

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

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, conseqüentemente, 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

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 prever 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 resposta 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 (androstenediona e testosterona) em estrógenos (estrone e estradiol) na mulher pós-menopausa e, conseqüentemente, 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 possui 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, conseqüentemente, 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 antiinflamatória, 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 ($\leq 4 \mu\text{M}$) causaram proliferação em linhagem de células de câncer de mama RE-positivo (MCF-7), enquanto altas concentrações ($\geq 44 \mu\text{M}$) inibiram o crescimento celular de MCF-7. Em outro estudo, Pozo-Guisado et al. (2002) demonstraram que altas doses de resveratrol ($50 \mu\text{M}$) 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 μ M. Levenson et al. (2003) também sugeriram que o resveratrol pode agir como um agonista em baixas concentrações (10 – 25 μ M), 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-activated 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 κ B (NF- κ B) (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,

umentando 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 significativamente 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, sobrevivência 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 fosfolípidos 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 aspartate-specific 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).

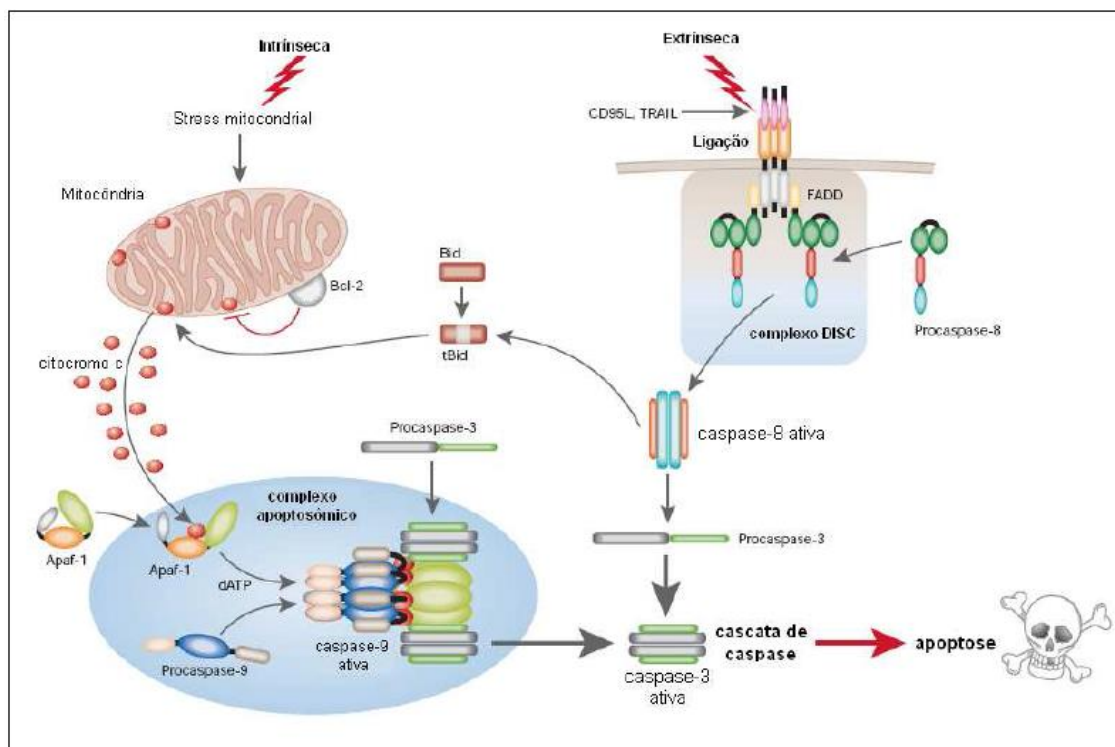
A via extrínseca (Figura 1) é iniciada por associação de marcadores extracelulares de morte, como FasL (Fas Ligante) ou TNF- α , a receptores de morte na membrana plasmática e, ao interagirem, promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras como Fas associada ao domínio de morte (FADD – *Fas-Associated 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-xL), 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 apoptossomo (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 saudáveis 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.

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, conseqüentemente, 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- β -cyclodextrin formulations. **Journal 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 therapy: 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 (ER α) expression in ER α -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 dehydrothysiferol. **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 apoptotic 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 docetaxel-mediated 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.