

# SIMPÓS

II Simpósio de Pós-Graduação do Sul do Brasil

BICENTENÁRIO DA INDEPENDÊNCIA: 200 ANOS DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO NO BRASIL

## O ÁCIDO ROSMARÍNICO REDUZ A MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HUMANAS DE MELANOMA CUTÂNEO METASTÁTICO

**Gilnei Bruno da Silva**

*Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas - UFFS  
gilneibrunosilva@hotmail.com*

**Daiane Manica**

*Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas - UFFS  
daianemanica2011@gmail.com*

**Marcelo Moreno**

*Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas - UFFS  
Marcelo.moreno@uffs.edu.br*

**Margarete Dulce Bagatini**

*Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas - UFFS  
margaretebagatini@gmail.com*

**Eixo 04: Ciências da Saúde**

**Resumo:** os casos de melanoma cutâneo têm aumentado nas últimas décadas e a procura por novos tratamentos tem ganhado destaque na literatura. O ácido rosmarínico tem sido apontado como um composto promissor no tratamento do melanoma. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do ácido rosmarínico na migração e proliferação de células humanas de melanoma cutâneo metastático. As células SK-MEL-28 foram tratadas com diferentes concentrações do ácido rosmarínico durante 12 horas. Após, foram realizadas as técnicas de migração e fluorescência. O ácido rosmarínico reduziu a migração e proliferação das células de melanoma metastático.

**Palavras-chave:** Câncer de pele. Ácido rosmarínico. Efeito antitumoral.

## 1 Introdução

Os casos de câncer têm aumentado nas últimas décadas e o câncer de pele é um dos tipos de neoplasias que tem ganhado destaque. Especificamente, o melanoma cutâneo (MC) foi responsável por mais de 325.000 casos e 57.000 mortes no mundo em 2020. Estima-se que essas taxas para 2040 aumentarão para 510.000 casos e 96.000 mortes (ARNOLD et al., 2022; IARC, 2021). No Brasil, o sul do país é a região geográfica com maior incidência de casos dessa neoplasia maligna (INCA, 2021).

Mesmo com os avanços científico-tecnológicos e com os resultados promissores encontrados com diversas drogas antineoplásicas, dentre elas os inibidores de *checkpoints* e anticorpos monoclonais, as taxas de resposta completa e duradouras no tratamento do MC não ultrapassam 30%. Além disso, diversos efeitos colaterais influenciam negativamente na qualidade de vida dos pacientes acometidos (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Muitos ensaios experimentais e clínicos, que testam moléculas com efeito sobre o MC metastático, visam amenizar os efeitos colaterais e garantir eficácia na terapêutica. Estudos têm indicado que o ácido rosmarínico (AR) tem potenciais efeitos antiproliferativo, anticancerígeno e antitumoral (SILVA et al., 2022; [ANWAR et al.](#), 2020). Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do AR na migração e proliferação de células humanas de melanoma cutâneo metastático.

## 2 Desenvolvimento

### 2.1 Referencial Teórico

O MC é um tipo de câncer que acomete a epiderme, caracterizando-se como um distúrbio citológico dos melanócitos, produtores de melanina, aumentando a capacidade proliferativa dessas células. Dessa forma, o MC é uma oncopatologia caracterizada pela alta invasividade das células tumorais e capacidade metastática, ocasionando um curto período de sobrevida, bem como altas taxas de mortalidade (PADDOCK et al., 2016; SCHADENDORF et al., 2015).

O principal fator de risco para o desenvolvimento do melanoma é a exposição à radiação ultravioleta (UV), presente na luz solar. Assim, a cor da pele é um fator de risco importante na fisiopatologia do melanoma, pois, em peles e cabelos escuros, a melanina

exerce efeito protetor, reduzindo os danos induzidos pelo UV. Portanto, indivíduos com pele clara, sardas e cabelos ruivos são mais predispostos ao melanoma em aproximadamente 50% (SAMPLE et al., 2018; RASTRELLI et al., 2014).

Os estágios iniciais do melanoma podem ser tratados cirurgicamente por ressecção de tecido. Apesar disso, em estágios avançados essa patologia costuma ter alto índice de resistência terapêutica. Mesmo com os avanços científico-tecnológicos, a taxa de sobrevivência dos pacientes com melanoma metastático ainda é muito baixa (CZARNECKA et al., 2020). Na busca por novas alternativas e terapias adjuvantes, o AR, proveniente de plantas herbáceas como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e sálvia (*Salvia officinalis*), tem sido apontado como promissor no tratamento de cânceres (ANWAR et al., 2020; LUO et al., 2020).

## 2.2 Metodologia

As células SK-MEL-28 foram cultivadas em garrafas com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM – glicose e L-glutamina), contendo antibiótico e antifúngico (penicilina/estreptomicina), suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas sob condições mínimas necessárias. As células foram tratadas com as concentrações de 50, 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$  de AR dissolvido em DMEM e expostas durante 12 horas. O grupo controle recebeu apenas o meio de cultura.

Para o ensaio de migração, as células SK-MEL-28 foram semeadas em uma densidade de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/poço, em placas de 6 poços, até formarem uma monocamada. Após, foi feita uma ferida com uma microponteira estéril de 200  $\mu\text{l}$  (JUSTUS et al., 2014). Com auxílio de um microscópio invertido (Nikon® Eclipse Ts2-FL), na magnificação de 4X, foi realizada a captura de uma imagem inicial (tempo 0h). Em seguida, as células foram tratadas com AR por 12 horas. Após o tempo de tratamento, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com solução fisiológica e uma nova imagem foi capturada (tempo 12h). Para realização das análises estatísticas, cinco pontos distintos na ferida foram medidos com auxílio do software ImageJ.

Para os ensaios de fluorescência, as células foram semeadas em uma densidade de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/poço, em placas de 96 poços, e tratadas com as concentrações no tempo de exposição previamente descrito. As leituras foram feitas em microscópio de fluorescência (Nikon® Eclipse Ts2-FL) com magnificação de 10X.

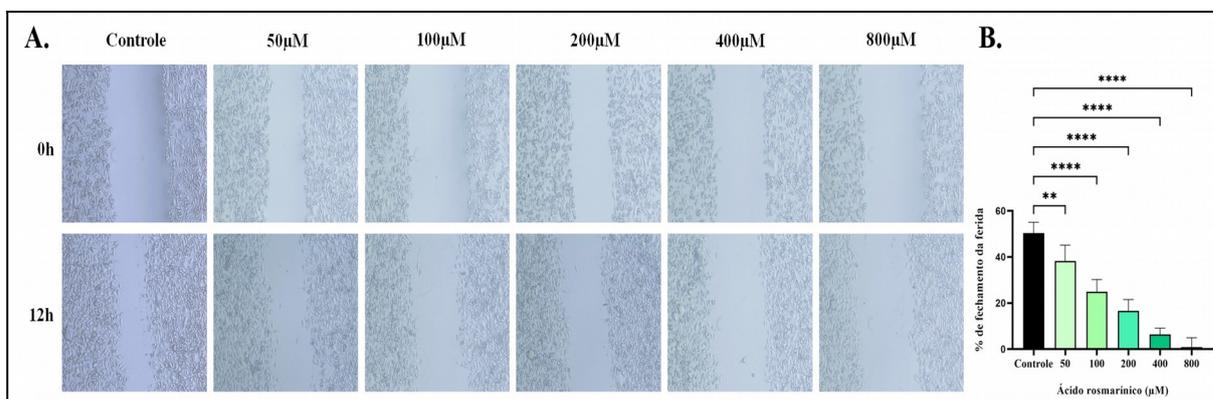
O corante laranja de acridina (LA) é uma molécula que interage com ácidos nucleicos de fita dupla (ds) e fita simples (ss). Quando o LA se intercala no DNA, ele emite fluorescência verde após excitação em uma faixa de 480-490nm. Assim, após exposição, as células foram lavadas duas vezes com solução fisiológica, coradas com LA (1µg/ml) e lidas imediatamente (MCGAHON et al., 1995).

Além disso, foi utilizado o corante tetrametilrodamina etil ester perclorato (TMRE) para a visualização de mitocôndrias viáveis. O TMRE é um corante catiônico que se acumula em mitocôndrias ativas e emite a cor vermelha quando excitado em 550nm. Decorrido o tempo do tratamento, as células foram lavadas duas vezes com solução fisiológica e incubadas por 30 minutos com 100µl de uma solução contendo TMRE (20nM) (JOSHI; BAKOWSKA, 2011).

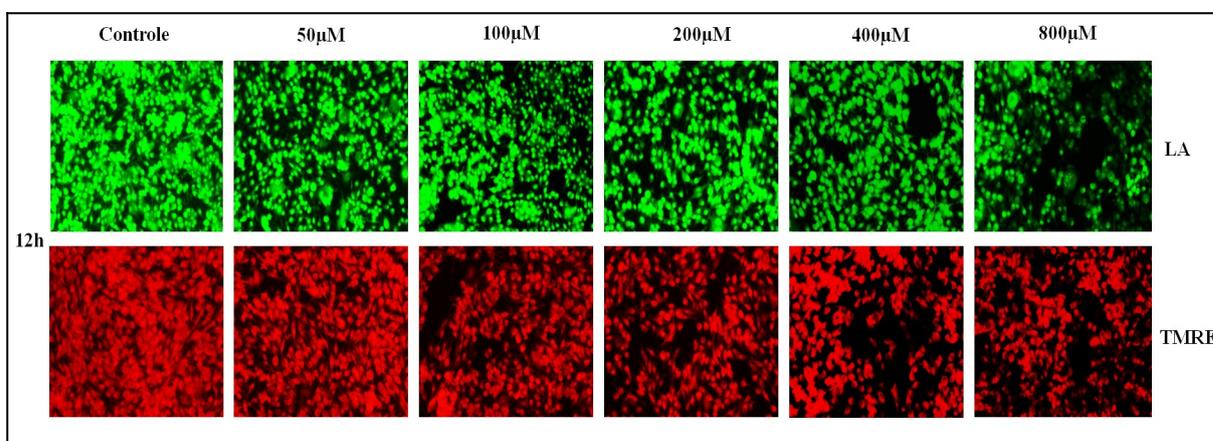
Todas as imagens foram ajustadas para brilho e contraste de forma linear pelo software Paint 3D. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism 9. Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas através da análise ANOVA *one-way*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores com  $p < 0.05$  (<5%). A significância estatística foi definida para os valores de  $p$ : \*( $p < 0.05$ ); \*\*( $p < 0.01$ ); \*\*\*( $p < 0.001$ ); \*\*\*\*( $p < 0.0001$ ). As diferenças significativas indicadas foram em relação ao grupo controle.

### 2.3 Resultados

A Figura 1 (A-B) representa a migração das células SK-MEL-28 após 12 horas de tratamento com o AR. Verificou-se visualmente uma progressiva diminuição no fechamento da ferida conforme o aumento das concentrações de AR (Figura 1A). Estatisticamente, todas as concentrações reduziram a porcentagem de fechamento de ferida em relação ao controle, sendo que, 100µM, 200µM, 400µM e 800µM de AR tiveram efeitos superiores ( $p < 0.001$ ) a concentração de 50 µM ( $p < 0.01$ ) (Figura 1B). Estão presentes na Figura 2 as microscopias de fluorescência representativas. Nota-se que a intensidade de fluorescência das imagens, comparada aos controles, é expressivamente menor com o aumento das concentrações de AR, revelando uma redução na marcação dos núcleos (LA) e das mitocôndrias (TMRE) celulares.



**Figura 1 – Ensaio de migração celular.** A. Após a realização da ferida na monocamada celular, foram feitas fotografias com auxílio de um microscópio óptico invertido (tempo 0h). Na sequência, as células foram tratadas com diferentes concentrações de ácido rosmarínico (AR) por 12h. Decorrido o tempo de exposição, as células foram novamente fotografadas nas mesmas condições iniciais (tempo 12h). Magnificação=4X. B. Todas as concentrações de AR reduziram significativamente a porcentagem de fechamento da ferida em relação ao controle.



**Figura 2 – Microscopias de fluorescência representativas de células SK-MEL-28 coradas com LA (núcleos em verde) e TMRE (mitocôndrias em vermelho).** Conforme as concentrações de AR aumentam, nota-se uma significativa redução da intensidade de fluorescências. Magnificação=10X.

### 3 Conclusão

A partir dos achados obtidos, fica evidenciado neste estudo que o AR reduz a migração e proliferação de células humanas de melanoma metastático após 12 horas de tratamento.

### Referências

ANWAR, S. et al. Rosmarinic Acid Exhibits Anticancer Effects via MARK4 Inhibition. **Scientific Reports**, v.10, n.1, p.10300, dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65648-z>.

ARNOLD M.; et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. **JAMA Dermatol**, v. 158, n.5, p.495–503, 2022. doi:10.1001/jamadermatol.2022.0160

CZARNECKA, A. M. et al. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4576, 27 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21134576>.

IARC - International Agency of Research in Cancer (2020). **CANCER TODAY**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em agosto de 2022.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (Brazil). **Cancer of skin melanoma**. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em agosto de 2022.

JOSHI, D. C., BAKOWSKA, J. C. Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. **J. Vis. Exp**, v.51, e2704, 2011. <http://doi.org/10.3791/2704>

JUSTUS, C. R.; et al. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. **JoVE**, v.1, n.88, p.51046 jun. 2014.

LUO, Y. A. et al. Anticancer effects of rosmarinic acid in human oral cancer cells is mediated via endoplasmic reticulum stress, apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inhibition of cell migration. **JBUON.**, v. 25, n. 2, p. 1245-1250, 2020. PMID: 32521932.

PADDOCK, L. E. et al. Skin self-examination and long-term melanoma survival. **Melanoma Research**, v. 26, n. 4, p. 401–408, ago. 2016. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000255>.

RASTRELLI, M. et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 28, n. 6, p. 1005–1011, dec. 2014.

SAMPLE, A.; HE, Y.Y. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 34, n. 1, p. 13–24, jan. 2018. <https://doi.org/10.1111/phpp.12329>.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, set. 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9).

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n.1, p. 11–30, jan. 2013. <https://doi.org/10.3322/caac.21166>.

SILVA, G. B. da; et al. Novel possibility for cutaneous melanoma treatment by means of rosmarinic acid action on purinergic signaling. **Purinergic Signalling**, v.18, p.61–81, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09821-7>