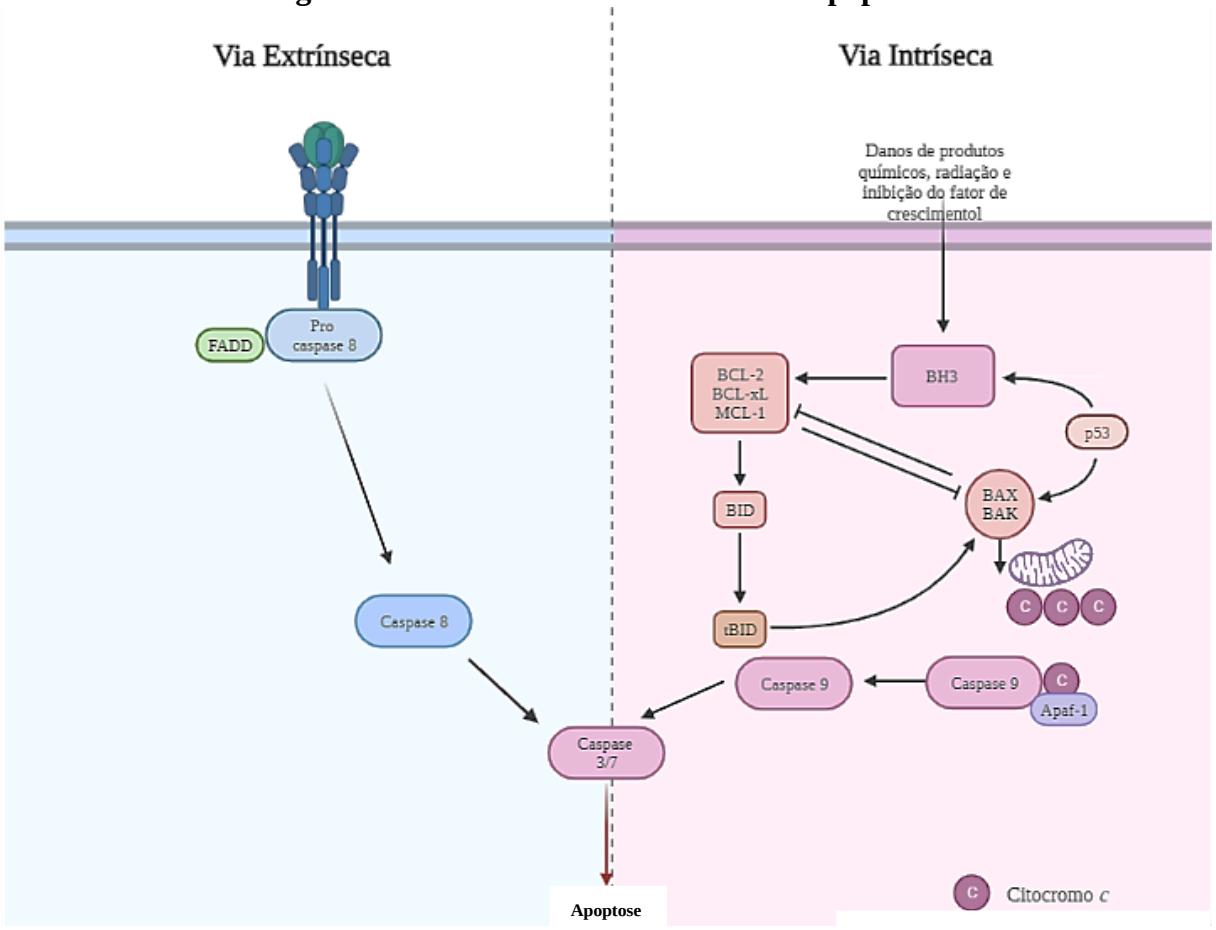
1.4.1 Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico e regulado que induz morte em células senescentes que sofreram algum dano celular (D'ARCY, 2019; BROUSSARD, *et al.*,2018). A apoptose causa várias alterações celulares que são características para esse tipo de morte, como: translocação da fosfatidilserina da membrana interna celular para a face externa da membrana; aumento dos níveis de Espécies reativas de oxigênio (EROs); ativação de caspases; encolhimento celular; condensação da cromatina; fragmentação do DNA; permeabilização da membrana externa mitocondrial com a liberação de citocromo *c* e formação de corpos apoptóticos. O processo inflamatório não é observado, pois a translocação da fosfatidilserina sinaliza para macrófagos fagocitarem as células apoptóticas, diferenciando-se da necrose, que apresentam inflamação local (PRISTTRITO *et al.*,2016; GALLUZZI, 2012).

O processo apoptótico ocorre dependente de caspases iniciadoras como, caspase-8 e 9 que participam das vias extrínseca e intrínseca da apoptose. As caspases efetoras, como caspase-3 e -7 são ativas pelas caspases iniciadoras. As caspases são proteases expressas em forma de pró-caspases, configuração inativa; uma vez ativas, têm a capacidade de iniciar uma cascata proteolítica que amplifica a sinalização do processo apoptótico (SHALINI, 2015; ELMORE, 2007). As proteínas da família Bcl-2 regulam a ativação das caspases, algumas proteínas desta família têm função pró-apoptóticas como: Bax, Bak, Bad e outras proteínas atuam como proteínas anti-apoptóticas como: Bcl-2, Bcl-xL, BAG (ELMORE, 2007).

O evento apoptótico pode acontecer por duas vias: extrínseca, onde o fator de necrose tumoral TNF do inglês *Tumor necrosis fator*, aos receptores, TNFR do inglês *tumor necrosis factor receptor*, presentes na superfície externa da membrana externa ocasionando ativação de uma cascata de sinalização intracelular (Figura 4A), a chamada via intrínseca, que ocorre pela via mitocondrial regulada por Bcl-2 (Figura 4 B) (SHALINI, 2014; LONG *et al.*,2018).

Figura 4. Via extrínseca e intrínseca da Apoptose.



Fonte: Autor

Representação da via extrínseca (A) onde TNF se liga ao receptor presente na membrana celular, desencadeando a formação do domínio de morte, levando ativação das caspases iniciadores e efetores levando a morte apoptótica. B) Fatores levam a célula a estresse, iniciando uma cascata de acontecimentos que geram ação das proteínas pró-apoptóticas desencadeando a morte celular por apoptose. No esquema é apontado as principais moléculas envolvidas.

A via extrínseca pode ser estimulada pela ação de moléculas citotóxicas que se ligam em receptores de morte. A ligação de TNF ao receptor TNFR forma o complexo domínio de morte. Duas proteínas auxiliam na interação da pró-caspase 8, com o complexo de sinalização indutor de morte, são elas: a proteína adaptadora Fas Associado Via Domínio de Morte (FADD do inglês *Fas Associated Via Death Domain)*, e proteína adaptadora receptor do fator de necrose tumoral associada a morte do tipo 1 (TRADD *do inglês Tumor necrosis factor receptor type 1-associated Death).* A partir dessa interação, o complexo de sinalização indutor de morte é formado, onde a caspases-8 leva ativação consequentemente das caspases -3 e -7, que desempenham seu papel causando danos irreversíveis à célula, ocasionando a morte por apoptose (PISTRITTO *et al.*,2016; SIPITIER, *et al.*,2014; D'ARCY, 2019).

A via intrínseca é ativada por danos como hipóxia, elevação das concentrações de cálcio

citosólico e estresse oxidativo. A ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax e Bak), induz a permeabilização da membrana externa mitocondrial, processo que causa liberação de proteínas presentes no interior da mitocôndria, como o citocromo *c* que possui características apoptogênicas. Após ser liberado da mitocôndria, o citocromo *c* se liga ao fator de ativação da protease apoptótica-1 (Apaf-1), o qual se liga a dATP (*Deoxyadenosine triphosphate*- Trifosfato de desoxiadenosina), que, por através de uma alteração conformacional, expõe os domínios de ativação e recrutamento de caspases (CARD do inglês, *caspase activation and recruitment domains*), permitindo, assim, que moléculas de Apaf-1 se agrupem e formem o apoptossomo. O apoptossomo recruta procaspase-9 e ativada em caspase-9, que por sua vez, ativará a caspase- 3, induzindo assim a apoptose (D'ARCY, 2019; PISTRITTO *et al.*,2016).

A apoptose pode ser suprimida por inibidores químicos de pan-caspases, como N - benziloxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (ZVAD-*fmk*) (GALLUZZI, 2012)

1.4.2 Necrose e necroptose

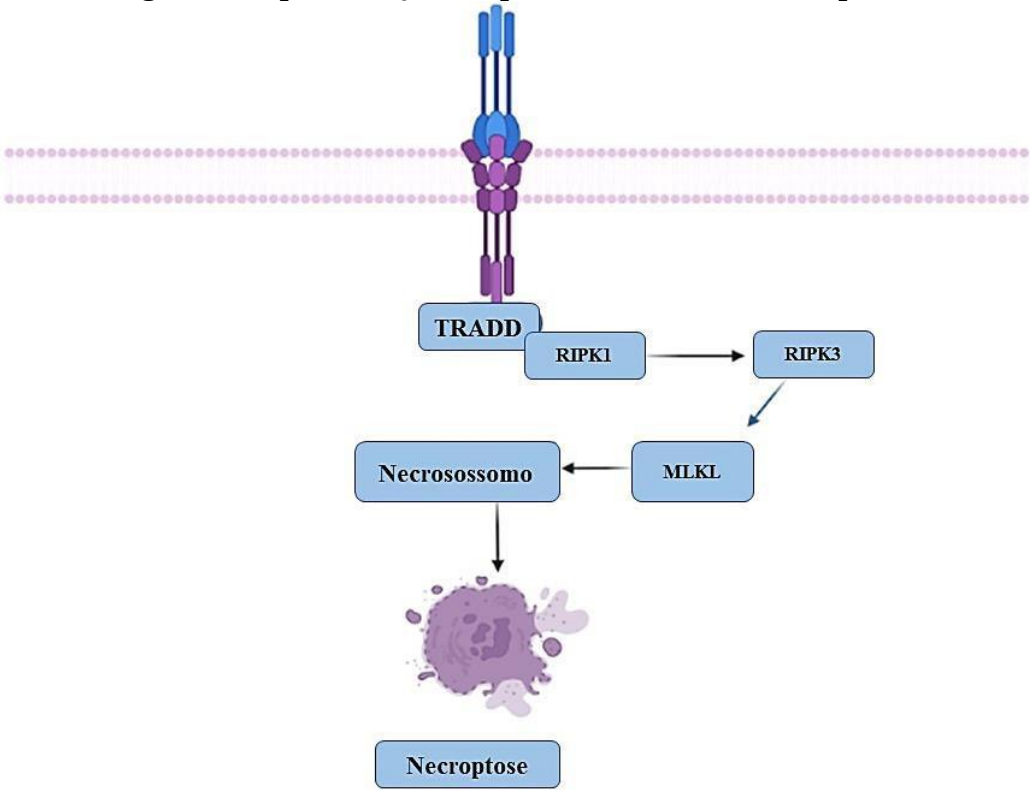
O processo de necrose se difere da apoptose, ocorrendo de forma independente de caspases (MAJNO; JORIS, 1995). A necrose ocasiona inflamação desregulada e passiva, afetando células ao redor. A necrose é um processo que não é regulado nem controlado (KERR *et al.*,1972; MAJNO; JORIS 1995; ELMORE, 2007).

O termo necroptose é utilizado para descrever um processo de morte celular que é uma via alternativa a apoptose extrínseca, ocorre quando a caspase-8 está inativa. A necroptose, também chamada de necrose programada, inicia-se com ligação de um indutor a um receptor de morte, que ativa serina / treonina-proteína quinase 1 (RIPK1 do inglês *Serine/threonine-protein kinase 1*) que é fosforilada e em sequência fosforila serina / treonina-proteína quinase 3 (RIPK3 do inglês *Serine/threonine-protein kinase 3*) (Figura 5) (SIPIETER *et al.*,2014; LINKERMANN; GRENN, 2014).

As formas de RIPK1e RIPK3 formam o complexo conhecido como necrossoma, onde RIPK3 fosforila Domínio de quinase de linhagem mista como pseudoquinase (MLKL do inglês *Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase*-), de maneira reversível. A necrostatina é um inibidor de RIPK1, que pode inibir o processo necroptótico (LINKERMANN; GRENN, 2014; LALAOUI, 2015; DEGTEREV, 2008).

Morfologicamente, a necrose e necroptose são caracterizadas pela ocorrência de um inchaço celular, permeabilização da membrana plasmática e mitocondrial, havendo extravasamento de proteínas do conteúdo celular e mitocondrial (MIZUMURA *et al.*,2016).

Figura 5. Representação simplificada da via da Necroptose



Fonte: Autor
Ligação da proteína ao receptor específico levando a interação com TRADD, que interage com RIPK1, levando a fosforilação de RIPK3, que interage com a pseudoquinase MLKL, levando a formação do necrossomo, desencadeando a necroptose na célula.

1.4.3 Autofagia

O processo autofágico é uma via de caráter de degradação lisossômica, induzida em condições fisiológicas normais e de estresse, onde proteínas, organelas danificadas e patógenos são eliminados em vacúolos denominados autofagossomos. Os lisossomos são, vesículas que possuem em seu interior enzimas digestivas, se fundem ao autofagossomo, formando o chamado autofagolisossomo (XIN *et al.*,2017; HARRIS *et al.*,2017).

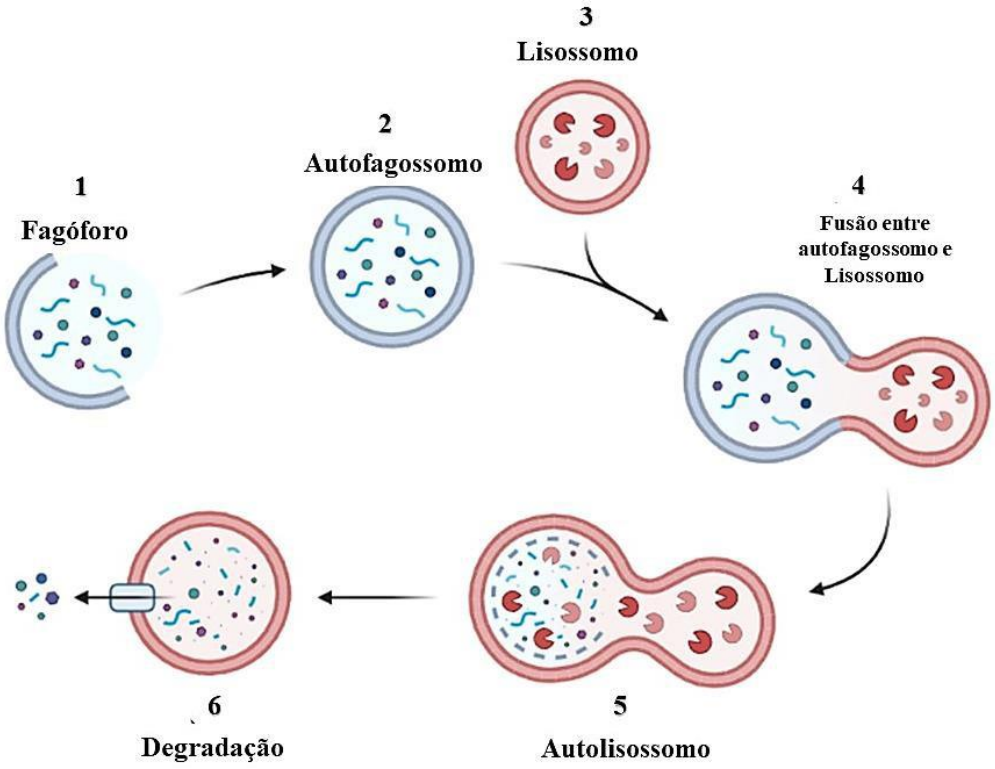
A autofagia ocorre em fases sequenciais, sendo elas, iniciação, nucleação, maturação da vesícula autofágica, fusão e degradação do conteúdo vesicular pelos lisossomos. Para regulação deste processo longo, vias como a PI3K/AKT/mTORC1, são importantes na sinalização da autofagia. A morte autofágica pode ser inibida por 3-metiladenina bloqueando a atividade PI3K classe III, que está ligada ao processo de nucleação da vesícula autofágica. Entretanto, a 3-metiladenina não é um inibidor específico de autofagia (CHUDE; AMARAVADI, 2017; XIN *et al.*,2017; WU, *et al.*,2010).

Existem pouco mais de 30 genes relacionados a autofagia, esses genes foram descobertos a partir de testes genéticos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e

denominados como ATG (relacionado a autofagia). Desses 30 genes, 18 são fundamentais para o desenvolvimento do processo autofágico, e muitos desses genes são encontrados em mamíferos e eucariontes superiores (HE; LEVINE, 2010; KLIONSKY, 2012).

A formação da expansão da membrana autofágica é mediada pelos sistemas de conjugação de proteínas que se assemelham a ubiquitina e o sistema LC3 (Atg8) e Atg 12. O LC3 (I) é o precursor da via, sendo processado pela protease Atg 4, que deixa o LC3 na forma madura, onde, após ação de uma proteína semelhante a ubiquitina E1, há formação de uma forma lipídica menor de LC3 (I) que, interagindo com E2 e Atg3, formam LC3 (II) que, junto a Atg12, irão desencadear uma cascata a qual culminará na iniciação do estágio de alongamento da formação da membrana de isolamento (LIMBERGEN *et al.* 2009).

Figura 6. Representação simplificada da via autofágica



Fonte: Autor

Representação do processo autofágico. 1) Elongação do fagóforo em torno das organelas danificadas. 2) Formação do autofagossomo, presente no seu interior as organelas fagocitadas. 3) Lisossomo, organela que tem presente em seu interior enzimas digestivas. 4) Fusão entre o autofagossomo e o lisossomo. 5) Formação do autofagolisossomo. 6) Degradação das organelas pelas enzimas.

Os tipos de morte celular programadas apresentadas são de grande importância no controle da proliferação celular, já que em células tumorais tais processos são inibidos, contribuindo para a progressão tumoral. Além do mais composto que apresentam atividade como inibição da migração, invasão celular e diminuição da formação de colônias se destacam

em tratamentos para os mais diversos tipos de canceres (SELIMOVIC *et al.*,2013).

Visto isso, o estudo de novas drogas desenvolvidas a partir de compostos naturais, que desencadeiem nas células processos que levam à morte celular e não apresentem citotoxidade em células não tumorais é o caminho para novas terapias se tornarem adjuvantes as quimioterapias atuais.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a lignina é um composto promissor para o desenvolvimento de novos compostos com ação antitumoral. Após tratamento de lignina na concentração de 60 μM em células de melanoma murino e humano foi visto uma diminuição significativa da viabilidade tumoral, onde experimentos posteriores indicam que o tratamento de lignina leve as células a processos de morte celular, como apoptose e autofagia. Além disso foi visto que em uma tratamento com concentração subtóxica de 3 μM de lignina nas células de melanoma utilizadas no estudo a lignina foi capaz de inibir a migração e invasão celular e em células B16F10-Nex2 inibiu a proliferação de colônias.

Assim a lignina apresenta resultados iniciais promissores, os quais são possíveis seguir dois caminhos nesse trabalho separadamente, seguindo sobre a avaliação mais a fundo da lignina em relação aos processos de morte celular, além de poder ser estudado a questão de se migração e invasão e avaliação se há a interferência no ciclo celular. Reforçando ser um composto de grande versatilidade para o estudos relacionados ao câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Determinar os efeitos citotóxicos do composto lignina extraído da casca do *Eucalypto sp.* em células de melanoma murino B16F10-Nex2 e em células de melanoma humano SK-MEL-25.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFÍCOS

→ Determinar a atividade antitumoral *in vitro* da lignina em células de melanoma murino (B16F10-Nex2) e melanoma humano (SK-MEL-25);

→ Determinar o menor tempo em que a lignina inicia o efeito antitumoral em células B16F10-Nex2.

→Verificar a degradação do DNA em células tratadas com lignina;

→ Analisar a ativação das caspases;

→ Analisar os efeitos citotóxicos da lignina na presença dos inibidores de caspase (Z-VAD-*fmk*), necroptose (necrostatina) e inibidor de ânion superóxido (N-acetil L-cisteina);

→ Avaliar a inibição da migração e invasão celular de células de melanoma murino e humano;

→ Analisar a inibição da formação de colônias em células de melanoma murino após tratamento com lignina.

3. MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

As células de melanoma murino B16F10-Nex2 e humano SK-MEL-25 foram gentilmente cedidas pelo professor Luiz R. Travassos (*in memoriam)* da Unidade de Oncologia Experimental da Universidade Federal de São Paulo (UNONEX-UNIFESP). A linhagem tumoral B16 foi obtido de camundongos C57BL/6 que desenvolveram melanoma. No Instituto Ludwing de pesquisas contra o câncer, Fidler em 1975, isolou as células de melanoma murino e depois de diversas passagens *in vivo*, obteve 10 linhagens com diferentes graus de agressividade, indo de F1 a menos agressiva até F10 a mais agressiva. A equipe da Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX), a partir da linhagem B16F10, produziu seis sublinhagens, Nex1 a Nex6 e dentre elas a linhagem B16F10-Nex2 foi a escolhida por apresentar a maior grau de agressividade.

As células B16F10-Nex2 foram cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 em meio RPMI-1640 suplementado com 10 mM de HEPES, 24 mM de bicarbonato de sódio, 40 mg/mL de gentamicina e 10% soro fetal bovino (SFB), pH 7,4.

A linhagem de melanoma humano SK-MEL-25 (RRID: CVCL_6028) foi originalmente obtida do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (NY, EUA) (*Carey et al.*,1976). As células foram cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 em meio DMEM *(Dulbecco's Modified Eagle Medium)* suplementado com 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 24 mM de bicarbonato de sódio, 40 mg/L de gentamicina (Hipolabor, MG, Brasil) e 10% (v/v) de SFB.

3.2 LIGNINA

As amostras de lignina foram extraídas e purificadas da casca do *Eucalyptus sp*., pela CIA SUZANO–PAPEL E CELULOSE. As amostras liofilizadas estavam com 95% de pureza e peso molecular de 2.500 Daltons, segundo as informações fornecidas pela CIA SUZANO–PAPEL E CELULOSE, Suzano, SP, que cedeu gentilmente a lignina para realizarmos os testes.

Para utilização nas linhagens celulares, a lignina foi inicialmente ressuspendidas em DMSO. Para o tratamento das células, a solução de lignina foi diluída em meio RPMI (1µL da solução de lignina + 99 µL de meio).

3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA LIGNINA

Para determinação do efeito citotóxico da lignina em células tumorais, as células de melanoma murino B16F10-Nex2 ($5x10^3$) e melanoma humano SK-MEL-25 ($5x10^3$), foram cultivadas em placas de 96 poços. Após 24h foi adicionado lignina nas concentrações: 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 μM. As células não tratadas (controle) foram incubadas com meio RPMI (B16F10-Nex2) ou DMEN (SK-MEL-25) com 1% de DMSO. Após 24h de incubação com a lignina, as células foram lavadas com em tampão de fosfato 1X (PBS) (140 M de NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM de Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4) e PBS/EDTA (PBS com 0,02% EDTA), desaderidas da placa de cultura com tripsina 1X (1:10 em PBS) e sua ação neutralizada com meio de cultura. As células foram contadas na presença do corante de exclusão *Trypan blue* na proporção de 1 para 1, na câmara de Neubauer, com o auxílio do microscópio óptico invertido ZEISS. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata (adaptado ARRUDA, *et al.*,2012).

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIGNINA ATRAVÉS DE UMA CURVA DE TEMPO

As células B16F10-Nex2 ($5x10^3$) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio RPMI 1640 com 10% de SFB e foram incubadas na presença de lignina nas concentrações 24 e 60 μM, nos seguintes tempos: 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24h. As células não tratadas (controle) foram cultivadas com meio RPMI e 1% de DMSO. O processo de contagem das células viáveis foi realizado como descrito no item 3.3. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata (adaptado ARRUDA, *et al.*,2012).

3.5 ENSAIO COM INIBIDORES DE MORTE E EROs

Para determinar a atividade citotóxica da lignina na presença dos inibidores de morte celular e de EROs, as células foram incubadas na presença de; necrostatina (necroptose), N-acetil L-cisteína (inibidor de espécies reativas de oxigênio), 3-metiladenina (autofagia) e Z-VAD-*fmk* (apoptose). As células B16F10-Nex2 ($5x10^3$) foram cultivadas em placa de 96 poços com meio RPMI 1640 com 10% de SFB e incubadas a 37 °C e 5% de CO_2. Inicialmente, foi realizado uma pré-incubação com necrostatina 50 μM ou com N-acetil L-cisteína 10 mM por 2h; ou com 3-metiladenina por 1h; ou com Z-VAD-*fmk* 2 μM por 2h em 3 experimentos independentes. Após período de incubação, foi adicionado lignina nas concentrações de 24 e

60 μM. As células não tratadas foram incubadas com meio RPMI e 1% de DMSO. Como controle negativo também foram utilizadas células tratadas apenas com inibidores diluídos em RPMI e 1% de DMSO. O processo de contagem das células foi realizado como descrito no item 3.3. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS CASPASES

Para a análise da ativação de caspase foi utilizado o Kit *"Apotarget Caspase Colorimetric Protease Assay"* (*Invitrogen*), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. O método consiste em determinar a ativação das caspases, sendo possível quantificar a atividade da enzima por reconhecer a sequência de aminoácidos DEVD-pna (caspase-3), IETD-pna (caspase-8), e LEHD-pna (caspase-9). Com a clivagem do substrato pelas caspases, a absorção de luz pode ser quantificada utilizando um espectrofotômetro, já que a presença de peptídeos sintéticos marcados no C terminal com para-nitroanilina (pNA) é responsável por emitir luz e assim possível calcular a atividade das caspases. As células que não foram incubadas na presença de lignina foram utilizadas como controle. Células B16F10-Nex2 foram cultivadas em garrafa de cultura de 75 cm^3 em meio RPMI 1640 com 10% de SFB, incubadas com lignina na concentração de 60 μM a 37 °C e 5% de CO_2 por 30 minutos. Após o tempo de incubação as células foram lavadas com PBS 1x e desaderidas com PBS-EDTA (PBS com 0,02% EDTA), centrifugadas e foi realizada a contagem e normalização das células em uma densidade celular de $3x10^6$. As células foram lisadas com o tampão de lise do *kit*. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford, descrito no item 3.7. As amostras foram diluídas no tampão de reação do *Kit* (*Caspase Colorimetric Protease Assay*) contendo os substratos: DEVD (caspase 3), IETD (caspase 8) e LEHD (caspase 9). A reação foi incubada por 2h e posteriormente a absorbância foi medida em um comprimento de onda de 405 nm no leitor de placa Multiskan FC Thermo Scientific.

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA POR BRADFORD

Para dosar as proteínas do ensaio de determinação da atividade de caspase, foi realizada uma curva padrão contendo 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 μg/mL de solução de albumina em cada poço em água destilada em uma placa de 96 poços. Em poços separados foram adicionados 1 μL do lisado de células obtidas após tratamento com lignina e 50 μL de água destilada. Em seguida foi adicionado em todos os poços 200 μL de reagente de Bradford. A absorbância foi determinada em comprimento de onda de 595nm no leitor de placa Multiskan

FC Thermo Scientific. Os dados da curva padrão foi plotado no gráfico o qual foi possível determinar a equação da reta e assim analisar a quantidade de proteína de cada amostra.

3.8 ENSAIO DE TUNEL

A fragmentação de DNA foi analisada utilizando o *Kit* de TUNEL (*TdT-mediated dUTP-X nick end labeling*) "*In Situ Cell Death Detection kit*, AP" (*Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany*) de acordo com as instruções do fabricante.

As células B16F10-Nex2 ($1x10^4$) foram plaqueadas em lamínulas de vidro e incubadas com RPMI com 10% de SFB incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 e tratadas com 24 µM de lignina por 24h. Após incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, fixadas com formaldeído 3,5% e permeabilizadas com *triton* X-100 a 0,1%. As células foram novamente lavadas com PBS e incubadas com os reagentes do kit ("*enzyme solution*" e "*label solution*") ao abrigo da luz por 1h. Posteriormente, as células foram lavadas e as células tratadas e não tratadas foram incubadas com de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindola) (*Invitrogen*) por 10 minutos. As lamínulas foram aderidas as lâminas na presença de 4 µL vectashield (*Vector*). As células foram observadas em um microscópio de fluorescência *Olympus* BX51 no aumento de 600x na presença de óleo de imersão. O DAPI se intercala no DNA e quando excitado com luz UV emite coloração azul no comprimento de onda de 461 nm, após ser excitado em um comprimento de onda de 358 nm. A fragmentação do DNA marcada com TUNEL foi observada quando excitado no comprimento de 494 nm emitindo luz verde em um comprimento onda de 521 nm.

3.9 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Células B1F10-Nex2 e células SK-Mel-25 foram cultivadas $5x10^4$ em placa de 12 poços para determinar o efeito da lignina sobre a migração celular. Após 24 h foram feitas lesões verticais nos poços com auxílio de uma ponteira de micropipeta de 1ml. As células foram t ratadas com 3 µM de lignina e as células não tratadas (controle) foram cultivadas em RPMI na presença de 0,6% DMSO. As imagens foram capturadas nos tempos 0, 2, 4 e 24h e a distância percorrida pelas células foi determinada subtraindo-se a distância medida no tempo inicial do experimento (0h) e após 24h, utilizando o *software ImageJ* 1.41A. Foi utilizado análise de variância *two-way* ANOVA no programa *GraphPad Prsim5®* (Adaptado de RODRIGUEZ *et al.*,2005).

3.10 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR

Nos ensaios de invasão celular foram utilizando placas de *Transwell* (*Greiner Bio-One*, poro de 8 µm), e o efeito da lignina nas células foi avaliado em uma camada de Matrigel (*Corning*®) (1:6 em meio de cultura RPMI E DMEN sem SFB) colocado sob as câmaras *Transwell* superiores, incubadas durante 30 minutos a 37 °C e 5% de CO_2. As células de melanoma murino B16F10-Nex2 ($5x10^4$) e células SK-MEL-25 ($2,5x10^4$) foram cultivadas nos *transwells,* incubadas a 37 °C e 5% de CO_2, em meio RPMI 1640 sem SFB e meio DMEN sem SFB, respectivamente. As células foram incubadas com 3 µM de lignina. No compartimento inferior dos poços da placa foi adicionado meio RPMI ou DMEN com 15% de SFB, para auxiliar na atração das células. Após 24h, as células não invasivas, presentes na superfície da membrana, foram removidas com auxílio do *swab*. As células que migraram através do *Transwell* foram fixadas em formaldeído 4% por 15 minutos, lavadas com PBS 1x, permeabilizadas com Triton-X 0,05% por 5 minutos e coradas com 0,05% de solução de cristal violeta por 45 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS 1x e observadas com aumento de 20x em Microscópio Óptico Invertido *Zeiss*®. As imagens foram capturadas em 7 campos aleatórios de cada uma das triplicatas e realizada a contagem manual de células invasivas para análise estatística (Adaptado de HU *et al.*,2018).

3.11 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

As células B16F10-Nex2 ($2x10^5$) foram cultivadas em placa de 12 poços com o objetivo de analisar a formação de colônias após tratamento com dose subtóxica de lignina. As células não tratadas receberam meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de DMSO. As células tratadas foram incubadas com 3 µM de lignina com 1% de DMSO quando as células foram plaqueadas, após 5 dias repetiu o tratamento com 3 µM e no sétimo dia após o primeiro tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com álcool 70% por 10 minutos em temperatura ambiente, lavadas novamente com PBS 1X. As colônias foram coradas com cristal violeta 0,05% diluído em H_2O *Mili-Q* por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS 1X. As colônias foram contadas com auxílio de uma lupa no aumento de 4X. Os dados foram analisados em *GraphPad Prism5* (MASSAOKA *et al.*,2014).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

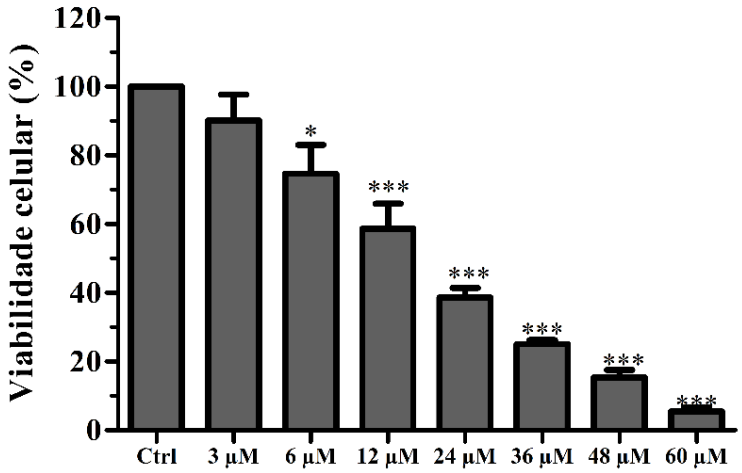
Todos os experimentos realizados no presente trabalho foram feitos três repetições independentes em triplicata, com resultados expressando média e desvio padrão em cada ensaio. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism5*® pela análise de variância (ANOVA) entre controles e tratados com mais de duas variáveis ou teste *t* de *Student* quando relacionadas apenas duas variáveis.

4. RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10- NEX2 E HUMANO SK-MEL-25.

Para determinar o efeito antitumoral da lignina nas linhagens de melanoma murino B16F10-Nex2, as células foram plaqueadas e incubadas por 24h na presença da lignina nas concentrações 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 µM. As células foram contadas na presença de Trypan Blue e os resultados mostraram que em células de melanoma murino, a maior concentração utilizada (60 µM), diminui a viabilidade celular em 95% e a EC50 calculada foi de 24±4,8 µM (Figura 7).

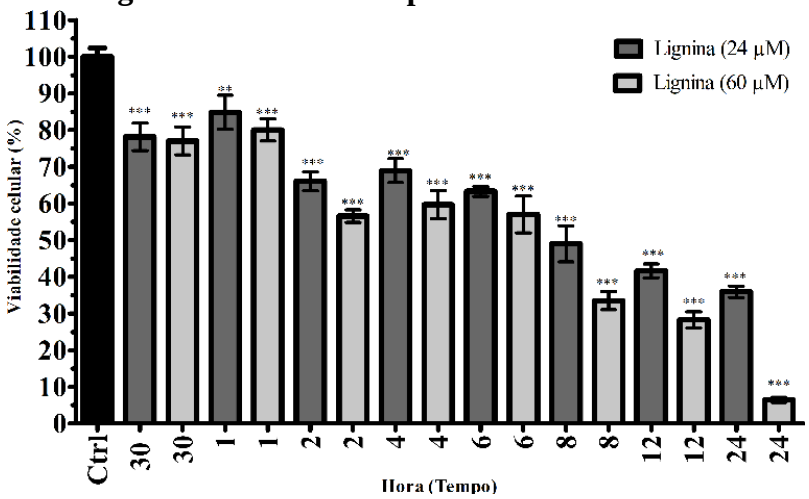
Figura 7. Viabilidade de células B16F10-Nex2 tratadas com lignina.



As células foram tratadas com lignina nas concentrações 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 µM por 24h. As células não tratadas (Ctrl) receberam meio RPMI e 1% de DMSO. Após incubação, as células foram desaderidas com tripisina, coradas com *trypan-blue* e as células viavéis foram contadas em câmara de Neubauer com auxilio de microscopio óptico invertido. Foram realizados três experimentos em triplicata. ANOVA.*$p < 0,05$; ***$p < 0,001$.

Após determinar a EC50 no ensaio de viabilidade celular, realizamos uma curva de tempo. As células foram tratadas com 24 e 60 µM por 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24h. Pode-se observar que a partir dos 30 minutos de incubação com 24 e 60 µM de lignina houve uma diminuição significativa da viabilidade celular. Além disso, a diminuição da viabilidade continua a ocorrer de forma gradativa nos tempos testados. Indicando que a lignina tem um efeito tempo dependente sobre a viabilidade celular (Figura 8).

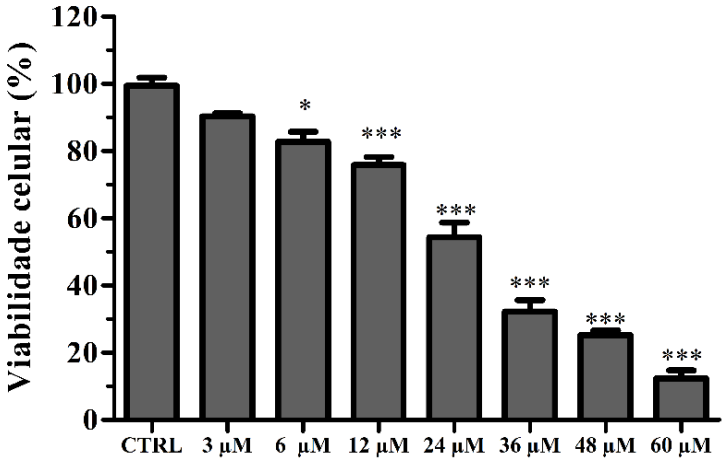
Figura 8. Curva de tempo com B16F10-Nex2.



As células foram tratadas com lignina nas concentrações de 24 µM e 60 µM por 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24h. As células não tratadas (Ctrl) foram incubadas com meio RPMI e 1% de DMSO. As células foram desaderidas com tripisina, coradas com *Trypan blue* e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer. Foram realizados três experimentos em triplicata. ANOVA. ***p*<0,05; ****p*< 0,001.

As células de melanoma humano SK-MEL-25 também foram tratadas com a lignina nas concentrações de 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 µM. Após três experimentos independentes, foi visto que após 24h de incubação houve uma diminuição da viabilidade celular, indicando que a lignina também foi citotóxica em células de melanoma humano, quando comparado as células não tratadas (controle). Foi determinado que a concentração de 60 µM de lignina diminui a viabilidade celular em 90%. A EC50 calculada foi de 29,4±4,9 µM (Figura 9).

Figura 9. Viabilidade Celular em SK-MEL-25 tratadas com lignina.



As células SK-MEL-25 foram tratadas com lignina nas concentrações 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 µM por 24h. As células não tratadas (CTRL) receberam meio RPMI e 1% de DMSO. As células foram desaderidas com tripisina, coradas com trypan-blue e as células viaveis foram contadas em câmara de Neubauer. Foram realizados três experimentos em triplicata. ANOVA. **p*<0,05; ****p*< 0,001.

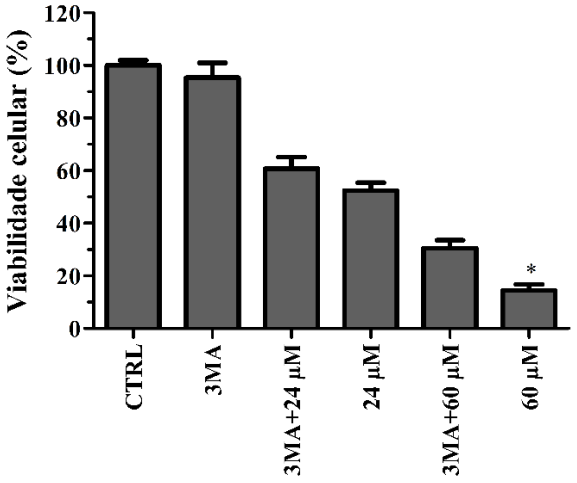
4.2 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE PROMOVIDA PELA LIGNINA

Os experimentos realizados com os inibidores de morte celular são utilizados para desenhar um panorama que evidencie os possíveis processos que estão ocorrendo nas células após exposição ao composto.

A linhagem celular utilizada para esses experimentos foi a B16F10-Nex2. As células foram pré-incubadas com os inibidores de morte celular por 1 ou 2h. Utilizamos neste ensaio inibidor de caspases (Z-VAD-*fmk*), de necroptose (necrostatina) e de autofagia (3-MA). As células foram tratadas com lignina nas concentrações de 24 e 60 µM por 12h na presença dos inibidores.

Os resultados indicam que o inibidor de autofagia, 3-Metiladenina (3MA) (2 mM), ao ser incubado na presença de lignina, inibe parcialmente o efeito citotóxico do composto quando comparado as células que foram incubadas somente na presença de lignina (Figura 10).

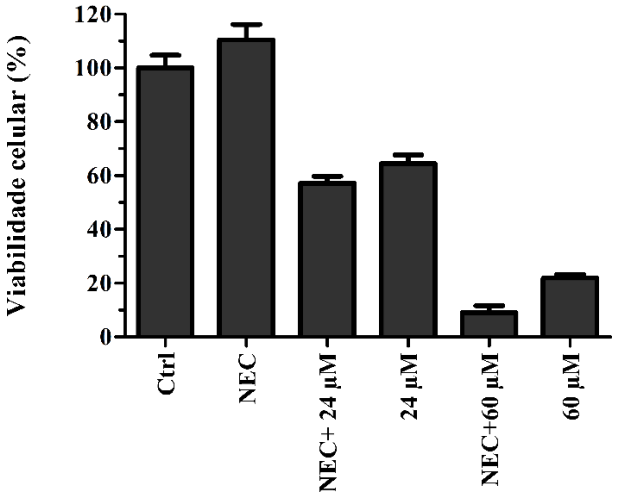
Figura 10. Inibidor de morte celular 3-MA



As células B16F10-Nex2, foram pré-incubadas com 3-MA e após período de incubação foram tratadas com lignina nas concentrações de 24 µM; 3-MA + 24 µM e 60 µM; 3-MA + 60 µM por 12h. As células não tratadas (Ctrl) foram incubadas com meio RPMI e 1% de DMSO e as células tratadas somente com o inibidor (3 -MA) em meio RPMI e 1% de DMSO. Como controle positivo, as células foram tratadas somente com lignina (60 µM). As células foram desaderidas com tripisina, coradas com *trypan-blue* e as células viaveis foram contadas em câmara de Neubauer. Foram realizados três experimentos em triplicata. ANOVA. *p<0,05.

Para investigarmos a possibilidade de a lignina induzir necroptose, utilizamos o inibidor de necroptose, necrostatina (NEC) (50 µM). As células foram pré-incubadas com necrostatina e incubadas com lignina nas concentrações de 24 e 60 µM na presença do inibidor. Não houve inibição do efeito antitumoral da lignina em células incubadas na presença de necrostatina (Figura 11).

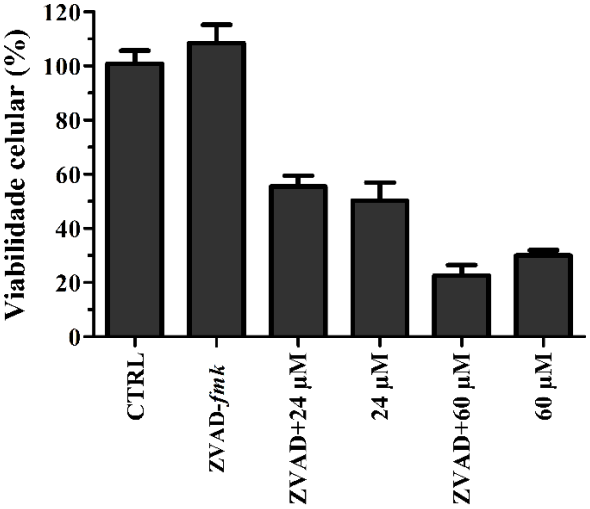
Figura 11. Inibidor de morte NEC 12h



As células B16F10-Nex2, foram pré-incubadas com NEC e após período de incubação foram tratadas com lignina nas concentrações de 24 µM; NEC + 24 µM e 60 µM; NEC+ 60 µM por 12h. As células não tratadas (Ctrl) foram incubadas com meio RPMI e 1% de DMSO e as células tratadas somente com o inibidor (NEC) em meio RPMI e 1% de DMSO. Como controle positivo, as células foram tratadas somente com lignina (60 µM). As células foram desaderidas com tripisina, coradas com *trypan-blue* e as células viaveis foram contadas em câmara de Neubauer. Foram realizados três experimentos em triplicata. ANOVA.

Para investigarmos a indução de apoptose, utilizamos um inibidor de pan-caspases Z-VAD-*fmk*. As células foram pré-tratadas com 20µM de Z-VAD-*fmk* por 12h tratadas com lignina nas concentrações 24 e 60 µM na presença do inibidor por 12h. Os resultados mostraram que o inibidor de caspases não diminui o efeito antitumoral da lignina nas células (Figura 12).

Figura 12. Inibidor de morte ZVAD-*fmk*

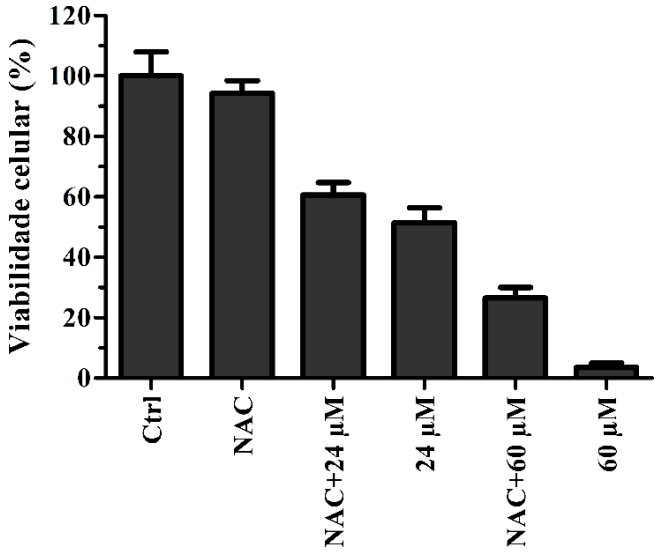


As células B16F10-Nex2, foram pré-incubadas com 3-MA e após período de incubação foram tratadas com lignina nas concentrações de 24 µM; Z-VAD-*fmk* + 24 µM; e 60 µM; Z-VAD-*fmk* + 60 µM por 12h. As células não tratadas (Ctrl) foram incubadas com meio RPMI e 1% de DMSO e as células tratadas somente com o inibidor (Z-VAD-*fmk*) em meio RPMI e 1% de DMSO. Como controle positivo, as células foram tratadas somente com lignina (60 µM). As células foram desaderidas com tripisina, coradas com *trypan-blue* e as células viaveis foram contadas em câmara de Neubauer. Foram realizados três experimentos em triplicata. ANOVA.

4.3 EFEITOS DA LIGNINA NA PRESENÇA DE INIBIDOR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

As células B16F10-Nex2 foram pré-tratadas com o inibidor de espécies reativas de oxigênio (EROs), NAC (10 µM) por 2h e após incubação foram tratadas com lignina nas concentrações de 24 e 60 µM na presença do inibidor. Foi observado que, na presença do inibidor de EROS (NAC), houve uma diminuição parcial do efeito citotóxico da lignina em relação as células que foram incubadas somente com lignina, indicando assim que a lignina pode estar induzindo aumento de EROS nas células de melanoma murino (Figura 13).

Figura 13. Inibidor de Espécies Reativas de Oxigênio.



As células B16F10-Nex2, foram pré-incubadas com NAC e após período de incubação foram tratadas com lignina nas concentrações de 24 µM; NAC + 24 µM e 60 µM; NAC + 60 µM por 12h. As células não tratadas (Ctrl) foram incubadas com meio RPMI e 1% de DMSO e as células tratadas somente com o inibidor (NAC) em meio RPMI e 1% de DMSO. Como controle positivo, as células foram tratadas somente com lignina (60 µM). As células foram desaderidas com tripisina, coradas com *trypan-blue* e as células viaveis foram contadas em câmara de Neubauer. Foram realizados três experimentos em triplicata. ANOVA. $*p<0,05$.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CASPASES APÓS TRATAMENTO COM LIGNINA EM CELULAS B16F10-NEX2.

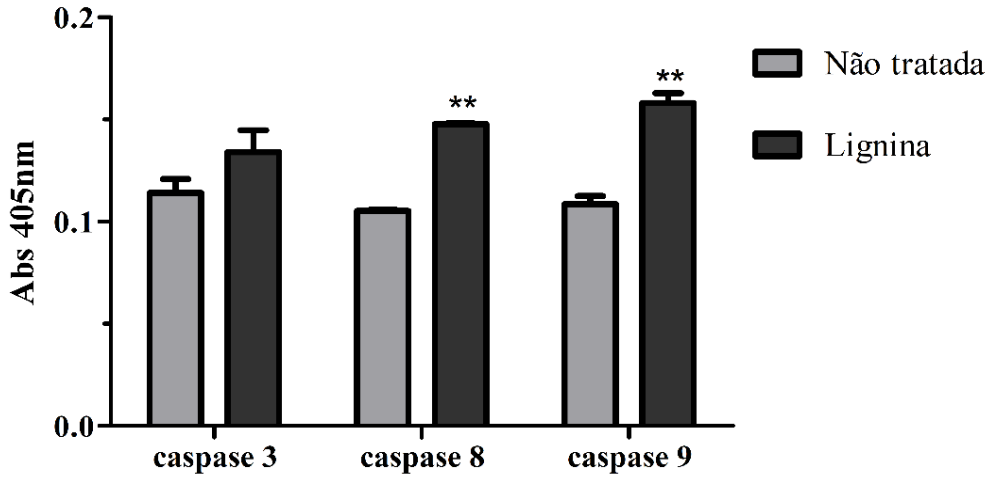
A determinação da ativação de caspase após tratamento com lignina foi realizada através do método colorimétrico em células de melanoma murino. As células foram cultivadas em garrafas T75 (75 cm³ de volume), o tratamento foi de 60 µM de lignina ressuspendidas em DMSO e diluída em meio RPMI por 30 minutos.

Após o período de incubação as células tratadas e não tratadas foram desaderidas, lavadas e lisadas com o tampão de lise do *kit* de caspases contendo os substratos: DEVD-pna

(caspase 3), IETD-pna (caspase 8) e LEHD-pna (caspase 9) e a reação foi incubada por 2h, só sendo possível calcular a atividade das caspases devido a presença de peptídeos sintéticos marcados no C-terminal com para-nitroanilina (pNA) é o qual é responsável por emitir luz. A ativação das caspsases-3, -8 e -9 foi determinada pela absorbância das amostras, que foram medidas em comprimento de onda de 405 nm no leitor de placa Multiskan FC (Thermo Scientific).

Os resultados deste experimento demonstram que houve aumento significativo das caspses-8 e 9, das vias extrínseca e intrínseca da apoptose, respectivamente. Não foi observado o aumento da ativação da caspase-3 após 30 minutos de incubação com lignina (Figura 14).

Figura 14. Determinação da ativação de caspase após tratamento com lignina.



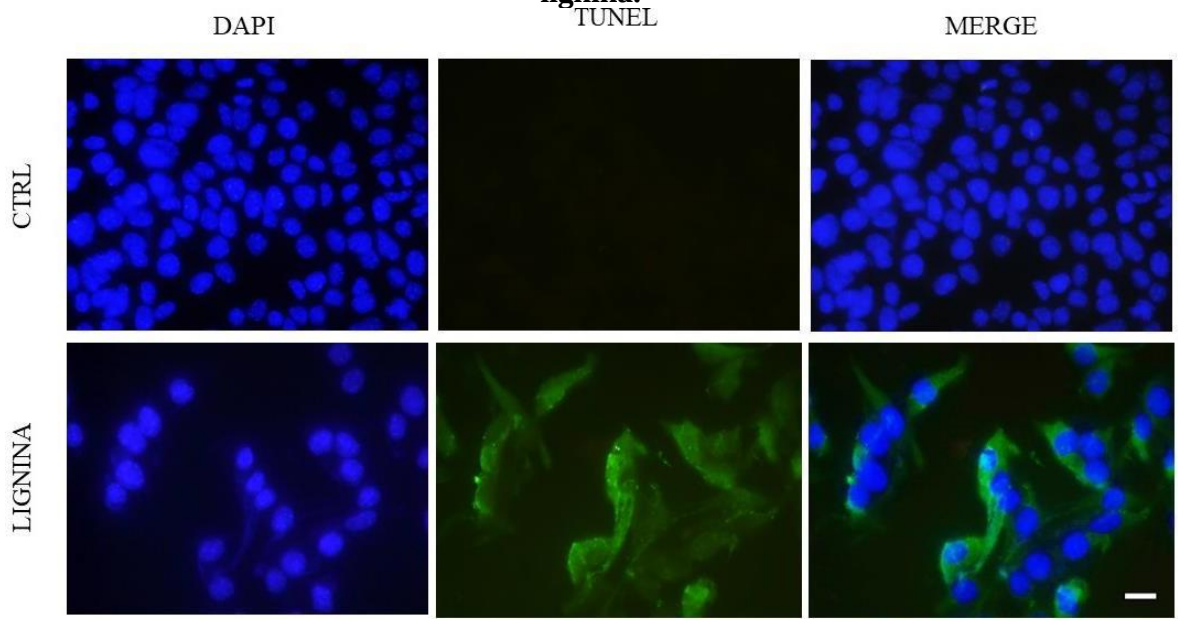
As células de B16F10-Nex2, foram tratadas com lignina na concentração de 60 µM por 30 minutos, incubadas a 37 °C, 5% de CO_2. As células foram lisadas com o tampão de lise do kit. O lisado celular foi incubado na presença os substratos: DEVD-pna (caspase 3), IETD-pna (caspase 8) e LEHD-pna (caspase 9) e a reação foi incubada por 2h. A absorbância foi determinada a 400 nm no leitor de placa . *Two-way* ANOVA. $^{**}p < 0{,}01$.

4.5 ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS B16F10-Nex2 APÓS TRATAMENTO COM LIGNINA

As células de melanoma murino B16F10-Nex2 ($1x10^4$) foram cultivadas em placas de 24 poços. Após 24h, as células foram tratadas com 24 µM de lignina por 24 h. As células não tratadas foram incubadas com meio RPMI e 1% de DMSO e utilizadas como células controle do experimento. Após incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e incubadas com o *kit* de TUNEL e DAPI. As lâminas foram confeccionadas e observadas no microscópio de fluorescência. Na figura 15 é possível observar a marcação por DAPI nas células tratadas e não tratadas, pois o DAPI é um fluoróforo que intercala no DNA. Observamos a marcação com TUNEL apenas em células que foram incubadas com lignina que induziu a fragmentação do

DNA. Também é possível sugerir que houve ruptura da lâmina nuclear, pois o DNA não está delimitado ao núcleo celular, mas encontra-se espalhado no citoplasma.

Figura 15. Fragmentação do DNA em células B16F10-Nex2 após tratamento com lignina.



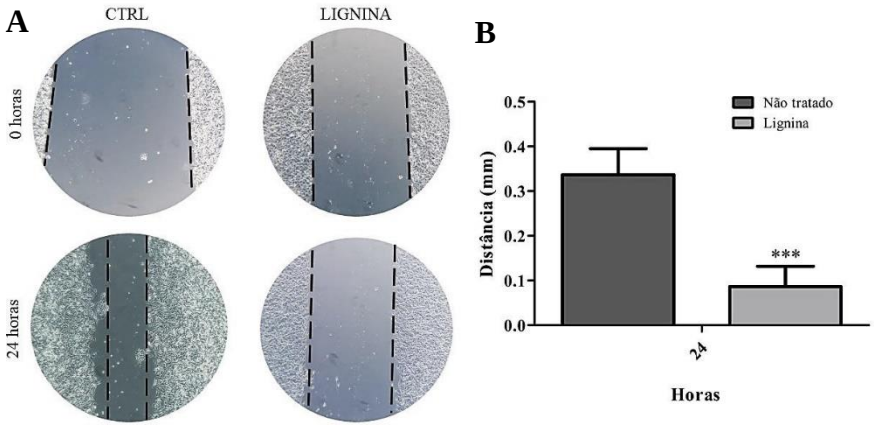
A células B16F10-NEX2 foram tratadas com 24 µM de lignina e marcadas com o DAPI e TUNEL e realizada a leitura em um microscópio de fluorescência. As células não tratadas apresentam a marcação com DAPI, mas não apresentam marcação por TUNEL. Células tratadas com lignina apresentaram a fragmentação do DNA assim sendo marcadas por TUNEL. MERGE sobreposição das imagens. Escala 20 µM.

4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR POR "WOUND HEALING ASSAY" COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO E HUMANO

Além de o efeito citotóxico induzido pela lignina, também fomos avaliar a inibição da migração e da invasão celular, que são estratégias para inibir o desenvolvimento de metástases.

O experimento de migração foi realizado por *wound healing assay*, no qual foi feito uma lesão vertical nos poços onde as células foram cultivadas. Este ensaio foi realizado com as linhagens celulares B16F10-Nex2 e SK-MEL-25 incubadas com uma concentração subtóxica de 3 µM de lignina. Foram capturadas imagens nos tempos de 0 e 24h (Figura 16A) e a partir dessas imagens realizou-se a análise da distância percorrida pelas células, utilizando o programa *ImageJ*. Foi observado que a lignina inibiu as migrações das células de melanoma murino, onde as células não tratadas migraram aproximadamente 0,33 ± 0,05 mm, já as células tratadas migraram 0,08 ± 0,03 mm. Os nossos resultados mostram que as células tratadas migraram aproximadamente 71% a menos que as células não tratadas (Figura 16B).

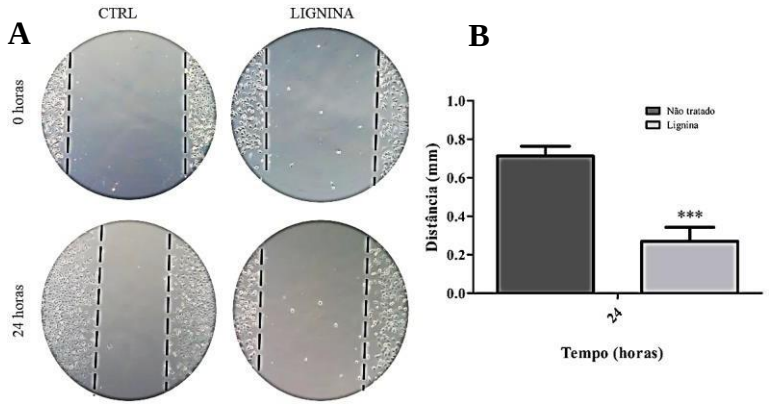
Figura 16. Migração celular com células B16F10-Nex2



As células foram $2x10^5$ cultivadas após 24 horas foi feita a lesão vertical e incubadas com 3 µM de lignina as células não tratadas (controle) foram incubadas na ausência de Lignina, com 1% de DMSO e meio RPMI. Foram capturadas imagens nos tempos 0, 2, 4 e 24 horas para análise da distância percorrida pelas células. Apresenta três experimentos realizados independentes, comparando as fotografias de 0 e 24h das células tratadas e não tratadas. Para determinar a distância percorrida foi utilizado o programa *ImageJ*, subtraindo os valores aferidos em 2h, 4h e 24h do valor aferido em 0h, para obter o valor percorrido pelas células. Foram realizados 3 experimentos em triplicata independentes. Two-way Anova. ***$p<$ 0,001.

As células de melanoma humano também foram incubadas com lignina na concentração de 3 µM. Após os tempos de 0 e 24h, foram capturadas imagens dos poços (Figura 17A) e os resultados mostraram que as células tratadas migraram 0,26 ± 0,069 mm, as células não tratadas migraram 0,71 ± 0,055 mm, dessa forma as células tratadas migraram 63,38% a menos que as células não tratadas (Figura 17B).

Figura 17. Migração celular com célula SK-MEL-25

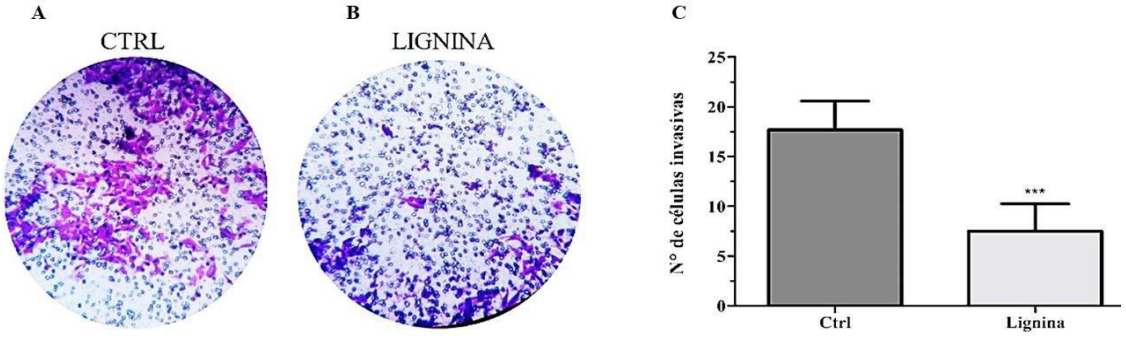


As células $2x10^5$ foram cultivadas após 24 horas foi feita a lesão vertical e incubadas com 3 µM de lignina as células não tratadas (controle) foram incubadas na ausência de Lignina, com 1% de DMSO e meio DMEN. Foram capturadas imagens nos tempos 0, 2, 4 e 24 horas para análise da distância percorrida pelas células. Apresenta três experimentos realizados independentes, comparando as fotografias de 0 e 24h das células tratadas e não tratadas. Para determinar a distância percorrida foi utilizado o programa *ImageJ*, subtraindo os valores aferidos em 2h, 4h e 24h do valor aferido em 0h, para obter o valor percorrido pelas células. Foram realizados 3 experimentos independentes e em triplicata. Two-way Anova. ***$p<$ 0,001.

4.7 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR COM MEMBRANA DE MATRIGEL EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO E HUMANO

O ensaio de invasão foi realizado utilizando *transwell* com uma membrana de Matrigel. As células B16F10-Nex2 foram tratadas com 3 µM de lignina, concentração subtóxica e as células não tratadas (controle) foram incubadas em meio RPMI com 0,6% de DMSO, as células foram adicionadas ao *transwell* com meio sem SFB e na câmara inferior adicionado meio com 15% de SFB, após 24h de incubação. As células que invadiram o *transwell* foram fixadas com formaldeído e coradas com cristal violeta e as imagens capturadas dos insertos de *transwell* (Figura 18A). As células não tratadas e as células tratadas foram contadas e observamos que as células não tratadas (controle) invadiram mais o transwell, foram contadas 18 ± 2,5 células. As células que foram incubadas na presença de lignina invadiram menos o transwell, foram contadas 8 ± 2 células. Dessa forma, as células que foram incubadas na presença de lignina invadiram 55,6% a menos que as células não tratadas, assim havendo inibição significativa da invasão (Figura 18B).

Figura 18. Invasão celular com membrana de Matrigel utilizando células de melanoma murino

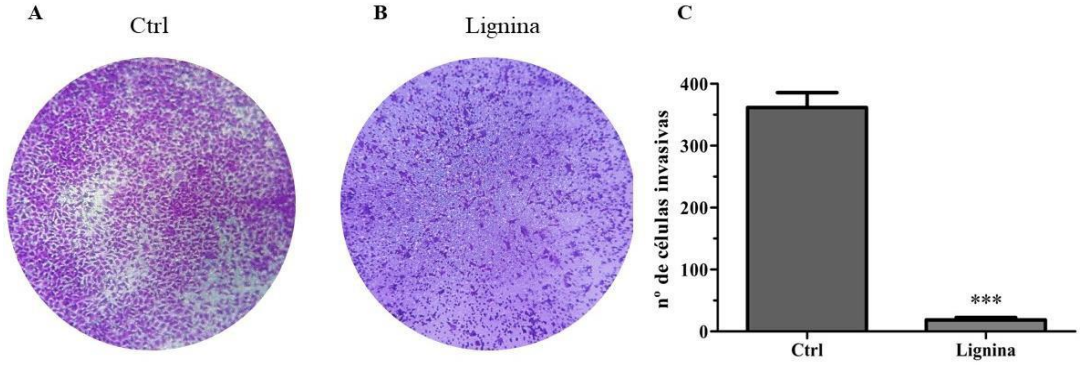


As células B16F10-Nex2 ($5x10^4$) foram cultivadas sobre o Matrigel presente no *Transwell* que estavam inseridos nos poços da placa de 24 poços. **A)** células não tratadas (controle) **B)** células tratadas com Lignina 3 µM **C)** gráfico da contagem de células invasivas. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata Teste *t.* ***$p<$ 0,001.

O ensaio de invasão celular também foi realizado em células SK-MEL-25. As células foram tratadas com 3 µM de lignina e as células não tratadas incubadas com meio DMEN sem soro fetal bovino (SFB) e DMSO 0,6% e as células foram adcioandas ao *transwell* com meio sem SFB e foi adicionado na câmara inferior meio com 15% de SBF. As células que não receberam tratamento tiveram uma característica mais invasiva quando comparada as células tratadas (Figura 19A). Foram capturadas imagens dos insertos de *transwell* e foi contado o número de células invasivas. Após contagem e análise no *GraphPad*, foi visto que as células

tratadas invadiram em média 94,91% a menos que as células não tratadas, sendo observado que as células não tratadas invadiram 361± 24 por média e as células tratadas com lignina invadiram 18,4 ± 2,6 em média (Figura 19B).

Figura 19. Invasão celular com membrana de Matrigel utilizando células de melanoma humano

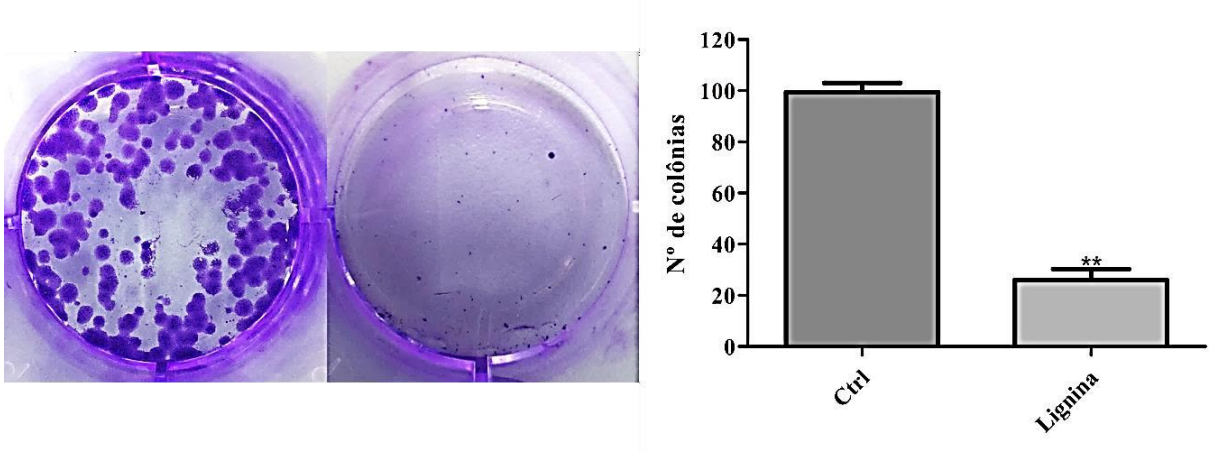


As células SK-MEL-25 ($2,5x10^4$) foram cultivadas sobre o matrigel presente no *transwell* que estavam inseridos nos poços da placa de 24 poços. **A)** células não tratadas (controle) **B)** células tratadas com Lignina 3 µM **C)** gráfico da contagem de células invasivas. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata. Teste *t.*****p*< 0,001.

4.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS COM CELULAS B16F10-Nex2.

O ensaio de formação de colônias foi realizado com o intuito de determinar se a lignina, em dose subtóxica, seria capaz de impedir que as células de melanoma formem colônias. Para esse experimento, as células B16F10-Nex2 foram cultivadas em placa de 12 poços e logo após foram tratadas de 3 µM de lignina. As células não tratadas foram incubadas com 0,6% de DMSO em meio RPMI. No quinto dia de tratamento, as células receberam um segundo tratamento com 3 µM, após dois dias, as células foram lavadas com PSB 1X, fixadas com etanol 70% e coradas com cristal violeta. As colônias formadas foram contadas e os resultados mostraram que a lignina diminui a formação de colônias, bem como, diminui a área das colônias, quando comparadas com as colônias de células que não foram tratadas com lignina (Figura 20).

Figura 20. Ensaio de Clonogenicidade.



Células de melanoma murino B16F10-Nex2, foram plaqueadas 2,5x10^5 e tratadas com lignina com 3 µM e as células controle receberam meio DMEM e DMSO 0,6%. A) Células não tratadas; B) Células tratadas; C) Gráfico comparando as celulas não tratadas (CTRL) e as celulas tratadas com Lignina. Após 7 dias foi visto a diminuição da formação de colônias em 70% quando comparados as células tratadas e controle. Teste *t*****p.*<0,001.

5. DISCUSSÃO

A desregulação da homeostase está associada ao aumento da proliferação e invasão celular devido ao aumento de fatores de crescimento autócrinos, falta de resposta dos fatores inibitórios de crescimento e aquisição da característica de imortalidade celular. Para o desenvolvimento do organismo, a motilidade celular é fator essencial; a desregulação desses parâmetros em patologias como o câncer propicia o desenvolvimento de metástase (HASS; HERLYN, 2005; JUSTUS, 2014).

A lignina é um produto derivado da polimerização de subunidades monoméricas conhecidas como monolignol e possui estrutura tridimensional que contém diferentes grupos funcionais. Estudos têm demonstrado que a lignina possui ações antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antivirais e antitumorais (ROGERS; CAMPBEL, 2004; NASEEM *et al.*,2016; FEDOROS *et al.*,2018).

Nos ensaios de viabilidade de celular, pudemos observar que a lignina induziu as células de melanoma murino à morte em uma concentração dose-tempo-dependente. A lignina na concentração de 6 µM já apresenta diminuição significativa da viabilidade celular em 20%, e a maior concentração utilizada 60 µM reduz significativamente a viabilidade celular em 93%. O mesmo efeito foi observado em células de melanoma humano SK-MEL-25 pois, a lignina diminui significativamente a viabilidade celular em 90% na concentração de 60 µM, possivelmente desencadeando processo de morte celular em uma concentração dose-dependente.

Estudos a partir de compostos naturais, produziram extratos que demonstraram diminuição da viabilidade celular das mais diversas linhagens tumorais, como: Song e colaboradores (2008) onde nas células de hepatoma SMMC7721; Barapatre e colaboradores (2016); onde foi visto atividade antioxidante, capacidade de reduzir a produção de radicais e capacidade de estabilizar reações induzidas pelo oxigênio e suas espécies radicais a partir do extrato de *Acacia nilótica* sobre as células câncer de mama (MCF-7); e Cunha (2014), observou processo apoptótico do extrato de *Garcina mongostana* sobre as células de melanoma murino (B16F10), linhagem em questão precursora da B16F10-Nex2 utilizada nesse trabalho.

Para investigarmos os mecanismos de morte celular, iniciamos os estudos testando inibidores de morte celular. O 3MA é amplamente utilizado e desempenha o papel de inibir a PI3K de classe III e VPS34; ao inibir as atividades dessas proteínas, há interrupção do processo autográfico (RAVANAN, *et al.*,2017). Assim, o resultado obtido no experimento apresenta indícios de que o processo autofágico esteja ocorrendo nas células que foram tratadas com

lignina. Na investigação com inibidores de morte e espécies reativas de oxigênio, foi visto efeito dos inibidores 3-MA e NAC sobre ação da lignina nas células, o que levantou a hipótese que a lignina desencadeia um possível estresse nas organelas, levando as células a buscarem equilíbrio, e com a ocorrência da formação de vários vacúolos autofágicos, a célula acaba morrendo.

As espécies reativas de oxigênio são produzidas nas células como subprodutos do metabolismo aeróbico ou, devido à estresse, são geradas principalmente em mitocôndrias, retículo endoplasmático, membrana plasmática e o citosol. As EROs possuem natureza altamente reativa, e é visto que conseguem desencadear morte celular nas células cancerígenas. O inibidor NAC é reportado na literatura como um inibidor da apoptose dependente de EROs; foi visto que ao incubar NAC juntamente com a lignina, houve diminuição parcial significativa da produção de espécies reativas de oxigênio nas células de melanoma murino, levantando a hipótese de que o tratamento com lignina pode induzir um aumento do estresse oxidativo, desencadeando uma apoptose dependente de espécies reativas de oxigênio (HALASI *et al.*,2013).

Os resultados obtidos com 3MA e NAC e com os resultados de ativação de caspases e degradação do DNA são indicativos de que, ao incubar as células de melanoma murino com lignina, possa estar ocorrendo dois processos de morte celular: autofagia e apoptose. A avaliação da expressão das proteínas autofágicas e apoptóticas, após tratamento com a lignina, pode confirmar, com mais clareza, o envolvimento desses processos.

O trabalho de Yang e colaboradores (2020), reforçar a ideia de dois processos de morte celulares estarem envolvidos. Pois ao tratarem as células de pulmão A549 com sesamina, uma lignina lipossolúvel, isolada da semente do gergelim, induziu ao aumento de EROs que desencadeou diminuição no potencial de membrana mitocondrial, levando apoptose pela via intrínseca com ativação de caspase-9 e -3. Além disso, observaram inibição da ação da sesamina sobre as células A549 ao utilizarem o inibidor NAC, relacionando assim o tratamento por sesamina leva as células apoptose e mitofagia. O estudo de Li e colaboradores (2016), ao utilizar a arctigenina, lignina, encontrada em ervas da família *Asteracea sp*. em células de cólon humano HT-29, determinaram que o processo apoptótico através da via intrínseca, está relacionado ao aumento das EROs e da p38MAPK.

Para investigarmos se havia outro tipo de morte ocorrendo juntamente com autofagia, utilizamos o inibidor de necroptose NEC, que tem ação sobre a proteína RIPK1, importante para o desencadeamento do processo necroptótico. A inibição dessa proteína gera um efeito

protetor às células diante do processo de necroptose induzida por TNF (TAKAHASHI, *et al.*,2012). Quando utilizamos a incubação com o inibidor NEC na presença de lignina, não foi observada diminuição do efeito da lignina nas células.

As células também foram incubadas com o inibidor de pan-caspase Z-VAD-*fmk* e não foi observado efeito inibitório na ação da lignina. A adição do inibidor bloqueia a morte celular por apoptose e com isso pode sensibilizar as células para que ocorra outros tipos de morte, como autofagia, levando a um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (VANDENABEELE *et al.*, 2006). Podemos sugerir que, ao ter inibido o processo apoptótico nas células, ainda ocorreu o processo de morte por autofagia.

Ativação das caspases é característica marcante relacionada a apoptose. Mesmo não tem um resultado de inibição por parte do inibidor Z-VAD-*fmk*, foi realizado ensaio de caspase com objetivo de buscar uma nova resposta se realmente a apoptose não estava ocorrendo após tratamento. Foi observado que as caspase iniciadoras 8 e 9 tiveram sua atividade aumentada após tratamento com lignina, o tempo de tratamento realizado no ensaio foi de 30 minutos, não sendo observado o aumento da caspase 3 efetora. As caspases iniciadoras tem como função clivarem nas formas inativas das caspases efetoras para que elas sejam ativas e sigam o processo de clivagem de outras proteínas para que ocorra no fim o processo de apoptose (LALAOUI, 2015).

Para continuarmos as investigações sobre a indução de apoptose, investigamos se a lignina poderia induzir a degradação do DNA. O ensaio de TUNEL detecta as porções terminais 3’ OH da fita de DNA danificado, ocorrendo a adição por meio de uma enzima terminal desoxynucleotidil transferase (TdT) de nucleotídeos, que foram modificados para que fossem capazes de emitir fluorescência através de moléculas de fluorescentes às fitas de DNA que sofreram fragmentação, sendo esse processo característico da apoptose, dentre outras características como: condensação da cromatina, corpos apoptóticos, *blebbing* de membrana e fragmentação citoplasmática (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018). Em nosso trabalho, o tratamento realizado com 24 µM por 24h em células de melanoma murino, foi visto a fragmentação do DNA das células tratadas com lignina isolada do eucalipto.

Além do mais, alguns estudos que utilizaram extratos naturais com a mesma finalidade de verificar a degradação do DNA, observaram a sua degradação. Citamos como exemplo: Zhue colaboradores (2019), com o composto *Honokiol*, extraído da casca *Magnolia officinalis*, que apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral; foi utilizado em células A549 e 95-D de câncer de pulmão humano.

Estudo realizado por Purushotham e colaboradores (2016), utilizou um extrato metanólico de *Andrographis nallamalayana* que, ao ser testado em células de câncer de pele A375 e B16F10, inibiu proliferação celular e induziu morte celular apoptótica.

A motilidade celular é um ponto chave para o desenvolvimento tumoral, portanto, o estudo da migração celular e compreensão do comportamento migratório é fundamental para desenvolvimento de novas terapias, visto que quando ocorre processo metastático dificulta ainda mais o tratamento e agrava a clínica do paciente (KRAMER *et al.*,2013). O processo de invasão é definido quando ocorre movimento celular através da matriz celular, havendo uma adaptação à sua estrutura para que a célula seja capaz de mover por meio da matriz extracelular , dessa forma as células invadem vasos sanguíneos e linfáticos migrando para outros órgãos, se alojando e desenvolvendo tumor secundário (JUSTUS *et al.*,2014).

Os ensaios realizados de migração e invasão celular demonstraram que a lignina extraída do *Eucalyptus sp.* em uma concentração subtóxica de 3 µM é capaz de inibir significativamente a migração e invasão celular, bem como, a formação de colônias *in vitro*. Alguns estudos que utilizaram de compostos naturais, também observam inibição de migração, invasão e formação de colônias. Lee e colaboradores (2015) testaram a curcumina a qual inibiu a migração de células SW620 (câncer de cólon). Como o caso de Bich Loan e colaboradores (2019), que utilizaram de ricinalipossoma, obtida da mamona, a qual inibiu invasão e migração celular após tratamento. O estudo de Leow e colaboradores (2009) analisou os efeitos da curcumina em células de osteossarcoma humano. Esse composto além de inibir a migração, também inibe a invasão celular, de modo dose-dependente. Wang e colaboradores (2017) observaram inibição da invasão celular ao tratarem as células de câncer de ovário: OVCAR-3 e SKOV-3 com Celastro. Estudo realizado por Purushotham e colaboradores (2016), utilizou um extrato metanólico de *Andrographis nallamalayana* que, ao ser testado em células de câncer de pele A375 e B16F10, inibiu proliferação celular e induziu morte celular apoptótica.

O ensaio clonogênico é de importância para avaliar o comportamento das células individualmente ao formarem colônias. O tratamento realizado com lignina nesse experimento foi de 3 µM de lignina que inibiu a formação de colônias. Esse resultado, junto a inibição da migração e invasão celular, reforça que a lignina pode se apresentar de maneira promissora como tratamento adjuvante no futuro, por ter tais efeitos em uma concentração subtóxica. Promraksa e colaboradores utilizaram o extrato obtido da *Scoparia dulcis L.* nas células KKU-100 e KKU-213 de colangiocarcinoma (CCA) e observaram diminuição da formação de colônias, respondendo a um tratamento dose-dependente.

Os resultados obtidos nesse trabalho destacam que a lignina estudada de forma isolada e extraída do *Eucalyptus sp*. possui efeito antitumoral dose-tempo-dependente sobre as células de melanoma murino, induzindo a morte celular. Além disso, a lignina inibe a migração, invasão celular e formação de colônias, mostrando que a lignina é um composto promissor para o estudo de novos compostos com atividade antitumoral.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

O presente trabalhou utilizou a lignina obtida do eucalipto (*Eucalyptus sp.*) para avaliar sua atividade antitumoral em células de melanoma murino e humano, com o intuito de identificar possíveis processos de morte celular, além de avaliar se haveria inibição no processo de migração, invasão celular e formação de colônias após tratamento com lignina.

Inicialmente avaliamos a viabilidade das células de melanoma murino e humano: B16F10-Nex2 e SK-MEL-25, sendo visto que, após o tratamento com a lignina, houve uma diminuição significativa da viabilidade celular. Com esses dados foram realizados experimentos voltados a elucidar os possíveis mecanismos de morte celular que poderiam estar sendo desencadeados na célula.

Foi realizado experimento com inibidores de morte e espécie reativas de oxigênio. A ação da lignina é inibida pelo 3MA (autofagia), como também é visto inibição por parte de NAC (EROs), indicando que pode estar ocorrendo processo autofágico e indução de estresse celular.

Com tudo, mesmo na presença do inibidor ZVAD-*fmk* (apoptose), a lignina não perdeu efeito citotóxico. Mas há a hipótese de estar ocorrendo mais de um processo de morte celular. Essa hipótese é levantada devido ao fato de termos tido resultados positivos para ativação de caspase após tratamento das células com lignina, além da degradação do DNA e ruptura da lâmina nuclear e extravasamento do DNA para o citoplasma.

Além disso foram realizados experimentos voltados para avaliar se a lignina interferia no processo de motilidade celular, visto que compostos que desencadeiam tais processos são bem aceitos para utilização em quimioterapias. Foi determinado que em concentração subtóxica, 3 μM, foi observado efeito inibitório da migração e invasão celular nas duas linhagens de melanomas utilizadas no trabalho. Ao analisarmos também a formação de colônias em células B16F10-Nex2, foi visto que a lignina inibe o desenvolvimento e diminuição do tamanho das colônias.

Portanto, a lignina apresentou resultados positivos na questão de atividade antitumoral em células de melanoma murino e humano, mostrando-se bastante promissora a continuidade do estudo desse composto natural para melhor compreensão e determinação dos mecanismos que ela desencadeia sobre as células tumorais e posteriormente sobre as células não tumorais.

REFERÊNCIAS

ALZOUBI, *et al.* Anticancer and antimutagenic activity of Silybum marianum L. and Eucalyptus camaldulensis Dehnh. against skin cancer induced by DMBA: In vitro and in vivo models . Pakistan journal of pharmaceutical sciences. V. 18, n°11. 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34602423/. Acessado em: 20//05/2022.

AROZARENA, Imanol *et al.* Oncogenic BRAF Induces Melanoma Cell Invasion by Downregulating the cGMP-Specific Phosphodiesterase PDE5A. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 45-57, 2011. Disponível em:https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1535610810004319?token=5FEA9FF59A45E969352CDD5611156F59DBDE4C8D83F98745D71EEDE2A61C244C05E506958D2F6D04383481A9B59A38BE&originRegion=us-east-1&originCreation=20230321134653. Acesso em: dia mês ano.

ARRUDA, D., *et al.* β-Actin-binding complementarity-determining region 2 of variable heavy chain from monoclonal antibody C7 induces apoptosis in several human tumor cells and is protective against metastatic melanoma. The Journal of Biological Chemistry. v. 287, n. 18, p. 1412 -14922. 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3340220/. Acessado em 05/05/2018.

BANDARCHI, Bizhan *et al.* From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatology Research and Practice,** v. 2010, ID 583748, p. 1-8, 2010. Disponível em: https://downloads.hindawi.com/journals/drp/2010/583748.pdf. Acesso em: 16/06/2018.

BARAPATRE *et al.* In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from Acacia nilotica. International Journal Biology Macromolecules. V.86. P.443. 2016. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141-8130(16)30110-6. Acessado em 20/05/2021.

BARROS, J, AND RICHARD A. "Plant Phenylalanine/Tyrosine Ammonia- lyases." Trends in plant science vol. 25, n°1 p. 66-79. 2020 doi:10.1016/j.tplants.2019.09.011. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138519302535. Acessado em 20/04/2021.

Bich Loan NT, Trung NN, Le Na NT, Thang ND. Anticancer Activities of Ricin-Liposome Complexes on SKMEL-28 Cells. Asian Pac J Cancer Prev. Vol. 1; n° 20(7), p 2117-2123. 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6745201/. Acessado em: 20/04/2021.

BRAY, FREDDIE *ET AL.* "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of
BROUSSARD, *et al.* Melanoma Cell Death Mechanisms. Chonnam medical journal, Vol. 54, n°3, p. 135–142. doi:10.4068/cmj.2018.54.3.135. 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6165917/#:~:text=2.-,Autophagy,and%20disposes%20of%20damaged%20organelles.. Acessado em: 20/05/2021.

Chen JM, Chen PY, Lin CC, Hsieh MC, Lin JT. Antimetastatic Effects of Sesamin on Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through Regulation of Matrix Metalloproteinase-2. Molecules, vol 25, n°9, ID 2248. 2020. doi:10.3390/molecules25092248. Disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7249112/. Acessado em 15/05/2021.

CHUDE, CYNTHIA I. AND AMARAVADI, RAVI K. Targeting autophagy in cancer: update on clinical. trials and novel inhibitor. International Journal of Molecular Sciences. v. 18, p. 1279 – 1290, 2017. Disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486101/. Acessado em: 20/04/2021.

CUNHA, *et al.* Evaluation of antimicrobial and antitumoral activity of Garcinia mangostana L. (mangosteen) grown in Southeast Brazil. Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 29. P. 21-28, 2014. Disponível em: https://www.scielo.br/j/acb/a/kZ5ZCv5yTdWKnLFWWmWRs7j/?lang=en. Acessado em: 05/04/2021.

CVETANOVA, B. *et al.* Sesquiterpene Lactone Deoxyelephantopin Isolated from Elephantopus scaber and Its Derivative DETD-35 Suppress BRAFV600E Mutant Melanoma Lung Metastasis in Mice. Int. J. Mol. ciência, Vol. 22, ID 3226. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms22063226. Acessado em: 20/05/2021.

D'ARCY, M.S. Morte celular: uma revisão das principais formas de apoptose, necrose e autofagia. Cell Biol Int, vol. 43 p.582-592. 2019. doi: 10.1002 / cbin.11137. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbin.11137. Acessado em: 20/04/2021.

DE VELLIS, C., *et al.* The Role of Glycosylation in Melanoma Progression, vol 10 , ID 2136. 2021. Disponível em:https://doi.org/10.3390/cells10082136. Acessado em: 16/05/2022.

DEGTEREV, A., *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nat. Chem. Biol, v. 1, p. 112–119. 2005. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nchembio711 Acessado em: 20/04/2021.

DEL RÍO *et al.* Hydroxystilbenes Are Monomers in Palm Fruit Endocarp Lignins. Plant Physiology. V.174, n°4, p. 2072-2082; 2017. DOI: 10.1104/pp.17.00362. Disponível em https://academic.oup.com/plphys/article/174/4/2072/6117434?login=false Acessado em: 20/04/202.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicologic Pathology. v. 35, p. 495–516,2007.Disponívelem:https://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230701320337?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed. Acessado em: 20/04/2021.

FANE, *et al.* BRN2, a POUerful driver of melanoma phenotype switching and metastasis CélulasdepigmentoMelanomaRes; Vol. 32, p. 9 - 24. 2019. https://doi.org/10.1111/pcmr.12710 Acessado em: 20/042021.

FARHAN, M. *et al.* "Artemisinin Inhibits the Migration and Invasion in Uveal Melanoma via Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway." Oxidative medicine and cellular longevity vol. 2021, ID. 9911537. 2021, doi:10.1155/2021/9911537. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/omcl/2021/9911537/. Acessado em: 20/05/2021.

FEDOROS *et al.* Novel Water-Soluble Lignin Derivative BP-Cx-1: Identification of Components and Screening of Potential Targets in Silico and in Vitro. Oncotarget, Vol. 9, n° 26, p, 18578-18593, 2018. Disponível em: https://www.oncotarget.com/article/24990/text/. Acessado em: 20/04/2021.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death and Differentiation. V.19, P. 107– 120, 2012. Disponível em: https://www.nature.com/articles/cdd201196. Acessado em: 20/04/2021.

GARG, J., *et al.* Applications of lignin nanoparticles for cancer drug delivery: An update. Materials Letters, Volume 311, ISSN 0167-577X, 2022. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X21022722?via%3Dihub. Acessado em: 20/05/2021.

GHAGANE, S. C., *et al.* In vitro antioxidant and anticancer activity of Leea indica leaf extracts on

human prostate cancer cell lines. Integrative Medicine Research. Volume 6, N° 1, P. 79-87, 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213422016301548#:~:text=The%20results%20indicate%20that%20Leea,to%20conclude%20its%20therapeutic%20use.. Acessado em: 20/04/2021.

GRAY-SCHOPFER *et al.* Melanoma biology and new targeted therapy. Nature, London, v. 445, n° 7130, p. 851-857, 2007. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nature05661. Acessado em: 20/04/2021.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. Nature, London, v. 445, n° 7130, p. 851-857, 2007. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nature05661. Acesasdo em: 21/04/2021.

HAASS; HERLYN. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. J Investig Dermatol Symp Proc. V. 10, n°153 –163, 2005. Disponível em: https://www.jidsponline.org/article/S0022-202X(15)52577-3/fulltext. Acessado em: 20/04/2021.

HALASI, MARIANNA *et al.* "ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors." The Biochemical journal vol. 454, n° 2, p 201-8. 2013. doi:10.1042/BJ20130282. Disponível em: https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/454/2/201/46494/ROS-inhibitor-N-acetyl-L-cysteine-antagonizes-the?redirectedFrom=fulltext. Acessado em 22/04/2021.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. V. 12, n°1, p. 31– 46. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059. Acessado em: 18/05/2022.

HARRIS, J., *et al.* Autophagy and Inflammasomes. Molecular Immunology, v. 86, p. 10–15, 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589017300524. Acessado em: 20/04/2021.

HARTMAN, M. L. & CZYZ, M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. Cellular and Molecular Life Science. v. 72, p. 1249–1260. 2015. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-014-1791-0. Acessado em: 20/04/2021.

HE, C. & LEVINE B. "The Beclin 1 interactome." Current opinion in cell biology. vol. 22, n°2. p 140-9. doi:10.1016/j.ceb.2010.01.001. 2010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067410000037?via%3Dihub. Acessado em: 20/04/2021.

HOEK, K. S. *et al.* Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. Pigment Cell & Melanoma Research, V. 21, p 665-676. doi:10.1111/j.1755-148X.2008. 00505.x. 2008. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-148X.2008.00505.x. Acessado em: 20/04/2021.

HU, H., *et al.* MEGF6 Promotes the Epithelial-to-Mesenchymal Transition via the TGFβ/ SMAD Signaling Pathway in Colorectal Cancer Metastasis. Cell Physiology Biochemistry. v. 46, p. 1895-1906. 2018. Disponível em: https://europepmc.org/article/MED/29719292. Acessado em: 20/04/2021.

HUANG; ZHOU. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways, and clinical translation to cancer-targeted therapy. Sig Transduct Target Ther. V.6 , n°254, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41392-021-00648-7. Acessado em: 20/04/2021.

HYUNA, S. *et al.* “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” CA: a cancer journal for incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.” CA: a cancer journal for clinicians vol. 71, n°3, p. 209-249. doi:10.3322/caac.21660. 2021. Disponível em: https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660. Acessado em: 16/05/2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/927. Acessado em: 20/04/2021.

JUSTUS *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. JOVE. V. 88, p. 1 - 8, 2014. Disponível em: https://www.jove.com/t/51046/in-vitro-cell-migration-and-invasion-assays. Acessado em: 20/04/2021.

Karthäuser, J., *et al.* “Lignin and Lignin-Derived Compounds for Wood Applications- A Review.” Molecules vol. 26, n°9, ID 2533.2021, 2021. Disponível em https://www.mdpi.com/1420-3049/26/9/2533. Acessado em: 16/05/2022.

KERR, *et al.* Apoptosis: A Basic BiologicalPhenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. Br. J. Cancer v. 26, p. 239-258, 1972. Disponível em: https://www.nature.com/articles/bjc197233. Acessado em: 20/04/2021.

Klionsky DJ. Look people, "Atg" is an abbreviation for "autophagy-related." That's it. Autophagy. V. 8, n° 9, p. 1281-1282, 2012. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/auto.21812. Acessado em: 20/04/2021.

KOZOVSKA, Z *et al.* “Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells.” Neoplasma vol. 63, n°4,p. 510-7; 2016. doi:10.4149/neo_2016_403. Disponível em: http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=4770&category_id=128&option=com_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1. Acessad em: 20/04/2021.

KRAKHMAL *et al.* Cancer invasion: patterns and mechanisms. Acta Nature. V.7 n°2; p. 17–28. 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4463409/. Acessado em: 20/04/2021.

KRAMER *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. V. 752, p 10–24. 2013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574212000464?via%3Dihub. Acessado em: 20/04/2021.

KUPHAL *et al.* H-Cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. V 22; p 296–306. 2009. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-148X.2009.00568.x. Acessado em: 20/04/2021.

KUPHAL, *et al.* “Integrin signaling in malignant melanoma.” Cancer metastasis reviews; vol. 24, n°2, p.195-222. doi:10.1007/s10555-005-1572-1. 2005. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-005-1572-1. Acessado em: 20/04/2021.

KURIAKOSE G., *et al.* Fungal vincristine from Eutypella spp - CrP14 isolated from Catharanthus roseus induces apoptosis in human squamous carcinoma cell line -A431. BMC Complementary and Alternative Medicine – v. 16, 2016. Disponível em: https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s12906-016-1299-2.pdf. Acessado em: 20/04/2021.

LAHMADI *et al.* Chemical Composition and Cytotoxic Activity of Eucalyptus torquata Luehm. and Eucalyptus salmonophloia F. Muell. Trunk Bark Essential Oils against Human SW620 and MDA-MB-231 Cancer Cell Lines. J Pharm Sci.;v.34. n°3. P. 987-993. 2021. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.202100315. Acessado em: 15/04/2022.

LALAOUI N., *et al.* The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. Semin Cell Dev Biol, v. 39, p. 63-69, 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952115000300?via%3Dihub. Acessado em: 20/04/2021.

LEE *et al.* Identification of anti-metastatic drug and natural compound targets in isogenic colorectal cancer cells. Journal of Proteomics. Volume 113, p. 326-336. 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391914004758?via%3Dihub. Acessado em: 20/04/2021.

LEOW *et al.* Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/β- catenin antagonists against human osteosarcoma cells. Invest New Drugs. V. 28. p. 766–782. DOI 10.1007/s10637-009-9311-z. 2010. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s10637-009-9311-z. Acessado em: 20/04/2021.

LI, Qing-chun *et al.* "Arctigenin induces apoptosis in colon cancer cells through ROS/p38MAPK pathway." Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology vol. 21, nº1 p. 87-94. 2016. Disponível em: https://www.jbuon.com/archive/21-1-87.pdf. Acessado em: 20/04/2021.

LIN, J. *et al.* Tetramethylpyrazine: A review on its mechanisms and functions. Biomedicine & Pharmacotherapy. Volume 150, 2022. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222003948?via%3Dihub. Acessado em: 20/10/2022.

LINKERMANN A, GREEN DR. Necroptosis. N Engl J Med. V. 370; nº 5: p. 455-65. doi: 10.1056/NEJMra1310050. PMID: 24476434; PMCID: PMC4035222. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1310050?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed. Acessado em: 20/04/2021.

LIU, CHANG-JUN. Deciphering the Enigma of Lignification: Precursor Transport, Oxidation, and the Topochemistry of Lignin Assembly. Molecular Plant. Volume 5, Issue 2, Pages 304-317. https://doi.org/10.1093/mp/ssr121. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674205214601209. Acessado em: 20/04/2021

LONG, *et al.* Novel Peptide Dermaseptin-PS1 Exhibits Anticancer Activity Via Induction of Intrinsic Apoptosis Signaling. Journal Cell Mol Med, p.1–13. 2018. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.14032.Acessado em: 20/04/2021.

MAEDA, H. AND DUDAREVA, N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. Annual Review of Plant Biology. Edição, 63:1, p 73-105 2012. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042811-105439?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acessado em: 20/04/2021.

MAJNO, G. AND JORIS I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis, An Overview of Cell Death. American Journal of Pathology, Vol. 146, No. 1, 1995. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1870771/. Acessado em: 20/04/2021.

MAJTNEROVÁ, P. & ROUŠAR. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. T. Mol Biol Rep. V. 45: ID 1469. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9. Acessado em: 20/04/2021.

MASSAOKA, *et al.* A novel cell-penetrating peptide derived from WT1 enhances p53 activity, induces cell senescence and displays antimelanoma activity in xeno and syngeneic systems. FEBS Open Bio. v. 4, p. 153-161, 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211546314000084. Acessado em: 20/04/2021.

MATALLANAS D, *et al.* Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. Genes Cancer. 2011;2(3):232-260. Dispov´vel em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3128629/. Acessado em: 20/04/2021.

MIZUMURA, *et al.* The role of necroptosis in pulmonary diseases. Respiratory Investigation, v. 54, p. 407–412, 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212534516300223?via%3Dihub. Acessado em: 20/04/2021.

MONAGHAN; BURRIDGE. Mutant B-RAF regulates a Rac-dependent cadherin switch in melanoma. Oncogene. 32, 4836–4844 & 2013. Disponível em: https://www.nature.com/articles/onc2012492. Acessado em:20/04/2021.

MOORE AR, *et al.* RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? [published correction appears in Nat Rev Drug Discov. 2020 Dec;19(12):902]. Nat Rev Drug Discov; V.19; nº 8; p. 533-552. 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41573-020-0068-6. Acessado em: 20/04/2021.

MOQADAM, *et al.* Cancer Detection Based on Electrical Impedance Spectroscopy: A Clinical Study. Journal of Electrical Bioimpedance. V. 9. P 17-23. 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7852020/. Acessado em: 20/04/2021.

NASEEM *et al.* Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: A review. International Journal of Biological Macromolecules. Volume 93, Part A, p 296-313, 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016311692. Acessado em: 20/04/2021.

NGUYEN *et al.* Differential contributions of actin and myosin to physical phenotypes and invasion of pancreatic cancer cells. Cell Mol Bioeng. V.13; nº 1, p. 27–44. 2020. Disponível em: https://europepmc.org/article/MED/32030106. Acessado em: 20/04/2021.

NUCHIC & CHAMMAS. Cancer and tumor microenvironment. Revista de Medicina, v.89, nº 1, p.21-31. 2010. Disponível em: https://www.semanticscholar.org/paper/Cancer-and-the-tumor-microenvironment-Onuchic-Chammas/0b37c28943f6e013a3df2f2a62a4d7735516191a. Acessado em 20/04/2021.

ONORATI AV, *et al.* Targeting autophagy in cancer. Cancer. Aug; V.124 nº16; p. 3307-3318. doi: 10.1002/cncr.31335. Epub 2018. Disponível em: https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.31335. Acessado em: 20/04/2021.

OU, *et al.* The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. International Journal of Nanomedicine, v.12, p. 6633—6646, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5595361/. Acessado em 20/04/2021.

OZEL, Irem *et al.* “The Good, the Bad, and the Ugly: Neutrophils, Angiogenesis, and Cancer.” Cancers vol. 14,3 p. 536. 2022, doi:10.3390/cancers14030536. Disponível em: https://www.mdpi.com/2072-6694/14/3/536. Acessado em: 28/08/2022.

PASCHKE *et al.* Inhibitory effects of bark extracts from Ulmus laevis on endometrial carcinoma: an in-vitro study. European Journal of Cancer Prevention. volume 2.P.162- 168,2009. Disponível em: https://journals.lww.com/eurjcancerprev/Abstract/2009/04000/Inhibitory_effects_of_bark_extracts_from_Ulmus.10.aspx. Acessado em: 20/04/2021.

PISTRITTO, *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Aging(AlbanyNY). ; V. 8: p603-
PROMRAKSA *et al.* Evaluation of anticancer potential of Thai medicinal herb extracts against cholangiocarcinoma cell lines. PLoS One.; v.14; nº 5. 2019. Disponivel em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0216721. Acessado em: 20/04/2021.

PURUSHOTHAM, G. *Et al.* “In vitro evaluation of anti-proliferative, anti-inflammatory and pro-apoptotic activities of the methanolic extracts of Andrographis nallamalayana Ellis on A375 and B16F10 melanoma cell lines.” 3 Biotech vol. 6, nº2, 212. doi:10.1007/s13205-016- 0529-0. 2016. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28330284/. Acessado em: 20/04/2021.

RAMOS, *et al.* Tags de sequências expressas em cana-de-açúcar (ESTs) que codificam enzimas envolvidas nas vias de biossíntese da lignina. Genetics and Molecular Biology ,V. 24; nº1-4, p. 235-241. 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28330284/. Acessado em: 20/04/2021.

Randic, Tijana *et al.* “NRAS mutant melanoma: Towards better therapies.” Cancer treatment reviews vol. 99, ID 102238. doi:10.1016/j.ctrv.2021.102238. 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34098219/. Acessado em: 20/04/2021.

RASTRELLI M., *et al.* Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. V. 6, p. 1005-1011; 2014. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25398793/. Acessado em: 20/04/2021.

RAVANAN, *et al.* Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. Life sciences, 188, 53–67. 2017. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25398793/. Acessado em: 20/04/2021.

RODRIGUEZ, L. *et al.* Wound-Healing Assay. Cell Migration. v. 294, p. 23-29. 2005. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-860-9:023. Acessado em: 20/04/2021.

ROGERS; CAMPBELL. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. New Phytologist, 164: 17-30. 2004. Disponível em: https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2004.01143.x. Acessado em: 20/04/2021.

SAID, R. E TSIMBERIDOU A. M. Pharmacokinetic evaluation of vincristine for the treatment of lymphoid malignancies. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. V. 10, nº 3 p. 483-494, 2014. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425255.2014.885016?journalCode=iemt20. Acessado em: 20/04/2021.

SCHWABE; STOCK. Ion channels and transporters in the migration and invasion of tumor cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sei. V. 369 (1638). 2014. Disponível em:

https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2013.0102. Acessado em: 20/04/2021.

SELIMOVIC D., *et al.* Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms. Apoptosis. V. 18, nº 8, p. 980–997, 2013. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s10495-013-0844-4. Acessado em: 20/04/2021.

SHALINI, *et al.* Old, new, and emerging functions of caspases. Cell Death and Differentiation. v. 22, p. 526–539, 2015. Disponível em: https://www.nature.com/articles/cdd2014216. Acessado em: 20/04/2021.

SIPIETER, *et al.* Shining light on cell death processes – a novel biosensor for necroptosis, a newly described cell death program. Biotechnology Journal. V. 9. p. 224–240, 2014. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biot.201300200. Acessado em: 20/04/2021.

SONG *et al.* Identification of Inonotus obliquus and Analysis of Antioxidation and Antitumor Activities of Polysaccharides. Curr Microbiol. V. 5, p.454–462 DOI 10.1007/s00284-008- 9233-6. 2008. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-008-9233-6. Acessado em: 20/04/.2021.

TAKAHASHI, *et al.* "Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models." Cell death & disease vol. 3, nº11, e 437. 2012, doi:10.1038/cddis.2012.176. Disponível em: https://www.nature.com/articles/cddis2012176. Acessado em: 20/04/2021.

TAKAHASHI, *et al.* Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. V.73, p 3278- 3282. DOI: 10.1073/pnas.73.9.3278. 1976. Disponível em: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.73.9.3278. Acessado em: 20/04/2021.

TESTA, CASTELLI, and PELOSI, Melanoma: Anormalidades Genéticas, Progressão Tumoral, Evolução Clonal e Células Iniciadoras de Tumores. Med. Sci., V. 5, nº 28. 2017. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/stke.3582006pe44. Acessado em: 20/04/2021.

VAN LIMBERGEN, *et al.* Autofagia: da ciência básica à aplicação clínica. Mucosal Immunol, V. 2, p. 315–330. 2009. https://doi.org/10.1038/mi.2009.20

VANDENABEELE *et al.* Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. Sci STKE. V. 358, p44. 2006. 619. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/stke.3582006pe44 Acessado em: 20/04/2021

VINARDELL; MITJANS, Lignins e seus derivados com efeitos benéficos na saúde humana. Int. J. Mol. ciência, V. 18, p. 1219. https://doi.org/10.3390/ijms18061219. 2017.

WANG *et al.* Celastrol inhibits migration and invasion by blocking the NF-κB pathway in ovarian cancer cells. Experimental and therapeutic medicine. vol. 14. Nº1, p. 819-824. Disponível em:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5488742/. Acessado em: 20/04/2021.

WEI, *et al.* "Effect of organosolv extraction on the structure and antioxidant activity of eucalyptus kraft lignin." International journal of biological macromolecules vol. 187:p. 462-470.2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021015300. Acessado em:

20/08/2022.

WENG; CHAPPLE. The Origin and Evolution of Lignin Biosynthesis. New Phytologist. v. 187, n° 2, p. 273-285, 2010. Disponível em: https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x. Acessado em: 20/04/2021.

WU, *et al.* Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 285, Nº. 14, pp. 10850 –10861, 2010. Disponível em: https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)74744-7/fulltext. Acessado em: 20/04/2021.

XIN; *et al.* Role of autophagy in regulating the radiosensitivity of tumor cells. J Cancer Res Clin Oncol. V. 143. P. 2147,2017. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-017-2487-2. Acessado em: 20/04/2021.

YANG, and Horwitz. Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. International Journal of Molecular Sciences. Volume 18. N° 1733. P 1-11, 2017. Diponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1733. Acessado em: 20/04/2021.

YANG, *et al.* "Sesamin induces A549 cell mitophagy and mitochondrial apoptosis via a reactive oxygen species-mediated reduction in mitochondrial membrane potential." The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology vol. 24, nº3, p.223-232. doi:10.4196/kjpp.2020.24.3.223. 2020. Disponível em: https://www.kjpp.net/journal/view.html?volume=24&number=3&spage=223. Acessado em: 21/04/2021.

YOLANDE, *et al.* Cytotoxic Effect of Spondias Cytherea Fruit Extract in Murine Melanoma Model In Vivo and In Vitro. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology. V. 37, n° 3, p. 231-240, 2018. Disponível em: https://www.dl.begellhouse.com/journals/0ff459a57a4c08d0,2f0b91ba0949bdaf,1ac7e5b81c79e362.html. Acessado em: 21/04/2021.

YOON J, *et al.* Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. Journal of Integrative Plant Biology. V. 57, p.902–912. 2015. doi: 10.1111/jipb.12422. Disponível em: https://www.dl.begellhouse.com/journals/0ff459a57a4c08d0,2f0b91ba0949bdaf,1ac7e5b81c79e362.html. Acessado em: 20/04/2021.

YVON, *et al.* Taxol Suppresses Dynamics of Individual Microtubules in Living Human Tumor Cells. **Molecular Biology of the Cel**l, Vol. 10, No. 4. P. 819-1287, 1999. Disponível em: https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.10.4.947?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed. Acessado em: 20/04/2021.

ZHOU Z, *et al.* Connexins and angiogenesis: Functional aspects, pathogenesis, and emerging therapies (Review). Int J Mol Med. V.50, nº2, p. 2022110. doi:10.3892/ijmm.2022.5166. Disponível em: https://www.spandidos-publications.com/ijmm/50/2/110. Acessado em: 20/04/2021.

ZHU, J., *et al.* Honokiol induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human lung cancer cells. Life Sciences, Volume 221, P. 204-211, 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320519300591?via%3Dihub. Acessado. 20/04/2021.