



**INSTITUTO LATINO-
AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA
NATUREZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA
Agave sisalana Perrine (EHAAS) EM LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA
METASTÁTICO**

RAFAELA ALBERTON FAVATO

**ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA
Agave sisalana Perrine (EHAAS) EM LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA
METASTÁTICO**

RAFAELA ALBERTON FAVATO

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado ao Instituto Latino-Americano de
Ciências da Vida e da Natureza da
Universidade Federal da Integração Latino-
Americana como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a.Dra. Thatiana Corrêa de
Melo

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro
Araldi

RAFAELA ALBERTON FAVATO

**ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA
Agave sisalana Perrine (EHAAS), EM LINHAGENS CELULARES DE
MELANOMA METASTÁTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Latino-Americano de
Ciências da Vida e Natureza da Universidade
Federal da Integração Latino-Americana,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Thatiana Corrêa de Melo
UNILA

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro Araldi
UNILA

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Prof. Dr. Edislaine Barreiros de Souza
UNESP

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Rafaela Alberton Favato

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento

- | | |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> graduação | <input type="checkbox"/> artigo |
| <input type="checkbox"/> especialização | <input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso |
| <input type="checkbox"/> mestrado | <input type="checkbox"/> monografia |
| <input type="checkbox"/> doutorado | <input type="checkbox"/> dissertação |
| | <input type="checkbox"/> tese |
| | <input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais |
| | <input type="checkbox"/> _____ |

Título do trabalho acadêmico: Análise dos efeitos tóxicos do Extrato da Hidrólise Ácida da *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) em linhagens de melanoma metastático

Nome do orientador(a): Thatiana Corrêa de Melo

Data da Defesa: 24 / 07 /2020

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública **Creative Commons Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, 23 de agosto de 2020.



Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus. Ele sempre foi meu amparo e minha força, principalmente nos dias em que achei que a caminhada estava difícil demais.

Aos meus professores que, durante minha jornada acadêmica, me capacitaram na parte teórica e prática com maestria, tornando a minha jornada de formação profissional a melhor possível. Em especial, à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Thatiana Corrêa de Melo, e ao meu co-orientador, Prof^º. Dr^º. Rodrigo Pinheiro Araldi, que durante meses me auxiliaram nas pesquisas e na finalização deste trabalho que, com certeza hoje me capacitou ainda mais para exercer minha profissão. A Prof^ª. Dr^ª. Edislane Barreiros de Souza (UNESP – Faculdade de Ciências e Letras de Assis) por ter gentilmente cedido o extrato de sisal empregado neste estudo, e fornecido seu apoio essencial a esta pesquisa.

Aos demais professores que acompanharam minha jornada acadêmica com muito carinho, em especial a Prof^ª. Dr^ª. Sanelly Lourenço, que sempre demonstrou amor e compaixão ao ouvir minhas histórias e desafios, e ao Prof^º. Dr^º. Jorge Luis Maria Ruiz, que sempre foi muito solícito em fornecer a melhor estrutura laboratorial e ajudar com os materiais experimentais sempre que foi necessário.

Aos meus colegas de trabalho, Micheli, Anderson e Mary, que não só auxiliaram cientificamente para o desenvolvimento desta pesquisa, como também tornaram este processo mais leve e divertido.

Em especial às minhas amigas Nathália Cecchet, Júlia Watanabe e Alice Baran que estiveram presentes em todos os estágios do meu crescimento acadêmico e pessoal, me dando apoio, garantindo risadas, e muitas conversas madrugada adentro enquanto analisávamos a positividade dos astros. E a todos os meus demais amigos que sempre escutaram com muito carinho minha empolgação com em relação ao curso e à minha formação.

À minha família, Neiva, Marcio e Maurício Favato, que nunca desistiram de mim e sempre forneceram toda a base necessária para que eu chegasse até aqui. A vocês, sou grata por meus estudos, por minha formação e por quem sou hoje.

Por fim, à Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) que me forneceu a oportunidade de cursar Biotecnologia e que mesmo com as dificuldades existentes, sempre teve um corpo docente que lutou para termos a melhor qualidade de ensino.

Fica aqui minha eterna gratidão e o desejo que a minha formação acadêmica não pare por aqui, mas seja contínua e inesquecível.

FAVATO, Rafaela Alberton. **ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA *Agave sisalana* Perrine (EHAAS), EM LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA METASTÁTICO**. 2020.105 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

O câncer é uma doença que mais afeta a população mundial, sendo o câncer de pele um dos mais frequentes, com mais de 80.000 novos casos por ano. O subtipo melanoma é o mais letal com taxa de mortalidade até 75% e dentre fatores genéticos e ambientais que influenciam o seu desenvolvimento, o mais relevante a exposição à radiação ultravioleta (UV). Os tratamentos disponíveis para o melanoma metastático apresentam taxa de resposta inferiores a 15%, e severos efeitos colaterais. A prospecção de novas substâncias terapêuticas tem sido cada vez mais necessária e os fitoterápicos despontam como potenciais adjuvantes em terapias oncogênicas. Nesse sentido, avaliamos os efeitos tóxicos do extrato da hidrólise ácida da espécie vegetal *Agave sisalana* Perrine (EHAAS), rico em saponinas, e da ciclofosfamida (CP) em células de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5) e em células controle, de fibroblasto normal de pulmão (MRC5). Nossos resultados demonstraram que o *background* genético distinto entre as linhas de melanoma metastático, influenciam no perfil de respostas citotóxicas. Para tumores com o perfil mutacional da linhagem A2058, o EHAAS sobre concentrações menores que 50 µg/mL induzem a apoptose, frente a uma viabilidade de 80% das células controle. O potencial genotóxico também foi mais evidente em células de melanoma (A2058) quando comparadas as células controles (MRC5). Para tumores com o perfil mutacional da linhagem SK-MEL-5, a ciclofosfamida demonstrou um maior potencial citotóxico, enquanto o EHAAS desencadeia um processo necroapoptótico. Sugerimos que as vias de morte induzidas por EHAAS, na linhagem SK-MEL-5 possam estar intimamente ligadas a expressão de RIP1 e nfK-β. O tratamento com EHAAS na concentração de 100 µg/mL promoveu uma expressiva atividade citotóxica, porém com níveis de ROS estatisticamente semelhantes ao controle, reforçando atividade antioxidante do extrato. Estes resultados sugerem que o EHAAS poderia atuar como adjuvante no combate ao estresse oxidativo, intrinsecamente relacionada ao câncer. Esses dados reforçam ainda mais o papel da heterogeneidade neoplásicas de diferentes respostas terapêuticas observadas nos pacientes.

Palavras-chave: câncer, melanoma, *Agave sisalana* Perrine, sisal, RIP1, nfK-β.

FAVATO, Rafaela Alberton. **ANALYSIS OF THE TOXIC EFFECTS OF THE ACID HYDROLYSIS EXTRACT FROM *Agave sisalana* Perrine (EHAAS), IN MALIGNANT MELANOMA CELL LINES.** 2020. 105 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases that most affect the world population, with skin cancer being one of the most frequent, with more than 80,000 new cases per year. Melanoma is the most lethal with a mortality rate of up to 75% and among the genetic and environmental factors that influence its development, the most relevant is exposure to ultraviolet radiation (UV). The treatments available for metastatic melanoma have a response rate of less than 15%, and severe side effects. The prospect of new therapeutic substances has been increasingly necessary and herbal medicines are emerging as potential adjuvants in oncogenic therapies. In this sense, we evaluated the toxic effects of the acid hydrolysis extract of the plant species *Agave sisalana* Perrine (EHAAS), rich in saponins, and cyclophosphamide (CP) in metastatic melanoma cells (A2058 and SK-MEL-5) and in control cells, of normal lung fibroblast (MRC5). Our results demonstrated that the distinct genetic background between the metastatic melanoma lines, influences the profile of cytotoxic responses. For tumors with the mutational profile of the A2058 cell line, EHAAS at concentrations below 50 µg / mL induce apoptosis, in view of the viability of 80% of the control cells. The genotoxic potential was also more evident in melanoma cells (A2058) when compared to control cells (MRC5). For tumors with the mutational profile of the SK-MEL-5 cell line, cyclophosphamide demonstrated a greater cytotoxic potential, while EHAAS triggers a necroapoptotic process. We suggest that the death pathways induced by EHAAS, in the SK-MEL-5 strain, may be closely linked to the expression of RIP1 and nfK-β. The treatment with EHAAS in the concentration of 100 µg / mL promoted an expressive cytotoxic activity, however with ROS levels statistically similar to the control, reinforcing the antioxidant activity of the extract. These results suggest that EHAAS could act as an adjuvant in combating oxidative stress, intrinsically related to cancer. These data further reinforce the role of neoplastic heterogeneity in different therapeutic responses observed in patients.

Keywords: cancer, melanoma, *Agave sisalana* Perrine, Sisal, RIP1, nfK-B.

FAVATO, Rafaela Alberton. **ANÁLISIS DE LOS EFECTOS TÓXICOS DEL EXTRACTO DE HIDROLISIS ÁCIDA DEL *Agave sisalana* Perrine (EHAAS), EN LÍNEAS DE CELULAS DE MELANOMA MALIGNO.** 2020. 105 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESÚMEN

El cáncer es una de las enfermedades que más afecta a la población mundial, siendo el cáncer de piel una de las más frecuentes, con más de 80,000 casos nuevos por año. El melanoma es el más letal con una tasa de mortalidad de hasta el 75% y entre los factores genéticos y ambientales que influyen en su desarrollo, el más relevante es la exposición a la radiación ultravioleta (UV). Los tratamientos disponibles para el melanoma metastásico tienen una tasa de respuesta de menos del 15% y efectos secundarios graves. La posibilidad de nuevas sustancias terapéuticas ha sido cada vez más necesaria y las hierbas medicinales están emergiendo como posibles adyuvantes en las terapias oncológicas. En este sentido, evaluamos los efectos tóxicos del extracto de hidrólisis ácida de la especie de planta *Agave sisalana* Perrine (EHAAS), rica en saponinas y ciclofosfamida (CP) en células de melanoma metastásico (A2058 y SK-MEL-5) y en células de control, de fibroblastos de pulmón normales (MRC5). Nuestros resultados demostraron que el fondo genético distinto entre las líneas de melanoma metastásico influye en el perfil de las respuestas citotóxicas. Para tumores con el perfil mutacional de la línea A2058, EHAAS a concentraciones inferiores a 50 µg / ml induce apoptosis, en vista de la viabilidad del 80% de las células de control. El potencial genotóxico también fue más evidente en las células de melanoma (A2058) en comparación con las células de control (MRC5). Para los tumores con el perfil mutacional de la línea SK-MEL-5, la ciclofosfamida demostró un mayor potencial citotóxico, mientras que EHAAS desencadena un proceso necroapoptótico. Sugerimos que las vías de muerte inducidas por EHAAS, en la cepa SK-MEL-5, pueden estar estrechamente relacionadas con la expresión de RIP1 y nfK-β. El tratamiento con EHAAS en la concentración de 100 µg / ml promovió una actividad citotóxica expresiva, sin embargo, con niveles de ROS estadísticamente similares al control, reforzando la actividad antioxidante del extracto. Estos resultados sugieren que EHAAS podría actuar como un adyuvante en la lucha contra el estrés oxidativo, intrínsecamente relacionado con el cáncer. Estos datos refuerzan aún más el papel de la heterogeneidad neoplásica en diferentes respuestas terapéuticas observadas en pacientes.

Palabras clave: cáncer, melanoma, *Agave sisalana* Perrine, sisal, RIP1, nfK-β.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Agave Sisalana</i> (Sisal).....	28
Figura 2 - Cromatografia em fase líquida (LC-MS) do extrato da hidrólise ácida de <i>Agave sisalana</i> Perrine (EHAAS) e da saponina comercial Quilaja sp. (Sigma)	30
Figura 3 - Ilustração representativa do ensaio de Anexina V/IP	38
Figura 4 - Sobreposição espectral dos fluorocromos FITC e PI.	39
Figura 5 - Resultados do ensaio de Anexina V-IP para a linhagem A2058 (melanoma)	47
Figura 6 - Resultados do ensaio de Anexina V-IP para a linhagem SK-MEL-5 (melanoma)	49
Figura 7 - Resultados do ensaio de Anexina V-IP para a linhagem MRC5 (fibroblasto normal)	51
Figura 8 – Comparativo dos resultados obtidos para o ensaio de Anexina V-IP	52
Figura 9 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): resultados do ensaio de MitoTracker para a linhagem A2058 (melanoma)	53
Figura 10 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): resultados do ensaio de MitoTracker para a linhagem SK-MEL-5 (melanoma)	54
Figura 11 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): resultados do ensaio de MitoTracker para a linhagem MRC5 (fibroblasto normal)	55
Figura 12 - Comparativo das análises estatísticas do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), entre as linhagens do estudo.....	56
Figura 13 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS): resultados dos ensaios de DCFH-DA para a linhagem A2058 (melanoma).	57
Figura 14 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS): resultados dos ensaios de DCFH-DA para a linhagem SK-MEL-5 (melanoma).	58
Figura 15 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS): resultados dos ensaios de DCFH-DA para a linhagem MRC5 (fibroblasto normal)	60
Figura 16 - Comparativo das análises de níveis de ROS entre as linhagens do estudo	61
Figura 17 - Avaliação do potencial genotóxico do extrato: Ensaio de histona γ H2A para a linhagem A2058 (melanoma).....	62
Figura 18 - Avaliação do potencial genotóxico do extrato: Ensaio de histona γ H2AX para a linhagem SK-MEL-5 (melanoma).....	63

Figura 19 - Avaliação do potencial genotóxico do extrato: Ensaio de histona γ H2AX para a linhagem MRC5 (fibroblasto normal).....	64
Figura 20 – Resultados da análise de expressão de MRP1 para as linhagens de melanoma (A2058; SK-MEL-5) e MRC5 (fibroblasto normal).....	66
Figura 21 - Resultados da análise de expressão de MRP3 para as linhagens de melanoma (A2058; SK-MEL-5) e MRC5 (fibroblasto normal).....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais quimioterápicos utilizados no tratamento de melanoma metastático	26
Quadro 2 - Propriedades medicinais do suco do Sisal, investigadas por diferentes grupos de pesquisa	29
Quadro 3 - Linhagens celulares utilizadas no estudo e os parâmetros de cultivo estabelecidos.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC <i>transporters</i>	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
CP	Ciclofosfamida
DBBs	<i>Double-Strand Breaks</i>
EHAAS	Extrato da Hidrólise Ácida de <i>Agave sisalana</i>
FCR	Fase de Crescimento Radial
FCV	Fase de Crescimento Vertical
IC ₅₀	Índice de Citotoxicidade 50
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP	Iodeto de Propídio
NfK-B	Fator nuclear kappa β
RIP1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-proteinkinase 1</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
UV	Radiação Ultravioleta
UVA	Radiação Ultravioleta tipo A
UVB	Radiação Ultravioleta tipo B

LISTA DE ANEXOS

Anexo A : Documento SIGEM.....	104
---------------------------------------	------------

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1 O Processo Oncogênico	17
1.2 CÂNCER DE PELE	19
1.3 O MELANOMA	21
1.3.1 Predisposição ao Melanoma	22
1.3.2 Diagnóstico e Prognóstico	23
1.3.3 Tratamento do Melanoma	24
1.4 <i>Agave Sisalana</i> Perrine como adjuvante no tratamento do câncer	27
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3.2.1 Avaliar a atividade citotóxica do EHAAS em diferentes concentrações (25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL) em linhagens de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5) e fibroblasto humano (MRC5) – como controle.....	32
3.2.2 Avaliar os efeitos do EHAAS sobre o metabolismo energético das linhagens celulares de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5) e fibroblastos humano (MRC5, controle).....	32
3.2.3 Identificar o potencial genotóxico do EHAAS em linhagens de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5) e fibroblasto humano (MRC5, controle)	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	33
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE <i>Agave sisalana</i> Perrine.....	33
4.3 CULTURA DE CÉLULAS	34

4.4	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	37
	4.4.1 Ensaio de Anexina-V/IP	37
	4.7.1 Ensaio de Histona γ H2AX	42
4.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA ABC: MRP1 E MRP3	44
5.	RESULTADOS.....	46
5.1	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	46
	5.1.1 Ensaio de Anexina V-IP	46
5.2	ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)	52
5.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO EXTRATO	61
5.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA ABC: MRP1 E MRP3	65
6.	DISCUSSÃO	68
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
	ANEXO A – DOCUMENTO SIGEM	104

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O Processo Oncogênico

O câncer é uma doença de caráter multifatorial, podendo ser desencadeada por fatores exógenos e endógenos. De acordo com o modelo estocástico, as células cancerígenas acumulam mutações em seu material genético, proporcionando a proliferação celular descontrolada pelo organismo (BARCELLOS-HOFF; LYDEN et al., 2013; KINZLER et al., 1996; PIEROTTI et al., 2017). Tais mutações podem ocorrer em qualquer segmento do DNA, porém, mutações em genes que regulam o ciclo celular, como proto-oncogênes e gene supressores tumorais, estão diretamente relacionadas a iniciação neoplásica (PIEROTTI et al., 2017; WARD, 2002).

Os proto-oncogênes são genes que fazem parte da biologia natural da célula, regulando positivamente o ciclo celular (WARD, 2002). Sob condições fisiológicas, a expressão destes genes ocorre somente frente a estímulos mitóticos (PIEROTTI et al., 2017). Contudo, quando mutados, estes se expressam de forma constitutiva, levando a constante estimulação da proliferação (CANTLEY et al., 1991; TORRY, 1992). Já os genes supressores tumorais, são responsáveis pela regulação negativa do ciclo celular, incluindo a eventual indução da apoptose, morte celular programada (ALBERTS et al., 2017; MORRIS; CHAN, 2015). A expressão destes genes está condicionada a insultos hiperproliferativos, de maneira a impedir que células que apresentem mutações em proto-oncogênes se expandam clonalmente. Por esta razão, não é surpreendente que células cancerígenas apresentem mutações tanto em proto-oncogênes como em genes supressores tumorais (ALBERTS et al., 2017).

Didaticamente, podemos classificar o processo de carcinogênico em quatro estágios: (1) iniciação, (2) promoção, (3) progressão e (4) metastatização (BARCELLOS-HOFF et al., 2013; HENNINGS et al., 1993).

A iniciação é um estágio-chave para a transformação maligna, sendo caracterizada por eventos mutacionais em uma célula saudável, ativando constitutivamente oncogenes e/ou inativando genes supressores tumorais (BARCELLOS-HOFF et al., 2013; PIEROTTI et al., 2017). Durante a promoção, as células iniciadas são expostas a fatores de crescimento endógenos ou a mitógenos ambientais, resultando na expansão clonal destas células (BARRETT, 1993; HENNINGS et al., 1993). A expansão clonal de células iniciadas leva a formação do nicho tumoral (BARCELLOS-HOFF et al., 2013; HENNINGS et al., 1993; VINCENT et al., 2008). A expansão dos clones iniciados, durante a fase de promoção, associado

ao estímulo hiperproliferativo, resulta no estresse da forquilha de replicação (FORMENT; CONNOR, 2018). Tal estresse resulta em quebras simples e duplas no DNA, levando a inserções e deleções (Indels) que, por sua vez, levam ao ganho de mutações adicionais. Estas mutações aumentam a heterogeneidade do microambiente neoplásico durante o terceiro estágio da carcinogênese, a progressão (BASU, 2018; CHOUDHURI; CHANDERBHAN; MATTIA, 2018). Durante este estágio, as células cancerígenas ganham auto-suficiência nos sinais de crescimento, apresentam angiogênese sustentada e desenvolvem mecanismos de plasticidade celular, que conferem capacidade migratória (CHOUDHURI; CHANDERBHAN; MATTIA, 2018; LOEB, 1991; WARD, 2002). A plasticidade celular e o ganho do potencial migratório, possibilita que estas células invadam outros tecidos e caracterizem o último estágio da carcinogênese, a metastatização (KINZLER; VOGELSTEIN, 1996; STUELLEN; PARENT; MONTELL, 2018).

Estudos recentes têm mostrado que a desdiferenciação celular que leva a metastatização está diretamente associada a dinâmica do microambiente neoplásico (EL-KENAWI; RUFFELL, 2019; EMON et al., 2018). Isto porque, a expansão clonal resulta no distanciamento físico das células em relação ao estroma e, por consequência, há uma redução da pressão parcial de oxigênio (EL-KENAWI; RUFFELL, 2019). A hipóxia resultante ativa fatores de transcrição que governam o processo de diferenciação celular, resultando na transição epitélio-mesênquima (TEM), levando a migração e invasão (EMON et al., 2018; HENNINGS et al., 1993; STUELLEN; PARENT; MONTELL, 2018; WARBURG, 1956).

Outra característica adquirida de células cancerígenas, é a superexpressão de algumas proteínas transportadoras da membrana. Estas proteínas estão associadas a resistência a múltiplas drogas, como as transportadoras de cassetes de ligação ao ATP (*ATP-binding cassette* - ABC transporters), e são responsáveis pelo movimento ativo, dependente de ATP, de diversas substâncias, como lipídeos, íons, e esteroides para fora da célula (ALEXANDER et al., 2019; HUANG; SADE, 2006). Neste sentido, quando este efluxo ocorre para compostos exógenos, como quimioterápicos, tem-se com maior facilidade a exteriorização da droga anti-neoplásica, interferindo na quimiossensibilidade e resistência das células tumorais (ALEXANDER et al., 2019). Estas proteínas encontram-se ainda mais expressas em células com fenótipo tronco-cancerígenas, justificando a alta resistência destas células às drogas anti-neoplásicas (TURDO et al., 2019). Neste sentido, as

células-tronco cancerígenas dificilmente são eliminadas em terapias citotóxicas, e tornam-se as responsáveis pela reincidência e manutenção de tumores (ALISI et al., 2013; VINOGRADOV; WEI, 2012). Uma importante subfamília das ABC *transporters* é a ABCC, conhecida como MRP's, onde encontram-se por exemplo, as proteínas MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6 e MRP8.

Os agentes carcinogênicos que levam a iniciação do câncer podem ser químicos, físicos e biológicos (BARNES et al., 2018; MALLING, 2004). Alguns destes agentes são classificados como carcinógenos completos, já que atuam tanto na iniciação neoplásica, promovendo a mutação, quanto na promoção do câncer, estimulando a divisão celular (JOHN et al., 2016; RUNGER, 2016).

Um dos maiores exemplos de um carcinógeno completo é a radiação ultravioleta (UV) (JOHN et al., 2016; RUNGER, 2016; SCHMITT, 2012). Isto porque, além de promover mutações decorrentes dos dímeros de timina, ela também induz a inflamação. A inflamação, por sua vez, gera a produção de citocinas que resultam na proliferação celular (OAK et al., 2018). Desta forma, a exposição à radiação UV é um dos principais agentes etiopatogênicos dos cânceres de pele, malignidades que protagonizam as estatísticas mundiais de câncer (LABERGE et al., 2020; PFEIFER, 2020)

1.2 CÂNCER DE PELE

No Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, estima-se que haverá 4.200 novos casos de melanoma em homens e 4.250 novos casos em mulheres (INCA, 2019). Mesmo acometendo mais mulheres, a mortalidade pela doença é maior em homens, chegando a 1.031 óbitos/ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Sugere-se que a maior incidência de melanoma no sexo feminino esteja relacionada ao maior tempo e frequência de exposição à UV pela cultura do bronzamento (DE SOUZA et al., 2004). Contudo, a maior percepção de risco da doença pelas mulheres, quando comparado aos homens gera um melhor prognóstico de cura no sexo feminino (SMALLEY, 2018). O Câncer de pele atinge com mais frequência pessoas brancas com mais de 40 anos de idade, sendo considerado um tumor raro em crianças e pessoas negras (PIRES et al., 2017).

A etiologia deste câncer é atribuída tanto a fatores genéticos intrínsecos, quanto a fatores ambientais (LEÓN et al., 2013). Entre os fatores ambientais, a exposição à radiação UV (tipos UVA e UVB) é o mais relevante, pois produz lesões nas moléculas de DNA (mutações) (CORRIE et al., 2014; MONTAGNER et al., 2009).

A radiação do tipo UVB e UVA não só promovem mutações diretas, em proto-oncôgenes e genes supressores tumorais, como causam também estresse oxidativo, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) (SOSA et al., 2012; VÁZQUEZ, 2012). As ROS, por sua vez, podem causar peroxidação lipídica das membranas, oxidação de proteínas e interagir com nucleotídeos, provocando quebras na fita de DNA (BARREIROS et al., 2006; PRASAD et al., 2017). Dessa forma, ambas as radiações UVA e UVB contribuem com a geração de danos graves no DNA que, se não reparados ou reparados de forma inapropriada pelo sistema de reparo, podem resultar em mutações (SOSA et al., 2012; VÁZQUEZ, 2012).

As mutações causadas pela radiação UV ocorrem principalmente em sequências do DNA ricas em bases pirimidinas próximas, como uma citosina e uma timina (C-T) ou duas citosinas (C-C) (MARTENS et al., 2018; WIKONKAL et al., 1999).

A radiação UV induz a formação de ligações covalentes entre estas bases, formando dímeros de timina (ALBERTS et al., 2017). Estes dímeros provocam distorções na dupla hélice tornando a fita de DNA instável, e quando não reparada, torna-se mais suscetível a quebras (ALBERTS et al., 2017). Em células saudáveis, a formação dos dímeros de timina é reparada pelo processo de fotorreativação, através de enzimas chamadas de fotolases (CHANG et al., 2009; KAO et al., 2005). Mas, na ausência do reparo do DNA lesionado, as mutações consequentes como deleções e substituições de bases, são herdadas no processo de replicação, contribuindo para a progressão do câncer de pele (ALBERTS et al., 2017).

O câncer de pele é classificado em dois tipos histológicos: (1) não melanoma e (2) melanoma (DIEPGEN et al., 2002). O tipo não melanoma é composto principalmente pelos carcinomas basocelular e espinocelular (DIEPGEN et al., 2002; MASSONE et al., 2005). O subtipo basocelular é o mais comum entre os não melanomas e, desenvolve-se como uma neoplasia de células basais da epiderme ou de anexos cutâneos (BROETTO et al., 2012; VÁZQUEZ, 2012). Já o subtipo espinocelular acomete queratinócitos. Por isso, um fator indicativo deste tipo

histológico pode ser o surgimento da queratose actínica, também conhecida por queratose solar ou senil (SCHMITT, 2012; TRAVASSOS et al., 2016). Apesar da relação direta de ambos com o acúmulo de exposições a UV, os carcinomas espinocelulares revelam-se frequentemente nas regiões do corpo de maior exposição, como pescoço, cabeça, face e orelhas (ALAM et al.,2001; SALASCHE, 2000).

Já o melanoma representa cerca de 3% dos casos de câncer de pele registrados anualmente (DZWIERZYNSKI, 2013; SIEGEL et al., 2011). Apesar de ser menos prevalente, este câncer apresenta uma elevada taxa de mortalidade, de até 73% (CARR et al., 2019;NIKOLAOU et al., 2014).

1.3 O MELANOMA

O acúmulo de mutações em melanócitos, células dendríticas que produzem a melanina, resulta no melanoma (CARR et al.,2019). Estas células estão localizadas entre as junções da derme com a epiderme, ou entre os queratinócitos basais da epiderme (COSTIN et al., 2007). Os melanócitos são regulados por fatores melanogênicos produzidos por queratinócitos ao serem expostos a radiação UV (COSTIN et al., 2007; MILER et al., 2006). Como resultado, estes fatores estimulam a produção da melanina em uma reação de proteção ao DNA dos queratinócitos. Dessa forma, a melanina é depositada em torno de seus núcleo celular (DONG et al., 2003; GRAY-SCHOPFER et al.,2007).

A melanina é um pigmento de coloração marrom escura e é responsável pela cor dos olhos, cabelos e pele (COSTIN et al., 2007). Ela estabelece uma relação direta entre os fototipos de pele e fenótipos raciais mais propensos ao melanoma (COSTIN et al.,2007; LANDI et al., 2002; TSAO et al., 2004). Assim, indivíduos com maior quantidade de melanina, como negros, são inicialmente mais protegidos da radiação UV, justificando a menor incidência de melanoma na população negra (CARR et al., 2019; RASTRELLI et al., 2014). Da mesma forma, populações com menores quantidades de melanina, como por exemplo brancos caucasianos, estão mais predispostos a desenvolver o melanoma (FERNANDES et al., 2005). Por isso no Brasil, a população da região Sul onde há majoritariamente fenótipo de peles claras devido a ancestralidade europeia, possui uma elevada incidência de melanoma (INCA, 2018).

Os melanomas geralmente apresentam coloração escura devido à quantidade exacerbada de melanina produzida (RASTRELLI et al., 2014). Em

indivíduos mais jovens, esta malignidade se desenvolve em áreas de maior exposição ao sol como costas, membros superiores e pernas, contrastando com os indivíduos mais velhos onde se desenvolve em regiões da cabeça e pescoço (ELWOOD et al., 1998; GUIDETTI et al., 2016). Contudo, o melanoma também acomete outras partes do corpo, localizando-se em regiões intraepidérmicas, células névicas, epitélio mucoso, olhos e leptomeninges (LEÓN et al., 2013).

A proliferação celular do melanoma ocorre em duas fases: **crescimento radial (FCR)** e **crescimento vertical (FCV)**. A primeira fase, **FCR**, apresenta a multiplicação de melanócitos no sentido horizontal e centrífugo na epiderme (DZWIERZYNSKI, 2013; GRAY-SCHOPFER et al., 2007). A segunda fase, **FCV**, apresenta crescimento vertical, estimulando a formação de grandes nódulos dérmicos com morfologia alterada (TUCKER et al., 2002). Estes nódulos celulares são capazes de invadir tecidos adjacentes e iniciam os primeiros estágios da metastatização (LEÓN et al., 2013; TUCKER et al., 2002). A metástase ocorre aceleradamente, comprometendo vários níveis da derme e órgãos a distância, tanto por via linfática quanto hematogênica (DEVITA VT et al., 2011; WEEDON et al., 2006).

Existem quatro principais subtipos de melanoma maligno: (1) melanoma disseminativo superficial, (2) lentigo maligno, (3) nodular e (4) lentiginoso acral. Estes subtipos de melanoma diferem-se por características histológicas próprias (GOYDOS et al., 2016; KIURU et al., 2019; PAN et al., 2017; RASTRELLI et al., 2014; SHAIN et al., 2016).

1.3.1 Predisposição ao Melanoma

Como uma doença multifatorial, a etiologia do melanoma associa-se a exposição a fatores ambientais (CARR; et al., 2019). Entretanto, a susceptibilidade genética influencia no agravamento desta neoplasia (NIKOLAOU et al., 2014). Em virtude disso, características fenotípicas como: a cor da pele, lesões precursoras e o aparecimento de nevos atípicos, são os principais fatores hereditários de predisposição descritos (BOLOGNIA et al., 2011). Adicionalmente, indivíduos portadores de doenças genéticas com o sistema de reparo comprometido, como a xeroderma pigmentosa, tornam-se 2000 vezes mais predispostos ao melanoma (CARR et al., 2019; LEÓN et al., 2013).

Os polimorfismos individuais e algumas mutações em genes de atividades pigmentares também podem aumentar a predisposição ao melanoma

(BEVONA et al., 2003). Por exemplo, o gene receptor de melanocortina-1 (MC1-R) é um importante regulador pigmentar que é altamente polimórfico, influenciando nos fenótipos de pigmentação e na resposta individual a radiação UV (BOX et al., 2001; DUFFY et al., 2004; FLANAGAN et al., 2000; KENNEDY et al., 2001; VALVERDE et al., 1996).

Quando ativo, o MC1-R leva a produção de eumelanina e expressa ligantes para hormônios de melanogênese como o hormônio estimulante de melanócitos do tipo α (α -MSH) e adrenocorticotrofina (ACTH) (ÁVILA, 2010; BUSCÀ et al., 2000). Os polimorfismos no MC1-R, conhecidos como “alelos R” (Arg151Cys, Arg160Trp e Asp294His) dobram os riscos de desenvolvimento de melanoma porque diminuem a capacidade celular de sequestrar ROS e de reparar danos no DNA (RANSOHOFF et al., 2016). Estas mutações são encontrados principalmente, em indivíduos ruivos, com pele clara e incapazes de sofrer bronzeamento (PALMER et al., 2000).

Mutações germinativas em genes de supressão tumoral e proliferação celular, também estão ligadas com o melanoma hereditário (GILLANDERS et al., 2003; HUSSUSSIAN et al., 1994). Por exemplo, quando mutados, os genes *P16* e *P14ARF* promovem a regulação negativa das vias das proteínas retinoblastoma (pRB) e p53 (que regulam negativamente o ciclo celular) (LANDI et al., 2002; LOWE et al., 2003; QUELLE et al., 1995; WEI et al., 2003). Outro exemplo, são as mutações no gene *BRAF*, como a mutação V600E, que levam a ativação constitutiva da via MAPK, estimulando de forma inadequada a proliferação, migração e invasão celular (COHEN et al., 2002; DONG et al., 2003; NIKOLAOU et al., 2014)

Um dos exemplos de mutações germinativas associadas ao melanoma hereditário é a síndrome dos nevos displásicos familiar - doença autossômica dominante, caracterizada pela ocorrência de múltiplos nevos atípicos e melanomas dentro da mesma família (BISHOP et al., 2002; CARVALHO et al., 2004; RANSOHOFF et al., 2016).

Compreender a etiologia do melanoma é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas como a imunoterapia, permitindo assim uma resposta ao tratamento mais efetiva de acordo com o perfil mutacional de cada paciente (GUERRA et al., 2019).

1.3.2 Diagnóstico e Prognóstico

A dermatoscopia é o principal procedimento de diagnóstico não invasivo realizado na investigação de lesões melanocíticas (MASSONE et al., 2005).

O diagnóstico, em uma lesão suspeita, investiga as características ditadas pelo ABCDE do melanoma: **A**ssimetria, **B**ordas irregulares, **C**or variada dentro da mesma lesão, **D**iâmetro superior a 5 mm e **E**volução (ABBASI et al., 2004; BACH et al., 2010).

Estas análises contribuem com aproximadamente 49% dos diagnósticos de melanoma, apresentando uma boa precisão e um diferencial para a escolha dos tratamentos (KITTLER et al., 2002; MASSONE et al., 2005). Ademais, investigações secundárias como diagnósticos histopatológicos por biópsia da lesão também são realizados e tomam como parâmetros os índices de Breslow e os níveis de invasão de Clark (LEÓN et al., 2013).

As investigações baseadas nos índices de Breslow e níveis de invasão de Clark possibilitam identificar o estadiamento da doença, direcionando o tratamento (BEVONA et al., 2003; DZWIERZYNSKI, 2013). O índice de Breslow mensura a espessura do tumor em milímetros, e prediz a profundidade da invasão, sendo o parâmetro de maior influência no estadiamento da doença (GARBE et al., 2009; LEÓN et al., 2013). Já os níveis de Clark representam o grau de invasão neoplásica nas camadas da pele (CLARK et al., 1969).

1.3.3 Tratamento do Melanoma

A cirurgia para excisão do tumor com margens ampliadas é o principal método terapêutico usado no tratamento do melanoma (BACH et al., 2010; DZWIERZYNSKI, 2013). Contudo, muitas vezes a excisão do melanoma é acompanhada da dissecação de toda a cadeia local de linfonodos, tornando o procedimento mais complexo (GARBE et al., 2009; THOMAS et al., 2014). Aliado a cirurgia, os pacientes são tratados com terapias adjuvantes que consistem na administração de interferon- α (IFN α) e inibidores de angiogênese tumoral (CORRIE et al., 2014; MOCELLIN et al., 2013).

Para melanomas malignos, muitas vezes as terapias existentes buscam apenas melhora do prognóstico do paciente, podendo ser utilizado a quimioterapia com drogas como a dacarbazina, temozolomida, cisplatina, vindesina, paclitaxel e cicplatina, descritos no **Quadro 1** (BHATIA et al., 2009; CONITEC, 2018). A maioria destes medicamentos pertencem ao grupo de agentes alquilantes que

interferem no ciclo celular pela ligação de grupos alquila no DNA, induzindo a morte celular (COATES, 1992; DE ALMEIDA et al., 2005).

Quadro 1 – Principais quimioterápicos utilizados no tratamento de melanoma metastático

Quimioterápico	Taxa de resposta	Efeitos colaterais	Referências
Dacarbazina	De 10 – 15%. Baixa durabilidade das respostas a longo prazo e taxa de sobrevida em 5 anos de 2 - 6%	Gastrotoxicidade, anemia, neutropenia, mielodepleção, trombocitopenia, linfopenia, possível depleção ovariana	(BALCH; ATKINS, 2020; BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009; DOMINGUES et al., 2018; JIANG et al., 2014; WILSON; SCHUCHTER, 2016; WINSHIP et al., 2018)
Temozolamida	13 – 14,5%	Dores de cabeça, náuseas, mielossupressão, linfopenia e trombocitopenia	(BALCH; ATKINS, 2020; WILSON; SCHUCHTER, 2016)
Vindesina	13%	Dor neuropática, perda de reflexos tendinosos profundos, disfunção motora, ataxia, paralisia, neutropenia e toxicidade gastrointestinal	(BALCH; ATKINS, 2020; MARTINO et al., 2018)
Cisplatina	Resposta média de 10-20%, com duração de 4 meses.	Nefrotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade, gastrointestinal, neurotoxicidade, mielossupressão, toxicidade hematológica, toxicidade vascular, hiperuricemia	(BALCH; ATKINS, 2020; BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009; GHOSH, 2019)
Paclitaxel	Em média 10-13%	Neutropenia, alopecia, dor óssea nos membros inferiores, reações anafiláticas, neuropatia periférica	(BALCH; ATKINS, 2020; WILSON; SCHUCHTER, 2016)
Ciclofosfamida (apenas terapias conjugadas)	De 50% - 70% quando combinada a outras estratégias, como por exemplo a imunoterapia	Supressão da medula óssea, toxicidade cardíaca e gonadal (principalmente falência ovariana), cistite hemorrágica e carcinogênese	(EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; GEORGE; ARMENIO; KATZ, 2016; OUYANG et al., 2015)

Entretanto, o melanoma apresenta um histórico de resistência às terapias convencionais, e atualmente, apenas um quimioterápico é disponibilizado como opção de tratamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, sendo a dacarbazina (CONITEC, 2018; DOMINGUES et al., 2018; KALAL et al., 2017). Contudo, ela apresenta baixas taxas de resposta, com efetividade de até 20%, baixa duração dos benefícios a longo prazo e efeitos colaterais que podem ser severos (**Quadro 1**) (CONITEC, 2018; GUERRA et al., 2019).

Outro grupo de agentes antineoplásicos utilizados para o melanoma, é o dos alcaloides extraídos de plantas, como a vindesina, que atua interrompendo a mitose celular de forma dose-dependente (BRANDÃO et al., 2008). A utilização de moléculas extraídas de plantas tem despertado grande interesse na oncologia (GREENWELL; RAHMAN, 2015). Isto porque, por se tratarem de metabólitos secundários de vegetais, estas moléculas apresentam atividade citotóxica e antioxidante (BAHMANI et al., 2017; HEIDARIAN et al., 2013). Desta forma, os extratos fitoterápicos podem ser utilizados como adjuvantes a quimioterápicos, auxiliando na neutralização de radicais livres naturalmente produzidos em resposta a administração de drogas antineoplásicas e reduzindo parte dos efeitos colaterais indesejáveis associados a estas drogas (CONKLIN, 2004).

1.4 *Agave Sisalana* Perrine como adjuvante no tratamento do câncer

A América Latina demonstra um grande potencial na bioprospecção de novas substâncias fitoterápicas devido sua ampla biodiversidade (CALIXTO, 2005; RATES, 2001). Desde 1957, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) relata que extratos vegetais obtidos desta região apresentam propriedades antineoplásicas (HAMBURGER et al., 1991).

Dentre os países da América Latina, o Brasil é um dos principais fornecedores de extratos vegetais para o mercado farmacêutico, tendo uma expressiva participação na bioprospecção de moléculas-alvo para o tratamento de diferentes doenças, incluindo o câncer (BRANDÃO et al., 2008).

Neste sentido, a região Nordeste do Brasil se destaca por uma ampla variedade de botânica e por pelo uso popular de diferentes produtos naturais para fins medicinais, embora a ação farmacológica de grande parte destes produtos permaneça sem comprovação científica (AGRA et al., 2007; MELO-BATISTA et al., 2014).

Dentre as espécies vegetais amplamente presentes na região Nordeste está a *Agave Sisalana* Perrine, também conhecida como sisal (**Figura 1**),

Figura 1 - Plantação de *Agave Sisalana* Perrine (Sisal).



Fonte: EMBRAPA, 2014.

A *A. sisalana* é uma monocotiledônea, adaptada a alta luminosidade, baixa pluviosidade e altas temperaturas – características estas encontradas no ecossistema do Nordeste (MIRANDA, 2011). Considerada também como o ouro verde do sertão, a fibra do sisal é a principal matéria prima utilizada na produção de fios e cordas de produtos artesanais (DANTAS, 1994; DUNDER et al., 2010a; MIRANDA, 2011; SANTOS et al., 2009).

Embora o sisal seja uma fonte de subsistência para parte da população nordestina, 95% do sisal não é utilizado pela indústria sendo geralmente descartado no solo (DUNDER et al., 2010a; JENER et al., 2009). O resíduo dessa planta é composto principalmente de celulose, água, e metabólitos orgânicos e inorgânicos (COSTA et al., 2014; DANTAS, 1994; SANTOS et al., 2009).

Diferentes estudos vêm investigando as propriedades farmacológicas do suco do sisal, conforme mostrado no **Quadro 2** (DEBNATH et al., 2010).

Quadro 2 - Propriedades medicinais do suco do sisal, investigadas por diferentes grupos de pesquisa.

Propriedade medicinal do Sisal	Referência Bibliográfica
Analgésica	(DUNDER et al., 2010; MWALE et al., 2012)
Anti-inflamatória	(INGAWALE et al., 2019; MWALE et al., 2012)
Antimicrobiana	(HAMMUEL et al., 2011; SANTOS et al., 2009)
Antineoplásica	(ALLSOPP et al., 2013)
Adjuvante em vacinas	(ARALDI et al., 2017)
*Citotóxica e antineoplásica	(ARALDI et al., 2018a; CASILLAS et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2019)
Anti-helmíntica	(BOTURA et al., 2011; DOMINGUES et al., 2010)
Imunomoduladora	(CHEN et al., 2011)
Prebiótica	(APOLINÁRIO et al., 2018)

* Em destaque, as propriedades citotóxicas e antineoplásica, fonte de investigação em nosso grupo de pesquisa.

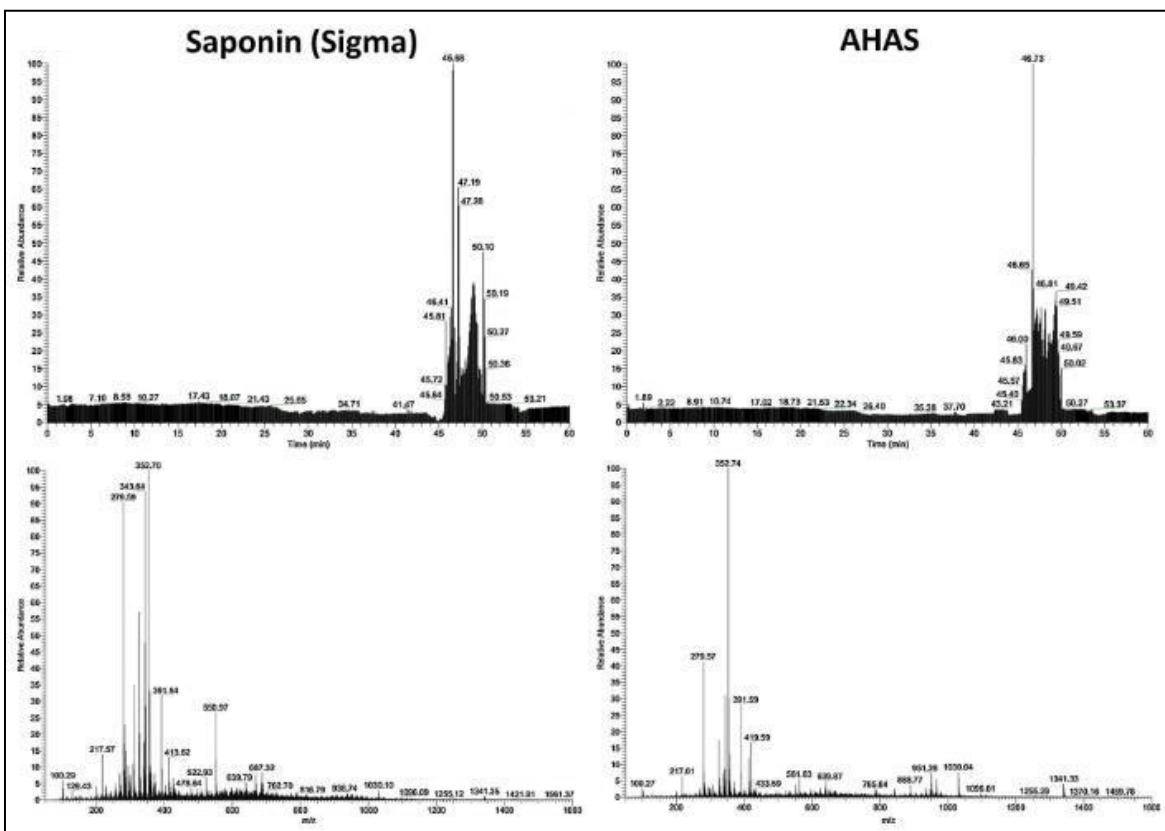
Os extratos do suco da *Agave Sisalana* Perrine podem ser obtidos por diferentes métodos, como: (1) processos de hidrólise ácida (**EHA**) - o qual ocorre a hidrólise do sisal por meio do aquecimento da planta com ácido sulfúrico; (2) precipitação seca (DPAS) - no qual o suco do sisal é centrifugado a vácuo até que se obtenha um precipitado e (3) extração hexânica (HEAS) - no qual o precipitado do suco seco é macerado com o hexano (ARALDI et al., 2018).

Em função das reações decorrente da interação do suco do sisal com os químicos empregados na extração, é sabido que a composição química de cada

um dos extratos pode variar e, com isso, as propriedades farmacológicas também podem ser distintas. Entretanto, de modo geral, estes extratos são ricos em: alcaloides, esteróis, cumarinas, terpenóides, flavanóides e, principalmente, saponinas (ARALDI et al., 2018; COSTA et al., 2014). Dentre estas, as saponinas se destacam por serem amplamente empregadas na indústria farmacêutica, onde são utilizadas como precursoras da semi-síntese de corticosteroides (ARALDI et al., 2018; DEBNATH et al., 2010; ZOU et al., 2006).

Em estudos prévios, Araldi et al. (2018) demonstraram por cromatografia em fase líquida (LC-MS) que o extrato da hidrólise ácida de *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) apresenta um padrão de íons muito similar ao da saponina comercial obtida da *Quilaja sp.* (Sigma, Alemanha) (**Figura 2**), demonstrando que este extrato é uma fonte em potencial de saponinas

Figura 2 – Cromatografia em fase líquida (LC-MS) do extrato da hidrólise ácida de *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) e da saponina comercial *Quilaja sp.* (Sigma).



Fonte: Araldi et al. (2018)

O estudo também mostrou que o EHAAS nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresenta atividade citotóxica para células VERO

(oriundas de rins de macacos verde) – linhagem comumente utilizada em estudos de citotoxicidade (ARALDI et al., 2018). Este resultado sugere que a atividade citotóxica do EHAAS poderia ser explorada no tratamento do câncer (ARALDI et al., 2018).

A citotoxicidade do EHAAS tem sido atribuída a presença das saponinas que, por apresentarem atividade tensoativa, promove a permeabilização de membranas biológicas interagindo com a fração lipídica (ARALDI et al., 2018).

Além do mais, o EHAAS mostrou exibir uma elevada atividade antioxidante, com baixa atividade genotóxica, tanto em modelos *in vitro* (com células VERO), como *in vivo* (em camundongos) (ARALDI et al., 2018).

Combinados, estes resultados fazem do EHAAS um promissor produto biotecnológico no tratamento de diferentes malignidades, incluindo o melanoma.

2. JUSTIFICATIVA

O melanoma possui elevadas taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo. A excisão cirúrgica da lesão maligna é a principal forma de tratamento da doença, porém a cirurgia não tem mostrado aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes de forma significativa. Além do mais, as terapias disponíveis são pouco eficientes no tratamento, sobretudo de pacientes com metástases. Desta forma, faz-se necessário investir na bioprospecção de novas moléculas com atividade antineoplásica seletiva para o melanoma metastático. Neste sentido, os extratos vegetais têm sido frequentemente estudados como uma fonte promissora de novas moléculas com propriedades antineoplásicas. Adicionalmente, nosso grupo mostrou que o extrato da hidrólise ácida da *Agave sisalana* Perrine (EHAAS), espécie de monocotiledônea amplamente distribuída no Nordeste brasileiro, apresenta atividade citotóxica e antioxidante para células Vero, porém com reduzido potencial mutagênico. Tais atividades têm sido atribuídas a elevada concentração de saponinas presente neste extrato. Os resultados obtidos em células Vero fazem do EHAAS um promissor agente adjuvante no tratamento de diferentes malignidades, incluindo o melanoma metastático.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do extrato da hidrólise ácida de *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) nas linhagens de melanoma A2058 - derivada de metástase linfonodal e SK-MEL-5 - derivada de metástase linfonodal axilar, como um possível agente adjuvante na quimioterapia do melanoma metastático.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar a atividade citotóxica do EHAAS em diferentes concentrações **(25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL)** em linhagens de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5) e fibroblasto humano (MRC5) – como controle.

Estratégia: Investigar os tipos de morte celular (apoptose e necrose) resultantes do tratamento com o EHAAS empregando o ensaio de Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio (IP) através de citometria de fluxo.

3.2.2 Avaliar os efeitos do EHAAS sobre o metabolismo energético das linhagens celulares de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5) e fibroblastos humano (MRC5, controle).

Estratégia: Avaliar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) através do ensaio MitoTracker e quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio DCFH-DA (diacetato de 2',7'-dichlorofluorescina) das células tratadas com o EHAAS nas diferentes concentrações **(25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL)** .

3.2.3 Identificar o potencial genotóxico do EHAAS em linhagens de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5) e fibroblasto humano (MRC5, controle).

Estratégia: Analisar potencial clastogênico do EHAAS sob as concentrações de **50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL** através do ensaio de histona γ -H2AX, por meio de análise de citometria de fluxo.

3.2.4 Investigar a resposta das linhagens de melanoma metastático (A2058; SK-MEL-5) e controle (MRC5) ao EHAAS através da expressão de proteínas associadas a resistência de múltiplas drogas.

Estratégia: Avaliar os níveis de expressão das ABC *transporters* MRP1 e MRP3 através de imuno-marcação com anticorpos Anti-MRP1 e Anti-MRP3, por meio da análise de citometria de fluxo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) em colaboração com o Laboratório Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e Laboratório de Genética, Mutagênese e Biologia Molecular da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Ciências e Letras de Assis.

Os métodos empregados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNESP - Faculdade de Ciências e Letras de Assis (FCLA) (processo). O uso do extrato vegetal avaliado neste estudo foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGem) (processo número A177E74, **Anexo 1**), garantindo a preservação do patrimônio genético Nacional.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *Agave sisalana* Perrine

O extrato da hidrólise ácida de *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) foi gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Edislane Barreiros de Souza (UNESP-FCLA). Para manutenção das propriedades do EHAAS, o extrato foi enviado liofilizado e, então ressuspenso em água destilada, obtendo-se assim a solução estoque na concentração de 20 mg/mL. A solução estoque foi armazenada em tubos de polipropileno de 2 mL a -80°C a fim de garantir a máxima preservação das biomoléculas presentes no extrato. Para os experimentos, a solução de estoque (20mg/ml) foi diluída na concentração de 2 mg/mL em meio de cultivo celular RPMI 1640 com HEPES (Vitrocell, EUA) ou em meio de cultura α MEM (Vitrocell, EUA). Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, EUA) e 1% de penicilina 100 U/mL com estreptomicina 100 μ g/mL (Sigma-Aldrich, EUA). Esta

solução foi diluída para as concentrações de trabalho(400, 200, 100, 75, 50 e 25 µg/mL), as quais foram adicionadas nas culturas celulares, conforme descrito por Araldi et al. (2018).

4.3 CULTURA DE CÉLULAS

Para este estudo foram utilizadas duas linhagens celulares de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5) e uma linhagem controle derivada de fibroblasto normal (MRC5), descritas no **Quadro 3**. Dentre as diversas linhagens de melanoma, A2058 e SK-MEL-5 foram escolhidas para nosso estudo por serem linhagens muito utilizadas como modelo para avaliar a quimiossensibilidade de drogas, isto porque apresentam certa resistência á quimioterápicos já estabelecidos, são altamente invasivas e metastáticas (GYORI et al., 2019; OLIVEIRA-JÚNIOR, 2020; RONCA et al., 2013).

Para manutenção das linhagens celulares, uma densidade de 1×10^5 células/cm² foram crescidas em frascos de cultura de 25 cm² (Kasvi, Brasil) contendo 4 mL do meio completo, preconizados para cada linhagem do estudo (**Quadro 3**). Para o crescimento, as células foram incubadas em estufas a 37°C, com atmosfera de CO₂ a 5% e umidade de 75% (Heal Force, CHN).

QUADRO 3 - Linhagens celulares utilizadas no estudo e os parâmetros de cultivo estabelecidos.

Linhagem	Principais Genes mutados	Tipo histológico	Meio de crescimento basal (meio completo)	Incubação
SK-MEL 5 (ATCC® HTB-70™)	BRAF CDK4 EGFR PTEN TP53 TERT	Melanoma humano, derivada de metástase linfonodal axilar.	RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, EUA), com 10% SFB (Vitrocell®) e 1% de penicilina 100U/ml com estreptomicina 100µg/ml (Sigma-Aldrich®, EUA).	37 °C com atmosfera de CO2 a 5% (Heal Force, CHN).
A2058 (ATCC® CRL-11147™)	AIFM1 BRAF PET TP53	Melanoma humano derivada de metástase linfonodal.	RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, EUA), com 10% SFB (Vitrocell®) e 1% de penicilina 100U/ml com estreptomicina 100µg/ml (Sigma-Aldrich®, EUA).	37 °C com atmosfera de CO2 a 5% (Heal Force, CHN).
MRC5 (ATCC® CCL-171™)		Fibroblasto humano, derivado de pulmão	α MEM (<i>Minimum Essential Medium α</i>), com 10% SFB (Vitrocell) e 1% de penicilina 100U/ml com estreptomicina 100µg/ml (Sigma-Aldrich®, EUA).	37 °C com atmosfera de CO2 a 5% (Heal Force, CHN).

Fonte: ATCC; Expasy, 2020.

Após atingirem a confluência de 80-90%, as linhagens celulares foram desagregadas ao atingirem a confluência de 70%, e subcultivadas em placas de Petri de poliestireno de 60 mm (Kasvi, Brasil). Para a expansão e subcultivo, seguimos os procedimentos padrão preconizados em cultura de células: inicialmente os meios de cultura foram removidos e as células foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada de fosfato (PBS 1X). Na sequência, foram adicionados 500µL da solução de tripsina-EDTA (Vitrocell, EUA). As células foram incubadas na estufa a 37°C por 2-5 minutos. As culturas foram desagregadas e observadas em microscópio invertido (Nikon, Japão). Em seguida, foram adicionados 4 mL do meio completo para inativação da enzima tripsina. A suspensão celular foi coletada dos frascos de cultura com auxílio de pipetas Pasteur estéreis e transferidas para tubos Falcon de 15 mL (Kasvi, Brasil). Uma alíquota de 10µL da suspensão celular foi retirada e reservada, para contagem de células em câmara de Neubauer espelhada. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 1.200 rpm, formando um *pellet* celular. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, ressuspendido em 4 mL do meio completo apropriado para cada linhagem.

Para a contagem de células foi utilizado o corante azul de Tripán, o qual diferencia células viáveis (não permeáveis ao corante, células incolores) e não viáveis (permeáveis ao corante, células coradas de azul). A contagem unitária das células foi aplicada a fórmula abaixo, obtendo-se a estimativa do total de células em cultivo.

$$\text{N}^{\circ} \text{ total de células/ml} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}}$$

Para as subculturas das linhagens celulares de melanoma (A2058 e SK-MEL-5) e linhagem controle (MRC5), uma densidade de 2×10^4 células e 3×10^4 células/cm², respectivamente, foi semeada em placas de Petri de poliestireno de 60 mm (Kasvi, Brasil).

As células foram incubadas com 2,5 mL do meio completo em estufas a 37°C, com atmosfera de CO₂ a 5% e umidade de 75%. Ao atingirem a

confluência de 70% as culturas de celulares foram tratadas com EHAAS nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL. Como controle positivo, utilizamos 100 µg/mL de ciclofosfamida, agente alquilante comumente empregado na quimioterapia metronômica de melanoma metastático (BORNE et al., 2010), e como controle negativo, utilizamos 2,5 mL do meio completo a linhagem.

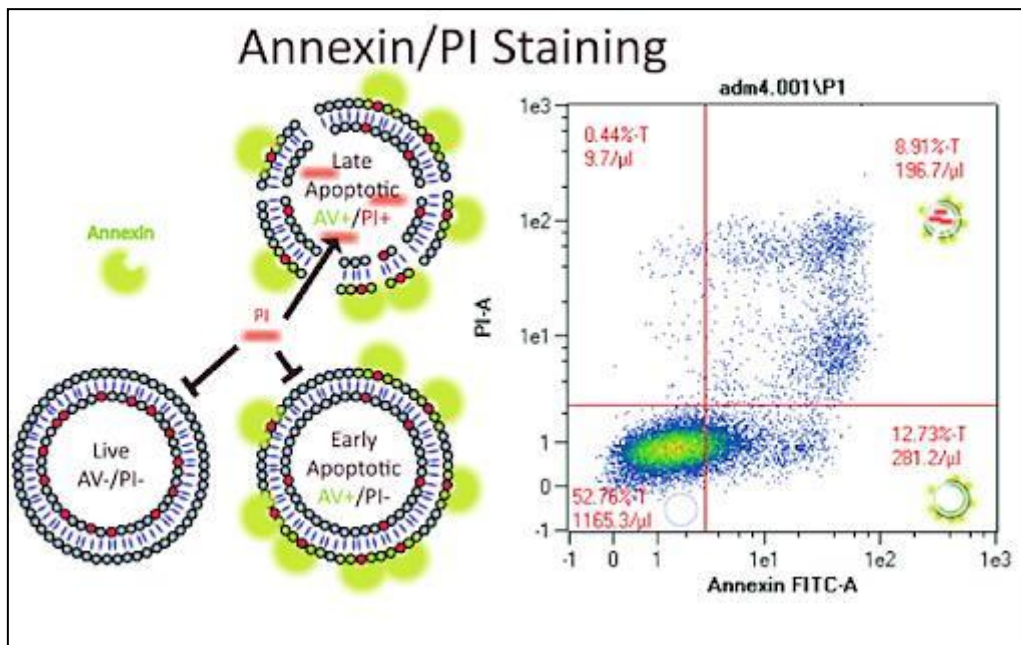
4.4 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

4.4.1 Ensaio de Anexina-V/IP

O ensaio de Anexina-V/IP é uma técnica amplamente empregada para avaliar a citotoxicidade de substâncias *in vitro*, já que possibilita diferenciar as vias de morte celular (apoptose e necrose), bem como avaliar o estágio da apoptose (inicial e tardia). Neste ensaio, é possível identificar células que iniciaram o processo apoptótico pela exposição de resíduos de fosfatidilserina da membrana plasmática. A anexina V é uma proteína Ca⁺⁺ dependente conjugada a um fluoróforo (geralmente FITC), que possui alta afinidade para a fosfatidilserina, e assim liga-se permitindo detectar através da fluorescência conjugada, células apoptóticas (MILLER, 2004; VAN ENGELAND et al., 1998).

Em estágios tardios de apoptose e em estágios necróticos, há uma progressiva perda da integridade da membrana celular, permitindo que o segundo componente deste ensaio, iodeto de Propídio (IP) se intercale ao DNA e também emita fluorescência durante a análise (VAN ENGELAND et al., 1998). Assim, torna-se possível fazer uma distinção entre os tipos de morte celular: células em apoptose inicial serão positivas para Anexina V e negativas para IP, pois terão externalizado a fosfatidilserina, mas ainda não são permeáveis ao IP. Células em apoptose tardia, serão positivas para Anexina V e para IP, pois os resíduos de fosfatidilserina foram expostos e suas membranas estarão em parte degradadas, tornando-as permeáveis ao IP. E células em necrose serão apenas positivas para IP, pois neste estágio suas membranas estão completamente degradadas, com ausência da fosfatidilserina para ligação com Anexina V (VAN ENGELAND et al., 1998). O resultado é obtido pela análise de citometria de fluxo, determinando as populações de células da amostra nos quadrantes correspondentes a cada estágio de morte celular (**Figura 3**).

Figura 3 – Ilustração representativa do ensaio de Anexina V/IP

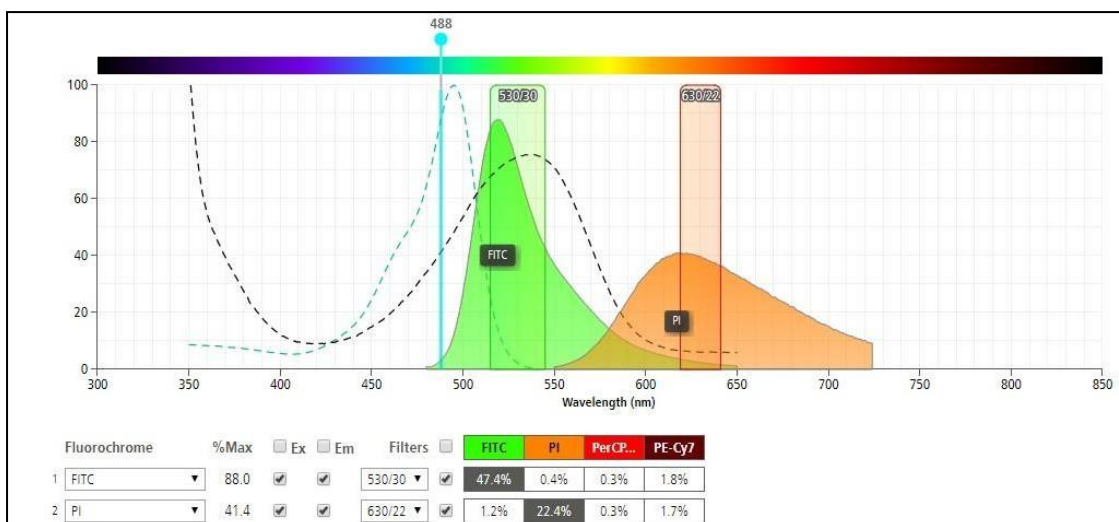


Fonte: St. Michael's Hospital, 2020.

Para o ensaio da Anexina-V/IP, as linhagens foram tratadas com EHAAS nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas por 24 horas, seguindo os métodos de cultura anteriormente descritos. Transcorrido o tempo de incubação de 24 horas, o meio foi removido e transferido para tubos Falcon de 15 mL (Sarstedt, Alemanha). Os poços foram lavados com PBS (1X) e receberam 300 μL da solução de tripsina-EDTA para que a monocamada celular fosse desagregada. A suspensão celular foi coletada em 1 mL de meio completo e transferida para os mesmos tubos Falcon, compondo assim a amostra de células viáveis e não viáveis após os tratamentos recebidos. Após a coleta das células, sob condições de baixa luminosidade, foi acrescentado 5 μL de Anexina V-FITC e 1 μL de IP na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ – ambos diluídos em tampão de ligação, conforme as recomendações do fabricante do Kit (ThermoFisher Scientific, EUA). As células foram incubadas por 15 minutos em ambiente protegido de luz. Transcorrido este tempo, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1.200 rpm. O *pellet* obtido, foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta em 300 μL de PBS (1X). As células foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri (BD

Bioscience, EUA), empregando o filtro FL1 (533 ±15 nm) para quantificar a Anexina-V-FITC e FL4 (675 ±12.5 nm) para PI. Os resultados foram analisados no software *Accuri* (BD Bioscience, EUA) por gráficos *density plot*, tendo sido realizada a devida compensação multicolor devido a sobreposição espectral do fluorocromo FITC com o IP, conforme mostrado na (**Figura 4**).

Figura 4 – Sobreposição espectral dos fluorocromos FITC e IP.



Fonte: BD Biosciences.

Foram classificadas como células em apoptose inicial aquelas com marcação somente para Anexina-V, e como células em apoptose tardia, as com dupla marcação de Anexina-V e IP. Para necrose, foram consideradas células somente com marcação para PI, e como células viáveis, células sem nenhuma marcação, conforme **Figura 3**.

4.5 ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)

Tendo em vista que a atividade citotóxica das saponinas (metabólito secundário presente no EHAAS) se deve a permeabilização da membrana interna das mitocôndrias e a consecutiva depleção na síntese de ATP (YOSHIMOTO; KAMIYA, 1984), este estudo também avaliou o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após o tratamento com as diferentes concentrações do EHAAS. A manutenção do $\Delta\Psi_m$ é a crucial à síntese de ATP e, conseqüentemente, à viabilidade celular (YOSHIMOTO; KAMIYA, 1984).

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, sondas com fluoróforos catiônicos podem ser utilizadas, uma vez que são sequestradas e acumuladas permanentemente na a matriz mitocondrial (WANG et al., 2019). A exemplo disso, a sonda MitoTracker® Deep Red (Thermo Fisher Scientific, EUA) permite analisar o potencial mitocondrial através da intensidade de fluorescência emitida (FRICK et al., 2015). Esta quantificação da fluorescência pode ser avaliada por diferentes métodos. Porém, a citometria de fluxo é o mais empregado, já que permite avaliar quantitativamente a fluorescência emitida e o percentual de células marcadas (VIZLER; GLAVINAS, 2002).

Para avaliar o $\Delta\Psi_m$ das linhagens de melanoma (SK-MEL 5 e A2058) e da linhagem controle (MRC5) foram semeadas $0,5 \times 10^4$ células/cm² e a 3×10^4 células/cm² respectivamente em microplacas de 6 poços (Corning, EUA). As células foram incubadas com 2 mL de meio completo, conforme descrito no **Quadro 3**. Ao atingirem a confluência de 70%, as linhagens MRC5, SK-MEL 5 e A2058 foram tratadas com o EHAAS. O tratamento ocorreu no período de 24 horas nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL. Como controle positivo, foi utilizado 100 µg/mL de ciclofosfamida e como controle negativo, 2 mL de meio completo.

Transcorrido o tempo de 24 horas, foram adicionados aos poços 2 mL de meio completo contendo 500 nM da sonda MitoTracker® Deep Red FM (Invitrogen, EUA) diluída em DMSO.. A sonda foi incubada por 40 minutos a 37°C. Após esse tempo, a monocamada celular foi enzimaticamente desagregada com 300 µL de solução Tripsina-EDTA (Vitrocell, Brasil) por 3 minutos. Então, foi adicionado 1 mL de meio completo aos poços. A suspensão celular foi coletada e transferida para tubos de polipropileno de 1,5 mL (Sarstedt, Alemanha). As células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* foi homogeneizado com 300 µL de PBS (1X) e as células foram analisadas no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Bioscience, EUA). Foram analisados um total de 10.000 eventos empregando o filtro FL4, na faixa de 675 ± 12.5 nm. Os resultados foram analisados no *software* FlowJo™ versão V10 (TreeStar, EUA) por meio de histogramas, relacionando a porcentagem de células que apresentaram marcação para a sonda MitoTracker® Deep Red FM (Invitrogen, EUA).

As análises estatísticas foram realizadas através do teste paramétrico One-Way ANOVA, seguido do teste *post-hoc* de Turkey, ambos com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Tais análises foram realizadas com o *software GraphPad Prism*.

4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Buscando confirmar uma depleção do potencial de membrana mitocondrial, a etapa seguinte consistiu na avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS).

As ROS são moléculas instáveis, originadas da redução do oxigênio celular consumido durante a respiração, podendo se apresentar em: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânions superóxidos (O_2^-) e radicais hidroxila (OH^\cdot) (DA SILVA et al., 2010). Logo, em havendo uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, é esperado que haja uma diminuição das ROS (ZOROV et al., 2006). Por outro lado, com a permeabilização da membrana mitocondrial, decorrente da ação das saponinas presentes no EHAAS, seria esperada a liberação das ROS presentes no lúmen mitocondrial para o citosol.

Desta forma, avaliamos os níveis de ROS em células de melanoma metastático e controle empregando o ensaio de diacetato de diclorodihidro-fluoresceína (DCFH-DA). Este ensaio se baseia na capacidade do DCFH-DA se difundir através das membranas e, ao reagir com as ROS, ser oxidado e transformado em uma molécula fluorescente (DCF), a qual pode ser quantitativamente avaliada por citometria de fluxo (HALLIWELL et al., 2004; KALYANARAMAN et al., 2012).

Para o ensaio da DCFH-DA, a linhagem controle (MRC5) e as linhagens de melanoma metastático (SK-MEL 5 e A2058) foram semeadas a uma densidade de 3×10^4 células/cm² e a $0,5 \times 10^4$ células/cm² em microplacas de 6 poços (Corning, EUA), respectivamente. As células foram incubadas com 2 mL de meio de cultura, conforme descrito no **Quadro 3**.

Ao atingirem a confluência de 70% as células foram tratadas com o EHAAS por 24 horas nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL. Como controle positivo, foi utilizado 100 µg/mL de ciclofosfamida e como controle negativo, 2 mL de meio completo.

Transcorrido o tempo de 24 horas, o meio foi descartado. Na sequência, foi adicionado 1 mL de meio completo, contendo 100 μ M da sonda DCFH-DA (Sigma-Aldrich, Alemanha). As placas foram incubadas em estufas por 40 minutos a 37°C e, em seguida, o meio foi removido. Foram adicionados 300 μ L da solução de Tripsina-EDTA (Vitrocell, Brasil) por 3 minutos, para que a monocamada celular fosse desagregada. As células de cada poço foram coletadas em 1 mL de meio completo e transferidas á tubos de polipropileno de 1,5 mL (Sarstedt, Alemanha). Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos à 1.200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi homogeneizado com 300 μ L de PBS (1X). O material foi analisado no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Bioscience, EUA), sendo avaliados 10.000 eventos empregando o filtro FL1 na faixa de 533 \pm 15 nm. Os resultados foram analisados por meio dos *softwares* Accuri e FlowJo™ versão V10 (TreeStar, EUA) empregando histogramas baseados no percentual de células marcadas para a sonda DCFH-DA.

As análises estatísticas foram realizadas através do teste paramétrico One-Way ANOVA, seguido do teste *post-hoc* de Turkey, ambos com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Tais análises foram realizadas com o *software* GraphPad Prism.

4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO EXTRATO

4.7.1 Ensaio de Histona γ H2AX

A detecção da histona γ H2AX por meio de citometria de fluxo permite identificar quebras-duplas no DNA (DSBs – *double-strand breaks*), sendo considerado um método de alta sensibilidade na detecção de clastogenicidade) (MODESTI et al., 2001). As DSBs representam o tipo mais grave de lesão no material genético (CHEN et al., 2001). Quando as DSBs ocorrem, proteínas histona H2A são fosforiladas no resíduo Ser139, passando a se chamar γ H2AX (PAULL et al., 2000).

Considerando que cada fosforilação é proporcional a cada DSB, a análise dos níveis de expressão de γ H2AX permite avaliar o índice de clastogenicidade (PAULL et al., 2000).

Para isto, as linhagens de melanoma metastático (SK-MEL 5 e A2058) e controle foram semeadas a uma densidade de $0,5 \times 10^4$ células/cm² e

3×10^4 células/cm² respectivamente, em microplacas de 6 poços (Corning, EUA). As células foram incubadas com 2 mL de meio completo, conforme descrito no **Quadro 3**.

As células foram tratadas por 24 horas com o EHAAS nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado 100 µg/mL de ciclofosfamida e como controle negativo, 2 mL de meio completo das respectivas linhagens (**Quadro 3**). Após este período, o meio foi descartado, as células foram lavadas com PBS (1X) e a monocamada celular foi desagregada com 300 µL de solução Tripsina-EDTA por 3 minutos. A suspensão celular foi coletada em 1 mL de meio completo e transferida a tubos de polipropileno de 1,5 mL (Sarstedt®, Alemanha). As células foram centrifugadas por 10 minutos a 1.200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi homogeneizado em paraformaldeído a 2%, permanecendo neste por 2 horas para fixação do material.

Para remoção do fixador, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e lavadas 2 vezes com PBS (1X) a 4°C, repetindo os processos de centrifugação. Em seguida, as membranas celulares foram permeabilizadas com 300 µL de Tween-20 (Invitrogen, EUA) a 0,1% por 15 minutos a 4°C. Este passo se faz importante para permitir que o anticorpo γH2AX, de expressão nuclear, acesse o interior da célula. Para a remoção do permeabilizante, repetiu-se os processos de centrifugação e lavagem com PBS (1X) por 1 vez.

Para bloquear ligações não-específicas com outros antígenos, adicionou-se albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, EUA) a 5% por 40 minutos. Na sequência, as células foram incubadas com uma solução contendo 1 µL de anticorpo anti-human-γH2AX (a 10 mg/mL) (Novus Biologicals, EUA) produzido em coelho (*rabbit*) e 50 µL de BSA a 1%. As células permaneceram a 4°C *overnight*. Na sequência, as células foram lavadas com PBS (1X) e centrifugadas como descrito anteriormente. Em seguida, adicionou-se a solução contendo o anticorpo secundário anti-*rabbit*-IgG conjugado com FITC na diluição de 1:1.000 em BSA a 1%. A incubação foi mantida por 1 hora. As células foram centrifugadas e lavadas com PBS (1X), como descritos anteriormente. O *pellet* foi ressuspendido em 300 µL de PBS (1X).

O material foi analisado no citômetro de fluxo Accucí C6 (BD Bioscience, EUA), empregado o filtro FL1 (533 ±15 nm), sendo analisados um total de 10.000 eventos. Os resultados foram exportados e analisados no *software* FlowJo™ versão V10 (TreeStar, USA).

Para a acurácia da técnica, estabeleceu-se dois controles, sendo: (1) controle negativo: células de cada linhagem que não foram incubadas com os anticorpos primários ou secundários; e (2) controle anticorpo secundário: células que foram incubadas apenas com o anticorpo secundário conjugado com FITC. O controle 2 permite avaliar a presença de marcações inespecíficas e autofluorescência da amostra, que pode acarretar em falsos positivos. As análises serão feitas com a mediana de intensidade de fluorescência das células tratadas e não tratadas (1-controle negativo), comparadas aos níveis expressão do controle com o anticorpo secundário (2).

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA ABC: MRP1 E MRP3

Sabendo que o melanoma apresenta altas taxas de resistência às terapias já preconizadas, investigamos a expressão de proteínas transportadoras de membrana que estão associadas a resistência a múltiplas drogas.

Estas proteínas, em destaque a família das ABC transporters (ATP-Binding Cassette), interferem diretamente na quimiosensibilidade celular a diversas substâncias e estão superexpressas no processo oncogênico (TURDO et al., 2019). Em especial, as proteínas MRP1 (ABCC1) e MRP3 (ABCC3) são investigadas em diversos cânceres, inclusive no melanoma, por atuarem no transporte de antraciclinas, camptotecinas, alcaloides da vinca, glutianona, glucuronato e seus conjugados, (HELMBACH et al., 2003; HUANG; SADE, 2006; KRUH; BELINSKY, 2003; WALSH et al., 2008). Neste sentido, o efluxo proporcionado por MRP1 e MRP3 poderiam interferir nas respostas citotóxicas do EHAAS nas células de melanoma.

Assim, as linhagens de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5) e a linhagem de fibroblasto normal (MRC5) foram semeadas a uma

densidade de 3×10^4 células/cm² e $0,5 \times 10^4$ células/cm² respectivamente, em microplacas de 6 poços (Corning®, EUA).

As células foram incubadas com 2 mL de meio completo seguindo os parâmetros descritos anteriormente no Quadro 3. Após atingirem 70% de confluência, o meio foi descartado, as células lavadas com PBS (1X), e a monocamada celular foi desagregada com 300 µL de solução Tripsina-EDTA, por cerca de 3 minutos. Em seguida, as células foram fixadas em formaldeído a 1% por 24 horas. Após a fixação, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Para a remoção do fixador, o pellet foi lavado com 1 mL de PBS (1X) gelado e foi levado novamente a centrifugação nas condições descritas acima.

Na sequência, as células foram tratadas com 200 µL da solução de bloqueio (5% de BSA diluído em PBS) por 40 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas nas condições descritas e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% diluído em PBS por 15 minutos. Após a permeabilização, as células foram centrifugadas e incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários anti-MRP1 (feito em camundongo - (IU2H10): sc-53130 - mouse) (Santa Cruz, EUA) e anti-MRP3 (feito em cabra – (H-16): sc-5774 – goat) (Santa Cruz, EUA). Transcorrido este tempo, as células foram lavadas e centrifugadas por duas vezes com PBS (1X) gelado. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos secundários Anti-Mouse-IgG (A28175; ThermoFischer, EUA) e Anti-goat-IgG (A-21086; ThermoFischer, EUA) conjugados com FITC e TRITC respectivamente, por 2 horas a 4°C sob a diluição de 1:2.000 em BSA a 5% (diluído em PBS (1X)).

Por fim, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS (1X) e ressuspendidas em 300 µL de PBS (1X). O material foi analisado no citômetro de fluxo Accucí C6 (BD Bioscience, EUA) empregado o canal FL1 (533 ±15 nm) para FITC e FL3 (670-nm LP) para TRITC, sendo analisados um total de 10.000 eventos em triplicata.

Os dados obtidos foram exportados e analisados no software FlowJo™ versão V10 (Tree Star Inc., EUA) e GraphPad Prism empregando histogramas com base na mediana de intensidade de fluorescência (MIF). Para a acurácia da citometria de fluxo, foi estabelecido um controle

negativo, feito com a incubação apenas dos anticorpos secundários conjugado com FITC e TRICT, a fim de avaliar possíveis ligações inespecíficas destes.

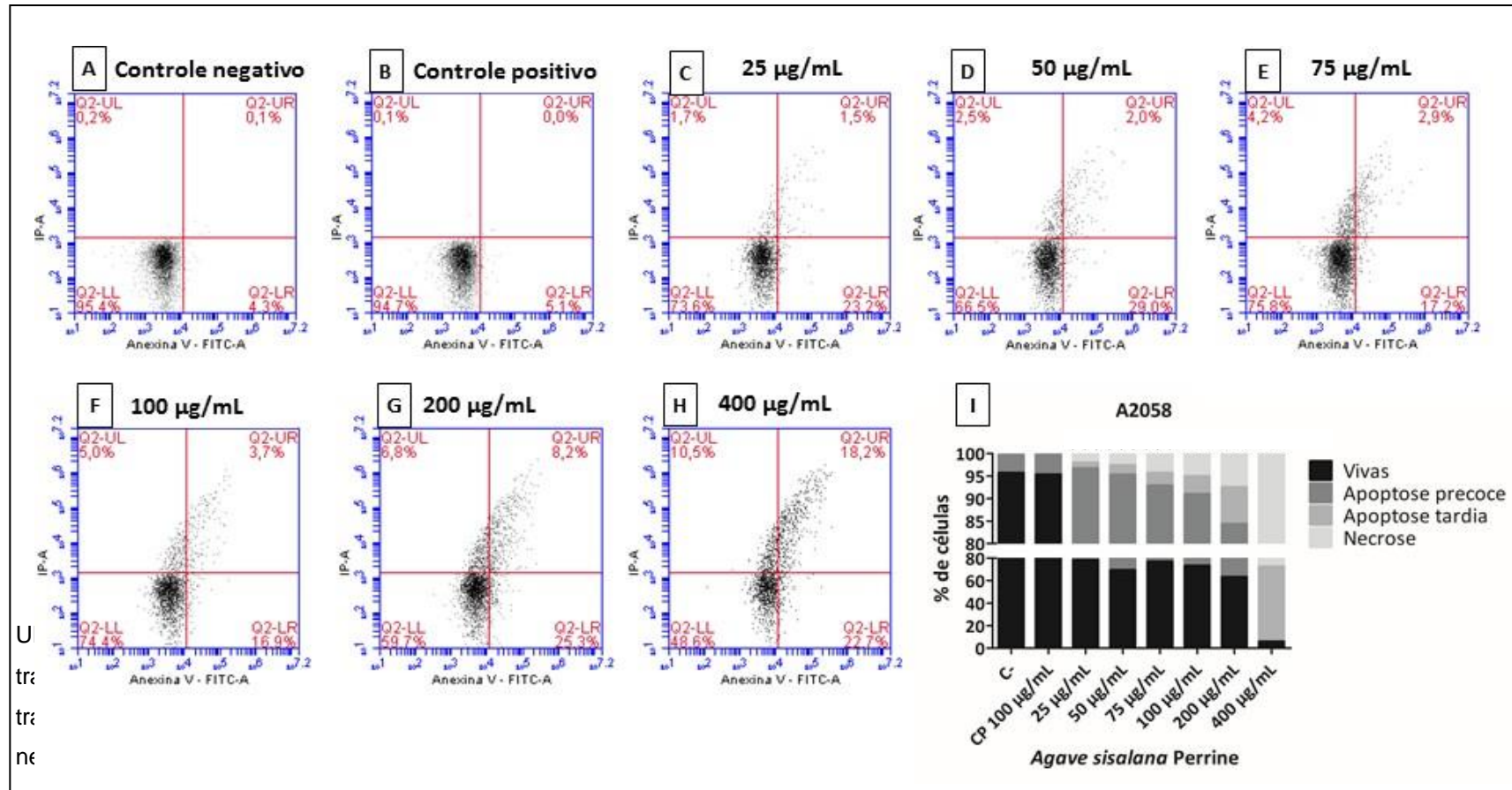
5. RESULTADOS

5.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

5.1.1 Ensaio de Anexina V-IP

Com base no número de células viáveis foi realizada a ANOVA one-way, seguida do teste *post-hoc* de Tukey. Os resultados destas análises mostraram diferenças estatísticas significativas entre as células da linhagem A2058 tratadas com o EHAAS e os controles positivos e negativos, tendo sido verificada uma expressiva redução do número de células viáveis tratadas com todas as concentrações avaliadas do EHAAS (**Figura 5**).

Figura 5 - Resultados do ensaio de Anexina V-IP para a linhagem A2058 (melanoma)

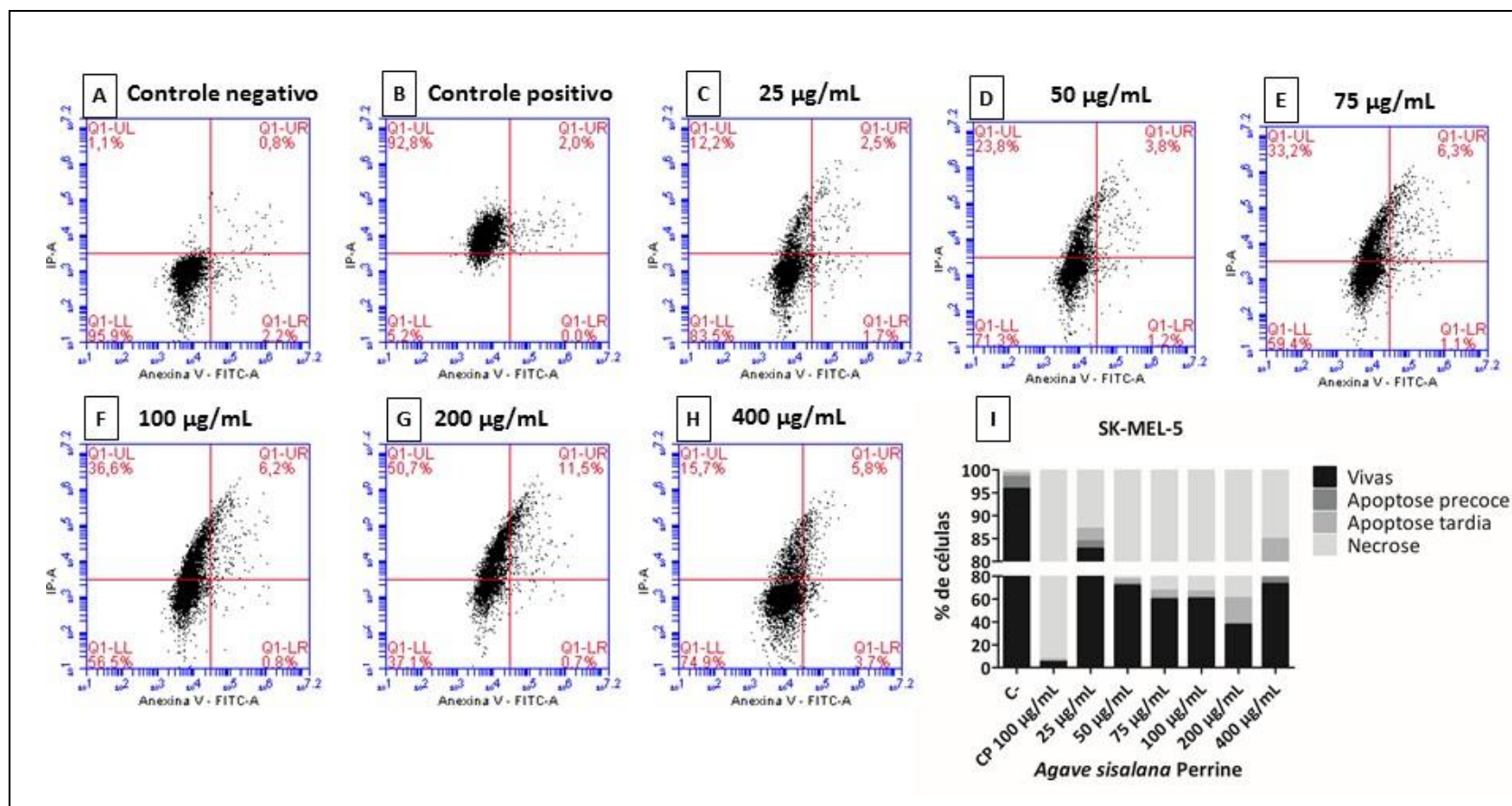


Nota: *Dotplots* mostrando a porcentagem de células viáveis (Q1-LL), apoptóticas precoces (Q1-LR), apoptóticas tardias (Q1-UR) e necróticas (Q1-UL). Em (A) Controle negativo: sem tratamento; (B) Controle positivo: 100 µg/mL de ciclofosfamida; e de (C) a (H) tratamentos realizados com as concentrações do EHAAS. Em (I) histograma mostrando a porcentagem de células vivas após todos os tratamentos. As análises estatísticas mostraram que a concentração de 400 µg/mL apresentou o maior potencial citotóxico em relação ao controle negativo. Não houve diferença significativa na porcentagem de células vivas entre o o grupo tratado com ciclofosfamida e o grupo sem tratamento – controle negativo

Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os controles positivos e negativos nesta linhagem (**Figura 5-I**). Conforme esperado, o EHAAS provocou um aumento significativo de morte celular por apoptose precoce em todas as concentrações testadas (**Figura 5**). Dentre as diferentes concentrações testadas, a concentração de 400 µg/mL de EHAAS foi a mais citotóxica para esta linhagem (**Fig.5-I**).

Já para a linhagem SK-MEL-5, todos os grupos de tratamento apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) no número de células vivas, quando comparada ao controle negativo (**Figura 6**). Além do mais, diferentemente do observado na linhagem A2058, a linhagem SK-MEL-5 apresentou uma expressiva redução do número de células viáveis após o tratamento com ciclofosfamida à 100µg/mL (C+) (**Figura 6-B**). Interessantemente, para a linhagem SK-MEL-5, a concentração de 200 µg/mL do EHAAS apresentou a maior citotoxicidade quando comparada as demais concentrações testadas (**Figura 6**).

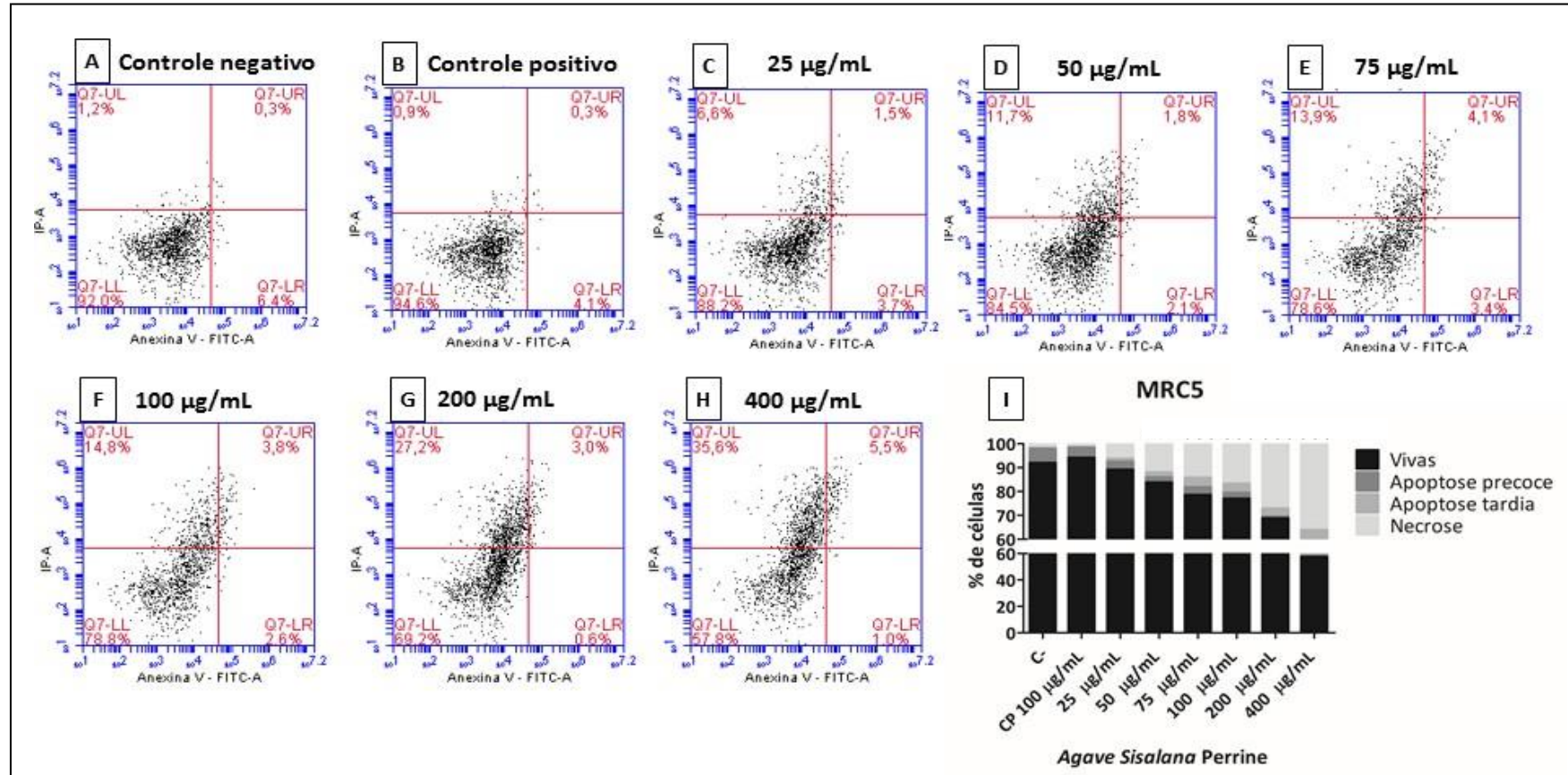
Figura 6 - Resultados do ensaio de Anexina V-IP para a linhagem SK-MEL-5 (melanoma)



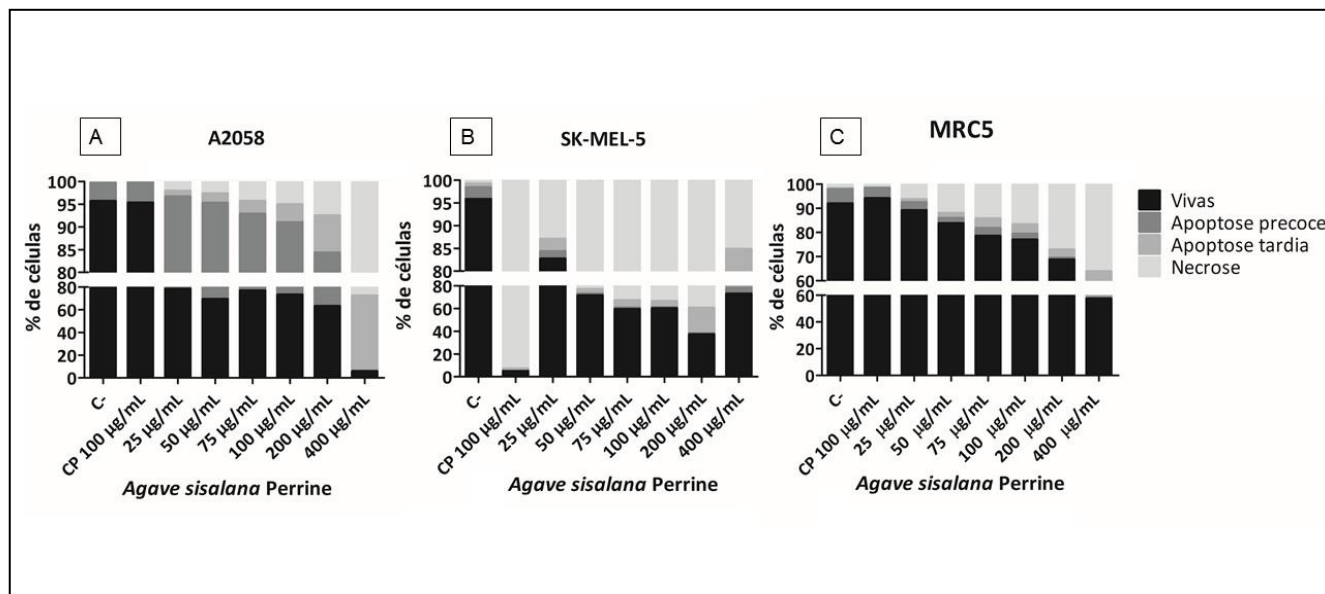
Nota: *Dotplots* mostrando a porcentagem de células viáveis (Q1-LL), apoptóticas precoces (Q1-LR), apoptóticas tardias (Q1-UR) e necróticas (Q1-UL). Em (A) Controle negativo: sem tratamento; (B) Controle positivo: 100 µg/mL de ciclofosfamida; e de (C) a (H) tratamentos realizados com as concentrações do EHAAS. Em (I) histograma mostrando a porcentagem de células vivas em todos os tratamentos. Os resultados mostraram que a ciclofosfamida apresentou o maior potencial citotóxico, seguido do EHAAS a 200 µg/mL.

Entretanto, as células tratadas com o EHAAS apresentaram um aumento expressivo no número de células necróticas (**Figura 6**). Resultado semelhante também foi observado na linhagem MCR5 (empregada como controle neste estudo), onde foi verificado um efeito dose-resposta, com um aumento do número de células necróticas com o aumento da concentração do EHAAS (**Figura 7**). Os resultados obtidos dos ensaios de Anexina V-IP para todas as linhagens, estão representados comparativamente na **Figura 8**.

Figura 7 - Resultados do ensaio de Anexina V-IP para a linhagem MRC5 (fibroblasto normal).



Nota: *Dotplots* mostrando a porcentagem de células viáveis (Q1-LL), apoptóticas precoces (Q1-LR), apoptóticas tardias (Q1-UR) e necróticas (Q1-UL). Em (A) Controle negativo: sem tratamento; (B) Controle positivo: 100 µg/mL de ciclofosfamida; e de (C) a (H) tratamentos realizados com as concentrações do EHAAS. Em (I) histograma mostrando a porcentagem de células vivas em todos os tratamentos. Os resultados mostraram um efeito dose-resposta nos tratamentos com EHAAS, e um aumento crescente de células necróticas.

Figura 8 - Comparativo dos resultados obtidos para o ensaio de Anexina V-IP

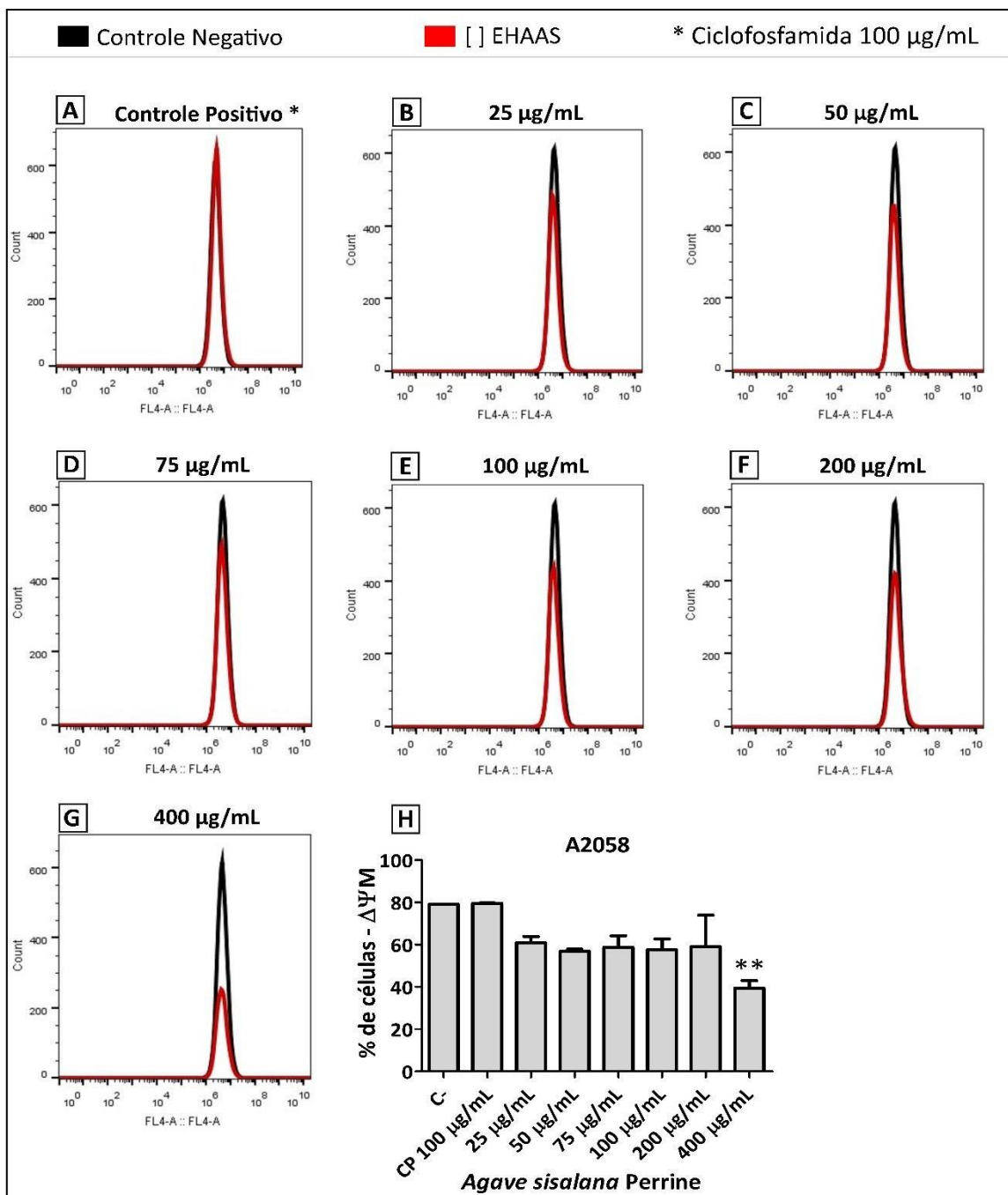
Nota: Em (A) linhagem A2058 - melanoma; Em (B) SK-MEL-5 - melanoma; Em (C) MRC5 - fibroblasto normal. No eixo X, a concentração de EHAAS utilizada. Em Y, a porcentagem de células em cada estágio de viabilidade, após 24 horas de tratamento. Controle negativo (C-): células sem tratamento; Controle positivo (C+): tratamento com 100 µg/mL de ciclofosfamida.

5.2 ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)

Visando avaliar se a atividade citotóxica do EHAAS (descrita no item 4.1) está associada a perda do potencial de membrana mitocondrial, decorrente da interação das saponinas do extrato com a membrana interna da mitocôndria, foi avaliado o $\Delta\Psi_m$.

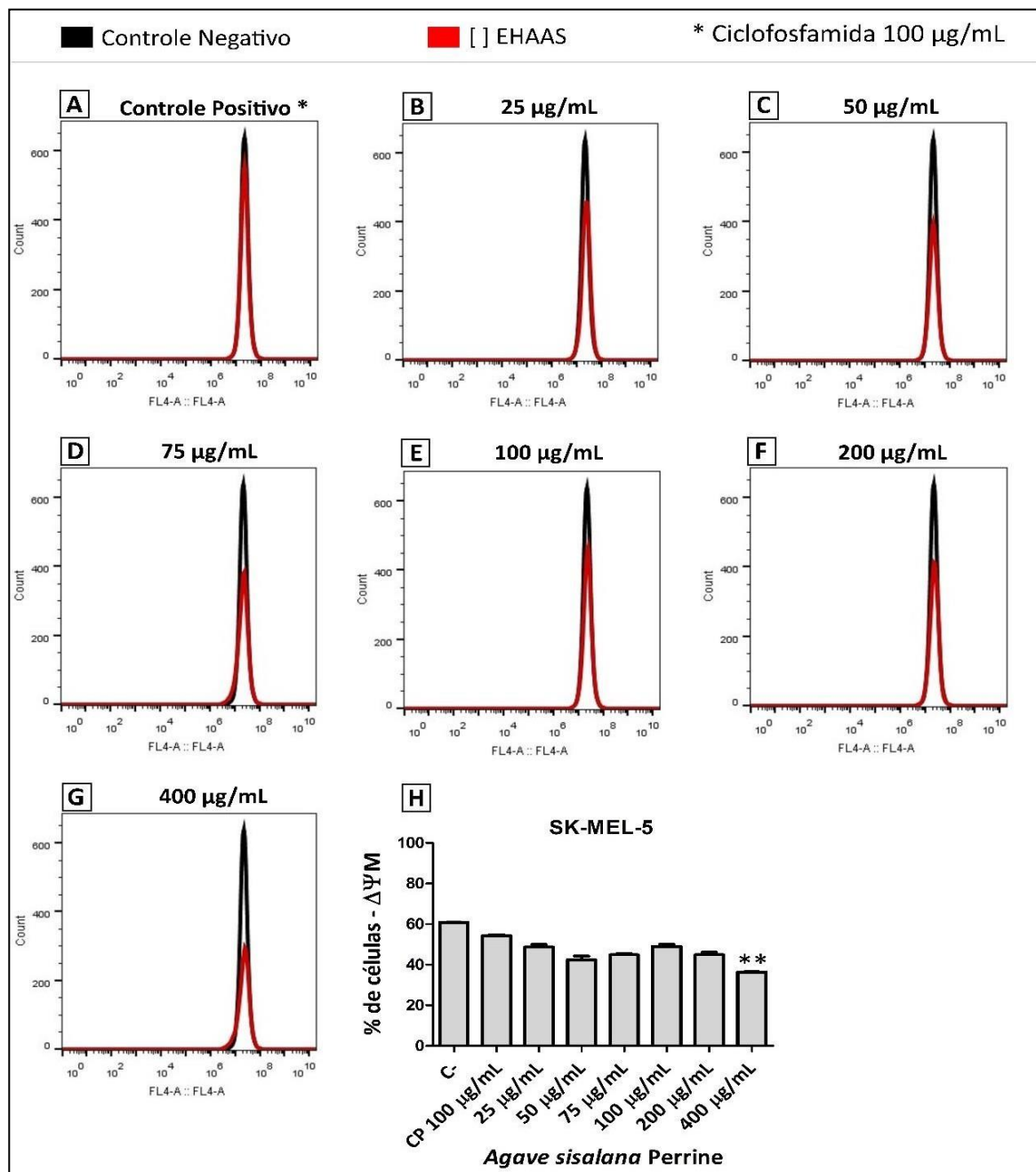
Os resultados mostraram o tratamento com o EHAAS resultou em uma discreta redução do $\Delta\Psi_m$ para ambas as linhagens de melanoma metastático avaliado (**Figura 9**; **Figura 10**), bem como para a linhagem controle (MCR5, **Figura 11**). Também não foram observadas reduções significativas no $\Delta\Psi_m$ das linhagens tratadas com a ciclofosfamida (**Figura 12**.)

Figura 9 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): resultados do ensaio de MitoTracker para a linhagem A2058 (melanoma)



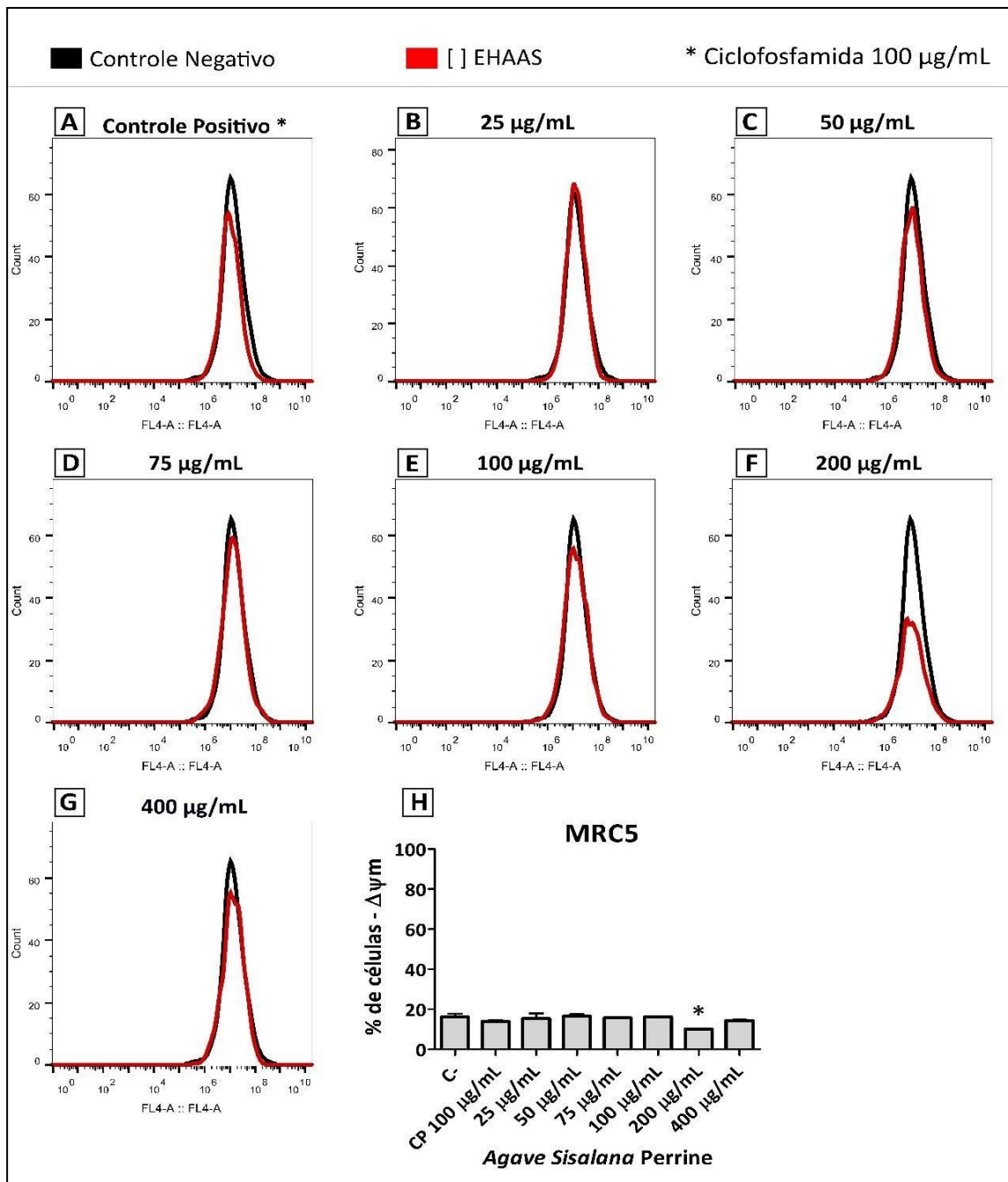
Nota: Os histogramas mostram a comparação da fluorescência de células não tratadas (em preto), e de células com diferentes tratamentos (em vermelho), após 24 horas. O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. Em (A): controle positivo referente ao tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ciclofosfamida (CP); De (B) a (G): tratamentos com as concentrações do EHAAS; Em (H): análise estatística com erro padrão dos resultados obtidos. Os tratamentos com EHAAS provocaram uma discreta diminuição do potencial de membrana mitocondrial das células, frente ao controle negativo.

Figura 10 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): resultados do ensaio de MitoTracker para a linhagem SK-MEL-5 (melanoma)



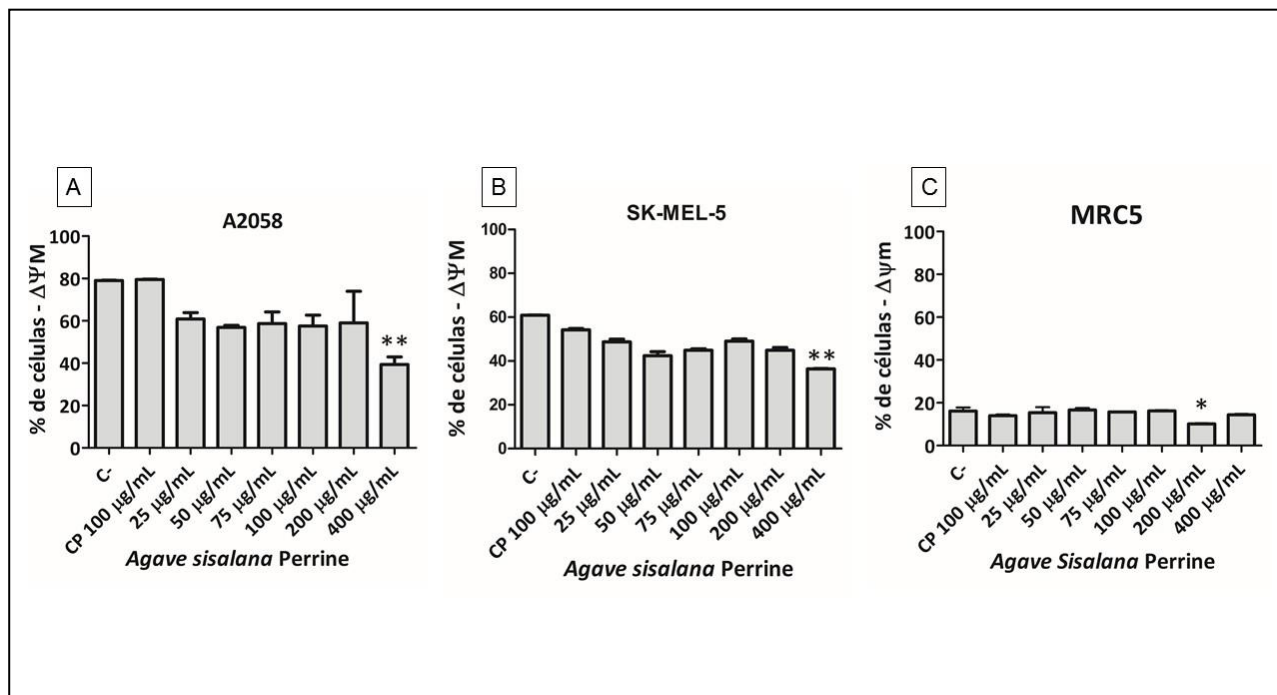
Nota: Os histogramas mostram a comparação da fluorescência de células não tratadas (em preto), e de células com diferentes tratamentos (em vermelho), após 24 horas. O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. Em (A): controle positivo referente ao tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ciclofosfamida (CP); De (B) a (G): tratamentos com as concentrações do EHAAS; Em (H): análise estatística com erro padrão dos resultados obtidos. Todos os tratamentos provocaram uma discreta redução do potencial de membrana mitocondrial das células, em relação ao controle negativo.

Figura 11 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): resultados do ensaio de MitoTracker para a linhagem MRC5 (fibroblasto normal)



Nota: Os histogramas mostram a comparação da fluorescência de células não tratadas (em preto), e de células com diferentes tratamentos (em vermelho), após 24 horas. O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. Em (A): controle positivo referente ao tratamento com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ciclofosfamida (CP); De (B) a (G): tratamentos com as concentrações do EHAAS; Em (H): análise estatística com erro padrão dos resultados obtidos. Apenas o tratamento com EHAAS a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ provocou uma redução significativa do potencial de membrana mitocondrial, frente ao controle negativo.

Figura 12 – Comparativo das análises estatísticas do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), entre as linhagens do estudo



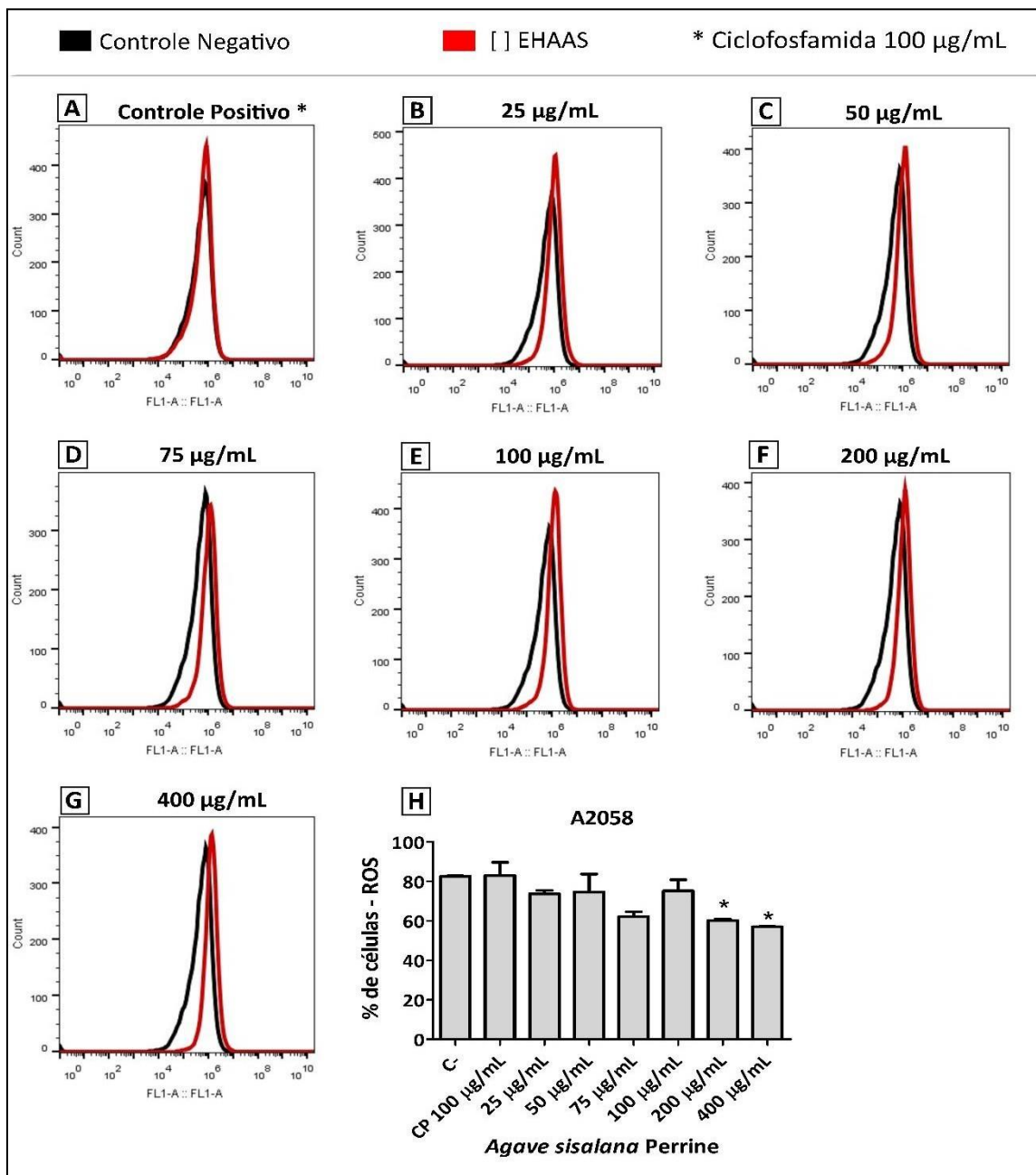
Nota: Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): A concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ do EHAAS provocou a mais drástica diminuição no potencial de membrana mitocondrial nas linhagens cancerígenas (A e B). Entretanto, esta concentração não foi capaz de reduzir significativamente o potencial de membrana mitocondrial das células controle (C).

5.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Considerando que a apoptose geralmente promove o aumento do estresse oxidativo e que as células cancerígenas apresentam um ambiente redox devido as alterações no metabolismo energético, avaliamos os níveis de ROS nas diferentes linhagens. Ademais, considerando a atividade antioxidante previamente relatada do EHAAS, os resultados na análise dos níveis de ROS fornecem informações importantes sobre sua possível atuação adjuvante em quimioterápicos.

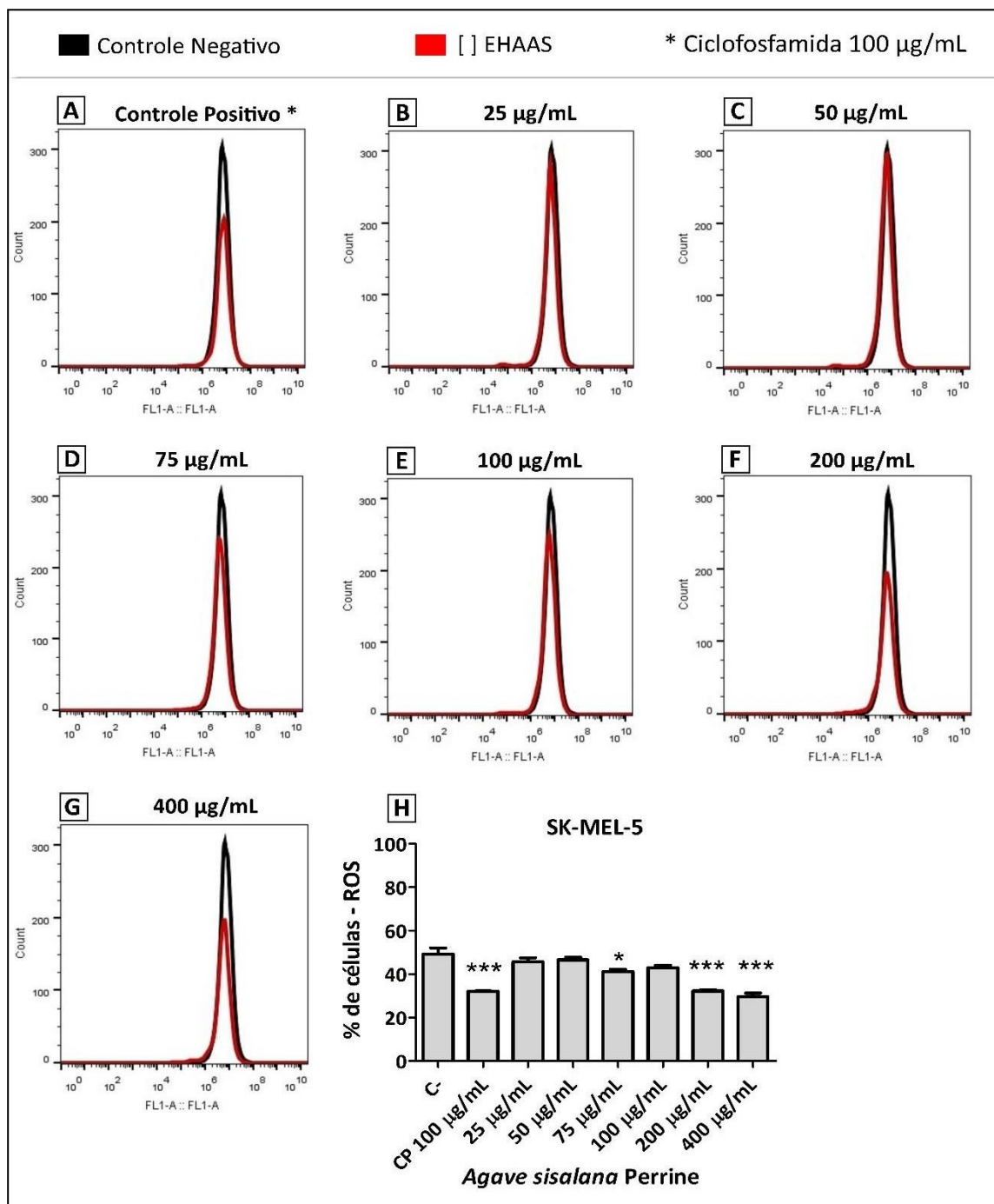
Os resultados mostraram o tratamento com EHAAS resultou em uma discreta redução dos níveis de ROS para ambas as linhagens de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5), a qual foi mais expressiva com os tratamentos nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 13**; **Figura 14**).

Figura 13 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS): resultados dos ensaios de DCFH-DA para a linhagem A2058 (melanoma)



Nota: Os histogramas comparam a fluorescência de células não tratadas (em preto), com a de células com diferentes tratamentos (em vermelho), após 24 horas. O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. Em (A): controle positivo referente ao tratamento com 100 µg/mL de ciclofosfamida (CP); De (B) a (G): tratamentos com as concentrações do EHAAS; Em (H): análise estatística com erro padrão dos resultados obtidos. Todos os tratamentos com EHAAS diminuíram o ROS celular, mesmo que em pequenas proporções, sendo as concentrações de 400 µg/mL e 200 µg/mL as mais significativas frente ao controle negativo.

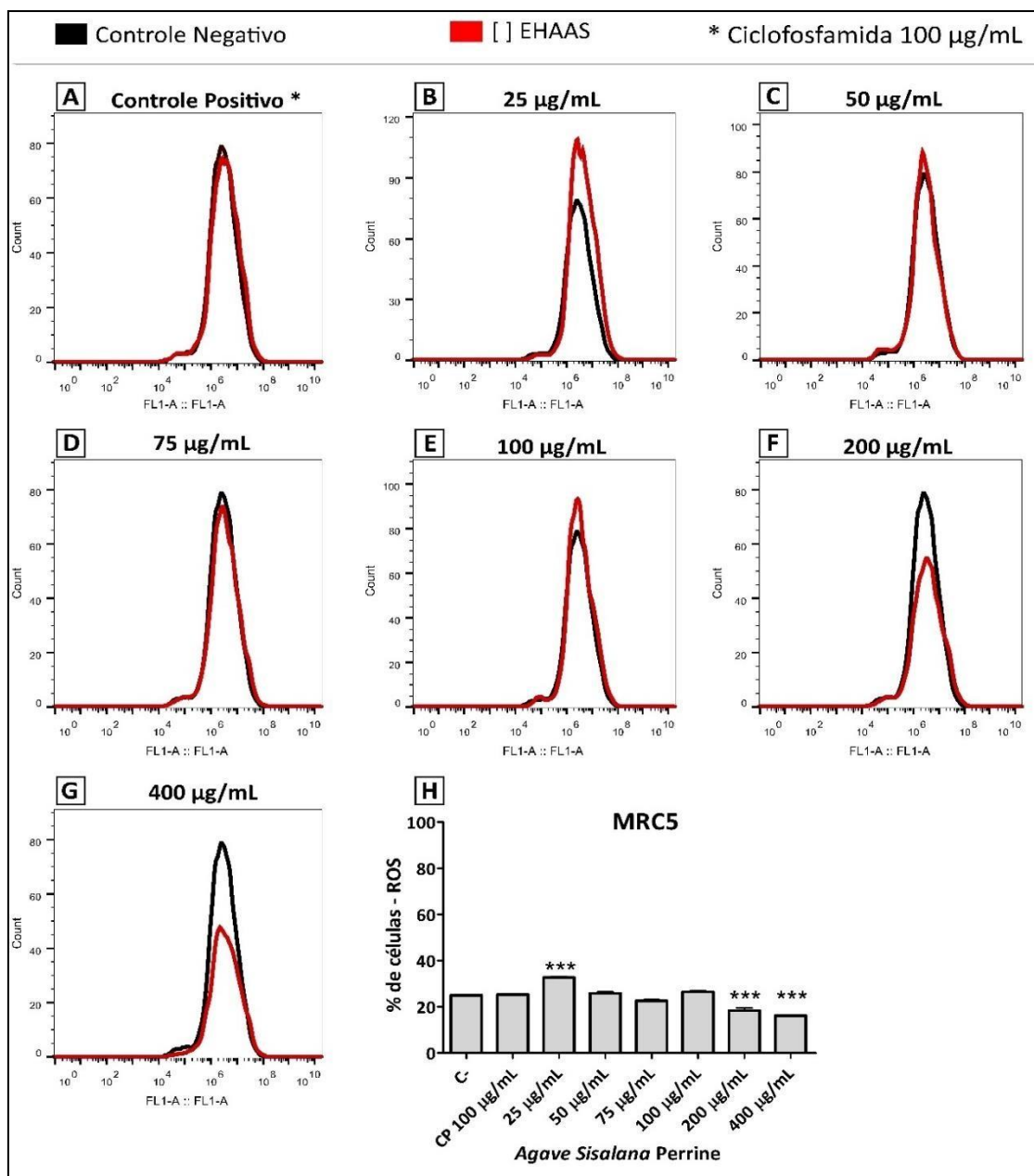
Figura 14 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS): resultados dos ensaios de DCFH-DA para a linhagem SK-MEL-5 (melanoma)



Nota: Os histogramas mostram a comparação da fluorescência de células não tratadas (em preto), e de células com diferentes tratamentos (em vermelho), após 24 horas. O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. Em (A): controle positivo referente ao tratamento com 100 µg/mL de ciclofosfamida (CP); De (B) a (G): tratamentos com as concentrações do EHAAS; Em (H): análise estatística com erro padrão dos resultados obtidos. O tratamento com a ciclofosfamida e os tratamentos com EHAAS a 75µg/mL 200 µg/mL e 400 µg/mL reduziram significativamente os níveis de ROS, frente ao controle negativo.

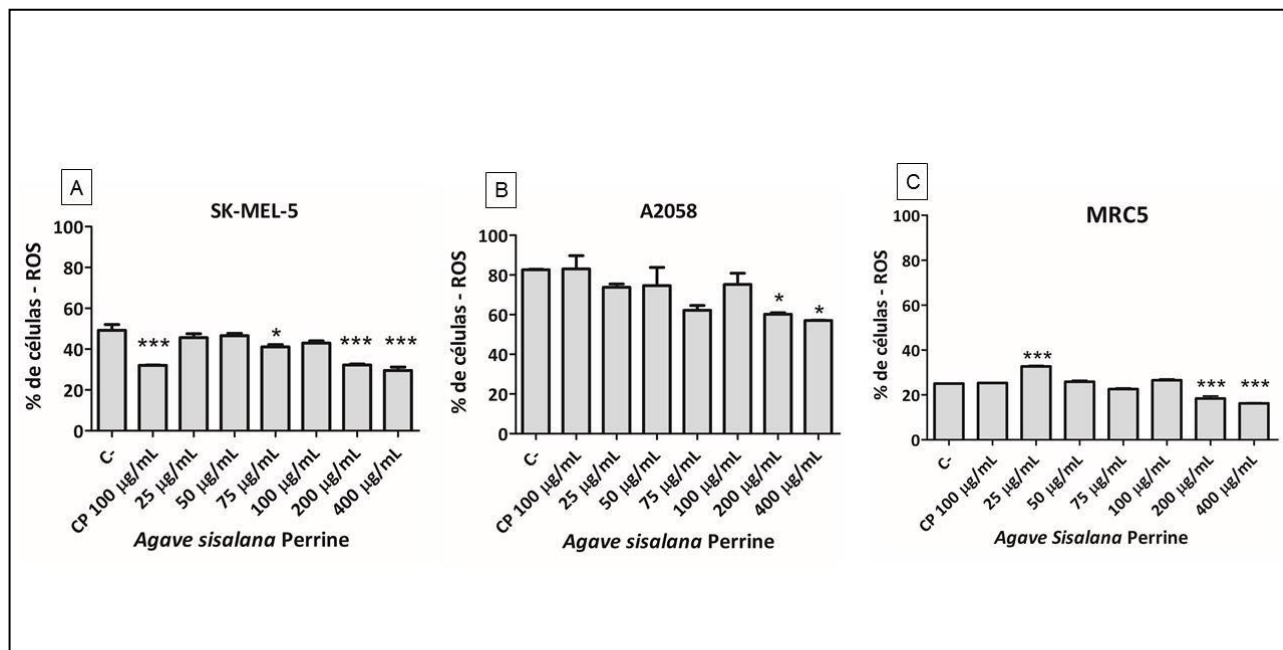
Já para a linhagem controle (MCR5) foi verificado uma redução significativa dos níveis de ROS entre as células tratadas com o EHAAS a 200µg/mL e 400µg/mL com relação ao controle negativo – sem tratamento (**Figura 15**). Constatou-se também um aumento significativo dos níveis de ROS após o tratamento das células com EHAAS a 25µg/mL. No geral, exceto para o tratamento com a 25µg/mL na linhagem MRC5, os níveis de ROS não aumentaram após os tratamentos com EHAAS (**Figura 16**).

Figura 15 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS): resultados dos ensaios de DCFH-DA para a linhagem MRC5 (fibroblasto normal)



Nota: Os histogramas mostram a comparação da fluorescência de células não tratadas (em preto), e de células com diferentes tratamentos (em vermelho), após 24 horas. O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. Em (A): controle positivo referente ao tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ciclofosfamida (CP); De (B) a (G): tratamentos com as concentrações do EHAAS; Em (H): análise estatística com erro padrão dos resultados obtidos. Os tratamentos com EHAAS a 200 $\mu\text{g/mL}$ e 400 $\mu\text{g/mL}$ reduziram significativamente os níveis de ROS, frente ao controle negativo.

Figura 16 - Comparativo das análises de níveis de ROS entre as linhagens do estudo



Nota: Maiores concentrações de EHAAS foram capazes de reduzir significativamente os níveis de ROS tanto nas linhagens cancerígenas (A e B), quanto na linhagem saudável (C), sendo elas 200 µg/mL e 400 µg/mL. Curiosamente, células da linhagem controle tratadas com EHAAS a 25 µg/mL apresentaram um aumento significativo dos níveis de ROS (C), quando comparadas ao controle negativo – sem tratamento.

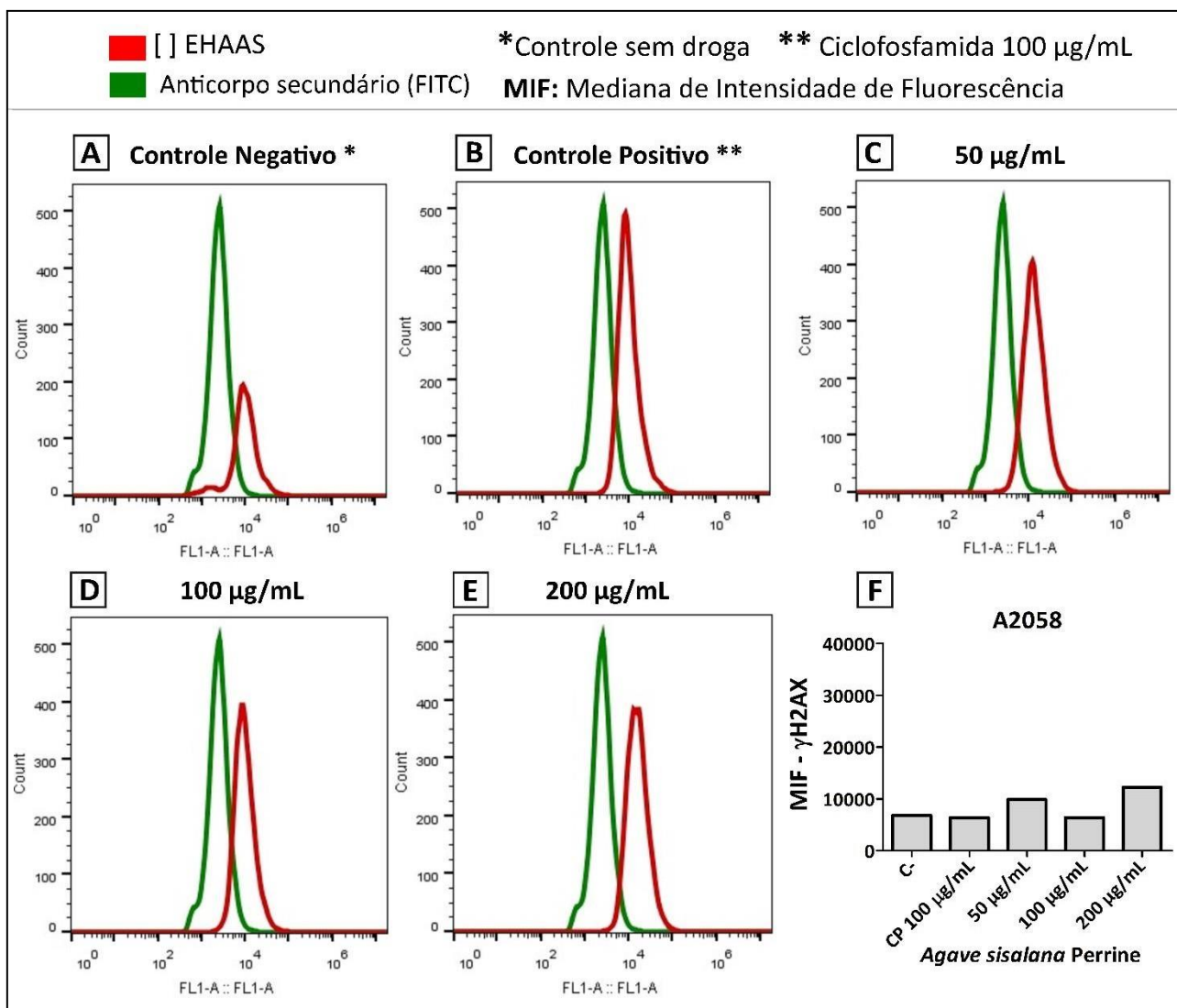
5.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO EXTRATO

A fosforilação do resíduo de tirosina 139 das histonas H2AX, (γ -H2AX) tem sido empregada como um importante marcador de genotoxicidade, pois permite detectar quebras-duplas no DNA (DSBs).

Tendo em vista que processo de apoptose é acompanhado pela fragmentação do DNA (BORTNER; OLDENBURG; CIDLOWSKI, 1995), avaliamos os níveis de clastogenicidade das linhagens tratadas com o EHAAS através do ensaio de histona γ -H2AX, submetido apenas nos tratamentos com 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL devido a limitação da quantidade de reagentes disponíveis para este ensaio.

Os resultados mostraram que o tratamento com o EHAAS promoveu um discreto aumento dos níveis de clastogenicidade na linhagem A2058 (**Figura 17**).

Figura 17 - Avaliação do potencial genotóxico do extrato: Ensaio de histona γ H2AX para a linhagem A2058 (melanoma)

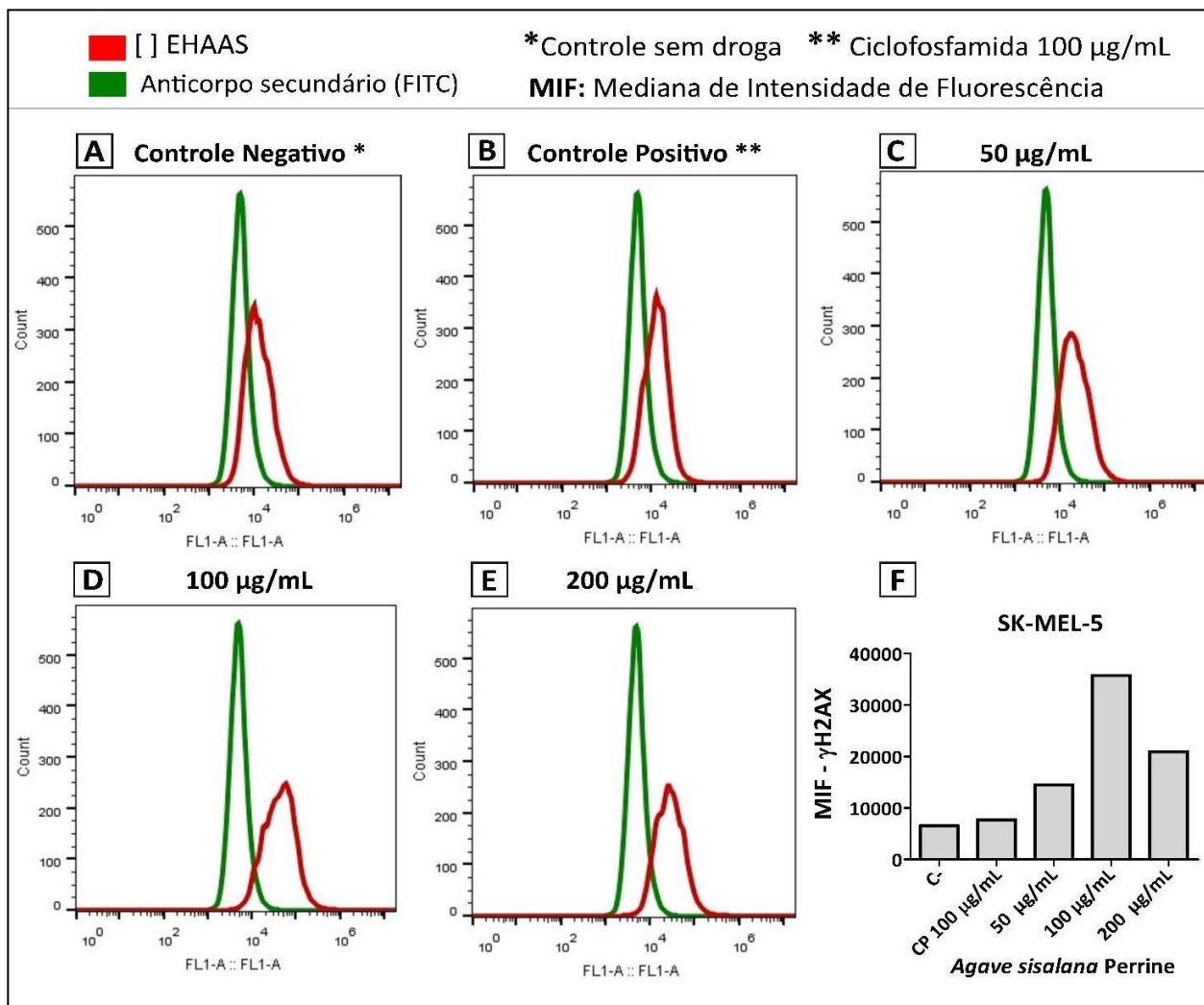


Nota: O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. Em (A), representa-se a fluorescência obtida em células sem tratamento, descritas pela linha vermelha, sob concentração nula de EHAAS. Em (B) tratamento realizado com ciclofosfamida a 100 µg/mL. De (C) a (E) tratamentos realizados com EHAAS nas diferentes concentrações descritas. A concentração de 200 µg/mL de EHAAS apresentou a maior porcentagem de γ H2AX dentre os tratamentos (E), notada pelo deslocamento à direita do pico em vermelho. Em (F), histograma representando comparativamente os índices de genotoxicidade obtidos após os tratamentos testados.

Entretanto, o tratamento com o extrato promoveu um expressivo aumento dos números DSBs na linhagem SK-MEL-5, sobretudo na

concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 18**). Estes sugerem que a linhagem SK-MEL-5 apresenta uma maior internalização do EHAAS.

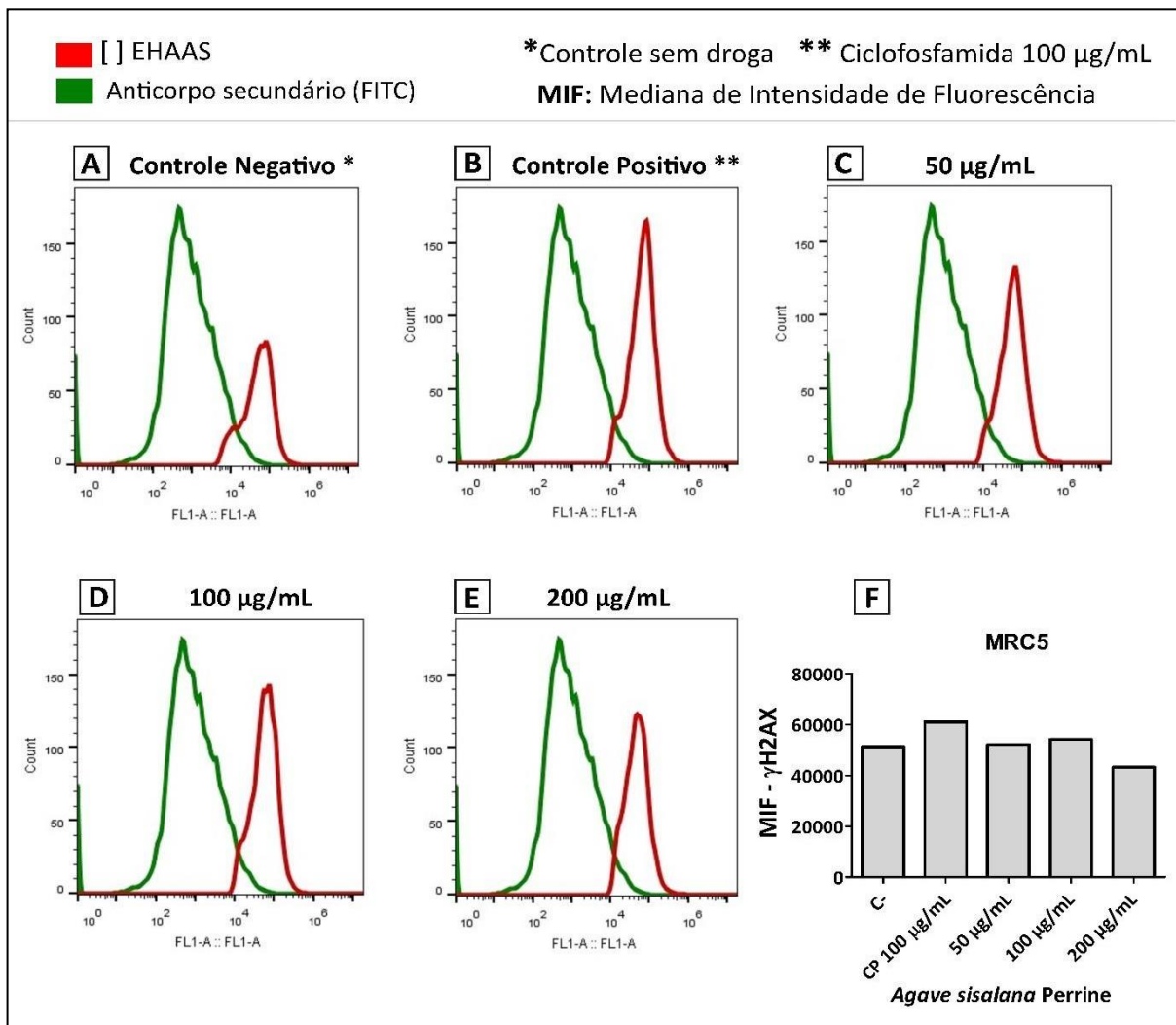
Figura 18 - Avaliação do potencial genotóxico do extrato: Ensaio de histona γH2AX para a linhagem SK-MEL-5 (melanoma)



Nota: O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. Em (A), representa-se a fluorescência obtida em células sem tratamento, descritas pela linha vermelha, sob concentração nula de EHAAS. Em (B) tratamento realizado com ciclofosfamida a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De (C) a (E) tratamentos realizados com EHAAS nas diferentes concentrações descritas. A concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EHAAS apresentou a maior porcentagem de γH2AX dentre os tratamentos (D), notada pelo deslocamento à direita do pico em vermelho. Em (F), histograma representando comparativamente os índices de genotoxicidade obtidos após os tratamentos testados.

Interessantemente, a ciclofosfamida (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentou baixos níveis de clastogenicidade para ambas as linhagens de melanoma metastático (**Figura 17; Figura 18**). Entretanto, a droga mostrou um elevado potencial clastogênico para a linhagem MRC5 (**Figura 19**).

Figura 19 - Avaliação do potencial genotóxico do extrato: Ensaio de histona γH2AX para a linhagem MRC5 (fibroblasto normal)



Nota: O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. Em (A), representa-se a fluorescência obtida em células sem tratamento, descritas pela linha vermelha, sob concentração nula de EHAAS. A ciclofosfamida (B) apresentou a maior porcentagem de γH2AX dentre os tratamentos. Em (F), histograma representando comparativamente os índices de genotoxicidade obtidos após os tratamentos testados.

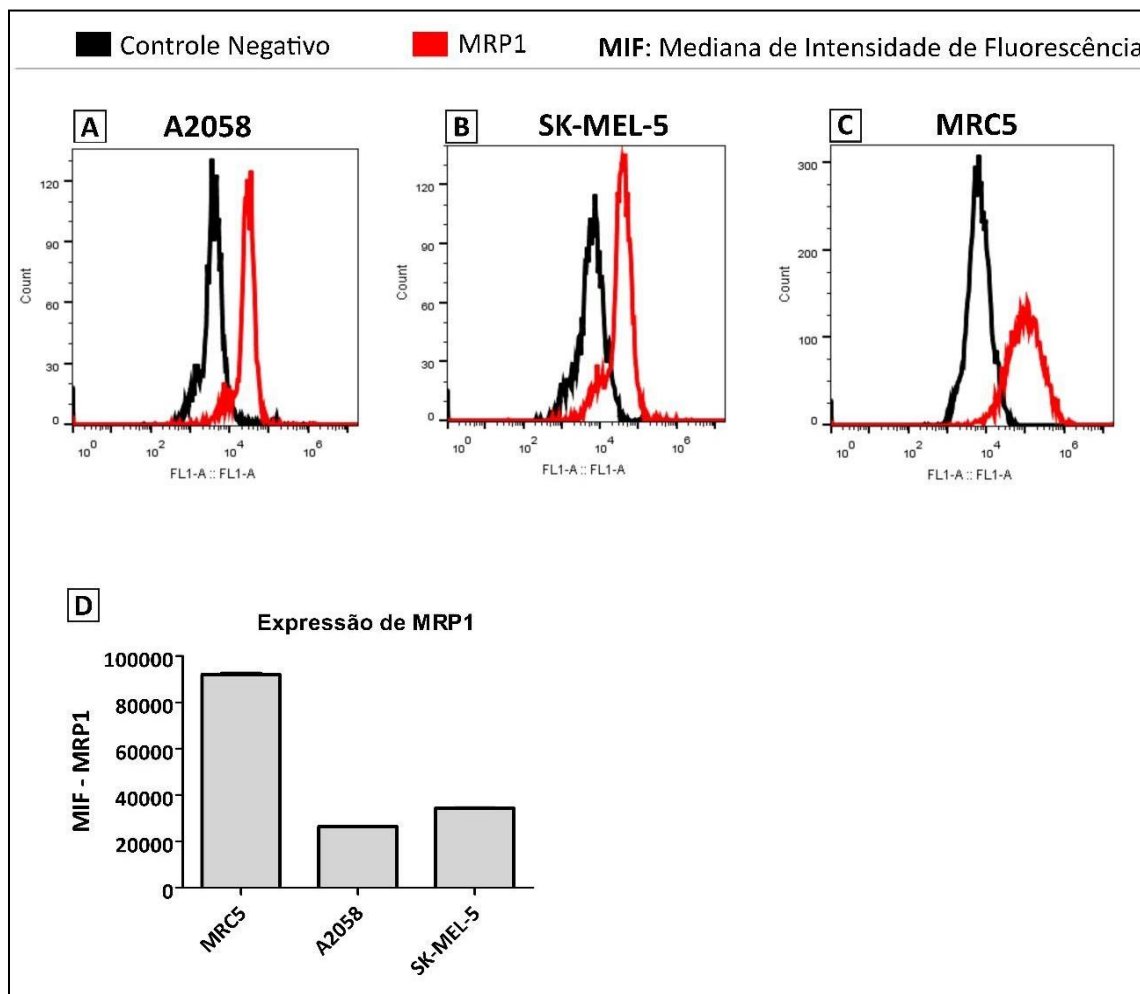
Estes dados indicam que, embora a ciclofosfamida tenha apresentado uma atividade citotóxica altamente satisfatória para a linhagem SK-MEL-5 (**Figura 6**), ela apresenta um potencial mutagênico sistêmico, podendo contribuir com a iniciação de malignidades secundárias.

5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA ABC: MRP1 E MRP3

Sabendo que o melanoma metastático possui baixas taxas de resposta às quimioterapias convencionais (WILSON; SCHUCHTER, 2016), e que a superexpressão de proteínas *ABC transporters* pode atuar diretamente neste processo (KALAL; UPADHYA; PAI, 2017), investigamos os níveis de MRP1 e MRP3 nas linhagens de melanoma (A2058; SK-MEL-5) e controle (MRC5). A análise destas *ABC transporters* que estão associadas a resistência a múltiplas nos auxilia a compreender as diferentes respostas citotóxicas obtidas frente aos tratamentos com EHAAS.

Os resultados mostraram que a linhagem de melanoma SK-MEL-5 apresenta uma maior expressão de MRP1 quando comparada a linhagem A2058, apesar de ambas estarem superexpressando MRP1 (**Figura 20**). Entretanto, a linhagem MRC5 (fibroblasto normal) teve os maiores níveis de expressão para MRP1, comparada as demais linhagens (**Figura 20**).

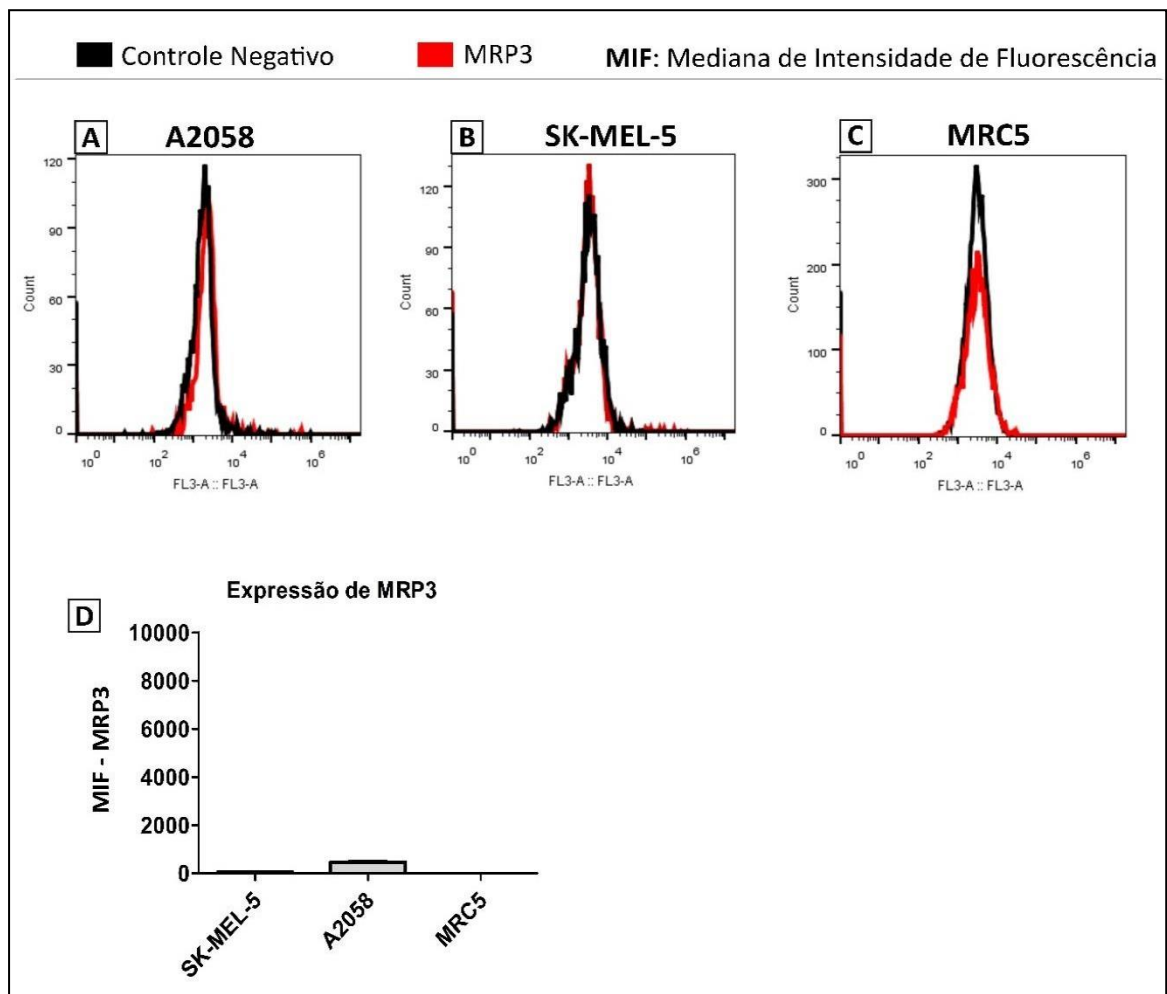
Figura 20 – Resultados da análise de expressão de MRP1 para as linhagens de melanoma (A2058; SK-MEL-5) e MRC5 (fibroblasto normal)



Nota: O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. As linhas vermelhas descrevem a fluorescência obtida nas diferentes linhagens (A - C), de maneira comparativa ao controle negativo experimental, descrito pelas linhas pretas. Em (D), histograma relacionando os resultados obtidos sob a mediana de intensidade de fluorescência das linhagens estudadas. Entre as linhagens de melanoma, a SK-MEL-5 expressa maiores níveis de MRP1.

Para a proteína MRP3 não foram verificados níveis significativos de expressão nas linhagens investigadas, os quais revelaram-se muito similares ao controle negativo experimental, e pouco representativos visual (**Figura 21**).

Figura 21 - Resultados da análise de expressão de MRP3 para as linhagens de melanoma (A2058; SK-MEL-5) e MRC5 (fibroblasto normal)



Nota: O eixo X mostra a intensidade de fluorescência, enquanto o eixo Y demonstra o número de células fluorescentes. As linhas vermelhas descrevem a fluorescência obtida nas diferentes linhagens (A - C), de maneira comparativa ao controle negativo experimental, descrito pelas linhas pretas. Em (D), histograma relacionando os resultados obtidos sob a mediana de intensidade de fluorescência das linhagens estudadas. Os resultados mostraram que não há expressão significativa de MRP3 nas linhagens investigadas, onde os níveis de fluorescência obtidos foram similares ao controle negativo experimental.

6. DISCUSSÃO

O melanoma representa o tipo histológico mais grave de câncer de pele, com uma taxa de mortalidade mundial próxima de 73% (CARR et al., 2019; DEVITA; LAWRENCE et al., 2015; IARC, 2018; NIKOLAOU et al., 2014). Se diagnosticado ainda no estágio inicial, o melanoma pode ser curável. Porém, nos estágios mais avançados, como no melanoma metastático, a doença geralmente é fatal (GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007).

A elevada mortalidade por melanoma pode ser atribuída a agressividade da doença, bem como a baixa eficiência dos quimioterápicos disponíveis, sobretudo para pacientes com melanoma metastático (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009; GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007; TENTORI; LACAL; GRAZIANI, 2013).

Estudos mostram que o tratamento com apenas um quimioterápico apresenta uma taxa de resposta satisfatória em menos de 20% dos casos (GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007) (**Quadro 1**). Por isso, tem sido proposto a combinação de diferentes quimioterápicos para o tratamento do melanoma (GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007) Porém, embora a combinação de três ou mais quimioterápicos tenha mostrado um aumento da taxa de resposta, este valor ainda se encontra abaixo de uma taxa satisfatória.

Além do mais, os quimioterápicos atualmente utilizados no tratamento do melanoma (**Quadro 1**), apresentam severos efeitos colaterais, como queda de cabelo, mielosupressão, neuropatia periférica e dores ósseas (DOMINGUES et al., 2018; GUERRA et al., 2019; WILSON; SCHUCHTER, 2016).

Desta forma, faz-se necessário investir na prospecção de novos agentes antineoplásicos que possam ser utilizados em combinação com outras drogas a fim de aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes com a doença avançada, número este que encontra-se abaixo de 10% (FIRESCU et al., 2019; GOGAS; KIRKWOOD; SONDAK, 2007; STRUB; BALLOTTI; BERTOLOTTI, 2020).

Neste sentido, é sabido que uma série de fitoquímicos apresentam atividade antineoplásica (CHINEMBIRI et al., 2014; GREENWELL; RAHMAN, 2015; IQBAL et al., 2019). Por isso, o interesse na bioprospecção destes fitoquímicos vem

atraindo a atenção de pesquisadores ao redor do mundo (GREENWELL; RAHMAN, 2015; BAHMANI et al., 2017; HEIDARIAN et al., 2013; CONKLIN, 2004).

Neste contexto, os países da América Latina detêm grande parte da biodiversidade mundial (CALIXTO, 2005).

Por possuir a maior diversidade vegetal, com mais de 45.000 espécies catalogadas, o que representa 20-22% do total de plantas existentes na Terra, o Brasil detém uma fonte quase inesgotável de plantas para a bioprospecção de fitoquímicos (BRANDÃO et al., 2008; CALIXTO, 2005; DUTRA et al., 2016).

Neste sentido, a região Nordeste do Brasil abriga uma rica diversidade botânica, contando com mais de 650 espécies vegetais descritas, pertencentes a 407 gêneros e 11 famílias (AGRA et al., 2008).

Embora grande parte das espécies vegetais presentes no Nordeste seja utilizada na medicina popular, poucas informações acerca das propriedades farmacológicas, bem como da biossegurança do uso destes produtos naturais encontra-se disponível.

Por apresentar características climáticas e geológicas favoráveis, a região Nordeste se tornou o maior produtor e fornecedor mundial de fibras de sisal (*Agave sisalana* Perrine) (BARRETO et al., 2017; DUNDER et al., 2010b; SANTOS; BRANCO, 2009).

Em 2011, a produção mundial do sisal excedeu 410 mil toneladas, sendo que deste total, o Brasil foi responsável por 283 mil toneladas, representando 69% da produção mundial (DAVID et al., 2015). O Estado da Bahia é responsável por 95% da produção nacional de *A. sisalana*, fazendo o cultivo do sisal uma importante atividade econômica para o Estado (SANTOS; BRANCO, 2009). Entretanto, a indústria do sisal utiliza apenas 4% das massa da *A. sisalana*, sendo que os 96% restante, que inclui a mucilagem e o suco do sisal, são tratados como subprodutos, sendo geralmente descartado no solo (CHEN et al., 2009; DUNDER et al., 2010b; SANTOS; BRANCO, 2009). Estes subprodutos do sisal são ricos em saponinas esteroidais, que são usadas pela indústria farmacêutica para a semi-síntese de corticoesteroides. Além do mais, os extratos da *Agave ssp.* têm mostrado diferentes propriedades farmacológicas (DEBNATH et al., 2010).

Os extratos obtidos por meio da hidrólise ácida da *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) é um dos extratos que se encontra sob investigação por nosso grupo.

Em estudos anteriores já mostramos que o EHAAS (nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL) é capaz de induzir a apoptose em células VERO (ARALDI et al., 2018). A ação citotóxica do EHAAS tem sido atribuída a presença de saponinas – glicosídeo anfipático produzido pelo metabolismo secundário da *Agave sisalana* Perrine, cuja atividade antineoplásica vem sendo descrita desde a década de 1940 (BUTROS, 1948; DAVID et al., 2015)

Por apresentar atividade citotóxica e elevadas concentrações de saponinas, o EHAAS desponta como um promissor alvo biotecnológico para o tratamento de diferentes malignidades, incluindo o melanoma metastático.

Dessa forma, avaliamos o potencial citotóxico e genotóxico dos extratos de EHAAS para duas linhagens celulares de melanoma metastático (A2058 e SK-MEL-5).

Inicialmente, avaliamos a atividade citotóxica do EHAAS e da ciclofosfamida nestas linhagens celulares. Interessantemente, os resultados desta análise mostraram que a linhagem SK-MEL-5 foi mais susceptível ao efeito citotóxico da ciclofosfamida (CP), ao passo que a linhagem A2058, ao EHAAS (**Figura 5; Figura 6**). Além do mais, verificamos que a morte celular predominante nesta linhagem foi a necrose, ao passo que na linhagem A2058, que se mostrou menos susceptível a atividade citotóxica dos agentes, foi observado que o tipo de morte celular predominante foi a apoptose (**Figura 8**).

A via de morte da apoptose é interessante na terapia oncogênica, pois dentre as demais vias, a apoptose é altamente programada por uma rede de sinalizações evitando a indução de inflamações (DE BRUIN et al., 2008). Entretanto, sabe-se que a via da necrose também pode de ser regulada, através de ligantes como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) ou Fas e seus receptores em um processo conhecido por necroptose (DE BRUIN et al., 2008; VERCAMMEN et al., 1998). Caracteristicamente necroptose é observada especialmente em células que apresentam superexpressão da quinases RIP1, como a linhagem SK-MEL-5, a qual confere resistência a apoptose (DE BRUIN et al., 2008; FESTJENS et al., 2007). A RIP1 recruta RIP3, outra quinase, e desencadeia sinais de morte pela via de necrose,

fato já relatado em células de melanoma (LIU et al., 2015). Além disso, estudos anteriores mostraram que a RIP1 confere resistência a apoptose através da ativação de NF- κ B, tornando estas células resistentes a medicamentos inibidores de BRAF, como o Vemurafenib (LEI et al., 2018; LIU et al., 2015).

Estes resultados sugerem que o EHAAS a 75 μ g/mL poderia ser utilizado em combinação com outros quimioterápicos já preconizados para o tratamento de pacientes que apresentem o mesmo perfil mutacional da linhagem A2058. Ao passo que ciclofosfamida desponta como um possível quimioterápico para o tratamento de pacientes com melanoma metastático com o perfil mutacional da linhagem SK-MEL-5.

Além do mais, foi verificado que as concentrações de abaixo de 50 μ g/mL de EHAAS mostraram uma baixa citotoxicidade à linhagem MRC5 (fibroblasto humana), sugerindo que nestas condições, o extrato apresenta baixa atividade citotóxica sistêmica (**Figura 7**).

Esta diferença de respostas frente aos tratamentos com o EHAAS e a CP pode ser justificada pelo *background* genético das linhagens testadas. Estes dados reforçam ainda o papel da heterogeneidade neoplásica de diferentes repostas terapêuticas observadas nos pacientes. Isto porque, embora as linhagens A2058 e SK-MEL-5 sejam derivadas do mesmo tipo histológico (metástase linfonodal de melanoma), a linhagem SK-MEL-5 é reconhecida por possuir um fenótipo tumoral mais agressivo quando comparada a linhagem A2058, pois apresenta mutações relevantes em genes reguladores da proliferação, como *EGFR*, *CDK4* e *TP53* (EXPASY, 2020; SIGISMUND et al., 2018; LEARY et al., 2016; WEEDON et al., 2006). Além disso, esta linhagem apresenta mutações no promotor *TERT*, desencadeando uma imortalização celular pelo alongamento dos telômeros, fato que já foi relacionado com um pior prognóstico para pacientes de melanoma (COSTA et al., 2016; NAGORE et al., 2016; OSELLA-ABATE et al., 2019).

Ambas as linhagens apresentam o gene *BRAF* mutado, que é um regulador da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (HARTMANN et al., 2018). O *BRAF* quando mutado, geralmente no códon 600 (variação *V600*), fosforila e ativa proteínas MEK da via das MAP quinases, estimulando sinais de proliferação e sobrevivência das células tumorais (HARTMANN et al., 2018; MONTAGUT et al., 2009). A mutação *BRAF V600* é relatada em diversas

neoplasias, e tem sido sugerida como um biomarcador de diagnóstico e tratamento de melanoma (DONG et al., 2003; HARTMANN et al., 2018; KALAL; UPADHYA; PAI, 2017). Entretanto, mesmo uma mutação sendo frequente dentro da mesma neoplasia, a heterogeneidade do câncer discutida aqui, revela a dificuldade em obter respostas celulares semelhantes a mesma droga terapêutica (CHENG et al., 2018; TURAJLIC et al., 2019). Ao descrevermos estas características que ditam a responsividade das linhagens cancerígenas, contribuímos na descrição de perfis tumorais e consequentemente no direcionamento de novas terapias.

A fim de melhor compreender a atividade citotóxica do EHAAS e da ciclofosfamida, foi realizada a análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), uma vez que a sua redução está relacionada com vias de morte celular por apoptose (REDZA-DUTORDOIR et al., 2016). Ademais, estudos já mostram que as saponinas presentes no EHAAS interagem com a membrana interna da mitocôndria, promovendo a redução do $\Delta\Psi_m$ e, por consequência, a apoptose (JI et al., 2012; LI et al., 2013).

Os resultados desta análise mostraram uma discreta redução do $\Delta\Psi_m$ de células SK-MEL-5 tratadas com o EHAAS nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ e 400 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 10**). Entretanto, foi observada uma expressiva redução do potencial de membrana nas células A2058 tratadas com todas as concentrações testadas do EHAAS (**Figura 9**). Estes resultados reforçam o processo de necroptose induzida pelo EHAAS na linhagem SK-MEL-5, já que, ao contrário da apoptose, esta via não está necessariamente ligada a depleção energética das mitocôndrias (MARSHALL et al., 2014; TAIT et al., 2013). Contudo, para a linhagem A2058, a redução do $\Delta\Psi_m$ condiz com a atividade apoptótica provocada pelo EHAAS, conforme verificado pelo ensaio de anexina V/PI (**Figura 5**).

Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com a ciclofosfamida para as linhagens A2058 e SK-MEL-5 (**Figura 12**). Resultado semelhante também foi verificado na linhagem MRC5 (**Figura 11**). Este resultado está de acordo com a farmacodinâmica do quimioterápico. Isto porque, a ciclofosfamida não depleta a produção de ATP, mas sim prove a clivagem do DNA resultando na apoptose (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009).

Interessantemente, para a linhagem MRC5 apenas o tratamento com EHAAS a 200 µg/mL reduziu significativamente o $\Delta\Psi_m$.

Considerando que a atividade citotóxica do EHAAS se deve a interação da saponina com a membrana interna da mitocôndria e, por consequência a liberação do conteúdo mitocondrial para o citosol, é esperado que neste processo ocorra o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DE OLIVEIRA et al., 2019; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016)(ABATE et al., 2019; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Ademais, o processo de morte celular e a diminuição do potencial de membrana mitocondrial tendem a criar um ambiente redox (ABATE et al., 2019). Por isso, avaliamos os níveis de ROS nas linhagens tratadas com o EHAAS e com a ciclofosfamida.

Curiosamente, não houve aumento dos níveis de ROS após os diferentes tratamentos, como seria esperado (**Figura 16**) Entretanto, este resultado é uma importante evidência da internalização do EHAAS nas diferentes linhagens. Isto porque, o EHAAS é rico em fitoquímicos antioxidantes como flavanóides e saponinas (ARALDI et al., 2018a; ASHRAF et al., 2013; DAVID et al., 2015). Desta forma, estas moléculas no interior da célula sequestram as ROS geradas pelo processo de apoptose, verificado sobretudo na linhagem A2058 (**Figura 5**), levando, portanto, a redução dos níveis de ROS (**Figura 13**).

Já para a linhagem MRC5, foi observado um aumento dos níveis de ROS nas células tratadas com o EHAAS a 25 µg/mL (**Figura 15**). Este resultado reforça a internalização do EHAAS, já que foi observada uma redução do percentual de células MRC5 viáveis após o tratamento com esta concentração do extrato (**Figura 7**), Porém, o aumento do nível de ROS nestas células (**Figura 15-B**) pode ser justificado pela baixa concentração do extrato, que possivelmente não foi capaz de sequestrar todo o ROS gerado pelo processo de apoptose. Entretanto, o tratamento com EHAAS na concentração de 100 µg/mL promoveu uma expressiva atividade citotóxica, porém com níveis de ROS estatisticamente semelhantes ao controle, reforçando a atividade antioxidante do extrato.

Embora a ciclofosfamida tenha apresentado o maior potencial citotóxico, sobretudo para a linhagem SK-MEL-5 (**Figura 6-B**), é sabido que este quimioterápico apresenta efeitos genotóxicos sistêmicos, estando relacionado ao surgimento de neoplasias secundárias, principalmente de origem hematopoiética

(BRODSKY et al., 1998; HUHN et al., 2003; JAIME-PÉREZ et al., 2016). Por isso, avaliamos o potencial genotóxico do EHHAS nestas linhagens através do ensaio de histona γ -H2AX – método altamente sensível na detecção de quebras-duplas no DNA (DSBs), as quais representam o tipo mais grave de lesão no material genético (BARNES et al., 2018; KHANNA; JACKSON, 2001).

Os resultados desta análise mostraram ausência de diferença estatística significativa entre as células controle das linhagens A2058 e SK-MEL-5 e tratadas com ciclofosfamida, indicando a ausência de genotoxicidade (**Figura 17; Figura 18**). Entretanto, a ausência de genotoxicidade para as células A2058 tratadas com ciclofosfamida pode estar associada a não internalização desta, já que também não foi observada uma redução da viabilidade celular na linhagem A2058 tratada com o quimioterápico (**Figura 5**).

Porém, foi observado um aumento expressivo do número de *foci* de DSBs nas células MCR5 tratadas com a ciclofosfamida (**Figura 19**), indicando o efeito genotóxico sistêmico desta droga. Por outro lado, o tratamento com o EHAAS nas doses abaixo de 50 μ g/mL não mostraram atividade genotóxica para a linhagem MRC5 (**Figura 19**), sugerindo ausência de potencial mutagênico sistêmico.

Buscando melhor compreender as diferenças de atividade citotóxica e genotóxica verificadas entre as linhagens A2058 e SK-MEL-5, avaliamos os níveis de expressão das proteínas de resistência a múltiplas drogas 1 e 3 (MRP1 e MRP3), as quais têm sido frequentemente associadas aos mecanismos de quimioresistência (ALEXANDER et al., 2019; DEPEILLE et al., 2005; HUANG; SADE, 2006).

Curiosamente, os resultados desta análise mostraram que a linhagem SK-MEL-5 apresenta níveis superiores de expressão de MRP1 em relação a linhagem A2058 (**Figura 20**) Entretanto, não foram detectadas a expressão de MRP3 nestas linhagens (**Figura 21**). A maior expressão de MRP1 na linhagem MRC5 está diretamente associada ao fenótipo de fibroblasto intrínseco a linhagem, onde há inclusive evidências de que a MRP1 participa da regulação de fatores de crescimento dos fibroblastos (DREUW et al., 2005; JONG et al., 2001).

Tendo em vista que a linhagem SK-MEL-5, que superexpressa MRP1, apresentou a maior citotoxicidade para a ciclofosfamida, as diferentes repostas citotóxicas frente ao tratamento com o EHAAS não estão associadas ao efluxo da droga, mas sim a características intrínsecas ao perfil mutacional das linhagens (A2058

e SK-MEL-5). Neste sentido, é sabido que a atividade apoptótica está associada a supressão da via de NF- κ B (Li et al., 2013). Entretanto, a superexpressão de RIP1 verificada na linhagem SK-MEL-5, leva ao aumento da expressão de NF- κ B, resultando na resistência a apoptose e justificando a necroapoptose como via preferencial de morte celular nesta linhagem.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O EHAAS demonstra um potencial adjuvante na terapia anti-neoplásica do melanoma metastático para tumores com o perfil mutacional semelhante a linhagem A2058. Doses abaixo de 50 µg/mL demonstram taxas satisfatórias de citotoxicidade às células de melanoma, e baixa genotoxicidade sistêmica, diminuindo o risco do surgimento de neoplasias secundárias ao tratamento.
- As características antioxidantes do EHAAS podem também diminuir os efeitos apresentados pelo microambiente tumoral, reduzindo as consequências do estresse oxidativo, e tornando o papel EHAAS mais plural na terapia oncogênica.
- A ciclofosfamida poderia ser implementada como estratégia terapêutica na quimioterapia de pacientes de melanoma metastático com o perfil mutacional da linhagem SK-MEL-5.
- Relevantemente, RIP1 e NfK-β despontam como futuros alvos biotecnológicos da terapia para melanoma metastático, onde a regulação da expressão destes fatores poderia aumentar as taxas de resposta a drogas anti-neoplásicas já preconizadas. Este tipo de estratégia poderia evitar o problema de tempo ocioso que existe entre a prospecção de novos quimioterápicos e suas aprovações legais.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, Marianna et al. Seminars in Cell & Developmental Biology Mitochondria as playmakers of apoptosis , autophagy and senescence. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], n. May, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.05.022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.022>.

ABBASI, Naheer R.; SHAW, Helen M.; RIGEL, Darrell S.; FRIEDMAN, Robert J.; MCCARTHY, William H.; OSMAN, Iman; KOPF, Alfred W.; POLSKY, David. Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma - Revisiting the ABCD Criteria. **JAMA Dermatology**, [S. l.], v. 292, n. 22, p. 2771–2776, 2004.

AGRA, Maria De Fátima; FREITAS, Patrícia França De; BARBOSA-FILHO, José Maria. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007.

AGRA, Maria de Fátima; SILVA, Kiriaki Nurit; BASÍLIO, Ionaldo José Lima Diniz; FREITAS, Patrícia França De; BARBOSA-FILHO, José Maria. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 472–508, 2008. DOI: 10.1590/S0102-695X2008000300023.

ALAM, Murad M. D.; RATNER, Désirée M. D. Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 344, n. 13, p. 975–983, 2001.

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; MORGAN, David; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WILSON, John; WALTER, Peter; HUNT, Tim. **Biologia Molecular da Célula**. [s.l: s.n.].

ALEXANDER, Stephen P. H. et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019 / 20 : Transporters. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 176, p. 397–493, 2019. DOI: 10.1111/bph.14753.

ALISI, Anna; CHO, William C.; LOCATELLI, Franco; FRUCI, Doriana. Multidrug Resistance and Cancer Stem Cells in Neuroblastoma and Hepatoblastoma.

International Journal of Molecular Sciences, [S. l.], v. 14, p. 24706–24725, 2013.

DOI: 10.3390/ijms141224706.

ALLSOPP, Philip; POSSEMIERS, Sam; CAMPBELL, David;

OYARZÁBAL, Iván Saldaña; GILL, Chris; ROWLAND, Ian. An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. **Anaerobe**, [S. l.], v. 22, p. 38–44, 2013. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.05.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.006>.

APOLINÁRIO, Alexandra Conceição; VIEIRA, Antonio Diogo Silva;

SAAD, Susana Marta Isay; CONVERTI, Attilio; JR, Adalberto Pessoa; DA SILVA, José Alessandro. Aqueous extracts of *Agave sisalana* boles have prebiotic potential. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–5, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2018.1536129. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1536129>.

ARALDI, R. P. et al. Analysis of antioxidant, cytotoxic and mutagenic potential of *Agave sisalana* Perrine extracts using Vero cells, human lymphocytes and mice polychromatic erythrocytes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 98, 2018. a. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.022.

ARALDI, Rodrigo Pinheiro et al. Analysis of antioxidant, cytotoxic and mutagenic potential of *Agave sisalana* Perrine extracts using Vero cells, human lymphocytes and mice polychromatic erythrocytes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 98, n. December 2017, p. 873–885, 2018. b. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.022>.

ARALDI, Rodrigo Pinheiro; MÓDOLO, Diego Grando; SOUZA, Jacqueline Mazzuchelli De; CARVALHO, Rodrigo Franco De; SANTOS, Lucinéia. Analysis of mutagenic potential of therapeutic vaccine based on BPV-1 E6 recombinant protein combined with different adjuvants. **Journal of Veterinary Medicine and Health**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1–10, 2017.

ASHRAF, Mehdi Farshad; ABD AZIZ, Maheran; STANSLAS, Johnson; ISMAIL, Ismanizan; ABDUL KADIR, Mihdzar. Assessment of antioxidant and

cytotoxicity activities of saponin and crude extracts of chlorophytum borivilianum. **The Scientific World Journal**, [S. l.], v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/216894.

ÁVILA, Alexandre Leon Ribeiro. **Caracterização Do Locus Cdkn2a E Dos Genes Cdk4 E Mc1R Em Pacientes Com Critérios Clínicos Para O Diagnóstico Da Síndrome Do Melanoma Familiar E Melanoma Múltiplo Esporádico**. 2010. [S. l.], 2010.

BACH, Charles M.; HOUGHTON, Alan N.; SOBER, Arthur J.; SOONG, Send-Jaw; ATKINS, Michael B.; THOMPSON, John F. Coleman; MD, William P. Cutaneous Melanoma, 5th Edition. **Dermatologic Surgery**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 518, 2010. Disponível em: https://journals.lww.com/dermatologicsurgery/Fulltext/2010/04000/Cutaneous_Melanoma,_5th_Edition.13.aspx.

BAHMANI, Mahmood; SHIRZAD, Hedayatollah; SHAHINFARD, Najmeh; SHEIVANDI, Laaleh; RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmoud. Cancer Phytotherapy: Recent Views on the Role of Antioxidant and Angiogenesis Activities. **Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 299–309, 2017. DOI: 10.1177/2156587215625157.

BALCH, Charles M.; ATKINS, Michael B. **Cutaneous Melanoma Sixth Edition**. [s.l: s.n.].

BARCELLOS-HOFF, Mary Helen; LYDEN, David; WANG, Timothy C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 511–518, 2013. DOI: 10.1038/nrc3536. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3536>.

BARNES, Jessica L.; ZUBAIR, Maria; JOHN, Kaarthik; POIRIER, Miriam C.; MARTIN, Francis L. Carcinogens and DNA damage. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 1213–1224, 2018. DOI: 10.1042/BST20180519.

BARREIROS, André L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006. DOI: 10.1590/s0100-40422006000100021.

BARRETO, Stella Maria Andrade Gomes et al. Evaluation of in vitro and in vivo safety of the by-product of *Agave sisalana* as a new cosmetic raw material: Development and clinical evaluation of a nanoemulsion to improve skin moisturizing. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 108, n. March, p. 470–479, 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.06.064.

BARRETT, J. C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 100, n. 12, p. 9–20, 1993. DOI: 10.1289/ehp.931009.

BASU, Ashis K. DNA damage, mutagenesis and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 4, 2018. DOI: 10.3390/ijms19040970.

BEVONA, Caroline; GOGGINS, William; QUINN, Timothy; FULLERTON, Julie; TSAO, Hensin; CORONA, Rosamaria. Cutaneous Melanomas Associated with Nevi. **Archives of Dermatology**, [S. l.], v. 139, n. 12, p. 1620–1624, 2003. DOI: 10.1001/archderm.139.12.1620.

BHATIA, Shailender; TYKODI, Scott S.; THOMPSON, John A. Treatment of metastatic melanoma: An overview. **Oncology**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 488–496, 2009.

BISHOP, D. Timothy et al. Geographical Variation in the Penetrance of CDKN2A Mutations for Melanoma. **CancerSpectrum Knowledge Environment**, [S. l.], v. 94, n. 12, p. 894–903, 2002. DOI: 10.1093/jnci/94.12.894.

BOLOGNIA, Jean L.; JORIZZO, Joseph L.; CALLEN, Jeffrey P.; RAPINI, Ronald P.; SCHAFFER, Julie V; OLIVEIRA, Renata Scavone De. **Dermatologia**, 2011. Disponível em: <http://site.ebrary.com/id/10898710>.

BORNE, Estelle et al. Oral metronomic cyclophosphamide in elderly with metastatic melanoma. [S. l.], p. 684–689, 2010. DOI: 10.1007/s10637-009-9298-5.

BORTNER, Carl D.; OLDENBURG, Niclas B. E.; CIDLOWSKI, Jhon A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends in cell biology**, [S. l.], v. 5, p. 21–26, 1995.

BOTURA, M. B. et al. In vivo anthelmintic activity of an aqueous extract

from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 177, n. 1–2, p. 104–110, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.11.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.039>.

BOX, Neil F.; DUFFY, David L.; CHEN, Wei; STARK, Mitchell; MARTIN, Nicholas G.; STURM, Richard A.; HAYWARD, Nicholas K. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 765–773, 2001. DOI: 10.1086/323412.

BRANDÃO, Maria G. L.; ZANETTI, Naiara N. S.; OLIVEIRA, Patricia; GRAEL, Cristiane F. F.; SANTOS, Aparecida C. P.; MONTE-MÓR, Roberto L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 120, n. 2, p. 141–148, 2008. DOI: 10.1016/j.jep.2008.08.004.

BRODSKY, Robert A.; PETRI, Michelle; SMITH, B. Douglas; SEIFTER, Eric J.; SPIVAK, Jerry L.; STYLER, Michael; DANG, Chi V; BRODSKY, Isadore; JONES, Richard J. Immunoablative High-Dose Cyclophosphamide without Stem-Cell Rescue for Refractory, Severe Autoimmune Disease. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v. 129, n. 12, p. 1031–1035, 1998. DOI: 10.7326/0003-4819-129-12-199812150-00007. Disponível em: <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/0003-4819-129-12-199812150-00007>.

BROETTO, Júlia; FREITAS, José Octávio Gonçalves De; SPERLI, Aymar Edison; SOH, Suk Won; RICHTER, Carlos Augusto; TONI, Ricardo Antonio De. Tratamento cirúrgico dos carcinomas basocelular e espinocelular: experiência dos Serviços de Cirurgia Plástica do Hospital Ipiranga. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 527–530, 2012. DOI: 10.1590/s1983-51752012000400009.

BUSCÀ, Roser; BALLOTI, Robert. Cyclic AMP a Key Messenger in the Regulation of Skin Pigmentation. **Pigment Cell Res**, [S. l.], v. 13, p. 60–69, 2000.

BUTROS, Joseph. The Effect of Saponin on Tissue and Cancer Cells in Vitro *. **Cancer Research**, [S. l.], v. 8, n. 5, 1948.

CALIXTO, João B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 100, n. 1–2, p. 131–134, 2005. DOI: 10.1016/j.jep.2005.06.004.

CANTLEY, Lewis C.; AUGER, Kurt R.; CARPENTER, Christopher; DUCKWORTH, Brian; GRAZIANI, Andrea; KAPELLER, Rosanna; SOLTOFF, Stephen. Oncogenes and signal transduction. **Cell**, [S. l.], v. 64, p. 281–302, 1991. DOI: 10.1016/B978-141603703-3.10002-0.

CARR, Stephanie; SMITH, Christy; WERNBERG, Jessica. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surgical Clinics of NA**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1016/j.suc.2019.09.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005>.

CARVALHO, Charles André; DA CUNHA, Mauricio Estrela; GIUGLIANI, Roberto; BAKOS, Lucio; ASHTON-PROLLA, Patrícia. Melanoma hereditário: Prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 53–60, 2004. DOI: 10.1590/s0365-05962004000100006.

CASILLAS, Florita Ramos; CRDENAS, Azucena Oranday; MORALES, Catalina Rivas; STAR, Ma. Julia Verde; CRUZ-VEGA, Delia Elva. Cytotoxic activity of Agave lechuguilla Torr. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 58, p. 12229–12231, 2012. DOI: 10.5897/ajb-12-1123.

CHANG, Raymond.; ARÊAS, Elizabeth Pinheiro Gomes; ORNELLAS, Fernando Rei. **Físico-química para as ciências químicas e biológicas**. São Paulo: McGraw-Hill, 2009.

CHEN, Benjamin P.; MURPHY, Michael; KURIMASA, Akihiro; CHEN, David J. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks *. **The Journal of Biology Chemistry**, [S. l.], v. 276, n. 45, p. 42462–42467, 2001. DOI: 10.1074/jbc.C100466200.

CHEN, Pi Yu; CHEN, Chin Hui; KUO, Ching Chuan; LEE, Tzong Huei; KUO, Yueh Hsiung; LEE, Ching Kuo. Cytotoxic steroidal saponins from Agave sisalana. **Planta Medica**, [S. l.], v. 77, n. 9, p. 929–933, 2011. DOI: 10.1055/s-0030-1250672.

CHEN, Pi Yu; KUO, Yuh Chi; CHEN, Chin Hui; KUO, Yueh Hsiung; LEE, Ching Kuo. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine Ex Engelm. **Molecules**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 1789–1795, 2009. DOI: 10.3390/molecules14051789.

CHENG, Liang; LOPEZ-BELTRAN, Antonio; MASSARI, Francesco; MACLENNAN, Gregory T.; MONTIRONI, Rodolfo. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. **Modern Pathology**, [S. l.], v. 31, p. 24–38, 2018. DOI: 10.1038/modpathol.2017.104. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2017.104>.

CHINEMBIRI, Tawona N.; PLESSIS, Lissinda H.; GERBER, Minja; HAMMAN, Josias H.; PLESSIS, Jeanetta. **Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.3390/molecules190811679.

CHOUDHURI, Supratim; CHANDERBHAN, Ronald; MATTIA, Antonia. **Carcinogenesis: Mechanisms and Models**. Third Edit ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-811410-0.00020-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00020-9>.

CLARK, Wallace H.; FROM, Lynn; BERNARDINO, Evelina A.; MIHM, Martin C. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. **Cancer Research**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 705–727, 1969.

COATES, Alan S. Systemic chemotherapy for malignant melanoma. **World Journal of Surgery**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 277–281, 1992. DOI: 10.1007/BF02071532.

COHEN, Cynthia et al. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 3728–3733, 2002.

CONITEC. Ipilimumabe para tratamento de pacientes com melanoma metastático. [S. l.], v. 239, 2018. Disponível em: https://www.mendeley.com/research-papers/ipilimumabe-para-tratamento-pacientes-com-melanoma-metastatico/?utm_source=desktop&utm_medium=1.17.13&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7B88653670-2624-3532-a3dd-950d1d46355a%7D.

CORRIE, Pippa G. et al. Adjuvant bevacizumab in patients with melanoma at high risk of recurrence (AVAST-M): Preplanned interim results from a multicentre, open-label, randomised controlled phase 3 study. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 620–630, 2014. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70110-X. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70110-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70110-X).

COSTA, Bruno M.; BELL, Robert J. A.; RUBE, H. Tomas; XAVIER-MAGALH, Ana. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. [S. l.], n. 43, p. 315–324, 2016. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0003.

COSTA, Milena Ferreira; TOMÁS, Juan; OSUNA, Ayala; BRANDÃO, Hugo Neves; HARAGUCHI, Mitsue; ALBERTO, Carlos. ISSN 2236 – 4420 Composição química e toxicidade foliar de extratos do resíduo líquido de sisal Chemical composition and foliar toxicity of the extracts from the waste liquid of sisal Introdução Material e métodos. [S. l.], p. 372–384, 2014.

COSTIN, Gertrude E.; HEARING, Vincent J. Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress. **FASEB Journal**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 976–994, 2007. DOI: 10.1096/fj.06-6649rev.

DA SILVA, Andreza Amaral; GONÇALVES, Roberto Calderon. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010.

DANTAS, Leiliam Cruz. **COMPLEXO AGROINDUSTRIAL DO SISAL : DA INTEGRAÇÃO À DESESTRUTURAÇÃO INTEGRADA: O Caso da BRASCORDA S/A na Microrregião do Curimataú Paraibano**. 1994. [S. l.], 1994.

DAVID, Jener; SANTOS, Gonçalves; JOSE, Ivo; VIEIRA, Curcino; BRAZ-FILHO, Raimundo. Chemicals from Agave sisalana Biomass: Isolation and Identification. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 16, p. 8761–8771, 2015. DOI: 10.3390/ijms16048761.

DE ALMEIDA, Vera Lúcia; LEITÃO, Andrei; BARRETT REINA, Luisa Del Carmen; MONTANARI, Carlos Alberto; DONNICI, Claudio Luis; LOPES, Míriam Teresa Paz. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005. DOI: 10.1590/s0100-40422005000100021.

DE BRUIN, Elza C.; MEDEMA, Jan Paul. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treatment Reviews**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 737–749, 2008. DOI: 10.1016/j.ctrv.2008.07.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.001>.

DE OLIVEIRA, João Victor A. et al. Saponin-rich fraction from Agave sisalana: effect against malignant astrocytic cells and its chemical characterisation by ESI-MS/MS. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 33, n. 12, p. 1769–1772, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2018.1434633. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1434633>.

DE SOUZA, Sonia R. P.; FISCHER, Frida M.; DE SOUZA, José M. P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: Revisão da literatura. **Revista de Saude Publica**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 588–598, 2004. DOI: 10.1590/s0034-89102004000400018.

DEBNATH, Mousumi; PANDEY, Mukeshwar; SHARMA, Rohit; THAKUR, Gulab S.; LAL, Pushpa. Biotechnological intervention of Agave sisalana: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 177–187, 2010.

DEPEILLE, P.; CUQ, P.; PASSAGNE, I.; EVRARD, A.; VIAN, L. Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 93, p. 216–223, 2005. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602681.

DEVITA, V. T.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S. A. **DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: Principles & practice of oncology: Tenth edition**. [s.l: s.n.].

DEVITA VT, LAWRENCE TS, Rosenberg SA. **DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology**. Lippincott Williams & Wilkins. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004. Disponível em: <http://www.ovid.com/site/catalog/books/4909.jsp>.

DIEPGEN, T. L.; MAHLER, V. The epidemiology of skin cancer. **British Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 146, p. 1–6, 2002.

DOMINGUES, Beatriz; LOPES, Jose; SOARES, Paula; POPULO,

Helena. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, [S. l.], v. Volume 7, p. 35–49, 2018. DOI: 10.2147/itt.s134842.

DOMINGUES, Luciana Ferreira et al. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 270–272, 2010. DOI: 10.1590/s1984-29612010000400018.

DONG, Jianli; PHELPS, Robert G.; QIAO, Rui; YAO, Shen; BENARD, Outhiriaradjou; RONAI, Zeev; AARONSON, Stuart A. BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. **Cancer Research**, [S. l.], v. 63, n. 14, p. 3883–3885, 2003.

DREUW, Alexandra; HERMANN, S. Heike M.; HEISE, A. Ruth; JOUSSEN, Sylvia; RODRI, Felipe; JUGERT, Frank; MERK, Hans F.; HEINRICH, Peter C.; BARON, Jens M. Interleukin-6-Type Cytokines Upregulate Expression of Multidrug Resistance-Associated Proteins in NHEK and Dermal Fibroblasts. **The Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 124, n. 1, p. 28–37, 2005. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.23499.x.

DUFFY, David L.; BOX, Neil F.; CHEN, Wei; PALMER, James S.; MONTGOMERY, Grant W.; JAMES, Michael R.; HAYWARD, Nicholas K.; MARTIN, Nicholas G.; STURM, Richard A. Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. **Human Molecular Genetics**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 447–461, 2004. DOI: 10.1093/hmg/ddh043.

DUNDER, Ricardo J.; QUAGLIO, Ana E. V.; MACIEL, Rubens P.; LUIZ-FERREIRA, Anderson; ALMEIDA, Ana C. A.; TAKAYAMA, Christiane; DE FARIA, Felipe M.; SOUZA-BRITO, Alba R. M. Potencial anti-inflamatório e analgésico do extrato hidrolisado de *Agave sisalana* Perrine ex Engelm, Asparagaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 376–381, 2010. a. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000300014.

DUNDER, RJ; QUAGLIO, AEV; MACIEL, RP; LUIZ-FERREIRA, A.; ALMEIDA, ACA; TAKAYAMA, C.; FARIA, FM; SOUZA-BRITO, ARM. Anti-inflammatory and analgesic potential of hydrolyzed extract of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm., Asparagaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 20, n. 3,

p. 376–381, 2010. b. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000300014.

DUTRA, Rafael C.; CAMPOS, Maria M.; SANTOS, Adair R. S.; CALIXTO, João B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 112, p. 4–29, 2016. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.01.021.

DZWIERZYNSKI, William W. Managing malignant melanoma. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [S. l.], v. 132, n. 3, p. 446–460, 2013. DOI: 10.1097/PRS.0b013e31829ad411.

EL-KENAWI, Asmaa; RUFFELL, Brian. The Immune Microenvironment and Cancer Metastasis. [S. l.], p. 1–24, 2019. DOI: 10.1101/cshperspect.a037424.

ELWOOD, J. Mark; GALLAGHER, Richard P. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 78, n. 3, p. 276–280, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19981029)78:3<276::AID-IJC2>3.0.CO;2-S.

EMADI, Ashkan; JONES, Richard J.; BRODSKY, Robert A. REVIEWS Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 638–647, 2009. DOI: 10.1038/nrclinonc.2009.146. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>.

EMON, Bashar; BAUER, Jessica; JAIN, Yasna; JUNG, Barbara; SAIF, Taher. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 16, p. 279–287, 2018. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.07.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.07.003>.

FERNANDES, Nurimar C.; CALMON, Roberto; MACEIRA, Juan P.; CUZZI, Tullia; DA SILVA, Cesar S. Claudio. Cutaneous melanoma: prospective study of 65 cases *. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 25–34, 2005.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; CORNELIS, S.; VANDENABEELE, P. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 400–410, 2007. DOI:

10.1038/sj.cdd.4402085.

FIRESU, Dorel; SERBAN, Cristina; NEAGU, Anca; MIHALACHE, Daniela; REBEGEA, Laura. Primary bowel malignant melanoma with ileo-ileal intussusception. **Revista de Chimie**, [S. l.], v. 70, n. 9, p. 3408–3411, 2019. DOI: 10.37358/rc.19.9.7559.

FLANAGAN, Niamh; HEALY, Eugene; RAY, Amanda; PHILIPS, Sion; TODD, Carole; JACKSON, Ian J.; BIRCH-MACHIN, Mark A.; REES, Jonathan L. Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. **Human Molecular Genetics**, [S. l.], v. 9, n. 17, p. 2531–2538, 2000.

FORMENT, Josep V; CONNOR, Mark J. O. Targeting the replication stress response in cancer Josep. **Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 188, p. 155–167, 2018. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.03.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.03.005>.

FRICK, Amber; FEDORIW, Yuri; RICHARDS, Kristy; DAMANIA, Blossom; BENTON, Cristina S.; CHAN, Emmanuel; THOMAS, Russell S.; WILTSHIRE, Tim. Immune cell-based screening assay for response to anticancer agents : applications in pharmacogenomics. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, [S. l.], v. 8, p. 81–98, 2015.

GARBE, Claus et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 46, n. 2010, p. 270–283, 2009. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.05.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2009.10.032>.

GEORGE, D. D.; ARMENIO, V. A.; KATZ, S. C. Combinatorial immunotherapy for melanoma. **Nature Publishing Group**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 141–147, 2016. DOI: 10.1038/cgt.2016.56. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2016.56>.

GHOSH, Sumit. Bioorganic Chemistry Cisplatin : The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 88, p. 102925, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.102925. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>.

GILLANDERS, Elizabeth et al. Localization of a Novel Melanoma Susceptibility Locus to 1p22. **The American Society of Human Genetics**, [S. l.], v. 73, p. 301–313, 2003.

GOGAS, Helen J.; KIRKWOOD, John M.; SONDAK, Vernon K. Chemotherapy for Metastatic Melanoma Time for a Change? [S. l.], n. January, 2007. DOI: 10.1002/cncr.22427.

GOYDOS, James S.; SHOEN, Steven L.; KAUFMAN, H. L.; MEHNERT, J. M. Acral Lentiginous Melanoma. **Cancer Treatment and Research**, [S. l.], v. 167, p. 107–129, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-22539-5. Disponível em: <http://www.springer.com/series/5808>.

GRAY-SCHOPFER, Vanessa; WELLBROCK, Claudia; MARAIS, Richard. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, [S. l.], v. 445, n. February, p. 851–857, 2007. DOI: 10.1038/nature05661.

GREENWELL, M.; RAHMAN, P. K. S. .. Europe PMC Funders Group Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. **International Journal of Pharmaceutical Science Research**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. 4103–4112, 2015. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12.Medicinal.

GUERRA, Renata Leborato; CORRÊA, Flávia de Miranda; FERNANDES, Ricardo Ribeiro Alves; ZIMMERMAN, Ivan Ricardo. Custo-utilidade de terapias-alvo comparadas à dacarbazina para o tratamento de primeira linha do melanoma avançado não-cirúrgico e metastático no Sistema Único de Saúde do Brasil. **Value in Health Regional Issues**, [S. l.], v. 20, p. 103–109, 2019. DOI: 10.1016/j.vhri.2019.04.001.

GUIDETTI, Matheus Violato; PORTO, Isadora Christina da Rocha; REZENDE, Maria Gabriela Vargas; MORAIS, Gabriela do Couto Gomes de.; REZENDE, Laura Ferreira de. Incidência e importância do diagnóstico precoce de melanoma no Brasil. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, [S. l.], v. 19, n. 1, 2016.

GYORI, Zsolt; SUSAN, Monica; SUSAN, Razvan; IFTODE, Andrada; TRANDAFIRESCU, Cristina. Melanoma Cell Lines Role in Obtaining New Drug Candidates for Combating the Malignant Pathology of the Cutaneous Organ. [S. l.], n. 3, p. 943–945, 2019.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean ? *[S. l.]*, p. 231–255, 2004. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705776.

HAMBURGER, Matthias; HOSTETTMANN, Kurt. 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, *[S. l.]*, v. 30, n. 12, p. 3864–3874, 1991. DOI: 10.1016/0031-9422(91)83425-K.

HAMMUEL, Chrinius; YEBPELLA, Gary G.; SHALLANGWA, Gideon A.; MAGOMYA, Asabe M.; AGBAJI, Abel S. Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, *[S. l.]*, v. 68, n. 4, p. 535–539, 2011.

HARTMANN, Arndt; SCHIRMACHER, Peter; STERLACCI, William; KOCH, Winfried; LIESENFELD, David B.; SCHIF, Birgit; GARBE, Claus. BRAF mutation testing in melanoma : results from a German observational multicenter study. *[S. l.]*, 2018.

HEIDARIAN, Esfandiar; RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmoud. Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. **Pharmaceutical Biology**, *[S. l.]*, v. 51, n. 9, p. 1104–1109, 2013. DOI: 10.3109/13880209.2013.777931.

HELMBACH, Heike; SINHA, Pranav; SCHADENDORF, Dirk; SCHADENDORF, D. Human Melanoma : Drug Resistance. **Recent Results in Cancer Research**, *[S. l.]*, v. 161, 2003.

HENNINGS, Henry; GLICK, Adam B.; GREENHALGH, David A.; MORGAN, David L.; STRICKLAND, James E.; TENNENBAUM, Tamar; YUSPA, Stuart H. Critical Aspects of Initiation, Promotion, and Progression in Multistage Epidermal Carcinogenesis. **Society for Experimental Biology and Medicine**, *[S. l.]*, v. 202, p. 1–18, 1993.

HUANG, Ying; SADE, Wolfgang. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. **Cancer Letters**, *[S. l.]*, v. 239, p. 168–182, 2006. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.07.032.

HUHN, Richard; READ, Elizabeth J.; BARRETT, Austin John;

DUNBAR, Cynthia E.; HEART, National. High-dose cyclophosphamide with autologous lymphocyte-depleted peripheral blood stem cell (PBSC) support for treatment of refractory chronic autoimmune thrombocytopenia High-dose cyclophosphamide with autologous lymphocyte-depleted peripheral blood stem. **Blood**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 71–77, 2003. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0171.

HUSSUSSIAN, Cristopher J.; STRUEWING, Jeffery P.; GOLDSTEIN, Alisa M.; HIGGINS, Paul A. T.; ALLY, Delphine S.; SHEAHAN, Michelle D.; CLARK, Wallace H. Jr.; TUCKER, Margaret A.; DRACOPOLI, Nicholas C. Germline p16 mutations in familial melanoma. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 6, p. 15–21, 1994.

IARC. GLOBOCAN 2018: Latest global cancer data. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], 2018.

INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva**, [S. l.], 2018.

INGAWALE, Deepa K.; MANDLIK, Satish K.; PATEL, Snehal S. Anti-inflammatory potential of hecogenin on atopic dermatitis and airway hyper-responsiveness by regulation of pro-inflammatory cytokines. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 327–336, 2019. DOI: 10.1080/08923973.2019.1608445. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1608445>.

IQBAL, Javed et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 109, n. June 2018, p. 1381–1393, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.107.

JAIME-PÉREZ, José Carlos; GUERRA-LEAL, Liliana Nataly; CANTÚ-RODRÍGUEZ, Olga Graciela; GÓMEZ-ALMAGUER, David. Myelodysplasia and acute myeloid leukemia fifteen years after high-dose cyclophosphamide in a child with severe aplastic anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 57–59, 2016. DOI: 10.1016/j.bjhh.2016.06.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.06.003>.

JENER, D. G. Santos et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*.

African Journal of Biotechnology, [S. l.], v. 8, n. 22, p. 6181–6184, 2009. DOI: 10.5897/ajb09.862.

JI, Y.; JI, C.; YUE, L.; XU, H. Saponins isolated from *Asparagus* induce apoptosis in human hepatoma cell line HepG2 through a mitochondrial-mediated pathway. **Current Oncology**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 1–9, 2012.

JIANG, Guan; LI, Rong-hua; SUN, Chao; LIU, Yan-qun; ZHENG, Jun-nian. Dacarbazine Combined Targeted Therapy versus Dacarbazine Alone in Patients with Malignant Melanoma : A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1–13, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0111920.

JOHN, Swen Malte; TRAKATELLI, Myrto; ULRICH, Claas. Non-melanoma skin cancer by solar UV : the neglected occupational threat. [S. l.], v. 30, p. 3–4, 2016. DOI: 10.1111/jdv.13602.

JONG, Mariska C. De et al. Peptide Transport by the Multidrug Resistance Protein MRP1 1. [S. l.], p. 2552–2557, 2001.

KALAL, Bhuvanesh Sukhlal; UPADHYA, Dinesh; PAI, Vinitha Ramanath. Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer. **Oncology Reviews**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 19–25, 2017. DOI: 10.4081/oncol.2017.326.

KALYANARAMAN, Balaraman et al. Free Radical Biology & Medicine Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes : challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>.

KAO, Ya Ting; SAXENA, Chaitanya; WANG, Lijuan; SANCAR, Aziz; ZHONG, Dongping. Direct observation of DNA repair by photolyase. **Femtochemistry VII**, [S. l.], v. 102, n. 45, p. 16128–16132, 2005. DOI: 10.1016/B978-044452821-6/50059-9.

KENNEDY, Cornelis; HUURNE, Jeanet; BERKHOUT, Marjo; GRUIS, Nelleke; BASTIAENS, Maarten; BERGMAN, W.; WILLEMZE, R.; NICO, Jan; BAVINCK, Bouwes. Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Gene Variants are Associated with an Increased Risk for Cutaneous Melanoma Which is Largely Independent of Skin

Type and Hair Color. **The Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 117, p. 294–300, 2001.

KHANNA, Kum Kum; JACKSON, Stephen P. DNA double-strand breaks : signaling , repair and the cancer connection. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 27, n. march, p. 247–254, 2001.

KINZLER, Kenneth W.; VOGELSTEIN, Bert. **life and death in a malignant tumour**, 1996.

KITTLER, H.; PEHAMBERGER, H.; WOLFF, K.; BINDER, M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. **Lancet Oncology**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 159–165, 2002. DOI: 10.1016/S1470-2045(02)00679-4.

KIURU, Maija; NEHAL, Kishwer S.; BUSAM, Klaus J. Lentigo Maligna Melanoma. *In*: **Pathology of Melanocytic Tumors**. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 140–157. DOI: 10.1016/B978-0-323-37457-6.00012-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323374576000122>. Acesso em: 27 out. 2019.

KRUH, Gary D.; BELINSKY, Martin G. The MRP family of drug efflux pumps. **Oncogene**, [S. l.], v. 22, p. 7537–7552, 2003. DOI: 10.1038/sj.onc.1206953.

LABERGE, Gregory S.; DUVALL, Eric; GRASMICK, Zachary; HAEDICKE, Kay; GALAN, Anjela; LEVERETT, Sudhir Baswan; YIM, Sunghan; PAWELEK, John. Recent Advances in Studies of Skin Color and Skin Cancer. **YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE**, [S. l.], v. 93, p. 69–80, 2020.

LANDI, Maria Teresa; BACCARELLI, Andrea; TARONE, Robert E.; PESATORI, Angela; TUCKER, Margaret A.; HEDAYATI, Mohammad; GROSSMAN, Lawrence. DNA repair, dysplastic nevi, and sunlight sensitivity in the development of cutaneous malignant melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 94–101, 2002. DOI: 10.1093/jnci/94.2.94.

LEARY, Ben O.; FINN, Richard S.; TURNER, Nicholas C. Treating cancer with selective CDK4 / 6 inhibitors. **Nature Publishing Group**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 417–430, 2016. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.26. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.26>.

LEI, Fu Xi; JIN, Lei; LIU, Xiao Ying; LAI, Fritz; YAN, Xu Guang; FARRELLY, Margaret; GUO, Su Tang. RIP1 protects melanoma cells from apoptosis induced by BRAF / MEK inhibitors. **Cell Death and Disease**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1038/s41419-018-0714-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0714-7>.

LEÓN, M. L. Villalobos; VILLAVARDE, R. Molina; GONZÁLEZ, J. L. López; SOTO, M. Álvarez-mon. Melanoma. **Medicine**, [S. l.], v. 11, n. 26, p. 1597–1607, 2013. DOI: 10.1016/S0304-5412(13)70511-0.

LI, Juan et al. Saponin 1 induces apoptosis and suppresses NF- κ B-mediated survival signaling in glioblastoma multiforme (GBM). **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0081258.

LIU, Xiao Ying et al. RIP1 Kinase Is an Oncogenic Driver in Melanoma. [S. l.], v. 75, n. 5, p. 1736–1749, 2015. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2199.

LOEB, Lawrence A. Mutator Phenotype May Be Required for Multistage Carcinogenesis. **Cancer Research**, [S. l.], v. 51, n. 12, p. 3075–3079, 1991.

LOWE, Scott W.; SHERR, Charles J. Tumor suppression by Ink4a \pm Arf : progress and puzzles. **Current Opinion in Genetics & Development**, [S. l.], v. 13, p. 77–83, 2003. DOI: 10.1016/S0959-437X(02)00013-8.

MALLING, Heinrich V. History of the science of mutagenesis from a personal perspective. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 372–386, 2004. DOI: 10.1002/em.20064.

MARSHALL, Kurt D.; CHRISTOPHER, P.; HUTTEMANN, Maik; STATE, Wayne. Necroptosis : is there a role for mitochondria ? [S. l.], v. 5, n. August, p. 1–5, 2014. DOI: 10.3389/fphys.2014.00323.

MARTENS, Marie Christine; SEEBODE, Christina; LEHMANN, Janin; EMMERT, Steffen. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies: An update. **Anticancer Research**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 1153–1158, 2018. DOI: 10.21873/anticancer.12334.

MARTINO, Emanuela; CASAMASSIMA, Giuseppe; CASTIGLIONE, Sonia; CELLUPICA, Edoardo; PANTALONE, Serena; PAPAGNI, Francesca; RUI,

Marta; MARIKA, Angela; COLLINA, Simona. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents : Looking back , peering ahead. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 28, n. 17, p. 2816–2826, 2018. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.06.044. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.044>.

MASSONE, Cesare; DI STEFANI, Alessandro; SOYER, H. Peter. Dermoscopy for Skin Cancer. **Current Opinion in Oncology**, [S. l.], v. 17, p. 147–153, 2005. DOI: 10.1002/9780470696347.ch12.

MELO-BATISTA, Aline Alves De.; OLIVEIRA, Cláudio Roberto Meira De. Plantas Utilizadas Como Medicinais Em Uma Comunidade Do Semiárido Baiano: Saberes Tradicionais E a Conservação Ambiental. **Enciclopédia Biosfera**, [S. l.], v. 10, n. 18, p. 74–88, 2014.

MILER, Arlo J.; M.D; D., Ph; MIHM, Martin C.; M.D., Jr. Mechanisms of Disease Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 355, n. 9, p. 51–65, 2006. DOI: 10.1097/00007611-200194090-00003.

MILLER, Eric. Apoptosis Measurement by Annexin V Staining. **Methods in Molecular Medicine**, [S. l.], v. 88, p. 191–202, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **SIM. Sistema de Informações sobre Mortalidade**. 2017.

MIRANDA, Gilbert Patsayev Marreiro. AGAVE SISALANA , O OURO VERDE DO SERTÃO : O mundo do trabalho e os espaços de resistência narrados pela memória dos velhos sisaleiros do semi-árido paraibano (1970-1990). Gilbert Patsayev Marreiro Miranda Pensar o semi-árido nordestino , requer preocupa. **Anais do XXVI Simpósio Nacional de História – ANPUH • São Paulo**, [S. l.], p. 1–12, 2011.

MOCELLIN, Simone; LENS, Marko B.; PASQUALI, Sandro; PILATI, Pierluigi; CHIARION SILENI, Vanna. Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S. l.], n. 6, 2013. DOI: 10.1002/14651858.CD008955.pub2. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD008955.pub2>. Acesso em: 24 out. 2019.

MODESTI, Mauro; KANAAR, Roland. DNA repair : Spot (light) s on

chromatin Chromatin modifications regulate many nuclear. **Current Biology**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 229–232, 2001.

MONTAGNER, Suelen; COSTA, Adilson. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 263–269, 2009. DOI: 10.1590/S0365-05962009000300008.

MONTAGUT, Clara; SETTLEMAN, Jeff. Targeting the RAF – MEK – ERK pathway in cancer therapy. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 283, n. 2, p. 125–134, 2009. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.01.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.022>.

MORRIS, Luc G. T.; CHAN, Timothy A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. **Cancer**, [S. l.], v. 121, n. 9, p. 1357–1368, 2015. DOI: 10.1002/cncr.29140.

MWALE, Marizvikuru; MASIKA, Patrick J.; FRANCIS, Joseph. Anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous leaf extract of *Agave sisalana* in rats. **Scientific Research and Essays**, [S. l.], v. 7, n. 14, p. 1477–1484, 2012. DOI: 10.5897/sre11.660.

NAGORE, Eduardo et al. TERT promoter mutations in melanoma survival. [S. l.], v. 124, p. 75–84, 2016. DOI: 10.1002/ijc.30042.

NIKOLAOU, V.; STRATIGOS, A. J. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. **British Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 170, n. 1, p. 11–19, 2014. DOI: 10.1111/bjd.12492.

OAK, Allen S. W.; ATHAR, Mohammad; YUSUF, Nabiha; ELMETS, Craig A. UV and Skin: Photocarcinogenesis. *In*: **Environment and Skin**. [s.l: s.n.]. p. 67–103.

OLIVEIRA-JÚNIOR, Raimundo Gonçalves De. Carotenoids from *Rhodomonas salina* Induce Apoptosis and Sensitize A2058 Melanoma Cells to Chemotherapy. [S. l.], 2020.

OSELLA-ABATE, Simona et al. TERT Promoter Mutations are Associated with Visceral Spreading in Melanoma of the Trunk. [S. l.], p. 1–14, 2019. DOI: 10.3390/cancers11040452.

OUYANG, Zhengxiao; WU, Hongwei; LI, Linqin; LUO, Yi; LI, Xianan; HUANG, Gang. Regulatory T cells in the immunotherapy of melanoma. **Tumor Biology**, [S. l.], v. 37, n. 283, p. 77–85, 2015. DOI: 10.1007/s13277-015-4315-0.

PALMER, James S.; DUFFY, David L.; BOX, Neil F.; AITKEN, Joanne F.; O’GORMAN, Louise E.; GREEN, Adele C.; HAYWARD, Nicholas K.; MARTIN, Nicholas G.; STURM, Richard A. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: Is the association explained solely by pigmentation phenotype? **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 176–186, 2000. DOI: 10.1086/302711.

PAN, Yan; ADLER, Nikki R.; WOLFE, Rory; MCLEAN, Catriona A.; KELLY, John W. Nodular melanoma is less likely than superficial spreading melanoma to be histologically associated with a naevus. **Medical Journal of Australia**, [S. l.], v. 207, n. 8, p. 333–338, 2017. DOI: 10.5694/mja17.00232.

PAULL, Tanya T.; ROGAKOU, Emmy P.; YAMAZAKI, Vikky; KIRCHGESSNER, Cordula U.; GELLERT, Martin; BONNER, William M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. **Current Biology**, [S. l.], v. 10, n. 15, p. 886–895, 2000.

PFEIFER, Gerd P. Mechanisms of UV - induced mutations and skin cancer. **Genome Instability & Disease**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 99–113, 2020. DOI: 10.1007/s42764-020-00009-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42764-020-00009-8>.

PIEROTTI, Marco A.; FRATTINI, Milo; MOLINARI, Francesca; SOZZI, Gabriella; CROCE, Carlo M. Oncogenes. *In*: **Holland-Frei Cancer Medicine 9th edition**. [s.l: s.n.]. p. 1–22. DOI: 10.1002/9781119000822.hfcm004.

PIRES, Carla Andréa Avelar; FAYAL, Aglayn Pimentel; CAVALCANTE, Renata Henriques; FAYAL, Syenne Pimentel; LOPES, Nicole Salomão; FAYAL, Franklin Pimentel; DOS SANTOS, Maria Amélia Lopes. Câncer de pele: caracterização do perfil e avaliação da proteção solar dos pacientes atendidos em serviço universitário. **Journal of Health & Biological Sciences**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 54, 2017. DOI: 10.12662/2317-3076jhbs.v6i1.1433.p54-59.2018.

PRASAD, Sahdeo; GUPTA, Subash C.; TYAGI, Amit K. Reactive

oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 387, p. 95–105, 2017. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.042. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>.

QUELLE, Dawn E.; ZINDY, Frédérique; ASHMUN, Richard A.; SHERR, Charles J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. **Cell**, [S. l.], v. 83, n. 6, p. 993–1000, 1995. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90214-7.

RANSOHOFF, Katherine J.; JAJU, Prajaka D.; TANG, Jean Y.; CARBONE, Michele; LEACHMAN, Sancy; SARIN, Kavita Y. Familial skin cancer syndromes Increased melanoma risk. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 423–434, 2016. DOI: 10.1016/j.jaad.2015.09.070. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.09.070>.

RASTRELLI, Marco; TROPEA, Saveria; ROSSI, Carlo Riccardo; ALAIBAC, Mauro. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. **In vivo**, [S. l.], v. 28, p. 1005–1012, 2014.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, [S. l.], v. 39, p. 603–613, 2001.

REDZA-DUTORDOIR, Maureen; AVERILL-BATES, Diana A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>.

RONCA, Roberto et al. Long Pentraxin-3 Inhibits Epithelial – Mesenchymal Transition in Melanoma Cells. [S. l.], v. 12, n. December, p. 2760–2772, 2013. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0487.

RUNGER, Thomas M. Mechanisms of Melanoma Promotion by Ultraviolet Radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 136, p. 1751–1752, 2016. DOI: 10.1016/j.jid.2016.04.001.

SALASCHE, Stuart J. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S.

I., v. 42, n. 1 SUPPL. 1, p. S4–S7, 2000. DOI: 10.1067/mjd.2000.103342. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1067/mjd.2000.103342>.

SANTOS, Jener D. G.; BRANCO, Alexsandro. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African Journal of Biotechnology**, [*S. I.*], v. 8, n. 22, p. 6181–6184, 2009. DOI: 10.5897/AJB09.862.

SANTOS, Jener D. G.; BRANCO, Alexsandro; SILVA, Alice F.; PINHEIRO, Carla S. R.; NETO, Aristóteles Góes; UETANABARO, Ana P. T.; QUEIROZ, Sandra R. O. D.; OSUNA, Juan T. A. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African Journal of Biotechnology**, [*S. I.*], v. 8, n. 22, p. 6181–6184, 2009.

SCHMITT, Juliano Vilaverde. Actinic keratosis: a clinical and epidemiological revision. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [*S. I.*], v. 87, n. 3, p. 425–434, 2012.

SHAIN, A. Hunter; BASTIAN, Boris C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, [*S. I.*], v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016. DOI: 10.1038/nrc.2016.37. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.37>.

SIEGEL, Rebecca; WARD, Elizabeth; BRAWLEY, Otis; JEMAL, Ahmedin. Cancer Stastics, 2011. **CA cancer journal of clinicians**, [*S. I.*], v. 61, p. 212–236, 2011. DOI: 10.3322/caac.20121. Available.

SIGISMUND, Sara; AVANZATO, Daniele; LANZETTI, Letizia. Emerging functions of the EGFR in cancer. [*S. I.*], v. 12, p. 3–20, 2018. DOI: 10.1002/1878-0261.12155.

SMALLEY, Keiran S. M. Why do women with melanoma do better than men? **eLife**, [*S. I.*], v. 7, p. 1–3, 2018. DOI: 10.7554/eLife.31770.

SOSA, Venus; MOLINÉ, Teresa; SOMOZA, Rosa; PACIUCCI, Rosanna; KONDOH, Hiroshi; LLEONART, Matilde E. ARTICLE IN PRESS Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, [*S. I.*], v. 12, n. 1, p. 376–390, 2012. DOI: 10.1016/j.arr.2012.10.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>.

STRUB, Thomas; BALLOTTI, Robert; BERTOLOTTO, Corine. The “ART” of epigenetics in melanoma: From histone “alterations, to resistance and

therapies". **Theranostics**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 1777–1797, 2020. DOI: 10.7150/thno.36218.

STUELLEN, Christina H.; PARENT, Carole A.; MONTELL, Denise J. Cell motility in cancer invasion and metastasis : insights from simple model organisms. **Nature Publishing Group**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 296–312, 2018. DOI: 10.1038/nrc.2018.15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2018.15>.

TAIT, Stephen W. G. et al. Report Widespread Mitochondrial Depletion via Mitophagy Does Not Compromise Necroptosis. **CellReports**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 878–885, 2013. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.10.034. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.034>.

TENTORI, Lucio; LACAL, Pedro Miguel; GRAZIANI, Grazia. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 34, n. 12, p. 656–666, 2013. DOI: 10.1016/j.tips.2013.10.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.003>.

THOMAS, Nancy E. et al. Comparison of clinicopathologic features and survival of histopathologically amelanotic and pigmented melanomas a population-based study. **JAMA Dermatology**, [S. l.], v. 150, n. 12, p. 1306–1314, 2014. DOI: 10.1001/jamadermatol.2014.1348.

TORRY, Donald S. Proto-Oncogenes and Germ-Cell Differentiation. **American Journal of Reproductive Immunology**, [S. l.], v. 27, n. Table I, p. 167–170, 1992.

TRAVASSOS, Ana Rita; SANCHES, Maria Mendonça; SOARES-DE-ALMEIDA, Luís. O Impacto do Campo de Cancerização no Desenvolvimento de Cancro Cutâneo. **Revista SPDV**, [S. l.], v. 74, n. 4, p. 327–333, 2016.

TSAO, Hensin; ATKINS, Michael B.; SOBER, Arthur J. Management of cutaneous melanoma. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 351, n. 10, p. 998–1012, 2004. DOI: 10.1056/NEJMra041245.

TUCKER, Margaret A. et al. A natural history of melanomas and dysplastic nevi: An atlas of lesions in melanoma-prone families. **Cancer**, [S. l.], v. 94,

n. 12, p. 3192–3209, 2002. DOI: 10.1002/cncr.10605.

TURAJLIC, Samra; STOTTORIVA, Andrea; GRAHAM, Trevor; SWANTON, Charles. Resolving genetic heterogeneity in cancer. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 20, p. 404–416, 2019. DOI: 10.1038/s41576-019-0114-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-019-0114-6>.

TURDO, Alice; GAGGIANESI, Miriam; CHINNICI, Aurora; STASSI, Giorgio; TODARO, Matilde. Cancer Stem Cells : From Birth to Death. *In*: **Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics**,. [s.l.] : Springer, 2019. p. 1–30. DOI: 10.1007/978-3-030-16624-3.

VALVERDE, Paloma; HEALY, Eugene; SIKKINK, Stephen; HALDANE, Faye; THODY, Anthony J.; CAROTHERS, Andrew; JACKSON, Ian J.; REES, Jonathan L. The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. **Human Molecular Genetics**, [S. l.], v. 5, n. 10, p. 1663–1666, 1996.

VAN ENGELAND, Manon; NIELAND, Luc J. W.; RAMAEKERS, Frans C. S.; SCHUTTE, Bert; REUTELINGSPERGER, Chris P. M. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 1–9, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R.

VÁZQUEZ, Alicia Cajina. Carcinoma Basocelular. **Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica LXIX**, [S. l.], n. 603, p. 325–329, 2012.

VERCAMMEN, Dominique; BROUCKAERT, Greet; DENECKER, Geertrui; VAN DE CRAEN, Marc; DECLERCQ, Wim; FIERS, Walter; VANDENABEELE, Peter. Dual signaling of the Fas receptor: Initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 188, n. 5, p. 919–930, 1998. DOI: 10.1084/jem.188.5.919.

VINCENT, Thomas L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 729–737, 2008.

VINOGRADOV, Serguei; WEI, Xin. R eview Cancer stem cells and

drug resistance : the potential of nanomedicine R eview. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 597–615, 2012.

VIZLER, Csaba; GLAVINAS, Hristos. Flow Cytometric Cytotoxicity Assay for Measuring Mammalian and Avian NK Cell Activity. [S. l.], v. 162, p. 158–162, 2002. DOI: 10.1002/cyto.10066.

WALSH, Naomi; KENNEDY, Susan; LARKIN, Annemarie; BALLOT, Jo; OOI, Wei; GULLO, Giuseppe; CLYNES, Martin; CROWN, John; O'DRISCOLL, Lorraine. Expression of MDR1 P-glycoprotein and MRP-1 proteins in melanoma. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 14, n. 15 Supplement, p. B5 LP-B5, 2008. Disponível em: http://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/15_Supplement/B5.abstract.

WANG, Weishan; LIU, Yong; NIU, Jie; LIN, Weiyong. Fluorescence Imaging of Mitochondria with Three Different Sets of Signals Based on Fluorene Cation Fluorescent Probe. **Journal of Fluorescence**, [S. l.], v. 29, p. 1457–1465, 2019.

WARBURG, Otto. On the origin of cancer cells. **Science**, [S. l.], v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956. DOI: 10.1126/science.123.3191.309.

WARD, Laura Sterian. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 351–360, 2002. DOI: 10.1590/s0004-27302002000400006.

WEEDON, D., MORGAN, M.B., GROSS, C., NAGORE, E., YU, L. L. Pathology and Genetics of Skin Tumors. *In*: **WHO Classification of Tumors**. [s.l.: s.n.].

WEI, Qingyi et al. Repair of UV Light-Induced DNA Damage and Risk of Cutaneous Malignant Melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 95, n. 4, p. 308–315, 2003.

WIKONKAL, Norbert M.; BRASH, Douglas E. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 6–10, 1999. DOI: 10.1038/sj.jidsp.5640173. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jidsp.5640173>.

WILSON, Melissa A.; SCHUCHTER, Lynn M. Cancer Treatment and Research: Melanoma. *In*: **Cancer Treatment and Research**. [s.l.: s.n.]. v. 167p. 107–

129. DOI: 10.1007/978-3-319-22539-5. Disponível em: <http://www.springer.com/series/5808>.

WINSHIP, Amy L.; BAKAI, Monika; SARMA, Urooza; LIEW, Seng H.; HUTT, Karla J. Dacarbazine depletes the ovarian reserve in mice and depletion is enhanced with age. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, p. 1–13, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-24960-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24960-5>.

YOSHIMOTO, Yasuaki; KAMIYA, Noburô. ATP- and Calcium-Controlled Contraction in a Saponin Model of *Physarum polycephalum*. **CELL STRUCTURE AND FUNCTION**, [S. l.], v. 9, p. 135–141, 1984.

ZOROV, Dmitry B.; JUHASZOVA, Magdalena; SOLLOTT, Steven J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. [S. l.], v. 1757, p. 509–517, 2006. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2006.04.029.

ZOU, Peng; FU, Jing; YU, He-shui; ZHANG, Jie; KANG, Li-ping; MA, Bai-ping; YAN, Xian-zhong. Spectral Assignments and Reference Data and ¹³C NMR assignments for two oxaphenalenones bacillosporin C and D from the mangrove endophytic fungus SBE-14. **Magnetic Resonance Chemistry**, [S. l.], v. 44, p. 1090–1095, 2006. DOI: 10.1002/mrc.

ANEXO A – Documento SISGEM



Ministério do Meio Ambiente

CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de
Acesso Cadastro nº A177E74

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do	A177E74
cadastro: Usuário:	Edislane barreiros de Souza
CPF/CNPJ:	444.755.439-91
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do	
Acesso:	



Pesquisa Científica



Bioprospecção



Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Agave sisalana

saponinas

Fonte

do

CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade:

Estudo do potencial anticâncer de extratos de Agave sisalana em

diferentes

linhagens de carcinoma.

Equipe

Edislane barreiros de Souza

UNESP - faculdade de Ciências e Letras

Rodrigo Pinheiro Araldi
Latino-Amer

UNILA - Universidade Federal da Integração

Parceiras

Nacionais

05.497.968/0001-99 /

Secretaria de Ciência Tecnologia e Inovação do Estado da Bahia

Data do Cadastro:

01/04/2019 17:06:16

Situação do Cadastro:

Concluído

**Conselho de Gestão do Patrimônio Genético**

Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 10:53 de 02/04/2019.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**