

RESUMO EXPANDIDO
XXVI Congresso de Iniciação Científica

DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE PERILALDEÍDO EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO E HUMANO

Jociele Gonçalves¹

Maria Carolina Mariano Cesar²

Denise Costa Arruda³

1. Discente do Programa de pós-Graduação em biotecnologia; e-mail: goncalves.jcl@hotmail.com
2. Discente do Programa de pós-Graduação em biotecnologia; e-mail: cesarcarolina1@hotmail.com
3. Docente na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: denisearruda@umc.br

Área de Conhecimento: Biologia celular

Palavras-Chave: Câncer; Melanoma; Terpenos; Perilaldeído; Compostos naturais;

Como citar:

Gonçalves J, Cesar MCM, Arruda DC. Determinação do efeito antitumoral de perilaldeído em células de melanoma murino e humano. Revista Científica UMC [Internet]. 27 de outubro de 2023; 8(2):e080200039. Disponível em: <https://seer.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/1899>

Fluxo de revisão: o presente resumo expandido foi revisado por pares pela comissão do evento.

Recebido em: 11/09/2023

Aprovado em: 26/10/2023

ID publicação: e080200039

DOI:

Licença CC BY 4.0 DEED

INTRODUÇÃO

O melanoma é um câncer de pele que se origina dos melanócitos e é considerado pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer) o tipo de câncer mais agressivo, devido a seu alto potencial metastático e sua alta incidência, que vem crescendo exponencialmente ao redor do mundo (INCA, 2023). Embora a quimioterapia e a radioterapia ainda sejam o padrão ouro para o tratamento de melanoma, seus efeitos adversos e a alta resistência do melanoma às terapias existentes justificam a busca por novos tratamentos (LIN, et al., 2019). O perilaldeído (PAH) é um monoterpeneo natural encontrado em abundância na erva *Perilla frutescens* (Perila) e é o principal constituinte de um óleo essencial acumulado nos tricomas glandulares da planta. Sua atividade antitumoral já foi relatada em diversas linhagens celulares, como em células MFCs de câncer gástrico murinos, adenocarcinoma prostático de grau IV (PC-3) e em adenocarcinoma de pulmão humano BroTo e A549 (ELEGBEDE et al., 2003; LIN et al., 2022; ZHANG et al., 2018). Neste trabalho, avaliamos a atividade antitumoral de PAH em células de melanoma murino e humano, assim como estudamos os possíveis mecanismos de morte celular causada por PAH e a capacidade de formação de colônias de células B16F10-Nex2 tratadas e não tratadas com este terpeno.

OBJETIVO

Determinar a atividade antitumoral de PAH em células de melanoma murino B16F10-Nex2 e melanoma humano SK-MEL-25.

METODOLOGIA

Para realizar ensaios de viabilidade celular, células B16F10-Nex2 ou SK-MEL-25 foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com 60, 120, 180, 240, 360, 480 e 600 μM de PAH por 24h. Células não tratadas foram incubadas com meio RPMI ou DMEM com 2% de etanol absoluto. A quantificação de células viáveis foi realizada através de ensaio de exclusão com Azul de Tripán e os resultados foram expressos em porcentagem comparadas ao controle.

Nos ensaios com inibidores de morte, células B16F10-Nex2 foram pré-incubadas com os inibidores: Z-VAD-FMK (inibidor de pan-caspases); 3-Metiladenina (3-MA) (inibidor de PI3K de classe III) e Necrostatina-1 (NEC-1) (inibidor de RIPK1). As células foram incubadas com PAH (600 μM), por 24h na presença ou ausência dos inibidores. A quantificação de células

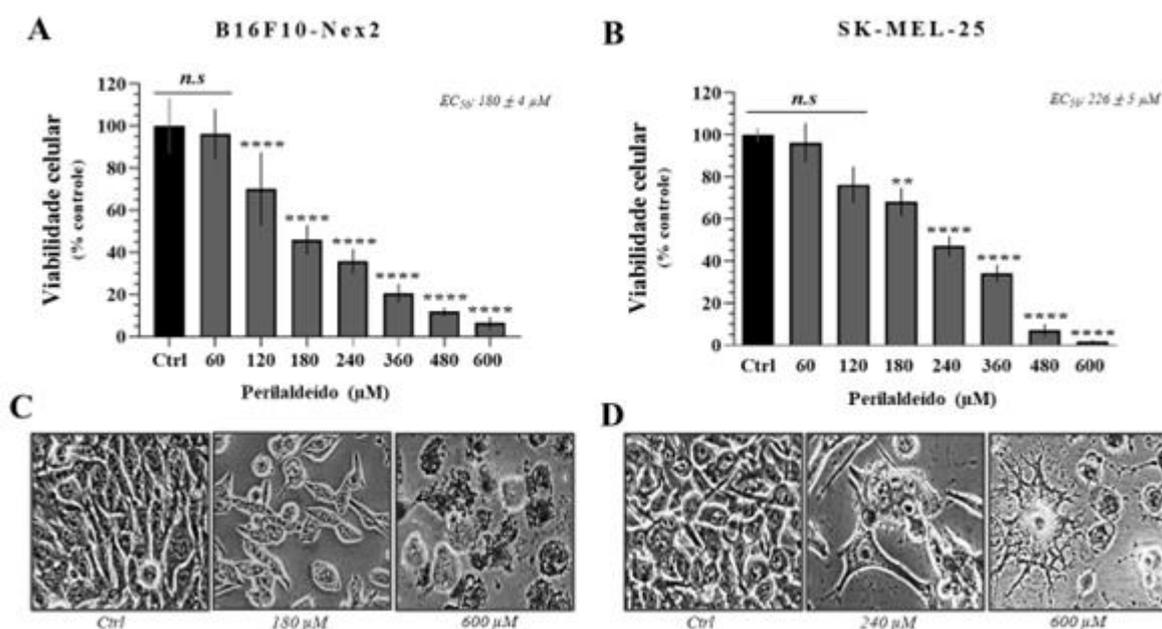
viáveis foi realizada através de ensaio de exclusão com azul de tripan e os resultados foram expressos em porcentagem comparadas ao controle.

Por fim, para realizar o ensaio clonogênico, células B16F10-NEX2 foram cultivadas em placas de 12 poços e incubadas com 10, 20, 30, 40 e 60 μM de PAH até que se formassem colônias de aproximadamente > 50 células. Após esse período, as colônias foram lavadas com PBS 1x, fixadas com etanol 70% e coradas com cristal violeta. A contagem das colônias e a área das colônias foi quantificada através do software ImageJ - versão 1.41a/Java 1.6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

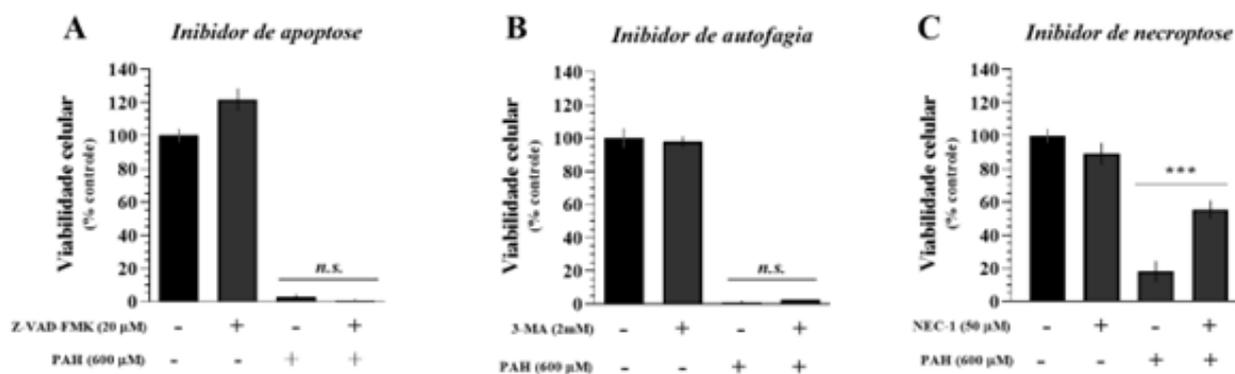
Inicialmente, foi investigada a antitumoral de PAH em células de melanoma murino B16F10-Nex2 (Figura 1A) e melanoma humano SK-MEL-25 (Figura 1B) por 24h. Os resultados demonstraram que PAH induziu citotoxicidade dose dependente em ambas as linhagens tumorais e alterou significativamente a morfologia dessas células, quando comparadas com células não tratadas (Figura 1C e D).

Figura 1 - Curva de dose resposta de PAH em células de melanoma murino B16F10-Nex2 e melanoma humano SK-MEL-25 e alterações morfológicas causadas pelo tratamento com o composto por 24h. Células B16F10-Nex2 (A) e SK-MEL-25 (B) foram incubadas com 60, 120, 180, 240, 360, 480 e 600 μM de PAH por 24h e sua viabilidade celular foi quantificada através do ensaio de exclusão com azul de tripan. Células não tratadas foram incubadas com meio RPMI e 2% de etanol. Para visualização das mudanças morfológicas de células B16F10-Nex2 (C) e SK-MEL-25 (D) tratadas com PAH por 24h, imagens foram capturadas em microscópio invertido primover de fabricante Carl Zeiss, em aumento de 400x ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.



Assim como em nosso trabalho, He e colaboradores (1997) também observaram citotoxicidade em uma linhagem de melanoma murino similar, B16F10, quando foram tratadas com PAH por 48h. Dessa forma, aprofundamos as pesquisas, avaliando os possíveis mecanismos de morte celular causada por PAH. Para isso, células B16F10-Nex2 foram tratadas com Z-VAD-FMK (inibidor de pan-caspases), 3-MA (inibidor de PI3K de classe III) e NEC-1 (inibidor de RIPK1) na presença e ausência de PAH (600 μ M). Os resultados demonstraram que os inibidores Z-VAD-FMK (Figura 2A) e 3-MA (Figura 2B) não alteraram o efeito citotóxico de PAH, entretanto, o inibidor NEC-1 (Figura 2C) inibiu parcialmente o efeito de PAH nas células de melanoma murino.

Figura 2 - Ensaio com inibidores de morte celular na presença de PAH. Para investigar os mecanismos de morte, células B16F10-Nex2 foram tratadas com 600 μ M de PAH por 24h na presença e ausência dos inibidores de pan-caspase, Z-VAD-FMK (A), PI3K de classe III, 3-MA (B) e RIPK1, NEC-1 (C). Os resultados demonstram que a atividade de PAH foi inibida somente na presença de NEC-1, inibidor de RIPK1. Células não tratadas foram incubadas com meio RPMI e 2% de etanol. *** $p < 0.001$.



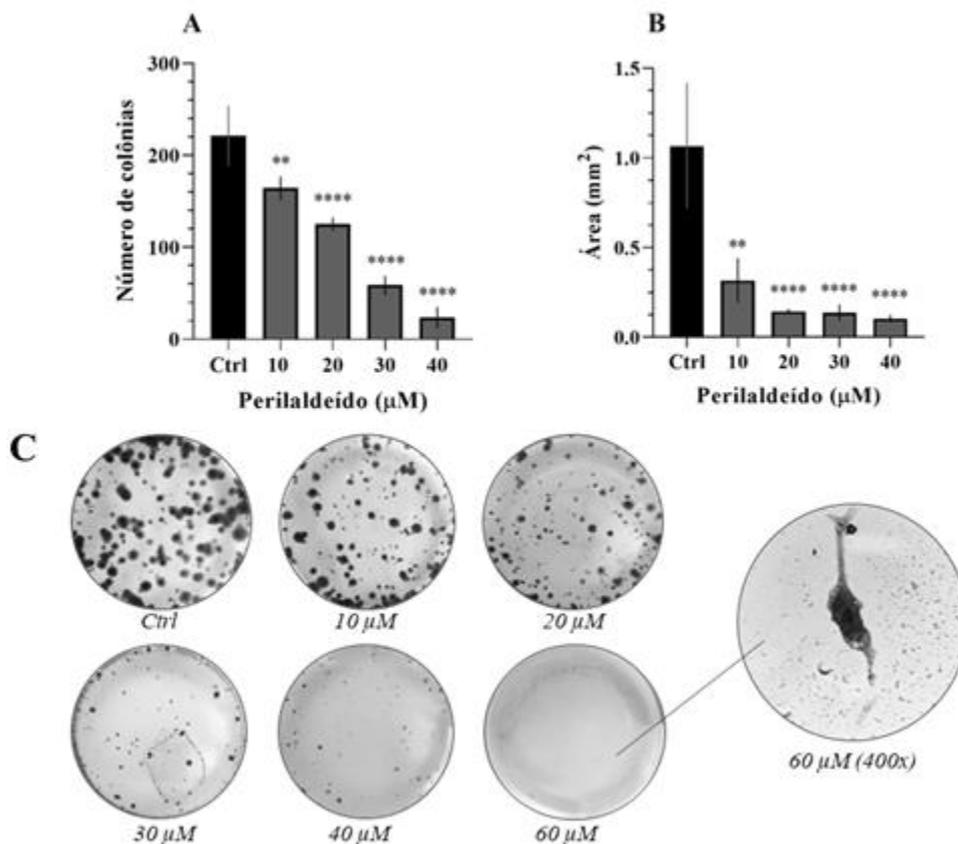
Embora RIPK1 seja um dos moduladores centrais do processo de morte por necroptose e nossos resultados tenham demonstrado que ao inibir RIPK1 o processo de morte foi parcialmente inibido, estudos recentes demonstraram a ausência total ou parcial de mRNA de RIPK3 em diversas linhagens celulares de melanoma (GESERICK et al., 2015; ROSSI et al., 2019). Como RIPK3 é uma proteína à jusante de RIPK1 que também desempenha um papel crítico na sinalização de morte celular por necroptose, a ausência de sua expressão pode implicar que a inibição do efeito citotóxico de PAH na presença de NEC-1 pode não estar relacionada com a morte celular por necroptose, mas pode ter esta via como um modulador central em seu processo de citotoxicidade (GONG, et al., 2019). Os processos de morte celular programada compartilham componentes em suas vias de sinalização e através dessas conexões as vias operam e modulam o tipo de morte celular que as células sofrerão de acordo com as condições ambientais. Sabe-se que a indução da via $TNF\alpha$, principal via indutora de necroptose, também pode culminar em sobrevivência celular através da ativação de $NF-\kappa B$ e

em morte celular apoptótica dependente de RIPK1, através da ativação de caspase 8, presente no complexo II. Neste contexto, devido a ausência de expressão de RIPK3, mecanismos podem modular a via de morte celular, usando como via alternativa a apoptose dependente de RIPK1 (GONG et al., 2019).

Lin e colaboradores (2022) demonstraram que PAH inibiu significativamente a ativação da via NF- κ B em células de adenocarcinoma prostático de grau IV (PC-3). Esses dados levantam a hipótese de que o efeito citotóxico de PAH poderia estar sendo causado pela inibição da via de sobrevivência celular, NF- κ B, com posterior modulação de morte por apoptose dependente de RIPK1. Corroborando com essa ideia, outros trabalhos também apontam PAH como indutor de apoptose e/ou necroptose em células tumorais, como Zhang e colaboradores (2018), que observaram que houve regulação positiva nos níveis de caspase-3 e p53 em células MFCs de câncer gástrico murinos, sugerindo que essas células sofreram morte celular apoptótica, e Elegbede e colaboradores (2003) que sugerem que PAH induziu necrose em células de adenocarcinoma de pulmão humano BroTo e A549.

Além de investigarmos os mecanismos de morte celular, também estudamos a capacidade de PAH inibir a formação de colônias em células B16F10-Nex2. Sabe-se que estabelecer colônias em outros órgãos é um passo crucial para o desenvolvimento da metástase, desse modo, compostos que tenham a capacidade de diminuir parcial ou completamente a formação de colônias são promissores para o tratamento de câncer. Com isso, demonstramos que PAH diminuiu significativamente o número e área das colônias nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 μ M (Figura 3A e B) e não houve formação de colônias na concentração de 60 μ M (Figura 3C). Dados na literatura demonstram resultados similares, onde PAH teve a capacidade de diminuir a formação de colônias em células de adenocarcinoma de pulmão humano A549, e também foi observado que células BroTo tratadas com PAH não formaram colônias, porém, havia células aderidas à placa de cultura, indicando possível toxicidade tardia de PAH (ELEGBEDE, et al., 2003). Em um estudo mais recente, também foi observada a diminuição significativa no número de colônias em células de câncer de próstata PC-3, tratadas com PAH (Lin, et al., 2022).

Figura 3 - Efeito de PAH na formação de colônias em células B16F10-Nex2. Ensaios de formação de colônias foram realizados para investigar o efeito de PAH na formação de colônias de células B16F10-Nex2. As células foram tratadas com 10, 20, 30, 40 e 60 μM de PAH até que se formassem colônias de < 50 células. Células não tratadas foram incubadas com meio RPMI e 2% de etanol. É possível observar a diminuição gradativa de número de colônias (A) e da área das colônias (B). Na concentração de 60 μM foram vistas apenas células individuais aderidas à placa de cultura (C) ** $p < 0.01$, **** $p > 0.0001$.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Perilaldeído é um composto que causa citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10-Nex2 e melanoma humano SK-MEL-25. Os mecanismos de morte celular ainda precisam ser melhor avaliados através de técnicas que possam quantificar proteínas de interesse, como RIPK1, caspases e outras que estejam relacionadas à morte celular. Além disso, novos experimentos precisam ser realizados para avaliar se em concentrações subtóxicas, o PAH também poderia estar interferindo no ciclo celular, bem como, nos mecanismos de migração e invasão celular. Como perspectiva, pretendemos avaliar a atividade de PAH em ensaios in vivo e fazer investigações da atividade antitumoral de PAH abrangendo outras

linhagens de melanoma humano, para que seu efeito seja determinado e comparado nas diversas linhagens dessa doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ELEGBEDE, J.Abiodun; FLORES, Richard; WANG, Robert C. Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in BroTo and A549 cells cultured in vitro. *Life Sciences*, [S.L.], v. 73, n. 22, p. 2831-2840, out. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00701-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00701-x). Acesso em: 09 set. 2023.
- GESERICK, P; WANG, J; SCHILLING, R; HORN, S; A HARRIS, P; BERTIN, J; GOUGH, P J; FEOKTISTOVA, M; LEVERKUS, M. Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma. *Cell Death & Disease*, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1884-1884, set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.240>. Acesso em: 15 nov. 2022
- GONG, Yitao; FAN, Zhiyao; LUO, Guopei; YANG, Chao; HUANG, Qiuyi; FAN, Kun; CHENG, He; JIN, Kaizhou; NI, Quanxing; YU, Xianjun; CHEN, Liu. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*, v. 18, n. 1, p. 1-17, 23 maio 2019. Acesso em: 20 fev. 2022.
- HE, Lei; MO, Huanbiao; HADISUSILO, Susilowati; QURESHI, Asaf A.; ELSON, Charles E.. Isoprenoids Suppress the Growth of Murine B16 Melanomas In Vitro and In Vivo. *The Journal Of Nutrition*. v. 127, n. 5, p. 668-674, 1 maio 1997. Acesso em: 10 fev. 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer: Câncer de pele melanoma. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 09 set. 2023.
- LIN, Shian-Ren; CHANG, Chia-Hsiang; HSU, Che-Fang; TSAI, May-Jwan; CHENG, Henrich; LEONG, Max K.; SUNG, Ping-Jyun; CHEN, Jian-Chyi; WENG, Ching-Feng. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: preclinical evidence. *British Journal Of Pharmacology*, [S.L.], v. 177, n. 6, p. 1409-1423, 27 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14816>. Acesso em: 09 set. 2023.
- LIN, Zhuoyuan; HUANG, Sheng; LINGHU, Xitao; WANG, Yixiao; WANG, Bin; ZHONG, Shaowen; XIE, Shangyan; XU, Xiaohong; YU, Aorigele; NAGAI, Atsushi. Perillaldehyde inhibits bone metastasis and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) signaling-induced osteoclastogenesis in prostate cancer cell lines. *Bioengineered*, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 2710-2719, 26 jan. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21655979.2021.2001237> Acesso em: 01 nov. 2022
- ROSSI, Alessandra; PAKHOMOVA, Olga N.; PAKHOMOV, Andrei G.; WEYGANDT, Samantha; BULYSHEVA, Anna A.; MURRAY, Len E.; MOLLICA, Peter A.; MURATORI, Claudia. Mechanisms and immunogenicity of nsPEF-induced cell death in B16F10 melanoma tumors. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-14, 23 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36527-5>. Acesso em: 11 nov. 2022
- ZHANG, Yu; LIU, Suosi; FENG, Qin; HUANG, Xiuyun; WANG, Xiangyang; PENG, Ya; ZHAO, Zhihong; LIU, Zhan. Perillaldehyde activates AMP-activated protein kinase to suppress the growth of gastric cancer via induction of autophagy. *Journal Of Cellular Biochemistry*, [S.L.], v. 120, n. 2, p. 1716-1725, 30 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.27491>. Acesso em: 09 mar. 2022