UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito de resveratrol associado ao tamoxifeno na proliferação e apoptose de células de câncer de mama.

Beatriz Tinoco Franceschi

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito de resveratrol associado ao tamoxifeno na proliferação e apoptose de células de câncer de mama.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Beatriz Tinoco Franceschi

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Torqueti

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 16/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Franceschi, Beatriz Tinoco
Avaliação do efeito do resveratrol associado ao tamoxifeno na proliferação e apoptose de células de câncer de mama. Ribeirão Preto, 2017.
p. 82:il; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientadora: Torqueti, Maria Regina

Palavras-chave: 1. Câncer de mama; 2. Tamoxifeno; 3. Resveratrol; 4. Apoptose

Beatriz Tinoco Franceschi

Avaliação do efeito de resveratrol associado ao tamoxifeno na proliferação e apoptose de células de câncer de mama.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Torqueti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, João e Leiza, e meus irmãos, Yara, João Vicente e José Leôncio, com muito carinho

AGRADECIMENTOS

À **Profª Drª Maria Regina Torqueti**, minha orientadora, agradeço por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança e pelos ensinamentos, essenciais para meu crescimento científico e pessoal, pela atenção e por estar sempre presente durante o decorrer deste trabalho.

À **Profª Drª Adriana Pelegrino Pinho Ramos**, coordenadora do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Ribeirão Preto, laboratório o qual faço parte da equipe de trabalho, agradeço por me incentivar a realizar o mestrado e a compreensão pelos momentos em que precisei me ausentar da jornada de trabalho.

Às farmacêuticas **Adriana, Carla** e **Patrícia**, colegas de trabalho, por toda ajuda durante o período de realização do mestrado.

À **Profª Drª Luciana Simon Pereira Crott, Profª Drª Fabíola Attié de Castro** e **Prof Dr Marcelo Dias Baruffi**, por disponibilizar equipamentos e reagentes.

À **Francine**, técnica do laboratório de citologia da FCFRP, pelos ensinamentos e pela ajuda com os experimentos.

À **Patrícia**, doutoranda, pelos ensinamentos, ajuda com os experimentos e análise estatística.

À **Luciana**, técnica do laboratório de hematologia da FCFRP, pelos ensinamentos e pela ajuda com os western-blot.

À **Fabiana**, responsável pela citometria de fluxo, por sua colaboração.

Ao meu namorado **Wellington** ❤ e meu irmão **João Vicente**, pela ajuda com as formatações do trabalho.

À amigos e familiares que estiveram comigo durante esta jornada.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, pela oportunidade da realização do mestrado.

À **Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.**

À todos que, de alguma forma, tornaram esse trabalho possível, MUITO OBRIGADA.

"[...] Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante

Dê o melhor de você assim mesmo

Veja que, no final das contas, é entre você e Deus

Nunca foi entre você e as pessoas. "

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

FRANCESCHI, B.T. **Avaliação do efeito de resveratrol associado ao tamoxifeno na proliferação e apoptose de células de câncer de mama.** 2017. 82f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: O câncer se tornou um grande problema de saúde pública mundial, sendo o câncer de mama o mais incidente em mulheres. A terapia endócrina com o tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM), é aplicada em câncer de mama receptor de estrógeno (RE) positivo, porém, pacientes tratadas por um longo período podem desenvolver resistência ao medicamento. O tratamento padrão para o câncer de mama triplo negativo é a quimioterapia com antraciclinas e taxanos, individual ou em combinação com cirurgia e/ou radioterapia, porém muitos fatores devem ser considerados. Assim, aumenta a necessidade por novas estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer de mama, especialmente para o fenótipo triplo-negativo e, consequentemente, abre-se uma grande área para a aplicação de produtos naturais, como o resveratrol. Estudos tem demonstrado que fitoquímicos, como o resvetatrol, podem ser usados em combinação com agentes quimioterapêuticos, aumentando sua eficácia e diminuindo sua toxicidade. **Objetivos:** Avaliar os efeitos citotóxicos do resveratrol e dos metabólitos do tamoxifeno (N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno), em tratamentos isolados e em associação, na proliferação e apoptose de células de câncer de mama RE-positivo (MCF-7) e células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231). **Materiais e Métodos:** A avaliação dos efeitos citotóxicos de resveratrol e metabólitos do tamoxifeno na proliferação e apoptose das células de câncer de mama foi realizada a partir do Ensaio de Viabilidade Celular (método de análise colorimétrica utilizando o Metil Tiazol Tetrazolium - MTT), cálculo de Coeficiente de Interação entre Drogas (CID) para avaliar o grau de sinergia entre os tratamentos, marcação celular com anexina V e iodeto de propídeo, Hypotonic Fluorescent Solution e western-blot (caspase 3, 8 e 9). **Resultados:** O tratamento associado de resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM e resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM mostrou diminuir significativamente a viabilidade celular de MCF-7 e MDA-MB-231, quando comparado com o tratamento isolado de desmetiltamoxifeno 30 µM e hidroxitamoxifeno 40 µM, respectivamente. Os tratamentos associados também mostraram aumento de células MCF-7 e MDA-MB-231 marcadas com anexina V e iodeto de propídeo e aumento de núcleos hipodiplóides, porém, a maior ativação de caspase 3, 8 e 9 ocorreu apenas em MCF-7. **Conclusões:** Os resultados obtidos indicam que os tratamentos associados reduziram a viabilidade de células MCF-7 e MDA-MB-231 e induziram ativação de apoptose somente em MCF-7. Assim, sugere-se que a redução na viabilidade de MDA-MB-231 deve estar relacionada com mecanismos independentes de ativação de caspases.

Palavras-chave: Câncer de mama; Tamoxifeno; Resveratrol; Apoptose

ABSTRACT

FRANCESCHI, B.T. **Evaluation of the effect of resveratrol combined with tamoxifen on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells**. 2017. 82f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introduction: Cancer has become a major public health problem worldwide, with breast cancer being the most common in women. Endocrine therapy with tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator (SERM), is used in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer, but patients treated over a long period may develop resistance to the drug. The standard treatment for triple negative breast cancer is chemotherapy with anthracyclines and taxanes, either alone or in combination with surgery and / or radiotherapy, but many factors must be considered. Thus, there is a growing need for new therapeutic strategies for the treatment of breast cancer, especially for the triple-negative phenotype and, consequently, opens up a great area for the application of natural products, such as resveratrol. Studies have shown that phytochemicals, such as resvetatrol, can be used in combination with chemotherapeutic agents, increasing their efficacy and decreasing their toxicity. **Objectives:** To evaluate the cytotoxic effects of resveratrol and the metabolites of tamoxifen (N-desmetiltamoxifen and 4-hydroxytamoxifen) in isolated and combined treatments on the proliferation and apoptosis of ER-positive breast cancer cells (MCF-7) and cancer cells of triple negative breast (MDA-MB-231). **Materials and methods:** The evaluation of the cytotoxic effects of resveratrol and metabolites of tamoxifen on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells was performed from the Cell Viability Assay (colorimetric analysis using Methyl Thiazole Tetrazolium - MTT), Coefficient of Drug Interaction (ICD) to assess the degree of synergy between treatments, cell marking with annexin V and propidium iodide, Hypotonic Fluorescent Solution and western blot (caspase 3, 8 e 9). **Results:** The associated treatment of resveratrol 165 μM + desmethyltamoxifen 30 μM and resveratrol 165 μM + hydroxytamoxifen 40 μM showed a significant decrease in the cellular viability of MCF-7 and MDA-MB-231 when compared to the isolated treatment of desmethyltamoxifen 30 μM and hydroxytamoxifen 40 μM, respectively. Associated treatments also showed increase of MCF-7 and MDA-MB-231 cells labeled with annexin V and propidium iodide and increase of hypodiploid nuclei, but the greater activation of caspase 3, 8 and 9 occurred only in MCF-7. **Conclusions:** The results indicate that the associated treatments reduced the viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells and induced activation of apoptosis only in MCF-7. Thus, it is suggested that the reduction in the viability of MDA-MB-231 should be related to independent mechanisms of caspase activation.

Keywords: Breast cancer; Tamoxifen; Resveratrol; Apoptosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do processo apoptótico 13

Figura 2 – Fluxograma da metodologia 18

Figura 3 – Viabilidade celular da linhagem MCF-10A tratada com resveratrol por 24 horas 30

Figura 4 – Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (4A) e MDA-MB-231 (4B) tratadas com resveratrol por 24 horas 32

Figura 5 – Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (5A) e MDA-MB-231 (5B) tratadas com desmetiltamoxifeno por 24 horas 34

Figura 6 – Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (6A) e MDA-MB-231 (6B) tratadas com hidroxitamoxifeno por 24 horas 36

Figura 7 – Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (7A) e MDA-MB-231 (7B) tratadas com associação de resveratrol 165 µM e desmetiltamoxifeno 30 µM por 24 horas 38

Figura 8 – Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (8A) e MDA-MB-231 (8B) tratadas com associação de resveratrol 165 µM e hidroxitamoxifeno 40 µM por 24 horas 39

Figura 9 - Análise da porcentagem das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em fase precoce de apoptose e apoptose tardia/necrose pelo método de marcação celular com Anexina V/PI por citometria de fluxo..... 43

Figura 10 – Porcentagem das linhagens MCF-7 (10A) e MDA-MB-231 (10B) em apoptose e apoptose tardia/necrose (marcação com Anexina V e iodeto de propídeo), quando tratadas com resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM e associação de resveratrol 165 µM com cada um dos metabólitos do tamoxifeno 45

Figura 11 - Análise da porcentagem de núcleos hipodiplóides das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 pelo método HFS por citometria de fluxo..... 47

Figura 12 – Porcentagem das linhagens MCF-7 (12A) e MDA-MB-231 (12B) em apoptose (núcleo hipodiplóide), quando tratadas com resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM e associação de resveratrol 165 µM com cada um dos metabólitos do tamoxifeno (ensaio de HFS) 49

Figura 13 – Ativação da caspase 3 pelo tratamento de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 51

Figura 14 – Ativação da caspase 8 pelo tratamento de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM na linhagem MCF-7 51

Figura 15 – Ativação da caspase 9 pelo tratamento de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM na linhagem MCF-7 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos utilizados nas linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 para o ensaio de viabilidade celular (MTT) 20

Tabela 2 – Tratamentos utilizados nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 para os ensaios de marcação com Anexina V/PI, HFS e Western-blot 23

Tabela 3 – Análise da Viabilidade Celular na linhagem MCF-10A após tratamento com resveratrol por 24 horas 30

Tabela 4 – Análise da Viabilidade Celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com resveratrol por 24 horas 31

Tabela 5 – Análise da Viabilidade Celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com desmetiltamoxifeno por 24 horas 33

Tabela 6 – Análise da Viabilidade Celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com hidroxitamoxifeno por 24 horas 35

Tabela 7 – Análise da Viabilidade Celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento associado de resveratrol com desmetiltamoxifeno e hidroxitamoxifeno por 24 horas 37

Tabela 8 – Análise da potencialização dos metabólitos do tamoxifeno quando associados ao resveratrol em tratamentos *in vitro* 41

Tabela 9 – Análise da apoptose e apoptose tardia/necrose (marcação com anexina V e iodeto de propídeo) nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento associado de resveratrol com desmetiltamoxifeno e hidroxitamoxifeno por 24 horas 44

Tabela 10 – Análise da apoptose (% núcleo hipodiplóide) nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento associado de resveratrol com desmetiltamoxifeno e hidroxitamoxifeno por 24 horas 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK – Adenosine 5'-Monophosphate-Actived Protein Kinase

Apaf-1 – Apoptosis Protease-Activating Factor-1

Bad – Bcl-2 antagonist of the cell death

Bak – Bcl-2 homologous antagonist/killer

Bax – Bcl-2 associated x proteins

Bcl-x_L – Bcl-2 related gene

Bcl-2 – b-cell lymphoma

BH-3 – Bcl-2 homology domain 3

Bid – BH3-interacting domain against

Bik – Bcl-2 interacting killer

Bim – Bcl-2 interacting mediator

CID – Coeficiente de Interação entre Drogas

DISC – Death Inducing Signaling Complex

DMSO - Dimetilsulfóxido

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor

FADD – Fas-Associated Death Domain

FasL – Fas Ligante

HER2 – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HFS – Hypotonic Fluorescent Solution

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

IA – Inibidores da Aromatase

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase

MCF-10A – Linhagem celular epitelial de mama não-cancerígena

MCF-7 – Linhagem de adenocarcinoma de mama estrógeno-dependente

MDA-MB-231 – Linhagem de adenocarcinoma de mama estrógeno-independente

MTT – Metil Tiazol Tetrazolium

NF-κB – Nuclear Factor κB

PARP – Poly(ADP-Ribose) Polymerase

PBS – Tampão Fosfato

PI – Iodeto de Propídeo

PI3K/Akt – Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B

PKC – Protein Kinase C

PVDF – Fluoreto de Polivinillideno

RE – Receptor de Estrógeno

RE-α – Receptor de Estrógeno do tipo alfa

RE-β – Receptor d Estrógeno do tipo beta

RP – Receptor de Progesterona

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium

SBF – Soro Bovino Fetal

SERM – Selective Estrogen Receptor Modulators

STAT-3 – Signal Transducer and Activator of Transcription 3

tBid – Bid truncado

TNF-α – Tumor Necrosis Factor Alpha

T47D – Linhagem de adenocarcinoma de mama estrógeno-dependente

VEGF – Vascular Endotelial Growth Factor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 2
1.1 Aspectos gerais do câncer de mama 2
1.2 Mecanismo de carcinogênese mamária 4
1.3 Terapias para o câncer de mama 5
1.3.1 Câncer de mama RE-positivo 5
1.3.2 Câncer de mama HER2-positivo 6
1.3.3 Câncer de mama triplo negativo 7
1.4 Resveratrol 8
1.5 Câncer e Morte celular 11
2 OBJETIVOS 15
2.1 Objetivo Geral 15
2.2 Objetivos Específicos 15
3 MATERIAIS E MÉTODOS 18
3.1 Linhagens Celulares e Cultura de Células 18
3.2 Substâncias Medicamentosas 19
3.3 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT 19
3.4 Análise da potencialização dos metabólitos do tamoxifeno quando associados ao resveratrol em tratamentos *in vitro* 21
3.5 Ensaios de Indução de Apoptose e Necrose 21
3.5.1 Marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo 21
3.5.2 Ensaio de HFS (Hypotonic Fluorescent Solution) 23
3.6 Detecção das caspase 3, 8 e 9 por Western-blot 24
3.7 Análise Estatística 26
4 RESULTADOS 28
4.1 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT 28
4.2 Análise da potencialização dos metabólitos do tamoxifeno quando associados ao resveratrol em tratamentos *in vitro* 40
4.3 Ensaios de Indução de Apoptose e Necrose 41
4.3.1 Marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo 41
4.3.2 Ensaio de HFS (Hypotonic Fluorescent Solution) 46
4.4 Detecção das caspases 3, 8 e 9 por Western-blot 50
5 DISCUSSÃO 54
6 CONCLUSÕES 59
REFERÊNCIAS 61

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do câncer de mama

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um grande problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde estimou que, no ano 2030, pode-se esperar 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer. No Brasil, as estimativas para o ano de 2018 apontam a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, sendo o câncer de mama o mais incidente em mulheres, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

A idade continua sendo o principal fator de risco para o câncer de mama, sendo que as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta. Contudo, outros fatores de risco já estão bem estabelecidos, como aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal), história familiar de câncer da mama e alta densidade do tecido mamário (INCA, 2018).

Por ser uma doença heterogênea, o câncer de mama é classificado de acordo com parâmetros clínicos, histopatológicos e moleculares, a fim de predizer sobre o comportamento do tumor e fornecer estratégias terapêuticas. Em relação aos parâmetros moleculares, a classificação é realizada levando em consideração a presença ou ausência de marcadores imunohistoquímicos, incluindo o receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), marcadores de proliferação KI67 e citoqueratinas, os quais são responsáveis por controlar a sinalização do crescimento celular (MAKKI, 2015; DAI et al., 2016).

O câncer de mama pode ser agrupado em quatro subgrupos de acordo com esses marcadores, sendo eles: [RE+|RP+]HER2-, tumores com RE e RP positivo e HER2 negativo; [RE+|RP+]HER2+, tumores com RE e RP positivo e HER2 positivo; [RE-|RP-]HER2+, tumores com RE e RP negativo e HER2 positivo, também chamados de HER2 positivo; e [RE-|RP-]HER2-, tumores

com RE e RP negativo e HER2 negativo, também chamados triplo negativo (DAI et al., 2016).

O RE é o biomarcador mais importante para a classificação do câncer de mama e o mais intensamente estudado até hoje. Foi identificado em 1960 e usado no manejo clínico do câncer de mama desde 1970, como um indicador primário da resposta à terapia endócrina e como fator prognóstico. Aproximadamente 75% dos cânceres de mama apresentam RE, sendo classificados como RE-positivos. Esses tumores são largamente diferenciados, menos agressivos, tendem a crescer mais lentamente, são responsivos à terapia hormonal e estão associados a um melhor prognóstico (DAI et al., 2016).

O RP é ativado pela progesterona e regula vias importantes, como a proliferação celular. Sabe-se que a expressão de RP é regulada pelo RE e a presença de RP indica que a via estrogênica está atuante (ALLRED, 2010). Aproximadamente 65% a 75% dos cânceres de mama apresentam RP, sendo classificados com RP-positivos. Tumores RE-RP+ respondem bem à terapia endócrina e tumores RE+RP- são menos responsivos à terapia endócrina quando comparados com tumores RE+RP+ (DAI et al., 2016).

Outro biomarcador importante na carcinogênese mamária é a amplificação ou aumento da expressão do oncogene HER2, que ocorre em 13% a 20% dos cânceres de mama. Esse gene codifica um receptor com atividade tirosina-quinase envolvido na sinalização de fatores de crescimento. Dessa forma, tumores HER2 positivos estão associados com um pior prognóstico devido a proliferação aumentada, angiogênese e inibição de apoptose (BRAVATÀ et al., 2013; DAI et al., 2016).

O marcador de proliferação celular mais importante é o KI67, o qual é utilizado em combinação com outros marcadores (RE, RP e HER2) para fornecer valor prognóstico e de tratamento do câncer de mama. Assim, o câncer de mama [RE+|RP+]HER2- pode ser classificado em [RE+|RP+]HER2-KI67- e [RE+|RP+]HER2-KI67+, sendo este último associado a um pior resultado após terapia sistêmica (DAI et al., 2016).

Tumores [RE+|RP+]HER2- e [RE+|RP+]HER2+ são similares aos tumores luminal A e luminal B, respectivamente. Porém, não há consenso na conversão entre a classificação imuno-histoquímica e a classificação GEP. O

câncer de mama luminal A expressa RE, RP e citoqueratinas, responde bem à terapia endócrina e apresenta bom prognóstico. Já o câncer de mama luminal B expressa RE, RP, HER2 e KI67, e apresenta resposta variável à terapia endócrina e seu prognóstico é pior quando comparado ao luminal A (MAKKI, 2015; DAI et al., 2016).

Tumores [RE-|RP-]HER2- não expressam receptores hormonais (RE-/RP-) e a proteína do oncogene HER2 (HER2-), sendo referido como câncer de mama triplo negativo. Esses tumores podem ser agrupados em duas classes moleculares distintas, sendo tumores [RE-|RP-]HER2- de fenótipo basal e não-basal, que diferem no seu comportamento e reposta a terapêutica. A presença de marcadores imunohistoquímicos como citoqueratinas 5/6, 14, 17, 8/18 e EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) são utilizados para a classificação do fenótipo basal. A definição amplamente aceita para o subtipo basal é a presença de citoqueratinas 5/6 e EGFR, sendo que representam 10 a 25% dos cânceres de mama. O câncer de mama triplo negativo está associado a um pior prognóstico, devido a poucas alternativas terapêuticas e pelo alto risco de recorrência, metástase e morte (DAI et al., 2016; YAO et al., 2017).

Os tumores [RE-|RP-]HER2+ e [RE-|RP-]HER2- são pouco diferenciados, apresentam comportamento agressivo e são menos prováveis de responder à terapia endócrina (DAI et al., 2016).

1.2 Mecanismo de carcinogênese mamária

Estrógenos regulam o crescimento, a diferenciação e a fisiologia do processo reprodutivo, além de influenciar no processo patológico de cânceres hormônio-dependente, tais como o câncer de mama, endométrio, próstata, ovariano e câncer na tireóide (CHEN, 2008).

A ação biológica dos estrógenos nos órgãos alvos é mediada através dos receptores de estrógenos, estando envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Assim, os REs agem como fatores de transcrição nuclear ativado pelo estrógeno, ou seja, o estrógeno se liga ao RE que migra para o núcleo, determinando aumento da expressão de genes envolvidos na proliferação celular e sobrevivência, e baixa expressão de genes

com atividade anti-proliferativa ou pró-apoptótica, e o efeito final é a estimulação do crescimento e proliferação celular. Estudos mostram que os estrógenos aumentam as chances do desenvolvimento de câncer de mama esporádico, mediante a exposição contínua dos mesmos (YAGER, 2015).

Por promoverem proliferação celular, os estrógenos contribuem ao acúmulo de mutações espontâneas, especialmente mutações nos genes supressores de tumores (p53, BRCA-1 ou BRCA-2) ou proto-oncogenes, que pode conduzir a uma proliferação descontrolada e o início do câncer (CHEN, 2008).

Já o câncer de mama triplo negativo está associado com mutações no gene BRCA-1 e apresenta aumento da expressão de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e EGFR, os quais contribuem para o crescimento rápido e proliferação desse tipo de câncer de mama (ZHANG et al., 2016).

1.3 Terapias para o câncer de mama

Para o tratamento do câncer de mama estão disponíveis cinco tipos de intervenções, sendo cirurgia (mastectomia), radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia (ZHOU; TENG; XIE, 2013).

1.3.1 Câncer de mama RE-positivo

O termo terapia hormonal é aplicado aos tratamentos de câncer de mama que tem como alvo o RE, sendo denominados moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERM). O RE está presente em 75% dos carcinomas mamários e a terapia hormonal tem se mostrado eficaz na redução do risco de reincidência do câncer de mama. O tamoxifeno (SERM) atua principalmente pelo bloqueio da ligação do estrógeno ao seu receptor (RE-α), como um antagonista, inibindo a transcrição de genes responsivos ao estrógeno, a proliferação celular e o crescimento tumoral, sendo considerado o medicamento padrão no tratamento hormonal do câncer de mama RE-positivo (YANG et al., 2013).

Após administração oral do tamoxifeno, mais de 50% é metabolizado no fígado e convertido em dois metabólitos importantes, N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno. O N-desmetiltamoxifeno apresenta uma menor atividade biológica em relação ao tamoxifeno, porém apresenta meia-vida de dias. Já o 4-hidroxitamoxifeno possui atividade biológica semelhante ao tamoxifeno, porém é eliminado rapidamente (7 a 14 horas) (BUCHANAN et al., 2007).

Apesar de o tamoxifeno apresentar efeitos positivos no tratamento do câncer de mama, seus efeitos não se restringem ao sítio tumoral. Além da propriedade antagonista, o tamoxifeno ligado ao receptor exibe propriedade de agonista parcial do estrógeno que pode ser responsável por algumas falhas de tratamento. O tamoxifeno é geralmente bem tolerado, mas pode estar associado a diversos efeitos colaterais, como distúrbios gastrointestinais e vaginite. E com o uso em longo prazo, as propriedades do tamoxifeno similares ao estrógeno estão associadas com um risco baixo, mas clinicamente significativo, de complicações tromboembólicas e um aumento de duas a três vezes o risco de desenvolver câncer do endométrio (HOWELL et al., 2004).

Além disso, pacientes tratadas por um longo período podem desenvolver resistência ao medicamento, sendo necessária a associação com outra classe de medicamentos, como Inibidores da Aromatase (IA). Os IA bloqueiam a enzima aromatase que metaboliza hormônios andrógenos (antrostenediona e testosterona) em estrógenos (estrona e estradiol) na mulher pós-menopausa e, consequentemente, inibem a síntese de estrógenos. Porém, os IA apresentam efeitos colaterais significativos, como aumento dos níveis séricos de colesterol e aumento de distúrbios cardíacos severos (JORDAN et al., 2005).

Muitos dos efeitos colaterais associados ao uso do tamoxifeno são considerados dose dependente, assim, a formulação de um esquema de tratamento que permita a utilização de doses mais baixas, menos tóxicas e com eficácia igual ou superior vem sendo procurados para o tratamento do câncer de mama com o tamoxifeno (YANG et al., 2013).

1.3.2 Câncer de mama HER2-positivo

Com os avanços genéticos e uma compreensão maior sobre as bases moleculares do câncer, terapias com ação em sítios específicos nas células

tumorais foram desenvolvidas, sendo denominadas terapias-alvo. O trastuzumabe foi o primeiro medicamento dessa classe a ser aplicado com sucesso no tratamento do câncer de mama (HADDAD, 2010).

O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que possuiu ação no sítio extracelular do receptor para o fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2), sendo aprovado para o tratamento do câncer de mama HER2-positivo. Assim, o trastuzumabe age bloqueando a porção extracelular dos receptores e impedindo a ligação de fatores de crescimento, consequentemente, inibe as vias de sinalização intracelulares que estimulam a proliferação celular, culminando com um efeito citostático e citotóxico (HADDAD, 2010).

1.3.3 Câncer de mama triplo negativo

Pacientes com câncer de mama triplo negativo não se beneficiam de terapias que são projetadas contra o câncer de mama RE-positivo e HER2-positivo, como o Tamoxifeno e Trastuzumabe, respectivamente (YAO et al., 2017).

Atualmente, a Sociedade Europeia de Oncologia Médica afirma que o tratamento padrão para pacientes com câncer de mama triplo negativo é a quimioterapia citotóxica utilizando medicamentos como as antraciclinas e os taxanos, individual ou em combinação com cirurgia e/ou radioterapia, que são empregadas rotineiramente em outros tipos de câncer de mama. Porém, é necessário levar em consideração os fatores relacionados à doença, como terapias anteriores, carga tumoral e necessidade de controle rápido da doença/sintomas, e fatores relacionados ao paciente, como preferências da paciente, idade, estado da menopausa, comorbidades e fatores fisiológicos (ISMAIL-KHAN; BUI, 2010; YAO et al., 2017).

Devido às poucas alternativas terapêuticas eficazes para o tratamento do câncer de mama triplo negativo, faz-se necessário a pesquisa de tratamentos alternativos que possam sensibilizar esse tipo de câncer. Assim, a literatura aponta a aplicação de produtos naturais no tratamento alternativo do câncer de mama, dentre os quais, destacam-se as isoflavonas e o resveratrol, como demonstrado por Ronghe et al. (2016) e Kala e Tollefsbol (2016), os

quais utilizaram resveratrol associado ao tamoxifeno e seu metabólito 4-hidroxitamoxifeno em células MCF-7 e MDA-MB-231.

1.4 Resveratrol

Atualmente, o potencial dos constituintes dietéticos em restringir a carcinogênese tem atraído atenção na quimioprevenção ao câncer. Entre os constituintes presentes na dieta, o resveratrol (trans-3,4',5-tri-hidroxi-estilbeno) recebeu especial atenção devido aos relatos de Pezzuto et al. (1997) sobre a sua capacidade de inibir a iniciação e promoção de câncer de pele induzido por hidrocarboneto e a progressão de câncer de mama em rato. Além disso, o resveratrol possui diversas propriedades biológicas e potencialmente benéficas, como atividade antinflamatória, antioxidante, cardioprotetora e no retardo do crescimento de uma variedade de células de câncer em modelos *in vivo*. É uma substância classificada como uma fitoalexina polifenólica, sendo um componente comum de frutas, em particular uvas, que é produzido pela enzima estilbeno sintase como uma resposta ao estresse de condições climáticas ou infecções microbianas (KOK et al., 2010; SINHA et al., 2016).

O resveratrol tem sido relatado como um fitoestrógeno devido à sua similaridade estrutural ao agente estrogênico dietilestilbestrol. O caráter fitoestrogênico do resveratrol foi confirmado por sua capacidade de se ligar e ativar RE-α e RE-β regulando a transcrição de genes alvos responsivos ao estrógeno. O resveratrol age com um caráter bifásico de uma maneira dose-dependente, apresentando propriedades agonistas/antagonistas nos REs, culminando com efeitos proliferativos e anti-proliferativos em células de câncer de mama (ALAMOLHODAEI et al., 2017).

Nakagawa et al. (2001) relataram que baixas concentrações de resveratrol (≤ 4 μM) causaram proliferação em linhagem de células de câncer de mama RE-positivo (MCF-7), enquanto altas concentrações (≥ 44 μM) inibiram o crescimento celular de MCF-7. Em outro estudo, Pozo-Guisado et al. (2002) demonstraram que altas doses de resveratrol (50 μM) inibiram o crescimento de células de câncer de mama RE-positivo (MCF-7) mas não de células de câncer de mama RE-negativo (MDA-MB-231), enquanto baixas

doses de resveratrol potencializaram a proliferação de MCF-7. A inibição do crescimento de MDA-MB-231 ocorreu em doses acima de 200 µM. Levenson et al. (2003) também sugeriram que o resveratrol pode agir como um agonista em baixas concentrações (10 – 25 µM), em células de câncer de mama estrógeno-dependente, através da ativação de genes responsivos ao estrógeno, demonstrando seu caráter fitoestrogênico. É importante ressaltar que a atividade antagonista do resveratrol é somente para o RE-α, e não para o subtipo RE-β (PARK et al., 2011).

Segundo dados da literatura, o resveratrol pode inibir a proliferação e a viabilidade de células de câncer *in vitro*, de uma maneira dose e tempo dependente, e muitos estudos demonstram que o resveratrol pode ser utilizado como agente quimiopreventivo pela sua capacidade de inibir o crescimento celular maligno, promover parada do ciclo celular e apoptose em várias linhagens celulares de câncer. Além disso, o resveratrol regula a expressão de genes específicos do câncer e inibe uma variedade de eventos moleculares em células de câncer, que auxiliam a sobrevivência celular e metástase (HSIEH; WU, 2010; SINHA et al., 2016).

O mecanismo pelo qual o resveratrol fornece uma variedade de benefícios para o tratamento do câncer ainda não foi bem elucidado e somente algumas moléculas intracelulares e vias de sinalização foram identificadas como alvo dessa substância, sendo elas: (1) regulação mitocondrial e ativação do sistema enzimático das caspases; (2) super expressão de inibidores quinases dependentes de ciclina, de genes supressores tumorais, de citocinas indutoras de morte e seus receptores; (3) baixa expressão de proteínas de sobrevivência associadas com o desenvolvimento de quimioresistência, incluindo survivina e proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x_L) (FARRAND et al., 2013); (4) ativação de AMPK (*adenosine 5´-monophosphate-actived protein kinase*) e (5) inibição de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PI3K/Akt (*phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B*) (LI et al., 2013), PKC (*protein kinase C*), nuclear factor κB (NF-κB) (THIEL e ROSSLER, 2014), STAT-3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) (BAEK, 2016), entre outros (JIANG et al., 2017).

Estudos tem demonstrado que fitoquímicos, como o resvetatrol, podem ser utilizados em associação com agentes quimioterapêuticos,

aumentando sua eficácia e diminuindo sua toxicidade. Por exemplo, o resveratrol, em associação com a cisplatina e doxorrubicina, tem mostrado exercer um efeito inibitório aditivo no crescimento de células de câncer ovariano e uterino (HSIEH; WU, 2010). Vinod et al. (2015) demonstraram que o resveratrol pode quimiosensibilizar células de câncer de mama que super expressam HER2, resistentes ao docetaxel, através do bloqueio de vias de sinalização como Akt e MAPK. Dun et al. (2015) demonstraram que o resveratrol associado à fluorouracila pode induzir apoptose em células de câncer, através da elevação dos níveis de *poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP) clivada e caspase 3 ativada.

Assim, nota-se que é muito grande a procura da ciência por novas estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer, pois a grande maioria dos medicamentos disponíveis no mercado tem seu uso limitado por diversos fatores, como a elevada toxicidade, resistência e baixa biodisponibilidade. Nesse contexto, diversas estratégias terapêuticas têm sido avaliadas em diferentes linhagens celulares tumorais.

A escolha do resveratrol neste estudo leva em consideração vários trabalhos produzidos ao longo da última década, incluindo um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, em que testamos diferentes concentrações de resveratrol em linhagem de câncer de bexiga (STOCCO et al., 2012). Neste estudo, concentrações acima de 20 µM induziram morte celular e, concentrações entre 0,1 e 20 µM não demonstraram atividade na proliferação celular, demonstrando o caráter dose dependente dessa substância. O tratamento com resveratrol 50-100 µM intensificou a morte de células de câncer de bexiga e aumentou significantemente o ratio Bad/Bcl-2 (proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas), indicando indução de morte por apoptose nessas células.

De acordo com a literatura, pode-se afirmar que o resveratrol exerce alguma atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. No entanto, para que o resveratrol torne-se candidato efetivo na terapia antitumoral, é fundamental o estabelecimento de esquemas de tratamentos mais robustos, seguros e eficazes. No presente trabalho, o resveratrol e o tamoxifeno foram avaliados em diferentes concentrações utilizando esquema de tratamento simultâneo e, a aplicação desse trabalho, permitirá avaliar se o resveratrol proporciona

benefícios quando administrado em associação ao quimioterápico (tamoxifeno) utilizado na clínica.

1.5 Câncer e Morte celular

A ocorrência de distúrbios na proliferação celular e na supressão da morte celular são características importantes para a patogênese do câncer, visto que promovem crescimento e proliferação celular desordenado. A morte celular pode ser classificada de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas, sendo que a via de morte celular mais estudada no câncer é a via apoptótica (PORTT et al., 2011).

Múltiplos sinais modulam a proliferação, sobrevida e morte celular, sendo que essas ações coordenadas permitem que a célula normal tenha uma divisão celular ordenada até sua senescência (MESTER; REDEUILH, 2008). As células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole de proliferação e ausência de morte celular, colaborando para o desenvolvimento dos tumores (FOSTER, 2008).

A apoptose é um processo fisiológico regulado de morte celular programada e desempenha um papel essencial na homeostase de diferentes tecidos e em certas condições patológicas, como o câncer. É caracterizada por contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos, formação de vesículas sem perda de integridade da membrana, chamados corpos apoptóticos, e sem resposta inflamatória, despolarização da membrana mitocondrial e alterações na assimetria de fosfolipídeos de membrana plasmática. Além disso, alterações no complexo de Golgi, no retículo endoplasmático e na mitocôndria produzem proteínas chamadas citocromo c, liberadas pela membrana mitocondrial, desencadeando um complexo de ativação de caspases intracelulares (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; TAYLOR et al., 2008).

As caspases (*Cystein-dependent aspastate-especific protease*) estão presentes em células saudáveis como enzimas precursoras inativas e, todo estímulo que desencadeia a apoptose leva a ativação de caspases, embora por diferentes vias. Há duas vias principais de regulação da apoptose: a) apoptose

mediada por receptores de morte, pertencentes à família do receptor de TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*), presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca, e b) apoptose mediada pela mitocôndria, denominada via intrínseca. Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca possuem um grupo independente de caspases iniciadoras (caspase 8, 9 e 10) que convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras (caspase 3, 6 e 7) com finalidade de executar eventos intracelulares (proteólises) que resultarão na morte celular programada (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

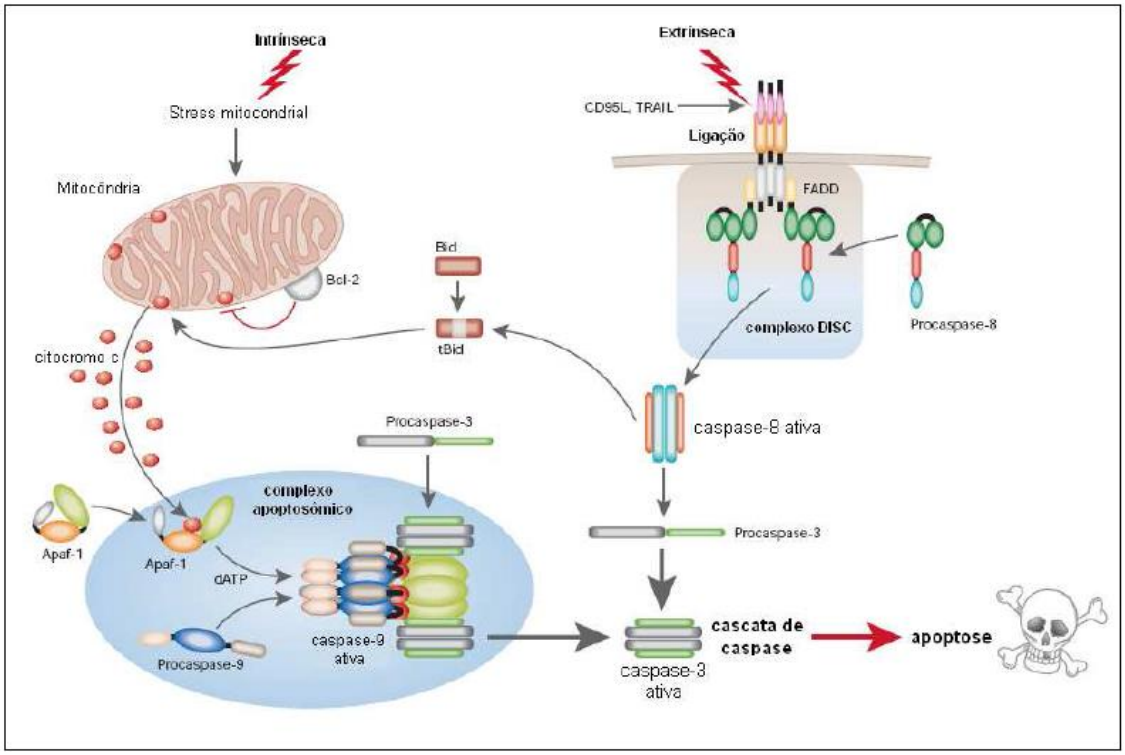
A via extrínseca (Figura 1) é iniciada por associação de marcadores extracelulares de morte, como FasL (Fas Ligante) ou TNF-α, a receptores de morte na membrana plasmática e, ao interagirem, promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras como Fas associada ao domínio de morte (FADD – *Fas-Associated Death Domain*), que recruta moléculas de pró-caspase 8, formando o complexo sinalizador para a indução de morte, DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Após seu recrutamento, pró-caspase 8 é convertida em caspase-8 e liberada para o citosol, onde pode ativar caspase 3 ou desencadear a via intrínseca por meio da clivagem da molécula Bid (tBid), que se transloca até a mitocôndria, promove oligomerização de Bak-Bax, causando alteração na função mitocondrial, liberando proteínas pró-apoptóticas, como citocromo c. O citocromo c liberado no citosol se associa com a Apaf-1 *(Apoptosis Protease-activating Factor-1")* e a pró-caspase 9, formando o complexo chamado apopssomo, que ativa caspase 9, que por sua vez ativa as caspases efetoras, levando à apoptose (TAYLOR et al., 2008; PORTT et al., 2011).

A via intrínseca (Figura 1) inicia-se pela ação de diversos sinais de estresse intra e extracelulares, tais como hipóxia, espécies reativas de oxigênio, irradiação ultravioleta, ausência de fatores de crescimento celular e vários compostos citotóxicos, resultando na ativação de membros da família de proteínas BH-3 (Bad, Bid, Bik, Bim, etc). Essas proteínas podem receber um sinal inibitório de uma família de moléculas denominadas Bcl-2 (Bcl-2 e Bcl-x_L), que são proteínas anti-apoptóticas, e que regulam e previnem a translocação de proteínas da mitocôndria para o citosol. Porém, se não forem inibidas, essas proteínas BH-3 promovem a oligomerização Bak-Bax, que são proteínas pró-apoptóticas, e induzem alterações na permeabilidade da membrana externa

mitocondrial através da formação de canais que permitem o efluxo de proteínas, como o citocromo c, do espaço intermembranar para o citosol, formando o apopssomo (TAYLOR et al., 2008; PORTT et al., 2011).

Assim, o processo de apoptose envolve as células afetadas e que resulta na degradação do DNA via ativação de endonucleases, desintegração nuclear e formação de corpos apoptóticos, que são retirados do tecido por macrófagos. A sinalização para que os macrófagos entrem em ação é devido a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana plasmática, sinalizando as células que deverão ser fagocitadas. Desse modo, a reação inflamatória é mínima ou ausente, evitando o comprometimento de estruturas sadias dos tecidos (TAYLOR et al., 2008; PORTT et al., 2011).

A resistência a apoptose é uma característica recorrente em tumores malignos, assim a sua ativação se torna um interessante alvo potencial na terapêutica (TAYLOR et al., 2008).



Fonte: adaptado de MACFARLANE e WILLIAMS (2004).

Figura 1 - Representação esquemática do processo apoptótico. Via intrínseca e via extrínseca.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do resveratrol em induzir apoptose e/ou necrose em cultura de células de câncer de mama estrógeno dependente (MCF-7) e estrógeno independente (MDA-MB-231) após os tratamentos isolados e em associação aos metabólitos do tamoxifeno (N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno), comparados com culturas de células de mama não-cancerígenas (MCF-10A).

2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a citotoxicidade celular do resveratrol (2,5 a 657 µM), utilizando o método de MTT, nas linhagens celulares MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 após os tratamentos isolados e em associação ao N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno (10 a 50 µM);

b) Avaliar o grau de interação entre as substâncias resveratrol, desmetiltamoxifeno e hidroxitamoxifeno nos tratamentos associados por meio do Coeficiente de Interação entre Drogas (CID) obtido a partir da viabilidade celular;

c) Avaliar a indução a necrose e apoptose celular, utilizando o ensaio de anexina-V e iodeto de propídeo (PI) nas células MCF-7 e MDA-MB-231, após os tratamentos isolados e em associação ao N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno;

d) Avaliar a fragmentação de DNA por marcação com PI através do ensaio de Hypotonic Fluorescent Solution (HFS), após os tratamentos isolados e em associação ao N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno;

e) Verificar a expressão de caspase 3, 8 e 9 pela metodologia do western-blotting, após os tratamentos isolados e em associação ao N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

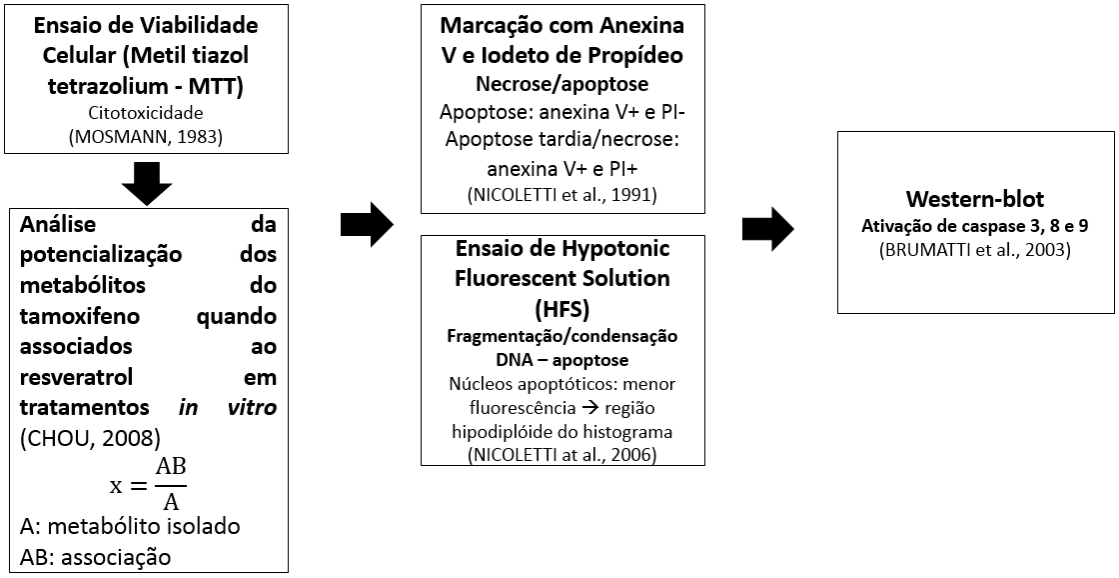


Figura 2 – Fluxograma da metodologia.

3.1 Linhagens Celulares e Cultura de Células

A linhagem celular epitelial não-cancerígena (MCF-10A) e as linhagens de adenocarcinoma estrógeno-dependente (MCF-7) e estrógeno-independente (MDA-MB-231) são procedentes do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem celular MCF-7 foi utilizada como modelo de câncer de mama receptor de estrógeno positivo e a linhagem celular MDA-MB-231 foi utilizada como modelo de câncer de mama triplo negativo.

As linhagens celulares apresentavam-se congeladas em nitrogênio líquido e continham $1x10^6$ células/mL de meio de congelamento (soro fetal bovino, 10% dimetilsulfóxido - DMSO). O cultivo das células foi iniciado após o descongelamento rápido a 37ºC em banho-maria de um criotubo contendo $1x10^6$ células/mL. Após descongelamento, as células foram depositadas em 5 mL de meio RPMI completo (suplementado de 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, 2 mM de glutamina e antibióticos/antimicótico 1% de penicilina – estreptomicina – anfotericina B) e submetidas à centrifugação de 240 x g por cinco minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular ressuspenso em 1 mL de meio RPMI. As células foram cultivadas em

frascos de cultivo de 75 cm^2 com 10 mL de meio RPMI e mantidas em estufa contendo 5% de gás carbônico (CO_2) e a temperatura de 37ºC. O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias até as culturas atingirem 80 a 100% de confluência. Para quantificar, as células foram coradas com corante supra-vital azul de tripan a 0,1% e as células viáveis foram contadas sob microscopia em câmara de Neubauer e plaqueadas para experimento.

3.2 Substâncias Medicamentosas

As substâncias medicamentosas que foram utilizadas são resveratrol (código R5010 - Sigma Aldrich®) nas concentrações de 2,5 a 657 µM, N-desmetiltamoxifeno (código D9069 - Sigma Aldrich®) e 4-hidroxitamoxifeno (código H7904 - Sigma Aldrich®) nas concentrações de 10 a 50 µM. O resveratrol e o N-desmetiltamoxifeno foram solubilizados em DMSO, e o 4-hidroxitamoxifeno foi solubilizado em etanol.

A concentração de escolha para o resveratrol foi aquela que não é tóxica para a célula MCF-10A. Para o N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, a concentração de escolha foi uma que apresente diminuição na viabilidade de MCF-7 e MDA-MB-231 de até 50%.

3.3 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT

Para avaliar a citotoxicidade do resveratrol, isolado ou em associação com cada uns dos metabólitos do tamoxifeno, foi utilizado o método de análise colorimétrica através do ensaio MTT (MOSMANN, 1983). Este método consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Em células vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) levando a redução desta molécula e formando o Azul de Formazan.

As células foram cultivadas em placa de 96 poços ($2x10^4$ células/poço) com 150 µL de meio RPMI em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 à 37°C

por 24 horas. Após as 24 horas de cultivo, o meio foi retirado e acrescentado os meios de tratamentos (resveratrol 2,5 a 657 µM, hidroxitamoxifeno 10 a 50 µM, desmetiltamoxifeno 10 a 50 µM, resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM). O controle de viabilidade foi apenas meio RPMI e o controle de morte foi uma solução de meio RPMI com triton 1%. Após a incubação por 24 horas das linhagens tumorais com as diferentes concentrações dos compostos, foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço. A placa foi então incubada por mais 4 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 à 37°C. Após as 4 horas de incubação, o meio de todos os poços foi retirado e acrescentado 200 µL de DMSO por poço para dissolver os sais de Formazan. As placas de cultivo celular foram mantidas por 20 minutos em estufa à 37°C. A avaliação de sais de Formazan nas amostras foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm. A viabilidade celular da célula não-cancerígena e das células de adenocarcinoma foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{[(\text{DO tratamento}) - (\text{DO branco})]}{[(\text{DO controle}) - (\text{DO branco})]} \text{ x } 100$$

Tabela 1 – Tratamentos utilizados nas linhagens MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 para o ensaio de viabilidade celular (MTT)

Tratamentos (µM)	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A
Resveratrol	2,5 a 657 µM	2,5 a 657 µM	165 a 657 µM
Hidroxitamoxifeno	10 a 50 µM	10 a 50 µM	
Desmetiltamoxifeno	10 a 50 µM	10 a 50 µM	
Resveratrol + Hidroxitamoxifeno	165 µM + 40 µM	165 µM + 40 µM	
Resveratrol + Desmetiltamoxifeno	165 µM + 30 µM	165 µM + 30 µM	

O resveratrol e o N-desmetiltamoxifeno foram solubilizados em DMSO, e o 4-hidroxitamoxifeno foi solubilizado em etanol. Em seguida, foram estocados para posterior utilização no preparo dos tratamentos citados.

3.4 Análise da potencialização dos metabólitos do tamoxifeno quando associados ao resveratrol em tratamentos *in vitro*

Quando o tratamento com a droga A exibe efeito e o tratamento com a droga B não exibe efeito, porém, ao associá-las (AB), o efeito do tratamento for melhorado, dizemos que houve potencialização do tratamento A pelo tratamento B (CHOU, 2008).

Assim, no presente trabalho, foram analisadas as viabilidades celulares dos tratamentos isolados de resveratrol 165 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM e hidroxitamoxifeno 40 µM, em seguida, foram analisadas as viabilidades celulares dos tratamentos associados de resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM e resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40µM nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. A potencialização foi expressa pelo número de vezes (x) que a associação do resveratrol 165 µM melhorou o tratamento do desmetiltamoxifeno 30 µM e do hidroxitamoxifeno 40 µM.

$$x = \frac{AB}{A}$$

A: % morte celular do tratamento com desmetiltamoxifeno 30 µM ou hidroxitamoxifeno 40 µM

B: resveratrol 165 µM (sem efeito)

AB: % morte celular do tratamento resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM ou resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40µM

3.5 Ensaios de Indução de Apoptose e Necrose

3.5.1 Marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo

A marcação de células com Anexina V é uma técnica destinada a avaliação de apoptose pela dosagem de fosfatidilserina. A fosfatidilserina está presente na superfície interna da bicamada lipídica da membrana celular e, nas células em fase precoce de apoptose, onde a membrana celular ainda permanece

intacta, mas sofre uma desorganização, a fosfatidilserina é translocada para a superfície exterior da bicamada lipídica. A Anexina V é uma proteína extrínseca de membrana plasmática que se liga aos fosfolipídeos e possui alta afinidade pela fosfatidilserina na presença de íons cálcio. Mudanças na assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana. Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo. O marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídio (PI) é utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas. O PI é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável (VAN HEERDE et al., 2000; MOCHIZUKI, 2003; PEC et al., 2003).

Assim, corar células simultaneamente com Anexina V e com o corante PI permite a discriminação de células viáveis, células em fase precoce de apoptose (positivas para Anexina V e negativas para PI) e células tardiamente apoptóticas ou necróticas (positivas para Anexina V e PI) (NICOLETTI et al., 1991).

Para realizar esta análise, as células foram cultivadas em placa de 6 poços ($5x10^5$ células/poço) com 1 mL de meio RPMI em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 à 37°C por 24 horas. Após as 24 horas de cultivo, o meio foi retirado e acrescentado os meios de tratamentos (resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM, resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM). O controle negativo foi células apenas com meio RPMI. Após as 24 horas de tratamento, o meio de cada um dos poços foi coletado em tubos de ensaio e as células removidas dos poços com uma solução tripsina/EDTA (0,2%/0,02%), deixando a solução agir 5 minutos em estufa CO_2 5% a 37°C, sendo também coletadas e adicionadas aos tubos de ensaio. As células foram submetidas à centrifugação a 4°C por cinco minutos a 240 x g e o sobrenadante desprezado. As células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS), adicionando 1 mL de PBS aos tubos de ensaio e centrifugadas a 4°C por cinco minutos a 240 x g. Por último, foi adicionado 200 µL de tampão de ligação de anexina (10 mM HEPES - pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$) e 1 µL

de Anexina-V FITC (Roche Applied Science®) aos tubos de ensaio e estes foram incubados no escuro sob refrigeração por vinte minutos. No momento da análise, foi adicionado 1 μL de iodeto de propídeo (100 μg/mL-Sigma Aldrich®) em cada tubo de ensaio e as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA-USA) com o auxílio do software CellQuest.

Tabela 2 – Tratamentos utilizados nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 para os ensaios de marcação com Anexina V/PI, HFS e Western-blot

Tratamentos (μM)	MCF-7	MDA-MB-231
Resveratrol	165 μM	165 μM
Hidroxitamoxifeno	40 μM	40 μM
Desmetiltamoxifeno	30 μM	30 μM
Resveratrol + Hidroxitamoxifeno	165 μM + 40 μM	165 μM + 40 μM
Resveratrol + Desmetiltamxifeno	165 μM + 30 μM	165 μM + 30 μM

O resveratrol e o N-desmetiltamoxifeno foram solubilizados em DMSO, e o 4-hidroxitamoxifeno foi solubilizado em etanol. Em seguida, foram estocados para posterior utilização no preparo dos tratamentos citados.

3.5.2 Ensaio de HFS (Hypotonic Fluorescent Solution)

A avaliação do conteúdo de DNA foi feita por meio da incorporação de iodeto de propídio (PI) em núcleos isolados. As células rompidas pelo tampão de lise expõem seus núcleos e o PI se liga ao DNA, sendo assim, as células que possuem núcleos íntegros emitem alta fluorescência e as células que apresentam condensação da cromatina ou fragmentação do DNA emitem baixa fluorescência, devido a menor marcação do DNA com PI (PERES, 2005). Assim, os núcleos de células saudáveis exibem uma incorporação compatível com conteúdo diplóide ou tetraplóide, presente em células em fase G0-G1 ou G2-M, enquanto que núcleos apoptóticos aparecem na região hipodiplóide do histograma, devido à fragmentação ou maior condensação da cromatina (NICOLETTI et al., 2006).

Para realizar esta análise, as células foram cultivadas em placa de 6 poços ($5x10^5$ células/poço) com 1 mL de meio RPMI em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 à 37°C por 24 horas. Após as 24 horas de cultivo, o meio foi retirado e acrescentado os meios de tratamentos (resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM, resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM). O controle negativo foi células apenas com meio RPMI. Após as 24 horas de tratamento, o meio de cada um dos poços foi coletado em tubos de ensaio e as células removidas dos poços com uma solução tripsina/EDTA (0,2%/0,02%), deixando a solução agir 5 minutos em estufa CO_2 5% a 37°C, sendo também coletadas e adicionadas aos tubos de ensaio. As células foram submetidas à centrifugação a 4°C por cinco minutos a 240 x g e o sobrenadante desprezado. As células foram lavadas duas vezes com PBS, adicionando 1 mL de PBS aos tubos de ensaio e centrifugadas a 4°C por cinco minutos a 240 x g. Por último, as células foram ressuspensas em 400 µL de solução de HFS (Hypotonic Fluorescent Solution, contendo 50 µg/mL de iodeto de propídio em 0,1% de citrato de sódio plus 1,0% Triton X-100) e incubadas no escuro sob refrigeração por vinte minutos. Após a incubação, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA-USA), sendo adquiridos 10000 eventos. A análise foi realizada por histograma com o software Diva e os resultados expressos por intensidade de fluorescência dos núcleos hipodiplóides, demonstrando assim, fragmentação nuclear ou maior condensação da cromatina.

3.6 Detecção das caspase 3, 8 e 9 por Western-blot

Este método foi utilizado para verificar a ativação de caspase 3, 8 e 9. Para realizar esta análise, as células foram cultivadas em placa de 6 poços ($1x10^6$ células/poço) com 1,5 mL de meio RPMI em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 à 37°C por 24 horas. Após as 24 horas de cultivo, o meio foi retirado e acrescentado os meios de tratamentos (resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM, resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM). O

controle negativo foi células apenas com meio RPMI. Após as 24 horas de tratamento, o meio de cada um dos poços foi coletado em tubos de ensaio e as células removidas dos poços com uma solução tripsina/EDTA (0,2%/0,02%), deixando a solução agir 5 minutos em estufa CO_2 5% a 37°C, sendo também coletadas e adicionadas aos tubos de ensaio. As células foram submetidas à centrifugação a 4°C por cinco minutos a 240 x g e o sobrenadante desprezado. As células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS), adicionando 1 mL de PBS aos tubos de ensaio e centrifugadas a 4°C por cinco minutos a 240 x g. O extrato proteico foi obtido adicionando tampão de lise de fosfoproteínas nas células e a quantificação de proteínas do extrato foi realizada pelo método BCA – Ácido Bicinconínico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) (SMITH et al., 1985). O extrato proteico de cada tratamento foi ressuspendido em tampão de amostra (5% de mercaptoetanol, 4% de SDS, 20% de glicerol e 100 mM Tris-CL-pH 6,0) e incubado por 5 minutos a 100°C em banho seco, seguido de incubação por 5 minutos em gelo para desnaturação. Em seguida, o extrato proteico foi submetido a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 12%, em um sistema de eletroforese vertical (BioRad), durante aproximadamente 2 horas a 100 V constantes, na presença de tampão de corrida (3 g de tris base (24,8 mM), 14,4 g de glicina (192 mM), 10 mL de SDS 10% e água destilada qsp 1000mL).

As proteínas separadas na eletroforese foram eletrotransferidas para membrana de PVDF, por um sistema de eletroforese vertical. Para isso, a membrana de PVDF foi ativada em metanol, em seguida, a membrana e o gel foram previamente estabilizados em tampão de transferência (3 g de tris base (24,8 mM), 14,4 g de glicina (192 mM), 200 mL de metanol e água destilada qsp 1000 mL) por 5 minutos. Feito isso, a membrana e o gel foram postos em contato (sistema de *"sandwich"*) para eletrotransferência por cerca de hora a 350 mA constantes.

A membrana de PVDF foi bloqueada em tampão de lavagem (TBS-Tween) com 5% de leite em pó desnatado (100 mM de tris-HCl; 0,9% de NaCl; 0,1% de Tween 20; e 5% de leite desnatado em pó) e, em seguida, incubada com anticorpo primário para detecção de caspase 3 (caspase 3 Rabbit monoclonal antibody – Cell Signaling Technologies®), caspase 8 (caspase 8 Mouse monoclonal antibody – Cell Signaling Technologies®), caspase 9

(caspase 9 Rabbit monoclonal antibody – Cell Signaling Technologies®) e tubulina (β-tubulin Rabbit monoclonal antibody - Cell Signaling Technologies®). Os anticorpos foram diluídos em diferentes concentrações (conforme protocolo do fabricante) em tampão de lavagem com 5% de leite em pó desnatado e incubados com a membrana por um período de 18 horas a temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Peroxidase-conjugated AffinitiPure Anti-Rabbit e Peroxidase-conjugated AffinitiPure Anti-Mouse – Jackson ImmunoResearch®) por uma hora à temperatura ambiente e a detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência (BRUMATTI et al., 2003).

3.7 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa Graph Pad Prisma (versão 5, Graph Pad, USA). Foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way” e o teste complementar de Tukey, considerando-se um nível de significância $p<0,05$. Foram realizados três experimentos independentes e em triplicatas.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT

Os experimentos de citotoxicidade foram realizados para determinar quais concentrações do resveratrol associado com cada um dos metabólitos do tamoxifeno possuem efeito redutor na viabilidade de células da linhagem MCF-7 e MDA-MB-231. Para isso, foi utilizado o método de análise colorimétrica com corante MTT, após 24 horas de tratamento. O primeiro ensaio de viabilidade celular realizado foi com a célula epitelial mamária não cancerígena (MCF-10A) para determinar a dose de resveratrol que não é tóxica para essa célula. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle. Foram utilizadas as concentrações de 2,5 a 657 µM de resveratrol, 10 a 50 µM de desmetiltamoxifeno e 10 a 50 µM hidroxitamoxifeno, isolados e em associação com o resveratrol. Como controle de viabilidade foi utilizado células das linhagens sem tratamento.

Como se pode observar na Tabela 3/Figura 3, os resultados mostram que as células MCF-10A tratadas com resveratrol 165 a 657 µM, apresentam redução significativa na viabilidade celular nas doses de 328, 438, 547 e 657 µM. Dessa forma, a dose escolhida para futuros tratamentos foi de 165 µM, pois não se demonstrou tóxica para a célula epitelial mamária, mantendo a viabilidade celular (88% ± 4,23 viabilidade celular).

Na Tabela 4/Figura 4, os resultados mostram que as células MCF-7 tratadas com resveratrol 2,5 a 657 µM apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade nas concentrações de 328, 438, 547 e 657 µM, apresentando 79% ± 13,07; 70% ± 9,86; 49% ± 14,25 e 47% ± 11,75 de viabilidade celular, respectivamente (Fig. 4A). As células MDA-MB-231 tratadas com resveratrol 2,5 a 657 µM também apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade nas concentrações de 328, 438, 547 e 657 µM, apresentando 51% ± 5,20; 52% ± 11,66; 53% ± 8,64 e 48% ± 13,57 de viabilidade celular, respectivamente (Fig. 4B). As células MCF-7 e MDA-MB-23 não demonstraram diminuição em sua viabilidade na concentração de 165 µM, apresentando 94% ± 10,5 e 92% ± 16,38 de viabilidade celular, respectivamente.

Na Tabela 5/Figura 5, os resultados mostram que as células MCF-7 tratadas com desmetiltamoxifeno 10 a 50 µM apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade nas concentrações de 30, 40 e 50 µM, apresentando 71% ± 15,06; 31% ± 15,03 e 11% ± 2,31 de viabilidade celular, respectivamente (Fig. 5A). As células MDA-MB-231 tratadas com desmetiltamoxifeno 10 a 50 µM também apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade nas concentrações de 30, 40 e 50 µM, apresentando 70% ± 12,16; 51% ± 12,61 e 17% ± 10,52 de viabilidade celular, respectivamente (Fig. 5B).

Na Tabela 6/Figura 6, os resultados mostram que as células MCF-7 tratadas com hidroxitamoxifeno 10 a 50 µM apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade nas concentrações de 40 e 50 µM, apresentando 85% ± 15,35 e 54% ± 11,02 de viabilidade celular, respectivamente (Fig. 6A). Já as células MDA-MB-231 tratadas com hidroxitamoxifeno 10 a 50 µM apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade nas concentrações de 30, 40 e 50 µM, apresentando 74% ± 13,46; 59% ± 7,37 e 27% ± 8,76 de viabilidade celular, respectivamente (Fig. 6B).

Na Tabela 7/Figura 7, os resultados mostram que as células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com resveratrol 165 µM e desmetiltamoxifeno 30 µM apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade em relação ao tratamento apenas com desmetiltamoxifeno 30 µM (Fig. 7A e 7B). Observa-se que a viabilidade de MCF-7 diminui de 71% ± 15,06 para 52% ± 7,21, apresentando resultado estatisticamente significativo ($p<0,05$), enquanto a viabilidade de MDA-MB-231 diminui de 70% ± 12,16 para 49% ± 10,94, apresentando resultado estatisticamente significativo ($p<0,01$).

Na Tabela 7/Figura 8, os resultados mostram que as células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com resveratrol 165 µM e hidroxitamoxifeno 40 µM apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade em relação ao tratamento apenas com hidroxitamoxifeno 40 µM (Fig. 8A e 8B). Observa-se que a viabilidade de MCF-7 diminui de 85% ± 15,35 para 44% ± 7,56, apresentando resultado estatisticamente significativo ($p<0,001$), enquanto a viabilidade de MDA-MB-231 diminui de 59% ± 7,37 para 21% ± 10,13, apresentando resultado estatisticamente significativo ($p<0,001$).

Tabela 3 – Análise da Viabilidade Celular na linhagem MCF-10A após tratamento com resveratrol por 24 horas

Tratamentos (µM)	Viabilidade Celular	p
R165	88% ± 4,23	ns
R328	62% ± 6,61	***
R438	58% ± 8,34	***
R547	46% ± 7,81	***
R657	45% ± 2,42	***

Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de três experimentos realizados em triplicata.
p: análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way" e Teste de Tukey.
ns: estatisticamente não significativo; *** diferença significativa, com valor de *p<0,0001*, para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas com resveratrol e do controle negativo.
R165: resveratrol 165 µM; R328: resveratrol 328 µM; R438: resveratrol 438 µM; R547: resveratrol 547 µM; R657: resveratrol 657 µM.

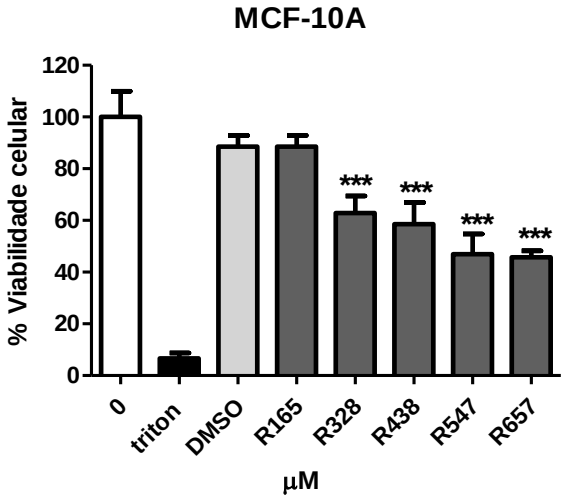


Figura 3 – Viabilidade celular da linhagem MCF-10A tratada com resveratrol por 24 horas. As células MCF-10A ($2x10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com resveratrol por 24 horas. 0: células sem tratamento (controle negativo); triton: células tratadas com triton 1%; DMSO: controle do solvente DMSO 0,6%. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. Foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way" e Teste de Tukey. *** diferença significativa, com valor de *p<0,001*, para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas com resveratrol e do controle negativo.

Tabela 4 – Análise da Viabilidade Celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com resveratrol por 24 horas

Tratamentos (µM)	Viabilidade Celular (MCF-7)	p
R2,5	104% ± 12,45	ns
R5	103% ± 9,69	ns
R10	103% ± 7,88	ns
R20	103% ± 11,4	ns
R41	99% ± 10,8	ns
R82	96% ± 10,81	ns
R165	94% ± 10,5	ns
R328	79% ± 13,07	**
R438	70% ± 9,86	***
R547	49% ± 14,25	***
R657	47% ± 11,75	***

Tratamentos (µM)	Viabilidade Celular (MDA-MB-231)	p
R2,5	122% ± 17,2	ns
R5	117% ± 14,17	ns
R10	117% ± 16,52	ns
R20	106% ± 9,73	ns
R41	101% ± 20,39	ns
R82	102% ± 15,16	ns
R165	92% ± 16,39	ns
R328	51% ± 5,20	***
R438	52% ± 11,66	***
R547	53% ± 8,64	***
R657	48% ± 13,57	***

Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de três experimentos realizados em triplicata.
p: análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way” e Teste de Tukey.
ns: estatisticamente não significativo; *** diferença significativa, com valor de *p<0,001* e ** diferença significativa, com valor de *p<0,01* para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas com resveratrol e do controle negativo
R2,5: resveratrol 2,5 µM; R5: resveratrol 5 µM; R10: resveratrol 10 µM; R20: resveratrol 20 µM; R41: resveratrol 41 µM; R82: resveratrol 82 µM; R165: resveratrol 165 µM; R328: resveratrol 328 µM; R438: resveratrol 438 µM; R547: resveratrol 547 µM; R657: resveratrol 657 µM.

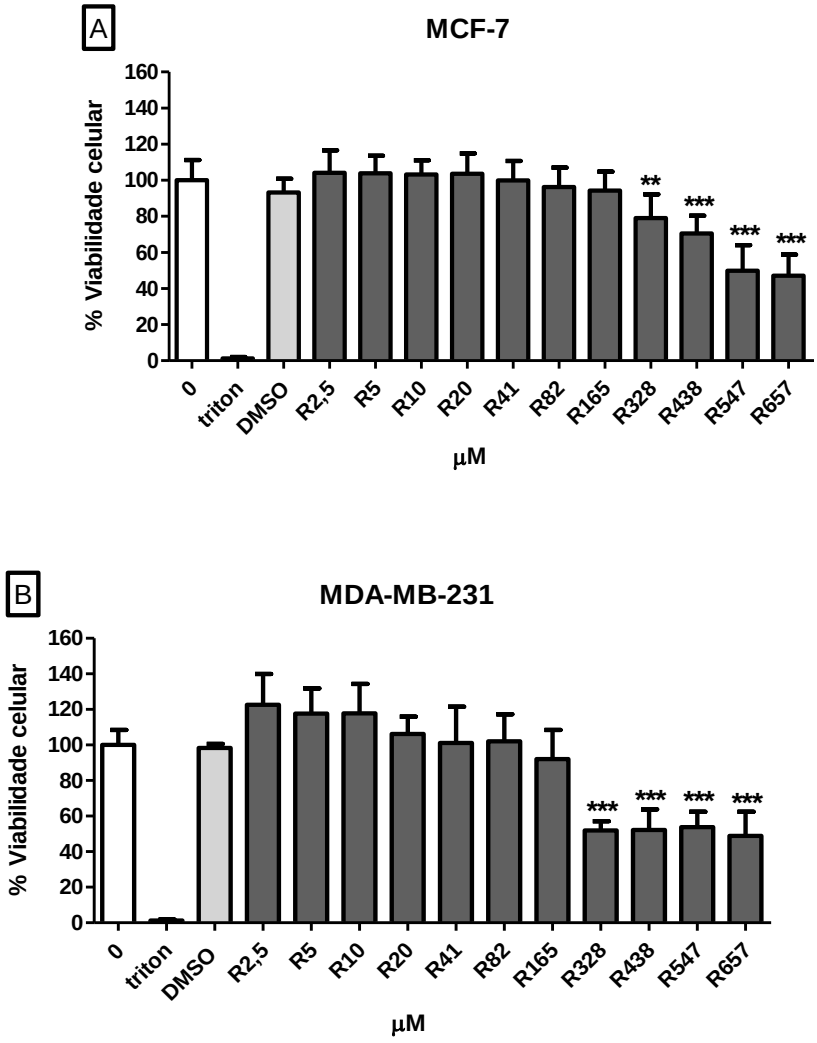


Figura 4 – Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (4A) e MDA-MB-231 (4B) tratadas com resveratrol por 24 horas. As células MCF-7 e MDA-MB-231 ($2x10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com resveratrol por 24 horas. 0: células sem tratamento (controle negativo); triton: células tratadas com triton 1%; DMSO: controle do solvente DMSO 0,6%. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. Foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way" e Teste de Tukey. *** diferença significativa, com valor de $p<0,001$ e ** diferença significativa, com valor de $p<0,01$ para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas com resveratrol e do controle negativo.

Tabela 5 – Análise da Viabilidade Celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com desmetiltamoxifeno por 24 horas

Tratamentos (µM)	Viabilidade Celular (MCF-7)	p
D10	91% ± 7,65	ns
D20	95% ± 9,27	ns
D30	71% ± 15,06	***
D40	31% ± 15,03	***
D50	11% ± 2,31	***

Tratamentos (µM)	Viabilidade Celular (MDA-MB-231)	p
D10	106% ± 13,65	ns
D20	103% ± 13,16	ns
D30	70% ± 12,16	***
D40	51% ± 12,61	***
D50	17% ± 10,52	***

Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de três experimentos realizados em triplicata.
p: análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way” e Teste de Tukey.
ns: estatisticamente não significativo; *** diferença significativa, com valor de $p<0,001$ para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas com desmetiltamoxifeno e do controle negativo.
D10: desmetiltamoxifeno 10 µM; D20: desmetiltamoxifeno 20 µM; D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; D40: desmetiltamoxifeno 40 µM; D50: desmetiltamoxifeno 50 µM.

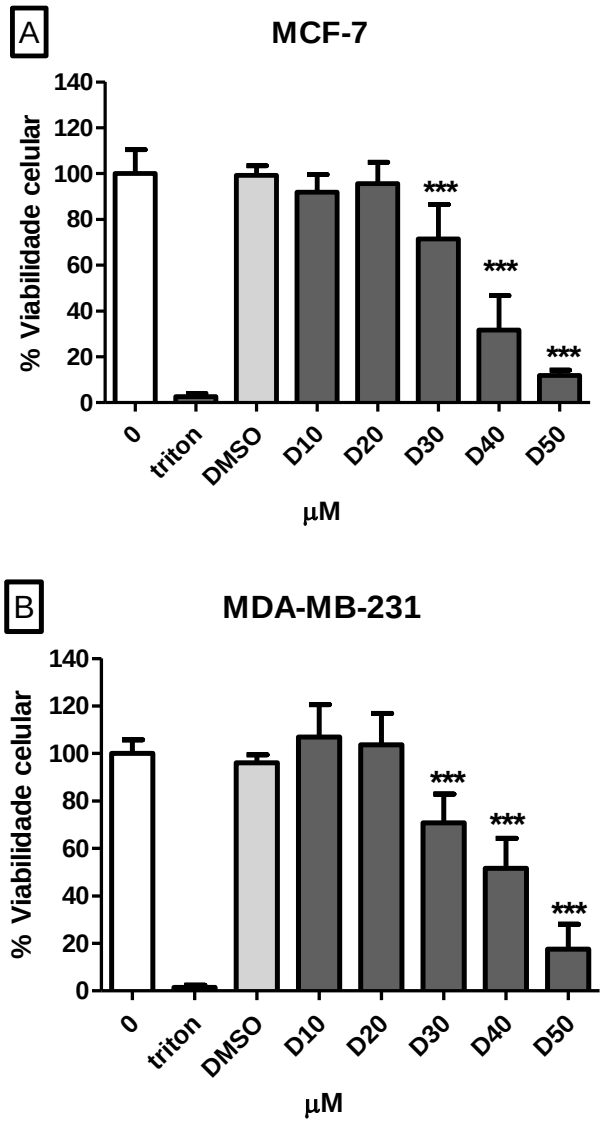


Figura 5 - Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (5A) e MDA-MB-231 (5B) tratadas com desmetiltamoxifeno por 24 horas. As células MCF-7 e MDA-MB-231 ($2x10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com desmetiltamoxifeno por 24 horas. 0: células sem tratamento (controle negativo); triton: células tratadas com triton 1%; DMSO: controle do solvente DMSO 1%. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. Foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way" e Teste de Tukey. *** diferença significativa, com valor de $p<0,001$, para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas com desmetiltamoxifeno e do controle negativo.

Tabela 6 – Análise da Viabilidade Celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento com hidroxitamoxifeno por 24 horas

Tratamentos (µM)	Viabilidade Celular (MCF-7)	p
H10	108% ± 15,03	ns
H20	102% ± 15,94	ns
H30	101% ± 13,73	ns
H40	85% ± 15,35	**
H50	54% ± 11,02	***

Tratamentos (µM)	Viabilidade Celular (MDA-MB-231)	p
H10	109% ± 6,08	ns
H20	106% ± 9,57	ns
H30	74% ± 13,46	***
H40	59% ± 7,37	***
H50	27% ± 8,76	***

Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de três experimentos realizados em triplicata.
p: análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way” e Teste de Tukey.
ns: estatisticamente não significativo; *** diferença significativa, com valor de *p<0,001* e ** diferença significativa, com valor de *p<0,01* para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas com hidroxitamoxifeno e do controle negativo.
H10: hidroxitamoxifeno 10 µM; H20: hidroxitamoxifeno 20 µM; H30: hidroxitamoxifeno 30 µM; H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; H50: hidroxitamoxifeno 50 µM.

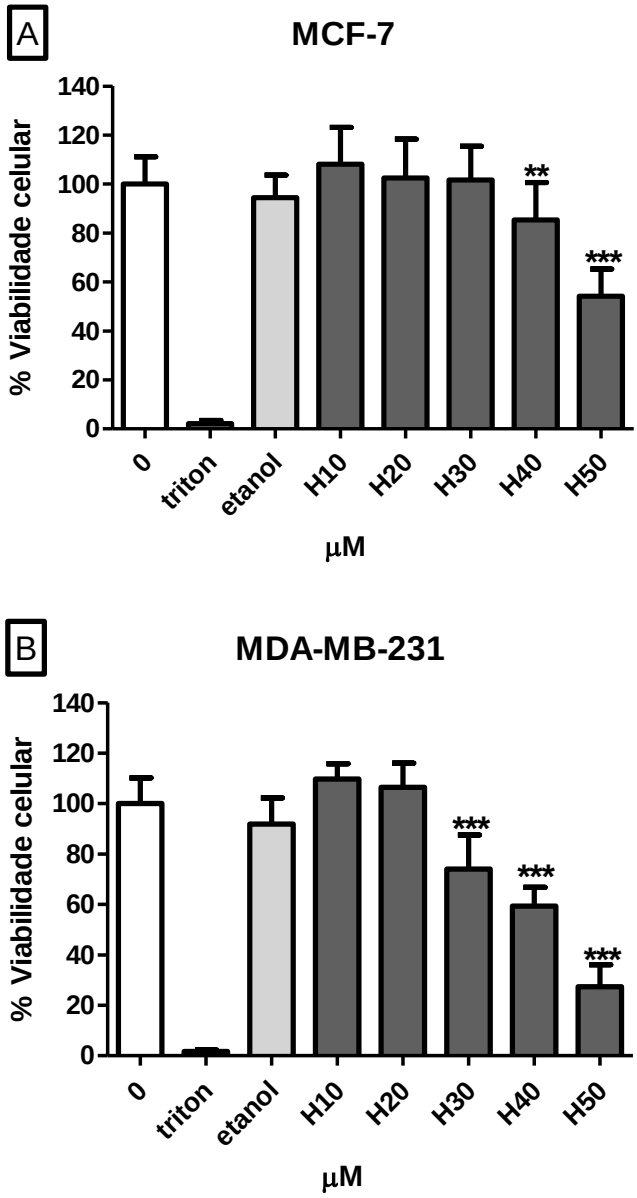


Figura 6 - Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (6A) e MDA-MB-231 (6B) tratadas com hidroxitamoxifeno por 24 horas. As células MCF-7 e MDA-MB-231 ($2x10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com hidroxitamoxifeno por 24 horas. 0: células sem tratamento (controle negativo); triton: células tratadas com triton 1%; etanol: controle do solvente etanol 4%. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. Foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way" e teste de Tukey. *** diferença significativa, com valor de $p<0,001$ e ** diferença significativa, com valor de $p<0,01$, para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas com hidroxitamoxifeno e do controle negativo.

Tabela 7 – Análise da Viabilidade Celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento associado de resveratrol com desmetiltamoxifeno e hidroxitamoxifeno por 24 horas

Tratamentos (µM)	Viabilidade Celular (MCF-7)	p
D30	71% ± 15,06	
RD	52% ± 7,21	*
H40	85% ± 15,35	
RH	44% ± 7,56	***

Tratamentos (µM)	Viabilidade Celular (MDA-MD-231)	p
D30	70% ± 12,16	
RD	49% ± 10,94	**
H40	59% ± 7,37	
RH	21% ± 10,13	***

Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de três experimentos realizados em triplicata.
p: análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way” e Teste de Tukey.
*** diferença significativa, com valor de *p<0,001*, ** diferença significativa, com valor de *p<0,01* e * diferença significativa, com valor de *p<0,05* para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas somente com desmetiltamoxifeno 30 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM e para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas somente com hidroxitamoxifeno 40 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM.
D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RD: resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM; H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; RH: resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM.

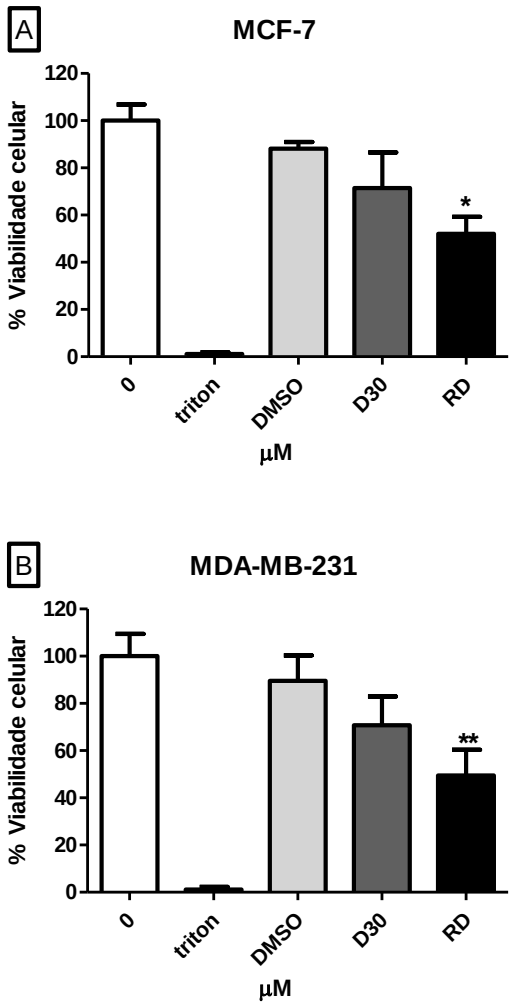


Figura 7 - Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (7A) e MDA-MB-231 (7B) tratadas com associação de resveratrol 165 µM e desmetiltamoxifeno 30 µM por 24 horas. As células MCF-7 e MDA-MB-231 ($2x10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com resveratrol 165 µM e desmetiltamoxifeno 30 µM por 24 horas. 0: células sem tratamento (controle negativo); triton: células tratadas com triton 1%; DMSO: controle do solvente DMSO 1,6%; D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RD: resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. Foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way" e Teste de Tukey. ** diferença significativa, com valor de $p<0,001$ e * diferença significativa, com valor de $p<0,05$, para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas somente com desmetiltamoxifeno 30 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM e desmetiltamoxifeno 30 µM.

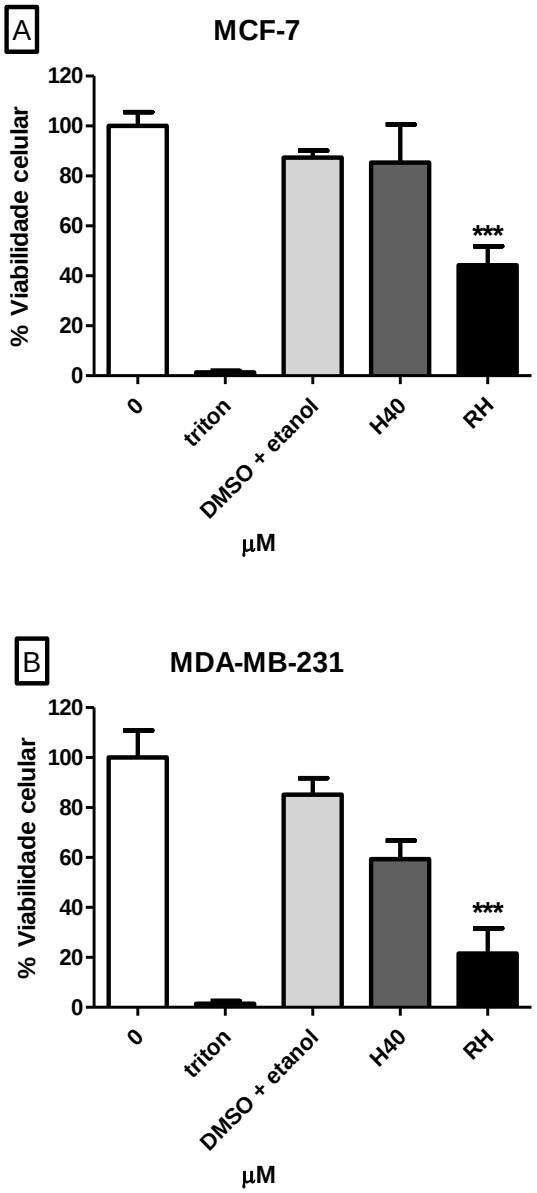


Figura 8 - Viabilidade celular das linhagens MCF-7 (8A) e MDA-MB-231 (8B) tratadas com associação de resveratrol 165 µM e hidroxitamoxifeno 40 µM por 24 horas. As células MCF-7 e MDA-MB-231 ($2x10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços com meio de tratamento e incubadas com resveratrol 165 µM e hidroxitamoxifeno 40 µM por 24 horas. 0: células sem tratamento (controle negativo); triton: células tratadas com triton 1%; DMSO+etanol: controle do solvente DMSO 0,6% + etanol 4%; H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; RH: resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. Foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way" e Teste de Tukey. *** diferença significativa, com valor de $p<0,001$, para a comparação entre as porcentagens de morte celular das células tratadas somente com hidroxitamoxifeno 40 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM e hidroxitamoxifeno 40 µM.

4.2 Análise da potencialização dos metabólitos do tamoxifeno quando associados ao resveratrol em tratamentos *in vitro*

Para analisar o grau de potencialização (x) dos tratamentos com os metabólitos do tamoxifeno associados ao resveratrol, utilizou-se os resultados de viabilidade celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

Nas células MCF-7, foi calculado o (x) para os tratamentos de desmetiltamoxifeno 30 µM e hidroxitamoxifeno 40 µM associados ao resveratrol 165 µM. Foi observado que a associação do resveratrol 165 µM ao desmetiltamoxifeno 30 µM potencializou o efeito do desmetiltamoxifeno 30 µM em 1,66 vezes e, que a associação do resveratrol 165 µM ao hidroxitamoxifeno 40 µM potencializou o efeito do hidroxitamoxifeno 40 µM em 3,73 vezes (Tabela 8).

Nas células MDA-MB-231, foi calculado o (x) para os tratamentos de desmetiltamoxifeno 30 µM e hidroxitamoxifeno 40 µM associados ao resveratrol 165 µM. Foi observado que a associação do resveratrol 165 µM ao desmetiltamoxifeno 30 µM potencializou o efeito do desmetiltamoxifeno 30 µM em 1,7 vezes e, que a associação do resveratrol 165 µM ao hidroxitamoxifeno 40 µM potencializou o efeito do hidroxitamoxifeno 40 µM em 1,93 vezes (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise da potencialização dos metabólitos do tamoxifeno quando associados ao resveratrol em tratamentos *in vitro*

	Dose (µM)	Viabilidade Celular	Morte celular	x
MCF-7	**R165**	94%	6%	
	H40	85%	15%	
	RH	44%	56%	3,73
	D30	71%	29%	
	RD	52%	48%	1,66
MDA-MB-231	**R165**	92%	8%	
	H40	59%	41%	
	RH	21%	79%	1,93
	D30	70%	30%	
	RD	49%	51%	1,7

R165: resveratrol 165 µM; H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; RH: associação de hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM; D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RD: associação de desmetiltamoxifeno 30 µM e resveratrol 165 µM. Viabilidade celular: obtida pelo método colorimérico MTT; Morte celular = 100% - viabilidade celular; x: grau de potencialização

4.3 Ensaios de Indução de Apoptose e Necrose

4.3.1 Marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo

Os experimentos de expressão de fosfatidilserina (Anexina V) e marcação com iodeto de propídeo foram realizados para determinar qual o tipo de morte celular que os tratamentos associados de resveratrol com cada um dos metabólitos do tamoxifeno induzem. Para isso, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM, resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM por 24 horas. Foram consideradas células em apoptose precoce aquelas marcadas somente com Anexina V (Anexina V + / PI -) e células em apoptose tardia/necrose aquelas

que apresentaram ou não marcação de Anexina V com marcação para PI (Anexina V + / PI + ou Anexina V - / PI +).

Para as células MCF-7, os resultados obtidos indicam que o hidroxitamoxifeno 40 µM, quando associado ao resveratrol 165 µM, é capaz de induzir maior porcentagem de células a apoptose tardia/necrose. O tratamento somente com hidroxitamoxifeno 40 µM induz 14,7% ± 3,3 de células a apoptose tardia/necrose, enquanto, o tratamento associado de hidroxitamoxifeno 40 µM com resveratrol 165 µM induz 41,6% ± 13,2 de células a apoptose tardia/necrose, apresentando um resultado estatisticamente significativo (*p<0,0001*) (Tabela 9; Fig. 10A). O tratamento de células MCF-7 com desmetiltamoxifeno 30 µM associado ao resveratrol 165 µM não foi capaz de induzir maior porcentagem de células a apoptose tardia/necrose.

Para as células MDA-MB-231, os resultados obtidos indicam que o hidroxitamoxifeno 40 µM e desmetiltamoxifeno 30 µM, quando associados ao resveratrol 165 µM, são capazes de induzir maior porcentagem de células a apoptose tardia/necrose. O tratamento somente com hidroxitamoxifeno 40 µM induz 32,3% ± 12,7 de células a apoptose tardia/necrose, enquanto, o tratamento associado de hidroxitamoxifeno 40 µM com resveratrol 165 µM induz 42,3% ± 14,5 de células a apoptose tardia/necrose, apresentando um resultado estatisticamente significativo (*p<0,05*). O tratamento somente com desmetiltamoxifeno 30 µM induz 18,8% ± 7,2 de células a apoptose tardia/necrose, enquanto, o tratamento associado de desmetiltamoxifeno 30 µM com resveratrol 165 µM induz 39,3% ± 11,3 de células a apoptose tardia/necrose, apresentando um resultado estatisticamente significativo (*p<0,05*) (Tabela 9; Fig. 10B).

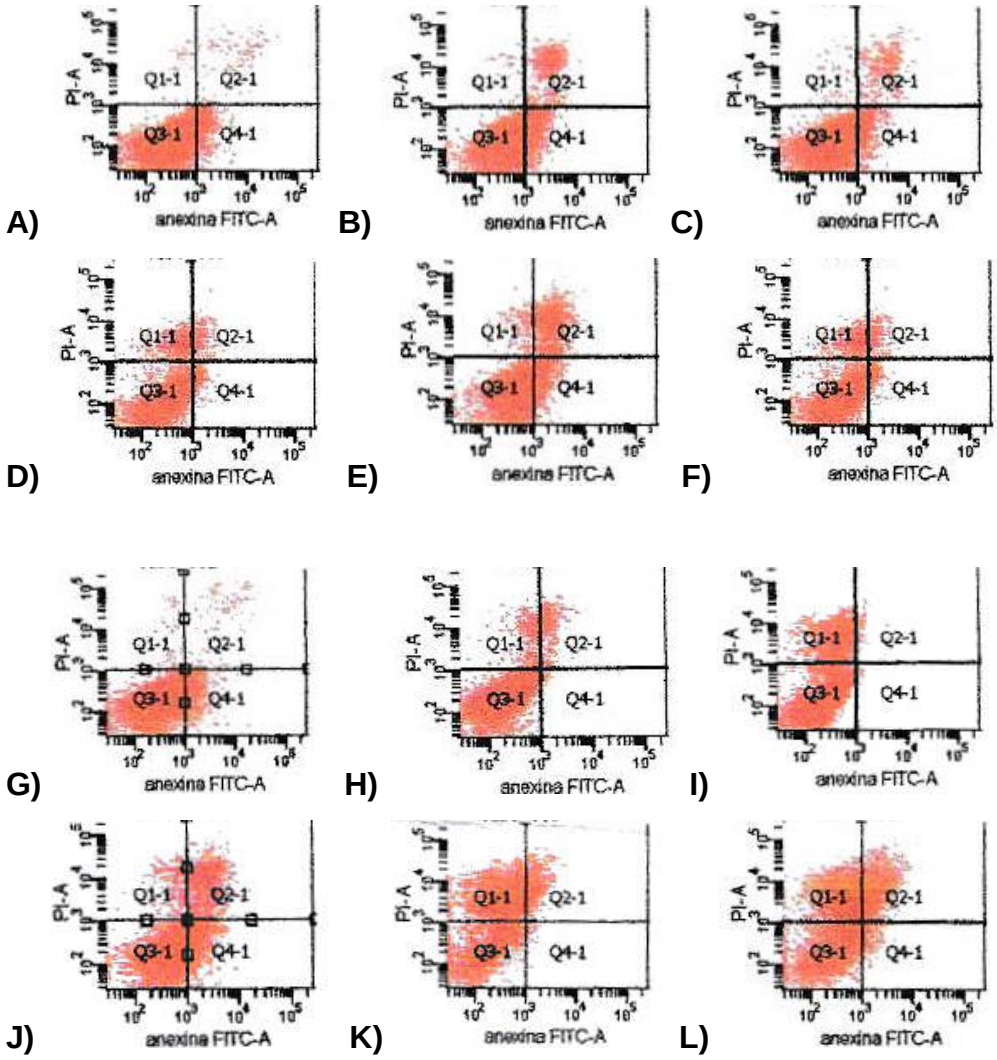


Figura 9 – Análise da porcentagem das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em fase precoce de apoptose e apoptose tardia/necrose pelo método de marcação celular com Anexina V/PI por citometria de fluxo. O histograma indica as células viáveis (Q3, Anexina V - / PI -), células em fase precoce de apoptose (Q4, Anexina V + / PI -) e células em apoptose tardia e/ou necrose (Q1+Q2, Anexina V +/ PI +). A a F: linhagem celular MCF-7. A) controle negativo do ensaio. B) células MCF-7 tratadas com resveratrol 165 µM. C) células MCF-7 tratadas com hidroxitamoxifeno 40 µM. D) células MCF-7 tratadas com desmetiltamoxifeno 30 µM. E) células MCF-7 tratadas com resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM. F) células MCF-7 tratadas com resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM. G a L: linhagem celular MDA-MB-231. G) controle negativo do ensaio. H) células MDA-MB-231 tratadas com resveratrol 165 µM. I) células MDA-MB-231 tratadas com hidroxitamoxifeno 40 µM. J) células MDA-MB-231 tratadas com desmetiltamoxifeno 30 µM. K) células MDA-MB-231 tratadas com resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM. L) células MDA-MB-231 tratadas com resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM.

Tabela 9 – Análise da apoptose e apoptose tardia/necrose (marcação com anexina V e iodeto de propídeo) nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento associado de resveratrol com desmetiltamoxifeno e hidroxitamoxifeno por 24 horas

Tratamentos (µM)	Apoptose (MCF-7)	Apoptose tardia / necrose (MCF-7)	p
0	3%	14% ± 3,88	
R165	4%	14% ± 1,79	ns
H40	4%	12% ± 3,33	ns
D30	2%	12% ± 2,85	ns
RH	2%	41% ± 13,21	***
RD	1%	17% ± 2,91	ns

Tratamentos (µM)	Apoptose (MDA-MB-231)	Apoptose tardia / necrose (MDA-MB-231)	p
0	3%	7% ± 5,28	
R165	1%	14% ± 4,12	ns
H40	1%	32% ± 12,79	ns
D30	1%	18% ± 7,29	ns
RH	1%	42% ± 14,57	*
RD	1%	39% ± 11,38	*

Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de três experimentos realizados em triplicata.
p: análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way” e Teste de Tukey.
ns: estatisticamente não significativo; *** diferença significativa, com valor de $p<0,001$, * diferença significativa, com valor de $p<0,05$ para a comparação entre as porcentagens de apoptose e apoptose tardia/necrose das células tratadas somente com desmetiltamoxifeno 30 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM e para a comparação entre as porcentagens de apoptose e apoptose tardia/necrose das células tratadas somente com hidroxitamoxifeno 40 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM.
D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RD: resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM; H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; RH: resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM.

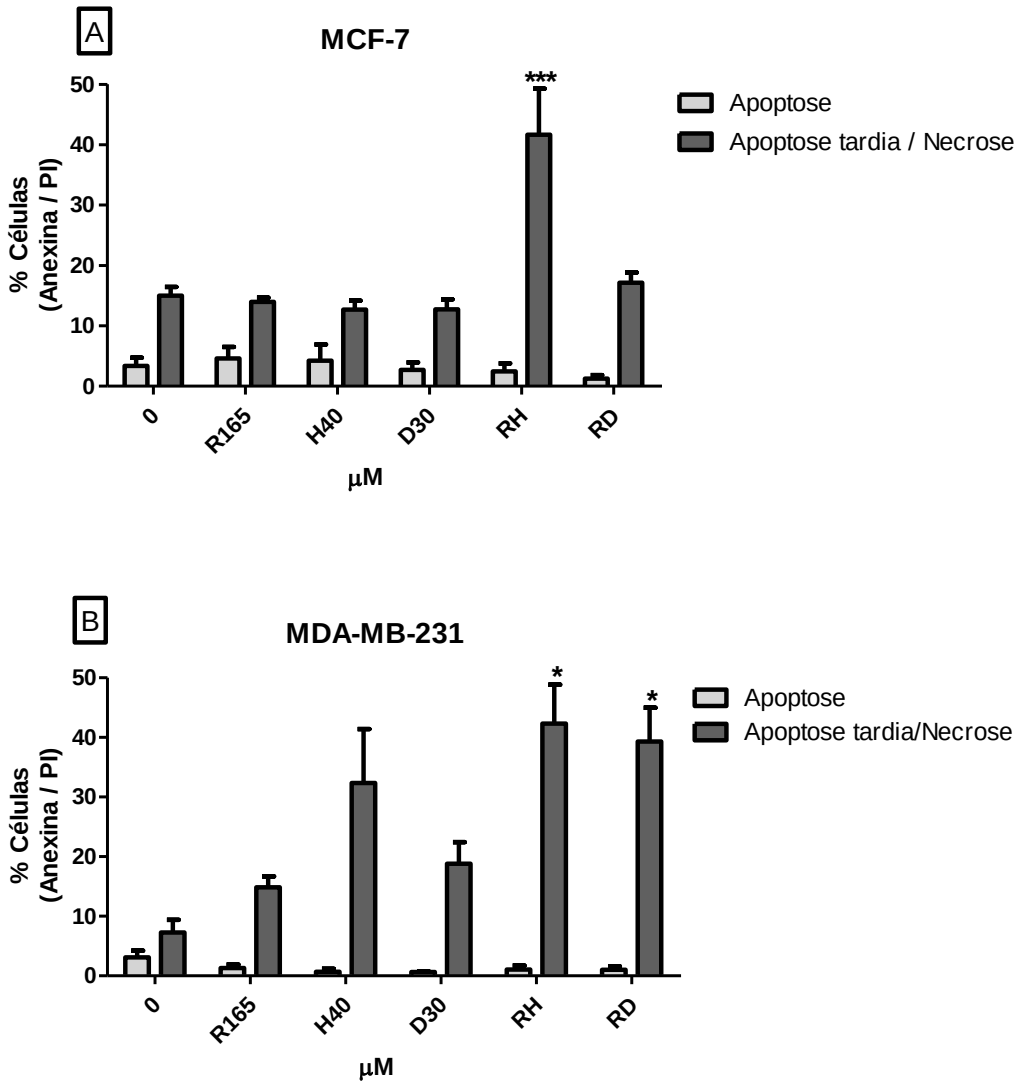


Figura 10 – Porcentagem das linhagens MCF-7 (10A) e MDA-MB-231 (10B) em apoptose e apoptose tardia/necrose (marcação com Anexina V e iodeto de propídeo), quando tratadas com resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM e associação de resveratrol 165 µM com cada um dos metabólitos do tamoxifeno. As células MCF-7 e MDA-MB-231 ($5x10^5$ células/poço) foram cultivadas em placa de 6 poços com meio de tratamento e incubadas com resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM e a associação por 24 horas. 0: células sem tratamento (controle negativo); H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RH: resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM; RD: resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. Foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way" e Teste de Tukey. *** diferença significativa, com valor de $p<0,001$, e * diferença significativa, com valor de $p<0,05$, para a comparação entre as porcentagens de apoptose e apoptose tardia/necrose das células tratadas somente com hidroxitamoxifeno 40 µM e desmetiltamoxifeno 30 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM.

4.3.2 Ensaio de HFS (Hypotonic Fluorescent Solution)

O ensaio de HFS foi utilizado para determinar a porcentagem de núcleos hipodiplóides, indicando que houve indução de apoptose pelos tratamentos associados de resveratrol com cada um dos metabólitos do tamoxifeno. Para isso, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM, resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM por 24 horas. Foram consideradas células apoptóticas (núcleo hipodiplóide) aquelas que apresentavam menor fluorescência.

Para as células MCF-7, os resultados obtidos indicam que o hidroxitamoxifeno 40 µM, quando associado ao resveratrol 165 µM, é capaz de induzir maior porcentagem de células a apoptose, sendo observado a partir da maior porcentagem de núcleos hipodiplóides. O tratamento somente com hidroxitamoxifeno 40 µM induz 9,5% ± 2,2 de células a apoptose, enquanto, o tratamento associado de hidroxitamoxifeno 40 µM com resveratrol 165 µM induz 41,6% ± 7,5 de células a apoptose, apresentando um resultado estatisticamente significativo ($p<0,05$) (Tabela 10; Fig. 12A). O tratamento de células MCF-7 com desmetiltamoxifeno 30 µM associado ao resveratrol 165 µM foi capaz de induzir maior porcentagem de células a apoptose, porém, o resultado não se apresentou estatisticamente significativo.

Para as células MDA-MB-231, os resultados obtidos indicam que o hidroxitamoxifeno 40 µM, quando associado ao resveratrol 165 µM, é capaz de induzir maior porcentagem de células a apoptose, sendo observado a partir da maior porcentagem de núcleos hipodiplóides. O tratamento somente com hidroxitamoxifeno 40 µM induz 13,0% ± 1,7 de células a apoptose, enquanto, o tratamento associado de hidroxitamoxifeno 40 µM com resveratrol 165 µM induz 49,4% ± 17,9 de células a apoptose, apresentando um resultado estatisticamente significativo ($p<0,05$) (Tabela 10; Fig. 12B). O tratamento de células MDA-MB-231 com desmetiltamoxifeno 30 µM associado ao resveratrol 165 µM não foi capaz de induzir maior porcentagem de células a apoptose.

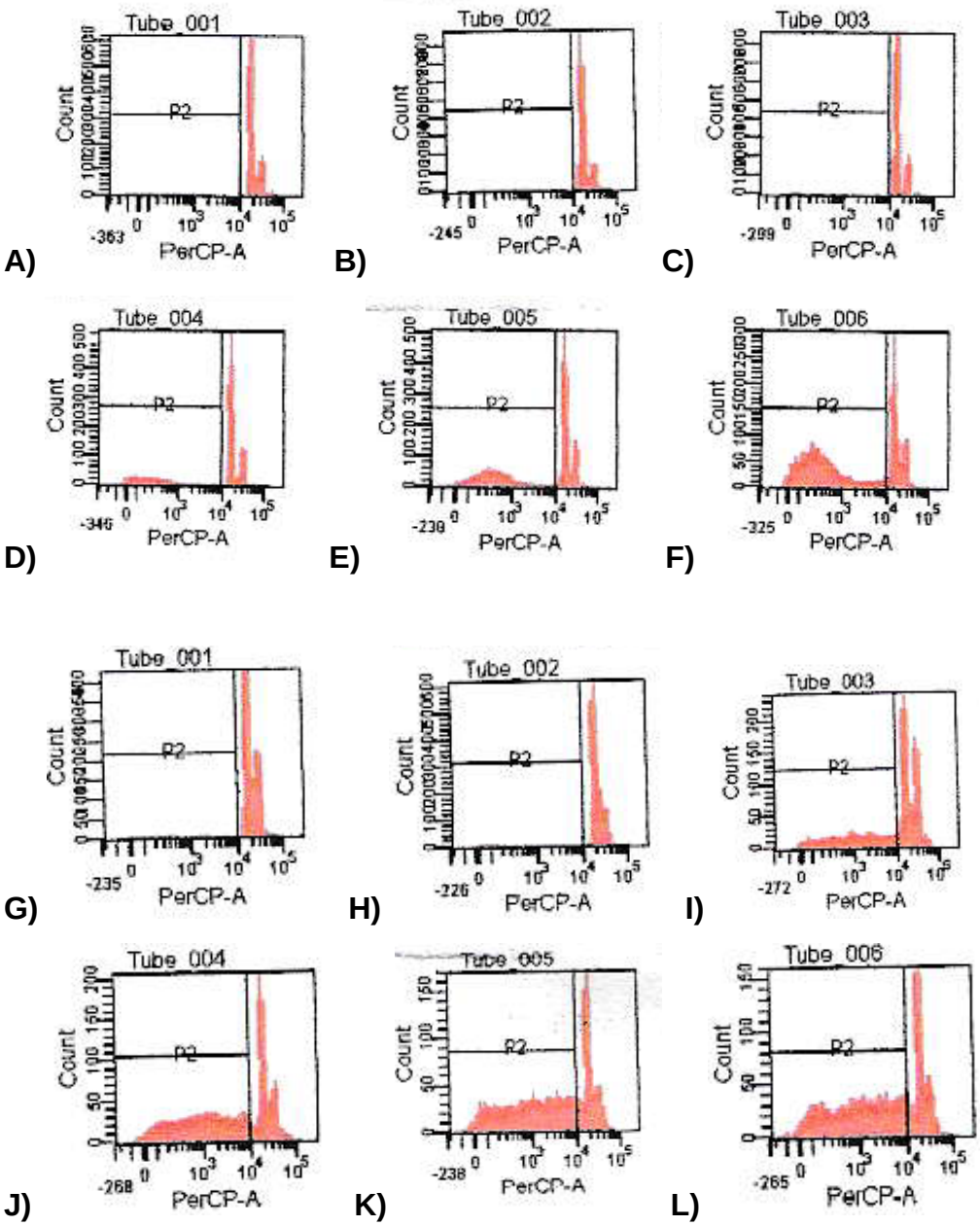


Figura 11 – Análise da porcentagem de núcleos hipodiplóides das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 pelo método HFS por citometria de fluxo. O histograma indica a intensidade de fluorescência (porcentagem) dos núcleos hipodiplóides (células em apoptose) marcados com iodeto de propídeo (P2) e núcleos diploides (P1, células viáveis). A a F: linhagem celular MCF-7. A) controle negativo do ensaio. B) células MCF-7 tratadas com resveratrol 165 µM. C) células MCF-7 tratadas com hidroxitamoxifeno 40 µM. D) células MCF-7 tratadas com desmetiltamoxifeno 30 µM. E) células MCF-7 tratadas com resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM. F) células MCF-7 tratadas com resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM. G a L: linhagem celular MDA-MB-231. G) controle negativo do ensaio. H) células MDA-MB-231 tratadas com resveratrol 165 µM. I) células MDA-MB-231 tratadas com hidroxitamoxifeno 40 µM. J) células MDA-MB-231 tratadas com desmetiltamoxifeno 30 µM. K) células MDA-MB-231 tratadas com resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM. L) células MDA-MB-231 tratadas com resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM.

Tabela 10 - Análise da apoptose (% núcleo hipodiplóide) nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento associado de resveratrol com desmetiltamoxifeno e hidroxitamoxifeno por 24 horas

Tratamentos (µM)	Apoptose (MCF-7)	p
0	2% ± 1,55	
R165	6% ± 0,47	ns
H40	9% ± 2,24	ns
D30	24% ± 9,41	ns
RH	41% ± 7,52	*
RD	42% ± 21,75	ns

Tratamentos (µM)	Apoptose (MDA-MB-231)	p
0	4% ± 2,67	
R165	10% ± 2,28	ns
H40	13% ± 1,69	ns
D30	57% ± 9,89	ns
RH	49% ± 17,95	*
RD	61% ± 8,10	ns

Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle (células não tratadas).
Os dados apresentados representam a média de três experimentos realizados em triplicata.
p: análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way” e Teste de Tukey.
ns: estatisticamente não significativo; * diferença significativa, com valor de $p<0,05$ para a comparação entre as porcentagens de núcleo hipodiplóide das células tratadas somente com desmetiltamoxifeno 30 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM e para a comparação entre as porcentagens de núcleo hipodiplóide para as células tratadas somente com hidroxitamoxifeno 40 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM.
D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RD: resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM; H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; RH: resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM.

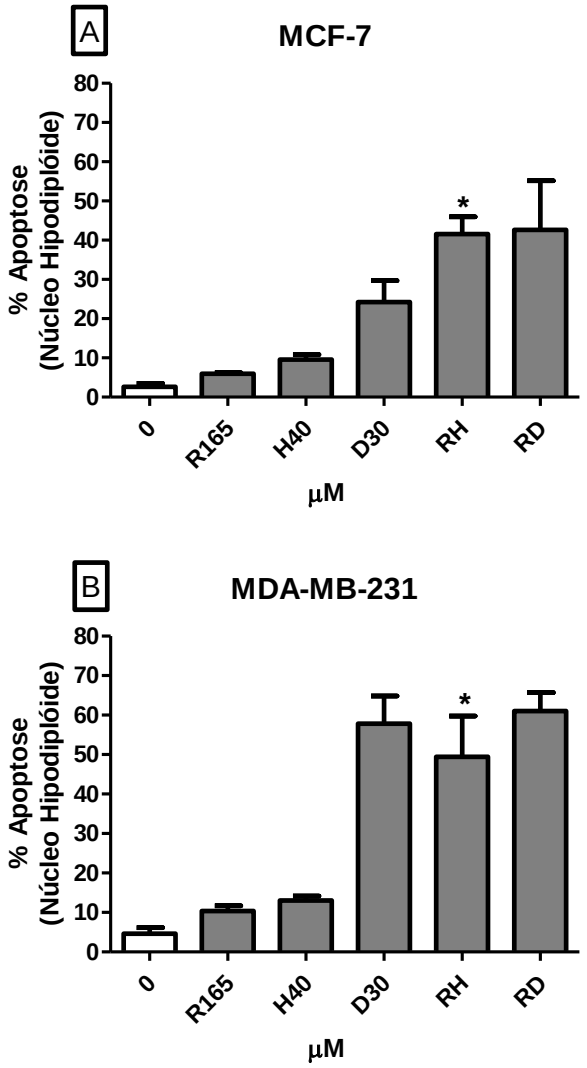


Figura 12 – Porcentagem das linhagens MCF-7 (12A) e MDA-MB-231 (12B) em apoptose (núcleo hipodiplóide), quando tratadas com resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM e associação de resveratrol 165 µM com cada um dos metabólitos do tamoxifeno (ensaio de HFS). As células MCF-7 e MDA-MB-231 ($5x10^5$ células/poço) foram cultivadas em placa de 6 poços com meio de tratamento e incubadas com resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM e a associação por 24 horas. 0: células sem tratamento (controle negativo); H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RH: resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM; RD: resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. Foi utilizada a análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way" e Teste de Tukey. * diferença significativa, com valor de $p<0,05$, para a comparação entre as porcentagens de apoptose das células tratadas somente com hidroxitamoxifeno 40 µM e desmetiltamoxifeno 30 µM e após tratamento associado de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM.

4.4 Detecção das caspases 3, 8 e 9 por Western-blot

Neste trabalho, foram analizados os níveis proteicos das caspases 3, 8 e 9 das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após os tratamentos com resveratrol 165 µM, hidroxitamoxifeno 40 µM, desmetiltamoxifeno 30 µM, resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM por 24 horas. Os experimentos foram realizados por western-blot com a finalidade de confirmar os resultados de indução de apoptose pelo ensaio de marcação com anexina V/iodeto de propídio e HFS por citometria de fluxo. Além disso, a detecção da ativação dessas caspases permite a identificação de qual via da apoptose (intrínseca ou extrínseca) é ativada pelos tratamentos.

A detecção proteica da proteína endógena tubulina foi utilizada como controle da quantidade de proteínas. Para a realização do western-blot, foram utilizadas proteínas extraídas de cada um dos tratamentos realizados em cada uma das linhagens celulares.

O tratamento das células MCF-7 com resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM estimulou a ativação da caspase 3 (Figura 13), caspase 8 (Figura 14) e caspase 9 (Figura 15). Porém, nota-se que os resultados do tratamento de resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM foram mais expressivos quando comparados aos resultados do tratamento de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM.

Já, a ativação de caspase 3 nas células MDA-MB-231 ocorreu apenas com o tratamento de resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM (Figura 13) e essa ativação ocorreu em menor grau quando comparada com a célula MCF-7. Não foi possível detectar a ativação de caspase 8 e 9 nas células MDA-MB-231.

É possível detectar a ativação das caspases pelo surgimento das bandas específicas para caspase 3, 8 e 9, indicando ativação da apoptose pelos tratamentos associados.

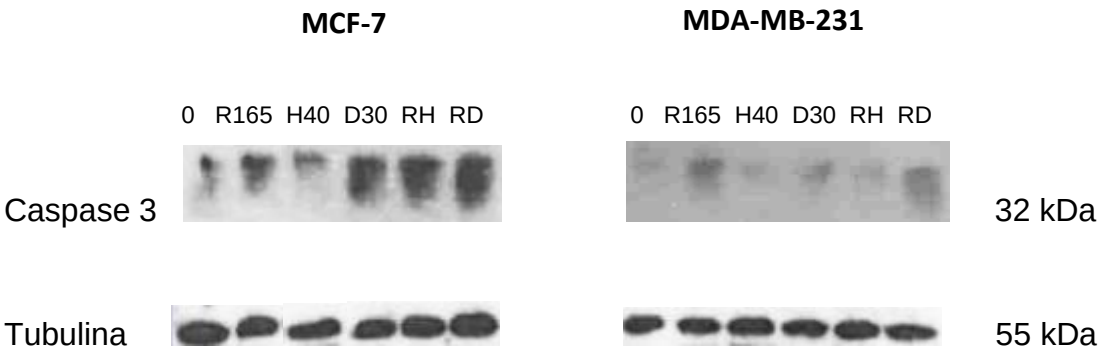


Figura 13 – Ativação da caspase 3 pelo tratamento de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. O aumento da marcação das bandas específicas para caspase 3 (peso molecular 32 kDa), no extrato proteico, indica ativação da apoptose das células MCF-7 e MDA-MB-231 pelos tratamentos associados (RH e RD). A tubulina (peso molecular 55kDa) foi utilizada como controle da quantidade de proteínas.
0: controle (células sem tratamento); R165: resveratrol 165 µM; H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RH: resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM; RD: resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM.

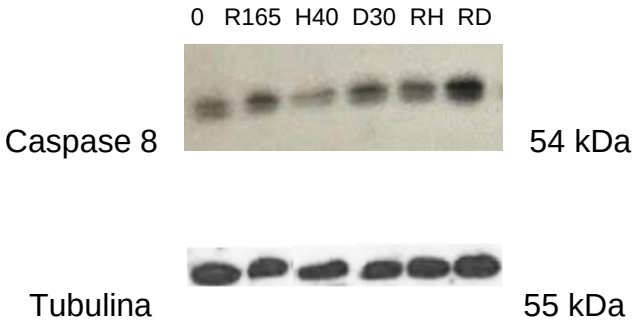


Figura 14 – Ativação da caspase 8 pelo tratamento de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM na linhagem MCF-7. O aumento da marcação das bandas específicas para caspase 8 (peso molecular 54 kDa), no extrato proteico, indica ativação da apoptose pela via extrínseca das células MCF-7 pelos tratamentos associados (RH e RD). A tubulina (peso molecular 55kDa) foi utilizada como controle da quantidade de proteínas.
0: controle (células sem tratamento); R165: resveratrol 165 µM; H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RH: resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM; RD: resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM.

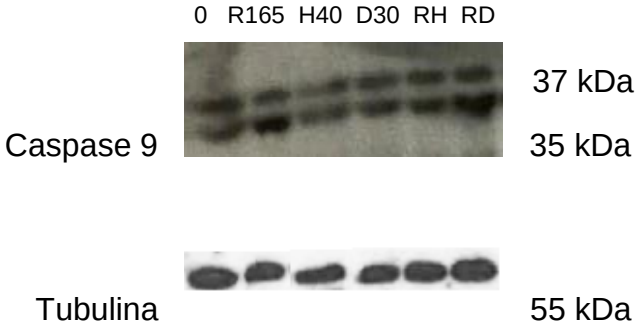


Figura 15 – Ativação da caspase 9 pelo tratamento de resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM na linhagem MCF-7. O aumento da marcação das bandas específicas para caspase 9 (peso molecular 35 e 37 kDa), no extrato proteico, indica ativação da apoptose pela via intrínseca das células MCF-7 pelos tratamentos associados (RH e RD). A tubulina (peso molecular 55kDa) foi utilizada como controle da quantidade de proteínas.
0: controle (células sem tratamento); R165: resveratrol 165 µM; H40: hidroxitamoxifeno 40 µM; D30: desmetiltamoxifeno 30 µM; RH: resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM; RD: resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM.

Discussão

5 DISCUSSÃO

As atuais estratégias de tratamento do câncer de mama dependem da presença de RE, sendo que os pacientes com um status de RE-positivo respondem melhor às terapias endócrinas disponíveis, tais como tamoxifeno (YANG et al., 2013). Os pacientes com um status de RE-negativo muitas vezes são resistentes às terapias endócrinas e o câncer é mais agressivo e confere pior prognóstico. Assim, é importante formular novas estratégias para sensibilizar os tumores ER negativos aos tratamentos endócrinos disponíveis (YAO et al., 2017).

Atualmente, o resveratrol tem recebido atenção devido às suas propriedades biológicas e potencialmente benéficas, como sua atividade anticarcinogênica (KOK et al., 2010; SINHA et al., 2016). O resveratrol tem sido relatado como um fitoestrógeno devido à sua capacidade de se ligar e ativar RE, regulando a transcrição de genes alvos responsivos ao estrógeno. Os efeitos do resveratrol sobre os REs permanecem controversos e os efeitos em células de câncer de mama humano é mais complicado devido ele ter mostrado exercer efeitos proliferativos e anti-proliferativos (ALAMOLHODAEI et al., 2017). Portanto, é necessário realizar pesquisas mais apuradas de como o resveratrol atua na fisiologia do câncer de mama e como o resveratrol associado aos metabólitos do tamoxifeno proporciona benefícios para o tratamento desse tipo de câncer.

No presente trabalho, analisamos o resveratrol devido a sua conhecida ação anticancerígena em células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 e os metabólitos do tamoxifeno, isolados e em associação ao resveratrol.

Logo nos primeiros testes realizados de citotoxicidade celular, foi observado que o resveratrol não apresentou toxicidade para a célula epitelial mamária (MCF-10A) na concentração de 165 µM, apresentando 88% ± 4,23 de viabilidade celular, sendo então a dose de escolha para os tratamentos em associação com os metabólitos do tamoxifeno. Esse dado está de acordo com o que foi observado por Siddiqui et al. (2013) utilizando substâncias análogas do resveratrol em doses de 50 µM.

Foi observado que o resveratrol diminuiu significativamente a viabilidade de células MCF-7 e MDA-MB-231 em altas concentrações de 328, 438, 547 e

657 µM, como demonstrado por Pozo-Guisado et al. (2002). Porém, na concentração de 165 µM não houve diminuição da viabilidade celular de MCF-7 (94% ± 10,5) e MDA-MB-231 (92% ± 16,38). O resveratrol, em baixas concentrações estimulou o crescimento de células MDA-MB-231, sendo resultado de seu efeito fitoestrogênico, como observado por Kala e Tollefsbol (2016) após tratamento de células MDA-MB-157 com resveratrol 15 µM, porém, o resultado do atual estudo foi considerado estatisticamente não significativo.

Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, Stocco et al. (2012) observaram que baixas concentrações de resveratrol (0,1 a 20 µM) não apresentaram inibição do crescimento de células de câncer de bexiga. Já altas concentrações de resveratrol (50 a 100 µM) apresentaram diminuição estatisticamente significativa na viabilidade de células de câncer de bexiga, demonstrando o efeito anti-proliferativo do resveratrol em doses elevadas. Nosso grupo, juntamente com outros pesquisadores, tem demonstrado a redução na viabilidade de células ER-positivas e ER-negativas induzida por fitoestrógenos e que essa redução ocorre como resultado da modulação em moléculas de expressão envolvidas no controle da via apoptótica (STOCCO et al., 2015).

Foi observado que o desmetiltamoxifeno diminuiu significativamente a viabilidade de células MCF-7 e MDA-MB-231 nas concentrações de 30, 40 e 50 µM. No momento que se associou a dose de 30 µM de desmetiltamoxifeno com resveratrol 165 µM, observou-se que a viabilidade de MCF-7 diminui de 71% ± 15,06 para 52% ± 7,21, sendo resultado da potencialização (x=1,66) do desmetiltamoxifeno 30 µM pelo resveratrol 165 µM, enquanto a viabilidade de MDA-MB-231 diminui de 70% ± 12,16 para 49% ± 10,94, sendo resultado da potencialização (x=1,7) do desmetiltamoxifeno 30 µM pelo resveratrol 165 µM. O mesmo resultado foi observado por Ronghe et al. (2016) quando células MCF-7 foram tratadas com tamoxifeno 2 µM e um análogo do resveratrol 10 a 30 µM e quando células MDA-MB-231 foram tratadas com tamoxifeno 2 µM e um análogo do resveratrol 2 a 10 µM.

Foi observado que o hidroxitamoxifeno diminuiu significativamente a viabilidade de células MCF-7 nas concentrações de 40 e 50 µM, e de células MDA-MB-231 nas concentrações de 30, 40 e 50 µM. No momento que se associou a dose de 40 µM de hidroxitamoxifeno com resveratrol 165 µM,

observou-se que a viabilidade de MCF-7 diminui de 85% ± 15,35 para 44% ± 7,56, sendo resultado da potencialização (x=3,73) do hidroxitamoxifeno 40 µM pelo resveratrol 165 µM, enquanto a viabilidade de MDA-MB-231 diminui de 59% ± 7,37 para 21% ± 10,13, sendo resultado da potencialização (x=1,93) do hidroxitamoxifeno 40 µM pelo resveratrol 165 µM. O mesmo resultado foi observado por Kala e Tollefsbol (2016) quando células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com pré-tratamento de resveratrol 15 µM e, em seguida, hidroxitamoxifeno 5 µM.

A fim de avaliar o tipo de morte celular induzida pelo tratamento associado de resveratrol 165 µM a cada um dos metabólitos do tamoxifeno (hidroxitamoxifeno 40 µM e desmetiltamoxifeno 30 µM), foi utilizado o ensaio de marcação com anexina V/iodeto de propídeo e HFS por citometria de fluxo.

Observou-se que o hidroxitamoxifeno 40 µM, quando associado ao resveratrol 165 µM, foi capaz de induzir maior porcentagem de células MCF-7 a apoptose tardia/necrose (41,6% ± 13,2), sendo observado também pela maior porcentagem de núcleos hipodiplóides (41,6% ± 7,5) no ensaio de HFS. Tais dados apresentam-se semelhantes aos dados observados em um estudo realizado por Ronghe et al. (2016), onde células T47D (linhagem celular de câncer de mama receptor de estrógeno positivo – carcinoma ductal) foram tratadas somente com tamoxifeno 2 µM, apresentando aproximadamente 6% de células em apoptose tardia. E, ao associar o tamoxifeno 2 µM a substâncias análogas do resveratrol 2 a 10 µM por 48 horas, notou-se que 28% das células T47D estavam em apoptose tardia.

Observou-se que o hidroxitamoxifeno 40 µM e o desmetiltamoxifeno 30 µM, quando associado ao resveratrol 165 µM, foi capaz de induzir maior porcentagem de células MDA-MB-231 a apoptose tardia/necrose (42,3% ± 14,5 e 39,3% ± 11,3, respectivamente), sendo observado também pela maior porcentagem de núcleos hipodiplóides (49,4% ± 17,9 - somente para o tratamento de hidroxitamoxifeno 40 µM + resveratrol 165 µM) no ensaio de HFS. Tais dados apresentam-se semelhantes aos dados observados em um estudo realizado por Ronghe et al. (2016), onde células MDA-MB-231 foram tratadas somente com tamoxifeno 2 µM, apresentando aproximadamente 6% de células em apoptose tardia. E, ao associar o tamoxifeno 2 µM a substâncias

análogas do resveratrol 2 a 10 µM por 48 horas, notou-se que 37% das células MDA-MB-231 estavam em apoptose tardia.

Para confirmar os resultados de indução de apoptose pelo ensaio de marcação com anexina V/iodeto de propídeo e HFS, foi realizado western-blot. Observou-se que os tratamentos com resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM induziram maior ativação de caspase 3 em células MCF-7, enquanto a maior ativação de caspase 3 em células MDA-MB-231 ocorreu apenas com o tratamento de resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM. Em um estudo realizado por Shi et al. (2013), células MCF-7 resistentes ao tamoxifeno foram tratadas com tamoxifeno 50 µM e resveratrol 0 a 50 µM, sendo concentrações não tóxicas, por 48 horas e analisadas por western-blot. Notou-se que o tratamento associado promoveu clivagem de caspase 3, principalmente em 40 e 50 µM de resveratrol, sugerindo indução de apoptose, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo.

Observou-se também que os tratamentos com resveratrol 165 µM + hidroxitamoxifeno 40 µM e resveratrol 165 µM + desmetiltamoxifeno 30 µM induziram maior ativação de caspase 8 e 9 em células MCF-7, indicando que a ativação de caspase 3 ocorre pelas duas vias da apoptose, via extrínseca e intrínseca.

Já, para a célula MDA-MB-231, os resultados não foram conclusivos, sendo necessários mais estudos a respeito do mecanismo de morte celular envolvido. Sugere-se que a morte celular esteja envolvida também com mecanismos independentes da ativação de caspases.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo indicam que células MCF-7 e MDA-MB-231 quando tratadas com a associação de tamoxifeno e resveratrol, em concentrações não tóxicas, exibem apoptose, enquanto os tratamentos apenas com resveratrol ou metabólitos do tamoxifeno não exerceram impacto na viabilidade celular e, consequentemente, na indução de apoptose. Nossos resultados claramente corroboram com outros estudos prévios.

Os dados obtidos indicam que o resveratrol pode sensibilizar as células RE-positivas e RE-negativas para responder à terapia endócrina com tamoxifeno. Assim, no futuro, essa estratégia terapêutica pode fornecer uma nova abordagem para o tratamento do câncer de mama e/ou permitir que o resveratrol seja administrado como uma terapia adjuvante ao tratamento com tamoxifeno.

Referências

REFERÊNCIAS

ALLRED, D.C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-α, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. **Modern Pathology,** v. 23, p. 52-59, 2010.

ALAMOLHODAEI, N. S. et al. Resveratrol as MDR reversion molecule in breast cancer: an overview. **Food Chem Toxicol**, v. 103, p. 223-232, 2017.

BAEK, S.H. et al. Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS-1: role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells. **Phytomedicine**, v. 23, p. 566–577, 2016.

BRAVATÀ, V. et al. “Omics” of HER2-Positive Breast Cancer. OMICS: **A Journal of Integrative Biology**, v. 17, n. 3, p. 119-129, 2013.

BRUMATTI, G. et al. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. **FEBS Lett**., v. 541, n.4, p. 57-63, 2003.

BUCHANAN, C.M. et al. Pharmacokinetics of tamoxifen after intravenous and oral dosing of tamoxifen-hydroxybutenyl-b-ciclodextrin formulations. **Jounal of Pharmaceutics Sciences**, v. 96, n. 3, p. 206, 2007.

CHEN, G. G.; ZENG, Q.; TSE, G. M. Estrogen and its receptors in cancer. **Med Res Rev**, v. 28, p. 954-974, 2008.

CHOU, T.C. Preclinical versus clinical drug combination studies. **Leukemia & Lymphoma**, v. 49, n. 11, p. 2059-2080, 2008.

DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal of cancer**. v. 23;7(10), p. 1281-94, 2016.

DUN, J.X. et al. Resveratrol synergistically augments anti-tumor effect of 5-FU *in vitro* and *in vivo* by increasing S-phase arrest and tumor apoptosis. **Exp. Biol. Med**. v. 240, p. 1672-1681, 2015.

FARRAND, L. et al. Piceatannol enhances cisplatin sensitivity in ovarian cancer via modulation of p53, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), and mitochondrial fission. **J. Biol. Chem**., v. 288, p. 23740–23750, 2013.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HADDAD, C.F. Trastuzumab no cancer de mama. **Femina**, v. 38, n. 2, 73-78, 2010.

HOWELL, A. et al. Comparison of Fulvestrant Versus Tamoxifen for the Treatment of Advanced Breast Cancer in Postmenopausal Women Previously Untreated With Endocrine Therapy: A Multinational, Double-Blind, Randomized Trial. **J Clin Oncol**, v. 22, p. 1605-1613, 2004.

HSIEH, T.C.; WU, J.M. Resveratrol: biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule, **Biofactors**. v. 36, p. 360-369, 2010.

INCA. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil.** INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância 2018.

ISMAIL-KHAN, R.; BUI, M.M. A review of triple-negative breast cancer. **Cancer Control**., v.17, p.173-176, 2010.

JIANG, Z. et al. Resveratrol and cancer treatment: updates. **Annals of the New York Academy of Sciences**., v. 1403, p. 59-69, 2017.

JORDAN, V.C. et al. The apoptotic action of estrogen following exhaustive antihormonal terapy: a new clinical treatment strategy. **Breast**, v.14, p. 624-630, 2005.

KALA, R.; TOLLEFSBOL, T. A novel combinatorial epigenetic therapy using resveratrol and pterostilbene for restoring estrogen receptor-α (ERα) expression in ERα-negative breast cancer cells. **PLoS ONE**., v. 11, n. 5, 2016.

KOK, T.M. et al. Antioxidative and antigenotoxic properties of vegetables and dietary phytochemicals: the value of genomics biomarkers in molecular epidemiology. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, p. 208-217, 2010.

LEVENSON, A.S. et al. Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER alpha. **Int. J. Cancer**., v. 104, p. 587-596, 2003.

LI, W. et al. Resveratrol inhibits the epithelial–mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF-kappaB pathway. Curr. **Med. Chem**., v. 20, p. 4185–4194, 2013.

MACFARLANE, M.; WILLIAMS, A.C. Apoptosis and disease: a life or death decision. **EMBO Reports**, v. 5, p. 674-678, 2004.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine Insights Pathology**, v. 8, 23-31, 2015.

MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 8, p.872-885, 2008.

MOCHIZUKI, T. et al. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with Tc-annexin-V. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 1, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**., v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAKAGAWA, H. et al. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. **J. Cancer. Res. Clin.Oncol**. v.127, p. 258-264, 2001.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Mehtods**, v. 139, p. 271-279, 1991.

NICOLETTI, I.; RICCARDI, C. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat. Prot**., v. 3, n.3, p. 1458-1462, 2006.

PARK, M. A.; HWANG, K.A.; CHOI, K.C. Diverse animal models to examine potential role(s) and mechanism of endocrine disrupting chemicals on the tumor progression and prevention: do they have tumorigenic or anti-tumorigenic property. **Lab. Anim. Res.** v. 27, p. 265-273, 2011.

PEC, M.K. et al. Indution of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothyrsiferol. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1452-1461, 2003.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células.** Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro-RJ, p. 251, 2005.

PEZZUTO et al. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. **Science**, v. 275, p. 218-220, 1997.

PORTT, L. et al. Anti-apoptosis and cell survival: A review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 1, p. 238-259, 2011.

POZO-GUISADO, E. et al. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. **Biochem Pharmacol**, v. 64, p.1375-1386, 2002.

RONGHE, A. et al. Tamoxifen synergizes with 4-(E)-{(4-hydroxyphenylimino)-methylbenzene, 1,2-diol} and 4-(E)-{(p-tolylimino)-methylbenzene-1,2-diol}, novel azaresveratrol analogs, in inhibiting the proliferation of breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 51747-51762, 2016.

SHI, X.P. et al. Resveratrol sensitizes tamoxifen in antiestrogen-resistant breast cancer cells with epithelial-mesenchymal transition features. **Internacional Journal of Molecular Sciences**., v. 14, p. 15655-15668, 2013.

SIDDIQUI, A. et al. Novel Azaresveratrol analogs: synthesis, characterization and anticancer activity against breast cancer cell lines. **Bioorg Med Chem Lett**, 2013.

SMITH, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**., v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SINHA, D. et al. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40-41, p. 209-232, 2016.

STOCCO, B.; TOLEDO, K.A.; SALVADOR, M. Dose-dependent effect of Resveratrol on bladder cancer cells: Chemoprevention and oxidative stress. **Maturitas**, v. 72, p. 72-78, 2012.

STOCCO, B.; TOLEDO, K.A.; FUMAGALLI, H.F. Biotransformed soybean extract induces cell death of estrogen-dependent breast cancer cells by modulation of apoptotics proteins. **Nutrition and Cancer**, v. 67(4), p. 612-619, 2015.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews**, v. 9, p. 231-241, 2008.

THIEL, G.; ROSSLER, O.G. Resveratrol stimulates AP-1- regulated gene transcription. **Mol. Nutr. Food Res**., v. 58, p. 1402– 1413, 2014.

VAN, H.W. et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on annexin V. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 549-559, 2000.

VINOD, B.S. et al. Resveratrol chemosensitizes HER-2-overexpressing breast cancer cells to docetaxel chemoresistance by inhibiting docetaxelmediated activation of HER-2-Akt axis. **Cell Death Discov. 1:** 15061, 2015.

YAGER, J.D. Mechanisms of Estrogen Carcinogenesis: The Role of E2/E1-Quinone Metabolites Suggests New Approaches to Preventive Intervention – A Review. **Steroids**., v. 99, p. 56-60. 2015.

YANG, G. et al. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 3, p. 392-404, 2013.

YAO, H. et al. Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? **Oncotarget**. v. 8, p. 1913-1924, 2017.

ZHANG, J.F. et al. Novel therapeutic strategies for patients with triple-negative breast cancer. **Onco Targets Ther.**, v. 9, p. 6519-6528, 2016.

ZHOU, J.; TENG, R.; XIE, S. Endocrine resistance in breast cancer: Current status and a perspective on the roles of miRNAs (Review). **Oncology Letters**., v. 6, n. 2, p. 295-305, 2013.