

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
FELIPE AUGUSTO BARBOSA BISCAIA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MICROVESÍCULAS DE MELANOMA CULTIVADO  
COM DEXAMETASONA SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA  
TRATADO COM TAMOXIFENO

PONTA GROSSA  
2018

FELIPE AUGUSTO BARBOSA BISCAIA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MICROVESÍCULAS DE MELANOMA CULTIVADO  
COM DEXAMETASONA SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA  
TRATADO COM TAMOXIFENO

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre pela Pós Graduação em Ciências  
Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta  
Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero

PONTA GROSSA

2018

B621

Biscaia, Felipe Augusto Barbosa

Avaliação do efeito de microvesículas de melanona cultivado com dexametasona sobre células de adenocarcinoma de mama tratado com tamoxifeno/ Felipe Augusto Barbosa Biscaia. Ponta Grossa, 2018.

38 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero

1. Melanoma. 2. Câncer de mama. 3. Microvesículas. 4. Dexametasona. 5. Tamoxifeno. I. Fávero, Giovani Marino. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa- Mestrado em Ciências Farmacêuticas. III. T.

CDD : 616.994

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia F. Bertholino dos Santos– CRB9/986

Ponta Grossa, 22 de agosto de 2018.

**ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 09/2018 DO MESTRANDO FELIPE AUGUSTO BARBOSA BISCAIA REALIZADA NO DIA 22 DE AGOSTO DE 2018, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.**

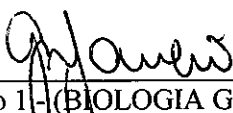
Aos vinte e dois dias de agosto de dois mil e dezoito, às 09h00min, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – sala 115 - Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Giovani Marino Favero reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do mestrando Felipe Augusto Barbosa Biscaia na linha de pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelos Professor Doutor Giovani Marino Favero (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): José Fabiano Costas Justus (UEPG/PR) e Mauro Ricetti Paes (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

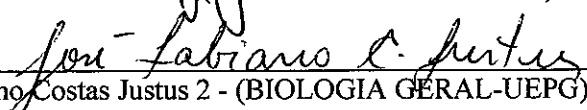
O título do trabalho foi: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MICROVESÍCULAS DE MALANOMA CULTIVADO COM DEXAMETASONA SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO TRATADO COM TAMOXIFENO.”** Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se aprovado a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

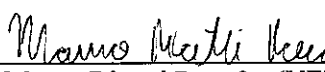
Observações (se necessário): \_\_\_\_\_

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: \_\_\_\_\_

  
Giovani Marino Favero 1 - (BIOLOGIA GERAL-UEPG) Presidente

  
José Fabiano Costas Justus 2 - (BIOLOGIA GERAL-UEPG) – Titular

  
Mauro Ricetti Paes 3 - (UFPR) – Titular

## RESUMO

Câncer é um conjunto de doenças causadas por uma lesão gênica associada a uma expansão clonal com crescimento desproporcional. O melanoma é o câncer de pele com menor perspectiva de sobrevida e com alta capacidade de metástase. O câncer de mama é um dos mais abundantes entre as mulheres, com alta incidência de morte. Estudos relatam que todas as células do corpo humano são capazes de secretar microvesículas e, que os tecidos tumorais secretam micropartículas com mais abundância. Essas micelas desempenham um papel importante na comunicação celular. Assim, a comunicação entre as células tumorais possui uma função essencial para o desenvolvimento do câncer. Neste trabalho, as linhagens de melanoma B16F10 e adenocarcinoma 4T1 foram cultivadas e submetidas ao tratamento dos fármacos Dexametasona e tamoxifeno, bem como microvesículas extraídas dos sobrenadante de B16F10 tratado com dexametasona. Como resultados, observamos redução da viabilidade celular de ambas as linhagens ocasionada pelos três tratamentos isolados, assim como pelos tratamentos combinados dos compostos utilizados. Os fármacos e as microvesículas desencadearam efeitos citotóxicos sobre as linhagens tumorais, mostrando-se potenciais alternativas para tratamento.

Palavras chaves: Melanoma, Câncer de mama, Microvesículas, Dexametasona, Tamoxifeno.

.

## **ABSTRACT**

Cancer is a set of diseases caused by a simple gene injury associated with a clonal expansion with disproportionate growth. Melanoma is a skin cancer with a lower survival prospect and high metastatic capacity. Breast cancer is one of the most abundant among women, with a high incidence of death. Several studies report that all human cells are able to secrete microvesicles, and that tumor tissues secrete microparticles with high abundance. These micelles play an important role in cellular communication. Thus, communication between tumor cells has an essential function for the development of cancer. In this work, the B16F10 melanoma and 4T1 adenocarcinoma cell lines were cultured and treated with the drugs Dexamethasone and tamoxifen, as well as microvesicles extracted from the B16F10 supernatant treated with dexamethasone. The results shows a reduction in the cell viability of both strains caused by the three isolated treatments, as well as by the combined treatments of the compounds used. Drugs and microvesicles triggered cytotoxic effects on tumor lines, showing potential treatment alternatives.

Key words: Melanoma, Breast cancer, Microvesicles, Dexamethasone, Tamoxifen.

## SUMÁRIO

|                                                               |               |
|---------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                     | <b>07</b>     |
| 1.1 Câncer.....                                               | 07            |
| 1.2 Câncer de mama.....                                       | 07            |
| 1.3 Melanoma.....                                             | 08            |
| 1.4 Microvesículas.....                                       | 08            |
| 1.5 Dexametasona no tratamento tumoral.....                   | 09            |
| 1.6 Tamoxifeno.....                                           | 09            |
| <br><b>2 OBJETIVOS.....</b>                                   | <br><b>10</b> |
| 2.1 Objetivo geral .....                                      | 10            |
| 2.2 Objetivos específicos .....                               | 10            |
| <br><b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                       | <br><b>11</b> |
| 3.1 Câncer.....                                               | 11            |
| 3.2 Melanoma.....                                             | 13            |
| 3.3 Câncer de mama.....                                       | 16            |
| 3.4 Microvesículas.....                                       | 18            |
| 3.5 Dexametasona no tratamento tumoral.....                   | 20            |
| 3.6 Tamoxifeno.....                                           | 21            |
| <br><b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                         | <br><b>23</b> |
| 4.1 Cultivo de células tumorais.....                          | 23            |
| 4.2 Preparo da solução de dexametasona.....                   | 23            |
| 4.3 Preparo da solução de tamoxifeno.....                     | 23            |
| 4.4 Extração de microvesículas.....                           | 23            |
| 4.5 Avaliação do tamanho e potencial zeta das partículas..... | 24            |
| 4.6 Ensaio de citotoxicidade por mtt com dexametasona.....    | 24            |
| 4.7 Ensaio de citotoxicidade por mtt com tamoxifeno.....      | 25            |
| 4.8 Ensaio de citotoxicidade por mtt com microvesículas.....  | 25            |

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.9 Análise estatística.....                                       | 25        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO. ....</b>                              | <b>26</b> |
| 5.1 Ensaio de citotoxicidade por mtt de dexametasona e B16F10..... | 26        |
| 5.2 Ensaio de citotoxicidade por mtt de tamoxifeno e 4T1.....      | 28        |
| 5.3 Ensaio de citotoxicidade por mtt de dexametasona e 4T1.....    | 30        |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>                                           | <b>36</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>                                          | <b>37</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER.

O câncer é um problema de saúde pública, com alta predominância exigindo estratégias e investimentos. É previsto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que até 2030 sejam observados 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer anualmente e 75 milhões de pessoas vivas convivendo com esta doença (MORAIS *et al*, 2013).

Esta doença pode ser diferenciada em fases denominadas de iniciação, promoção e progressão. A primeira delas é marcada por mutações no DNA, as quais a princípio são reparadas enzimaticamente; a segunda é instalada, quando a reparação já não é eficaz e as células mutadas passam a se multiplicar. Com a multiplicação, as células normais são substituídas progressivamente por células tumorais, as quais levam à perda funcional dos órgãos – fato este que, se não tratado a tempo, culmina com a morte do indivíduo, caracterizando a terceira e última fase evolutiva (DE ALMEIDA *et al*, 2005).

Essas fases se aplicam ao câncer que ocorre nos melanócitos, denominado de melanoma, e também no caso do câncer de mama, um tipo de tumor que ocorre com alta frequência entre as mulheres. Os tratamentos para esses tipos de câncer desencadeiam uma série de efeitos colaterais prejudiciais aos indivíduos. Sendo assim, este trabalho voltou-se ao melanoma e ao câncer de mama, uma vez que se faz necessário o desenvolvimento de novos métodos de tratamentos mais eficazes.

### 1.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama resulta de uma multiplicação desordenada de células do tecido glandular, sendo um dos tipos de câncer com maior ocorrência entre mulheres, só no Brasil são esperados em média 57.960 casos novos. Quando há o desenvolvimento de um câncer no tecido mamário, emergem sinais bem característicos como a presença de nódulos na região em questão, pele de aparência modificada e até mesmo modificações no mamilo (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

O tratamento para esse tipo de câncer engloba quatro vertentes, dentro das quais, o tratamento endócrino se destaca com o uso do fármaco Tamoxifeno,

reduzindo taxas como recorrência tumoral e morbidade por esse tipo de câncer (ANJUM; RAZVI; MASOOD, 2017).

### 1.3 MELANOMA

O melanoma é câncer originado dos melanócitos tipos de células encontradas na pele capazes de produzir "melanina", proteína responsável para proteger os tecidos subjacentes contra os efeitos prejudiciais da radiação solar. Este tipo também é conhecido como "melanoma maligno" ou "melanoma cutâneo". Muitas células do melanoma ainda sintetizam melanina, portanto, tumores de melanoma apresentam coloração em tons de marrom ou preto. Quando não há síntese da melanina, os tumores apresentam os tons de coloração rosa, bronze ou branco (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

O melanoma, bem como diversos tipos de cânceres, secretam micropartículas provenientes da membrana plasmática, denominadas de microvesículas, as quais desempenham um importante papel no desenvolvimento tumoral, uma vez que elas possibilitam a comunicação celular (LIMA *et al*, 2008).

### 1.4 MICROVESÍCULAS

Microvesículas (MVs) são fragmentos liberados a partir da membrana plasmática de células submetidas a situações de estresse, incluindo processo de apoptose ou morte celular, participando assim na remodelagem da membrana celular. Atualmente sabe-se que as microvesículas possuem um papel fundamental no processo de comunicação entre as células, estimulando a sua proliferação, podendo promover a ativação ou a degeneração celular, sendo grandes vetores na troca de informações biológicas, tudo isso sendo coordenado por diversos quadros fisiológicos nos quais as células se encontram (FREYSSINET, 2003). As microvesículas são desprendidas da superfície celular, sendo assim, durante a fragmentação da membrana celular elas podem abranger componentes de membrana e também conteúdo citoplasmático, podendo variar de tamanho e de composição conforme o tipo de célula das quais elas se originaram (RATAJCZAK *et al.*, 2006).

### 1.5 DEXAMETASONA NO TRATAMENTO TUMORAL

A dexametasona (DEX) é um fármaco do tipo corticosteróide amplamente utilizado clinicamente como antiinflamatório e antialérgico. Seu efeito inibe vias de síntese de citocinas e enzimas, afetando células que participam dos processos de inflamação, o qual está fortemente presente no ambiente tumoral. Sendo assim, estudos têm mostrado resultados benéficos em relação ao uso da dexametasona em tratamentos tumorais (COYNE & NARAYANAN, 2016; FENG; FEI; HU, 2018).

Em relação ao carcinoma pulmonar de Lewis, esse fármaco demonstrou uma capacidade de citotoxicidade sobre as células cancerígenas, além de ter efeitos positivos sobre células advindas de linhagens leucêmicas e de cólon. Além disso, esse tipo de corticosteróide permite um tratamento seletivo, através de ligações covalentes que o mesmo pode desempenhar (COYNE & NARAYANAN, 2016; FENG; FEI; HU, 2018).

### 1.6 TAMOXIFENO

Outro fármaco utilizado no tratamento tumoral é o Citrato de tamoxifeno, o qual é um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM), ele se liga de forma competitiva aos receptores do hormônio estrogênio expressos na superfície celular característicos das células do tecido glandular mamário, devido a isso, o uso dessa droga é empregado a muito tempo no tratamento endócrino contra o câncer de mama (WEI-LAN YEH *et al*, 2014).

Apesar da sua eficácia na redução dos tumores, há relatos de resistência das células tumorais em relação ao fármaco, sendo esse um problema notável. Além disso, também são relatados efeitos diretos e indiretos no metabolismo dos lipídios desencadeados pelo tamoxifeno, sendo este capaz de reduzir a quantidade de colesterol no sangue, e combater doenças cardiovasculares (HULTSCH *et al*, 2018).

Considerando tudo, é notável, devido aos diversos efeitos colaterais ocasionados nos indivíduos, não somente pelos quimioterápicos, mas também pelas outras vertentes utilizadas para combater todos os tipos de cânceres, que ainda se faz necessária a busca por novos métodos e compostos que possam atuar como tratamentos mais eficazes, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliação dos efeitos das microvesículas derivadas do sobrenadante da cultura de melanoma tratados com dexametasona sobre células de adenocarcinoma de mama tratados com tamoxifeno.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Cultivo de Melanoma com dexametasona e avaliação da toxicidade do fármaco.
- Encontrar a dose mais alta e menos tóxica da dexametasona sobre o melanoma para extração das microvesículas.
- Extração de microvesículas do sobrenadante da linhagem B16F10.
- Avaliação do potencial Zeta e tamanho das microvesículas.
- Avaliar efeitos do fármaco dexametasona e das microvesículas extraídas do sobrenadante, sobre a linhagem 4T1 tratada com tamoxifeno.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CÂNCER

É um conjunto de mais de 100 doenças, as quais são caracterizadas pelo crescimento celular desordenado e descontrolado, gerando uma malignidade, a qual pode invadir outros tecidos ou órgãos e espalhar-se para todo o corpo, causando várias alterações e até mesmo a morte do indivíduo (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

As causas, em maior número, são relacionadas com os fatores ambientais, entende-se por "ambiente" o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas -), o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e hábitos socioculturais. Entretanto há também as causas internas, as quais estão relacionadas a fatores genéticos pré-determinados e a como o organismo responde a fatores agressivos do ambiente (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

Como exemplo de fator ambiental, há o cigarro, que está altamente correlacionado com o surgimento do câncer de pulmão, também a exposição excessiva ao sol, a qual pode causar câncer de pele e os vírus oncogênicos – sendo tais fatores denominados de cancerígenos ou carcinógenos. Portanto, o aparecimento dessa doença está relacionado ao tempo e intensidade de exposição das células aos fatores carcinógenos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

Há também a origem hereditária que incluem fatores familiares e étnicos, porém com uma pequena parcela no surgimento dessa doença, apesar do fator genético exercer um importante papel na oncogênese. Um exemplo são os indivíduos portadores de retinoblastoma que, em 10% dos casos, apresentam história familiar deste tumor. Alguns tipos de câncer de mama, estômago e intestino parecem ter um forte componente familiar, embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum. Determinados grupos étnicos parecem estar protegidos de certos tipos de câncer, como exemplo, a leucemia linfocítica que é rara em orientais e o sarcoma de Ewing sendo é muito raro em negros (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

Sendo assim, de forma sucinta, quando uma célula está exposta a situações, como as citadas, podem ocorrer alterações na estrutura do ácido

desoxirribonucleico (DNA), o qual é uma estrutura química que armazena as informações de uma célula que são utilizadas para construir e organizar moléculas e organelas que compõem a mesma (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

Uma célula normal pode sofrer alterações no DNA, é o que chamamos mutação genética. As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais. Essas células diferentes são denominadas cancerosas (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2017).

O tratamento para o câncer possui, de modo geral, cinco vertentes, sendo elas : Cirúrgica, quimioterápica, imunoterápica, radioterápica e terapia direcionada. A terapia direcionada é baseada nas diferenças entre as linhagens cancerígenas, sendo novidade, essa vertente consiste no uso de drogas que "conseguem" distinguir as pequenas diferenças presentes entre células normais e células tumorais, como mudanças nos genes do DNA. Portanto, essas drogas são direcionadas para atingir somente as células tumorais, afetando sua biologia celular, deixando de atingir as células normais. Esse mecanismo difere da outra vertente nomeada como quimioterapia, onde tanto as células tumorais quanto as células normais são atingidas, causando diversos tipos de efeitos colaterais nos pacientes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

A quimioterapia é amplamente utilizada no tratamento do câncer, ela consiste na intervenção do ciclo celular das células tumorais através de drogas quimioterápicas isoladas ou aplicadas de forma combinadas para aumentar a eficácia do tratamento. Entretanto, durante o tratamento, além das células tumorais as células saudáveis também são afetadas, causando sérios efeitos colaterais em pacientes. Sendo assim, deve-se fazer um balanço entre a morte das células saudáveis e células tumorais, podendo aplicar as outras vertentes de tratamentos citadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

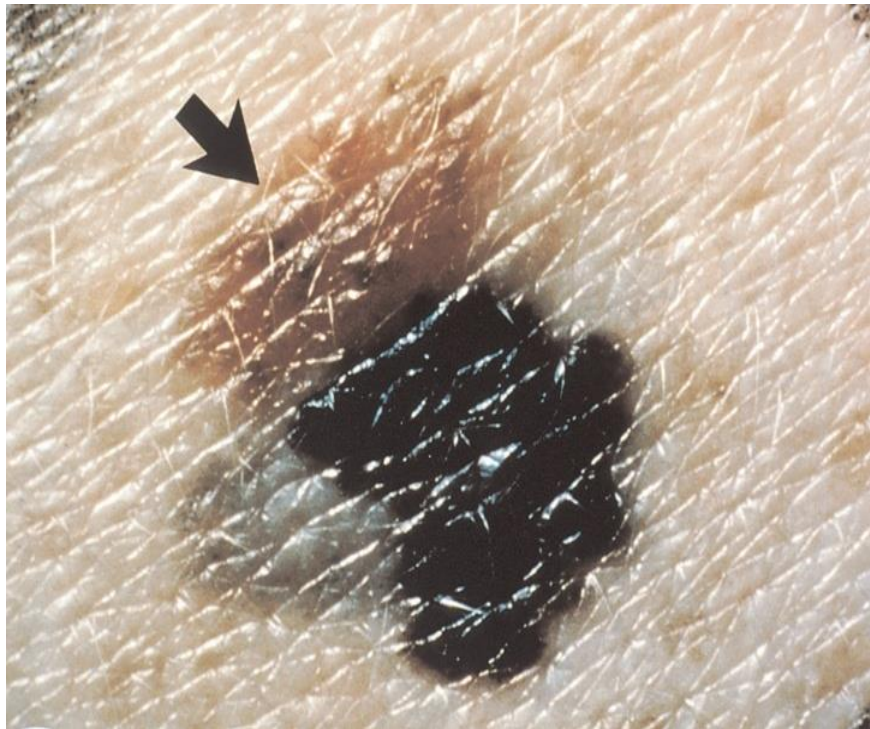
### 3.2 MELANOMA

Um tipo dos tipos de câncer que ocorrem na pele é o melanoma. Este ocorre nos melanócitos que são responsáveis pela produção de melanina, sendo assim, pode se desenvolver em qualquer lugar do corpo onde há a presença de melanócitos, sendo comum no tronco (peito e pescoço) em homens e nas pernas, em mulheres. Pessoas com pele escura apresentam menor risco de desenvolver esse tipo de câncer. Pode surgir, ainda que de forma menos comum, em genitálias, boca, olhos e na região anal (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Melanoma é o menos comum em relação aos cânceres que ocorrem nas células escamosas e basais da pele, porém é mais agressivo, considerando que possui mais facilidade para se espalhar pelo corpo se não for diagnosticado nos estágios iniciais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Os primeiros sinais do aparecimento é a mudança de forma, cor ou tamanho de um sinal na pele ou verruga. Alguns aspectos podem ajudar a detectar essas mudanças, como a assimetria, onde a metade da marca na pele não se parece com a outra metade. É possível, também, notar irregularidades na borda da marca da pele. Cores desiguais presentes na marca da pele podem ser identificadas como outra característica que pode indicar o desenvolvimento de um melanoma. Além disso, mudanças no diâmetro ou tamanho do sinal ou verruga, dentro de semanas ou meses, pode ser indício de melanoma que está em fase de desenvolvimento (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2010).

**FIGURA 1** – Foto mostrando um melanoma assimétrico com bordas irregulares



**FONTE:** (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2010)

O melanoma pode variar em suas características, sendo que aqueles que estão em estágio mais avançado podem expressar mudanças na textura da pele, ser dolorosos, sensíveis e provocar prurido. Há vários fatores de riscos, os quais elevam as chances do desenvolvimento dessa doença. Um dos principais é a exposição demasiada a radiação ultravioleta (UV) (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2010).

Geralmente esse tipo de câncer está correlacionado a exposição a radiação UV, a qual pode ser dividida entre UVA, UVB e UVC. Esta última é barrada pela camada de ozônio da nossa atmosfera terrestre, já a radiação UVA compreende entre 90-95% e a UVB 5-10% da radiação. A radiação UVA penetra camadas mais profundas da pele, já a UVB é quase que completamente absorvida pela epiderme (SEEBODE; LEHMANN; EMMERT, 2016).

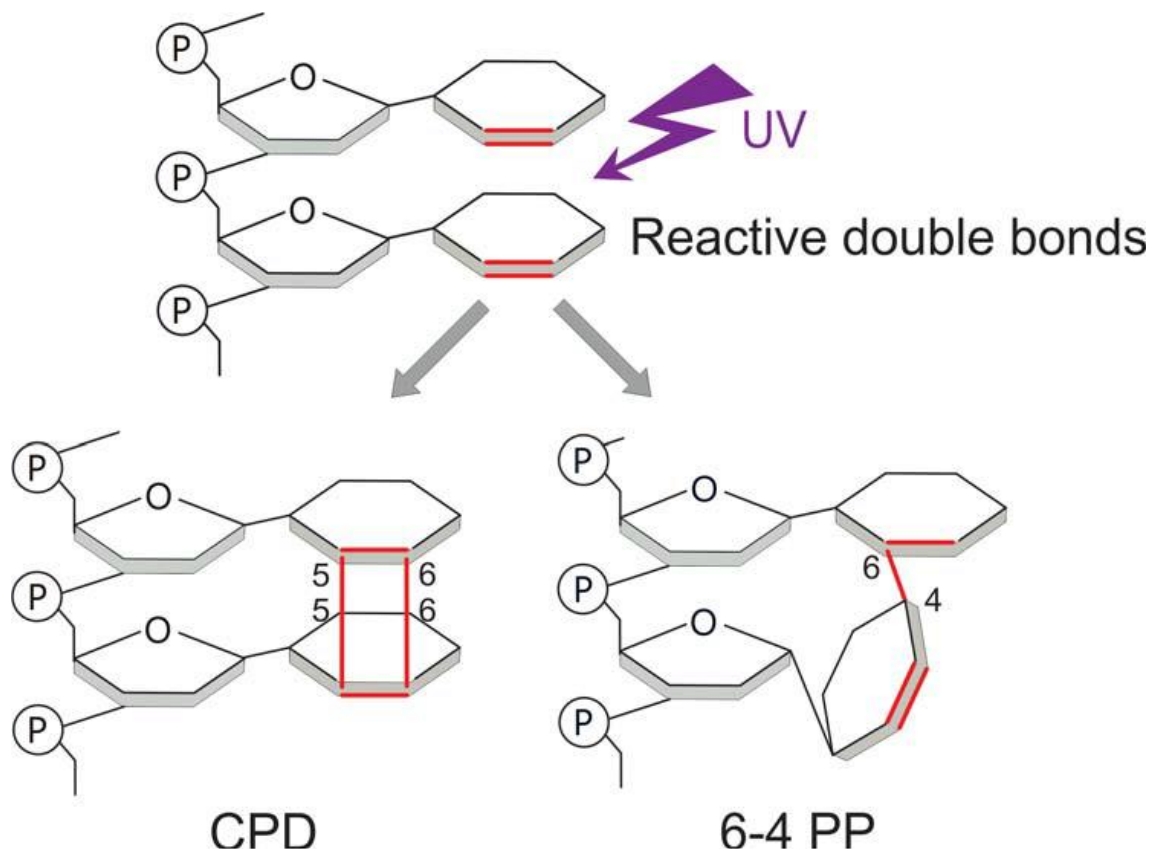
Embora a radiação UVA seja a parcela majoritária da radiação solar, ela causa o foto envelhecimento da pele através da deterioração das fibras, sendo muito menos cancerígena. Já em relação à radiação UVB, que compõem uma pequena porcentagem da radiação solar, pode ser significativamente muito mais cancerígena, mesmo quando há exposição em pequenas doses. Desta forma, a radiação UVB é considerada a maior causadora de câncer de pele de forma direta, ainda que, em

menor parcela e também de forma indireta, a radiação UVA possa contribuir para o surgimento de um câncer de pele (SEEBODE; LEHMANN, EMMERT, 2016).

A radiação UVA, não é absorvida diretamente pelo DNA, porém a sua penetração causa danos foto-oxidativos indiretos neste, além de contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O alvo da ERO em relação ao DNA é a guanina e a *8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine*, que tem sido considerada como a mais frequente lesão oxidativa. Não obstante, mais recentemente tem sido observado que a radiação UVA induz danos à pirimidina, tipo dímero, ao DNA, além de efeitos imunossupressores. Essa inibição da resposta ao dano do DNA pode tornar os dímeros induzidos por UVA mais mutagênicos que os dímeros induzidos por UVB (SEEBODE; LEHMANN; EMMERT, 2016).

A radiação UVB já é absorvida diretamente pelo DNA levando a formação de foto produtos como o ciclobutano dímeros de pirimidina (CDPs) e 6-pirimidina-4-pirimidona fotoprodutos (PPs), os quais são os principais causadores do efeito carcinógeno da radiação UVB. Os CDPs são formados entre duas timinas adjacentes ou duas citosinas formando um anel ciclobutano, considerando que 6-4 PPs são produzidos por uma única ligação não cíclica entre o carbono 6 do 5' pirimidina e carbono 4 do 3' pirimidina. Os CDPs são formados numa proporção de 66% e 33% de PPs, e ambas lesões causam um grande volume de distorção ao DNA. Essas lesões inibem a enzima polimerase durante a transcrição ou a replicação do DNA durante a divisão celular. Quando não há a reparação, essas lesões podem gerar uma mutação chamada de assinatura UV onde há a mudança de base C para T e CC para TT em *tandem* (SEEBODE; LEHMANN; EMMERT, 2016).

**FIGURA 2** - Ilustração que identifica o mecanismo de ação da radiação UV sobre as bases nitrogenadas.



FONTE: (SEEBODE; LEHMANN; EMMERT, 2016).

### 3.3 Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres. No Brasil são esperados em torno de 57.960 novos casos dessa doença, a qual possui vários tipos que variam entre um desenvolvimento rápido e mais lento (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

Esse tipo de câncer apresenta sinais bem característicos que podem ser observados pelo próprio indivíduo, estes são: presença de nódulo (caroço) na região da glândula mamária ou em axilas e também podendo aparecer no pescoço, pele da mama apresenta cor avermelhada podendo estar retraída se assemelhando a uma casca de laranja, e também pode apresentar modificações no mamilo. Havendo

algum sintoma dos citados, o indivíduo deve procurar um centro de diagnóstico para averiguar se há um tumor ou não, pois se for detectado em fase inicial, aumentam-se as chances de tratamento e de cura (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

Grande parte dos casos de descoberta de câncer de mama se deu pelas próprias mulheres que observaram os sinais citados acima. Além disso, é recomendado a realização de um exame de rastreamento a cada dois anos, denominado de mamografia, o qual detecta o câncer antes mesmo de aparecerem os sinais. O exame consiste em uma radiografia, realizada por um equipamento de raios X denominado de mamógrafo, este analisa alterações suspeitas nas glândulas mamárias (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

O modo de prevenção desse tipo de câncer é genérica para quase todos os outros tipos, isso quer dizer: praticar atividades físicas regularmente, ingerir alimentos saudáveis com o intuito de manter o peso corporal adequado para cada indivíduo, evitar o consumo de bebidas alcoólicas, e para as mulheres o que também previne esse tipo de câncer é o ato de amamentar (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

Ocupando o segundo lugar dos cânceres que mais causam mortes entre mulheres, o câncer de mama possui as seguintes vertentes como terapia: cirúrgica, radioativa, tratamento endócrino e quimioterápica. O tipo de tratamento que se é aplicado depende do estágio no qual o câncer se encontra, sendo assim, para se classificar o estágio do câncer são consideradas características como tamanho do tumor que pode variar entre os graus 1 até 4, envolvimento ou não de linfonodos regionais e a existência e a distância da metástase (ANJUM; RAZVI; MASOOD, 2017).

Umas das vertentes de tratamento citadas acima, tratamento endócrino, utiliza do tamoxifeno que é um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM), cujo o qual se liga aos receptores de estrogênio efetuando características agonistas e antagonistas. O seu caminho de ação se dá pela acoplagem em receptores de estrogênio, bloqueando a ligação entre o hormônio naturalmente produzido pelas

células desse tecido e como consequência inibindo a proliferação das células tumorais. A dose padrão é de 20mg, sendo comumente utilizada no tratamento de câncer de mama, resultando na redução de 50% de chances de recorrência desse tipo de câncer e de 28% nas taxas de morbidade pelo mesmo. Entretanto, tem se relatado que tratamentos endócrinos, como com o tamoxifeno, aumentam a atividade agonista de xenoestrogênios em receptores transmutados de estrogênios, os quais estão associados com a resistência a drogas (ANJUM; RAZVI; MASOOD, 2017).

### 3.4 Microvesículas

As micropartículas celulares ou também conhecidas como microvesículas (MV) são estruturas liberadas da superfície celular, podem ser liberadas quase que espontaneamente, ou quando a célula passa por momentos de estresse como no processo de apoptose (FREYSSINET, 2003).

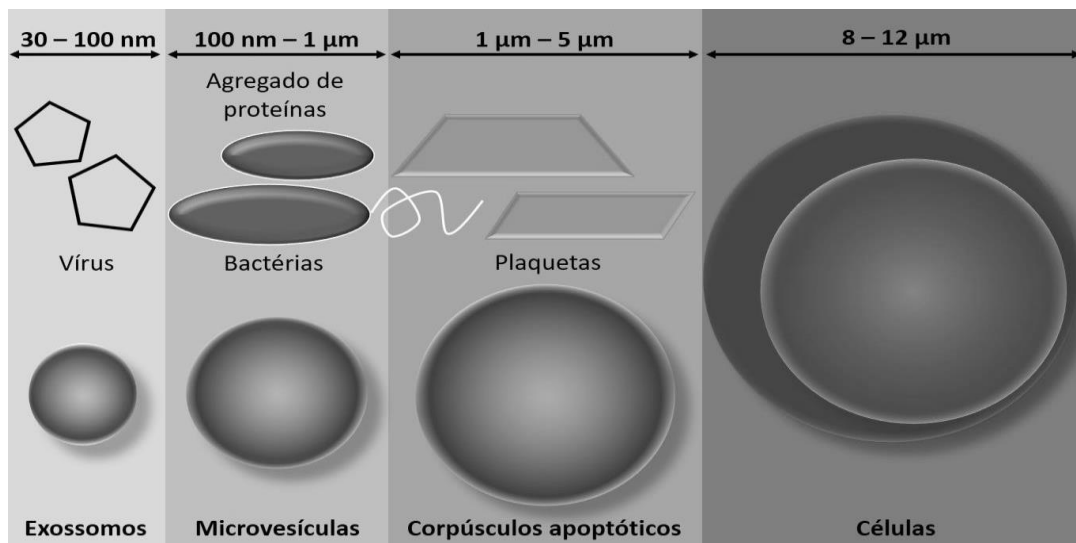
Atualmente sabe-se que essas estruturas desempenham uma importante função na comunicação entre as células, transferindo sinais como ativação ou degeneração celular refletindo em tecidos *in vivo*, conceituando-as como grandes vetores de informações transcelulares, as quais transmitem informações biológicas importantes de acordo com quadros fisiológicos, e também patológicos, nos quais as células se encontram (FREYSSINET, 2003).

A comunicação entre as células por meio de fragmentos circulares de membrana (microvesículas), é uma habilidade extraordinária que acompanha a ativação e o crescimento celular, sendo assim em culturas celulares onde há uma proliferação de células que ocorre de forma mais rápida há maior secreção de microvesículas, e em culturas celulares onde a proliferação é mais lenta, é observado uma menor secreção dessas estruturas. A liberação dessas, se dá por diversos fatores e quadros fisiológicos, como a ativação celular, presença de estresse oxidativo, quando há exposição á proteínas pertencentes a um complexo cascata ativado e entre outros (RATAJCZAK *et al.*, 2006).

As microvesículas são compostas por diversos tipos de proteínas e lipídios, muitos desses componentes são semelhantes ao das células das quais elas se originaram, pois elas são desprendidas da superfície celular, sendo assim, durante a fragmentação da membrana celular as microvesículas podem abranger

componentes de membrana, e como há um dobramento, pode ocorrer também o envolvimento de conteúdo citoplasmático onde podem estar presentes proteínas derivadas do citoplasma e mRNA, além disso, podem ser englobadas partículas infecciosas de vírus e príons do citoplasma. Sendo assim, essas estruturas variam de tamanho e de composição conforme o tipo de célula das quais elas se originaram (RATAJCZAK *et al.*, 2006).

**Figura 1-** Classificação das vesículas extracelulares de acordo com o diâmetro



FONTE: GYÖRGY *ET AL.* (2011)

As habilidades totais das microvesículas ainda não estão totalmente elucidadas, porém sabe-se que elas possuem papel importante no ambiente intracelular e na modulação da comunicação de célula-célula através de diferentes mecanismos, influenciando a biologia da célula-alvo (RATAJCZAK *et al.*, 2006).

Um dos mecanismos é a estimulação da célula-alvo através de ligantes expressos na superfície da membrana da mesma, onde a microvesícula atua como um complexo sinalizador, pois elas carregam numerosas proteínas e lipídios bioativos. Além disso, há a possibilidade de transferência de um receptor de membrana externa de uma célula para outra, como a entrega de proteínas, partículas infecciosas de vírus, mRNAs e por fim a transferência de organelas inteiras como mitocôndrias (RATAJCZAK *et al.*, 2006).

As culturas celulares apresentam pequenas estruturas no meio de cultivo, as quais são nominadas de "restos celulares ou fragmentos celulares", os quais estão presentes em cultivos com um crescimento celular saudável. Em estudos de microscopia eletrônica foi revelado que esses "restos celulares" possuem grandes

quantidades de microvesículas, as quais também estão presentes em culturas de células tumorais, portanto é notável que elas desempenham um importante efeito biológico no microambiente tumoral e consequentemente são importantes para o tumor. Conclui-se isto, devido a observação de modelos de estudo de linhagens de câncer de pulmão humano e murino, que apresentaram como resposta ao tratamento de doses não apoptóticas de quimioterápicos, a secreção de microvesículas em seu microambiente. Por fim, estudos têm demonstrado que as microvesículas também estimulam a expressão de fatores angiogênicos em diversas linhagens tumorais humanas (RATAJCZAK *et al.*, 2006).

Contudo, devido a grande quantidade de microvesículas presentes em fluídos corporais de indivíduos com câncer em estágios avançados e a menor quantidade das mesmas em indivíduos saudáveis, muitos estudos têm sido voltados para compreender a sua função no progresso tumoral. Há estudos demonstrando uma interação entre as microvesículas e as células que normalmente estão presentes no ambiente tumoral, como fibroblastos, células endoteliais, tipos diferenciados de leucócitos e outros, os quais possuem suas atividades moduladas por essas estruturas. Somando a isso, há evidências científicas cujas quais mostram uma correlação entre a capacidade metastática *in vivo* de cânceres, devido a ação proteolítica desempenhada pelo conteúdo das microvesículas presentes (LIMA *et al.*, 2008).

Entretanto, ainda não é totalmente esclarecido como ocorre o processo de síntese dessas microvesículas, o que se sabe é que há um aumento intracelular de cálcio, o qual ativa a protease calpaína desestruturando a membrana plasmática que está ligada ao citoesqueleto por meio de clivagem de proteínas como actina (LIMA *et al.*, 2008).

### 3.5 Dexametasona no tratamento tumoral

A dexametasona (DEX) é um corticosteróide que possui efeitos antiinflamatórios e antialérgicos. Seus mecanismos de ação incluem inibições de diversas vias de sínteses bioquímicas de enzimas e citocinas, como a inibição da via de síntese de NF- $\kappa$ B que resulta na redução de produção do fator de necrose tumoral  $\alpha$  desencadeando consequências para as células. Considerando isso, essa droga é amplamente utilizada em tratamentos clínicos, além disso, estudos têm mostrado que esse fármaco possui efeitos benéficos em tratamentos tumorais. Há

dados demonstrando a capacidade da DEX em reduzir a invasão e migração de células tumorais de cólon assim como a capacidade de induzir o processo de apoptose em linhagens celulares leucêmicas (COYNE & NARAYANAN, 2016; FENG; FEI; HU, 2018).

Em outro estudo, relatou-se que em pacientes que possuíam câncer de pulmão e foram pré-tratados com DEX, houve redução da toxicidade hematológica e aumento da eficiência de quimioterápicos em tratamento. Somando a isso, foi observado a eficiência da droga Dexametasona na inibição do crescimento do carcinoma pulmonar de Lewis, tornando verdade o efeito antitumoral que esse fármaco possui sobre esse tipo de câncer (FENG; FEI; HU, 2018).

Adicionalmente, sabe-se que um corticosteróide como a Dexametasona pode se ligar covalentemente a uma imunoglobulina G (IgG) que possui propriedades de ligação seletiva, sendo assim, esse complexo "DEX-IgG" pode atingir seletivamente um tipo celular causando efeitos como: promover altas concentrações citosólicas de Dexametasona ou de um quimioterápico, e também ativar múltiplas respostas imunes do hospedeiro que podem desencadear uma citotoxicidade seletivamente direcionada para o tipo celular (COYNE & NARAYANAN, 2016).

### 3.6 TAMOXIFENO

Como já citado, o Citrato de tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM), o qual se liga de forma competitiva aos receptores do hormônio estrogênio expressos na superfície celular característicos das células do tecido glandular mamário, devido a isso, o uso dessa droga é empregado a muito tempo no tratamento endócrino contra o câncer de mama, tanto nos estágios iniciais e avançados do tumor, quanto no período de pré e pós menopausa em mulheres. Entretanto, como a maioria dos tratamentos, o uso do tamoxifeno pode desencadear efeitos colaterais indesejáveis, como fadiga, dores, mudanças de humor e entre outros, os quais podem acarretar o a interrupção da terapia com o fármaco (WEI-LAN YEH *et al*, 2014).

A eficácia do Citrato de tamoxifeno, contra o câncer de mama, foi pioneiramente relatada em 1985 pelo estudo realizado por Cuzick e Baum, onde foi observado a redução da incidência do tumor em indivíduos que incorporaram o fármaco. Após isso, outros estudos carregaram o tamoxifeno para ensaios clínicos contra o câncer de mama, e seu uso na prevenção do mesmo. Em estudos

realizados pela National Surgical Adjuvant Breast and Bowel project (NSABP-P1), foi observado que após o uso de 20 mg do Citrato de tamoxifeno em grupos de mulheres, houve redução da incidência em até 69% do tumor, além de mostrar que houve a prevenção desse tipo de câncer em grupos com pré-disposição de desenvolvimento do tumor devido a mutações nos genes específicos causadores do câncer de mama e também pela presença de casos na família (OLIVEIRA, ALDRIGHI, RINALDI, 2006).

O tamoxifeno é utilizado no tratamento e na prevenção contra o câncer de mama a muito tempo, porém, apesar da sua eficácia na redução dos tumores, há relatos de resistência das células tumorais em relação ao fármaco, sendo esse um problema notável. Os mecanismos de resistência contra o tamoxifeno envolvem diversos fatores, como a alteração do alvo do fármaco, ativação das vias alternativas de sinalização intracelular e entre outros (HULTSCH *et al*, 2018).

Além dos efeitos antitumorais nas células do tecido mamário, o tamoxifeno é conhecido por desencadear efeitos diretos e indiretos no metabolismo dos lipídios, também sendo capaz de reduzir a quantidade de colesterol no sangue, e combater doenças cardiovasculares. O fármaco é capaz de se associar ao sítio microssomal de ligação de antiestrogênio, regulando o equilíbrio de lipídios, mecanismo qual está associado com o metabolismo do colesterol. Tal mecanismo é relacionado com o controle do crescimento, diferenciação e o processo de apoptose na presença das espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo esse, um outro método pelo qual o tamoxifeno é capaz de induzir a citotoxicidade (HULTSCH *et al*, 2018).

Porém, como já mencionado o fármaco citrato de tamoxifeno apresenta diversos efeitos colaterais, além disso, também foi relatado o desenvolvimento de esteatose hepática em 43% dos indivíduos que realizaram o uso dessa droga. Sendo assim, pelo fato do tamoxifeno não ser ideal, foram desenvolvidos outros quimioterápicos hormonais utilizados como adjuvantes no tratamento contra o câncer de mama (HULTSCH *et al*, 2018; XANTHOPOULOS, ROMANO, MAJUMDAR, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CULTIVO DE CÉLULAS TUMORAIS

As linhagens B16F10 e 4T1 em estudo foram cultivadas em meio de cultura RPMI, acrescido de 10% de soro fetal bovino complementado com 100 mg de estreptomicina e 100 mg de penicilina por litro. Após acondicionadas em garrafas próprias de cultivo celular, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até o momento do uso.

### 4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE DEXAMETASONA

Foram feitas quatro soluções mães de 1 ml contendo o fármaco fosfato dissódico de dexametasona injetável, com as concentrações de 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM e 0,8 mM, completando com o meio de cultivo celular RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino complementado com 100 mg de estreptomicina e 100 µg de penicilina por litro. As soluções foram preparadas no momento do tratamento dos grupos. O fármaco foi estocado e armazenado em um recipiente estéril sob a temperatura de 25°C

### 4.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE TAMOXIFENO

O comprimido de tamoxifeno 20mg foi macerado e pesado. 10mg do pó de tamoxifeno foi dissolvido em 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução inicial com a concentração de 10mg/ml, foi armazenada a -20° C e protegida da luz, devido ao fato da solução ser fotossensível. Após isso, completou-se 20 µl para 40 ml de meio de cultivo celular RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 100 mg de estreptomicina e 100 µg de penicilina por litro, obtendo uma solução de tratamento com a concentração de 5 µg/ml do tamoxifeno e 0,1% de DMSO.

### 4.4 EXTRAÇÃO DAS MICROVESÍCULAS

A cultura de B16F10 foi submetida a uma solução contendo meio de cultivo celular RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino complementado com 100 mg de estreptomicina e 100 µg de penicilina por litro e com adição do fosfato dissódico de dexametasona injetável, na concentração de 0,2 mM, em uma garrafa de cultivo celular. A cultura foi submetida a uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, durante 48 horas. Após isso, o sobrenadante foi recolhido e submetido a

centrifugação a 300g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado e o pellet descartado. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado novamente a 2000g por 10 min a 4°C. Sucedendo a isso, o sobrenadante da centrifugação anterior foi recolhido e centrifugado novamente a 30000g por 10 min a 4°C, para retirada de debri e restos celulares, o pellet foi descartado. Após isso, foi realizada a centrifugação a 100000g por 2 horas a 4°C, para retirada de proteínas descartando o pellet, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado novamente a 100000g por 2 horas a 4°C, o pellet foi ressuspensionado em meio de cultivo celular RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino complementado com 100 mg de estreptomicina e 100 µg de penicilina por litro

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO TAMANHO E POTENCIAL ZETA DAS PARTÍCULAS

Como foi descrito no item "4.4 extração das microvesículas", após a última etapa de centrifugação do sobrenadante da cultura do melanoma, o pellet foi ressuspensionado em 2 ml de PBS, e levado para determinação do tamanho e potencial Zeta das partículas da amostra no equipamento Zetasizer nano Series. O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão (distribuição de tamanho) foram medidos por espectroscopia de correlação de fótons, em temperatura ambiente.

O Potencial Zeta das suspensões de nanopartículas em água foram determinadas por anemometria laser Doppler. As amostras foram acondicionadas em uma célula eletroforética a 25°C, onde um potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido.

#### 4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT COM DEXAMETASONA.

As células das linhagens B16F10 e 4T1 foram adicionadas em placas de 96 poços com meio de cultura RPMI (7.000 células/poço). Após 24 horas foram tratadas com a solução contendo dexametasona, nas concentrações de 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM e 0,8 mM, com RPMI suplementado com 10% de SFB e antibiótico, no grupo controle foi adicionado somente meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB e antibiótico.

Depois de 24 e 48 h o sobrenadante das células foi retirado e adicionado 70 µl de uma solução salina contendo 0,5 µg/mL de MTT. Após a incubação por 2 hr a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> adicionou-se a solução eluente de álcool isopropílico com HCl 0,1 M, para solubilizar os cristais de formazan formados, a leitura da cor formada foi mensurada espectrofotometricamente em 570 nm.

#### 4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT COM TAMOXIFENO.

As células da linhagem 4T1 foram adicionadas em placas de 96 poços com meio de cultura RPMI (7.000 células/poço). Após 24 horas foram tratadas com a solução contendo tamoxifeno com a concentração de 5 µg/ml e 0,1% de DMSO, com RPMI suplementado com 10% de SFB e antibiótico, no grupo controle foi adicionado somente meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB e antibiótico.

Depois de 24 e 48 h o sobrenadante das células foi retirado e adicionado 70 µl de uma solução salina contendo 0,5 ug/mL de MTT. Após a incubação por 2 hr a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> adicionou-se a solução eluente de etanol com HCl 0,1 M, para solubilizar os cristais de formazan formados, a leitura da cor formada foi mensurada espectrofotometricamente em 570 nm.

#### 4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT COM MICROVESÍCULAS.

As células da linhagem 4T1 foram adicionadas em placas de 96 poços com meio de cultura RPMI (7.000 células/poço). Após 24 horas foram tratadas com a solução contendo microvesículas (item 4.5) e meio RPMI suplementado com 10% de SFB e antibiótico, no grupo controle foi adicionado somente meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB e antibiótico.

Depois de 24 e 48 h o sobrenadante das células foi retirado e adicionado 70 µl de uma solução salina contendo 0,5 ug/mL de MTT. Após a incubação por 2 hr a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> adicionou-se a solução eluente de etanol com HCl 0,1 M, para solubilizar os cristais de formazan formados, a leitura da cor formada foi mensurada espectrofotometricamente em 570 nm.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

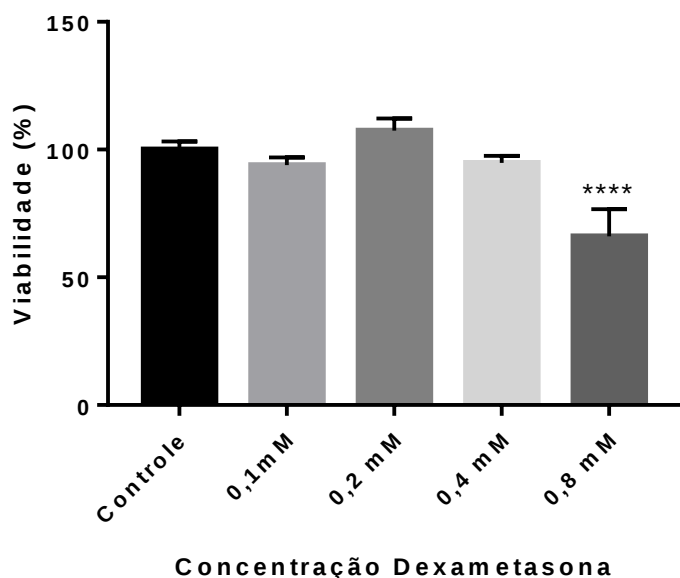
Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (S.E.M). Os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, estas condições foram verificadas pelos testes de D' Agostino & Pearson e Tukey, respectivamente. O nível de significância aceito para os testes foi de  $P < 0,05$ . Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism (versão 5.01, San Diego, Califórnia, EUA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT DE DEXAMETASONA E B16F10

Após a incubação das linhagens com os tratamentos de dexametasona, tamoxifeno e microvesículas, foi possível observar os seguintes resultados demonstrados pelos gráficos abaixo. O gráfico 1 demonstra os resultados obtidos pelo ensaio de MTT com as células da linhagem B16F10 que foram tratadas com as concentrações de 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM e 0,8 mM de dexametasona, onde apenas a concentração de 0,8 mM diminuiu, com significância estatística, a viabilidade das células em relação ao controle e em relação as outras concentrações, após 24 horas de tratamento

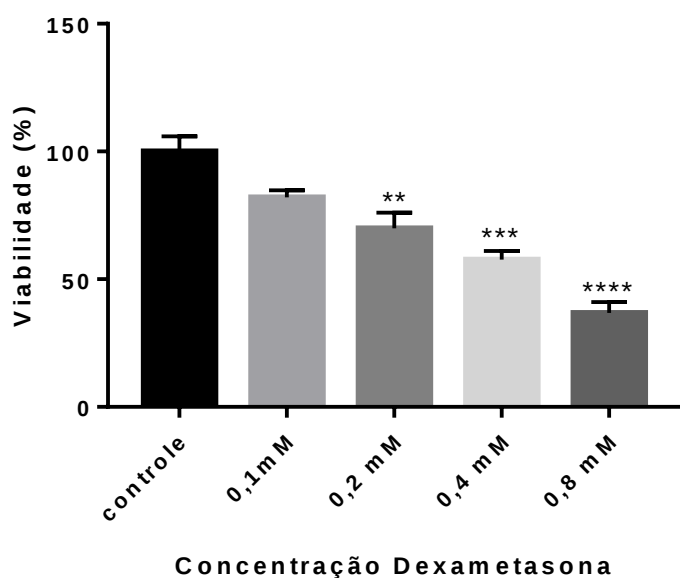
**Gráfico 1 - Efeitos desencadeados pelas diferentes concentrações do fármaco dexametasona sobre a linhagem B16F10 após 24 horas de tratamento, analisado pelo método MTT.** Foram testadas as concentrações de 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4mM e 0,8 mM do fármaco dexametasona sobre a linhagem B16F10 durante 24 horas de incubação. Cada coluna representa o resultado da absorbância de 5 grupos de quadruplicata (controle e concentrações). Análise estatística foi feita utilizando ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. \*\*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao controle e em relação as concentrações de 0,1 0,2 e 0,4 mM.



FONTE: AUTOR

Já no gráfico 2 estão demonstrados os resultados obtidos pelo ensaio de MTT com as células da linhagem B16F10 que foram tratadas com as concentrações de 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM e 0,8 mM de dexametasona, após 48 horas. As concentrações de 0,2 mM, 0,4mM e 0,8 mM reduziram a viabilidade celular com significância estatística em relação ao controle. Também houve diferença estatística entre as concentrações dos grupos tratados.

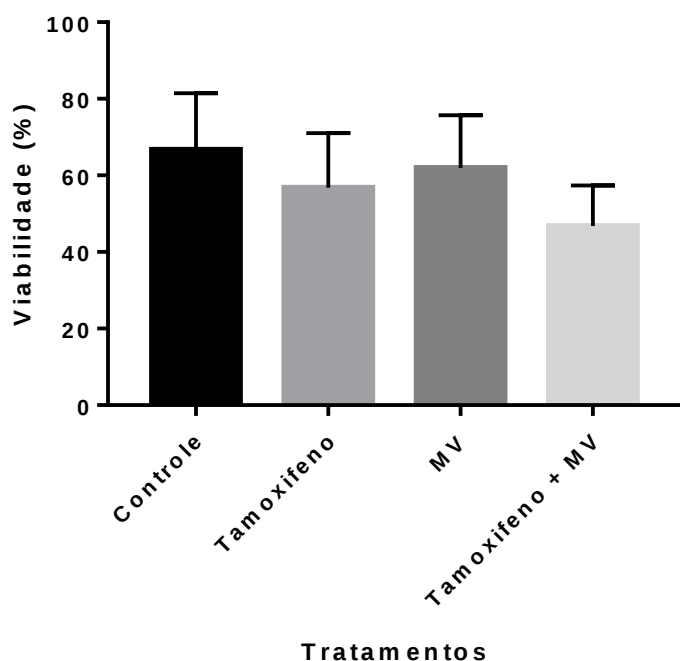
**Gráfico 2 - Efeitos desencadeados pelas diferentes concentrações do fármaco dexametasona sobre a linhagem B16F10 após 48 horas de tratamento, analisado pelo método MTT.** Foram testadas as concentrações de 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4mM e 0,8 mM do fármaco dexametasona sobre a linhagem B16F10 durante 48 horas de incubação. Cada coluna representa o resultado da absorbância de 5 grupos de quadruplicata (controle e concentrações). Análise estatística foi feita utilizando ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. \*\*  $P < 0,001$  em relação ao controle e a concentração de 0,1 mM \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao controle e a concentração de 0,1 e 0,2 mM \*\*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao controle e a concentração de 0,1, 0,2 e 0,4 mM.



FONTE: AUTOR

## 5.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT DE TAMOXIFENO E 4T1

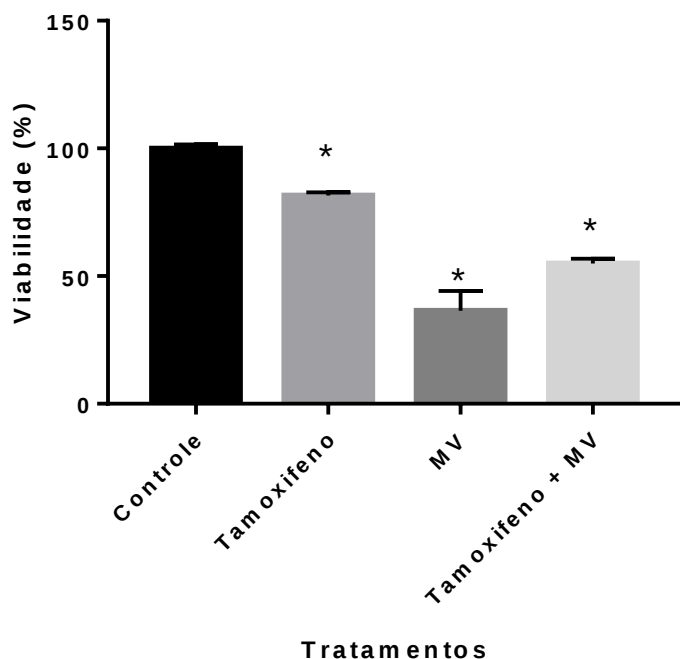
**Gráfico 3 - Efeitos do fármaco tamoxifeno e microvesículas sobre a linhagem 4T1 após 24 horas de tratamento analisado pelo método MTT.** Foi testado o fármaco tamoxifeno isolado, microvesículas isoladas e tamoxifeno combinado com microvesículas sobre a linhagem 4T1 durante 24 horas de incubação. Cada coluna representa o resultado da absorbância de 4 grupos de quadruplicata (controle e concentrações). Análise estatística foi feita utilizando ANOVA de duas vias e pós teste de Tukey.



**FONTE:** AUTOR

No gráfico 3 estão representados o resultados obtidos pelo método do MTT com as células da linhagem 4T1, onde foram divididos quatro grupos de quadruplicatas, um sendo o controle e outros três tratados com tamoxifeno, microvesículas (MV) e tamoxifeno com microvesículas. Após 24 horas de tratamento, não houve redução estatisticamente significativa da viabilidade celular em relação ao controle e em relação entre os grupos tratados.

**Gráfico 4 - Efeitos do fármaco tamoxifeno e microvesículas sobre a linhagem 4T1 após 48 horas de tratamento analisado pelo método MTT.** Foi testado o fármaco tamoxifeno isolado, microvesículas isoladas e tamoxifeno combinado com microvesículas sobre a linhagem 4T1 durante 48 horas de incubação. Cada coluna representa o resultado da absorbância de 4 grupos de quadruplicata (controle e concentrações). Análise estatística foi feita utilizando ANOVA de duas vias e pós teste de Tukey. \*  $P < 0,001$  em relação ao controle.

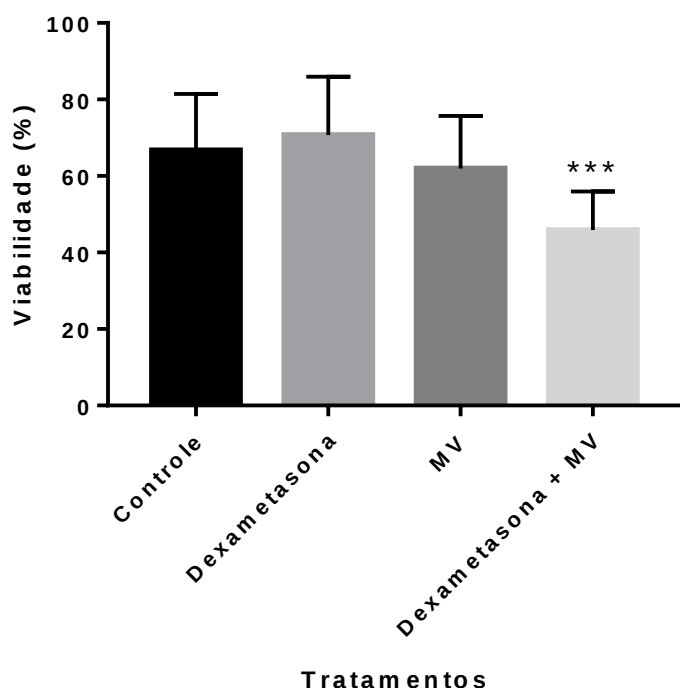


**FONTE:** AUTOR

O gráfico 4 mostra os resultados do método do MTT em relação aos tratamentos com tamoxifeno, microvesículas e tamoxifeno adjunto de microvesículas, sobre as células da linhagem 4T1. Após 48 horas houve redução da viabilidade celular, com significância estatística, nos três grupos tratados quando comparados com o controle, não havendo diferença estatística da viabilidade celular entre os grupos tratados, demonstrando que os compostos utilizados nos grupos, possuem um efeito de citotoxicidade sobre as células dessa linhagem.

### 5.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT DE DEXAMETASONA E 4T1

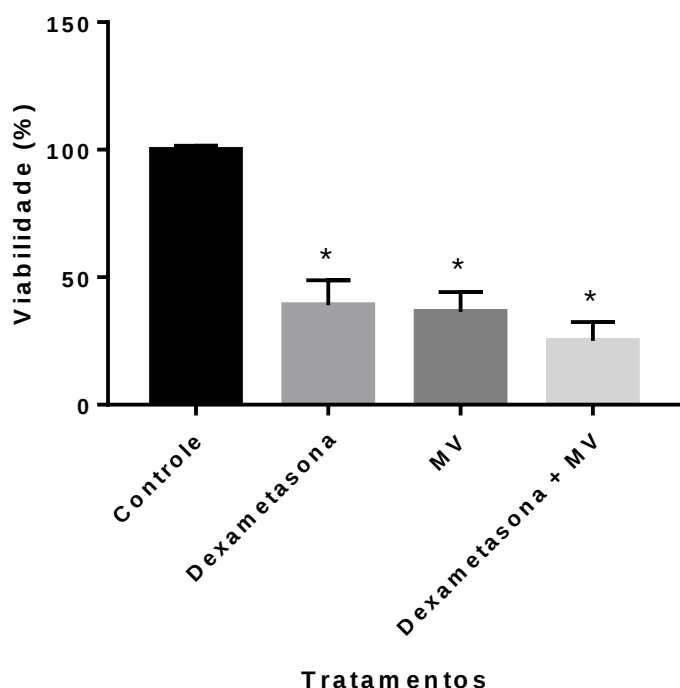
**Gráfico 5 - Efeitos do fármaco dexametasona e microvesículas sobre a linhagem 4T1 após 24 horas de tratamento analisado pelo método MTT.** Foi testado o fármaco dexametasona 0,8 mM isolado, microvesículas isoladas e dexametasona 0,8mM combinado com microvesículas sobre a linhagem 4T1 durante 24 horas de incubação. Cada coluna representa o resultado da absorbância de 4 grupos de quadruplicata (controle e concentrações). Análise estatística foi feita utilizando ANOVA de duas vias e pós teste de Tukey. \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao controle e aos grupos tratados MV e Dexametasona.



FONTE: AUTOR

O gráfico 5 demonstra o ensaio de citotoxicidade por MTT, no qual foram divididos quatro grupos de quadruplicatas, sendo um o controle e outros três tendo sido tratados com dexametasona, microvesículas e dexametasona adjunta de microvesículas. Após 24 horas de tratamento houve redução na viabilidade celular estatisticamente significativa no grupo tratado com dexametasona adjunto de microvesículas quando comparado com o controle, bem como diferença estatística na viabilidade celular desse mesmo grupo quando comparado com os outros grupos tratados. Isso demonstra que as microvesículas adjuntas do corticóide dexametasona desempenham um efeito citotóxico sobre a linhagem 4T1.

**Gráfico 6 - Efeitos do fármaco dexametasona e microvesículas sobre a linhagem 4T1 após 48 horas de tratamento analisado pelo método MTT.** Foi testado o fármaco dexametasona 0,8 mM isolado, microvesículas isoladas e dexametasona 0,8mM combinado com microvesículas sobre a linhagem 4T1 durante 48 horas de incubação. Cada coluna representa o resultado da absorbância de 4 grupos de quadruplicata (controle e concentrações). Análise estatística foi feita utilizando ANOVA de duas vias e pós teste de Tukey. \* $P < 0,001$  em relação ao controle.



**FONTE:** AUTOR

No gráfico 6 estão representados os resultados do ensaio de citotoxicidade realizado pelo método do MTT, em relação as células da linhagem 4T1. Foram divididos quatro grupos de quadruplicatas, sendo um o controle e os outros três tendo sido tratados com dexametasona somente, microvesículas e dexametasona adjunto de microvesículas. Após 48 horas de tratamento, as células dos três grupos tratados tiveram sua viabilidade reduzida de forma estatisticamente significativa em relação ao controle, demonstrando que os compostos utilizados desempenharam um atividade citotóxica sobre a linhagem 4T1.

Como já é sabido, a droga dexametasona possui efeitos antiinflamatórios, sendo amplamente utilizada clinicamente. No entanto, estudos têm relatado que este fármaco possui efeitos antitumorais sobre linhagens celulares, como descrito no trabalho de XIAO-LING FENG, HUI-ZHI FEI & LING HU (2018), no qual foram

analisados os efeitos da dexametasona sobre a linhagem celular A549 de adenocarcinoma pulmonar aveolar basal humano. Neste trabalho foram administradas doses da dexametasona com as concentrações de 0,1 mM, 1mM e 10 mM, procedendo às análises das amostras após 12 horas, 24horas e 48 horas do tratamento.

Segundo os autores do trabalho referido, a dexametasona reduziu a proliferação celular e aumentou a taxa de apoptose das células dependendo da dose e do tempo de tratamento, obtendo como resultados a redução da viabilidade celular nas concentrações de 1 mM e 10 mM após 24 e 48 horas de tratamento. No estudo, ficou esclarecido pelos autores que a exposição das células da linhagem A549 perante a dexametasona desencadeou um acúmulo de células apoptóticas, bem como aumentou a quantidade da caspase-3 e a atividade da via TGF-  $\beta$ 1/ Smad2.

Em relação a linhagem B16F10, foram padronizadas as concentrações do corticóide dexametasona, tendo como base o trabalho de XIAO-LING FENG, HUI-ZHI FEI & LING HU (2018), sendo a concentração inicial a de 0,1 mM seguindo das concentrações de 0,2 mM, 0,4 mM e 0,8 mM. A citotoxicidade sobre as células foi observada, após 24 horas de tratamento, pela concentração de 0,8 mM, indicando que a linhagem B16F10 é mais suscetível ao fármaco em concentrações menores quando comparado com a linhagem A549 utilizada no trabalho realizado por XIAO-LING FENG, HUI-ZHI FEI & LING HU (2018). Já no tratamento isolado da linhagem 4T1 com dexametasona, foi utilizada a concentração de 0,8 mM, sendo esta a concentração maior estabelecida no ensaio de citotoxicidade com a linhagem B16F10, podendo assim, comparar o efeito do fármaco sobre diferentes linhagens tumorais.

Entretanto, o mecanismo pelo qual o fármaco dexametasona desencadeou a redução na viabilidade celular, nas linhagens B16F10 e 4T1, ainda permanece desconhecido, uma vez que o ensaio do MTT demonstra a atividade enzimática presente na mitocôndria. Sendo assim, para uma melhor compreensão do processo ocasionado pelo fármaco sobre as células, se faz necessário futuros estudos com técnicas mais avançadas. O tamoxifeno é um quimioterápico usado no tratamento contra o câncer de mama há mais de vinte anos, devido ao seu potencial limitante da proliferação celular nesse tipo de câncer, sua ação se deve a sua capacidade de

se ligar aos receptores de estrogênio impedindo que o hormônio estimule a proliferação tumoral.

Entretanto, o uso contínuo do tamoxifeno pode estimular a progressão do tumor, tornando necessário a busca por novos métodos de tratamento, como novos compostos e até mesmo a combinação do tamoxifeno com outros fármacos e compostos. Muitos trabalhos têm abordado os efeitos da combinação dos métodos de tratamento contra esse tipo de câncer, como o trabalho desenvolvido por XANTHOPOULOS, ROMANO & MAJUMDAR (2004), no qual foi analisado o tratamento combinado do tamoxifeno com outro composto denominado anastrozol.

No trabalho referido foram comparados os efeitos individuais do tamoxifeno e do anastrozol com os efeitos do tratamento adjunto dos compostos, sobre as células da linhagem 4T1. Foram utilizadas as concentrações de 5µg/ml de tamoxifeno e 50µg/ml do anastrozol de forma individual e combinada pelos períodos de 24, 48 e 72 horas de tratamento. Como resultado foi observado pelos autores que ambos os tratamentos feitos com tamoxifeno e o combinado (tamoxifeno com anastrozol) inibiram o crescimento celular da linhagem 4T1 em todos os períodos em relação ao grupo controle, porém, quando comparados os tratamentos, o tratamento combinado se mostrou mais efetivo em inibir o crescimento celular em relação ao tamoxifeno isolado, o mesmo foi observado em relação ao anastrozol.

Outros fármacos são usados de modo combinatório para tratar o câncer de mama, como os compostos platina, cisplatina e carboplatina, que podem ser empregadas de modo isoladas ou combinadas, assim como as antraciclinas como a doxorrubicina e epirrubicina que são amplamente utilizadas no regime de combinação. Apesar das toxicidades, a combinação de compostos tem se mostrado muito eficaz no tratamento contra o câncer de mama (ANJUM; RAZVI; MASOOD, 2017).

As microvesículas foram obtidas a partir da centrifugação do sobrenadante da cultura de B16F10, a qual continha dexametasona na concentração de 0,2 mM, sendo esta a concentração máxima ideal para a indução da produção de microvesículas como resposta a exposição das células perante o fármaco, sem desencadear o processo de apoptose nas células da cultura.

Os grupos tratados com microvesículas demonstraram efeito de citotoxicidade sobre as células da linhagem 4T1 após 48 horas de tratamento, com significância estatística quando comparado com o controle. Como já mencionado, as microvesículas presentes no microambiente tumoral possuem diversas funções, sendo como a principal a comunicação entre as células, podendo estimular a proliferação celular ou, como demonstrado nos resultados obtidos, reduzindo a viabilidade celular. No entanto, o mecanismo pelo qual as microvesículas atuam sobre essa linhagem 4T1 ainda não está esclarecido, sendo necessário mais estudos para melhor compreensão do processo. Porém como descrito por RATAJCZAK *et al.* (2006), um dos mecanismos desempenhados pelas microvesículas é a estimulação da célula-alvo através de ligantes presentes na superfície da membrana celular, agindo como molécula sinalizadora estimulando a célula-alvo. Além disso, outras moléculas como proteínas e lipídios são carregados por elas, bem como fragmentos de RNAs e até mesmo organelas.

As amostras obtidas após a realização do protocolo de extração das microvesículas do sobrenadante da cultura celular da linhagem B16F10, foram processadas no equipamento Zetasizer o qual demonstrou como resultado para tamanho das microvesículas de 0,1395 nm e potencial Zeta de -6,77 mV.

De modo geral, há três tipos de vesículas extracelulares (VEs) fragmentadas e liberadas da membrana plasmática, sendo elas os corpúsculos apoptóticos, liberados do processo de apoptose, exossomos liberados caracteristicamente pelas células e as microvesículas produzidas pelas células submetidas a algum tipo de estresse celular (GYÖRGY *et al.*, 2011).

Segundo GYÖRGY *et al.* (2011), o tamanho dos exossomos podem variar entre 30 nm a 100 nm de diâmetro, as microvesículas de 100 nm a 1 µm e os corpúsculos apoptóticos de 1 µm a 5 µm. As informações relacionadas ao tamanho das microvesículas encontradas na literatura não corroboram com o tamanho das amostras, resultante da leitura feita pelo equipamento Zetasizer, apesar de o sobrenadante, da cultura da linhagem B16F10, ter sido submetido ao protocolo de centrifugação para extração de microvesículas.

Já a carga negativa resultante no potencial Zeta, corrobora com o trabalho realizado por NGUYENA *et al.* (2014), onde foram caracterizadas as microvesículas

liberadas por células vermelhas humanas. Os autores, mediram o potencial Zeta das microvesículas diluídas em diferentes soluções, obtendo como resultado uma variação de carga de potencial Zeta de -10 mV a -40 mV. Segundo os autores, a carga negativa depende da concentração de íons e do pH das soluções nas quais as microvesículas foram submetidas.

Sendo assim, estudos com o uso de técnicas mais avançadas e específicas, podem elucidar melhor o processo que está ocorrendo em relação aos fármacos testados e as microvesículas, correlacionados com as linhagens tumorais.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que:

- O fármaco Dexametasona apresentou efeito citotóxico sobre a linhagem B16F10 nas concentrações de 0,2 mM, 0,4 mM e 0,8mM e sobre a linhagem 4T1 na concentração de 0,8 mM após 48 horas do tratamento;
- O fármaco tamoxifeno reduziu a viabilidade celular da linhagem 4T1;
- O tratamento isolado das microvesículas reduziu de forma significativa a viabilidade celular da cultura 4T1
- Os tratamentos combinados dos fármacos, dexametasona e tamoxifeno, com as microvesículas reduziram a viabilidade celular de forma estatisticamente significativa em relação a linhagem 4T1;

Concluindo, o trabalho contribui com uma nova abordagem nas possíveis formas de tratamento para o câncer de mama, bem como no tratamento contra o melanoma. Além disso, é plausível o emprego desse trabalho como base para estudos que envolvem ensaios *in vivo* para avaliar os efeitos dos tratamentos em um sistema orgânico mais complexo, abrindo novos caminhos para se desenvolver terapias mais eficazes contra o câncer de mama, melanoma e até mesmo outros tipos de cânceres, melhorando a qualidade de vida de indivíduos portadores dessa doença. Por fim, o desenvolvimento do mestrado contribuiu para a minha formação profissional e pessoal, acrescentando conhecimento em minha área de formação e senso de responsabilidade.

## 7. REFERÊNCIAS

American Cancer Society. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em: 10 de junho de 2016

ANJUM, F.; RAZVI, N.; MASOOD, M. A. Breast Cancer Therapy: A Mini Review. **MedCrave**, Paquistão, V. 1, p. 1-4, Maio, 2017.

COYNE, C. P.; NARAYANAN, L. molecular design , synthetic organic chemistry reactions , and antineoplastic cytotoxic potency against pulmonary adenocarcinoma ( A549 ). **Dovepress**, Mississipi, p. 2575–2597, 12 de agosto de 2016.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **QuimicaNova**, v. 28, p.118-129. 2005.

DE OLIVEIRA, V. M.; ALDRIGHI, J. M.; RINALDI, J. F. Quimioprevenção de câncer de mama. **Revista associação médica brasileira**, São paulo, Brasil, p. 453-459, 2006.

FENG, X. L.; FEI, H. U. I. Z. H. I.; HU, L. Dexamethasone induced apoptosis of A549 cells via the TGF- $\beta$  1 / Smad2 pathway. **Oncology letters**, China, p. 2801–2806, 27 de junho de 2017.

FREYSSINET J. M. **Cellular** microparticles: what are they bad or good for? **Journal Thromb Haemost**, Strasbourg, França, p. 1655-1662, 2003.

GYÖRGY B., SZABO, G. T., PÁSZTÓI M., PAL Z., MISJÁK P., ARADI B., LASZLÓ V., PALLINGER E., PAP E., KITTEL A., NAGY G., FALUS A., BUZÁS E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Budapeste, p. 2667-2688, 11 de maio de 2011.

HULTSCH, S.; KANKAINEN, M.; PAAVOLAINEN, L.; KOVANEN, R-M.; IKONEN, E.; KANGASPESKA, S.; PIETIÄINEN, V.; KALLIONIEMI, O. Association of tamoxifen resistance and lipid reprogramming in breast cancer. **BMC Cancer**, Helsinki, Finlândia, p. 1-14, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **O que é câncer?**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em 29 de novembro de 2017.

LIMA, L. G. **MICROVESÍCULAS TUMORAIS: PAPEL NA BIOLOGIA DO TUMOR COM ÊNFASE EM PROCESSOS IMUNOSSUPRESSIVOS E PRÓ-TROMBÓTICOS**. 2008, 139 f, Dissertação (mestrado em Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MORAIS, J. F; YOSHIMOTO, M.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista Uningá Review**. 17:27-34, 2013.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Skin Cancer (Including Melanoma) - Patient Version**, 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/skin>>. Acesso em: 10 de junho de 2016.

RATAJCZAK J, WYSOCZYNSKI M, HAYEK F, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia**, Canadá, p. 1487-1495, 20 de julho de 2006.

RATAJCZAK J., MIEKUS K., KUCIA M., ZHANG J., RECA R., DVORAK P., RATAJCZAK MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia**, República checa, p. 847-856, 2 de fevereiro de 2006.

SEEBODE, C.; LEHMANN, J.; EMMERT, S. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies. **Anticancer research**, v. 36, n. 3, p. 1371–8, 2016.

S. A. HOPTION CANN, J. P. VAN NETTEN, AND C. VAN NETTEN, “Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future,” **Postgraduate Medical Journal**, vol. 79, no. 938, p. 672–680, 2003.

TANG, T. ; ELDABAJE, R. ; YANG, L. Current Status of Biological Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma. **Anticancer Research**, v. 36, n 7, jul. 2016.

XANTHOPOULOS, J. M.; ROMANO, A. E.; MAJUMDAR, S. K. Response of Mouse Breast Cancer Cells to Anastrozole , Tamoxifen , and the Combination. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Estados Unidos da América, p. 10–19, 2005.

WHO – *World Heath Organization*. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 19 de fevereiro de 2015.

YEH, W-L.; LIN, H-Y.; WU, H-M.; CHEN, D-R. Combination Treatment of Tamoxifen with Risperidone in Breast Cancer. **PLOS ONE**, Taiwan, China, v. 9, n. 6, 2 jun. 2014