

## Efeito do álcool perílico na expressão gênica de células de adenocarcinoma de pulmão humano\*

Effect of perillyl alcohol on gene expression of human pulmonary adenocarcinoma cells

JULIANA DE SALDANHA DA GAMA FISCHER<sup>1</sup>, MARCELO SOARES DA MOTA E SILVA<sup>2</sup>, MARCOS EDUARDO PASCHOAL<sup>3</sup>, CERLI ROCHA GATTASS<sup>4</sup>, PAULO COSTA CARVALHO<sup>5</sup>, MARIA DA GLORIA DA COSTA CARVALHO<sup>4</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** Estudar a ação do álcool perílico na expressão gênica de células de adenocarcinoma de pulmão humano. **Métodos:** Incubaram-se células de adenocarcinoma de pulmão com álcool perílico em diluições que variaram entre 0,03% e 0,0003% por 48 horas. Observaram-se as alterações na morfologia celular e quantificou-se a viabilidade celular pelo método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo). Analisou-se a síntese de proteínas das amostras previamente marcadas radioativamente com <sup>35</sup>S, através de eletroforese em gel de poliácridamida. Determinou-se a expressão das proteínas p53 e p42/44 através do método de Western Blot. **Resultados:** Após 48 horas de incubação, observaram-se alterações na morfologia celular para a diluição de 0,03% de álcool perílico, as quais foram pouco verificadas em diluições superiores a 0,003%. A inibição da viabilidade celular foi de 60,17% (p < 0,001), 15,62% (p < 0,001) e 11,53% (p < 0,05) para as diluições de 0,03%, 0,003% e 0,0003% de álcool perílico, respectivamente. Os resultados mostram a indução de proteínas de 110 kDa, 42 kDa e 28 kDa. Não se observou variação estatisticamente significativa para a expressão da proteína p53. Em comparação com a expressão de  $\alpha$ -tubulina, a diluição de 0,003% de álcool perílico provocou uma diminuição marcante da fosforilação da p44 e um aumento da fosforilação da p42. **Conclusão:** Os resultados apresentados sugerem novos caminhos metabólicos da ação do álcool perílico em células de adenocarcinoma de pulmão humano.

**Descritores:** Adenocarcinoma; Neoplasias pulmonares; Monoterpenos; Cultura de células; Pulmão/citologia

### ABSTRACT

**Objective:** To study the effect of perillyl alcohol on the gene expression of human pulmonary adenocarcinoma cells. **Methods:** Pulmonary adenocarcinoma cells were incubated with perillyl alcohol in dilutions ranging from 0.03% to 0.0003% for 48 hours. Alterations were observed in the cell morphology, and cell viability was quantified using [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assays. Protein synthesis of samples previously targeted with <sup>35</sup>S was analyzed using electrophoresis on a polyacrylamide gel. Expression of the proteins p53 and p44/42 was determined using the Western blot method. **Results:** After 48 hours of incubation, greater numbers of morphological alterations were observed in cells treated with the 0.03% perillyl alcohol dilution than in those treated with perillyl alcohol diluted to 0.003% or further. Treatment with perillyl alcohol dilutions of 0.03%, 0.003% and 0.0003% inhibited cellular viability by 60.17% (p < 0.001), 15.62% (p < 0.001) and 11.53% (p < 0.05), respectively. The results show that 28-kDa, 42-kDa and 110-kDa proteins were induced. No statistically significant effect on p53 expression was observed. In comparison with the expression of  $\alpha$ -tubulin, the 0.003% perillyl alcohol dilution induced an increase in p42 phosphorylation and a marked decrease in p44 phosphorylation. **Conclusion:** The results suggest that there are other, previously undescribed, metabolic pathways for perillyl alcohol effects in human pulmonary adenocarcinoma cells.

**Keywords:** Adenocarcinoma; Lung neoplasms; Monoterpenes; Cell culture; Lung/cytology

\* Trabalho realizado no Laboratório de Oncologia Molecular do Instituto de Doença do Tórax do Hospital Universitário Clementino Fraga - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Órgão Financiador: Capes e CNPq - Processo número: 5506532002-3

1. Mestre em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

2. Acadêmico de Iniciação Científica do Hospital Universitário Clementino Fraga - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

3. Doutor do Setor de Tisiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

4. Professora Adjunta e Chefe do Laboratório da Expressão Gênica do Laboratório do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

5. Mestrando do Instituto Oswaldo Cruz - IOC - Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Endereço para correspondência: Maria da Glória da Costa Carvalho. Rua Nascimento Silva, 241/501, Ipanema - CEP:22421-020, Rio de Janeiro - RJ, Brasil. Tel: 55 21 2275-9789. E-mail: mgccosta@biof.ufrj.br

Recebido para publicação em 9/3/05. Aprovado, após revisão, em 20/5/05.

## INTRODUÇÃO

Pacientes com câncer de pulmão possuem uma taxa de sobrevida extremamente baixa, o que reflete o seu alto índice de mortalidade. Os principais motivos desse fato são o diagnóstico tardio da doença e a ineficácia dos tratamentos utilizados. Por essas razões, faz-se necessária a busca de novos tratamentos quimioterápicos.

Uma alternativa que vem sendo pesquisada para o tratamento de tumores sólidos é a utilização do álcool perílico (AP). O AP é um monoterpene isolado dos óleos essenciais de menta, cerejas e sementes de aipo, dentre outras plantas.<sup>(1)</sup> Estudos em animais mostram que o AP é um agente quimioterápico eficaz na regressão de tumores de mama,<sup>(2)</sup> pâncreas,<sup>(3)</sup> fígado<sup>(4)</sup> e próstata,<sup>(5)</sup> e agente quimio-preventivo nos tumores de cólon,<sup>(6)</sup> melanomas<sup>(7)</sup> e neuroblastomas.<sup>(8)</sup> O AP atua na indução de apoptose de células tumorais sem afetar as células normais e pode reverter as células tumorais para um estágio diferenciado.<sup>(1)</sup> A inibição da transdução de sinal através da membrana pelo AP resulta da não ancoragem da proteína Ras através da inibição de sua isoprenilação. Em adenocarcinoma pulmonar, a proteína Ras apresenta mutação em 19% dos casos, daí constituir-se em um importante alvo terapêutico.<sup>(9)</sup>

Com base nessa problemática, o objetivo deste trabalho foi estudar a ação do álcool perílico na expressão gênica de células de adenocarcinoma de pulmão humano, para melhor compreender seu mecanismo de ação como agente quimioterápico.

## MÉTODOS

Foram obtidas células de adenocarcinoma de pulmão A549 da *American Type Culture Collection*, as quais foram cultivadas sob a forma de monocamadas em meio *RPMI 1640 Gibco*. Para o subcultivo das células, lavaram-se as monocamadas confluentes ( $1,0 \times 10^7$  células/garrafa) em solução salina fosfato PBS, pH 7,2 (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,15%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), fez-se o tratamento, rapidamente, com solução de tripsina (0,25% em PBS) e ressuspendeu-se, por agitação suave, em meio de cultura novo. Adicionou-se o álcool perílico (Sigma-Aldrich, 96%) às monocamadas de células semiconfluentes nas diluições de 0,03%, 0,003% e 0,0003%, as quais

foram mantidas a 37°C, em estufa de gás carbônico, por 48 horas.

Quantificou-se a viabilidade celular através do método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo), conforme descrito por Mosmann.<sup>(10)</sup> Resumidamente, cresceram 104 células/poço em placas de 96 poços que, 24 horas depois, foram incubadas com álcool perílico nas diferentes diluições anteriormente citadas. Após 48 horas, adicionaram 20  $\mu\text{L}$  de MTT (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a cada poço e as células permaneceram no escuro, a 37°C, por quatro horas. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e dissolveu-se o precipitado com 150  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfoxido. A leitura foi feita em leitor de *ELISA* (BenchMark, Biorad) no comprimento de onda de 570 nm e filtro de referência de 630 nm.

Incubaram-se as monocamadas de células semiconfluentes com AP nas diluições de 0,03%, 0,003% e 0,0003%. Após 48 horas, retirou-se o meio de cultura, o qual foi substituído pelo meio *Eagle's Minimum Essencial Medium*, isento de soro e contendo 40  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  de metionina, durante 120 minutos. Após a incorporação, tratou-se a monocamada celular com tampão: Tris-HCl, pH 6,8, 62,5 mM; sódio dodecil sulfato (SDS), 2%; glicerol, 10%; 2 mercaptoetanol, 5%; azul de bromofenol, 0,001%. Foram então analisadas as proteínas marcadas radioativamente através de auto-radiografia.

Analisaram-se as proteínas fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, segundo a técnica descrita por Laemmli, em 1970.<sup>(11)</sup> Determinou-se o peso molecular das proteínas por co-eletroforese de proteínas de peso molecular conhecido (Life Technology, Inc; Gaithersburg, MD): miosina (200 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (68 kDa), beta-lactoglobina (18,4 kDa) e lisosima (14,3 kDa). Coraram-se os géis com azul de Coomassie, os quais, após secagem, foram expostos ao filme radiográfico *Kodak X-Omat YAR- S* (Kodak, USA).

Obteve-se o traçado densitométrico da auto-radiografia utilizando-se o aparelho *LKB 2202 Ultrascan Laser Densitometer*. O traçado representa o perfil protéico da auto-radiografia das células-controle e das incubadas com álcool perílico após 48 horas.

Para o teste de *Western Blot* para as proteínas cinases p44/42 (ERK1 e ERK2),  $\alpha$ -tubulina e p53 fracionaram-se as proteínas em gel de SDS - PAGE

a 12%,<sup>(11)</sup> os quais foram transferidos para a membrana de nitrocelulose por eletroblotting e submetidos à reação de imunodeteção, separadamente para cada anticorpo. Bloqueou-se a membrana de nitrocelulose da marca Gibco BRL - Life Technologies, com solução a 5% p/v de leite em pó desnatado em TBST (10 mM Tris, pH 8,3; 150 mM NaCl; 0,15% Tween 20).

Após três lavagens de quinze minutos em tampão TBST, incubou-se a membrana, separadamente, com os anticorpos monoclonais anti-p53 (Mab 1801, Gibco), anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin clone B-5-1-2) e anti-ERK 1/2 (Phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/ Try 204) E10 monoclonal antibody), Cell signaling technology) por 24 horas, em diluições recomendadas pelo fabricante. Posteriormente, incubou-se novamente a membrana, por uma hora, com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado à peroxidase (Amersham Biosciences, USA), na diluição de 1:1.000. Visualizaram-se os complexos pelo kit de revelação de *quimiluminescência* da Amersham (Enhanced Chemiluminescence System- ECL, Amersham) com exposição a um filme radiográfico Kodak X-Omat YAR- S (Kodak, USA).

Realizaram-se três experimentos independentes em triplicatas e a significância estatística foi

analisada através do teste t de Student, não pareado. Foram consideradas diferenças significativas aquelas que apresentaram  $p < 0,05$ .<sup>(12-13)</sup>

## RESULTADOS

Estudaram-se as alterações na morfologia celular em diluições de AP compreendidas entre 0,03% e 0,0003%. A Figura 1A mostra a morfologia das células não incubadas com AP. A Figura 1B mostra que a diluição de 0,03% provocou intensa lise celular, a qual foi pouco observada em diluições de 0,003% e 0,0003% (Figuras 1C e 1D), quando em comparação com células-controle (Figura 1A). A inibição da viabilidade celular, quantificada através do método do MTT, foi de 60,17% ( $p < 0,001$ ), 15,62% ( $p < 0,001$ ) e 11,53% ( $p < 0,05$ ) para as diluições de AP de 0,03%, 0,003% e 0,0003%, respectivamente (Figura 2). Estes resultados estão de acordo com as alterações de morfologia celular mostradas na figura 1.

Com o objetivo de verificar se as alterações no controle da expressão gênica ao nível da síntese protéica poderiam estar associadas aos resultados mostrados nas Figuras 1 e 2, analisou-se o padrão de proteínas através da incorporação de precursor radioativo (Figura 3). Os resultados mostram

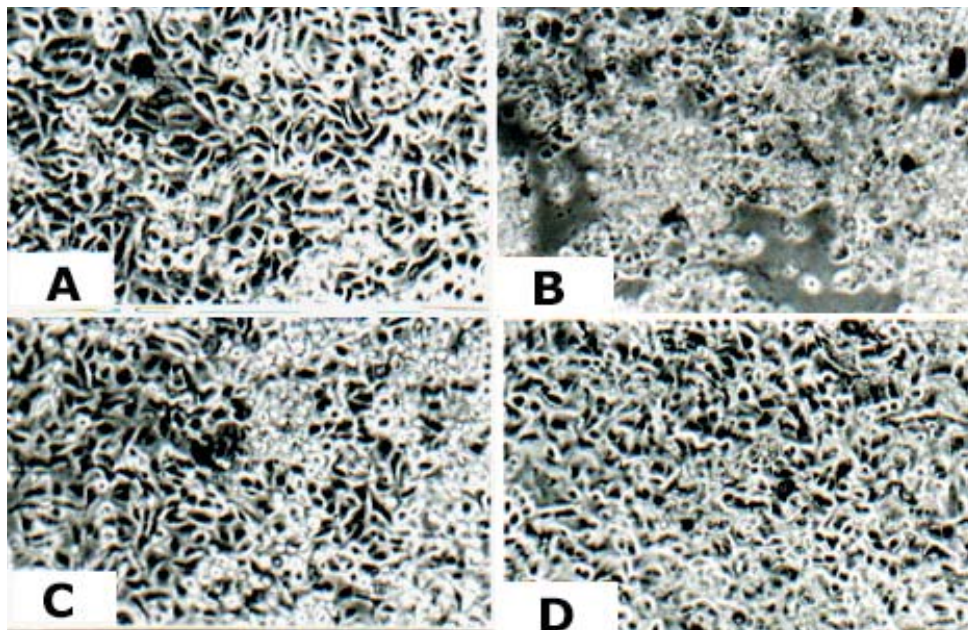


Figura 1 - Morfologia das células A549 após 48 horas de incubação com o álcool perílico nas diluições de: A: 0,00% ; B: 0,03% ; C : 0,003% e D: 0,0003%

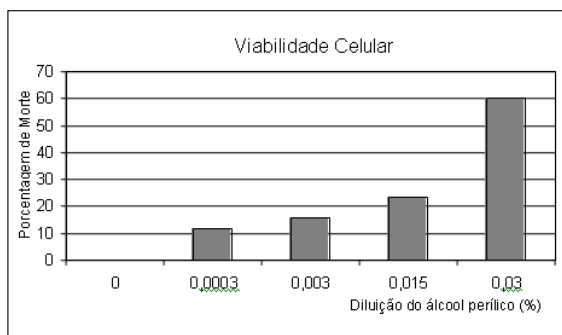


Figura 2 - Viabilidade celular após 48 horas de tratamento com álcool perílico

que o tratamento com 0,003 % de AP leva à indução de proteínas de 110 kDa, 42 kDa e 28 kDa, não observada na diluição de 0,0003%, como indicam as setas na auto-radiografia (Figura 3A) e no traçado densitométrico (Figura 3B). Como o AP levou à diminuição da viabilidade celular (Fi-

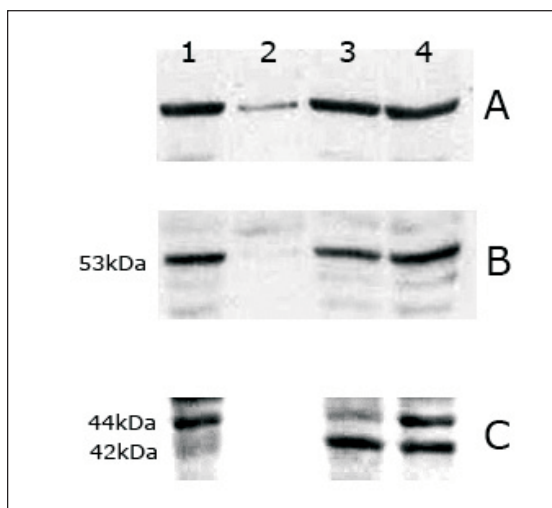


Figura 4 - Western Blot: A -  $\alpha$ -tubulina, B - p53 e C - p44/42. Canal 1: células A549 controle; Canais 2 a 4: células A549 incubadas com álcool perílico nas diluições de 0,03%, 0,003% e 0,0003%, respectivamente, por 48 horas

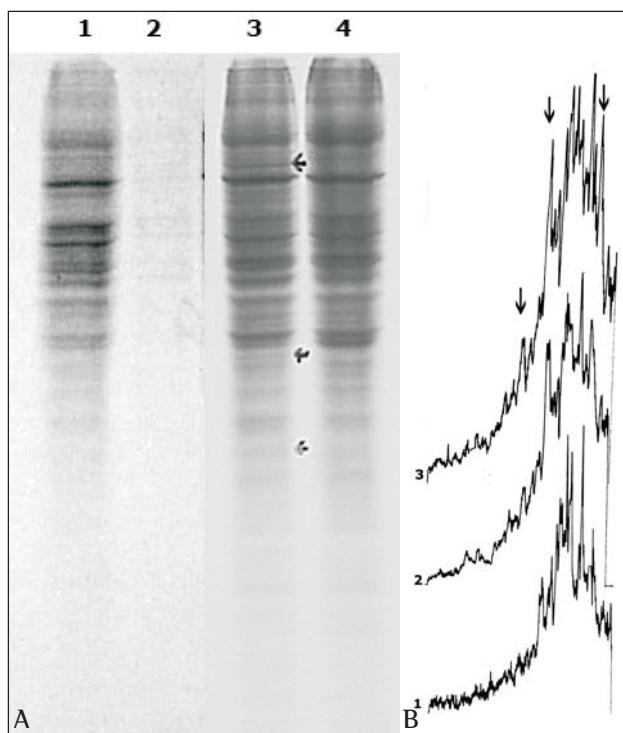


Figura 3 - A - Auto-radiografia do gel de poliacrilamida: canal 1 - células A549 controle; canais de 2 a 4 - células A549 incubadas com 0,03%, 0,003% e 0,0003% de álcool perílico, respectivamente, por 48 h. B - Densitometria da auto-radiografia: 1 - células A549 controle; 2 - células A549 com 0,0003% de álcool perílico; 3 - células com 0,003% de álcool perílico. As setas indicam as alterações devidas à ação do álcool perílico

gura 2), analisou-se, também, o possível envolvimento de proteínas presentes nas vias de proliferação e apoptose (Figura 4). Determinou-se a expressão das proteínas p53 e p44/42 através do método de *Western Blot*. A proteína  $\alpha$ -tubulina foi utilizada como controle interno. Observou-se a mesma quantidade de  $\alpha$ -tubulina para todas as diluições (Figura 4A), exceto para a diluição de 0,03% de AP, em que a viabilidade celular se encontrou reduzida (Figura 2). Os resultados apresentados na Figura 4B mostram que não ocorreu variação estatisticamente significativa para a p53. Em comparação com a expressão de  $\alpha$ -tubulina, a diluição de 0,003% de AP provocou uma diminuição marcante da fosforilação da p44 e um aumento da fosforilação da p42 (Figura 4C).

## DISCUSSÃO

A compreensão do perfil molecular dos tumores humanos é essencial para o uso efetivo de agentes quimioterápicos. As alterações celulares mostradas neste trabalho sugerem que o AP pode ser um potencial quimioterápico em câncer de pulmão. Os resultados apresentados mostram um novo mecanismo de ação desse agente, através de alterações das vias que regulam o crescimento e a diferenciação celular.

As proteínas cinases p42 e p44 estão presen-

tes na cascata de cinases que regulam o crescimento e a diferenciação celular. As *mitogen activated protein* cinases são ativadas por uma variedade de fatores extracelulares, incluindo fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores.<sup>(14-</sup>

<sup>16)</sup> A ativação das *mitogen activated protein* cinases ocorre através da fosforilação da tirosina e treonina (202 e 204 de *mitogen activated protein* cinases humanas (ERK 1) ou 183 e 185 de rato (ERK 2)) na seqüência aminoácidos treonina e tirosina (TEY) por uma única cinase.<sup>(17-18)</sup> Os resultados indicam

que o AP é capaz de induzir a fosforilação da proteína p42 para as diluições de 0,003% e 0,0003% em 48 horas (Figura 4C) e de inibir a fosforilação da p44. O significado fisiológico desta ativação/inibição *in vitro* ainda não está bem estabelecido.

Os resultados mostram, pela primeira vez, que a ERK1/2 é um dos alvos moleculares da modulação da resposta ao AP em células de adenocarcinoma de pulmão humano. O AP estaria atuando diretamente no estado de fosforilação da cinase regulada por sinal extracelular (ERK), e não somente através da inibição da farnesilação da proteína Ras.

## AGRADECIMENTOS

À professora Maria Christina Soares Rebello, pela colaboração na discussão do trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Belanger JT. Perillyl alcohol: applications in oncology. *Altern Med Rev.* 1998;3(6):448-57.
2. Haag JD, Lindstrom MJ, Gould MN. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Res.* 1992;52(14):4021-6.
3. Stark MJ, Burke YD, McKinzie JH, Ayuobi AS, Crowell PL. Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Lett.* 1995;96(1):15-21.
4. Mills JJ, Chari RS, Boyer IJ, Gould MN, Jirtle RL. Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Res.* 1995;55(5):979-83.
5. Jeffers L, Church D, Gould M, Wilding G. The effect of perillyl alcohol on the proliferation of human prostatic cell lines. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1995;36:303.
6. Reddy BS, Wang CX, Samaha H, Lubet T, Steele VE, Kelloff GJ, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res.* 1997;57(3):420-5.
7. He L, Mo H, Hadisusilo S, Oureshi AA, Elson CE. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. *J Nutr.* 1997;127(5):668-74.
8. Shi W, Gould MN. Induction of differentiation in neuro-2A cells by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Lett.* 1995;95(1-2):1-6.
9. Kawamura MT. Estudo das alterações moleculares em soros de pacientes com câncer de pulmão[tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2002. 98p.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
12. Kanji GK. 100 statistical tests. London: Sage;1983.
13. Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL. *Epidemiologia.* São Paulo: Atheneu; 2003.
14. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 1995;80(2):179-85.
15. Hunter T. Protein kinase and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 1995;80(2):225-36.
16. Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanism and specificity. *Cell.* 1995;80(2):199-211.
17. Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem.* 1995;270(25):14843-6.
18. Burack WR, Sturgill TW. The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry.* 1997;36(20):5929-33.