

CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA DE HISTONA H3 DIMETILADA EM CÉLULAS CANCERÍGENAS TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha x villosa* Huds

Juliana Mainenti Leal Lopes¹, Erick Esteves de Oliveira¹, Sara Malaguti Andrade Soares¹, Sandra Bertelli Ribeiro Castro¹, Daniel Sales Pimenta², Luciana Moreira Chedier², Ana Paula Ferreira¹, Heloisa D'Avila da Silva Bizarro¹, Cíntia Marques Coelho¹.

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

²Departamento de Botânica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

Resumo

Estudos recentes têm demonstrado alterações nas informações epigenéticas em células cancerosas, essas podem ocorrer em diferentes estágios do tumor e contribuem para o desenvolvimento do cancro. Vários estudos têm sugerido que monoterpenos e sesquiterpenos podem representar novas fontes de biomoléculas para utilização na prevenção dessa doença. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* Huds. no padrão de metilação da histona H3 em células de sarcoma J774 A.1 de camundongos. Macrófagos J774 A.1 foram cultivados com meio RPMI a 37° C em CO₂ a 5%. Em seguida, foram tratadas com o óleo essencial de *Mentha x villosa* Huds. a uma concentração final de 0,1µg/ml durante 24 horas, para controle, células J774 A.1 foram tratadas apenas com o diluente 0,1% de DMSO em meio RPMI. Posteriormente submetidas à técnica de imunolocalização com um anticorpo primário específico de dimetilação da histona H3 e um anticorpo secundário conjugado com Isotiocianato de fluoresceína (FITC). As lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI e analisadas por microscopia de fluorescência. Os resultados indicaram a presença de histonas dimetiladas nas células tratadas com óleos essenciais extraídos de *Mentha x villosa* Huds., não visualizadas nos controles. Esses resultados demonstraram que o tratamento leva a modificação no padrão de histonas, a compreensão destas alterações pode auxiliar nos estudos para tratamentos alternativos de câncer.

Palavra-chave: células cancerosas, histona modificada, imunolocalização, *Mentha x villosa* Huds. e óleo essencial.

Introdução

Estudos recentes têm demonstrado que, além de alterações de sequência no genoma, também existem alterações na informação epigenética em células cancerosas (Gal-Yam, 2008; Kurdistani, 2007), sendo essas alterações mais frequentes que as no genoma, desta forma estudos epigenéticos são de grande importância para uma melhor compreensão do desenvolvimento da doença (Oliveira, 2010).

A primeira mudança nessa informação em células cancerosas foi a perda de metilação do DNA em dinucleotídeos CpG (Feinberg, 2004). As alterações epigenéticas podem ocorrer em diferentes estágios do tumor e contribuem para o desenvolvimento e progressão do cancro. (Gal-Yam, 2008). Vários estudos têm sugerido que monoterpenos e sesquiterpenos podem representar uma nova classe de agentes para utilização na prevenção do cancro através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que levam à inibição do ciclo celular e/ou morte celular programada, que é particularmente importante no caso de tumores altamente resistentes à quimioterapia e também para minimizar os efeitos indesejáveis dos medicamentos utilizados nos tratamentos atuais (Antosiewicz et al., 2008). O padrão de metilação em histonas é altamente variável devido a alterações ambientais (Turner, 2011). Os tratamentos com óleo essencial *Mentha x villosa* Huds. são exemplos deste tipo de alteração.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do óleo essencial no padrão de metilação da histona H3 em uma linhagem celular monocítica J774 A.1 de camundongos leucêmicos.

Material e Métodos

Folhas de *Mentha x villosa* Huds. foram coletadas na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da UFJF. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação utilizando-se extrator do tipo *Clevenger* modificado durante 2h. Macrófagos da linhagem J774 A.1 foram cultivadas e mantidas em meio RPMI com 5% de soro fetal bovino e incubadas em estufa de atmosfera úmida com 5% (v/v) de CO₂ à 37°C. Essas células foram raspadas com *cellscraper*, contadas e semeadas 2 x 10⁵ células/poço em uma placa de 24 poços. Após 24 horas, o óleo essencial foi diluído na concentração final foi de 0,1 mg/ml adicionados aos poços por 24 horas. Como controle foi utilizado o diluente do óleo essencial DMSO a 0,4% para tratamento de células em meio RPMI com 5% de soro fetal bovino e em dois poços contendo apenas as células em meio RPMI com 5% de soro fetal bovino, para constatar se houve alguma auto-fluorescência.

Posteriormente, as células foram submetidas a uma técnica de imunolocalização com um anticorpo primário específico com concentração final de 1:50, para dimetilação da histona H3 e um anticorpo secundário conjugado com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) que foi diluído 1:500. As lâminas foram montadas com meio de montagem Vectashield com DAPI e analisadas por microscopia de fluorescência Olympus BX 51.

Resultados e Discussão

O óleo essencial de *Mentha x villosa* Huds. apresenta como constiuente majoritário o monoterpene epoxipulegona. A Figura 1 apresenta o padrão de metilação dos macrófagos J774 A.1, após tratamento com o óleo essencial de *Mentha x villosa* Huds. Os resultados obtidos mostraram que as células não tratadas, crescidas apenas em DMSO, não apresentaram marcações indicando que não há presença de histona H3 lisina 9 dimetiladas. O tratamento diferenciou o padrão de metilação dessas células (Figura 1), o controle DMSO não mostra nenhuma marca de histona H3 dimetilada (Figura 1A e 1B), enquanto as células tratadas com o óleo essencial apresentam marcas (Figura 1C e 1D).

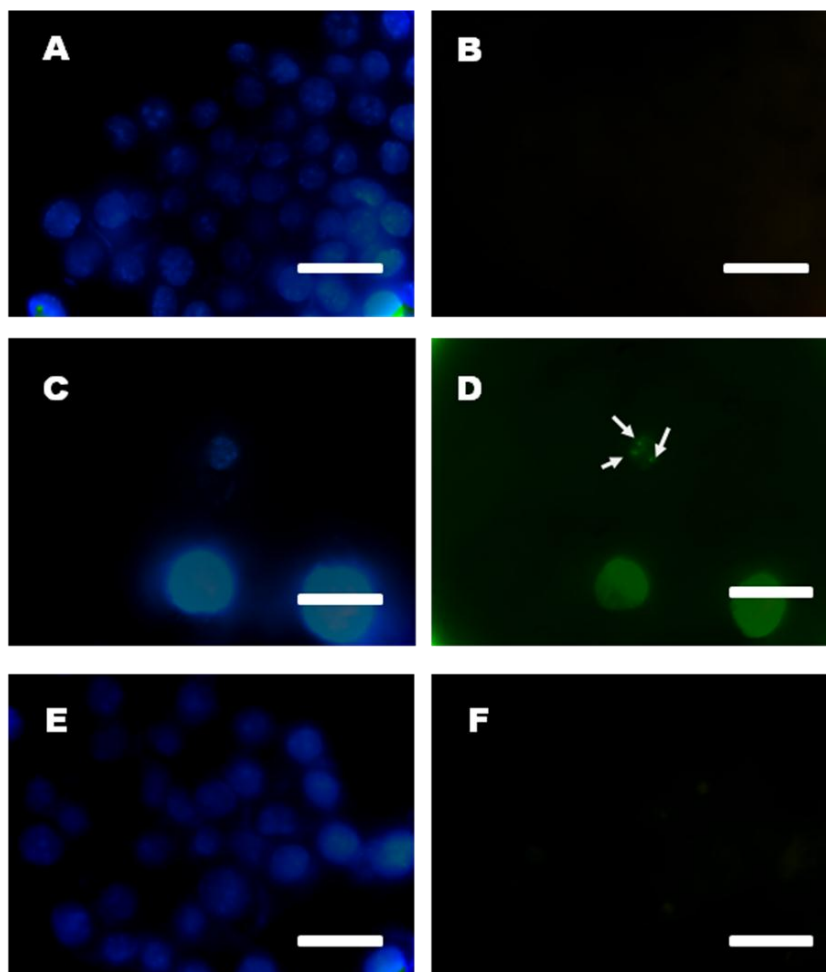


Figura1. Imunolocalização de Histona H3 dimetilada em células J774 A.1 visualizadas em microscópio de fluorescência. No painel da esquerda, o campo é visualizado no filtro UV e no painel da direita é visualizado no filtro verde, a barra corresponde a 5µm. (A) Células J774 A.1 controle crescidas apenas com DMSO. (B) Células J774 A.1 controle crescidas apenas com DMSO, mostra que não há marcações. (C) Células J774 A.1 tratadas com o óleo essencial de *Mentha x villosa* Huds. (D) Células J774 A.1 tratadas com o óleo essencial de *Mentha x villosa* Huds. visualizadas, setas brancas mostram marcas de histonas H3 dimetilada. (E) Células J774 A.1 crescidas apenas em meio RPMI. (F) Células J774 A.1 crescidas apenas em meio RPMI, mostra que não houve autofluorescência.

Esse resultado mostra que o tratamento leva a uma modificação da histona, uma vez a ligação do anticorpo foi identificada (Figura 1D), e talvez isso conduzirá à morte celular. Já foi registrado que a metilação da histona H3 está relacionada à ativação de um gene supressor do câncer (Sun *et al.*, 2009), o que demonstra uma possível via de ação do óleo essencial analisado. Entender essas modificações pode ajudar em estudos para alternativas no tratamento ao câncer.

Agradecimentos

Agradecemos a FAPEMIG, CNPq, Capes e UFJF pelo apoio financeiro e estrutural para a realização do presente trabalho.

Referências

ANTOSIEWICZ, J.; ZIOLKOWSKYW, K. A. R. S. ; POWOLNY, A. A.; SINGH, S. V. 2008. Role of oxygen intermediates in cellular responses to dietary cancer chemopreventive agents.

Planta Medica.

FEINBERG, A. P.; TYCK, B. The history of cancer epigenetics. 2004. **Nature reviews Cancer.**

GAL-YAM, E. N.; SAITO, Y; EGGER, G.; JONES, P. A. 2008. Cancer Epigenetics: Modifications, Screening, and Therapy. **Annual Review of Medicine.** Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the Tip60 tumor suppressor

SUN, Y.; JIANG, X.; XU, Y.; AYRAPETOV, M. K.; MOREAU, L. A.; WHETSTINE, J. R.; PRICE, B. D. 2009. Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the Tip60 tumor suppressor. **Nature cell biology.**

KURDISTANI, S. K. 2007. Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view. **British Journal of Cancer.**

OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C.; ANDIA, D. C.; PARDO, A. P. S. 2010. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia.**

TURNER, B. M. 2011. Environmental sensing by chromatin: An epigenetic contribution to evolutionary change. **FEBS letters.**