

ACÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE A ATIVIDADE E EXPRESSÃO DA CD73 EM CÉLULAS SK-MEL-28

CAROLINA BRUNA LOPES OLIVATTO¹, VITÓRIA CAPELLI DE MELO², LETÍCIA DE SOUZA MATIAS³, KAYLA ILANA DE OLIVEIRA⁴, MARIA LUIZA BERGAMINI⁵, ANA CAROLINA SCHEID DEMORI⁶, MAISA MARCOLIN⁷, DAIANE MANICA⁸, GILNEI BRUNO DA SILVA⁹, MARGARETE DULCE BAGATINI¹⁰

Introdução

O Melanoma Cutâneo (MC) é classificado como a neoplasia maligna de pele mais agressiva. Este tipo, advém de células melanocíticas que sofrem diversas mutações, sendo a causa principal a exposição à radiação UVA e UVB (radiações ultravioletas) da luz solar. (LONG, 2023) Além da exposição à luz solar, este câncer pode ser herdado e possuir traço autossômico dominante, no entanto, a incidência é muito menor. Desse modo, o que se sabe é que, independente da origem ser familiar ou por fatores ambientais, como raios solares e bronzeamento artificial, as mutações que geram o melanoma são originadas, principalmente, nos genes que regulam a progressão do ciclo celular e a telomerase. (ROBBINS, 2014)

O sistema purinérgico está emergindo como uma promissora ferramenta terapêutica no combate ao câncer, devido ao seu papel fundamental na regulação do microambiente tumoral e da resposta imunológica. Dentro desse sistema, o CD73 desempenha um papel único, regulando a produção de adenosina imunossupressora. Esta enzima é crucial na via de sinalização purinérgica, catalisando a conversão de AMP em adenosina, uma molécula com várias funções imunossupressoras (Allard, 2019)

Mesmo com novas possibilidades terapêuticas, há uma discrepância entre o aprimoramento das terapias anticâncer e o manejo adequado dos efeitos colaterais e da toxicidade associados ao tratamento. Por isso, destaca-se a imprescindibilidade do desenvolvimento de terapias adjuvantes, o que tem sido facilitado pelo constante avanço da ciência e do aprimoramento tecnológico. Nesse contexto, compostos fenólicos, como o ácido

¹ Acadêmica do curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó - SC, carolina.olivatto@estudante.uffs.edu.br

² Acadêmica do curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó - SC, vitoriacapelli@hotmail.com

³ Acadêmica do curso de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó - SC, leticiadesouzamatias@gmail.com

⁴ Acadêmica do curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó - SC, kayla.oliveira@estudante.uffs.edu.br

⁵ Acadêmica do curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó - SC, maria.bergamini@estudante.uffs.edu.br

⁶ Acadêmica do curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó - SC, ana.demori@estudante.uffs.edu.br

⁷ Acadêmica do curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó - SC, maisa.marcolin@uffs.edu.br

⁸ Mestre em Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC

⁹ Mestre em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó - SC

¹⁰ Doutora em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó - SC.

rosmarínico (AR), possuem efeitos sinérgicos promissores quando combinados de forma adjuvante a medicamentos antineoplásicos de primeira linha, superando a resistência em células cancerígenas por meio da interação com vias de sinalização críticas (Villegas, 2024). Esse ácido fenólico é facilmente encontrado em plantas das famílias Boraginaceae e Lamiaceae, como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (Nunes, 2017). O efeito anticancerígeno do AR já foi demonstrado em algumas pesquisas em carcinoma de cólon (Karthikkumar, 2015), câncer de mama (Messeha, 2020) e câncer de próstata (Jangi, 2018). Embora os trabalhos demonstrem os efeitos do AR no âmbito do câncer e do MC, os efeitos do AR em humanos ainda são pouco compreendidos.

Objetivos

O objetivo geral deste manuscrito foi a análise da ação do AR sobre a atividade e expressão da enzima CD73 em células de MC (SK-Mel-28), por meio dos parâmetros oxidativos e da sinalização purinérgica.

Metodologia

Para compreender a ação do AR sobre a atividade e expressão da enzima CD79 adquiriu-se a linhagem celular de melanoma metastático humano SK-MEL-28 do Banco de Células do Rio de Janeiro (CBRJ), Brasil. As células foram cultivadas em frascos com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com glicose (4.500mg/L), L-glutamina, contendo antibióticos/antifúngicos (1% penicilina/estreptomicina) e suplementado com 10% de soro bovino fetal. Ademais, as células permaneceram em um ambiente com umidificação, temperatura e oxigenação adequadas. Os experimentos foram realizados em concentrações de 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M e 800 μ M com AR dissolvido no meio de cultura durante 24h. Passado o tempo, o sobrenadante foi coletado bem como as células tumorais para a avaliação da viabilidade celular e potencial citotóxico. Por fim, verificou-se a expressão gênica e proteica e a atividade enzimática da enzima CD73. As avaliações estatísticas foram realizadas por análise de variância seguida pelo teste *post hoc* apropriado usando o software GraphPad Prism 9.0. As diferenças entre as células não tratadas (CT) e tratadas foram avaliadas pelo teste t de Student não pareado ou pela análise de variância ANOVA unidirecional seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças na probabilidade de rejeição da hipótese nula em $< 5\%$ ($P < 0,05$) foram consideradas

estatisticamente significativas. A significância estatística foi definida para valores de p de * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$.

Resultados e Discussão

Nesta pesquisa, descobriu-se que o AR diminuiu significativamente a expressão gênica da ectoenzima CD73 em uma concentração de 800 μM ($P = 0,0003$). Altas taxas de expressão da CD73 foram relatadas em pacientes em grau avançado de melanoma (Monteiro, 2018). Dessa forma, os resultados relacionados à expressão da ectonucleotidase, CD73, encontrados neste estudo sugerem uma possível aplicação terapêutica do AR na modulação purinérgica no MC.

Além disso, foi verificada a expressão protéica dessas ectoenzimas nas células tratadas com AR. Da mesma forma, na concentração de 800 μM , houve uma redução significativa na expressão de CD73 ($P < 0,0001$). É sabido que a enzima CD73 é responsável pela conversão do AMP em adenosina (Ado), exercendo um importante controle na resposta imune contra tumores (Beavis, 2012). Em modelos animais, a inibição da CD73 foi associada a um efeito positivo na imunidade antitumoral e à redução do tamanho do tumor (Forte, 2012). Portanto, a redução na expressão gênica e proteica da CD73 induzida pelo AR destaca seu potencial terapêutico no controle da resposta imune em MC. Alterações na atividade enzimática das ectonucleotidases foram destacadas em estudos prévios envolvendo pacientes com outros tipos de neoplasias (Zanini, 2012).

Conclusão

Portanto, a partir dos resultados da pesquisa, conclui-se que o AR é citotóxico para células tumorais, mas não afeta células não tumorais. Além de ser um bom inibidor da migração celular envolvida na metástase e um potente antioxidante. Ademais, o componente químico participa da sinalização purinérgica ao modular a expressão e atividade de ectonucleotidases como CD73.

Referências Bibliográficas

Allard, D., Chrobak, P., Allard, B., Messaoudi, N., & Stagg, J. (2019). Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. *Immunology Letters*, 205, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.05.001>.

BEAVIS P. A., et al. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*, v. 33, n. 5, p. 231-23, 2012.

FORTE, G. et al. Inhibition of CD73 Improves B Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity in a Mouse Model of Melanoma. *The Journal of Immunology*, v. 189, n. 5, p. 2226– 2233, set. 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200744>.

JANG, Y. G.; HWANG, K. A.; CHOI, K. C. Rosmarinic Acid, a Component of Rosemary Tea, Induced the Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Modulation of HDAC2 Expression in Prostate Cancer Cell Lines. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1784, nov. 2018. DOI 10.3390/nu10111784. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30453545/>. Acesso em: 29 jul. 2024.

KARTHIKKUMAR, V. et al. Rosmarinic acid inhibits DMH-induced cell proliferation in experimental rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, v. 26, n. 2, p. 185–200, 1 mar. 2015. DOI 10.1515/jbcpp-2014-0044. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25210763/>. Acesso em: 28 jul. 2024.

LONG, G. V.; SWETTER, S. M.; MENZIES, A. M.; GERSHENWALD, J. E.; SCOLYER, R. A. Cutaneous melanoma. *The Lancet*, v. 402, n. 10400, p. 485–502, 5 ago. 2023. DOI 10.1016/S0140-6736(23)00821-8. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(23\)00821-8/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(23)00821-8/abstract). Acesso em: 1 ago. 2024.

MESSEHA, S. S. et al. Rosmarinic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 885, p. 173419, 15 out. 2020. DOI 10.1016/j.ejphar.2020.173419. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32750370/>. Acesso em: 29 jul. 2024.

MONTEIRO I. et al. CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. *Oncotarget*, v. 9, n. 42, p. 26659–26669, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25426>.

NUNES, S. et al. Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid - Cytoprotective properties and pharmacokinetic profile. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 57, n. 9, p. 1799–1806, 13 jun. 2017. DOI 10.1080/10408398.2015.1006768. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26114303/>. Acesso em: 29 jul. 2024.

ROBBINS. *Fundamentos de patologia*. 8. ed. Petropolis: Robbins, 2014.

ZANINI, D. et al., 2012. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 66, n. 1, p. 40-45, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2011.09.003>

Palavras-chave: Melanoma Cutâneo; Ácido Rosmarínico; Ectonucleotidase; CD73

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2023-0400

XIV EDIÇÃO

JIC JORNADA DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA
E TECNOLÓGICA

14 a 16 de
outubro

EVENTO ON-LINE

UNIVERSIDADE
FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL

Financiamento: CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Título do projeto no PRISMA: Ação do ácido rosmarínico sobre a atividade e expressão da CD39 e CD73 em células SK-Mel-28