

## **ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO* E *IN VITRO* DO TERPENO *CIS/TRANS*-NEROLIDOL E DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR**

Milena Souza Borges da Silva<sup>1</sup>; Fernanda Fernandes Miranda da Cunha<sup>2</sup>; Denise Costa Arruda<sup>3</sup>.

1. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: milenasborges18@outlook.com
2. Doutoranda em Biotecnologia; e-mail: cunha.fernandes@gmail.com
3. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: denisearruda@umc.br

**Área do conhecimento:** Biologia Celular.

**Palavras-Chave:** Melanoma; Nerolidol; Morte Celular.

### **INTRODUÇÃO**

Os melanócitos são células encontradas na camada basal da epiderme, capazes de sintetizar melanina, uma proteína responsável pela coloração da pele, da íris dos olhos e dos fios de cabelo. Fatores de riscos como histórico familiar, imunossupressão, exposição à radiação UV e sensibilidade a luz solar podem gerar variações em determinados genes dos melanócitos, afetando-os de diversas formas, podendo levar a transformação maligna e a formação do melanoma (GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK & MARAIS, 2007; BERTOLOTTI, 2013). O melanoma é considerado o tipo mais grave de câncer de pele, pois, em comparação aos outros tipos, este possui um índice metastático muito alto e de rápida disseminação sistêmica (LIM *et al.*, 2018). Quando descoberto em seu estágio inicial, o melanoma pode ser tratado utilizando recursos cirúrgicos, e estes por sua vez, representam 90% de chances de cura (TAS, 2012). Porém, em estágios avançados, como o melanoma maligno metastático, estas células apresentam uma alta resistência à tratamentos quimioterápicos. A incidência dos casos de melanoma tem aumentado com o passar dos anos, sendo assim, a pesquisa de novas drogas capazes de induzir morte celular em células tumorais se torna relevante (LIM *et al.*, 2018). O Nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol) é um sesquiterpeno que, apresenta fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O, membro dos álcoois, encontrado em óleos essenciais de plantas, que possui vários efeitos, dentre eles atividade antitumoral, como foi observado em alguns estudos como o de Ryabchenko e colaboradores em 2011, e as pesquisas realizadas por Costa e colaboradores em 2015.

### **OBJETIVOS**

Determinar o mecanismo de morte celular induzido pelo nerolidol em células de melanoma murino B16F10-Nex2, bem como, estudar a atividade antitumoral *in vivo* no modelo metastático e *in vitro* em células de melanoma humano e células não tumorais.

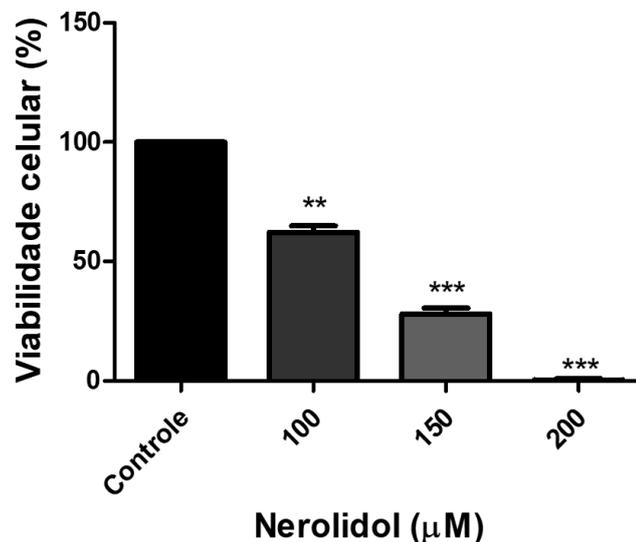
### **METODOLOGIA**

Para determinar a atividade citotóxica do Nerolidol *in vitro* em células de melanoma humano *Skmel-25* e em células não tumorais *L929* (fibroblastos), as células foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com o terpeno em diferentes concentrações, após 24 horas de tratamento foram desaderidas e contadas com auxílio do corante de exclusão Trypan blue. Para avaliar a inibição da migração celular, cultivou-se células *B16F10-Nex2* em placa de 12 poços, posteriormente foram feitas lesões verticais, e as células foram tratadas com 25 µM de Nerolidol (concentração subtóxica), no decorrer de 0, 2, 4, 24 e 48 h foram capturadas imagens dos poços. Para determinar a ativação de caspases, cultivou-se células *B16F10-*

Nex2 com 150  $\mu\text{M}$  de Nerolidol por 30 minutos em garrafa de cultura de 75  $\text{cm}^2$ , posteriormente foram seguidos os protocolos preconizados pelo fabricante do kit “*Apotarget Caspase Colorimetric Protease Assay*” (Invitrogen). Para determinar os efeitos *in vivo* do Nerolidol no modelo metastático, células *B16F10-Nex2* foram inoculadas em camundongos *C57BL/6*, que foram tratados via intraperitoneal com o 19,6 mM do terpeno, após 10 dias da inoculação das células (sendo destes apenas 9 de tratamento) os camundongos foram sacrificados e os pulmões foram retirados para realizar a contagem de nódulos.

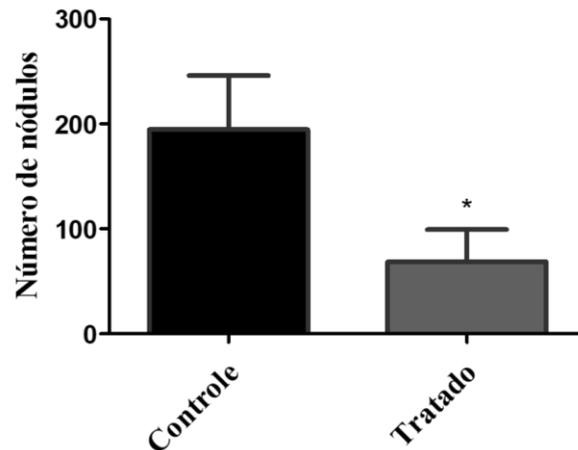
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

O Nerolidol não apresenta efeito citotóxico em células não tumorais da linhagem *L929* de fibroblastos, mas possui efeito antitumoral dose dependente em células *B16F10-Nex2* (dados apresentados anteriormente) e em *Skmel-25*, como é possível observar na figura 1 a viabilidade celular diminui conforme a concentração do composto aumenta, o que corrobora com pesquisas realizadas por Costa e colaboradores em 2015 que utilizaram *trans-nerolidol* demonstrando sua eficácia contra células tumorais das linhagens *B16-F10* (melanoma murino), *HepG2* (carcinoma hepatocelular humano), *HL-60* (leucemia promielocítica humana) e *K562* (leucemia mielocítica crônica humana).



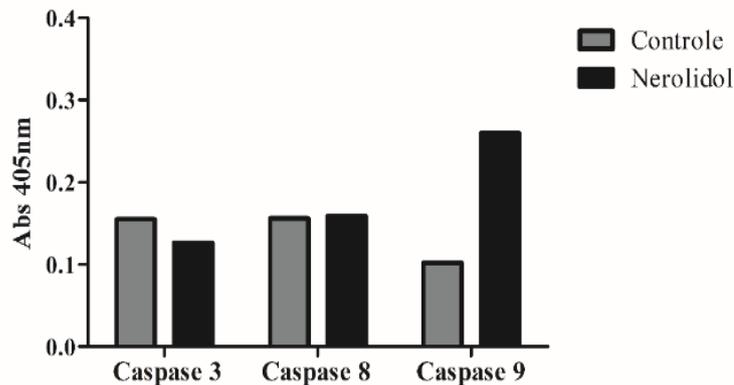
**Figura 1:** Determinação da viabilidade celular de células *Skmel-25* após tratamento com nerolidol. Células *SKMEL 25* ( $1 \times 10^4$ /poço, placas de 96 poços) foram incubadas com o *NER* nas 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$  por 24 horas a 37  $^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . A viabilidade celular foi determinada por contagem com o corante de exclusão *Trypan Blue*. Células não tratadas (controle) foram incubadas com 1% de etanol. O experimento foi realizado em triplicata. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

O melanoma é um tipo de câncer muito agressivo, capaz de se disseminar sistemicamente e atingir os demais tecidos do corpo muito rapidamente, caracterizando assim a metástase, sendo muito comum em tecidos como o tecido pulmonar ou o tecido hepático, por exemplo (DAMSKY; THEODOSAKIS & BOSENBERG, 2013). Dessa forma tornou-se relevante testar a eficácia do Nerolidol no modelo metastático e também na migração celular, demonstrando que o terpeno é capaz inibir a migração celular, bem como, diminuir o desenvolvimento de nódulos pulmonares decorrentes do processo metastático. O terpeno apresentou efeito na inibição da migração celular, assim como, na diminuição do desenvolvimento de nódulos pulmonares (observar gráfico do experimento *in vivo* na figura 2).



**Figura 2:** Número de nódulos pulmonares. Células *B16F10-Nex2* inoculadas  $1 \times 10^5$  em camundongos C57BL/6. Camundongos foram tratados com 19,6 mM de Nerolidol por 9 dias. Camundongos não tratados (controle) receberam PBS por 9 dias. Após o tratamento os camundongos foram sacrificados, os pulmões foram retirados e fotografados. \*  $p \leq 0,05$ .

Visto que anteriormente em nosso laboratório foi observado características de morte por apoptose em células *B16F10-Nex2* tratadas com Nerolidol, sendo elas: condensação da cromatina, aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, degradação do DNA e inibição parcial de morte celular por *Z-VAD-FMK*, um inibidor de pancaspase, (dados não publicados), foram feitos ensaios para saber se há ativação de caspases iniciadoras (8 e 9) ou efetora (3) em células tratadas. De acordo com os resultados obtidos neste projeto houve a ativação da caspase 9 nas células tratadas no tempo testado (observar na imagem 4), sendo esta responsável pela iniciação da via intrínseca do apoptose. O que corrobora com os estudos publicados utilizando células tumorais tratadas com óleos essenciais que possuíam Nerolidol, demonstrando que estas apresentaram morte por apoptose em células *HepG2*, *CaCo-2* (Adenocarcinoma colorretal), linhagem primária de hepatócitos de rato, *B16*, *HL-60* e *HCT8* (Adenocarcinoma ileocecal) (BIAZI, et al., 2017; AMBROZ, et al., 2015; TATMAN & MO, 2002).



**Figura 3:** Ativação de Caspase por Método Colorimétrico. Células *B16F10-Nex2* incubadas com 150  $\mu$ M de Nerolidol de 20-30 min a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Células não tratadas (controle) foram incubadas a 1% de etanol. O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

## CONCLUSÕES

Os experimentos realizados até o momento demonstram que o cis/trans-Nerolidol apresenta efeito antitumoral em células de melanoma murino *B16F10-Nex2* e humano *Skmel-25*, além de não apresentar atividade citotóxica em células não tumorais da linhagem *L929* e

que um dos possíveis mecanismos de morte induzidos pelo terpeno é a apoptose pela via intrínseca, visto que, é possível observar a atividade de caspases 9, sendo estas iniciadoras exclusivas da via em questão. O presente estudo também demonstrou que o Nerolidol é capaz de inibir a migração celular em concentrações subtóxicas, além de ser capaz de diminuir o desenvolvimento de nódulos pulmonares no modelo metastático *in vivo*. Porém é necessária a realização de experimentos posteriores para determinar os mecanismos de morte celular, assim como, para comprovar a eficácia do nerolidol na diminuição do desenvolvimento de nódulos pulmonares advindos da metástase.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROŽ, *et al.* The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. **Molecules**, v.20, n.8, 2015.

BERTOLOTTO, Corine. Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options. **Scientifica**, [s.l.], v. 2013, p.1-22, 2013. Hindawi Limited.

BIAZI, B, *et al.* Cis-Nerolidol Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells through Extensive CYP2C19 and CYP1A2 Oxidation. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 2017.

COSTA, Emmanoel V, *et al.* Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Med**, v.81, p.563–567, 2015.

GRAY-SCHOPFER, Vanessa; WELLBROCK, Claudia; MARAIS, Richard. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, [s.l.], v. 445, n. 7130, p.851-857, fev. 2007.

LIM, Jonathan Chee Woei; *et al.* The Role of PPAR $\beta/\delta$  in Melanoma Metastasis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 10, p.2860-2872, 20 set. 2018.

RYABCHENKO, B, *et al.* Cytotoxic Properties of Selected Sesquiterpene Alcohols on Human Cervix Carcinoma Cell Lines. **Journal Of Essential Oil Bearing Plants**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.316-319, jan. 2011.

TAS, Faruk. Metastatic Behavior in Melanoma: Timing, Pattern, Survival, and Influencing Factors. **Journal Of Oncology**, [s.l.], v. 2012, p.1-9, 2012. Hindawi Limited.

TATMAN, Dana; MO, Huanbiao. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 175, p. 129-139, 2002.

DAMKSY, WE., THEODOSAKIS, N., BOSENBERG, M. Melanoma Metastasis: new concepts and evolving paradigms. **Oncogene**. [s.l.], v.33, 2413–2422, 2013.