

Potencial quimioterápico do Mirtenal e de sua atividade inibitória
sobre a V-ATPase na contenção do processo de Metástase em
Melanoma Murino

RAUL FERRAZ ARRUDA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO- UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ
MARÇO-2015

Potencial quimioterápico do Mirtenal e de sua atividade inibitória
sobre a V-ATPase na contenção do processo de Metástase em
Melanoma Murino

RAUL FERRAZ ARRUDA

“Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia e Biociências.”

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ
MARÇO-2015

“Dedico esta dissertação aos meus pais, sem os quais eu não teria condições de alcançar a realização deste feito”.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar à Deus, que me abençoou , capacitou e deu forças para que eu chegasse até o final e para que nunca desistisse mesmo com todos os obstáculos que se colocaram na minha frente.

Ao professor Dr. Arnaldo Rocha Façanha, meu orientador, por todos ensinamentos, apoio, força, palavras de ânimo ao longo de todo percurso e pela oportunidade de trabalhar com uma excelente linha de pesquisa e em um ótimo grupo de pesquisa.

A minha família, meus pais Sebastião Luiz e Anna Maria, os quais sem o apoio, incentivos e amor não seria possível essa realização; meu irmão Hiago, meus avós e tios pelo apoio .

Aos amigos do grupo de pesquisa: Luiz Alfredo, Janaína, Janiélío, Antônio, Gildeíde, Amanda, Sávio, Fred, Camila, Lívia, Juliana Couto, pela amizade e ensinamentos construídos durante o Mestrado. A Brunna Xavier por toda ajuda experimental, ensinamentos, conselhos e amizade, aos alunos de IC , Enrico e Ingrid Siqueira pela amizade e ajuda experimental; a Ingrid Errera por toda ajuda experimental a este trabalho.

Ao professor Carlos Eulógio pela ajuda, ensinamentos e colaboração principalmente nas Histologias, a professora Fernanda Antunes pela amizade e colaboração. A professora Nadir pela amizade e conselhos, a professora Fernanda Antunes colaboradora desse trabalho.

Aos professores Rodrigo e Franz por ter aceitado o convite para a banca.

A FAPERJ/UENF pela bolsa de demanda social.

A todos que direta e indiretamente participaram desse trabalho.

Resumo

Um papel crucial exercido por sistemas que controlam o pH extracelular tem emergido de estudos seminais que têm revelado relações diretas entre mudanças de acidificação/alcalinização do microambiente tecidual com o desenvolvimento de várias patologias, inclusive do câncer. Há mais de 50 anos Warburg já relatava que o microambiente tumoral seria mais ácido do que o de tecidos normais, devido ao aumento do fluxo glicolítico com geração de ácido láctico. Esse microambiente tumoral, têm sido relatada como integrante de processos de quimoresistência, malignidade, invasão e proliferação. As V-ATPases presentes nas vesículas e na membrana plasmática das células tumorais, possuem potencial para exercer um controle fino da acidificação e alcalinização, de microdomínios do meio externo e do citoplasma, respectivamente.. O Mirtenal é um monoterpeneo cíclico derivado de óleos essenciais de plantas, o qual nosso grupo demonstrou ser, *in vitro*, ser um potente inibidor de bomba de H⁺; este trabalho então investigou os efeitos antineoplásicos , *in vivo* , do mirtenal. O mirtenal se mostrou eficaz contra metástases induzidas no pulmão e nos linfonodos, numa análise macroscópica observou-se a diminuição do numero de micronódulos metastáticos nos pulmões quando tratados com mirtenal; nos linfonodos observou-se uma diminuição no tamanho da metástase ; por histologia , observou-se que quando tratados, só houve uma pequena invasão dos tecidos deixando os órgãos em seu lúmen intactos. Camundongos com metástases induzidas quando não tratadas perderam 20% de seu peso total. Na busca por novas drogas com efeitos antineoplásicos , os resultados sugerem que o mirtenal possui capacidade de atenuar o processo de metástase em camundongos com metástase induzida por células de melanoma murino B16F10.

Palavras Chaves: acidificação, câncer , mirtenal.

Abstract

A crucial role played by systems that control the extracellular pH has emerged. Seminal studies have shown a direct relationship between changes in acidification / alkalisation of the tissue microenvironment in the development of many diseases, including cancer. For over 50 years Warburg already reported that tumor microenvironment is more acidic than normal tissues due to increased glycolytic flux generating lactic acid. This tumor microenvironment, have been reported as part of quimoresistência processes, malignancy, invasion and proliferation. The V-ATPase present in the vesicles and the plasma membrane of tumor cells have the potential to exert fine control of acidification and alkalization, microdomains of the external environment and the cytoplasm, respectively .. The Mirtenal is a cyclic monoterpene derived from essential oils of plants, which is our group demonstrated in vitro to be a potent inhibitor of H⁺ pump; this work then investigated the anticancer activity in vivo, the mirtenal. The mirtenal was effective against metastases induced in the lung and lymph nodes, a macroscopic observed to decrease the number of micro-nodules metastatic lung when treated with mirtenal; lymph nodes was observed a decrease in the size of metastasis; by histology, it was observed that when treated, there was only a small tissue invasion leaving the organs in your intact lumen. Guinea with induced metastasis when untreated lost 20% of its total weight. In the search for new anticancer drugs effects, the results suggest that mirtenal has the capacity to attenuate the process of metastasis in mice induced by metastatic murine melanoma B16F10 cells.

Keywords: acidification, cancer, mirtenal

Lista de Figuras

Figura 1: Glicoproteína P	4
Figura 2: Proteínas envolvidas na regulação do PH.....	6
Figura 3: Modelo Esquemático da F-ATPase.....	8
Figura 4: Estrutura da V – ATPase	9
Figura 5: Mecanismo rotacional de translocação de prótons da V-ATPase.....	10
Figura 6: Representação estrutural do mirtenal.....	12
Figura 7: Esquema ilustrando os modelos de indução de metástase.....	16
Figura 8: Toxicidade do mirtenal: DI 50.....	20
Figura 9: Toxicidade do Mirtenal, enzimas renais.....	21
Figura 10: Toxicidade do Mirtenal, enzimas Hepáticas.....	22
Figura 11: Toxicidade do mirtenal, Histologia	23
Figura 12: Fotos macroscópicas dos pulmões.....	25
Figura 13: Análise Histológica dos Pulmões.....	27
Figura 14: Análise Histológica dos Pulmões.....	28
Figura 15: Gráfico da variação de peso de camundongos com metástase pulmonar.....	29

Figura 16: Fotos macroscópicas dos linfonodos.....	30
Figura17:Análise Histológica dos Linfonodos.....	32
Figura18:Gráfico mostrando a variação do peso metástase nos linfonodos.....	33
Figura19: Gráficos da Atividade da V-ATPase.....	34

Abreviaturas

AEs – trocadores de ânions

ALT - alanina transaminase

AST – aspartato transaminase

ATP - adenosina tri fosfato

CAs – anidrases carbônicas

CTL - Controle

DMEM - meio Eagle modificado

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

GLUT1;BT – transportador de glicose

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MDR - Resistência a múltiplas drogas

NBCs - co-transportadores $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$

NHEs – trocadores Na^+/H^+

PMF – força próton motora

Pgp- glicoproteína P

PH - Potencial Hidrogeniônico

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil

RGP - Fase de Crescimento Radial

RPM – rotações por minuto

TCM - transportadores de monocarboxilatos

TRIS - abreviação do composto orgânico (hidroximetil)aminometano

U373 MG – células de Glioma malignas

VGP – Fase de Crescimento Vertical

WHO – Organização Mundial de Saúde

1. Sumário

1.	Sumário	0
1.	Introdução	12
1.1.	Câncer	12
1.1.1.	Melanoma	13
1.2.	Quimiorresistência tumoral	14
1.3.	Glicose, Acidificação e Progressão Tumoral	15
1.4.	Estrutura e funcionamento da F-ATPase	18
1.5.	Estrutura e Funcionamento da V-ATPase	19
1.6.	Óleos Essenciais	22
2.	Justificativa	24
3.	Objetivo Geral	25
3.1.	Objetivos Específicos	25
4.	Material e Métodos	26
4.1.	Terpenos	26
4.2.	Cultura de Células	26
4.3.	Indução de Metástase	26
4.4.	Controle do peso corporal	27
4.5.	Parâmetros bioquímicos do plasma	28
4.6.	Sacrifício e análise histológica	28
4.7.	Purificações das membranas	28
4.8.	Dosagens de Proteína	29
4.9.	Atividade Hidrolítica da V-ATPase	30
4.10.	Análise Estatística	30
5.	Resultados	31
5.1.	Dose Letal (DL ₅₀)	31
5.2.	Toxicidade do Mirtenal	32
5.2.1.	Metabólitos Renais	32
5.2.2.	Enzimas Hepáticas	32
5.2.3.	Histologia	33
5.3.	Indução da metástase pulmonar	35
5.3.1.	Análise Histológica	37
5.3.2.	Controle de peso dos animais	40
5.4.	Indução de Metástase nos Linfonodos	41

5.4.1.	Análise Histológica	42
5.4.2.	Controle de Peso	44
5.4.3.	Atividade Hidrolítica da V ATPase	45
6.	Discussão.....	46
7.	Conclusão	51
8.	Referências.....	52

Y

1. Introdução

1.1. Câncer

No âmbito da patologia, o câncer compreende um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células malignas, ou seja apresentam alterações genéticas que lhes conferem a capacidade de proliferar e invadir outros órgãos e tecidos(metástases). As células cancerígenas são próprias do organismo. Porém as alterações genéticas pela qual passaram resultam na perda da funcionalidade e prejudicam o funcionamento do organismo. (Kumar *et al.*, 2005).

Quando um tumor apresenta células que se dividem lentamente estes são chamados tumores benignos, eles não são invasivos, conseqüentemente não produzem metástases, são altamente diferenciados ,apresentam escassa mitose e raramente trazem riscos a saúde (Domingo *et al.*, 2008).Por outro lado os tumores malignos apresentam células que se dividem desordenadamente e devido a sua baixa diferenciação , estas tem a capacidade de migrar para vários órgãos levando a formação de metástases(Bacac e Stamenkovic, 2008).

Os cânceres se classificam em três grupos: os de mucosas e células epiteliais são denominados carcinomas, os de tecidos conjuntivos, como ossos, músculos ou cartilagens são os sarcomas e o terceiro grupo de cânceres são os de tecido sanguíneo, conhecidos como leucemias (Kumar *et al.*, 2005).

O envelhecimento naturalmente leva ao acúmulo de mutações no genoma das células que aumentam a sua suscetibilidade á transformação maligna. Mas dentre os casos registrados cerca de 80 a 90% podem ser associados à exposição a fatores ambientais mutagênicos, tais como o fumo, radiações solares e outras ionizantes, e alguns vírus. Porém, o surgimento de um câncer também depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores(Sober *et al.*, 2001, Sondak *et al.*, 2004).

Segundo a organização mundial de saúde (WHO) o número de mortes por câncer no mundo deve aumentar 45% até 2030, em 2013 o número de mortes foi de 8,2 milhões em 2030 esse número deve chegar 11,5 milhões (WHO, 2014). No Brasil, segundo o INCA, em 2012 surgiram 518.510 novos casos de câncer no Brasil sendo 257.870 em homens e 260.640 em mulheres.

1.1.1. Melanoma

De acordo com dados da American Melanoma Foundation 121.840 novos casos de melanoma foram registrados em 2009, e no mesmo ano foram registradas 65.161 mortes atribuídas ao melanoma em todo o mundo (American Melanoma Foundation, 2009).

No Brasil, a letalidade é também elevada e vem aumentando, porém sua incidência é baixa, embora também em ascensão: estima-se que em 2012 foram registrados 6,630 novos casos de melanoma (INCA 2014).

A quebra da homeostase do melanócito é considerada a base para o desenvolvimento e progressão do melanoma. Os melanócitos são células dendríticas originárias da crista neural, que migram durante o desenvolvimento embrionário para a epiderme e cuja principal função é a síntese e transferência dos grânulos de melanina para os queratinócitos circunvizinhos (Slominski *et al*, 1995). O melanoma surge então, quando os melanócitos tornam-se malignos, sendo denominado cutâneo quando originam-se da pele, ou intra-ocular (ou ocular) quando origina-se nos olhos (GBM, 2012). Inicia-se como uma lesão escura que aumenta de tamanho em extensão, apresentando características de fácil reconhecimento como Assimetria, Bordas irregulares, Coloração variada, e Diâmetro maior que 6 milímetros (ABCD do melanoma). Podem ocorrer modificações como dor, coceira, regressão, desaparecimento de parte ou total, manchas ou pontos escuros ao redor da região, sangramento e pequena ferida na superfície, (GBM, 2012).

Devido a alta capacidade de invasão e metástase, a detecção precoce é essencial para o tratamento, melanomas primários são curáveis através de cirurgia mas, o tratamento da doença avançada tem uma probabilidade de cura menor que 5% (Kieran *et al*, 2008) Atualmente o tratamento contra o melanoma , radioterapia e quimioterapia quando diagnosticados precocemente , em estágios avançados, o tratamento é paliativo e as drogas mais usadas são Ipilimumab , vemurafenib e cisplatina(INCA 2015).

1.2. Quimiorresistência tumoral

Apesar dos avanços no tratamento contra o câncer a resistência aos agente quimioterápicos é a principal razão para a falha no tratamento em pacientes com câncer . A resistência a múltiplas drogas(MDR) é o principal mecanismo que leva à aquisição do fenótipo multirresistente através da sobre - expressão de transportadores de efluxo de prótons tais como a glicoproteína P (Pgp), codificada pelo gene MDR1 na membrana plasmática e as chamadas proteínas associadas à multiresistência (MPR-Multidrugresistance-associated protein)(Nielsen *et al*, 1992).

A glicoproteína P (pgp) pertence a superfamília de transportadores cassete de proteína (Figura 1). Ela comporta-se como uma bomba dependente de ATP unidirecional que permite que as células tumorais evitem os efeitos tóxicos das drogas. A expressão de diferentes níveis de Pgp tem sido correlacionados com o grau e resistência a droga , sendo baixos níveis encontrados em células pouco resistentes. A glicoproteína P também é encontrada em tecidos saudáveis com níveis máximos encontrados nas glândulas supra-renais, rins, mucosa intestinal e Fígado, sugerindo que estas glicoproteínas estão envolvidas na desintoxicação e transporte de moléculas lipofílicas(Pérez - Sayans *et al*, 2010).

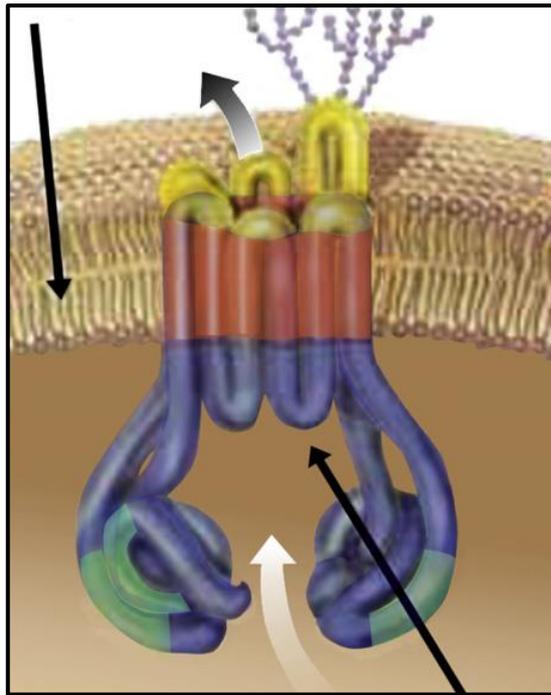


Figura1. A glicoproteína P localiza-se na membrana da célula, onde bombeia toxinas para fora da célula. A figura mostra um modelo da estrutura da proteína que se baseia na sua sequência de aminoácidos conhecida. A cadeia de proteína dobra-se 12 vezes através da bicamada lipídica da membrana formando um poro de 12 lados. Dois grandes domínios (roxo) e quase idênticos sobressaem para dentro da célula. Eles incluem regiões (verde) que ligam o transporte de ATP, o que, provavelmente, fornece a energia impulsiona os efluxo (setas) (Fonte: adaptado de Kartner, 1989).

Outras moléculas também são apontadas como responsáveis pela resistência à múltiplas drogas, glutathione S-transferase-p, e DNA topoisomerase II; entretanto estas moléculas não podem elucidar totalmente a MDR, a V-ATPase, que é em grande parte responsável por regular a acidez no microambiente de tumores sólidos e portanto interferir na absorção de drogas (Pérez - Saýans *et al*, 2010).

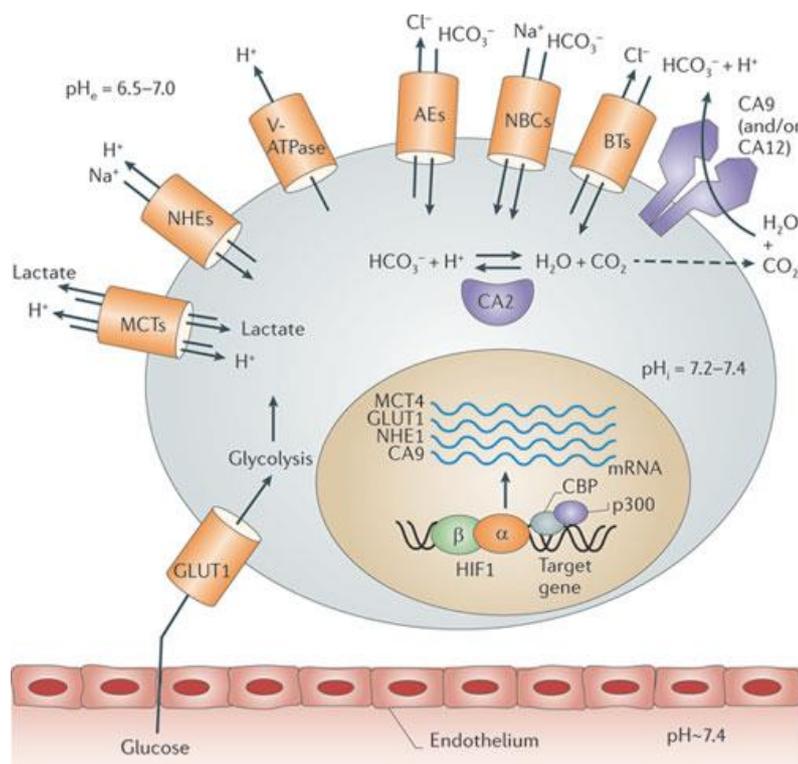
1.3. Glicose, Acidificação e Progressão Tumoral

A Progressão Tumoral não é caracterizada somente pela proliferação descontrolada de células cancerosas, mas também por alterações no metabolismo e no microambiente do tumor que suportam o crescimento da

massa neoplásica disseminação metastática para sítios distantes(Hananah *et al*, 2011).

Em células normais a glicose é convertida a glicose-6-fosfato e subsequentemente a piruvato, que é então oxidado na mitocôndria que libera 38 moléculas de ATP por mol de glicose (Gatembyet *al*, 2004). No entanto a entrega de oxigênio insuficiente para algumas regiões dos tumores leva hipóxia, o que restringe a oxidação fosforilativa, como consequência, células tumorais mudam seu metabolismo para glicólise reduzindo o piruvato, gerado no primeiro passo, a lactato (Fanget *al*, 2008). Embora em termos energéticos seja um processo menos eficiente, não depende de oxigênio; além disso, muitas vezes a glicólise persiste mesmo após a reoxigenação porque os intermediários metabólicos(lactato, piruvato) podem ser utilizados para a biossíntese de aminoácidos , nucleotídeos e lipídeos. Todo esse metabolismo oncogênico gera um excesso de prótons e dióxido de carbono que são mantidos em equilíbrio com ácido carbônico pela enzima anidrase carbônica ; assim , o aumento do metabolismo da glicose nas células tumorais contribui para a acidificação extracelular do meio conferindo assim uma vantagem seletiva na proliferação das células tumorais(Gatembyet *al*, 2004).

Homeostase do PH em qualquer tipo de célula é um processo complicado que envolve muitas proteínas e sistemas de membrana. Nas células tumorais estes processos são ainda mais complexos devido ao compartimento interno que é ligeiramente mais alcalino (PH aproximadamente 7,4) e o compartimento externo sendo mais ácido(PH 6,5~7,0). A variação na taxa de PHi/PHe tão baixo quanto 0,1 pode alterar importantes processos bioquímicos e/ou biológicos tais como a síntese de ATP o que prejudicaria proliferação, invasão, migração e metástase do tumor. Na Figura 2. observa-se os principais atuantes envolvidos na regulação do PH tumoral.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 2. Proteínas envolvidas na regulação do PH de uma célula tumoral incluindo: transportadores de monocarboxilatos (TCM) que transportam ácido lático e outros monocarboxilatos pela degradação glicolítica da glicose; trocadores de Na^+/H^+ (NHEs); bomba de prótons presente na membrana plasmática (V-ATPase); trocadores de ânions (AEs); co-transportadores $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBCs); anidrases carbônicas (CA2, CA9 e CA12). Transportador de glicose GLUT1; BT transportador de HCO_3^- ; CBP, AMP cíclico que se liga a proteína (CREB); HIF1, fator de transcrição que induz hipóxia; p300, histona acetiltransferase p300 (Fonte: adaptado de Neri & Supuran).

No melanoma observa-se super – expressão da V-ATPase , sendo apontada como principal responsável pela acidificação e manutenção de um gradiente de PH aberrante entre o citosol e o ambiente extracelular(Sennoune *et al*, 2004)(Sennoune *et al*, 2004). A regulação de tais gradientes é um fator crucial envolvido na proliferação, tumorigênese, resistência a drogas e progressão do tumor e pode representar uma alvo adequado e específico para novas drogas anticâncer (Sennoune *et al*, 2004)(Nishi & Forgac , 2002)(De Millito & Fais, 2005).

1.4. Estrutura e funcionamento da F-ATPase

As ATPases do tipo F(ATPsintases) são responsáveis pela síntese de ATP a partir de ADP e P, ao dissiparem um gradiente eletroquímico de prótons(força próton-motora ou PMF); as PMFs são formadas a partir de uma voltagem e diferença de PH através das membranas nas cristas sintetizando assim ATP nas mitocôndrias (Wieczorecket *al*, 1999). As F-ATPases são encontradas em mitocôndrias, cloroplastos e membrana plasmática de bactérias (Gerengser & Zhang, 2003). Em bactérias elas podem operar como H⁺ F-ATPases, ou seja, usando a energia da hidrólise do ATP para gerar PMFs (Wieczorecket *al*, 1999).

As F-ATPases possuem uma massa molecular de aproximadamente 400 Kda e consiste de 9 subunidades arranjadas em um setor catalítico F₁ e um setor de translocação de prótons F₀ (Wieczorecket *al*, 1999). Como mostrado na Figura 3, a F – ATPase possui uma subunidade central γ , que juntamente com a subunidade ϵ formam a haste central que conecta os setores F₁ e F₀. Estas subunidades são ligadas as doze subunidades c que estão dispostas lado a lado formando um canal transmembrana , as quais geram um movimento de rotação que ocorre quando os prótons ligam-se a estas subunidades do domínio Fo. Essa rotação é propagada através da subunidade γ até as subunidades β provocando a rotação do domínio F1 de modo que ocorre a síntese de ATP acoplada a translocação ativa de prótons através da membrana (Futai *et. al.*,2000).

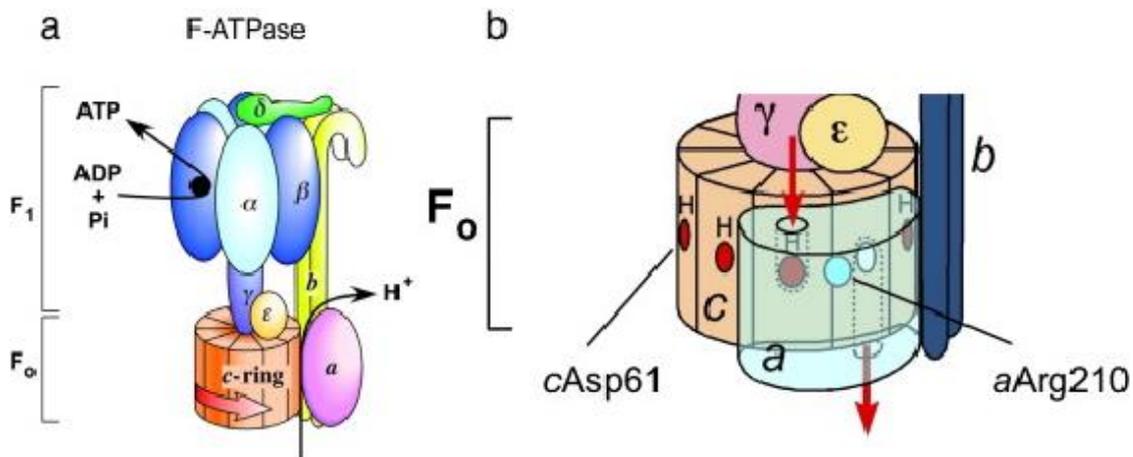


Figura 3 . Modelo esquemático da F-ATPase; A- Organização das subunidades da F-ATPase e dos domínios F_1 e F_0 ; B – Domínio F_0 da F-ATPase (Fonte: Futai *et al*, 2012).

2.5 Estrutura e Funcionamento da V-ATPase

As V-ATPases são grandes complexos protéicos, compostas por 14 polipeptídeos diferentes organizados em dois domínios (Fig.4). O domínio V_0 é o domínio transmembranar responsável pela translocação de prótons. É constituído por seis subunidades diferentes – designadas a, d ,e, c, c' c''(em eucariotos superiores não existe a subunidade c '). Estas proteínas(c, c',c'') são altamente hidrofóbicas, e formam um anel inserido na membrana plasmática. A translocação de prótons é feita pela rotação deste anel proteolipídico, no qual também participa diretamente a subunidade a, ao formar dois hemi-canais por onde são transportados os prótons(Forgac, 2007).O domínio V_1 é o mais periférico e está localizado na face citoplasmática da membrana. Este é responsável pela hidrólise de ATP, sendo composto por 8 subunidades (A,B,C,D,E,F,G,H,), algumas das quais presentes repetidamente. As subunidades A e B formam um arranjo hexamérico alternado, no qual se encontram os 3 locais da hidrólise de ATP(Forgac, 2007).

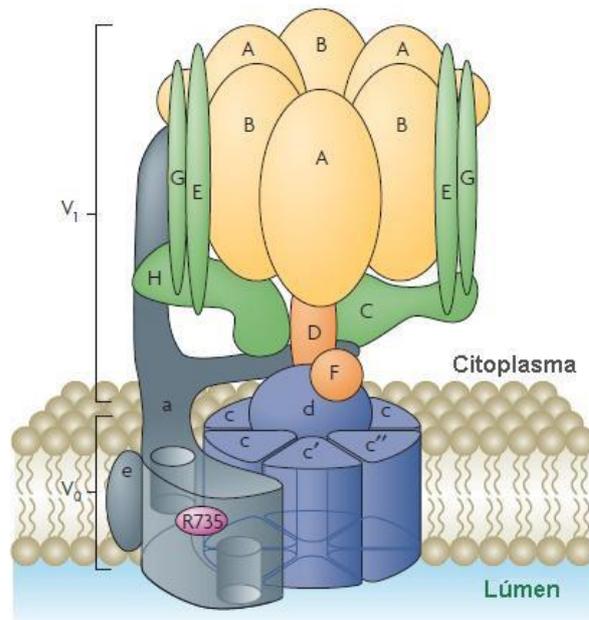


Figura 4. Estrutura da V-ATPase. O complexo da (V-) ATPase vacuolar é composto por um domínio periférico , responsável pela hidrólise de ATP (V1); e um domínio integral de membrana (V0) que está envolvido na translocação de prótons através da membrana. (Adaptado de Forgac, 2007)

Na V-ATPase, a maioria das suas subunidades formam elementos de suporte, ligando os dois domínios. O suporte central (constituído pelas subunidades d, D e F) serve de rotor, que acopla a energia libertada da hidrólise de ATP no domínio V1 á rotação do domínio V₀. O suporte periférico (formado pelas subunidades C, E, G, H e domínio N-terminal da subunidade a) tem como função prevenir a rotação do complexo formado pelas subunidades A e B durante o funcionamento da bomba, servindo desta forma como “stator” (Forgac, 2007). O “stator” não só estabiliza todo o complexo durante o processo de rotação como também participa da regulação da V- ATPase (Diepholz, 2008).

O transporte de prótons através da V-ATPase é feito através de um mecanismo rotacional (FIG. 5): a hidrólise de ATP no complexo A₃B₃ induz alterações conformacionais na subunidade A, o que gera uma força rotacional. Assim, os prótons entram no complexo V₀ através de um dos hemi-canais na subunidade a, ligando-se a um dos locais de ligação existentes no anel proteolipídico. À medida que este roda, os prótons atravessam a bicamada

lipídica e regressam à subunidade a, mas desta vez ao hemi-canal de saída (Cipriano *et al.*, 2008).

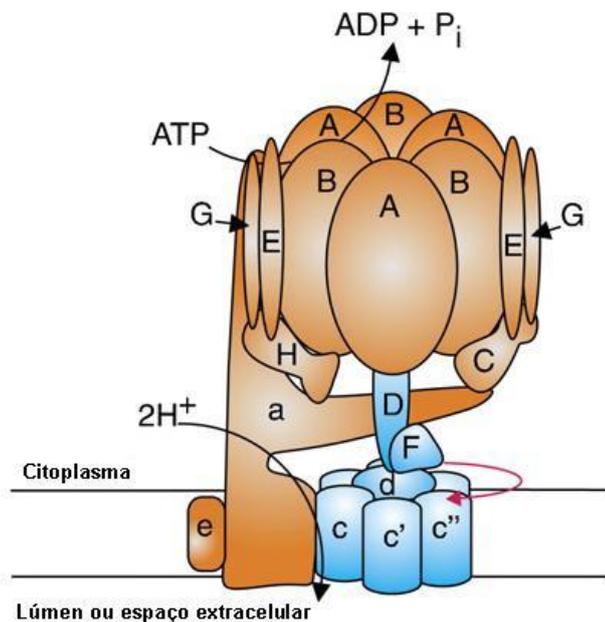


Figura 5. Mecanismo rotacional de translocação de prótons da V-ATPase. A hidrólise de ATP provoca alterações conformacionais nas subunidades A do domínio V1, que gera a rotação do rotor. Entretanto, os prótons entram no complexo V0 através de um dos hemi-canais na subunidade a, ligando-se a um dos locais de ligação existentes no anel proteolípido e saindo para o lúmen ou espaço extracelular através do segundo hemi-canal (Adaptado de Cipriano *et al.*, 2008).

As V-ATPases estão presentes na membrana plasmática de alguns tipos celulares (figura 4), como hepatócitos (Stone e cols, 1989), macrófagos (Swallow *et. al.*, 1990), osteoclastos (Väänänen *et. al.*, 1990), células epiteliais (Turrini *et. al.*, 1989), células parientais (Väänänen *et. al.*, 1990), células secretoras do trato urinário, células intercaladas do ducto coletor renal (Schuster, 1991), membranas apicais do intestino médio de insetos (Klein, 1992).

A V-ATPase pode estar presente tanto na membrana de compartimentos intracelulares como na membrana plasmática (Hinton *et al.*, 2009). No primeiro caso, estas membranas delimitam vesículas do complexo de golgi, vesículas endossomais e lisossomais, vacúolos (no caso de células vegetais) e vesículas secretoras. Como tal, as V-ATPases participam em todos os passos do tráfico membranar normal da célula, desde a formação de endossomos precoces até

a acidificação de endossomos tardios e lisossomos. Este transportador é fundamental na membrana plasmática ao gerar potenciais de membrana, têm a capacidade de energizar processos de transporte acoplados, funcionando assim na importação e/ou exportação de várias moléculas (Forgac 2007). A V-ATPase também é fundamental na regulação do PH citoplasmático das células, por exemplo, no equilíbrio do esqueleto ósseo e no armazenamento do esperma no epidídimo e vaso deferente. Nas células tumorais esta diretamente relacionada na manutenção do PH ácido extracelular e também na migração das células durante a angiogênese e a invasão das células tumorais (Hinton *et al*, 2009).

1.6. Óleos Essenciais

Óleos essenciais e extratos foram usados para uma grande variedade de propósitos durante milhares de anos (Jones, 1996). Estes efeitos variam desde o uso de jacarandá e cedro em perfumaria, para aromatizar bebidas com limão, erva-doce ou óleo de bagas de zimbro (Lawless, 1995), bem como a aplicação de óleo de capim-limão para a preservação de culturas alimentares armazenados (Mishra&Dubey, 1994). Em particular, a atividade antimicrobiana de óleos vegetais e extratos formou a base de muitas aplicações, incluindo extratos brutos e processados na conservação de alimentos, síntese produtos farmacêutica medicina alternativa e terapias naturais (Reynolds 1996; Lis-Balchin&Deans 1997).

Na maioria dos casos os óleos essenciais têm uma composição bastante complexa, sendo que os compostos predominantes são os terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos),mas apresentam ainda outros compostos químicos como, por exemplo, terpineol, cineol, terpenóides e fenilpropanóides, incluindo carboidratos, álcool, éteres, aldeídos e cetonas, que são responsáveis pelas propriedades perfumadas e biológicas de plantas aromáticas e medicinais. Muitos dos constituintes dos óleos essenciais são apenas vestigiais ou estão em proporções insignificantes, no entanto, por vezes são os que apresentam a maior função organoléptica. São altamente voláteis com a faixa do ponto de ebulição de 140 - 180 °C. Possuem efeitos

farmacológicos que demonstram propriedades anti-inflamatórias, antioxidante (Golab *et. al.*, 2005.) e anticarcinogênicas .

A classificação dos terpenos se baseia no número de unidades isoprenicas: monoterpenos (C10, 2 unidades), sesquiterpenos (C15, 3 unidades), diterpenos (C20, 4 unidades), sesterpenos (C25, 5 unidades), triterpenos (C30, 6 unidades) e tetraterpenos (C40, 8 unidades) sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os terpenos mais frequentes em óleos voláteis (Simoes e Spitzer, 2003).

Atualmente dois diterpenos são conhecidos no tratamento do câncer : Docetaxel utilizado no tratamento do câncer de mama, ovário e pulmão) e o Paclitaxel no tratamento do câncer de bexiga, esôfago e também de pulmão(Brandão *et. al.*, 2010)..

2.7 Mirtenal

Com poucos relatos na literatura o monoterpeno oxigenado bicíclico, Imelouane e colaboradores em 2010 estudaram o uso dos principais componentes de óleo essencial extraído da *Lavandula dentata*, dentre eles o mirtenal e observaram que células de Glioma malignas humanas, U373 MG, são sensíveis aos efeitos citotóxicos desse extrato enquanto linhagens como MCF7, tumor de mama, são menos sensíveis. Em 2011, Martins, descreveu o mirtenal como um potente inibidor de bombas de H⁺, resultados *in vitro* demonstraram resultados que chegaram a alcançar 80 % da inibição das bombas.

Nosso grupo vem investigando e avançando no potencial do mirtenal como inibidor de Bombas de H⁺, resultados *in vitro* demonstram sua eficácia como inibidor em células tumorais, com base nesses dados torna-se viável testes *in vivo* do mirtenal.

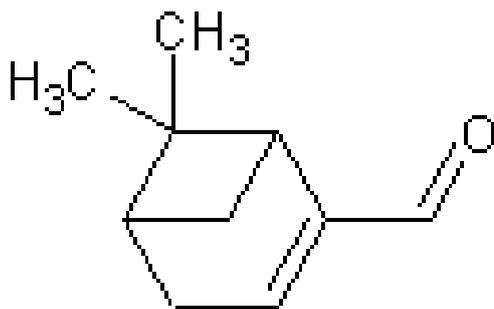


Figura 6. Representação estrutural do mirtenal.

2. Justificativa

O câncer consiste num dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Segundo a organização mundial de saúde em 2013, 14 milhões de pessoas foram diagnosticados com câncer no mundo, levando a morte 8,2 milhões de pessoas (WHO 2014).

O melanoma é um dos tipos de câncer mais invasivos e de difícil controle. A pesquisa por metodologias terapêuticas inovadoras, economicamente viáveis e com a menor carga possível de efeitos colaterais sobre o metabolismo das células saudáveis se reveste de grande interesse social, científico e tecnológico

Dados da literatura apontam para um crescente reconhecimento do envolvimento da V-ATPase com a malignidade das células tumorais; nosso grupo testou a eficácia inibitória do mirtenal, demonstrada *in vitro*, sobre a atividade das bombas de H⁺ e na retenção do processo metastático, estes dados justificam como fundamental a realização de análises *in vivo* deste monoterpene no intuito de verificar a toxicidade do mesmo e seus efeitos sobre a fisiologia e morfopatologia de cobaias.

3. Objetivo Geral

- Estudar o potencial quimioterápico do monoterpene Mirtenal em camundongos com metástases induzidas por células B16 F10 e B16 F0, as quais apresentam diferentes potenciais metastáticos.

3.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a Toxicologia do Mirtenal através de análises de sangue (AST, ALT, ureia e creatinina) e histologia;
- Avaliar a progressão da metástase induzida por meio da observação da invasão dos tecidos de pulmões e linfonodos;
- Verificar a ativação das bombas de H⁺ isoladas de tumores retirados dos camundongos;
- Acompanhar ao longo do tratamento a variação de peso dos camundongos com metástase induzidas ;.
- Verificar, por histologia, o efeito do Mirtenal sobre a metástase em camundongos tratados com diferentes concentrações;

4. Material e Métodos

4.1. Terpenos

O monotерpeno Mirtenal(1*R*)-2-Pinen-10-al,(1*R*)-6,6-Dimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-en-2-carboxaldehyde) de fórmula molecular C₁₀H₁₄O, foi obtido comercialmente (Sigma Aldrich), e diluído no solvente DMSO a 0.97% e PBS resultando nas concentrações finais de 10mg/kg , 15 mg/kg, 20mg/kg e 50 mg/kg.

4.2. Cultura de Células

As células B16 F10, melanoma murinho muito metastática, foram adquiridas do banco de células Radovan, na Universidade Estadual do Rio de Janeiro (BCRJ). São Cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB em garrafas de cultura de 25cm³a 37°C com 5% de CO₂ e umidade controlada.

4.3. Indução de Metástase

Células B16 F10, foram retiradas da garrafa, com tripsina, centrifugadas e ressuspensas de modo a ajustar a concentração de 5 x 10⁵ células por 0,1 ml.

Foram usados camundongos C57BL/6 para a indução com 8 semanas de idade, os camundongos foram divididos em grupos com 7 animais cada de modo a se obter 3 grupos: camundongos sem tratamento, camundongos tratados com DMSO e camundongos tratados com Mirtenal

As células foram então aplicadas nos camundongos de dois modos diferentes de maneira a se conseguir dois tipos diferentes de metástase em diferentes grupos , metástase pulmonar e metástase nos linfonodos.

Para observar metástase pulmonar, foram aplicadas 5×10^5 células em uma das veias da calda do camundongo. Para observa metástase nos linfonodos as células foram aplicadas na parte superior da orelha.

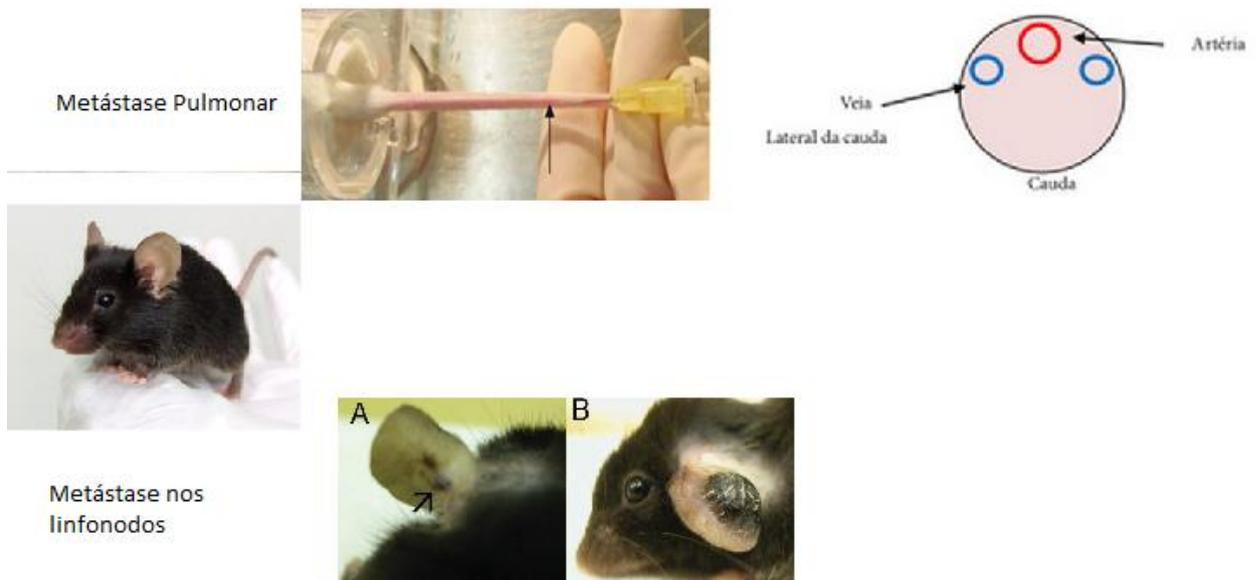


Figura 7: Esquema ilustrando os modelos de indução de metástase.

Os tratamentos foram realizados a partir do dia da indução sendo feito a cada 72 horas, o tratamento foi intraperitoneal.

4.4. Controle do peso corporal

O peso corpóreo foi acompanhado individualmente a cada 3 dias. Medições individuais de peso serão obtidas com o auxílio de uma balança, de forma a se comparar com seus aspectos clínicos. Os valores obtidos foram utilizados na construção da curva de ganho de peso corporal, no software GraphPadPrism 5.0.

4.5. Parâmetros bioquímicos do plasma

Amostras de sangue foram coletadas no final de 21 dias dos camundongos.

A coleta foi feita por punção cardíaca, as amostras foram então encaminhadas para análise Bioquímica no aparelho VitrosR 950 Chemistry System no laboratório Plínio Bacelar. Foram dosadas, alanina transaminase (ALT) e aspartatotransaminase (AST), ureia e creatinina a fim de avaliar a alteração no quadro clínico decorrente da indução da metástase e tratamento com mirtenal. Os valores obtidos foram utilizados na construção dos gráficos em barra com os dados de cada parâmetro em pontos específicos, no software GraphPadPrism 5.0.

4.6. Sacrifício e análise histológica

Os animais foram acompanhados durante 21 dias após a indução da metástase pulmonar e dos linfonodos . Durante a necropsia , foram retirados, rim, fígado e coração e pulmão para verificar alterações histopatológicas. Os órgãos foram fixados em formol 10%posteriormente foram clivados, desidratados em série crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), clarificados com xilol, impregnados e incluídos em parafina e as seções foram obtidas no micrótomo. As lâminas foram então montadas e coradas com hematoxilina e eosina. As amostras foram então observadas no microscópio Zeiss Axioplan e fotografadas no sistema Axiovision.

4.7. Purificações das membranas

Tumores retirados dos camundongos foram macerados e centrifugados por 5 minutos a 1200 rpm para posterior retirada do meio DMEM e aplicação do tampão de lavagem com 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 1 mM PMSF e 3 mM benzamidina em pH 7,4. Posteriormente, foram centrifugados seguindo

uma sequência de lavagem com o tampão de lavagem repetida duas vezes em centrífuga refrigerada a 500 rpm por 5 minutos e 4°C, coletando o precipitado. O precipitado foi então rompido em Potter (Figura 11) e o homogenato submetido à nova centrifugação de lavagem a 500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado numa micro ultra centrífuga a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C para isolar a fração mitocondrial. O sobrenadante resultante é então centrifugado a 100.000 x g para isolar a fração microssomal que precipita e foi ressuspensa em tampão de ressuspensão contendo 250 mM de sacarose, 1 mM EGTA e 50 mM de Tris-HCl em pH 7,2. A fração microssomal foi então depositada cuidadosamente no topo de um gradiente descontínuo de sacarose (46% e 25% sacarose, 1 mM EGTA e 50 mM de Tris-HCl em pH 7,2) e submetida à centrifugação a 100.000 x g por 30 minutos a 4°C, sendo coletada a fração da interface que constituiu a fração enriquecida com vesículas oriundas da membrana plasmática. Esta fração foi então centrifugada novamente a 100.000 x g por 30 minutos em tampão de ressuspensão e congelado em N₂ líquido e estocado a -70°C.

4.8. Dosagens de Proteína

A fração de vesículas purificadas teve o seu conteúdo de proteínas totais dosado pelo método de Bradford (1976). A solução de Bradford foi confeccionada com 100 mg de comassie blue, 50 mL de etanol sobre agitação durante 1 hora, e depois foram adicionados 100 mL de ácido ortofosfórico e o volume foi completado para 1000 mL de H₂O destilada, a solução foi então filtrada em papel filtro 4 vezes. A curva padrão foi obtida utilizando solução de BSA 1mg/mL diluída a concentrações variando de 2 a 18 µg, completando o volume para 100 µL de H₂O ultra pura e adicionando 900 µL da solução de Bradford. As amostras (10 µL) foram colocadas em 90 µL de H₂O Milique e 900 µL de Bradford, após 15 minutos foi feita à leitura a 595 nm no espectrofotômetro.

4.9. Atividade Hidrolítica da V ATPase

Para mensurar a atividade enzimática das bombas de H^+ de cada um dos tumores retirados da orelha dos camundongos (B16F10) foram utilizadas as frações de membrana plasmática das V-ATPases. Para tal, o meio de reação básico continha: Hepes-Tris 10mM (pH7,0 para plasmalema ou 8,0 para mitocôndrias), $MgSO_4$ 1mM, Molibdato de sódio 0,2mM e ATP 1 mM; levado ao volume final com adição da apropriada quantidade de H_2O ultra pura para cada condição de ensaio. Para a revelação da atividade da V ATPase foi usado inibidor específico (Nitrito 50mM), além dos monoterpeno e Mirtenal nas seguintes concentrações: 50 μ M; 100 μ M; 200 μ M . A reação foi disparada com a adição de cada fração de membranas (plasmalema ou mitocôndria; na concentração de 0,030 mg/mL de proteína) e parada após 0 e 30 minutos de tempo de incubação, pela retirada de alíquotas que foram imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo TCA a 5 %, mantidos em gelo. Para revelar o fosfato liberado pela hidrólise de ATP, usou-se o método clássico de Fiske e Subbarow (1925), molibdato de amônio e ácido ascórbico e a leitura foram feita no leitor de Elisa a 750 nm (Adaptado de Summer et.al., 1995)

4.10. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas para os testes de controle de peso, atividade da V-ATPase através do programa Graph Pad Prism versão 5.0. O teste estatístico utilizado foi tukey's multiple comparison test, one-way ANOVA.

5. Resultados

5.1. Dose Letal (DL₅₀)

Diferentes grupos com 7 animais foram administrados com uma única dose de mirtenal, de modo que cada grupo recebesse uma concentração diferente. Na Figura 8 observa-se a mortalidade dos animais, o grupo administrado com 20 mg/kg apresentou uma mortalidade de 40% e o grupo administrado com 50 mg/kg teve mortalidade de 60%, os demais grupos não apresentaram morte. Sendo a toxicidade do mirtenal na concentração por volta de 35 mg/kg.

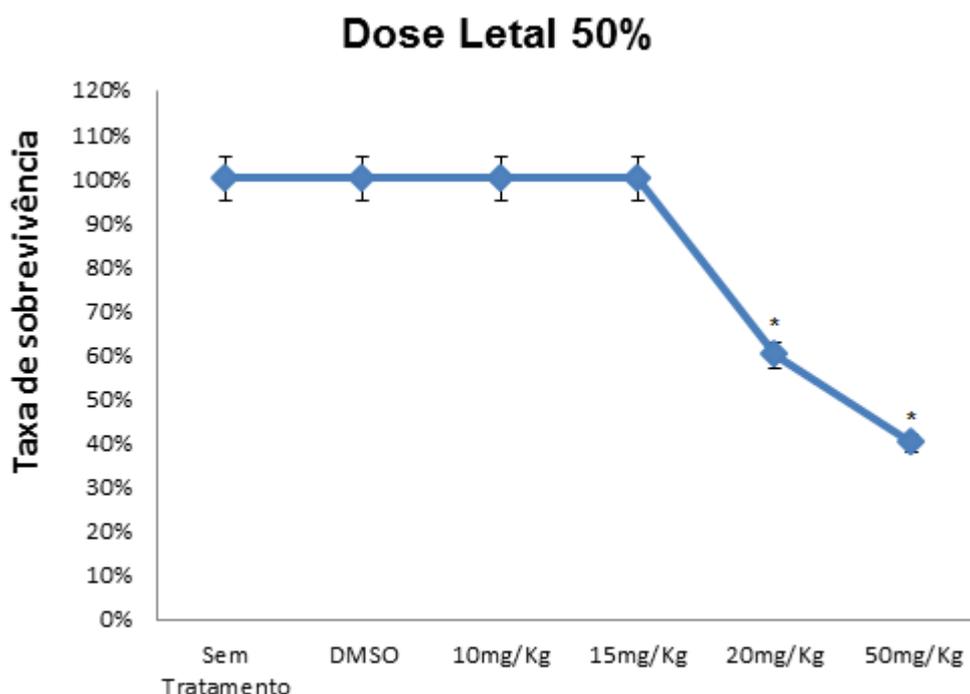


Figura 8: Toxicidade do Mirtenal; foi aplicada uma única dose com diferentes concentrações do Mirtenal em cada grupo para a verificação da mortalidade (DL₅₀) tempo máximo foi de 21 dias. N=7 p<0,01

5.2. Toxicidade do Mirtenal

5.2.1. Metabólitos Renais

Para observar os efeitos tóxicos do mirtenal foi coletado sangue por punção cardíaca, após 21 dias do tratamento, e foi feita a quantificação dos metabólitos renais. Na figura 9 observa-se as dosagens de uréia e creatinina, em grupos sem tratamento, tratados só DMSO, e com Mirtenal, todos ficaram dentro do padrão estabelecido.

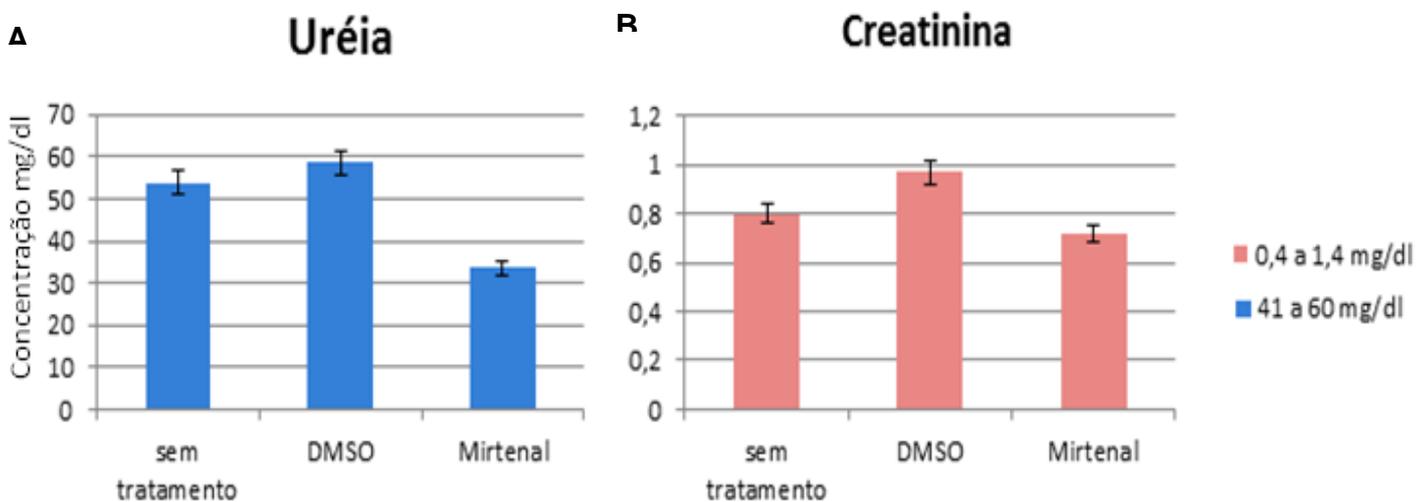


Figura 9: Toxicidade do Mirtenal;. Análise da bioquímica Clínica dos animais, 21 dias após o tratamento com mirtenal, pela quantificação da Uréia (A) e da Creatinina (B) para avaliação das funções renais. N=7

5.2.2. Enzimas Hepáticas

Na Figura 10 observa-se a dosagem das enzimas hepáticas, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), O sangue foi coletado 21 dias após ao tratamento, Foi feita uma média com 3 grupos, sem tratamento, DMSO(diluente) e o Mirtenal. De acordo com resultado obtido observa-se que o grupo tratado com DMSO e o grupo tratado com Mirtenal, apresentaram pequena alteração na atividade das enzimas, alteração esta

dentro da normalidade visto que no metabolismo de diversas drogas ocorre alterações enzimáticas no fígado .

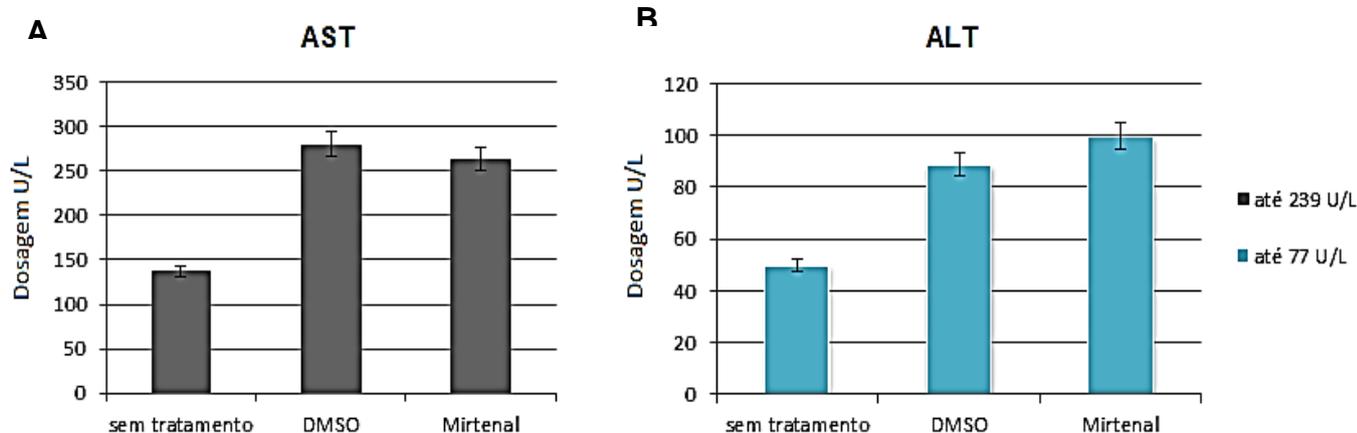


Figura 10: Avaliação das funções hepáticas em A dosagem da enzima e aspartato aminotransferase (AST) e em B dosagem da enzima alanina aminotransferase (ALT). N=7

5.2.3. Histologia

Os órgãos dos animais usados na DL50 foram coletados para análise histológica. Foram coletados coração, rins e Fígado, de modo a se observar alguma alteração causada pelo tratamento com mirtenal. Nas Figuras 11 A, C e E observa-se rim, fígado e coração respectivamente de animais que não foram tratados com o mirtenal; quando comparados com animais tratados com mirtenal a única alteração é uma degeneração Hidrópica no rim(Figura 11 D), ocorre pelo acúmulo de água no meio intercelular decorrente de algum tipo de tratamento.

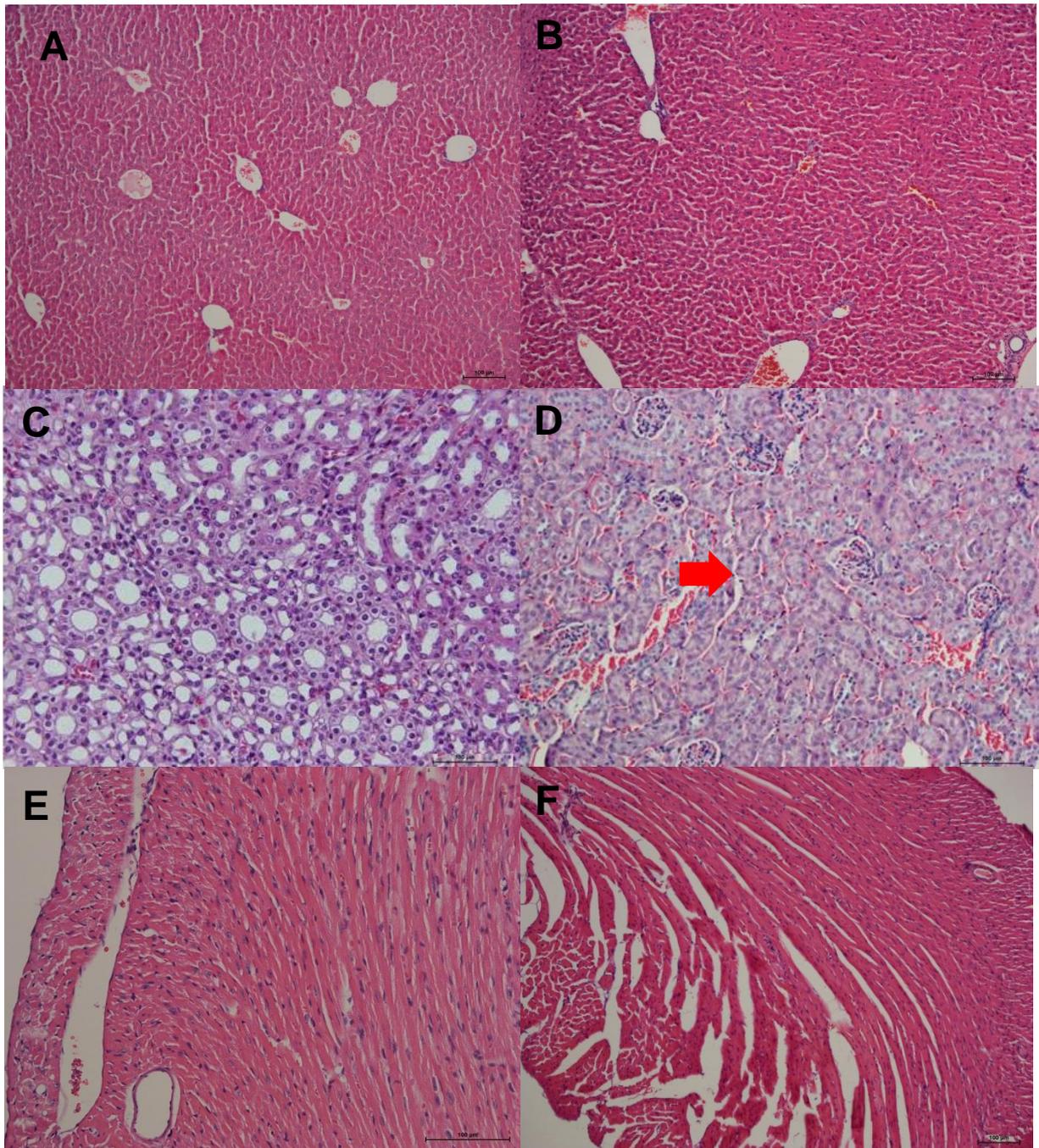


Figura 11: Toxicidade do mirtenal: histologia de órgãos coletados de animais 21 dias após o tratamento; na figura A observa-se fígado de um animal não tratado, na figura B observa-se fígado de um animal tratado ; em C observa-se o rim de um animal do grupo controle, em D rim de um animal do grupo tratado com mirtenal; em E coração de uma animal do grupo controle, em F coração de um animal tratado. A seta indica a degeneração Hidrópica. Aumento de 40 x , laminas coras com hematoxilina e eosina.

5.3. Indução da metástase pulmonar

Animais foram divididos em 3 grupos com 7 animais cada, em todos foram induzidos metástase pulmonar com as células de melanoma murinho B16F10, o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento; outro grupo administrado somente com DMSO que é diluente do mirtenal, e outro grupo foi administrado com mirtenal, o tratamento foi feito a partir do dia da indução metástase sendo administrado a cada 3 dias. Após 21 dias da indução, foi feita a necropsia e retirada dos pulmões. Na Figura 12 A e B observa-se pulmões de camundongos controle que não receberam nenhum tratamento; em C e D observam-se pulmões de camundongos que foram tratados com DMSO; em E e F pulmões de camundongos que foram tratados com mirtenal, observa-se redução do número de nódulos metastáticos.

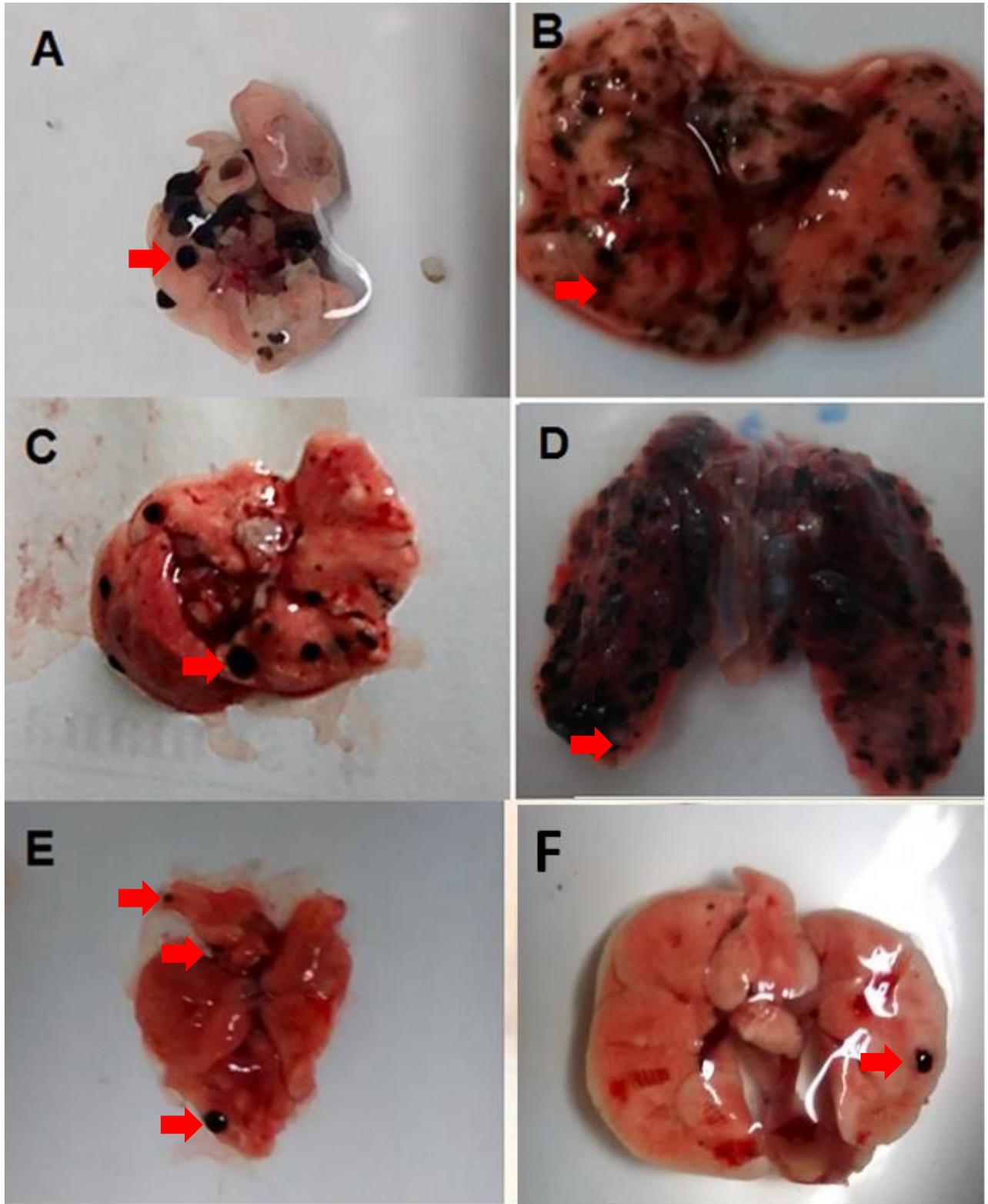


Figura 12: Fotos Macroscópicas dos pulmões retirados dos camundongos retirados após 21 dias de tratamento; Em A e B camundongos do grupo controle que não receberam nenhum tratamento; em C e D camundongos que foram tratados com DMSO; em E e F camundongos tratados com mirtenal. As setas indicam micronódulos metastáticos.

5.3.1. Análise Histológica

Os pulmões retirados dos camundongos ao fim do tratamento foram fixados e foi feita análise histológica, Pulmões retirados de animais saudáveis estão dispostos nas Figuras 13 A e B; pulmões com metástase induzida que não receberam nenhum tratamento estão em C e D; pulmões do grupo de camundongos que foram tratados com mirtenal estão em E e F; observa-se apenas uma pequena invasão nos pulmões pertencentes a animais tratados com mirtenal com alvéolos permanecendo intactos (Figura 13 E e F), enquanto observa-se invasão total do tecido com abundância de melanina e presença de hemorragias nos camundongos não tratados.

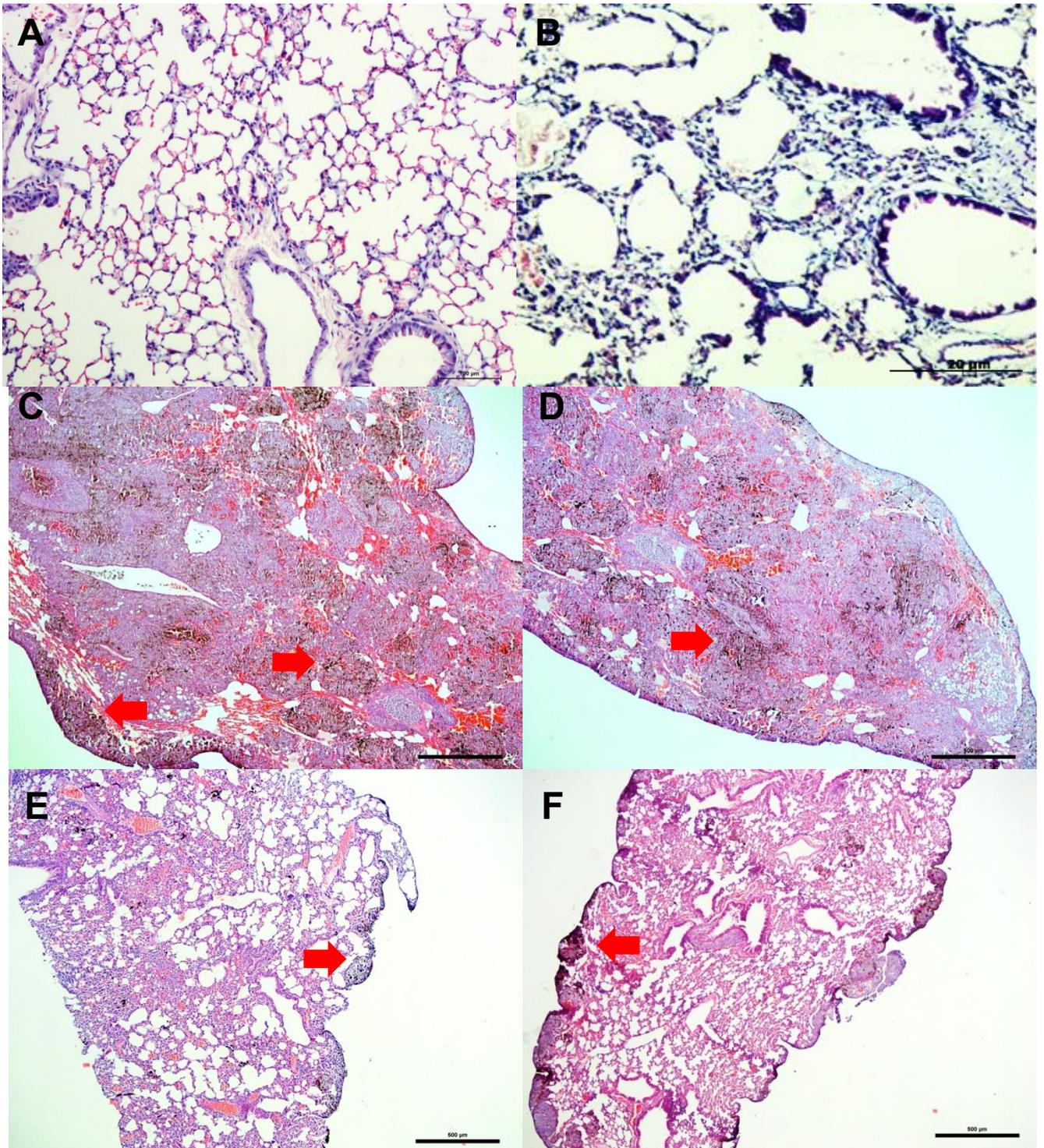


Figura 13: Análise Histológica de pulmões retirados dos camundongos após 21 dias de experimento; em A e B pulmões retirados de camundongos saudáveis (grupo controle); em C e D camundongos com metástase induzidas que não foram tratados; em E e F camundongos com metástase induzida tratados com mirtenal. Aumento 10X. as setas mostram invasão pelas células tumorais e melanina.

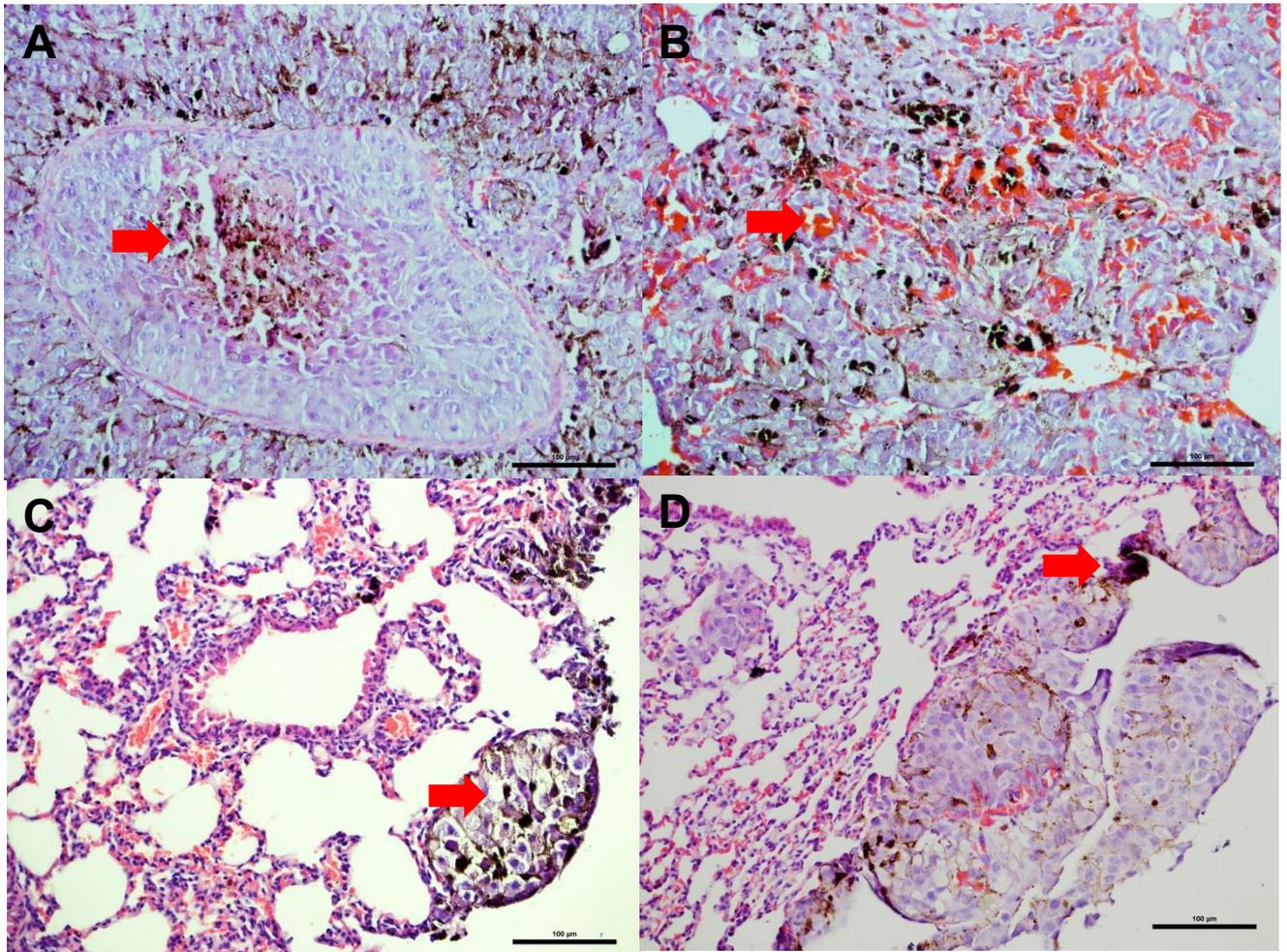


Figura 14: Análise histológica de pulmões retirados de animais após 21 dias da indução da metástase; em A camundongo sem tratamento, observa – se um embolo neoplásico , em B animal do grupo sem tratamento apresentando hemorragia; em C e D animais tratados com mirtenal , aumento 20x observa-se pequena invasão do pulmão com os alvéolos intactos. As setas indicam os locais da invasão com presença de melanina e hemorragia.

5.3.2. Controle de peso dos animais

Durante todo o tratamento foi feito o acompanhamento de peso dos camundongos a fim de se correlacionar com os fatores clínicos e patológicos; camundongos tratados com mirtenal não apresentaram alteração de peso (Figura 17); camundongos não tratados com mirtenal apresentaram perda de peso em torno de 20%; animais tratados estavam ativos, não houve baixa no peso ,aparência saudável , no grupo dos animais não tratados houve baixa no peso, respiração ofegante camundongos inativos.

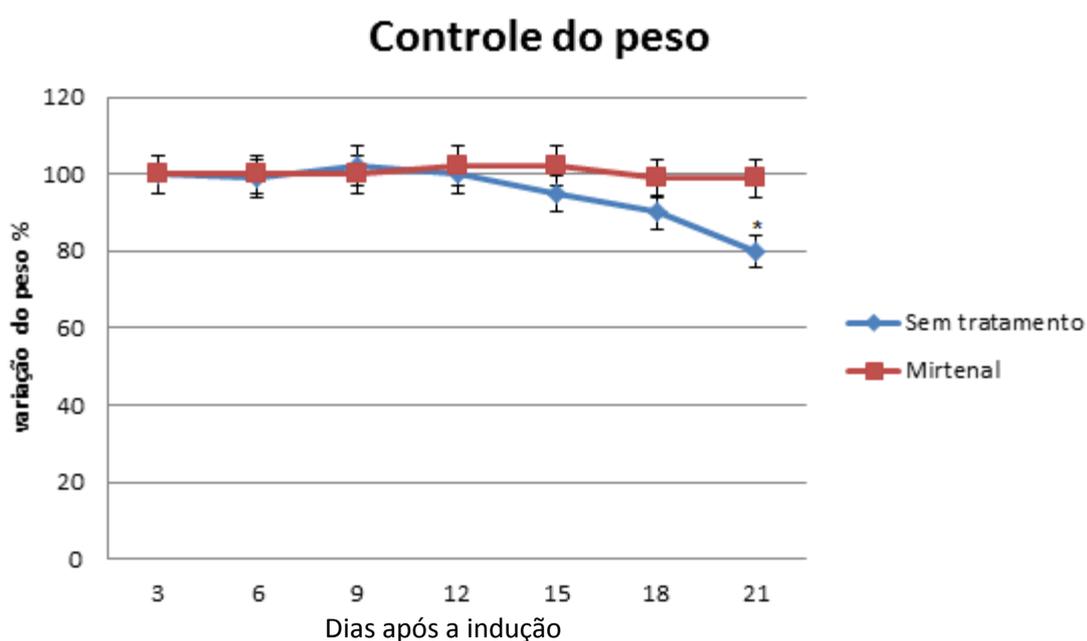


Figura 15: gráfico mostrando a variação do peso dos animais com metástase induzida no pulmão durante 21 dias de tratamento., eixo x taxa de sobrevivência ,eixo Y variação de peso camundongos. N=7 P < 0,01

5.4. Indução de Metástase nos Linfonodos

Animais foram divididos em 3 grupos com 7 animais cada, em todos foram induzidos metástase nos linfonodos com células de melanoma murinho B16F10, o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento; outro grupo administrado somente com DMSO que é solvente do mirtenal, e outro grupo foi administrado com mirtenal, o tratamento foi feito a partir do dia da indução metástase sendo administrado a cada 3 dias. Após 21 dias da indução, foi feita a necropsia e retirada dos linfonodos e dos tumores formado na orelha. Na Figura 16 A observa-se metástase no linfonodo de uma camundongo pertencente ao grupo que não recebeu nenhum tratamento, em B linfonodo de um camundongo que recebeu somente DMSO, em C camundongo que foi tratado com mirtenal, observa-se diminuição do crescimento do tumor formado no linfonodo, em D comparação da metástase no linfonodo de um camundongo tratado com o não tratado.

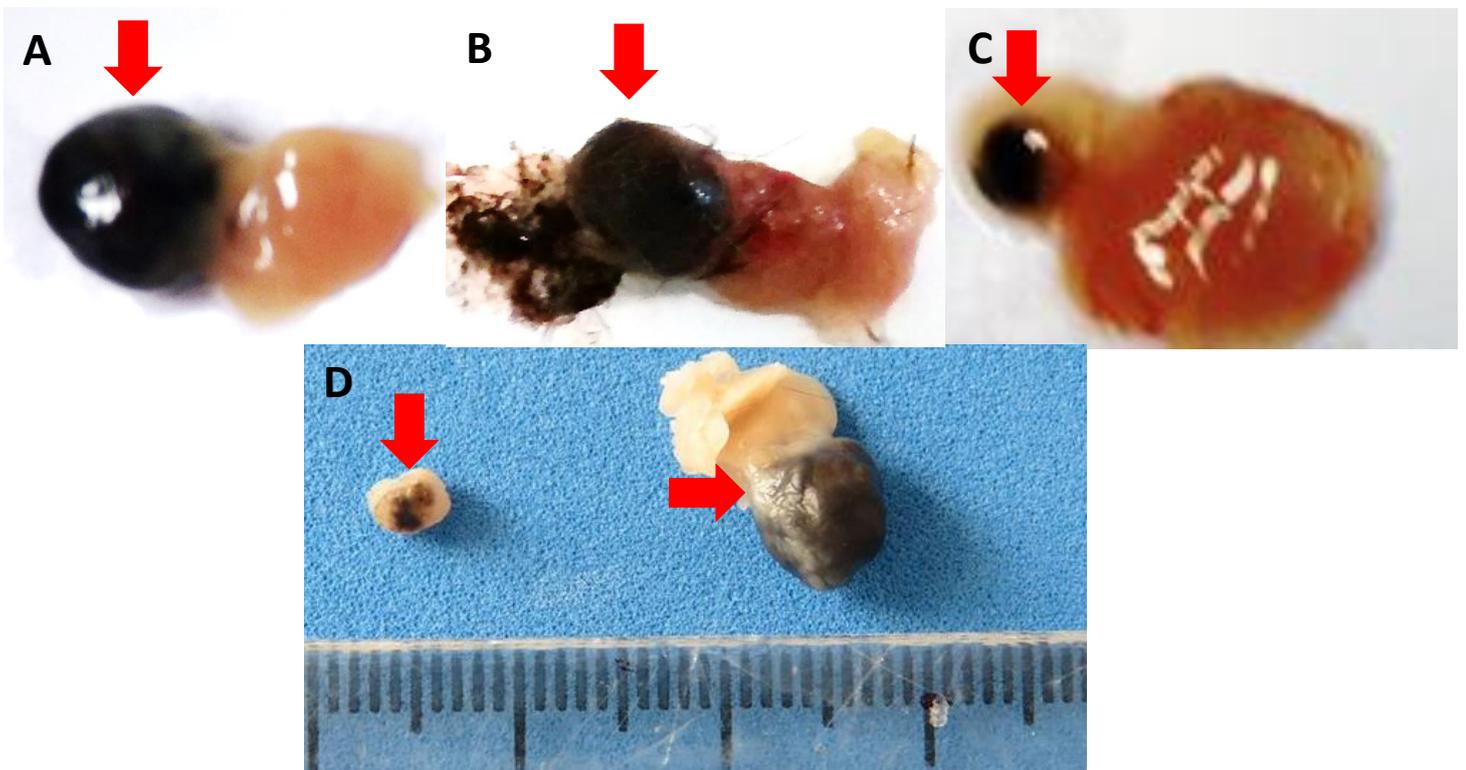


Figura 16: Metástase nos linfonodos; em A grupo controle, camundongo que não recebeu tratamento; em B camundongo pertencente ao grupo tratado com DMSO; em C camundongo tratado com mirtenal, em D comparação de um camundongo tratado com o não tratado.

5.4.1. Análise Histológica

Durante a necropsia foram retirados linfonodos de camundongos saudáveis e com metástase induzida, foram fixados e foi feita análise histológica, Linfonodos retirados de animais saudáveis estão dispostos nas Figuras 16 A e B; em C e D linfonodos retirados de camundongos não tratados 21 dias após a indução da metástase; linfonodos do grupo de camundongos que foram tratados com mirtenal es tão em E e F; observa –se grande invasão nos camundongos não tratados (C e D) e pequena invasão nos camundongos tratados com mirtenal(E e F).

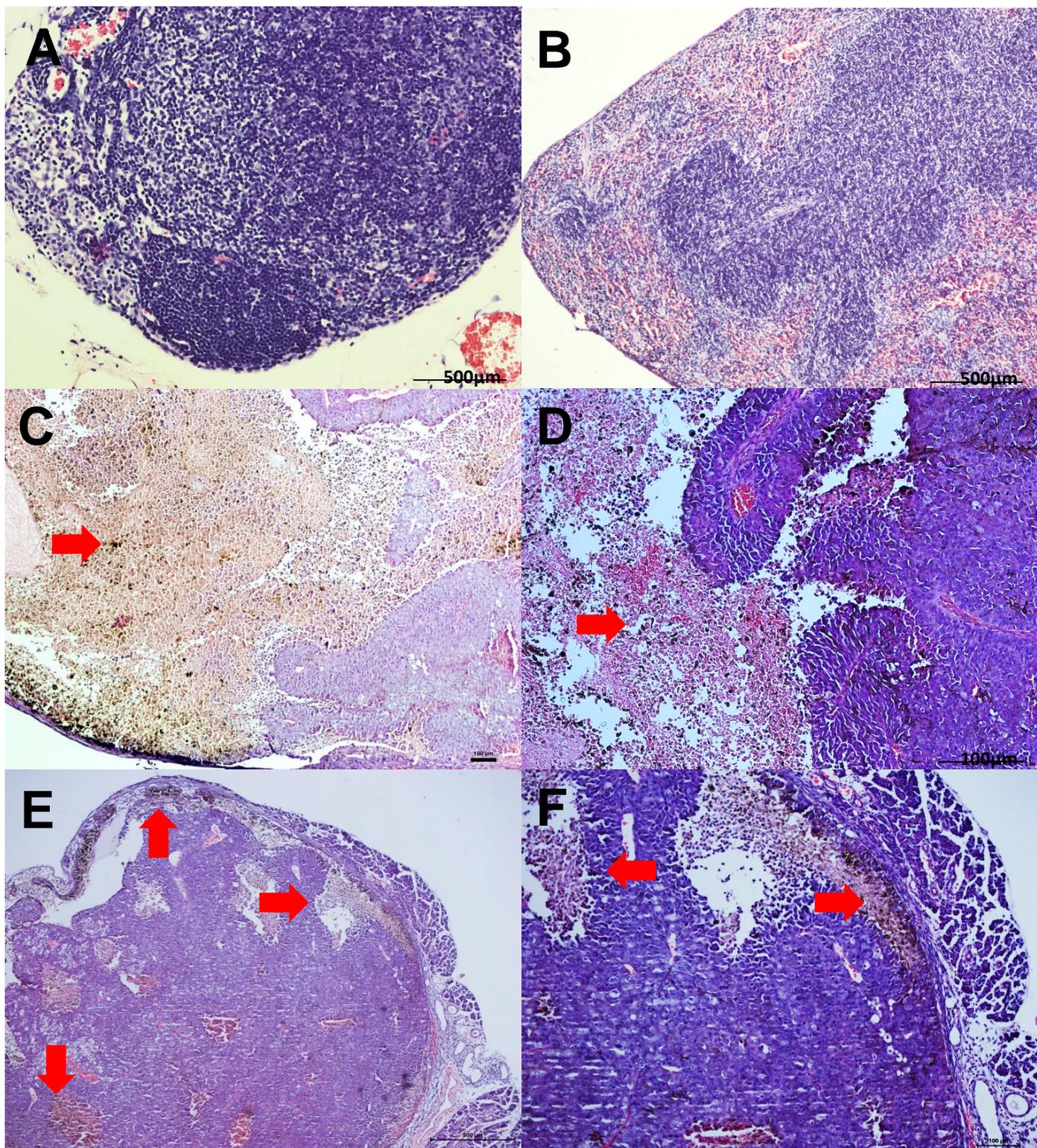


Figura 17: Análise Histológica: Em A linfonodo retirado de um camundongo saudável (aumento 100x); em B linfonodo retirado de um camundongo saudável aumento (20x); em C linfonodo retirado de um camundongo não tratado após 21 dias da indução da metástase aumento (10x); em D C linfonodo retirado de um camundongo não tratado após 21 dias da indução da metástase aumento (20x); em E linfonodo retirado de um camundongo tratado com mirtenal após 21 dias da indução da metástase (aumento 100x); em F linfonodo retirado de um camundongo tratado com mirtenal após 21 dias da indução da metástase (aumento 200x).As setas indicam os pontos de metástase , presença de melanina e necrose.

5.4.2. Controle de Peso

Durante todo o tratamento foi feito o acompanhamento de peso dos camundongos a fim de se correlacionar com os fatores clínicos e patológicos; camundongos tratados com mirtenal não apresentaram alteração de peso (Figura 17); camundongos não tratados com mirtenal apresentaram perda brusca de peso em torno de 20%; animais tratados estavam ativos, não houve baixa no peso ,aparência saudável , em animais não tratados houve baixa no peso, piora na sobrevivida, camundongos inativos.

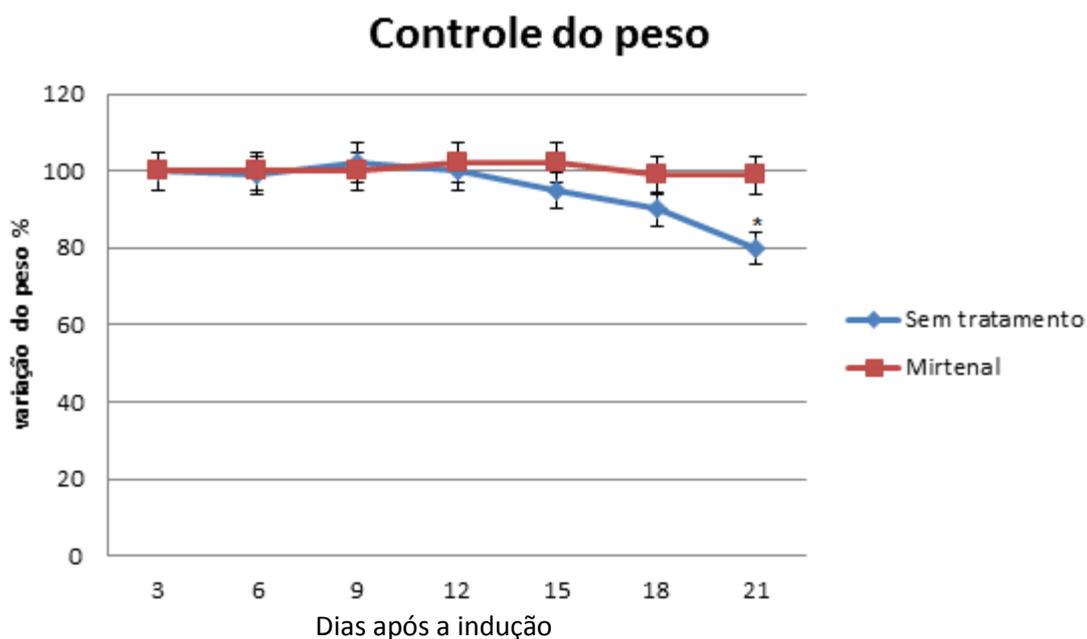


Figura 17: gráfico mostrando a variação do peso dos animais com metástase induzida nos linfonodos durante 21 dias de tratamento., eixo x taxa de sobrevivência ,eixo Y variação de peso camundongos. N=7 < 0,01

5.4.3. Atividade Hidrolítica da V ATPase

Foi feito o isolamento e purificação das membranas dos tumores formados na orelha dos camundongos, a atividade hidrolítica das frações de V-ATPases de membranas purificadas foram avaliadas quanto à taxa de inibição pelo terpeno Mirtenal na concentração 100µM. Em tumores retirados de camundongos controle e após a purificação ,quando incubados com mirtenal por 30 minutos, observou-se a inibição de 70% da atividade da V-ATPase (Figura 18 A). Na figura 18 B observa-se a atividade total da V- ATPase purificadas de tumores não tratados e tratados com mirtenal , tumores tratados apresentaram atividade 55% menor que os não tratados.

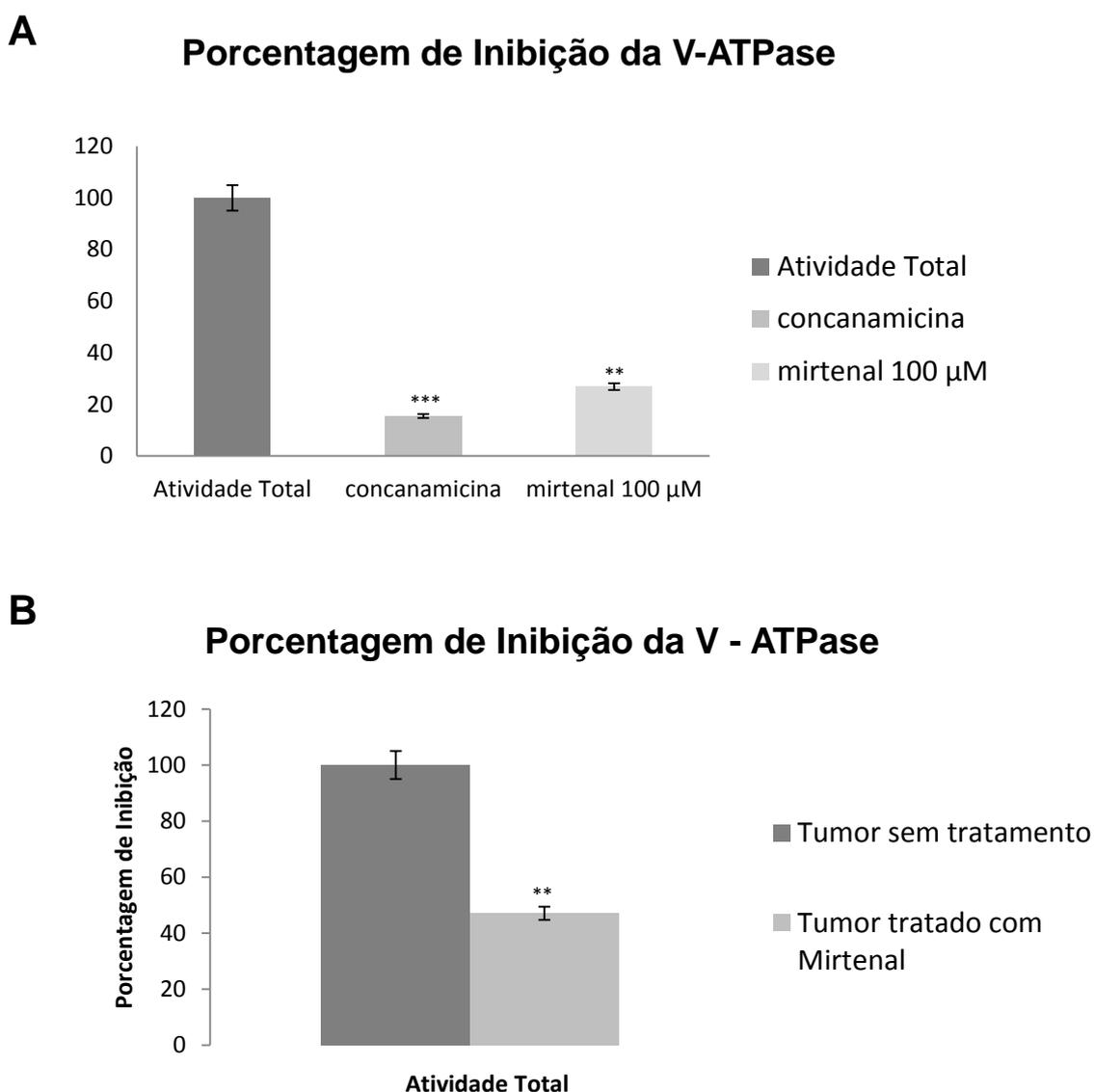


Figura 18: Atividade Hidrolítica: em A comparação da atividade da V-ATPase quando inibida com mirtenal e concanamicina , em B comparação da atividade da V-ATPase de membranas purificadas de camundongos não tratados e tratados com mirtenal. $P < 0,001$

6. Discussão

Estudos sobre melanoma vêm sendo desenvolvidos a passos largos nos últimos anos, o prognóstico tardio, malignidade da doença e resistência as drogas dificultam o tratamento e estimulam a busca por novos alvos terapêuticos com objetivo de aumentar e melhorar a qualidade da sobrevivência dos pacientes(INCA 2014).

Mudanças de acidificação/alcalinização do microambiente tumoral vem sendo descritas como responsável por processos como quimiorresistência, invasão, migração e proliferação. Há mais de 50 anos Warburg já relatava que esse fenômeno, se deve aumento do fluxo glicolítico com geração de ácido láctico. Atualmente sabemos que tal acidificação leva ao aumento na transcrição de fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e de interleucinas, intensificando a expressão de Catepsinas e metaloproteases, podendo levar também ao aumento da atividade do fator nuclear Kappa B(NF-κB), desencadeando a migração de vesículas lisossomais para periferia celular e a exocitose de seus produtos. As V-ATPases presentes nestas vesículas e na membrana plasmática das células tumorais, são responsáveis por esse controle fino da acidificação e alcalinização, de microdomínios do meio externo e do citoplasma, respectivamente.

Nosso grupo vem demonstrando a presença e importância da atividade das bombas de H^+ no controle da acidificação, Santos 2009 mostrou que as linhagens celulares J774A₁ (não carcinogênica) e B16F0 (pouco metastática), apresentam semelhantes perfis de atividades hidrolítica para as V-ATPases e F-ATPases, mas a linhagem B16F10 (muito metastática) apresentou uma maior atividade e sensibilidade aos inibidores. As V-ATPases têm como função principal a geração de fluxo de prótons (Hille e cols, 1993; Torigoe e cols, 2002; Nakamura, 2003; Nishi, Kawasaki-Nishi e Forgac, 2003; Wilkens, Inoue e Forgac, 2004; Saroussi e Nelson, 2009) e na esfera das células tumorais, a acidificação promovida por estas enzimas transportadoras tem se relacionado como o potencial de invasão e metástase tumoral (Sennoune e Martinez-Zaguilán, 2007; Fais e cols, 2007). Segundo Gottlieb e cols (1995) e Martinez-Zaguilán e cols (1998), a manutenção do pH influencia

alguns processos celulares como crescimento, mobilidade, tumorigênese, metástase, apoptose e resistência a drogas.

Atualmente, são comercialmente disponíveis os inibidores clássicos de V-ATPases, a Bafilomicina A1 e a concanamicina A, os quais são extremamente tóxicos e impróprios para o uso clínico em seres humanos induzindo a morte celular de forma indiscriminada (Nishihara, 1995). Portanto, torna-se estratégica a busca por novos inibidores menos agressivos e mais específicos, capazes de inibir a atividade das bombas de prótons e o processo de metástase.

Os efeitos tóxicos das drogas antitumorais se devem a baixa seletividade, ou seja, as drogas matam tanto as células cancerígenas quanto as células normais humanas. Portanto, substâncias que possam atuar diretamente sobre as células tumorais e poupar as células normais são um bom indicador para a continuidade dos testes de avaliação do potencial antitumoral. Dessa forma nossos primeiros testes foram os ensaios de DL50 do mirtenal de modo a se ajustar a concentração e utilizar a mais baixa possível e padronizar os intervalos do tratamento.

O mirtenal foi testado nas concentrações de 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg e 50 mg/kg, divididos em grupos com 7 animais cada, nos 3 primeiros dias 60% dos animais que foram administrados com 50 mg/kg e 40% dos animais que foram administrados com 20mg/kg morreram. Nos outros grupos não houveram mortes. Nas análises de Bioquímica Clínica, observou-se que os camundongos tratados com 15mg/kg não apresentaram alterações renais, foi feita a quantificação da Uréia e Creatinina(Figura 9); e também não observou-se alterações significativas na dosagem da atividade das enzimas hepáticas(Figura 10), as enzimas escolhidas foram Alanina transaminase (ALT) e Aspartato transaminase (AST) sendo a alteração considerada normal uma vez que em qualquer tratamento observa-se alterações hepáticas mesmo que mínimas. Nas análises histológicas(Figura 11) não se observou alterações no fígado, rins e coração na comparação de animais tratados com animais não

tratados. A partir dos dados de Martins 2013 e nossos testes de citotoxicidade foi eleita a concentração de 15mg/kg como a ideal para os tratamentos posteriores.

Corroborando com Martins (2013) que, *in vitro*, demonstrou a eficácia do mirtrenal como inibidor da V-ATPase , e indutor de apoptose em células de melanoma murinho B16F10 e B16F0 e melanoma humano Skmell – 5 , nossos dados demonstram a eficácia do mirtrenal no tratamento de camundongos com metástase induzidas no pulmão e linfonodos.

Vários modelos de melanoma em camundongos foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas (1-13) e são utilizadas para determinar o função de proteínas específicas em progressão do melanoma e se aproximam em certos aspectos biológicos ao ser humano facilitando a busca por novas drogas(Cobertt 2002). O mais conhecido e aceito é a indução intravenosa onde se observa metástase nos pulmões (;Guimarães *et al*, 2010). Existem também modelos de metástase óssea, ovário, reto e fígado (Sharon A *et al* 2003, Kishimoto *et al*, 2013). Em 2010 Bobek e colaboradores desenvolveram um novo tipo de metástase com células de melanoma em que por injeção de células cancerosas entre a pele e a cartilagem no lado dorsal da orelha pode se observar metástase nos linfonodos. Indução de células B16F10 no peritônio pode ,eventualmente, gerar linfonodos metastáticos(Chirivi RG *et al*, 1994)

Neste trabalho nós abordamos dois tipos diferentes de metástase, metástase pulmonar de Nakamura e metástase nos linfonodos de Chirivi.

Na Figura 12 observa-se a indução da metástase pulmonar pelo método de Guimarães *et al* (2010), células B16F10 foram induzidas na veia lateral da cauda dos camundongos. Os camundongos tratados por 21 dias com mirtrenal apresentaram redução significativa no numero de nódulos metastáticos no pulmão, além de apresentarem parâmetros clínicos e patológicos bem diferentes dos grupos tratados somente com DMSO e dos não tratados; as cobaias mantiveram peso constante ao longo do tratamento, aspectos clínicos bom animais estavam ativos e não apresentaram queda de pelo .

Sendo assim foi questionado se além de reduzir o número de metástases o tratamento com mirtenal poderia também ter reduzido o tamanho delas. Para isso a coloração de Hematoxilina foi utilizada para avaliar microscopicamente os pulmões com B16F10. Com essa coloração, os tumores de melanoma foram identificados como aglomerações celulares presentes principalmente próximas aos vasos sanguíneos nessas análises histológicas observa-se que o grupos tratados com mirtenal apresentaram somente uma pequena invasão dos pulmões, alvéolos ficaram intactos (Figura 13), os grupos sem tratamento possuem grande quantidade de células tumorais, hemorragias e abundancia de melanina.

Estes dados corroboram com Lu e cols que em 2005 demonstraram que inibições *in vivo* da atividade de V-ATPase pela técnica de RNAi induz o retardo da progressão do câncer humano pela diminuição da extrusão de prótons, ressaltando a hipótese que a regulação do pH celular pode ser o papel chave na homeostase tumoral. Matsuo e cols em 2011 descreveu também que o α -pineno que também é um monoterpene foi capaz de induzir apoptose em células B16F10.

O tratamento com mirtenal também foi efetivo em camundongos com metástase nos linfonodos, na figura 15 observa-se que houve grande diferença no tamanho da metástase quando o camundongo foi submetido ao tratamento com mirtenal. A fim de mostrar o percentual de invasão foi feita a análise histológica dessas amostras. Na figura 16 observa-se que nos camundongos tratados com mirtenal houve apenas uma pequena invasão do tecido, observa-se a porção cortical do linfonodo em que a capsula linfonodal continua intacta, e presença de pequenos números de aglomerações de células tumorais e pouca melanina. Nos camundongos não tratados observa-se uma área grande de necrose, abundancia de melanina e de células tumorais, a porção cortical do tecido perdeu sua forma.

Na Literatura, existem poucos relatos de tratamentos de camundongos com metástase nos linfonodos. O mais relevante e recente (Henry, *et al* 2015) que através de imunoterapia conseguiu inibir parcialmente as metástases.

Levando em consideração a importância da V-ATPase na progressão tumoral, empreendemos esforços para mostrar a atuação do mirtenal nas bombas. Foi feito fracionamento de membranas de tumores retirados da orelha dos camundongos e foi feita atividade da V-ATPase. Na figura 17 A, observa-se inibição de cerca de 80% da atividade da V-ATPase quando comparada com a total, em 17 B observa-se a inibição de 60 % da V-ATPase de tumores retirados do grupo tratado quando comparado com o grupo não tratado.

Esses dados corroboram com dados do grupo, Martins, 2011 demonstrou, *in vitro*, que o mirtenal é capaz de inibir a V-ATPase e também a F-ATPase, e observou-se também por Fluorescência o acúmulo de vesículas ácidas próximo a membrana plasmática. Em 2013 Martins demonstrou que o mirtenal é capaz de induzir apoptose em células de melanoma murino B16F10, sendo possível ver a retração do núcleo, redução do volume celular, ativação de caspases e liberação da fosfatidilserina.

A busca por novas drogas no combate ao câncer tem sido incessante, principalmente contra o melanoma que particularmente é um modelo muito agressivo. A acidificação tem sido descrita se suma importância nos processos tumorigênicos, nosso grupo vem estudando o mirtenal como inibidor de bombas de H⁺, estudos *in vitro* já comprovaram sua eficácia (Martins 2011, 2013); na literatura não há relatos sobre o uso desses monoterpenos em células tumorais, portanto este trabalho é o primeiro que demonstrou a aplicabilidade clínica do mirtenal, demonstrando ser um potencial quimioterápico no combate ao câncer.

7. Conclusão

Os resultados do presente trabalho sugerem que monoterpenos possuem capacidade de atenuar o processo de metástase em camundongos com metástase induzida por células de melanoma murinho B16F10.

Camundongos com metástase induzida no pulmão apresentaram drástica redução no número de nódulos metastáticos quando tratados com mirtenal; camundongos com metástase nos linfonodos apresentaram redução no tamanho da metástase. Observou-se que além dos resultados macroscópicos, o mirtenal foi capaz de reduzir a invasão dos tecidos,

Os testes de toxicidade com mirtenal *in vivo* demonstraram sua baixa toxicidade.

As bombas de H⁺ isoladas de tumores retirados dos camundongos foram inibidas por mirtenal em cerca de 80%.

Camundongos quando tratados com mirtenal apresentaram quadro clínico bom, com manutenção do peso normal, não observou-se queda de pelo e nem inatividade por parte do animal.

8. Referências

AMERICAN MELANOMA FOUNDATION (AMF), estimative 2009 <http://www.melanomafoundation.org/>

BACAC, M., STAMENKVIC, I. Metastatic Cancer Cell. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. v.3, p.221-247, 2008.

CLARK, G.A.; MCCORMICK, D.A.; LAVOND, D.G.; THOMPSON, R.F.; Effects of lesions of cerebellar nuclei on conditioned behavioral and hippocampal neuronal responses Brain Res 291:125-136, 1984.

CIPRIANO DJ, WANG Y, BOND S, HINTON A, JEFFERIES KC, QI J, FORGAC M., Structure and regulation of the vacuolar ATPases. Biochim Biophys Acta 1777(7-8), 599, 2008.

CORBETT T: Tumor Models in Cancer Research. Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp. 41-71, 2002.

DARIO NERI & CLAUDIU T. SUPURAN., Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. Nature Reviews Drug Discovery 10, 767-777 (October 2011)

DE MILITO A, FAIS S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. Future Oncol ;1:779-86, 2005.

DIEPHOLZ, MEIKEL, BÖRSCH, MICHAEL, BÖTTCHER, BETTINA, Structural organization of the V-ATPase and its implications for regulatory assembly and disassembly. Biochemical Society Transactions 36(5), 1027, 2008

DOMINGO, S. T., BAGÁN, J. V., JIMÉNEZ, Y., POVEDA R., MURILLO J., DÍAZ J. M., SANCHIS J. M., GAVALDÁ C., CARBONELL E, - Benign tumors of the oral mucosa: A study of 300 patients. Med Oral Patol Oral Cir Bucal , V.13, n.1, p.161-166, 2008.

D. NIELSEN, T. SKOVSGAARD, P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines, *Biochim. Biophys. Acta* 1139 169–183, 1992.

FANG, J. S., GILLIES, R. J. & GATENBY, R. A. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Sem. Cancer Biol.* **18**, 330–337 2008.

FORGAC, MICHAEL, Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8** (11), 917 (2007).

FUTAI, M., OKA, T., SUN-WADA, G., MORIYAMA, Y., KANAZAWA, H., E WADA, Y. Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. *Journal Experimental Biology*. 203, 107-116, 2000.

FUTAI, M., NAKANISHI., NAKANISHI-ATSUI, M., OKAMOTO, H., SEKIYA, M., NAKAMOTO, R.K. Rotational catalysis in proton pumping ATPases: From *E. coli* F-ATPase to mammalian, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* Volume 1817, cap 10, Pages 1711–1721, 2012.

GATENBY, R. A. & GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Rev. Cancer* **4**, 891–899 2004.

GERENGSER, G.A., ZHANG, J. Chloride ATPase pumps in nature: do they exist? *Biology Reviews.* 78, 197-218, 2003.

GHINJ, A.A, BURTON, G., GORS, E.G Metabolismo of gramine in *Hordeum Vulgare* plants: a time course study. *Phytochemistry*, 21:605 – 607, 1982 .

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 2011.

HINTON, A., BOND, S., FORGAC, M. , V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **457**(3), 589 2009

IMELOUANE, B., ELBACHIRI, A., WATHELET, J., DUBOIS, J., e Amhamdi, H. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the essential oil of *Lavandula dentate*. *World Journal of Chemistry*. 2010. 103-110.

INCA. Estimativa 2013. Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer, 2013. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>

KIERAN, S.; ROBERT A GATEMBY, R.A.; MAINI, P.A.; “Mathematical modelling of tumour acidity” 106-12. *In Journal of theoretical biology* 255 (1), 1988

KISHIMOTO, HIROYUKI; MOMIYAMA, MASASHI; AKI, RYOICHI; KIMURA, HIROAKI; SUETSUGU, ATSUSHI; BOUVET, MICHAEL; FUJIWARA, TOSHIYOSHI; HOFFMAN, ROBERT M. (2013): Dual-color imaging of tumor–host interaction in nestin-driven green fluorescent protein (ND-GFP) nude mice. *Figure_6.tif. PLOS ONE*.10.1371/journal.pone.0079453.g006.

KRISTINA A.E., LARSON, I, Z., DELP, G LISBETH M.V. JONSSON., N-Methyltransferase involved in gramine biosynthesis in barley: Cloning and Characterization *Phytochemistry* pages 2002-2008, 2006

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. - Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7.ed. Philadelphia. Elsevier Saunders, 2005.

KUTCHAN, TM, Alkaloid Biosynthesis – The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, 7: 1059 – 1070, 1995.

LELAND, T.J., HANSON, A.D. Induction of a specific N-methyltransferase enzyme by long-term heat stress during barley leaf growth. *Plant physiology*, 79:451-457, 1985 .

MARTINEZ-ZAGUILAN, R. LYNCH, R.M., MARTINEZ, G.M., E GILLIES, R.J. Vacuolar-type H⁺-ATPase are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *American Physiological Society*.93, 1015-1029, 1993.

MATSUO, AI, FIGUEIREDO, C.R., ARRUDA,D.C., PEREIRA,F,V., SCUTTI, J., α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model
Biochemical and biophysical research communications 411 (2), 449-454

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, n. 7, p.791–798, 2002.

NISHI T, FORGAC M. The vacuolar (H⁺)-ATPases nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*;3:94–103 2002.

N. KARTNER, V. LING, Multidrug resistance in cancer, *Sci. Am.* 260 44–51, 1989.

PÉREZ-SAYÁNS ,M, SOMOZA-MARTÍN,J,S., BARROS-ANGUEIRA,F., GAYOSO,P ., GÁNDARA REY, J,S., GARCÍA-GARCÍA,A Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPases
Cancer Letters 295 135–143, 2010.

SENNOUNE SR, BAKUNTS K, MARTÍNEZ GM, Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol*;286: 1443–52 2004.

SANTOS, J.M.C.O. Ativação diferencial de V-ATPases na membrana plasmática em linhagens de melanoma. Tese de mestrado. Centro de Biociências e Biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2009. 70p

SENNOUNE SR, LUO D, MARTINEZ-ZAGUILAN R. Plasmalemmal vacuolar-type H⁺-ATPase in cancer biology. *Cell BiochemBiophys* ;40:185–206, 2004.

SOBER AJ, CHUANG TY, DUVIC M. – Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. *J. Am. AcadDermatol.* 45:579-586, 2001.

SONDAK VK, TAYLOR JM, SABEL MS. - Mitotic rate and younger age are predictors of sentinela lymph node positivity: lessons learned from the generation of a probabilistic model. *Ann. Surg. Oncol.* 11:247-258, 2004.

SHARON A. VANTYGHM , CARL O. POSTENKA , ANN F. CHAMBERS , Advances in Brief Estrous Cycle Influences Organ-specific Metastasis of B16F10, Melanoma Cells 1 (2003)

STONE, D.K., XIE, X-S., WU, L-T., E RACKER, E. Proton translocating ATPases of clathrin coated vesicles, renal medulla and Ehrlich In: Forte, J.G., e Rector, F.C. *Hydrogen Ion Transport in Epithelia* .New York. Wiley, 1989.

SWALLOW, C.J., GRINSTEIN, S., E ROTSTEIN O.D. A vacuolar type H⁺ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *The Journal of Biological Chemistry.* 265, 7645-7654, 1990.

TAIZ, L., ZEIGER, E, *Fisiologia Vegetal.* Trad. Eliane Romanato ;Santarém et al. Porto Alegre. 3ª edição .719 p, 2004.

VÄÄNÄNEN, H.K., KARHUKORPI, E.K., SUNDQUIST, K., WALLMARK, B., ROINEN, I., HENTUNEN, T., TUUKKANEN, J, E LAKKAKORPI, P. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *The Journal of Cell Biology.* 111, 1305-1311, 1990.

WIECZOREK, H., BROWN, D., GRINSTEIN, S., EHRENFELD, J., HARVEY, W.R. Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *Bioessay* 21, 637-648, 1999.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Câncer.* Publicação online disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.