

RESUMO EXPANDIDO
XXVI Congresso de Iniciação Científica

ANÁLISE DOS EFEITOS ANTITUMORAIS DO SESQUITERPENO AROMADENDRENO EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

Maria Eduarda Rafful Pinto da Cunha¹

Juliana Machado Anastácio²

Agnes Kobayashi Calvo de Sant'Ana³

Maria Carolina Mariano Cesar⁴

Denise Costa Arruda⁵

1. Discente do curso de Biomedicina; e-mail: duda_rafful06@hotmail.com
2. Discente Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail: juliana_machado@hotmail.com
3. Discente Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail: agneskcsantana@gmail.com
4. Discente Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail: cesarcarolina1@hotmail.com
5. Docente na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: denisearruda@umc.br

Área de Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-Chave: Melanoma, Aromadendreno, Compostos Naturais.

Como citar:

da Cunha MERP, Anastácio JM, de Sant'Ana AKC, Cesar MCM, Arruda DC. Análise dos efeitos antitumorais do sesquiterpeno aromadendreno em células de melanoma murino. Revista Científica UMC [Internet]. 27 de outubro de 2023;8(2):e080200045.

Disponível em: <https://revista.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/1929>

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: e080200045

DOI:

Licença CC BY 4.0 DEED

INTRODUÇÃO

O melanoma é o câncer de pele mais agressivo devido ao seu alto potencial metastático, origina-se a partir do acúmulo de mutações nos melanócitos, células presentes na camada basal da epiderme. Nos estágios iniciais, esse tipo de câncer de pele possui melhor prognóstico. Em estágios mais avançados da doença, as células tumorais podem adquirir capacidade de resistência aos tratamentos disponíveis, tornando necessária a busca por novas terapias (GRAY-SCHOPFER et al; 2007). Atualmente, o estudo de compostos naturais com atividade antitumoral, como os terpenos, vem crescendo nos últimos anos (YEHIA et al., 2012). O aromadendreno, é um terpeno derivado da árvore de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), que demonstrou na literatura, possuir efeito antitumoral nas linhagens de adenocarcinoma colorretal, câncer de mama e leucemia linfoblástica aguda (WEI et al., 2021; ZUGAZAGOITIA et al., 2016; SAUTER, 2020). Entretanto, nenhum estudo havia sido realizado até o momento com aromadendreno em células de melanoma. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito antitumoral deste terpeno.

OBJETIVO

Avaliar o efeito antitumoral do aromadendreno em células de melanoma murino, bem como, avaliar o aumento de espécies reativas de oxigênio induzido por este composto.

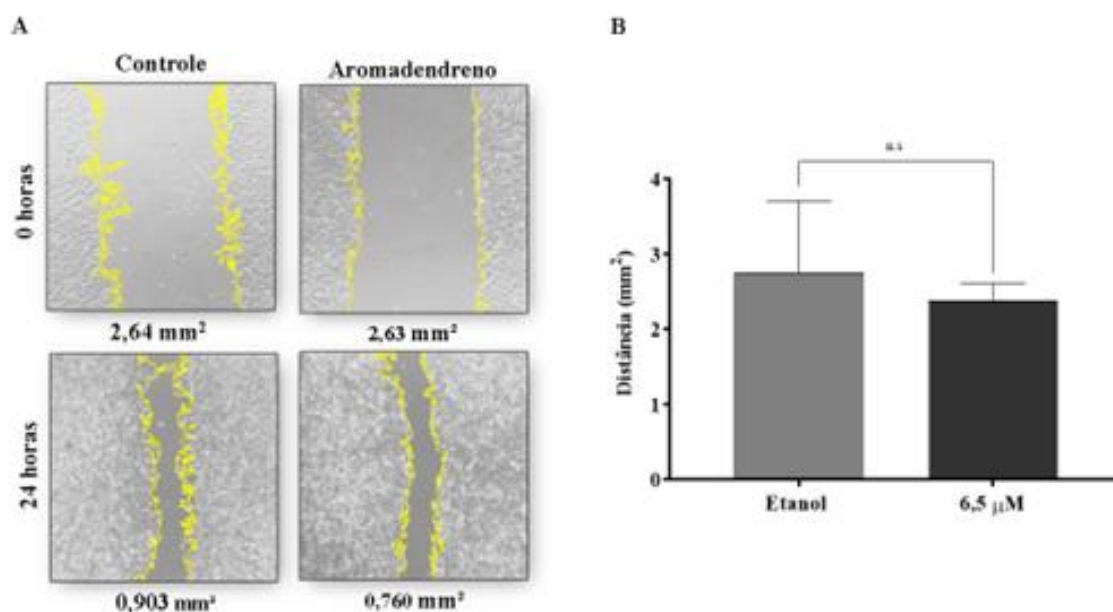
METODOLOGIA

As células da linhagem tumoral B16F10-Nex2, foram cultivadas em placas de 96 para o ensaio de citotoxicidade, tratadas com aromadendreno nas concentrações de 6,5; 25; 50; 100; 100; 150; 175; 200; 250; e 300 μM por 24 h e contadas pelo método de exclusão Trypan blue. Através da mesma metodologia, foi realizado o ensaio de viabilidade celular na presença dos inibidores de espécies reativas de oxigênio Glutathione Reduzida e N-acetil-L-cisteína, onde as células foram pré-incubadas por 1 e 2 h respectivamente, tratadas nas concentrações de 175 μM e 300 μM do aromadendreno por 3 h. Além disso, foi feito um ensaio de migração celular, onde as células foram cultivadas em placas de 12 poços e tratadas com uma concentração subtóxica de 6,5 μM para observar se o aromadendreno possui a capacidade de interferir na motilidade celular através do ensaio Wound Healing.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade celular é o mecanismo pelo qual as células se proliferam entre os tecidos. Em neoplasias, esse mecanismo está associado a formação de metástase e essa é uma das características principais que aumentam a taxa de mortalidade no melanoma (CORY G., 2011). Dessa forma, foi realizado o ensaio de migração celular, para avaliar se o aromadendreno possui a capacidade de inibir esse mecanismo na linhagem tumoral B16F10-Nex2 de melanoma murino. Neste ensaio, foi possível constatar que o aromadendreno, na concentração subtóxica de $6,5 \mu\text{M}$, não inibiu a migração celular (Figura 1). Sendo assim, decidimos investigar se o aromadendreno poderia induzir algum outro efeito antitumoral.

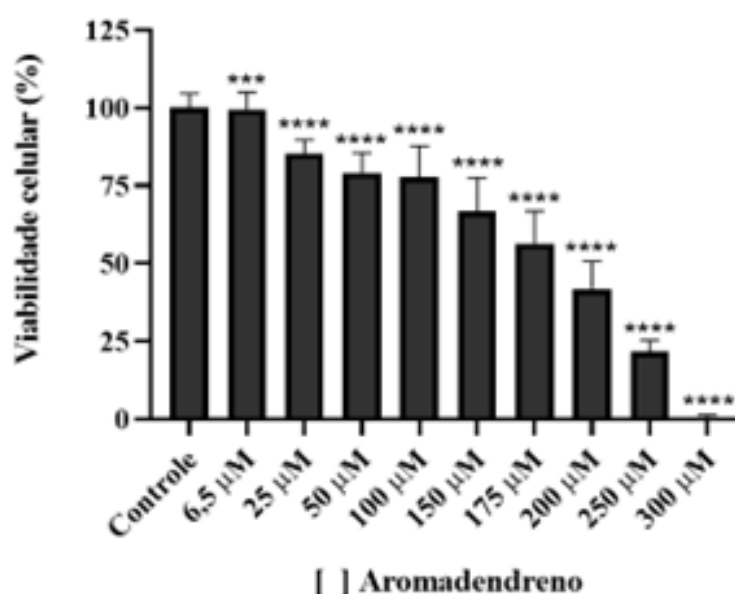
Figura 1 - Determinação do efeito do aromadendreno na migração de células B16F10-Nex2. Células B16F10-Nex2 ($1,5 \times 10^5$) foram cultivadas em placas de 12 poços, e após 24 h foram feitas lesões em cada poço. Em seguida, as células foram tratadas ($6,5 \mu\text{M}$). (A) Imagens foram capturadas nos tempos de 0 e 24 h através do microscópio óptico invertido em um aumento de 200x. (B) distância percorrida (mm^2) durante a migração celular. Teste t de Student.



Os mecanismos de morte celular são alvos para o desenvolvimento de terapias contra o câncer. Estudos utilizando compostos naturais como terpenos, elucidaram que essa classe dispõe menor toxicidade para as células não tumorais, bem como, possuem efeito antitumoral nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Pavithra e colaboradores (2018), demonstraram que o aromadendreno, foi capaz de diminuir a viabilidade celular nas linhagens tumorais de adenocarcinoma colorretal, câncer de mama e leucemia linfoblástica aguda (PAVITHRA et al., 2018; YEHA et al., 2012).

Em nossos estudos, foi realizado o ensaio de viabilidade celular para verificar a citotoxicidade do aromadendreno para determinar o efeito antitumoral do composto em células de melanoma murino B16F10-Nex2. No ensaio de citotoxicidade, foi possível observar a diminuição de aproximadamente 15% da viabilidade celular na concentração de 25 μM e 99% na concentração de 300 μM , após 24 h de tratamento (Figura 2). A EC50 calculada foi de 175 μM .

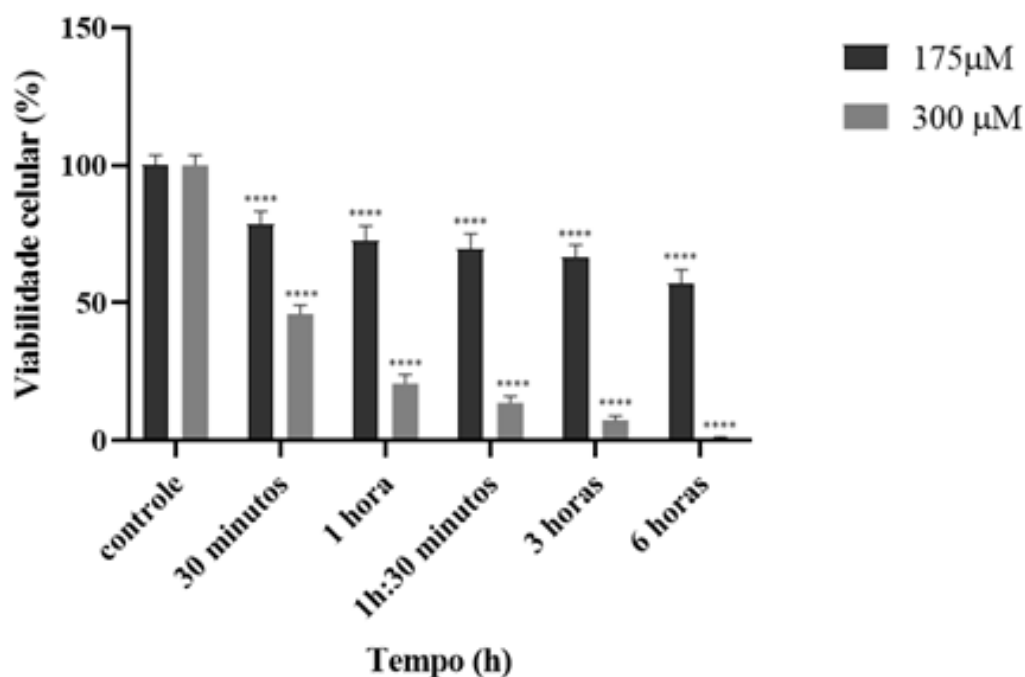
Figura 2 - Determinação do efeito do aromadendreno na viabilidade de células B16F10-Nex2. Células B16F10-Nex2 (5×10^3) foram cultivadas em placas de 96 poços, e tratadas com o aromadendreno por 24 h. A viabilidade celular foi estabelecida pelo teste de exclusão de Trypan Blue. *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$. Teste one way ANOVA.



Através de uma curva de tempo, foi observado que a partir de 1h e 30 minutos de incubação o composto começa a ser citotóxico para as células e em 3 h, o aromadendreno na concentração de 300 μM levou a diminuição em 98% da viabilidade celular (Figura 3). A partir desse resultado, o tempo de 3 h foi selecionado para realizar o ensaio de viabilidade celular na presença dos inibidores de espécies reativas de oxigênio NAC e glutatona reduzida.

Huang e colaboradores (2022) elucidaram que o terpeno artesunato derivado da planta artemisia (*Artemisia annua*), possuiu efeito antitumoral dependente das EROs nas linhagens celulares de câncer colorretal SW480 e HCT116O. Com isto, fomos investigar se o efeito antitumoral do aromadendreno está relacionado com as espécies reativas de oxigênio (EROs).

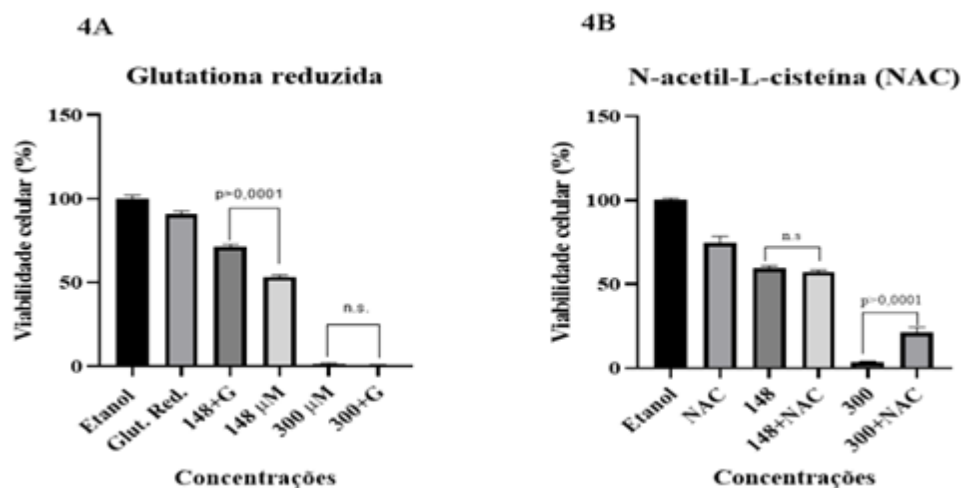
Figura 3 – Curva de tempo do aromadendreno nas concentrações de 175 μM e 300 μM . Células B16F10-Nex2 (5 x 10³) foram cultivadas em placas de 96 poços, e tratadas com o aromadendreno por 30 minutos, 1 h, 1h e 30 minutos, 3 h e 6 h. A viabilidade celular foi estabelecida pelo teste de exclusão de Trypan Blue. **** $p < 0,0001$. Teste one way ANOVA



Para avaliação do envolvimento de EROs na indução de morte celular após incubação com aromadendreno, o ensaio de viabilidade celular foi realizado na presença dos inibidores de espécies reativas de oxigênio (EROs), N-acetil-L-cisteína (NAC) e glutathiona reduzida. As células foram pré-incubadas com o NAC por 2 h, glutathiona reduzida por 1 h e tratadas por 3 h nas concentrações de 148 μM e 300 μM , após o tratamento foi possível observar que o composto teve a sua ação inibida parcialmente pelo NAC na concentração de 300 μM e pela glutathiona reduzida na concentração de 148 μM (Figura 4).

Huang e colaboradores (2022) também verificaram que o terpeno artesunato teve sua atividade inibida na presença de N-acetil-L-cisteína (NAC). Além disso, Volk e colaboradores (2014), observaram que a glutathiona reduzida também foi capaz de diminuir a quantidade de espécies reativas de oxigênio na linhagem de queratinócitos humanos OKF6/TERT2, possibilitando a diminuição da morte celular por apoptose dessa linhagem.

Figura 4 - Ação do aromadendreno na presença dos inibidores de morte celular NAC e glutathiona reduzida. Células B16F10-Nex2 (5×10^3) foram cultivadas em placas de 96 poços, pré-incubadas com NAC e Glutathiona reduzida por 2 h e tratadas com o aromadendreno por 3 h. A viabilidade celular foi estabelecida pelo teste de exclusão de Trypan Blue. $p < 0,0001$. Teste One way ANOVA.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, foi possível observar neste trabalho que o aromadendreno embora não interfira no processo de migração celular, esse terpeno demonstrou efeito citotóxico para as células de melanoma murino (B16F10-Nex2). Além disso, o composto perdeu parcialmente o efeito na presença dos inibidores de espécies reativas de oxigênio N-acetil-L-cisteína (NAC) e glutathiona reduzida. Sendo assim, esses resultados podem indicar que o mecanismo do aromadendreno seja dependente das espécies reativas de oxigênio, para melhor elucidação dessa hipótese serão realizados os ensaios de DHE, para avaliar os níveis de ânion superóxido intracelular, TUNEL, para analisar a fragmentação do DNA e análise da permeabilização da membrana plasmática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORY G. Scratch-wound assay. *Methods Mol Biol.*2011.

GREY-SCHOPFER, V; WELLBROCK, C; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007.

GREY-SCHOPFER, V; WELLBROCK, C; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007.

HUANG, Z; GAN, S; ZHUANG, X; CHEN, Y; LU, L; WANG, Y; QI, X; FENG, Q; HUANG, Q; DU, B; ZHANG, R; & LIU, Z. Artesunate Inhibits the Cell Growth in Colorectal Cancer by Promoting ROS-Dependent Cell Senescence and Autophagy. *Cells*. 2022.

PAVITHRA, P.S; MEHTA, A; VERMA, R.S. Aromadendrene oxide 2, induces apoptosis in skin epidermoid cancer cells through ROS mediated mitochondrial pathway. *Life Sci*. 2018.

SAUTER, E.R. Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2020.

VOLK, J; LEYHAUSEN, G; WESSELS, M; & GEURTSSEN, W. Reduced glutathione prevents camphorquinone-induced apoptosis in human oral keratinocytes. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*. 2014.

WEI, G; WANG, Y; YANG, G; WANG, Y; JU, R. Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy. *Theranostics*. 2021.

YEHIA, EID, S.; EL-READI, M, Z; WINK, M. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine*. 2012.

ZUGAZAGOITIA, J; GUEDES, C; PONCE, S; FERRER, I; MOLINA-PINELO, S; PAZ-ARES, L. Current Challenges in Cancer Treatment. *Clin Ther*. 2016.