

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): JOÃO LUCAS RODRIGUES DOS SANTOS, ALFREDO MAURICIO BATISTA DE PAULA, AMANDA RODRIGUES SANTOS, MAGDA MENDES VIEIRA, AMANDA SOUTO MACHADO, CAMILA SANTOS PEREIRA, RAQUEL JÚNIA DA CRUZ OLIVEIRA

Resveratrol e Sirtinol Diminuem a Viabilidade em Linhagem de Células de Melanoma Maligno Cutâneo sem Modificar a Expressão do mRNA de SIRT1

Introdução

No Brasil, o câncer mais frequente é o de pele, correspondendo a 25% de todos os tumores diagnosticados. Dentre todos os tumores de pele, a incidência de melanoma maligno cutâneo é de apenas 4%, no entanto, é um tipo de neoplasia altamente agressiva e com altas taxas de mortalidade (ZHANG *et al.*, 2012). Melanoma cutâneo forma-se a partir dos melanócitos que, por sua vez, migraram da crista neural para toda a epiderme durante a embriogênese (ERICKSON; REEDY, 1998). Estudos epidemiológicos apontam a presença de histórico familiar, exposição à radiação solar, presença de nevos congênitos e displásicos na pele como principais fatores de risco para a ocorrência de melanoma (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

A SIRT1 é uma histona desacetilase de classe III encontrada predominantemente no núcleo e está relacionada com estabilidade do genoma, longevidade, proliferação celular, respostas ao estresse, envelhecimento e metabolismo do câncer (OTA *et al.*, 2006). Várias substâncias têm sido estudadas com efeito de modular a expressão da SIRT1, como por exemplo, o resveratrol que é um polifenol muito estudado por apresentar propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. O resveratrol pertencente ao grupo dos flavonoides e pode ser encontrado nas uvas principalmente nas cascas, amendoins (RAJENDRAN *et al.*, 2011). O sirtinol é um inibidor da atividade das histonas desacetilases dependentes de NAD⁺, que inibe o crescimento de células cancerígenas e suprime a sinalização de partículas inflamatórias em células endoteliais (BAUR *et al.*, 2006). O presente estudo avaliou o efeito do resveratrol e sirtinol, ativador e inibidor de sirtuínas, respectivamente, sobre a viabilidade celular e a expressão do transcrito primário da SIRT1 em linhagens de melanoma cutâneo metastático murino (B16F10).

Materiais e Métodos

A. Aspectos éticos

Este estudo obteve parecer favorável para a realização de suas atividades através dos comitês de ética local (Comitê de ética em pesquisa - Unimontes: número de protocolo: 691.408/2014, e também no Comitê de Ética em Pesquisa - Faculdades Integradas Pitágoras: número de protocolo: 714.865/2014).

B. Estudos *in vitro*

As Linhagens celulares murinas de melanoma cutâneo metastático (B16F10) e de melanócito normal (Melan-A) foram tratadas com concentrações crescentes das drogas resveratrol (1,56-200 μ M dissolvidas em DMSO) e sirtinol (60-200 μ M dissolvidas em DMSO) durante 48 horas. Para a avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). A leitura do ensaio de MTT foi realizada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 570nm. Para o ensaio de fragmentação de DNA com iodeto de propídio, as células B16F10 e Melan-A foram tratadas com as concentrações de 5, 25 e 50 μ M de resveratrol e sirtinol (Valores abaixo do IC50 obtidos no ensaio de MTT). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo e os resultados analisados através do software FlowJo 7.6.5.

C. Expressão do transcrito primário da SIRT1

As células B16F10 e Melan-A foram tratadas com resveratrol e sirtinol nas concentrações de 5, 25 e 50 μ M por 48 horas. Após o tratamento, foi realizada a extração do RNA através do reagente trizol seguida da síntese de cDNA. A expressão do RNA mensageiro (mRNA) da SIRT1 e do endógeno β -actina foi determinada pela PCR em tempo real (qRT-PCR) através do método Sybergreen.

D. Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e submetidos a testes estatísticos específicos com nível de significância de $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$). Os resultados dos ensaios de MTT, fragmentação de DNA por iodeto de propídio e análise da expressão do mRNA da SIRT1 foram comparados entre os grupos através de análise de variância (ANOVA)

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

e teste de Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico SPSS ® (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), versão 18.0 para Windows ® e software Graph Pad Prism®5.0.

Resultados e Discussão

As sirtuínas apresentam diversos papéis importantes em muitos processos biológicos relacionados à sobrevivência celular. Moléculas com potencial de inibir ou estimular a expressão da SIRT1 podem ser utilizadas com potencial terapêutico devido à participação dessa enzima nos processos relacionados à regulação da longevidade celular e metabolismo (LU *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, as linhagens celulares, B16F10 (melanoma maligno cutâneo metastático) e Melan-A (melanócito murino normal) foram tratadas com resveratrol e sirtinol para avaliação da viabilidade celular (Fig. 1), fragmentação de DNA (Fig. 2) e expressão de SIRT1 (Fig.3). O tratamento das células com resveratrol e sirtinol significativamente afetou a viabilidade celular ($p < 0.05$) e promoveu a fragmentação do DNA nas células B16F10 e Melan-A ($p < 0.05$). Resveratrol diminuiu a viabilidade celular através da indução da parada do ciclo celular e inibição da proliferação celular. A inibição da expressão de SIRT1 pelo sirtinol pode resultar na acetilação da proteína p53, levando em parada do ciclo celular e diminuição da viabilidade das células tumorais (WU *et al.*, 2015). No entanto, o tratamento com resveratrol e sirtinol nas concentrações estudadas não alterou a expressão do transcrito primário da SIRT1.

Conclusão

Os resultados do presente estudo revelam que o uso dessas drogas pode representar uma promissora estratégia quimioterápica no combate ao melanoma, mesmo não ocorrendo alterações no transcrito primário da SIRT1.

Agradecimentos

O estudo foi apoiado por doações da Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo em Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Referências bibliográficas

- BAUR, J. A. *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337-42, Nov 16 2006. ISSN 1476-4687
- ERICKSON, C. A.; REEDY, M. V. Neural crest development: the interplay between morphogenesis and cell differentiation. **Curr Top Dev Biol**, v. 40, p. 177-209, 1998. ISSN 0070-2153
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-7, Feb 22 2007. ISSN 1476-4687
- LU, J. *et al.* SIRT1 counteracted the activation of STAT3 and NF-kappaB to repress the gastric cancer growth. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 12, p. 5050-8, 2014. ISSN 1940-5901
- OTA, H. *et al.* Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. **Oncogene**, v. 25, n. 2, p. 176-85, Jan 12 2006. ISSN 0950-9232
- RAJENDRAN, R. *et al.* Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 368276, 2011. ISSN 1110-7251
- WU, Z. *et al.* Resveratrol inhibits the proliferation of human melanoma cells by inducing G1/S cell cycle arrest and apoptosis. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 1, p. 400-4, Jan 2015. ISSN 1791-3004
- ZHANG, M. *et al.* Use of tanning beds and incidence of skin cancer. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 14, p. 1588-93, May 10 2012. ISSN 1527-7755

[Digite aqui]

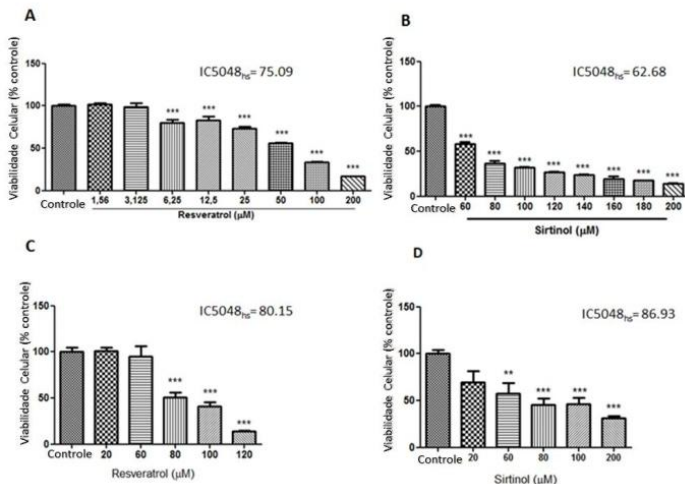


Figura 1. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT. As células B16F10 foram tratadas com resveratrol (Fig. 1A) e Sirtinol (Fig. 1B) com várias concentrações diferentes durante 48 h. As células Melan-A foram tratadas com resveratrol (Fig. 1C) e Sirtinol (Fig. 1D) em várias concentrações diferentes durante 48 h. As células viáveis foram detectadas por ensaio de MTT e a viabilidade foi determinada como a razão entre células tratadas e controles não tratados. Os dados são representados como médias a partir de três experimentos independentes.

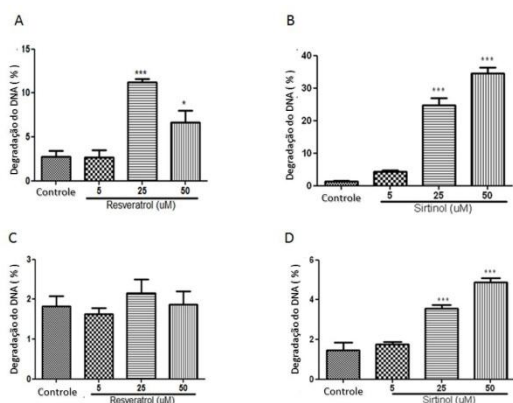


Figura 2. Efeito do resveratrol e do sirtinol sobre a fragmentação do DNA das células. As células B16F10 foram tratadas com concentrações crescentes de resveratrol (A) e sirtinol (B) durante 48 h. As células Melan-A foram tratadas com concentrações crescentes de resveratrol (C) e sirtinol (D) durante 48 h, respectivamente. As células foram fixadas, coradas e analisadas quanto ao teor de DNA. Os dados são apresentados como as médias \pm Desvio Padrão. * $P < 0,005$ e *** $P < 0,001$ entre células do grupo controle e grupo tratado.

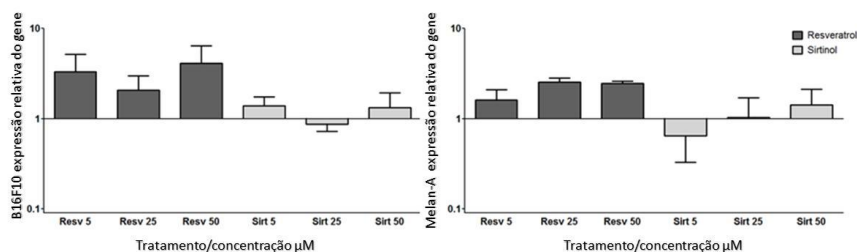


Figure 3. Análise da expressão do RNA mensageiro da SIRT1 nas células B16F10 e Melan-A através da técnica do qPCR.

[Digite aqui]