

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

Milena Souza Borges da Silva¹; Aline Scarlet Resende de Abreu²; Fernanda Fernandes Miranda da Cunha³; Denise Costa Arruda⁴

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

Área de conhecimento: **Biologia Celular**

Palavras-Chaves: 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 $C_{15}H_{10}O$, 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.

OBJETIVO

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

A atividade antitumoral do Nerolidol (uma mistura de cis- e trans-Nerolidol) foi testada em células de melanoma murino B16F10-Nex2, por 24 horas em diferentes concentrações, após 24 horas de tratamento as células foram desaderidas e contadas com corante de exclusão Trypan blue. Para o ensaio de migração as células B16F10-Nex2 foram cultivadas em placa de 12 poços e tratadas com 10 μ M e 15 μ M de Nerolidol (concentrações que não matam as células) durante 0, 2, 4 e 24 horas. Para avaliar se o Nerolidol induz hemólise

testaram-se as duas concentrações deste terpeno adicionando-se a elas uma suspensão de hemácias. Para determinar se o Nerolidol apresenta efeito antitumoral na presença dos inibidores de necroptose (necrostatina), espécies reativas de oxigênio (N-acetil L-cisteína), apoptose (Z-VAD) e autofagia (3-metiladenina), células B16F10-Nex2 foram pré-incubadas com tais inibidores e posteriormente tratadas com nerolidol. No modelo subcutâneo, camundongos foram tricotomizados na região dorsal e inoculados com células B16F10-Nex2 por via subcutânea, seguiu-se um tratamento por via tópica com creme Lanette contendo 8% de Nerolidol por 15 dias consecutivos. Para o ensaio de microscopia eletrônica, as células foram cultivadas em garrafa e tratadas com nerolidol por 24h, posteriormente foram fixadas com glutaraldeído, incluídas em resina e foram confeccionadas telas para leitura em microscópio eletrônico de transmissão. Para análise da degradação do DNA, células B16F10-Nex2 aderidas a lamínulas foram tratadas com nerolidol por 24h, posteriormente incubadas com os reagentes do kit “enzyme solution” e “label solução”, e depois com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (Invitrogen), as lamínulas foram aderidas às lâminas na presença de vectashield (Vector) e as células foram observadas em um microscópio de fluorescência. Para análise da condensação da cromatina, células aderidas a lamínulas foram tratadas com o nerolidol, e posteriormente incubadas com Hoechst 33342 (Invitrogen), as lamínulas foram aderidas às lâminas na presença de vectashield (Vector) e em seguida, as células foram observadas em um microscópio de fluorescência. Para determinação da presença de ânion superóxido e permeabilização da membrana as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, posteriormente foram tratadas com o nerolidol, após o tempo de incubação as células foram lavadas e incubadas com DHE (Dihidroetídio) e Iodeto de Propídio (PI) para determinação da presença de ânion superóxido e permeabilização da membrana respectivamente, e observadas em microscópio de fluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O Nerolidol possui efeito antitumoral dose dependente em células B16F10-Nex2, como é possível observar na figura 1, a viabilidade celular diminui conforme a concentração do composto aumenta.

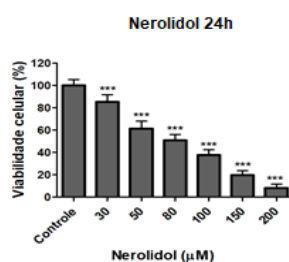


Figura 1: Determinação da viabilidade celular após tratamento com Nerolidol. Células B16F10-Nex2 (1×10^4 /poço, placas de 96 poços) foram incubadas com o nerolidol nas concentrações 30, 50, 80, 100, 150 e 200 μM por 24 horas a 37 °C, 5% CO_2 . A viabilidade celular foi determinada por contagem com o corante de exclusão Trypan Blue. Células não tratadas (controle) foram incubadas com 1% de etanol. O experimento foi realizado em triplicata. *** $p < 0,0001$.

O experimento de migração celular utilizando células tratadas com nerolidol demonstrou que quando comparados com o controle, os poços com tratamento não apresentaram diferenças significativas, sendo assim, não foi capaz de inibir a migração das células, indicando que nestas concentrações, a ação deste terpeno não interfere na inibição da motilidade celular. Analisar o potencial hemolítico do agente utilizado é importante para avaliar a toxicidade de moléculas capazes de danificar as células sanguíneas, dessa forma inviabilizando a utilização *in vivo*. De acordo com os resultados obtidos, não houve indução de hemólise após o tratamento com nerolidol, dessa forma, viabilizando experimentos *in vivo*. Como o nerolidol é considerado um potencializador de penetração na pele, capaz de aumentar a taxa de difusão de administrações transdérmicas de vários fármacos (CORNWELL & BARRY, 1994), viu-se a oportunidade de verificar a eficácia do nerolidol como um possível

tratamento de uso tópico para melanoma, considerando que este câncer se instala na pele, porém após a realização do ensaio *in vivo* no modelo subcutâneo de tratamento foi possível observar que o grupo de camundongos tratados com nerolidol em comparação ao grupo controle não apresentou uma diferença significativa, embora o tamanho da lesão tenha sido menor. Ao analisar a viabilidade celular na presença dos inibidores de apoptose (Z-VAD), ROS (NAC), necroptose (NEC) e autofagia (3-MA), e posterior tratamento com nerolidol, foi possível observar que a atividade do terpeno foi parcialmente inibida por todos os inibidores, sendo assim, ele está envolvido na ativação de caspase, RIP1 e o aumento de ROS, assim apresentando características de três mecanismos de morte celular, sendo eles: apoptose, autofagia e necroptose, dado que estudos apontaram que o nerolidol é capaz de induzir morte por necrose (BIAZI, *et al.*, 2017) ou apoptose (BIAZI, *et al.*, 2017; AMBROZ, *et al.*, 2015; TATMAN & MO, 2002;). Além disso, as células tratadas com Nerolidol também apresentaram resultados positivos para degradação do DNA, aumento de ânion superóxido (figura 2) e condensação da cromatina, indicando assim, outras características relacionadas a apoptose, mas não apresentando permeabilização da membrana conforme foi observado no ensaio de microscopia de fluorescência utilizando Iodeto de Propídio.

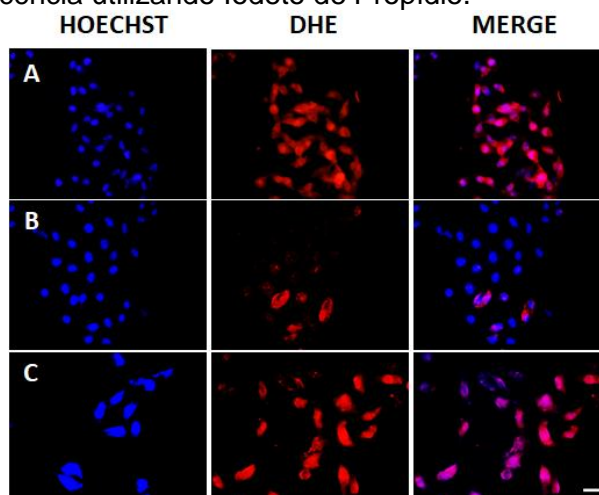


Figura 2: Determinação da presença de ânion superóxido em células B16F10-Nex2 tratadas com nerolidol. Células B16F10-Nex2 tratadas com: (A) Peróxido de Hidrogênio 5 mM por 1 hora (controle positivo) (B) 1% de Etanol Absoluto por 24 horas (controle), e; (C) 100 μ M de Nerolidol por 24 horas. Células foram incubadas com DHE e Hoescht e posteriormente analisadas por microscopia de fluorescência utilizando aumento de 40x vezes. Microscópio de Florescência Olympus IX-70. Barra 20 μ m. Merge: sobreposição das imagens.

A figura 3, demonstra os resultados da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), nas imagens, é possível observar a presença de vacúolos autofágicos, desintegração das organelas e estruturas citoplasmáticas, sinais ligados a autofagia, além de demonstrar mitocôndrias danificadas (fator ligado a elevação da produção de ROS), condensação da cromatina, características ligadas a morte celular por apoptose.

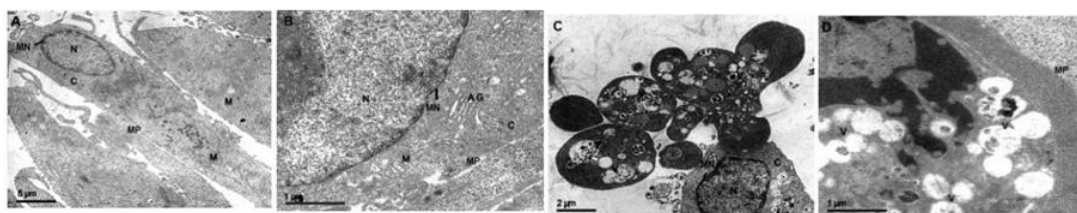


Figura 3: Análise morfológica por MET de células B16F10-Nex2 tratadas com nerolidol. Células B16F10-Nex2 tratadas com 150 μ M de nerolidol por 24h observadas em MET. (A, B) controle; (C, D) células tratadas; MN: membrana nuclear; N: núcleo; C: citoplasma; M: mitocôndria; AG: aparelho de Golgi; MP: membrana plasmática; V: vacúolos. Barra: (A) 5 μ m, (B) 2 μ m, (C, D) 1 μ m.

CONCLUSÃO

Os experimentos realizados até o momento apontam evidências voltadas para três diferentes mecanismos de morte celular, sendo eles apoptose, autofagia e necroptose, e sabe-se que um estímulo específico pode desencadear diferentes mecanismos de morte celular simultaneamente, podendo estes interagir uns com os outros. O aumento de ROS, condensação da cromatina, presença de vacúolos autofágicos, desintegração de organelas, ativação das caspases, são fatores importantes para a morte celular. Porém, outros testes serão realizados para a determinação da morte celular, tais como: análise da translocação da fosfatidilserina e determinação da atividade da caspase por método colorimétrico. Além disso, também será realizado ensaios *in vivo* em camundongos C57Bl/6 no modelo de metástase pulmonar e ensaios para avaliar a viabilidade de outras linhagens celulares a partir do tratamento com nerolidol, sendo essas tumorais e não tumorais.

REFERÊNCIAS

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.

CORNWELL, P. A.; BARRY, B. W.. Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil. **J Pharm Pharmacol**. v. 46, n.4, p. 261-269, 1994.

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. Springer Nature.

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

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.