



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na interação de células neoplásicas com polímeros arborescentes transportadores de selênio

NICOLI DOLORES GONÇALVES CORREA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares.

São Paulo

2023

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na interação de
células neoplásicas com polímeros arborescentes transportadores de
selênio**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

NICOLI DOLORES GONÇALVES CORREA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Tecnologia Nuclear –
Aplicações.**

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares.

**São Paulo
2023**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar: DOLORES GONÇALVES CORREA, N. **Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na interação de células neoplásicas com polímeros arborescentes transportadores de selênio**. 2023. 113 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gonçalves Correa, Nicolí Dolores
Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial
na interação de células neoplásicas com polímeros
arborescentes transportadores de selênio / Nicolí Dolores
Gonçalves Correa; orientador Carlos Roberto Jorge Soares. --
São Paulo, 2023.
113 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2023.

1. Dendrímeros de poliglicerol. 2. Carcinoma mamário. 3.
Espécies reativas de oxigênio (EROS). I. Roberto Jorge Soares,
Carlos, orient. II. Título.

Folha de Aprovação

Autor: Nicoli Dolores Gonçalves Correa

Título: Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na interação de células neoplásicas com polímeros arborescentes transportadores de selênio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Em primeiro lugar dedico este trabalho a Deus, pela proteção e por me guiar até esse momento tão importante da minha vida, ao qual foi meu refúgio diante dos momentos difíceis e me manteve nessa jornada.

Dedico à minha mãe Doroteia Gonçalves, ao meu avô e pai do coração Benedito Augusto Gonçalves e à minha avó Eduarda Maria das Dores Shilliter Gonçalves, que com amor sempre me incentivaram e acreditaram em mim. É impossível expressar em palavras o amor e gratidão que sinto por vocês.

Dedico às minhas irmãs e ao meu irmão: Olivia Gonçalves May, Selma Eduarda May, Catarine May e Luiz Henrique May, por serem luz na minha vida. Desde a chegada de cada um, vocês têm sido a minha maior motivação para me tornar melhor a cada dia. Espero sempre ser um bom exemplo para vocês e suporte nos momentos em que precisarem,

Dedico ao meu companheiro Guilherme Mesquita de Oliveira, pelo amor, paciência e compreensão nos momentos de ausência. Agradeço por todo apoio, incentivo e colaboração durante esse período.

Dedico as às pessoas especiais na minha vida: Silvia Dolores Gonçalves, Livia Gonçalves Rodrigues, Jose Luiz May, Ana Paula Machado Cruz e Aline Maia de Figueiredo. Sou grata por ter vocês na minha vida e por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus e à minha família, meus verdadeiros mentores, que me guiaram no caminho da honestidade e humildade. Agradeço profundamente pelo apoio nas minhas escolhas e pelo esforço para que eu pudesse triunfar e realizar meus sonhos.

Ao professor e meu orientador Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, que me acolheu em seu grupo de pesquisa e ao qual sou extremamente grata, pela confiança em meu trabalho, incentivo e compreensão. Que com paciência me guiou nessa jornada, dispondo de todo o conhecimento para meu crescimento profissional.

Ao Professor Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz, agradeço pelo projeto desafiador que trouxe inúmeros ensinamentos científicos. Agradeço por todo o suporte oferecido para a realização da minha dissertação.

Ao Professor Dr. Daniel Perez Vieira, sou grata por todos os ensinamentos, suporte, paciência e exemplo profissional. Não há como medir o quanto pude aprender e crescer com seus conhecimentos. Sem o seu suporte e disposição em me auxiliar, tenho certeza de que não seria possível a realização desse sonho. Agradeço também pelo carinho e acolhimento em seu grupo de aprendizado.

Agradeço ao Centro de Biotecnologia do Ipen e a todos os colaboradores do centro, que com muita competência e simpatia sempre ajudaram em todo o processo. Guardarei carinho e respeito por todos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), meu agradecimento pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste mestrado.

Podemos escolher recuar em direção à segurança ou avançar em direção ao crescimento. A opção pelo crescimento tem que ser feita repetidas vezes. E o medo tem que ser superado a cada momento.

Abraham Maslow

RESUMO

DOLORES GONÇALVES CORREA, N. **Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na interação de células neoplásicas com polímeros arborescentes transportadores de selênio.** 2023. 113 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

As fases de iniciação, promoção e progressão de carcinogênese têm sido frequentemente relacionadas ao estresse oxidativo, caracterizado em circunstâncias nas quais o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) transforma células normais em cancerosas. O organismo humano contém a selenoenzima glutathione peroxidase (GPx) que constitui a primeira defesa endógena de neutralização das EROS. As interações entre os antioxidantes e antineoplásicos promovem a potencialização do mecanismo de ação dos quimioterápicos. O objetivo desta pesquisa é avaliação da atividade antitumoral de selenetos de dendrímeros de poli(glicerol) (DPGLi-Se) biomiméticos da enzima glutathione peroxidase (GPx). O composto DPGLi-Se foi sintetizado e caracterizado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H 1) e carbono (RMN-C 13). No estudo da atividade antitumoral do DPGLi-Se propõe-se a avaliação do potencial citotóxico do composto em condições *in vitro* frente a linhagem tumoral de câncer de mama (MCF-7) e não tumoral (células de ovário de Hamster Chinês, CHO-k1). O perfil citotóxico foi investigado utilizando o método de viabilidade celular (MTS) avaliando o percentual de inibição do crescimento tumoral e o aumento da sobrevivência *in vitro* após 24 h, 48h e 72h de inoculação do DPGLi-Se. A quantificação das células em apoptose foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados obtidos com o DPGLi-Se, confirmaram a ausência de efeitos hemolíticos. Não observamos efeitos citotóxicos para as células CHO-K1; no entanto, com a linhagem celular MCF-7, os efeitos citotóxicos foram menos específicos que os observados em trabalhos anteriores com a linhagem de tumor de pescoço. As técnicas padronizadas e utilizadas têm potencial aplicação na avaliação de drogas desenvolvidas para tratamentos tumorais. O dendrímero estudado pode ser uma opção terapêutica importante. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar sua ação em diferentes linhagens tumorais.

Palavras-Chave: Dendrímero de Poliglicerol, MCF-7, CHO-k1, Câncer.

ABSTRACT

DOLORES GONÇALVES CORREA, N. **Evaluation of oxidative stress and mitochondrial redox status in the interaction of neoplastic cells with selenium transporting polymers.** 2023. 113 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

The initiation, promotion and progression phases of carcinogenesis have been frequently related to oxidative stress, characterized in circumstances in which the excess of reactive oxygen species (ROS) transforms normal cells into cancerous ones. The human body contains the selenoenzyme glutathione peroxidase (GPx) which constitutes the first endogenous defense to neutralize ROS. Interactions between antioxidants and antineoplastic agents promote the potentiation of the mechanism of action of chemotherapeutic drugs. The objective of this research is to evaluate the antitumor activity of selenides of poly(glycerol) dendrimers (DPGLi-Se) biomimetic of the enzyme glutathione peroxidase (GTX). The DPGLi-Se compound was synthesized and characterized by nuclear magnetic resonance of hydrogen (NMR-H 1) and carbon (NMR-C 13). In the study of the antitumor activity of DPGLi-Se, it is proposed to evaluate the cytotoxic potential of the compound under in vitro conditions against the tumor cell line of breast cancer (MCF-7) and non-tumor (Chinese Hamster ovary cells, CHO-k1). The cytotoxic profile of DPGLi-Se was investigated using the cell viability method (MTS) evaluating the percentage of tumor growth inhibition and the increase in in vitro survival after 24h, 48h and 72h of DPGLi-Se inoculation. The quantification of cells in apoptosis was evaluated by flow cytometry. Synthesis of DPGLi-Se was successfully performed and demonstrated a decrease in cell proliferation at lower doses in the MCF-7 cell line. The study of apoptosis was preliminary due to the need for studies under different conditions. The assays corroborate the specificity of the compound in cancer cells.

Keywords: Polyglycerol Dendrimer, MCF-7, CHO-k1, Cancer.

Lista de Figuras

Figura 1: Célula humana generalizada mostrando as principais organelas..	18
Figura 2: Tipos de crescimento celular na proliferação do câncer.	19
Figura 3: Fatores que causam danos ao DNA e alternativas para evitar.	21
Figura 4: Etapas da carcinogênese química.....	23
Figura 5: Demonstração da diminuição da concentração de oxigênio em função da distância capilar	26
Figura 6: Estímulos tumorais à angiogênese	27
Figura 7: Representação esquemática dos papéis da COX-2 na carcinogênese.	30
Figura 8: Conversão do ácido araquidônico em prostaglandina.....	31
Figura 9: Progressão angiogênese e crescimento tumoral	32
Figura 10: Esquema da ativação da cascata de sinalização	34
Figura 11: Influência do p53 no ciclo celular.....	37
Figura 12: Características morfológicas do processo de apoptose e da necrose	38
Figura 13: Corpúsculos apoptóticos sendo fagocitados por uma célula branca do sangue.	40
Figura 14: Vias de ativação para apoptose (extrínseca e intrínseca).....	42
Figura 15: Anatomia Mamária.	44
Figura 16: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados no Brasil para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.	47
Figura 17: Representação espacial das taxas de câncer de mama para mulheres no ano de 2023,	48
Figura 18: Estados singletos do O ₂ . (Segundo a Teoria do Orbital molecular).....	50
Figura 19: Mecanismo de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	51
Figura 20: Mecanismos de dano celular induzido pelo estresse oxidativo. ..	54
Figura 21: Comparação com as dimensões atômicas das moléculas em nanoescala.....	57
Figura 22: Idealização da circulação de dendrímeros na corrente sanguínea.	58
Figura 23: Arquitetura do dendrímero.....	59
Figura 24: Representação esquemática do crescimento dendrimérico.....	60

Figura 25: Dendrímero de poliglicerol.....	62
Figura 26: Espectros ATR-FTIR medidos a temperatura ambiente (25°C) de: DPGLi-Se (a) e SeMeCys-DPGLi-Se após 5 min (b) e 30 min (c) de reação de esterificação, respectivamente.	72
Figura 27: Conversão do éster durante a reação de esterificação entre Boc-SeMeCis e DPGLi usando DMAP/EDC a temperatura ambiente (25 °C).....	74
Figura 28: (A) Espectro UV-Vis do complexo Se(IV):DAHMP e teor de Se em DPGLi resultante do acoplamento SeMeCis a DPGLi (B). A curva de calibração obedece à equação $A = 0,04018C \text{ (mg/mL}^{-1}) + 0,0175$, que possui coeficiente de Pearson ($r^2 = 0,9984$) em uma ampla faixa de concentração de 1-12 mg/mL ⁻¹	75
Figura 29: Espectro de massas MALDI do DPGLi (a) e seu conjugado SeMeCis-DPGLi (b).	76
Figura 30: Imagem dos frascos com amostras de DPGLi-Se. A) Dendrímero de selênio antes da liofilização; B) Dendrímero de selênio após a liofilização.	77
Figura 31: Gráfico obtido da avaliação da viabilidade celular em células MCF-7 do DPGLi-Se e controles: celular (CC) e DMSO 5% em células MCF-7.	78
Figura 32: Gráfico obtido da avaliação da viabilidade celular em células CHO-k1 do dendrímero e controles: celular (CC) e DMSO 5% em células MCF-7.	79
Figura 33: Gráfico obtido da avaliação da viabilidade celular em células MCF-7 no período de 24h, 48h e 72h.	80
Figura 34: Gráfico obtido da avaliação da viabilidade celular em células CHO-k1 no período de 24h, 48h e 72h.	80
Figura 35: Frequência de apoptose em células CHO-k1 e MCF-7. Representação do gráfico de apoptose em células CHO-k1 (A) e em células MCF-7 (B), e de morte células em CHO-K1 (C) e MCF-7 (D);	82
Figura 36: Gráfico de hemólise em diferentes concentrações do dendrímero de selênio.....	84
Figura 37: Gráfico do potencial antioxidante em diferentes concentrações do dendrímero de selênio.	86
Figura 38: Gráfico da viabilidade celular.	88

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1.	Carcinoma	17
2.2.	Carcinogênese.....	22
2.3.	Angiogênese	24
2.4.	Carcinogênese e o processo inflamatório.....	28
2.5.	Mecanismos relacionados à inflamação	29
2.6.	Via de Sinalização	33
2.7.	Processo de apoptose	35
2.8.	Anatomia da mama.....	43
2.9.	Carcinoma de mama.....	45
2.10.	Toxicidade devido ao oxigênio	49
2.11.	Estresse Oxidativo e Espécies reativas do oxigênio (EROS/ROS)	52
2.12.	Dendrímeros	55
3.	OBJETIVOS.....	63
3.1.	Objetivo Geral	63
3.2.	Objetivos específicos	63
4.	METODOLOGIA	64
4.1.	Síntese e Caracterização do DPGLi-Se.....	64
4.2.	Ensaio Biológicos.....	64
4.2.1.	Cultivos celulares.....	64
4.2.2.	Liofilização do dendrímero de selênio	65
4.2.3.	Avaliação de citotoxicidade de dendrímeros de selênio em células MCF-7 e CHO-K1	65
4.2.4.	Quantificação da apoptose	67
4.2.5.	Ensaio de hemólise	68
4.2.6.	Ensaio de avaliação do potencial antioxidante	69
4.2.7.	Ensaio de genotoxicidade.....	70
4.2.8.	Análise estatística.....	71
5.	RESULTADOS.....	72
5.1.	Caracterização do DPGLi-Se.....	72
5.2.	Liofilização do dendrímero de selênio.....	77

5.3.	Teste de viabilidade celular em células MCF-7 e CHO-k1.....	78
5.4.	Ensaio de apoptose	81
5.5.	Avaliação hemolítica do dendrímero de selênio em sangue de rato Wistar 83	
5.6.	Avaliação do potencial antioxidante do dendrímero de selênio em sangue de rato Wistar	85
5.7.	Ensaio de micronúcleos.....	87
6.	DISCUSSÃO	89
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

Embora seja uma doença crônica que ocorre em todas as idades, o câncer destaca-se dentre as doenças crônicas que mais acometem a população idosa e por isso é caracterizada como uma doença do envelhecimento [1]. De acordo com o Banco de Dados de Vigilância Epidemiológica do Instituto Nacional de Câncer dos EUA, 43% dos homens e 38% das mulheres desenvolverão um câncer invasivo ao longo da vida. Dados do mesmo instituto indicam ainda que, mais de 60 % das doenças oncológicas ocorrem em indivíduos acima de 65 anos e 70% das mortes por câncer ocorre nesta mesma faixa etária [2].

O câncer é uma doença multifatorial caracterizada pelo crescimento descontrolado, rápido e invasivo de células com alterações em seu material genético [3]. O fenômeno bioquímico do envelhecimento continua a ser um tema pouco compreendido dentro da literatura científica. Algumas evidências sugerem claramente que existe uma relação simbiótica entre o envelhecimento, inflamação e doenças crônicas como o câncer. No entanto, não está claro se o envelhecimento leva à indução de processos inflamatórios resultando no desenvolvimento e manutenção de doenças crônicas ou se a inflamação é o fator causal para a indução de envelhecimento e doenças crônicas como as neoplasias [4]. Entretanto, o consenso geral na literatura científica sobre a relação entre câncer e envelhecimento é que o câncer é o resultado do acúmulo de dano celular associado a vários caminhos celulares que regulam o processo de envelhecimento dependente do tempo e conseqüentemente, do câncer [5].

O desenvolvimento científico atual aponta para o fato de que não existem genes que tenham sido selecionados para promover o envelhecimento. A teoria evolutiva permite concluir que o processo de envelhecimento é impulsionado pelo acúmulo de danos celulares ao longo da vida, principalmente devido às espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas pelas mitocôndrias como subproduto da produção da adenosina trifosfato (ATP) [6]. Como

consequência desse processo, as células enviam um sinal que aciona um processo de suicídio celular, também conhecido como apoptose.

A indução mitocondrial de apoptose é um processo intracelular que acontece quando as células estão danificadas ou estressadas. Nesse caso, as mitocôndrias são induzidas a liberar a proteína carreadora de elétrons citocromo c para o citosol. No citosol o citocromo c se liga a uma proteína denominada de fator de ativação de apoptose 1 (Apaf-1). A Apaf-1 ativada se liga a moléculas de procaspase-9 gerando um agregado destas procaspases. Logo em seguida as procaspases-9 são clivadas e ativadas, e seguem ativando outras procaspases gerando uma cascata e a consequente morte celular [7].

Durante o processo de apoptose a célula exhibe alterações na sua superfície, fazendo com que através disto ela seja fagocitada tanto por células vizinhas como por um macrófago, antes que pudesse ocorrer liberação de seu conteúdo [8]. As células cancerígenas, no entanto, são resistentes ao protocolo celular de suicídio apoptótico e possuem defesa interna contra ele. A resistência a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores maligno sendo então o EROs um fator ativador para seu crescimento metastático [9].

A gênese do câncer possui uma vertente relacionada, entre outros mecanismos, com uma deficiência de apoptose que ocasiona uma ativação de vias de transdução de sinal, resultando em uma proliferação desordenada de células em determinado tecido. Desse modo, novos fármacos anticâncer têm sido avaliados, considerando sua habilidade de parar ou restaurar o processo biológico do processo apoptótico.

Para o tratamento do câncer existem várias opções terapêuticas, entre elas, alguns agentes quimioterápicos citotóxicos essencialmente não vetorizados usados isoladamente ou em combinação com outros agentes [10]. O tratamento do câncer em indivíduos idosos é mais complicado, pois estes são mais suscetíveis a complicações provocadas pela quimioterapia citotóxica os riscos de toxicidade induzida pelo fármaco aumentam significativamente com a idade dos pacientes, especialmente em idosos que possuem mais de 70 anos [11].

A partir dos anos 70, diversas seleno-proteínas, inicialmente encontradas em bactérias, e posteriormente nos mamíferos foram identificadas [12]. Uma das descobertas mais expressivas indicou que o selênio desempenha papel fundamental na atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) [13]. As enzimas GPx apresentam atividade antioxidante, catalisando a redução de peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) através do consumo de tióis formando água e dissulfeto [14]. Ao mesmo tempo, constatou-se que o sítio ativo destas enzimas é um resíduo do aminoácido selenocisteína e o agente redutor é a glutathiona (GSH), um peptídeo endógeno com um fragmento tiol proveniente do aminoácido L-cisteína [15].

De acordo com a literatura, o átomo de selênio da enzima GPx atua na forma de selenol, que reage com o peróxido de hidrogênio (EROs) reduzindo-o à água e formando ácido selênico [16]. Este então reage com um equivalente de glutathiona (GSH), para formar o selenosulfeto e liberar água. Por último, um segundo equivalente de GSH ataca o selenosulfeto formando a glutathiona oxidada (GSSG) e regenerando a enzima na sua forma ativa para o ciclo catalítico. No processo global, dois equivalentes de GSH são oxidados a dissulfeto e água, enquanto o hidroperóxido é convertido em água [17].

É fato reconhecido pela literatura de que muitos tipos de células malignas podem gerar e liberar espécies reativas de oxigênio, em especial H_2O_2 , in vitro em resposta a um estímulo específico desencadeado via fator de crescimento/citocina ou constitutivamente no caso de células tumorais [18]. Células cancerígenas geram peróxido de hidrogênio e, se isso ocorrer in vivo, poderá contribuir para a mutação das células normais em cancerígenas e provocar danos em tecidos normais e, assim, facilitar o crescimento e invasão do tumor [19].

Tem sido sugerido que a persistência de uma situação de estresse oxidativo em células tumorais poderia explicar parcialmente algumas características do câncer, tais como proto-oncogenes ativados, fatores de transcrição, instabilidade genômica, resistência à radioterapia ou a quimioterapia, invasão tecidual e metástase [20]. Essas descobertas nos impulsionam na busca

por compostos orgânicos de selênio sintéticos que possam mimetizar a atividade antioxidante da enzima GPx.

A síntese de derivados dendríticos de PGLi (DPGLi), bem como a avaliação dos mesmos como miméticos da enzima GPx não foi ainda observado na literatura. Estruturas macromoleculares do tipo DPGLi são moléculas construídas através de crescimento radial a partir de um núcleo oligomérico de glicerol de forma repetitiva. O número de unidades de monômeros de glicerol incorporado a cada camada é sucessivamente dobrado ou triplicado em relação ao do ciclo anterior. A estrutura dendrítica do DPGLi resultante é altamente ramificada e com um grande número de grupamentos hidroxilas na sua superfície que podem ser funcionalizadas com selênio. Ao mesmo tempo a estrutura globular do DPGLi confere ao composto DPGLi a mesma estrutura das proteínas globulares, daí seu caráter biomimético da enzima GPx após funcionalização com o selênio.

Partindo desse pressuposto, planejou-se a síntese de PGLi arborescente contendo selênio (DPGLi-Se) a fim de se testar seu potencial como agente antineoplásico, mimetizador da atividade da GPx. O composto DPGLi-Se é de grande valia para estudos envolvendo a relação estrutura/atividade frente a testes do potencial biológico com fins para o desenvolvimento de um fármaco anticâncer com baixo efeito colateral para o paciente, em particular o paciente idoso.

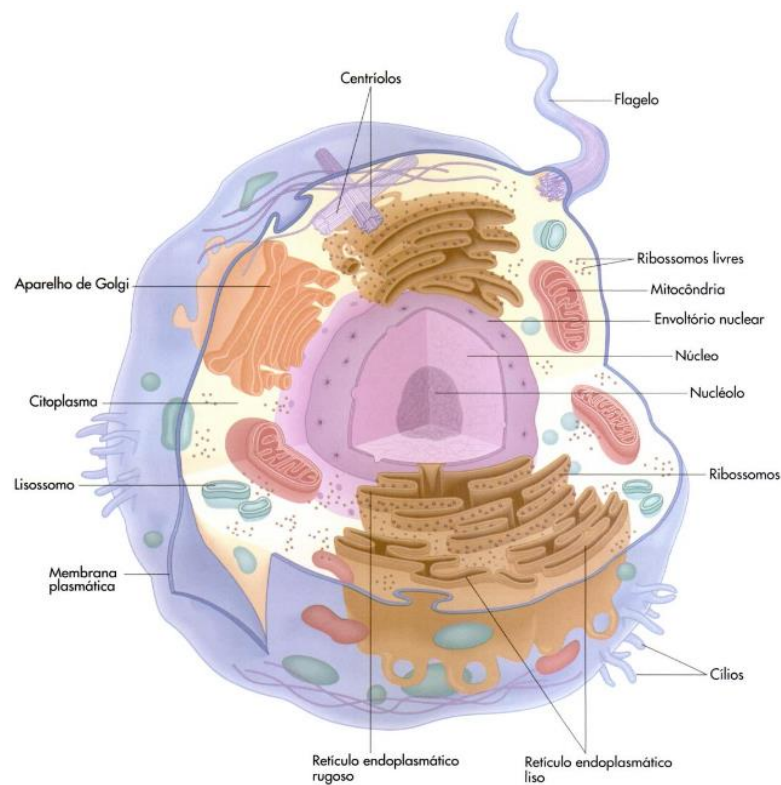
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Carcinoma

A palavra câncer vem do grego karkínos, que quer dizer caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 A.C. O câncer não é uma doença nova. O fato de ter sido detectado em múmias egípcias comprova que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo. Atualmente, segundo a OMS, o câncer é um termo genérico para um grupo grande de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo [22].

Todas as células humanas realizam certas funções; algumas mantêm a sobrevivência das células e outras ajudam a manter a sobrevivência do corpo. Em muitos casos, o número de organelas permite que as células difiram dramaticamente em termos de suas funções especializadas (figura 1) [23]. As células normais que formam os tecidos do corpo humano são capazes de se multiplicar por meio de um processo contínuo que é natural. A maioria das células normais cresce, multiplica-se e morre de maneira ordenada, porém, nem todas as células normais são iguais: algumas nunca se dividem, como os neurônios; as células do tecido epitelial – dividem-se de forma rápida e contínua. Dessa forma, a proliferação celular não implica necessariamente presença de malignidade, podendo simplesmente responder a necessidades específicas do corpo [24].

Figura 1: Célula humana generalizada mostrando as principais organelas.

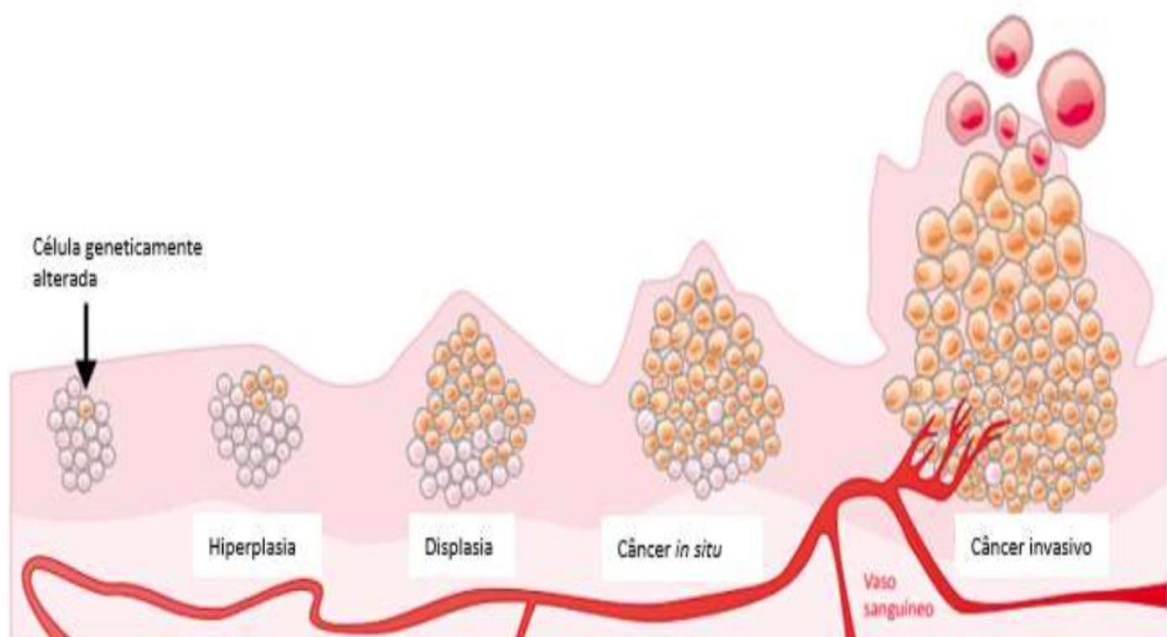


Fonte: [23].

O crescimento celular de tecidos normais pode ser controlado ou não, localizado ou autolimitado e haver pequenas alterações nas células normais.

Após cessado o estímulo o efeito é reversível [25]. A proliferação celular pode ser controlada ou não controlada. No crescimento controlado, tem-se um aumento localizado e autolimitado do número de células de tecidos normais que formam o organismo, causado por estímulos fisiológicos ou patológicos. Nele, as células são normais ou com pequenas alterações na sua forma e função, podendo ser iguais ou diferentes do tecido em que se instalam. O efeito é reversível após o término dos estímulos que o provocaram. A hiperplasia, a metaplasia e a displasia são exemplos desse tipo de crescimento celular. No crescimento não controlado, tem-se uma massa anormal de tecido, cujo desenvolvimento é quase autônomo, persistindo dessa maneira excessiva após o término dos estímulos que o provocaram (figura 2). As neoplasias (câncer *in situ* e câncer invasivo) correspondem a essa forma não controlada de crescimento celular e, na prática, são denominadas tumores [26].

Figura 2: Tipos de crescimento celular na proliferação do câncer.



Fonte: [22].

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que pode afetar diversas partes do corpo. Outros termos utilizados são tumores

malignos e neoplasias. Uma característica que define o câncer é a rápida criação de células anormais que crescem além de seus limites habituais e podem invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos, processo referido como metástase. A metástase é a principal causa de morte por câncer [27].

Sendo assim, dentre as doenças crônicas que mais acometem a população idosa, encontra-se o câncer, que corresponde a uma doença multifatorial caracterizada pelo crescimento descontrolado, rápido e invasivo de células com alterações em seu material genético. Sua incidência aumenta consideravelmente com a idade, possivelmente porque o avançar dos anos leva ao acúmulo de fatores de risco para diversos tipos de câncer associados a uma menor eficácia dos mecanismos de reparação celular que naturalmente acometem os idosos com o avançar da idade [28].

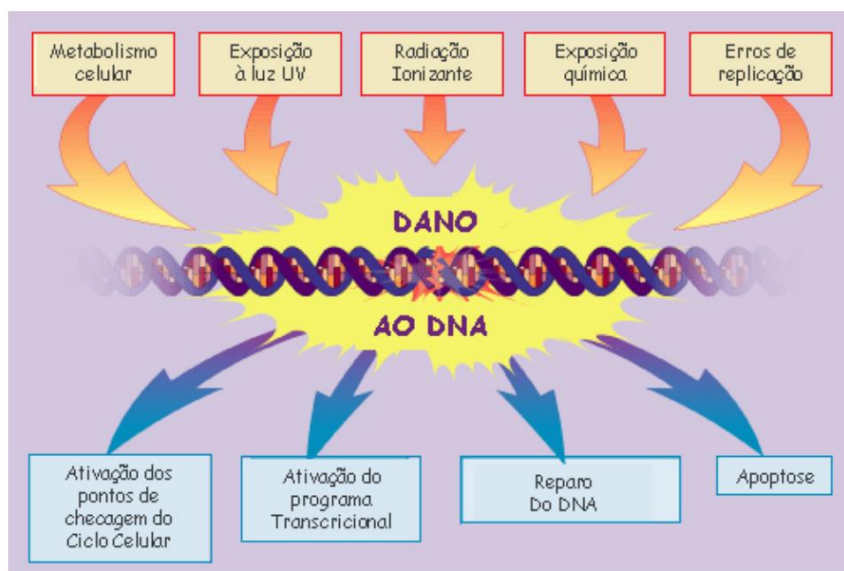
O ciclo celular é um conjunto ordenado de eventos, cujo objetivo final é o crescimento celular e sua divisão em duas células-filhas [29]. Dois eventos compõem o ciclo celular: a duplicação do DNA dentro do núcleo e a divisão (mitose) da célula em duas novas células com componentes de DNA idênticos. Os controles moleculares no núcleo determinam se a divisão celular deve prosseguir ou ser retardada. Uma das finalidades desse sistema de controle é evitar o acúmulo de erros genéticos durante a mitose. Os controles moleculares que regulam o ciclo celular incluem: um grupo de proteínas do ciclo celular chamadas ciclinas que atuam nos “pontos de verificação” que monitoram a atividade molecular entre cada estágio do ciclo celular, retardando a progressão se ocorrerem aberrações genéticas [30].

O ciclo celular apresenta-se em quatro fases: a fase G1 é onde ocorre aumento da célula e síntese de proteínas para preparação da replicação do DNA. A duplicação do DNA ocorre na fase S (síntese). A fase G2 compreende o período entre o final da fase S e a mitose, onde ocorre síntese protéica adicional estimulada pela atividade das ciclinas. Na fase M ou mitose propriamente dita, porções iguais de cromossomos e componentes celulares são divididos para as duas novas células filhas. Uma vez ocorrida a duplicação dos genes, a mitose ocorre automaticamente dentro de cerca de uma hora [29].

De fato, existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna, mas a maior parte deles interferem na divisão celular e, assim, o conhecimento do ciclo celular ou dos seus mecanismos é importante para que haja a compreensão da etiologia do câncer. Nas fases G1 e S existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular. Os fatores de crescimento, como os produtos de oncogenes, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação (“feedback”) são inibidores da multiplicação celular. Estes controles são, por exemplo, genes supressores tumorais, que detêm a replicação celular quando há dano no DNA, para que ele seja reparado (figura 3) [31].

O sistema de reparo é constituído por enzimas especializadas em reverter as mutações do DNA, seja por correção direta ou por excisão do pedaço errado na hélice e reconstrução. Essas enzimas podem variar ligeiramente em sua eficiência de pessoa para pessoa, pois é uma carga genética. Pessoas com um reparo melhor têm menos chance de desenvolver câncer. Esse é, portanto, o fator genético na tendência maior ou menor para o câncer [29].

Figura 3: Fatores que causam danos ao DNA e alternativas para evitar.



Fonte: [29].

Essas reações e eventos são interrompidos durante a transição das fases G1/S e G2/mitose. Nesses momentos críticos do ciclo celular conhecidas

como 'pontos de checagem' -, a célula continua o processo de divisão ou inicia o processo de morte celular por apoptose. Esse mecanismo de controle de falhas e acertos na síntese de uma nova célula é essencial. Portanto, qualquer defeito em um dos componentes ou operadores de um desses mecanismos provocará a proliferação contínua da célula [32].

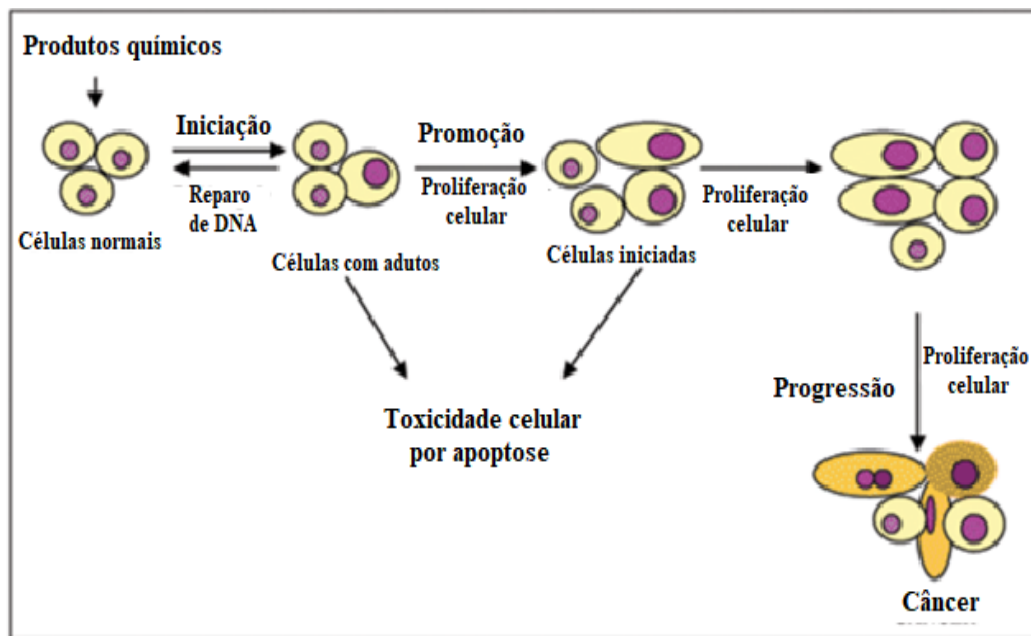
2.2. Carcinogênese

O processo de surgimento do câncer é denominado de oncogênese ou carcinogênese, dos quais início, promoção, progressão e inibição do tumor, têm como responsáveis os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos. Em geral, esse processo acontece lentamente podendo levar vários anos para que a mutação se prolifere e dê origem a um tumor visível [33]. A carcinogênese é determinada pela exposição a agentes, em uma dada frequência e período de tempo, e pela interação entre eles. Devem ser consideradas, no entanto, as características individuais, que facilitam ou dificultam a instalação do dano celular [22].

A carcinogênese compreende vários passos, os quais refletem as alterações genéticas que conduzem à transformação progressiva do tecido normal até o estado de maligno [34]. Sendo um processo altamente complexo do qual participam fatores de risco ambientais predisponentes intrínsecos (predisposição herdada), quanto extrínsecos (fatores de risco ambientais), tais como a alimentação, o hábito de fumar, a ocupação, e a exposição a radiação e a agentes químicos [35]. O processo de carcinogênese mamária é resultante de um processo sequencial progressivo. Esse processo apresenta, basicamente, três fases: iniciação, promoção e progressão. Estas acontecem de maneira lenta, de tal forma que quando o tumor se expressa clinicamente, a ativação inicial do processo já se deu há pelo menos algumas décadas [36]. A conversão neoplásica (iniciação) ocorre quando um evento genético (mutações, rearranjos cromossômicos, inserções ou deleções de genes e amplificação de genes) resulta em ativação de oncogenes e/ou em falta de expressão - ou inativação de produtos - de genes supressores de tumores. A promoção envolve a expansão clonal das células "iniciadas" e exige a proliferação celular [35].

Mudanças na estrutura do genoma ocorrem em todos os três estágios de desenvolvimento neoplásico. Mudanças na expressão gênica também ocorre durante a fase de promoção, com proliferação seletiva de células iniciadas e o desenvolvimento de células pré-neoplásicas. Durante a iniciação e promoção, a apoptose e a proliferação celular podem ocorrer em taxas diferentes, mantendo-se equilibradas. Durante a progressão, este equilíbrio é modificado e daí surge a malignidade (figura 4) [37].

Figura 4: Etapas da carcinogênese química.



Fonte: [37].

Com isso, a fase de iniciação sofre influência de fatores, chamados carcinogênicos, que irão atuar no material genético da célula, induzindo ao erro de replicação e ao dano celular. São considerados agentes carcinogênicos, ou seja, agentes que podem iniciar a carcinogênese: os erros de duplicação gênica, infecções por vírus, danos no DNA por agentes químicos ou radiações. Após o DNA das células sofrerem danos desses fatores carcinogênicos iniciadores, estas células passam a se multiplicar, sendo influenciadas por fatores estimulantes ou inibidores. Para o desenvolvimento de um tumor clinicamente identificado estas células danificadas foram estimuladas por agentes promotores, de forma lenta e

gradual. Entre os fatores promotores mais conhecidos estão os hormônios esteróides, que têm como função permitir o amadurecimento e a diferenciação dos ductos e lóbulos das mamas [36].

Existem dois períodos críticos para promoção do câncer de mama, chamados de janelas de risco. No momento do desenvolvimento mamário (existe um estímulo proliferativo desde a menarca até a primeira gestação a termo), ocorre a primeira janela. A segunda janela seria na involução mamária na perimenopausa, em que ocorre fisiologicamente a atrofia do tecido epitelial mamário. Acredita-se que um efeito hormonal não equilibrado possa comprometer o órgão estimulando atividade proliferativa e promovendo o crescimento tumoral. Além dos hormônios esteróides, são reconhecidos como fatores promotores os processos inflamatórios e os fatores de crescimento. Entre os fatores de crescimento estão o EGF (fator de crescimento epidérmico) e o TGF-alfa (fator de transformação do crescimento fibroblástico). Na fase da progressão ocorre a capacidade de invasão e de metastização. A invasão é a capacidade de um carcinoma in situ de se transformar em invasor, as células têm que atravessar a membrana basal e atingir os vasos linfáticos e sanguíneos. Para que os tumores possam progredir e metastizar, eles devem adquirir certos fenótipos que os permitam migrar para locais distantes. Isso inclui, entre outras coisas, maior mobilidade e invasividade [36].

2.3. Angiogênese

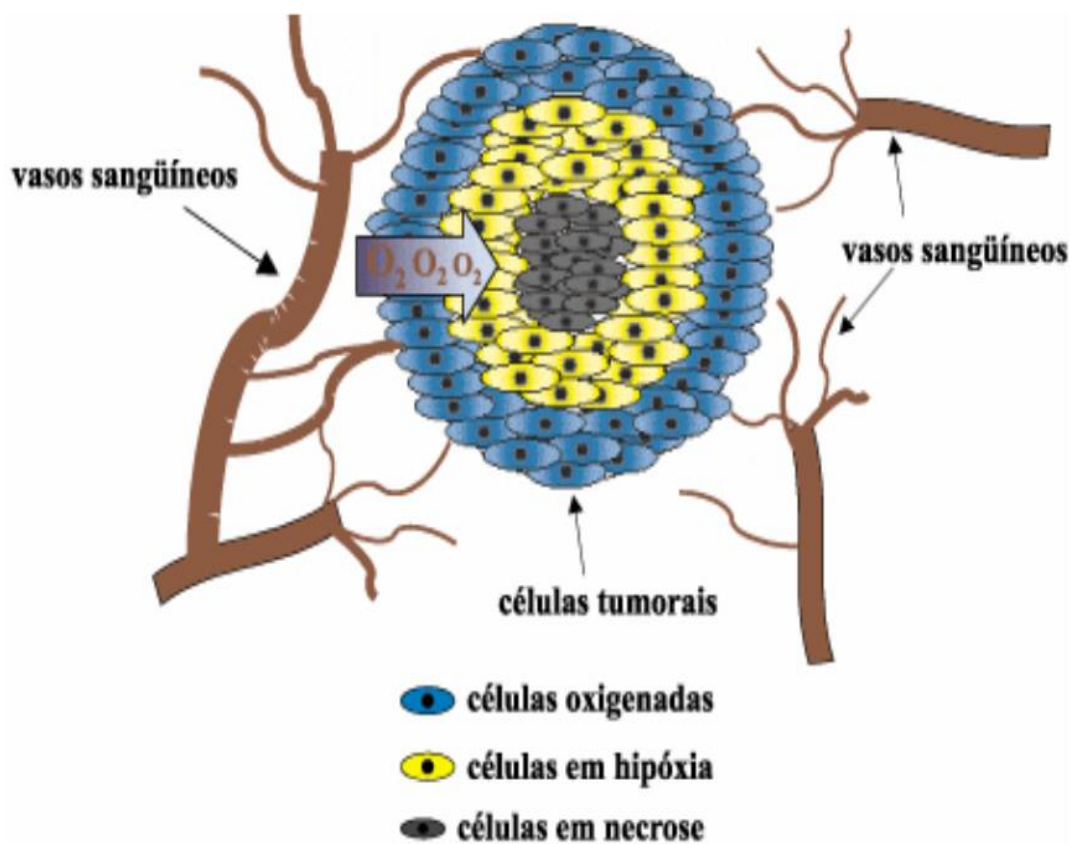
No século passado, descobriu-se que os tumores apresentam, bastante proeminentes em relação aos tecidos normais. A vascularização exacerbada demonstrou ser uma condição essencial para que ocorra o desenvolvimento neoplásico. Este fato se deve ao desenvolvimento de microvasos a partir de células endoteliais pertencentes a capilares situados próximos às células neoplásicas. A presença de um crescimento vascular aumentado em um tecido tumoral demonstra a existência de um forte estímulo para as células endoteliais, capaz de alterar seu estado proliferativo normal, bem como a natureza local deste estímulo, uma vez que tal proliferação irá ocorrer

apenas no segmento adjacente ao surgimento de um diminuto clone de células neoplásicas. crescimento vascular localizado denomina-se angiogênese. [38].

Estudos sugerem que a ativação angiogênica ocorre em etapas diferentes durante a progressão tumoral e em diferentes tipos de neoplasia. Contudo, uma vez que o tumor ultrapasse essa fase, novos vasos são formados continuamente. A hipóxia, em áreas necróticas do tumor, é o estímulo permanente para o crescimento de novos vasos que garante que as células tumorais recebam os nutrientes necessários para manter o crescimento e também possibilita a via de transporte das células tumorais para sítios distantes, onde podem formar metástases (figura 5) [38]. Ou seja, a angiogênese é um processo de múltiplos degraus que conduz a formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes e que participa em diversos processos fisiológicos e patológicos incluindo o crescimento tumoral e de metástases [39].

Nesse contexto, a ativação da angiogênese desempenha um papel crucial no crescimento tumoral e na disseminação de metástases [40]. Para que uma célula evolua de seu estado normal até assumir as características de uma célula neoplásica, é necessária a ocorrência de uma série de mutações, envolvendo genes que expressem proteínas cuja ação esteja relacionada ao controle do ciclo celular. Caso esta ação seja no sentido de estimular a divisão celular, estes genes são genericamente denominados como oncogenes e caso tenham por função inibi-la, serão considerados como genes supressores de tumor. Seja por função anormalmente exacerbada dos oncogenes ou por inibição dos supressores, o resultado será a obtenção de uma célula que apresentará um ganho proliferativo em relação às demais, tornando-se insensível aos estímulos apoptóticos. Entretanto, aparentemente isto não é suficiente para que esta célula dê origem a um tumor com volume detectável e capaz de ameaçar a vida do indivíduo. Para que um determinado grupo de células consiga manter um crescimento sustentado é necessário que exista uma fonte de suprimento sanguíneo específico e constante [41].

Figura 5: Demonstração da diminuição da concentração de oxigênio em função da distância capilar.



Fonte: [29].

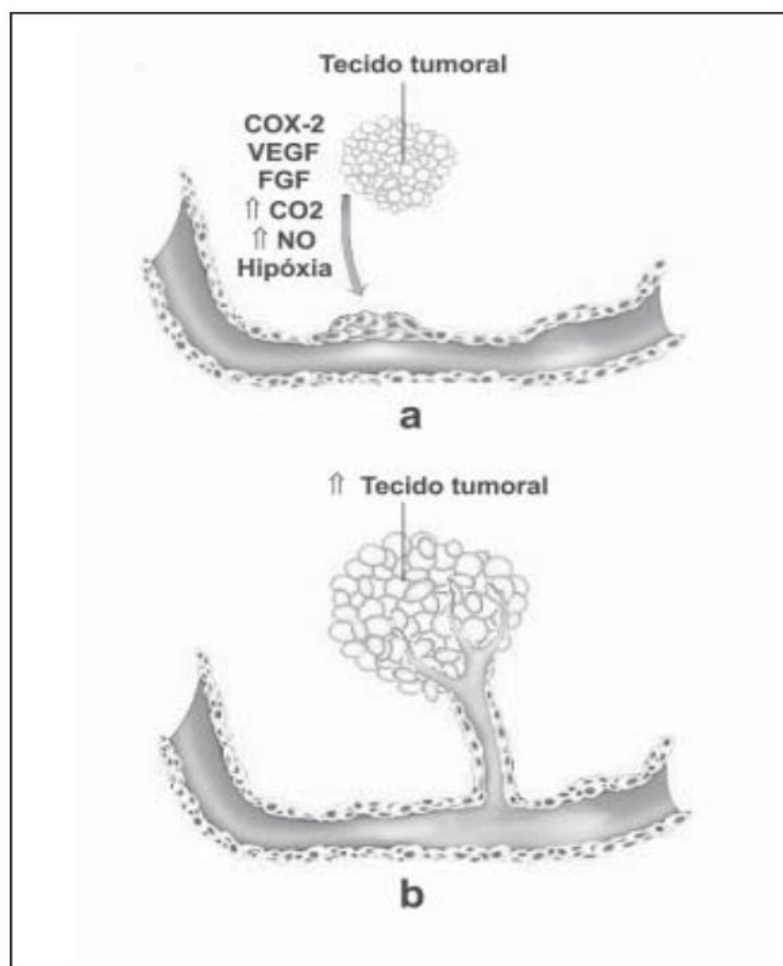
A formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, pode ocorrer tanto no período embrionário como durante a vida adulta, caracterizando-se como marcadora de vitalidade devida à essencialidade da circulação sanguínea para os órgãos e tecidos na obtenção de oxigênio, nutrientes, transporte de metabólitos, migração de células para diferentes áreas do corpo, entre muitas outras ações em que a vascularização se faz presente direta ou indiretamente.

A manutenção da circulação sanguínea em um tecido lesado é primordial para que o processo de reparo aconteça, seja naturalmente através da cicatrização, ou através de abordagens regenerativas. Conforme elucidado, a angiogênese, tanto no período embrionário como na fase adulta, não ocorre de forma rápida e frequente, mas sim diante de um estímulo como na cicatrização de feridas. O oposto ocorre durante o crescimento tumoral que acontece de forma

rápida e dependente de uma circulação sanguínea nova para suprir as demandas de oxigênio e favorecer a metástase, que ocorre através da formação de novos vasos sanguíneos através do processo conhecido como neoangiogênese [42].

A angiogênese tumoral é necessária para o crescimento de neoplasias e produção de metástases. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma glicoproteína homodimérica de ligação à heparina que se liga aos receptores de VEGF e pode induzir mitose de células endoteliais, invasão e, eventualmente, formação de tubo capilar (figura 6) [43].

Figura 6: Estímulos tumorais à angiogênese.



Fonte: [43].

2.4. Carcinogênese e o processo inflamatório

Um dos fatores que criam um ambiente favorável para a carcinogênese é o processo inflamatório [44]. Pesquisas revelaram uma importante associação entre inflamação e câncer, mostrando que inflamação crônica é um dos fatores epigenéticos que mais contribuem ao surgimento e à progressão do tumor [45]. A inflamação como fator promotor do câncer foi descrita pela primeira vez no século XIX, quando o patologista alemão Rudolf Carl Virchow (1821-1902) levantou a hipótese de que neoplasias malignas poderiam originar-se em locais de inflamação crônica, supondo que a inflamação aumentaria a proliferação celular, maximizando o risco do desenvolvimento de tumores [46]. Isso porque, os tumores foram observados surgindo em locais de inflamação crônica e descobriu-se que células inflamatórias estavam presentes em amostras biopsiadas de tumores. Células inflamatórias e seus mediadores (por exemplo, quimiocinas, citocinas, adipocinas e prostaglandinas) estão presentes no microambiente da maioria dos tumores [36].

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos tais como agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo e lesão térmica ou por agentes físicos. Cada tipo de estímulo provoca um padrão de resposta [29]. Sendo assim, o câncer possui a patogênese influenciada pela desregulação imunológica de citocinas e quimiocinas que desencadeiam uma inflamação crônica, resultando em lesão de órgãos e déficit na resposta às infecções [47].

A inflamação é um dos mais importantes processos em mediar angiogênese. Nesse sentido, citocinas inflamatórias/angiogênicas secretadas pelos leucócitos, como neutrófilos, mastócitos e macrófagos, exercem papel crucial na neo-angiogênese e remodelação vascular. Sinais inflamatórios regulam a expressão e secreção de vários agentes angiogênicos [29]. A COX-2 é uma das moléculas angiogênicas inflamatórias secretadas pelas células tumorais que influenciam o crescimento e desenvolvimento vascular do tumor e metástase. A atividade aumentada da COX-2 produz excessiva quantidade de prostaglandinas (PGs). As PGs contribuem para o crescimento do tumor por induzir a formação de

novos vasos sanguíneos que fornecem viabilidade celular e crescimento do tumor [29].

2.5. Mecanismos relacionados à inflamação

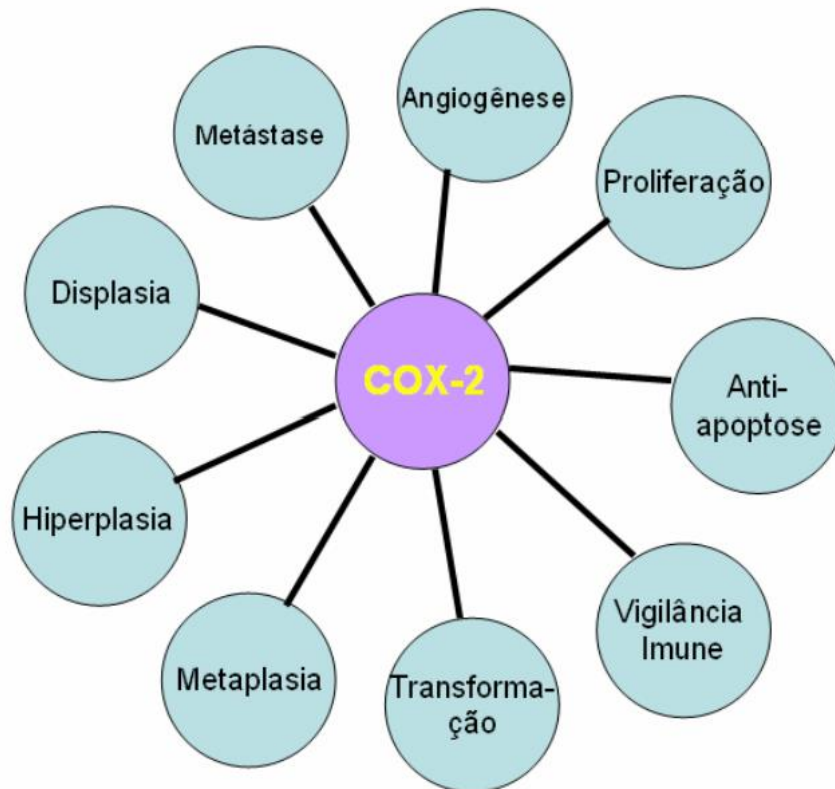
O conhecimento sobre a relação etipatogênica entre inflamação e câncer não é novo [46]. Diversos estudos têm apontado a relação entre o desenvolvimento de câncer e a superexpressão das enzimas formadoras de eicosanóides, tais como as ciclooxigenases (COX), presentes no processo inflamatório e em uma grande variedade de tumores em animais e em humanos [44].

A ciclooxigenase possui duas isoformas semelhantes em estrutura e peso molecular denominadas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2). A primeira é considerada constitutiva, pois é expressa na maioria dos tecidos constantemente e é essencial para a manutenção do estado fisiológico normal deles, incluindo a proteção da mucosa gastrointestinal; controle do fluxo sanguíneo renal; homeostasia; respostas autoimunes; funções pulmonares e do sistema nervoso central; cardiovasculares e reprodutivas. A segunda é considerada induzida, uma vez que o aumento da sua expressão está relacionado geralmente aos estímulos por endotoxinas como LPS (produzidos por bactérias), citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos e linfócitos, fatores de crescimento lesões celulares sejam elas químicas ou físicas [47].

Múltiplas linhas de evidências convincentes sustentam que a COX-2 desempenha um papel crucial na carcinogênese [48]. A COX-2 é uma das moléculas angiogênicas inflamatórias secretadas pelas células tumorais que influenciam o crescimento e desenvolvimento vascular do tumor e metástase (figura 7). A atividade aumentada de COX-2 produz excessiva quantidade de prostaglandinas (PGs). As PGs contribuem para o crescimento do tumor por induzir a formação de novos vasos sanguíneos que fornecem a viabilidade celular e crescimento do tumor. A indução de COX-2 foi relatada em numerosos tumores sólidos (cólon, próstata, pulmão, mama, pâncreas, pele, cabeça e pescoço), mas não em tecidos normais correspondentes. A COX-2 foi detectada em células

tumorais, vascularização tumoral e em capilares adjacentes pré-existent. Enquanto os vasos normais expressam a enzima COX-1, as novas células angiogênicas endoteliais expressam a COX-2 [29].

Figura 7: Representação esquemática dos papéis da COX-2 na carcinogênese.

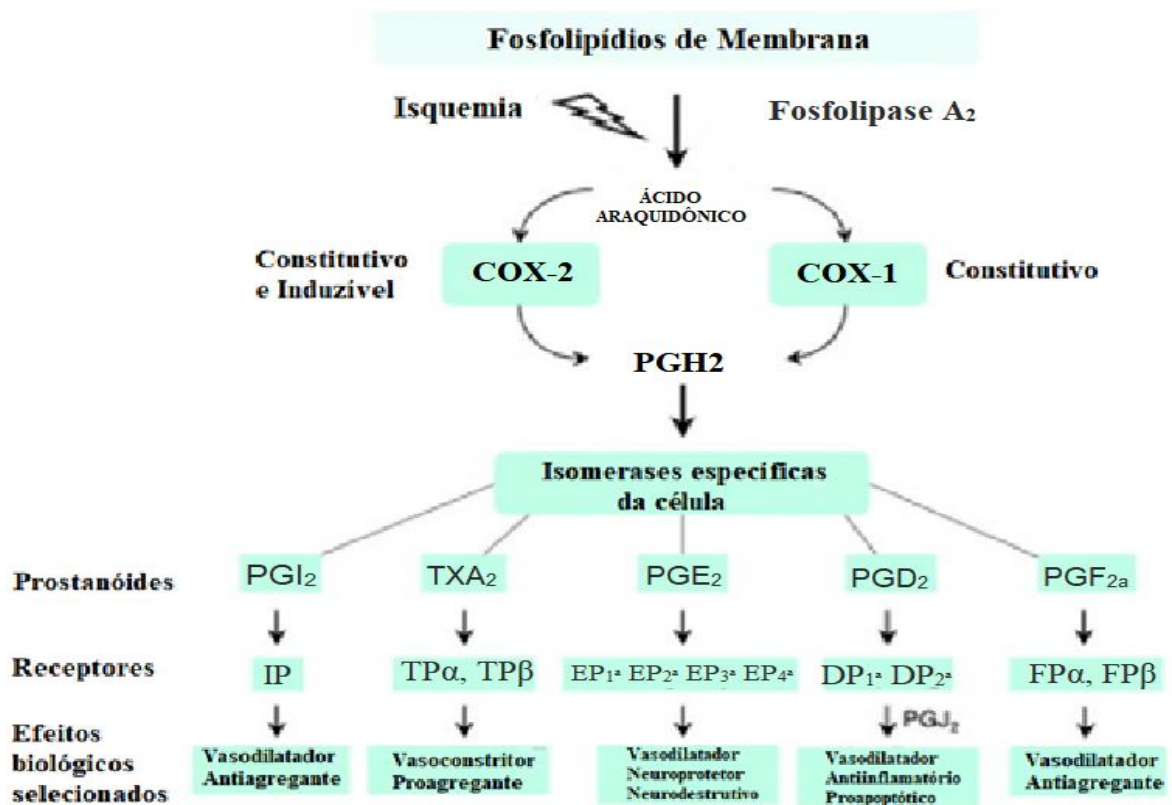


Fonte: [48].

As enzimas COX catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H₂ (PGH₂). O ácido araquidônico, produzido pela degradação dos fosfolipídios da membrana, é metabolizado pela COX em PGH₂ em uma reação de 2 etapas na qual o radical superóxido também é produzido. A COX-2 é expressa constitutivamente em alguns órgãos, como o cérebro, mas é acentuadamente regulada por uma ampla variedade de estímulos, principalmente mediadores inflamatórios. O produto da reação COX PGH₂ é convertido em 5 prostanóides diferentes por um número correspondente de isomerasas, cuja distribuição é específica para células e órgãos. Assim, a PGH₂ pode dar origem a

diferentes prostanóides dependendo das isomerases disponíveis para metabolizá-la. Para aumentar ainda mais a complexidade do sistema COX está o fato de que cada prostanóide atua em múltiplos receptores com diversos perfis de sinalização e muitas vezes em ações biológicas opostas (figura 8) [49].

Figura 8: Conversão do ácido araquidônico em prostaglandina.



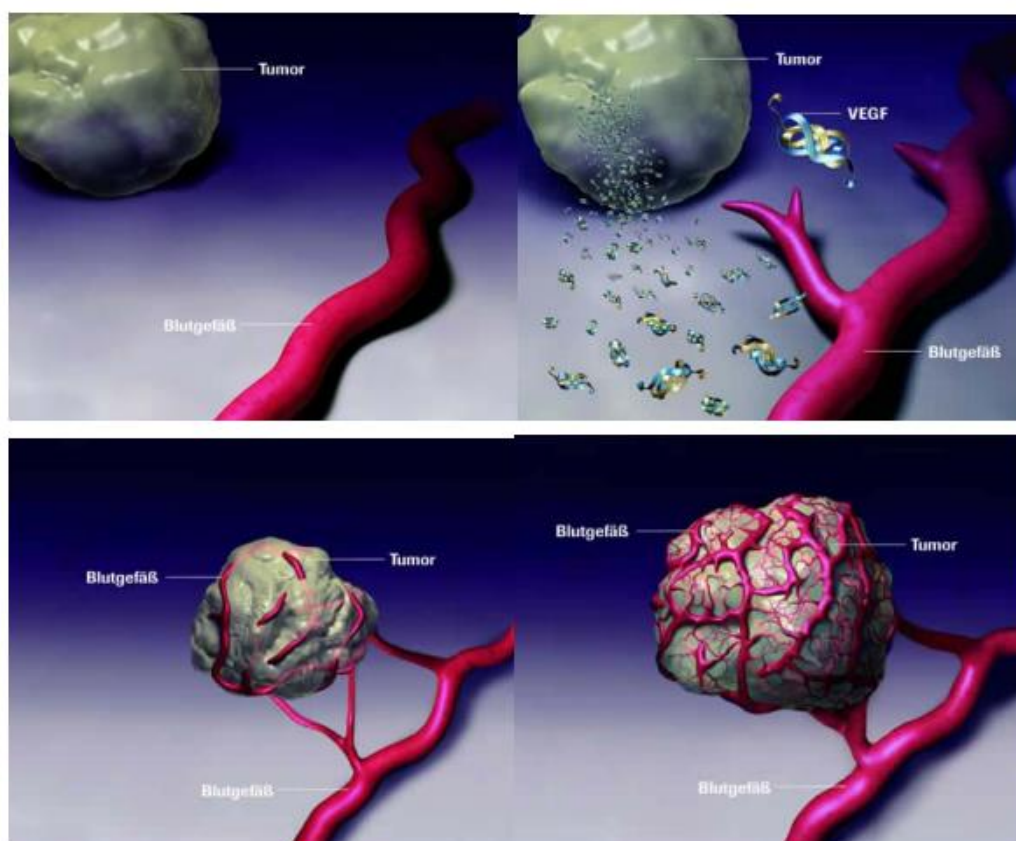
Fonte: [49].

A potência dos inibidores de COX-2 *in vivo* pode ser atribuída à inibição da enzima no tumor, bem como nas células estromais, resultando em ações antiproliferativas e pró-apoptóticas dentro do tumor, ações antiangiogênicas e pró-imunes e atividades de vigilância em células endoteliais e mieloides. A combinação de inibidor de COX-2 com quimioterapêutico e/ou radiação de câncer padrão pode fornecer paradigmas terapêuticos adicionais no tratamento de vários cânceres humanos [49]. Com isso, a inibição de COX-2 tem se tornado um campo de especial interesse na prevenção e regressão de tumores em

desenvolvimento. A vascularidade tumoral é um forte indicador de sua agressividade biológica, especialmente em câncer de mama, e está significativamente correlacionada com o grau clínico e histológico do carcinoma. O uso de inibidores de angiogênese é apropriado no início dos estágios da doença, especialmente em pacientes com prognóstico pobre, melhorando a sobrevivência e a qualidade de vida [41].

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) podem atingir diferentes graus de inibição da COX-1 e COX-2 [50]. Sendo assim, a COX-2 pode ser uma importante ligação regulatória entre a progressão do tumor e os fatores tumorigênicos sendo a inibição terapêutica da angiogênese para o controle e prevenção do câncer alvo de intensa pesquisa (figura 9) [29].

Figura 9: Progressão angiogênese e crescimento tumoral.



Fonte: [29].

2.6. Via de Sinalização

Na sinalização celular, as células se comunicam através de moléculas-sinal, secretadas ou expostas em sua superfície. As moléculas-sinal são reconhecidas por receptores, geralmente proteínas que podem estar expostas na superfície celular ou presentes no interior das células. Esses receptores, após se ligarem às moléculas-sinal, transmitem a informação para outras proteínas presentes no interior da célula, mecanismo conhecido como transdução de sinal. Esse mecanismo pode desencadear diferentes respostas, como alteração da função de uma proteína (resposta rápida e passageira) ou modificação de expressão gênica, levando a uma alteração na quantidade de proteína dentro da célula (resposta lenta e mais prolongada). Essas modificações levam a alterações no comportamento da célula, visto que as proteínas são as responsáveis por dirigir as funções celulares [51].

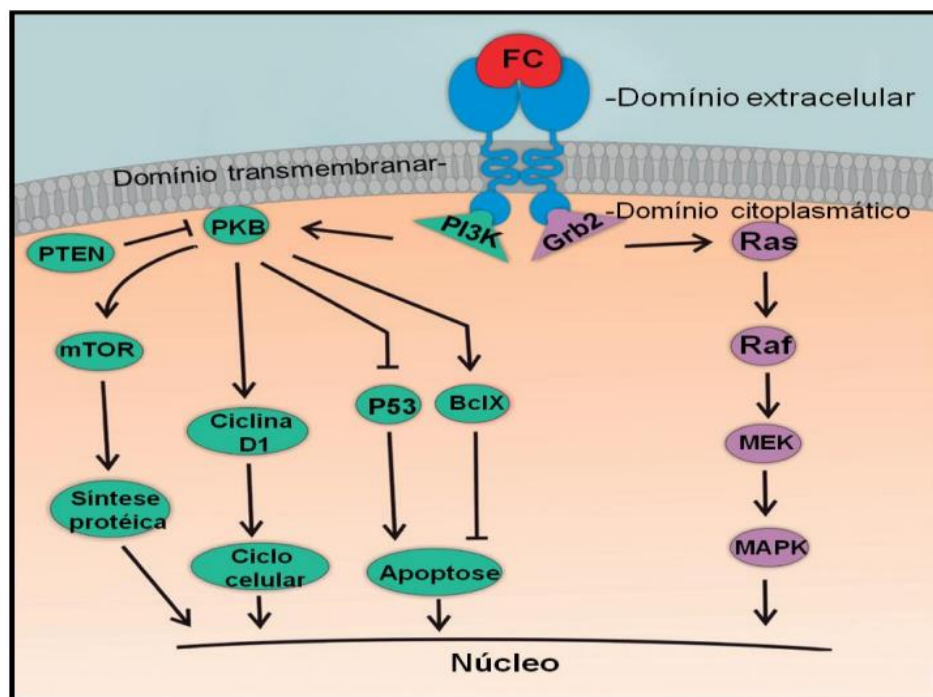
A maior parte das proteínas que participam das vias de sinalização são enzimas, biocatalizadores que atuam na aceleração das reações bioquímicas que ocorrem dentro da célula. Dentre elas encontram-se as quinases, que constituem uma das principais famílias de proteínas em mamíferos. Elas são enzimas que catalisam a transferência de grupos fosfatos de moléculas do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) para outras moléculas orgânicas, como lipídeos e proteínas [51].

Importantes vias de sinalização dos fatores de crescimento envolvidos na divisão celular, crescimento, metabolismo, sobrevivência são a via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase b (PI3K/PKB) e a via Ras/Raf/MEK/MAPK. Estas interagem entre si fisiologicamente, porém quando um ou mais componentes estão mutados ou superexpressos são capazes de iniciar diversos cânceres descritos em humanos [52].

A PI3K é uma quinases regulada por sinal extracelular que atua na fosforilação do fosfolipídio fosfatidilinositol presente nas membranas celulares. Outras proteínas com grande participação em vias de sinalização são as que compreendem a família das GTPases, enzimas que quando ativas atuam na hidrólise da molécula do nucleotídeo guanosina trifosfato (GTP), gerando como produto guanosina difosfato (GDP) e fosfato inorgânico. Alguns exemplos são a

Ras que atua na ativação de várias vias de sinalização, como aquelas relacionadas às proteínas ERK1/2 e PI3K; e a Rho, relacionada com a ativação de moléculas efetoras como a Rho quinase (ROCK, Rho Kinase). A desregulação das vias de sinalização celular, causada geralmente por aumento/diminuição da atividade ou expressão de seus constituintes proteicos, pode levar ao descontrole de eventos fisiológicos e desencadear variados tipos de doenças, incluindo o câncer [51]. No citoplasma, a fosforilação desencadeia uma cascata de reações que podem resultar em respostas celulares diferentes e, sequencialmente, promovem a transdução do sinal (figura 10) [52].

Figura 10: Esquema da ativação da cascata de sinalização.



Fonte: [52].

Além disso, os receptores tirosina quinases (RTQ) têm gerado grande interesse na oncologia. A descoberta da ativação de receptores celulares e seus ligantes, responsáveis pelos mecanismos envolvidos na transdução de sinais por essa desencadeados em células tumorais, tornou possível a identificação, mensuração e posterior validação para a tentativa de novos alvos terapêuticos

contra o câncer, levando ao desenvolvimento de novas classes de drogas, comumente conhecidas como terapias alvo. A família RTQ inclui, entre outros, o EGFR, os receptores do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR), os receptores do fator de crescimento dos fibroblastos (FGFR), os receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o receptor de insulina (IGFR). Devido ao seu papel no crescimento, diferenciação, metabolismo e comunicação celular, muitos RTQ foram associados ao início ou progressão de vários tipos de câncer, seja através de mutações com ganho de função do receptor ou através da sua superexpressão [52].

No câncer, as alterações nos Fatores de Crescimento, seus receptores ou ainda nas vias de transdução de sinais por esses desencadeadas, podem estar presentes em várias características associadas à malignidade, entre as quais a independência na produção de FC, a insensibilidade aos genes supressores tumorais e consequente resistência à apoptose, indução à angiogênese, ativação da invasão e formação de metástase. potencial de replicação ilimitado, instabilidade genômica e mutação, além da desregulação energética celular [52].

Sendo assim, a melhor compreensão da biologia molecular do câncer permitiu um progresso notável no manejo clínico dessa doença. Isso é resultado do crescente conhecimento sobre as estruturas moleculares e vias de sinalização de receptores de tirosina-quinase, o que levou ao desenvolvimento de diversas terapias alvo, incluindo os inibidores de tirosina-quinase (TKIs) [53].

2.7. Processo de apoptose

As células do organismo fazem parte de sistema altamente organizado. O número de células é regulado pelo controle da taxa de divisão celular e pelo controle da taxa de morte celular [54]. Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência. Alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na tumorigênese [55].

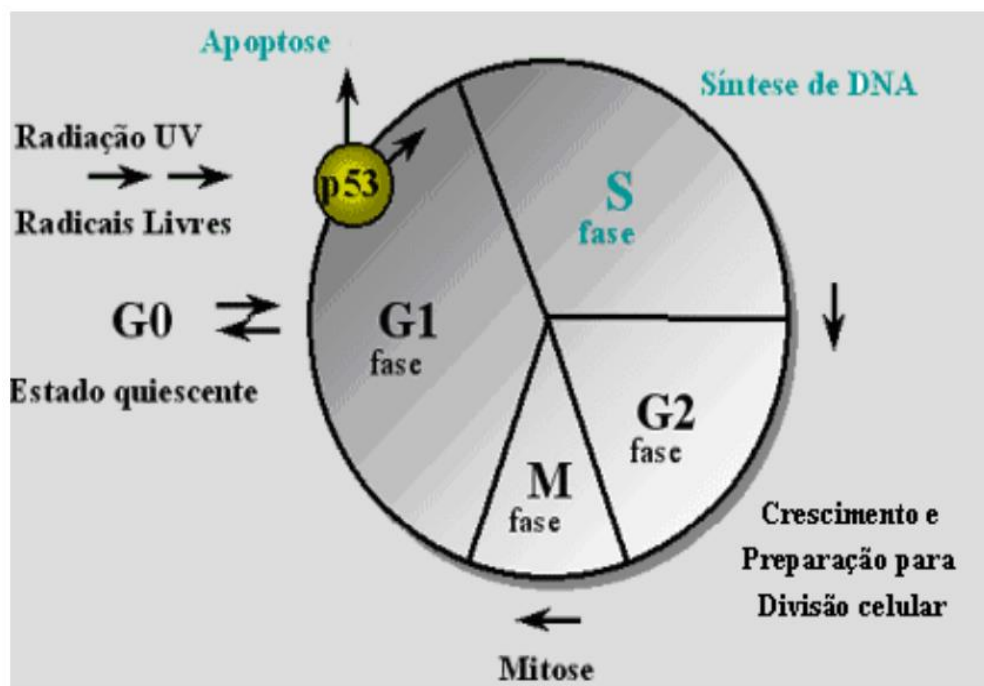
A autofagia é uma importante via de degradação de macromoléculas intracelulares em células animais. Descrita como um mecanismo importante para manutenção da homeostase celular. Ela consiste em um processo fisiológico natural que possui importância fundamental para a renovação celular e aquisição de energia em condições de estresse. A degradação de proteínas e organelas celulares é um processo conservado evolutivamente e ocorre pela integração da via autofágica com lisossomos [56]. A autofagia também pode ser estimulada em resposta a diferentes situações de estresse, como alteração no volume celular, estresse oxidativo, sinalização hormonal, irradiação, entre outros [57].

A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem uma agressão que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local. A mitose catastrófica envolve uma mitose aberrante, resultando em uma segregação cromossômica errônea. Geralmente, não é considerada uma forma de morte, mas sim uma sinalização irreversível para a morte. A senescência é um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento. Ocorre por meio de uma programação genética que envolve deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores tumorais. As células que entram em senescência perdem a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares [55].

Uma característica importante das células senescentes, refere-se ao fato de que geralmente, à perda da habilidade das células de se proliferarem, está associada ao bloqueio do ciclo celular, bem como as alterações na expressão de proteínas chave que atuam no controle da progressão do mesmo. Assim, proteínas que atuam na regulação do ciclo celular, também estão envolvidas no controle do processo de senescência. Nesse sentido, duas proteínas-chave (que também se tratam de supressores tumorais) regulam este processo: p53 e pRb. Estas duas vias de sinalização interagem entre si, em diversos pontos, e cooperam para controlar a transcrição de inúmeros genes necessários para indução da senescência celular [58].

A via do p53 é acionada quando ocorre dano ao DNA, o qual pode ser decorrente do encurtamento/disfunção de telômeros ou da ação direta de outros agentes como, por exemplos, EROs e quimioterápicos. A indução de dano ao DNA leva a ativação das quinases ATM/ATR e CHK1/2, culminando então, na fosforilação e ativação de p53 (figura 11). Uma vez ativada, p53 exerce sua função transcripcional e induz a expressão de p21. Este último trata-se de um inibidor de quinase dependente de ciclina, que bloqueia a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S ao inibir principalmente, a formação do complexo ciclina E-quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), prevenindo a fosforilação de pRb, a ativação do fator de transcrição E2F e a passagem para a fase S do ciclo celular [58].

Figura 11: Influência do p53 no ciclo celular.



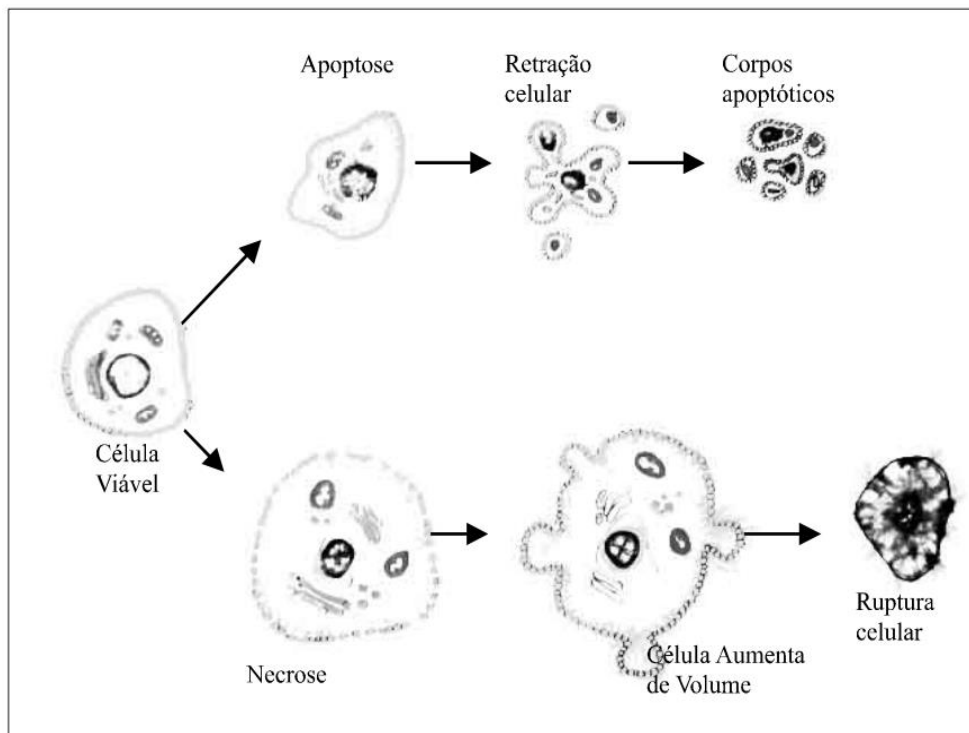
Fonte: [29].

O p53 é um gene supressor que inibe o desenvolvimento de células cancerosas, bloqueando a habilidade de ciclinas estimularem a divisão celular. Ele é capaz de detectar mutações irreparáveis e guiar a célula para apoptose. Quando o gene p53 está mutado, sua efetividade como gene supressor de tumor

é diminuída e o câncer se desenvolve. Genes p53 mutados são encontrados em aproximadamente 50% dos cânceres e a disfunção da proteína p53 contribui para a tumorigênese e a agressividade do tumor. Outro gene supressor de tumor é BRCA1 (encontrado em câncer familiar de mama e ovário) [29].

Já a apoptose, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (figura 12). Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. Esse fenômeno biológico, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado a inúmeras doenças, como o câncer [55].

Figura 12: Características morfológicas do processo de apoptose e da necrose



Fonte: [55].

Constata-se que a apoptose e os genes que a controlam têm um efeito profundo no fenótipo maligno. Como por exemplo, algumas mutações oncogênicas interrompem a apoptose, levando à iniciação, progressão ou metástase do tumor. Por outro lado, evidências convincentes indicam que outras alterações oncogênicas promovem a apoptose, produzindo assim pressão seletiva para anular a apoptose durante a carcinogênese em vários estágios. A maioria dos agentes anticancerígenos citotóxicos induz a apoptose, levantando a intrigante possibilidade de que defeitos nos programas apoptóticos contribuam para o fracasso do tratamento. Como as mesmas mutações que suprimem a apoptose durante o desenvolvimento do tumor também reduzem a sensibilidade do tratamento, a apoptose fornece uma estrutura conceitual para vincular a genética do câncer à terapia do câncer [50].

A apoptose representa um mecanismo fisiológico conservado de morte celular programada, que é essencial ao normal desenvolvimento e à homeostasia dos tecidos em todos os organismos [60]. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, em resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos [55]. A lesão celular ocorre quando as células são submetidas a um estresse tão severo que não são mais capazes de se adaptar ou quando são expostas a agentes perniciosos. Células que sofreram lesões irreversíveis sofrem alterações morfológicas que são reconhecidas como morte celular [61].

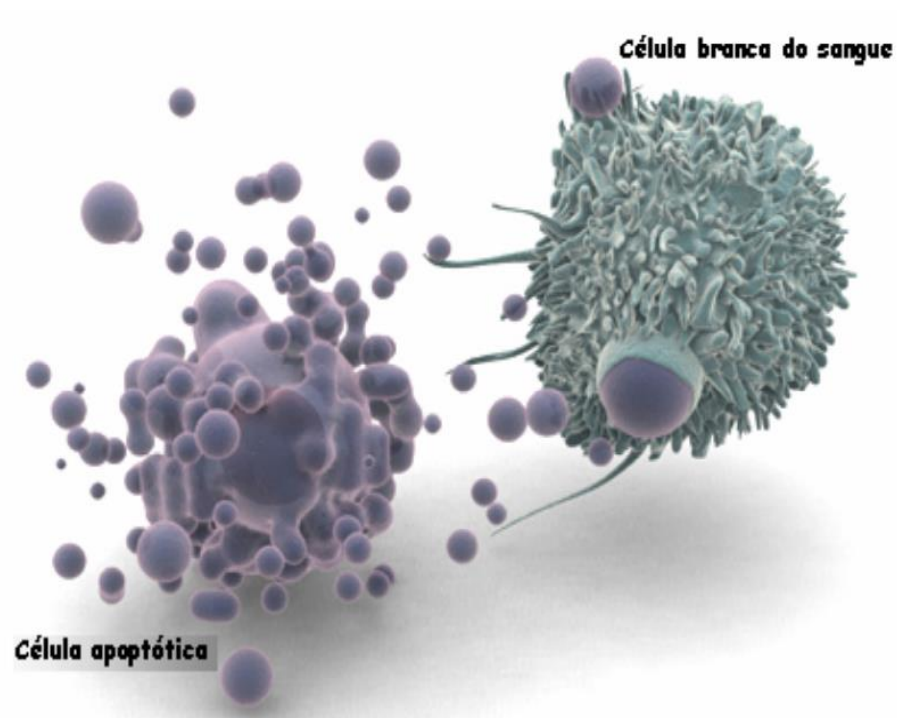
Enquanto a necrose é sempre um processo patológico, a apoptose ocorre em várias funções normais e não necessariamente associada somente a lesão celular. Alguns estímulos podem induzir tanto a necrose como a apoptose, dependendo da intensidade e duração do estímulo, da rapidez do processo de morte celular e das alterações bioquímicas induzidas na célula danificada. As causas das lesões celulares variam desde causas externas, como acidentes, a causas endógenas, tais como mutações genéticas e hipóxia [61].

De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana

externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (blebs) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e se rompem, liberando as estruturas do conteúdo celular.

Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas de corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (figura 13). Outra característica marcante da apoptose é a fragmentação do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos múltiplo de 200 pares de base [55, 62].

Figura 13: Corpúsculos apoptóticos sendo fagocitados por uma célula branca do sangue.



Fonte: [29].

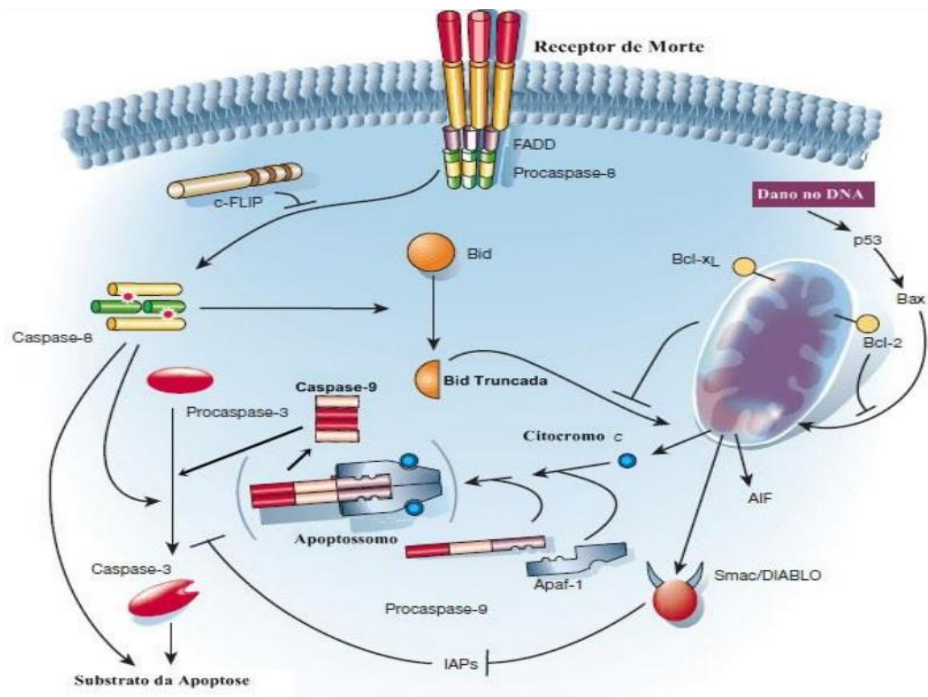
Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (figura 14) [55].

A via extrínseca de apoptose é induzida por um sinal originado fora da célula, sendo esse um ligante específico que interage com receptores de membrana, pertencentes à família dos receptores de morte (DR- Death Receptors) da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNF), entre eles o Fas/CD95, Apo1, TNFR1, TNFR2, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/TRAILR1, DR5/TRAILR2/TRICK2/Killer e DR6. Esses receptores de morte celular são caracterizados pela presença de repetições ricas em cisteínas na sua porção extracelular e um domínio de morte na porção citoplasmática, que modula as interações proteína-proteína. A ativação desses receptores induz a formação de um complexo de sinalização indutor de morte, conhecido como DISC (Death-Inducing Signalling Complex), contendo diversas moléculas adaptadoras. Todo esse complexo recruta e promove a clivagem e ativação de pró-caspases iniciadoras -8 ou -10, que por sua vez irão igualmente ativar caspases efetoras da apoptose [63].

A apoptose intrínseca pode ser dividida em duas diferentes definições, sendo uma a apoptose intrínseca dependente da ativação das caspases, e outra independente da ativação enzimática [64]. A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes, tais como radiação ultra violeta, esteroides, quimioterápicos, drogas ou ausência de fatores de crescimento. Esses fatores induzem ao aumento da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, permitindo a passagem de citocromo c, SMAC/diablo e AIF para o citoplasma da célula, além de outros processos, como a interrupção do transporte de elétrons, da fosforilação oxidativa e da produção de ATP e alteração do potencial de redução e oxidação [55,63].

O citocromo c livre no citoplasma irá induzir a formação de um complexo proteico, formado por citocromo c, pró-caspase-9, Apaf-1 (Fator-1 de ativação da protease apoptótica) e ATP, chamado apoptossomo. O apoptossomo por sua vez irá reconhecer e ativar pró-caspases-9, que então irão ativar caspases efetoras que desencadeiam a apoptose. As proteínas AIFs que também são liberadas pela mitocôndria, quando livres no citoplasma são translocadas para o núcleo, onde participarão ativamente da fragmentação do DNA e condensação da cromatina. Ou seja, os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria [55,63].

Figura 14: Vias de ativação para apoptose (extrínseca e intrínseca).



Fonte: [63].

Sabe-se que a expressão aumentada de algumas proteínas contribui para a tumorigênese, induzindo células a proliferar e resistir à apoptose [52]. Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, todos os tumores malignos adquiriram a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um

descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Portanto, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos. De fato, a análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral. Entre estes, a resistência à morte por apoptose em células que escaparam do controle do crescimento e da diferenciação normais exercidos por fatores solúveis ou por contatos célula-célula ou célula-matriz extracelular até aquela induzida por lesões no DNA, por hipóxia ou por espécies reativas do oxigênio [55].

2.8. Anatomia da mama

As mamas são órgãos pares, situadas na parede anterior do tórax, sobre os músculos denominados Grande Peitoral [65]. Essas são estruturas glandulares pares situadas na parede anterior e superior do tórax, derivam de glândulas sudoríparas modificadas (sem cápsula nem bainha especial) [66].

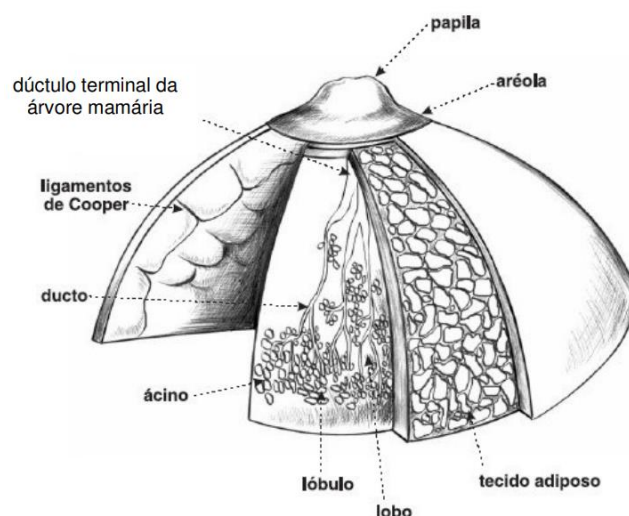
As mamas são estruturas anexas à pele especializadas na produção de leite. Existem em ambos os sexos, mas são rudimentares nos homens. Nas mulheres desenvolvem-se e diferenciam-se na puberdade, atingindo o seu maior desenvolvimento na gravidez e na lactação. Composto pelas células produtoras de leite, 63% do total, o tecido glandular está na sua maioria localizado acerca de 3 cm da base do mamilo. O tecido adiposo distribui-se imediatamente abaixo da pele (tecido adiposo subcutâneo), no interior da glândula mamária (intra-glandular) e atrás do tecido glandular (retro-mamário) à frente do músculo peitoral. O tecido subcutâneo na base do mamilo é mínimo [67, 68].

Situadas entre as camadas superficial e profunda da pele, as mamas estendem-se entre a segunda e a sexta costelas e do esterno à linha axilar média. Quanto à sua forma podem ser hemisféricas, cônicas, piriformes, cilíndricas ou discóides. São ligeiramente assimétricas e estão separadas pelo sulco inter-mamário e limitadas inferiormente pelo sulco inframa-mamário (que, de acordo

com a idade ou estado funcional, pode apresentar-se mais ou menos profundo). Os ácinos ou alvéolos mamários, unidades ultraestruturais da glândula mamária, são constituídos por células secretoras rodeadas por tecido mioepitelial. Estão organizados em 12 a 20 lobos, que se dividem e estão separados por septos fibrosos (ligamentos de Cooper) que se estendem da faixa profunda à pele [67, 68].

Cada lobo é drenado por um canal excretor próprio, o canal lactífero, que é sinuoso e independente, conduz todos para a base da papila. Contudo, antes de atingir a base da papila, o canal lactífero apresenta uma dilatação fusiforme, que é conhecido como seio lactífero (*sinus lactiferi*). O tecido conjuntivo interlobular contém depósitos de adipócitos. Cada um dos seus ductos excretores termina de forma independente no mamilo. Por serem revestidos por uma camada de células mioepiteliais, os ductos são igualmente sensíveis à ação da oxitocina, reagindo com movimentos peristálticos que contribuem na ejeção do leite. O mamilo ou papila mamária é constituído por fibras musculares lisas, é proeminente, cilíndrico e circundado por uma zona mais escura de tamanho variável e pele pigmentada, chamada aréola. Contém também fibras musculares involuntárias, cuja contração (por ação da oxitocina) provoca a ereção do mamilo (figura 15) [67, 68].

Figura 15: Anatomia Mamária.



Fonte: [65].

2.9. Carcinoma de mama

O câncer consiste em uma enfermidade crônica, caracterizada pelo crescimento desordenado das células, o qual é resultante de alterações no código genético [69]. De 5% a 10% das neoplasias são resultados diretos da herança de genes relacionados ao câncer e grande parte dos casos envolve danos ao material genético, de origem física, química ou biológica que se acumulam ao longo da vida. O desenvolvimento das várias formas mais comuns de câncer resulta de uma interação entre fatores endógenos e exógenos, sendo o mais notável desses fatores a dieta e o estilo de vida. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a principal causa de óbitos no mundo, atingindo cerca de seis milhões de pessoas, representando 12% dos casos das mortes anualmente [70].

O câncer de mama, é uma doença heterogênea, que engloba tumores biologicamente diferentes, com variadas manifestações clínicas e morfológicas [71]. O câncer de mama de caráter hereditário (predisposição genética) corresponde a cerca de 5-10% do total de casos. Já em relação aos fatores idade e endócrinos, o aumento do risco está associado à história de menarca precoce (primeira menstruação antes dos 12 anos), menopausa tardia (após os 50 anos), primeira gestação após os 30 anos, nuliparidade e terapia de reposição hormonal pós-menopausa, principalmente se prolongada por mais de cinco anos [72,73].

Existem diversos tipos de carcinoma mamário, com variadas manifestações clínicas e morfológicas. Não é possível falar na evolução do câncer de mama de forma genérica. Há subtipos mais agressivos, que evoluem rápido para metástases em órgãos vizinhos ou distantes, como ossos, fígado, pulmão e cérebro, enquanto a maioria dos tumores tem características de menor agressividade e melhor prognóstico. O câncer de mama desenvolve-se, mais comumente, nos ductos mamários (carcinoma ductal), mas pode também ter origem nos lobos mamários (carcinoma lobular). Pode se apresentar como tumor in situ, quando ainda não ultrapassou a membrana basal do tecido epitelial, ou invasivo, quando rompeu essa membrana, mesmo que ainda restrito à mama [71].

O carcinoma ductal infiltrante é o tipo histológico mais comum e representa cerca de 80% do total de casos. É importante ressaltar que, mesmo

dentro desse subtipo histológico, há heterogeneidade no comportamento biológico do tumor, dependendo de diversos fatores prognósticos conhecidos ou não [69]. Por outro lado, o diagnóstico precoce é importante para se obter maior sobrevida para os pacientes, possibilitando também tratamentos menos agressivos [74].

De acordo com o Banco de Dados de Vigilância Epidemiológica do Instituto Nacional de Câncer dos EUA, 43% dos homens e 38% das mulheres desenvolverão um câncer invasivo ao longo da vida [75]. O envelhecimento é um processo multifatorial e atualmente, é o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer. Indivíduos com 65 anos ou mais têm um aumento de 11 vezes na incidência de câncer, e 16 vezes na mortalidade, quando comparados com aqueles com idade inferior [76].

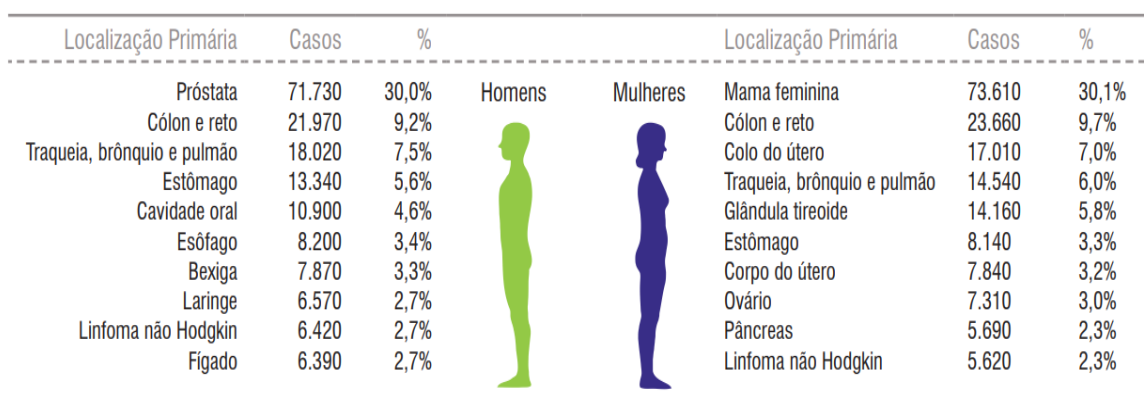
Estudos demonstraram que para os próximos anos, surgirão 704 mil casos novos de câncer no Brasil para cada ano do triênio 2023-2025, sendo 74 mil casos novos previstos por ano até 2025 para câncer de mama. Dados do INCA, demonstram (quadro 1), que o câncer de mama é o segundo tumor maligno mais incidente entre todos os tipos de câncer, afetando principalmente mulheres [77].

Quadro 1: Estimativas de novos casos de Câncer no Brasil para 2023.

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS								
	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada	Casos	Taxa bruta	Taxa ajustada
Mama feminina	-	-	-	73.610	66,54	41,89	73.610	66,54	41,89
Próstata	71.730	67,86	55,49	-	-	-	71.730	67,86	55,49
Cólon e reto	21.970	20,78	12,43	23.660	21,41	11,06	45.630	21,10	11,43
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	17,06	12,73	14.540	13,15	9,26	32.560	15,06	10,52
Estômago	13.340	12,63	9,51	8.140	7,36	4,92	21.480	9,94	7,08
Colo do útero	-	-	-	17.010	15,38	13,25	17.010	15,38	13,25
Glândula tireoide	2.500	2,33	1,84	14.160	12,79	6,68	16.660	7,68	4,83
Cavidade oral	10.900	10,30	7,64	4.200	3,83	2,61	15.100	6,99	4,95
Linfoma não Hodgkin	6.420	6,08	4,55	5.620	5,08	3,00	12.040	5,57	3,79
Leucemias	6.250	5,90	4,75	5.290	4,78	3,95	11.540	5,33	4,43
Sistema nervoso central	6.110	5,80	4,56	5.380	4,85	3,80	11.490	5,31	4,33
Bexiga	7.870	7,45	3,96	3.500	3,14	1,58	11.370	5,25	2,75
Esôfago	8.200	7,76	5,46	2.790	2,49	1,43	10.990	5,07	3,38
Pâncreas	5.290	5,00	3,74	5.690	5,15	3,22	10.980	5,07	3,31
Fígado	6.390	6,06	5,18	4.310	3,89	3,14	10.700	4,95	4,29
Pele melanoma	4.640	4,37	2,24	4.340	3,90	1,56	8.980	4,13	1,88
Corpo do útero	-	-	-	7.840	7,08	4,13	7.840	7,08	4,13
Laringe	6.570	6,21	5,07	1.220	1,09	0,72	7.790	3,59	2,68
Ovário	-	-	-	7.310	6,62	5,01	7.310	6,62	5,01
Linfoma de Hodgkin	1.500	1,40	0,84	1.580	1,41	0,78	3.080	1,41	0,75
Outras localizações	41.730	39,49	26,17	33.970	30,69	19,70	75.700	34,99	21,96
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	239.430	226,56	185,61	244.160	220,75	154,08	483.590	223,59	169,63
Pele não melanoma	101.920	96,44	-	118.570	107,21	-	220.490	101,95	-
Todas as neoplasias	341.350	323,00	-	362.730	327,96	-	704.080	325,53	-

Fonte: [77].

Figura 16: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados no Brasil para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.

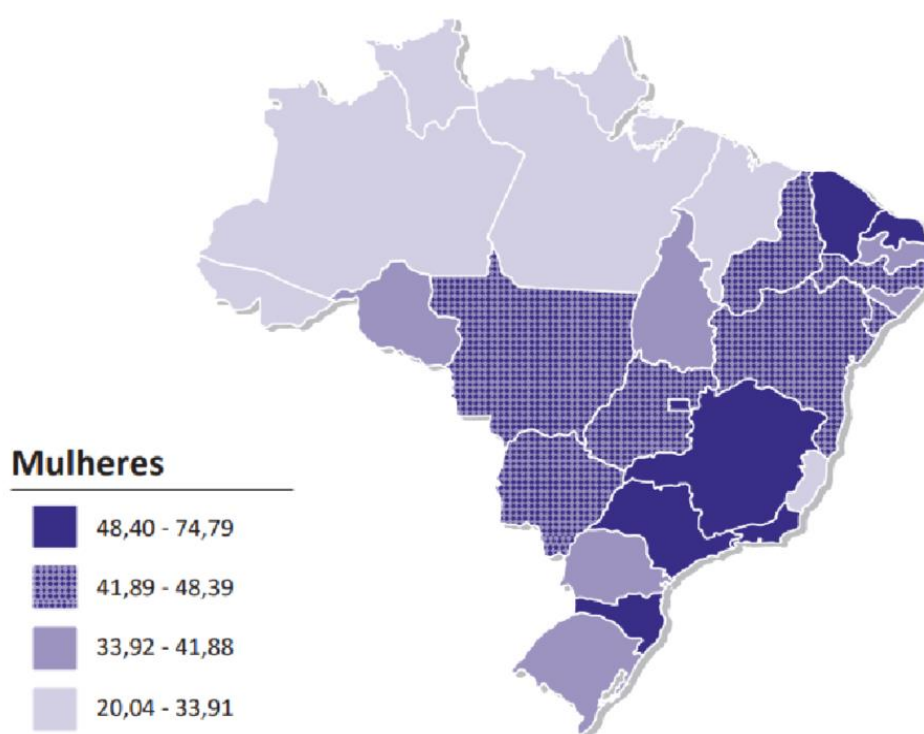


*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: [77].

Segundo o instituto nacional do câncer (INCA), os dez principais tipos de câncer representam mais de 60% do total de casos novos. O câncer de mama feminina é o mais incidente no mundo, com 2,3 milhões (11,7%) de casos novos, seguido pelo câncer de pulmão, com 2,2 milhões (11,4%); cólon e reto, com 1,9 milhão (10,0%); próstata, com 1,4 milhão (7,3%); e pele não melanoma, com 1,2 milhão (6,2%) de casos novos (figura 16) [77].

Figura 17: Representação espacial das taxas de câncer de mama para mulheres no ano de 2023,



Fonte: [79].

O câncer de mama pode se manifestar de forma esporádica ou hereditária. Pode ser resultante de uma sequência de fatores externos que podem causar danos ao material genético das células que compõem a glândula mamária (ductos e/ou lóbulos), através de alterações no DNA, produzirão clones modificados, as chamadas de mutações somáticas (forma esporádica). Ou pode resultar da promoção de um grupo de células que já sofreram mutação na fase embrionária, e a proliferação dessas células acontecem quando sujeitas a agentes promotores, as chamadas mutações germinativas [36].

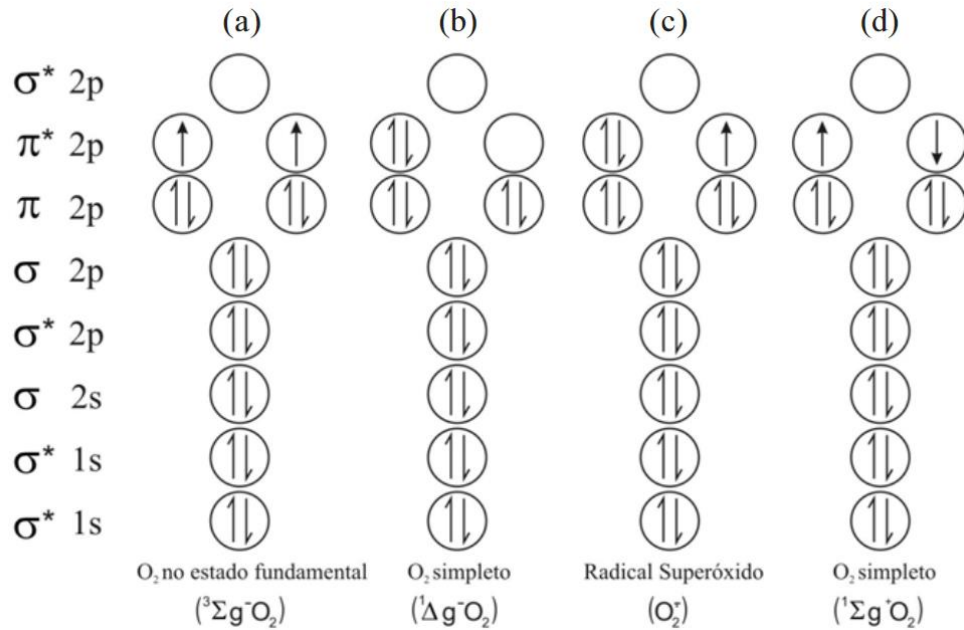
2.10. Toxicidade devido ao oxigênio

O oxigênio que é primordial para a sobrevivência dos seres vivos, pode sob alguns aspectos tornar-se lesivo. Em 1954, Rebecca Gershman e Daniel L. Gilbert propuseram que a maioria dos efeitos danosos do oxigênio poderiam ser atribuídos à formação de radicais livres de oxigênio. Uma das teorias mais populares para explicar a toxicidade do oxigênio (O_2) propõe-se que esta toxicidade seja devida à super produção de $O_2^{\cdot-}$ [78].

O oxigênio é utilizado como receptor final de elétrons por organismos aeróbicos, porque permite elevada produção de energia na respiração, em consequência de seu alto potencial eletroquímico. Entretanto, devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais livres, de forma que as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) estão constantemente presentes nas células eucarióticas [79]. Segundo a teoria do Orbital molecular, a molécula de Oxigênio diatômico (O_2 = oxigênio molecular ou tripleto), em seu estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados no orbital antiligante π^* [80].

O oxigênio molecular, no estado fundamental (O_2), possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais π de mesma energia, chamados de degenerados, caracterizando, portanto, um estado tripleto. Cada elétron está, portanto, localizado em um orbital antiligante π^* . Assim, se o O_2 tentar oxidar outro átomo ou molécula aceitando um par de elétrons, ambos os novos elétrons devem ter spin paralelo para ocupar os espaços vagos nos orbitais π^* . A maioria das biomoléculas apresentam suas subunidades monoméricas ligadas covalentemente, e os elétrons que formam a ligação covalente têm spins opostos e ocupam o mesmo orbital molecular (figura 18). Portanto, a reação do oxigênio com as biomoléculas é restringida pelo spin [81].

Figura 18: Estados singletos do O₂. (Segundo a Teoria do Orbital molecular).



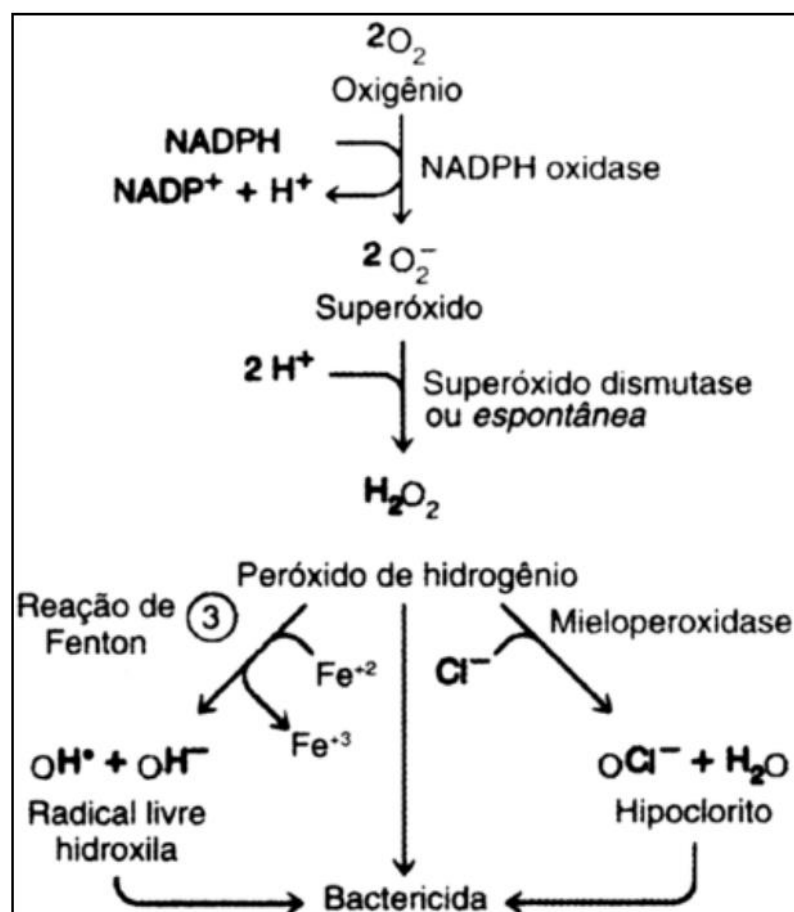
Fonte: [81].

O corpo humano com seu grande "poço" de carbono e hidrogênio em biomoléculas é termodinamicamente instável no ar, mas não entramos em combustão espontânea. Os fatores que contribuem para a proteção contra a oxidação contínua, devem-se primeiro, à própria restrição de spin que é benéfica para a vida em um ambiente rico em oxigênio, pois retarda a reação do oxigênio molecular com as moléculas biológicas. Há também uma importante restrição orbital. A sobrevivência, no entanto, depende, em última análise, do reparo constante do dano oxidativo. Isso é apoiado por proteção antioxidante específica (enzimática) e moléculas de limpeza menos específicas que protegem os principais locais e limitam os danos gerais. Os metais de transição são encontrados nos sítios ativos da maioria das oxidases e oxigenases porque sua capacidade de aceitar e doar elétrons individuais pode superar a restrição de spin do oxigênio [81].

Em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez. A conversão univalente do oxigênio à água processa-se da seguinte maneira: A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido (O_2^-).

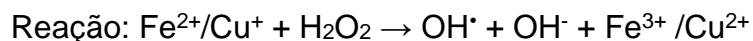
Dois íons superóxido ao receberem mais um elétron e dois íons hidrogênio, forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através do processo chamado dismutação. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação a 10^4 vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico. O radical hidroxila (OH^\bullet) é formado pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na qual o H_2O_2 se divide em dois radicais hidroxila (OH^\bullet), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima, e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos [82]. Após a complexação do NADPH oxidase e a formação do radical ânion superóxido, iniciam uma série de outros eventos bioquímicos no fagossomo, levando à formação de outras espécies reativas de oxigênio (EROs) (figura 19) [83].

Figura 19: Mecanismo de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio



Fonte: [83].

O radical hidroxila pode ser formado quando o peróxido de hidrogênio reage com íons ferro ou cobre. A reação é conhecida como reação de Fenton [82].



Os radicais superóxido (O_2^{\bullet}) e hidroxil (OH^{\bullet}) têm elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa e são, portanto, chamados radicais livres. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre: representa um metabólito do oxigênio parcialmente reduzido. Outras espécies reativas de interesse são os oxigênios singletes, que são espécies mais reativas do oxigênio molecular. Esses metabólitos derivados do oxigênio, considerados em conjunto, são denominados espécies reativas de oxigênio em função da sua aumentada reatividade para as biomoléculas, e em geral alteram o tamanho e a forma dos compostos com quem eles interagem [82]

Conforme Meneghini, (1987) e Southorn, (1988), uma série de trabalhos relacionaram um grande número de doenças a processos mediados por radicais livres, como doenças inflamatórias, enfisema pulmonar, injúria por isquemia seguida de reperfusão (miocárdica ou em outros tecidos), danos cerebrovasculares, aterosclerose, câncer e envelhecimento (dano ao DNA e outras macromoléculas levando a doenças degenerativas, lesões malignas e eventual morte de células vitais) [78].

2.11. Estresse Oxidativo e Espécies reativas do oxigênio (EROS/ROS)

As espécies reativas no meio biológico são átomos, moléculas, ou íons derivados do oxigênio, que em sua grande maioria possuem alta reatividade e constituem três classes de compostos: espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As espécies reativas podem ainda ser didaticamente divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares [84].

Espécies redox-ativas participam de variados processos fisiológicos como: crescimento celular, morte celular programada e senescência celular. Sendo assim, os radicais livres têm um papel fisiológico na sinalização celular

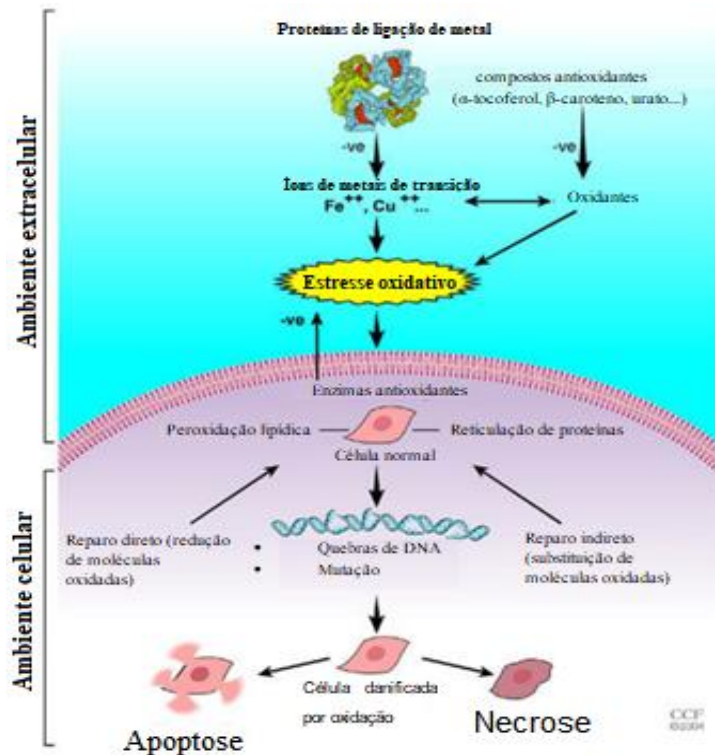
redox. Porém, apesar de essenciais nas respostas biológicas, o aumento na produção dessas espécies pode resultar em efeitos destrutivos ao organismo [85].

Os radicais livres são naturalmente produzidos pelo metabolismo dos seres vivos. As mitocôndrias são a maior fonte endógena de produção de radicais livres nos eucariotos. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o mais comumente gerado, a partir de elétrons que escapam da cadeia transportadora das mitocôndrias e reduzem o O_2 presente nas células. Outra fonte de radicais livres no organismo são células do sistema imunológico, produtoras de enzimas NADPH Oxidase (Nox) que produzem uma grande quantidade de $O_2^{\cdot-}$ capaz de matar microrganismos invasores. Células nervosas, epiteliais, endoteliais e macrófagos produzem a enzima óxido nítrico sintetase, responsável pela produção de NO. Fontes externas, como a radiação UV, tabagismo, poluentes, drogas, dietas excessivamente calóricas, entre outras circunstâncias, também podem induzir a formação de radicais livres [84]. Sendo assim, as espécies de radicais livres são instáveis e altamente reativas. Eles se tornam estáveis adquirindo elétrons de ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, carboidratos ou qualquer molécula próxima, causando uma cascata de reações em cadeia, resultando em dano celular e doença [86].

Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo (EO), quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas próoxidantes e antioxidantes de maneira que os primeiros sejam predominantes. O estresse oxidativo pode gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual [87].

Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (EROS) e os antioxidantes encontram-se em uma situação de equilíbrio. Quando este equilíbrio é quebrado e uma quantidade excessiva de EROS é liberada, ocorre o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é consequência do desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais são também comumente denominadas radicais livres. Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de EROS e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes (figura 20) [88].

Figura 20: Mecanismos de dano celular induzido pelo estresse oxidativo.

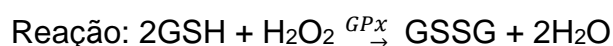


Fonte: [86].

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos. Isso permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas. Alguns exemplos são: OH[•] (íon hidroxila), HOH[•] (íon peroxil), O₂^{•-} (ânion superóxido), NO (óxido nítrico) e O₂ (oxigênio molecular). Os radicais livres podem agir como aceptores ou doadores de elétrons, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor. Os compostos não radicalares, como H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e HOCl (ácido hipocloroso), não possuem elétrons livres, sendo portanto menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas na sua redondeza [84].

Como as EROS são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores. Cabe salientar que a composição das defesas antioxidantes difere de tecido a tecido, de tipo de célula a tipo de célula e possivelmente entre células do mesmo tipo, em um dado tecido.

O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A catalase desempenha importante papel na eliminação do H₂O₂, promovendo a sua catálise até água. A GPx também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG), removendo H₂O₂ e formando água [82].



Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa. O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx) é importante para a manutenção da integridade celular [82].

2.12. Dendrímeros

A maior parte dos agentes antineoplásicos utilizados na atualidade apresenta limitações devido ao seu alto nível de efeitos colaterais. Duas estratégias podem ser utilizadas para melhorar a eficácia dos tratamentos quimioterápicos e reduzir seus efeitos colaterais. A primeira delas é o desenvolvimento de novas moléculas de fármaco, capazes de atuar especificamente sobre o processo tumoral, tais como mesilato de imatinibe e trastuzumabe. Entretanto, o desenvolvimento de novos fármacos é um processo lento e que demanda vultosos investimentos financeiros [89].

A ciência da nanomedicina está atualmente entre as áreas de pesquisa mais fascinantes. Muita pesquisa neste campo nas últimas duas décadas já levou ao registro de 1.500 patentes e à conclusão de ensaios clínicos variados. Ao usar vários tipos de nanopartículas para a entrega da quantidade exata de medicamento às células afetadas, como as células cancerígenas/tumorais, sem perturbar a fisiologia das células normais, a aplicação da nanomedicina e do sistema de entrega de nanomedicamentos é certamente a tendência que

continuará a ser a futura arena de pesquisa e desenvolvimento nas próximas décadas [90].

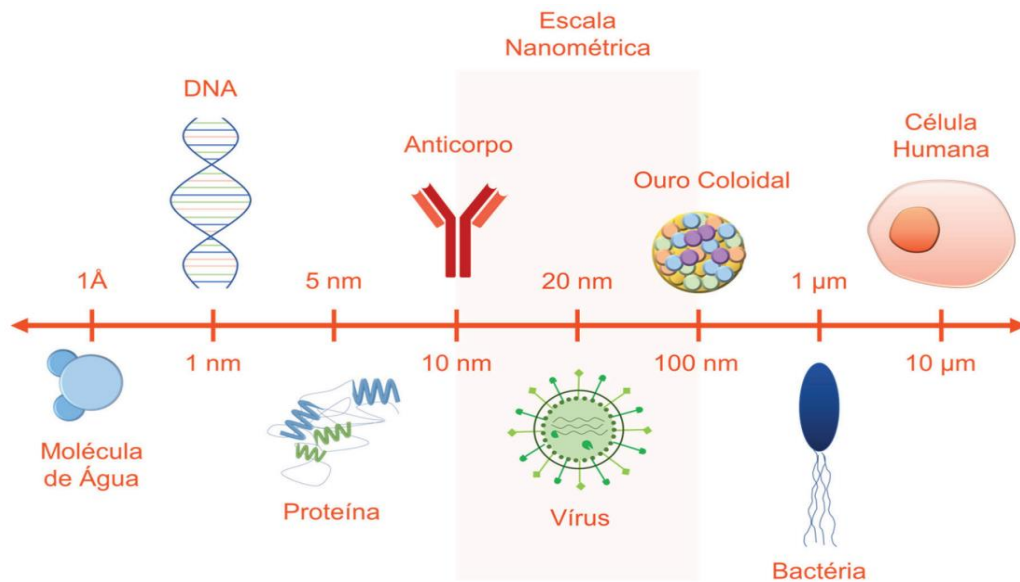
Como o grande desafio na implementação de terapia medicamentosa é o controle da dose de fármaco a ser empregada, evitando causar danos ao organismo, e ao mesmo tempo, proporcionando um tratamento eficaz, com absorção, metabolização e excreção adequadas. Em torno de 40% das moléculas farmacologicamente ativas descobertas são rejeitadas, devido principalmente, à reduzida solubilidade e biodisponibilidade. Para contornar tais problemas, transportadores capazes de modular a liberação do fármaco, surgiram como alternativas eficazes [44]. Uma segunda estratégia é o desenvolvimento de nanocarreadores, capazes de aumentar o tempo de circulação sanguínea e facilitar o acúmulo do fármaco no sítio tumoral, em detrimento a outros tecidos e órgãos [89].

A nanotecnologia está vinculada principalmente ao desenvolvimento de novos dispositivos terapêuticos (sistema de liberação de drogas “inteligentes”) capazes de melhorar a eficácia dos tratamentos já existentes, destruindo de forma segura células doentes e proporcionando a cura ao paciente. O tratamento dessa doença possui protocolos bem definidos e seguidos pelos profissionais da oncologia. Produz efeitos colaterais fortes e variáveis, com a consequente perda da qualidade de vida dos pacientes. Uma das formas para contornar essas dificuldades seria que os fármacos utilizados ao longo do tratamento atuassem somente nas células doentes, sem alcançar as células saudáveis, diminuindo ou extinguindo os efeitos tão indesejáveis no tratamento, como a quimioterapia [91].

O conceito de nanotecnologia no registro de medicamentos envolve não apenas a escala, mas as diferentes características resultantes de seu tamanho que resultariam em um melhor desempenho terapêutico do produto (figura 21). Desse modo, o perfil diferenciado de liberação de fármacos a partir de nanocarreadores bem como a distribuição distinta (especificidade e/ou penetração em tecidos) alcançada fundamenta conceitos biofarmacêuticos que são, na maioria das vezes, relatados como vantagens dos nanocarreadores. Fala-se então em um campo chamado de nanofarmacologia, o qual se baseia inicialmente em perfis farmacocinéticos modulados como, por exemplo, aumento de

biodisponibilidade e/ou meia-vida e alterações nas ações dos fármacos, como alterações farmacodinâmicas que resultem em maior eficácia [92].

Figura 21: Comparação com as dimensões atômicas das moléculas em nanoescala.



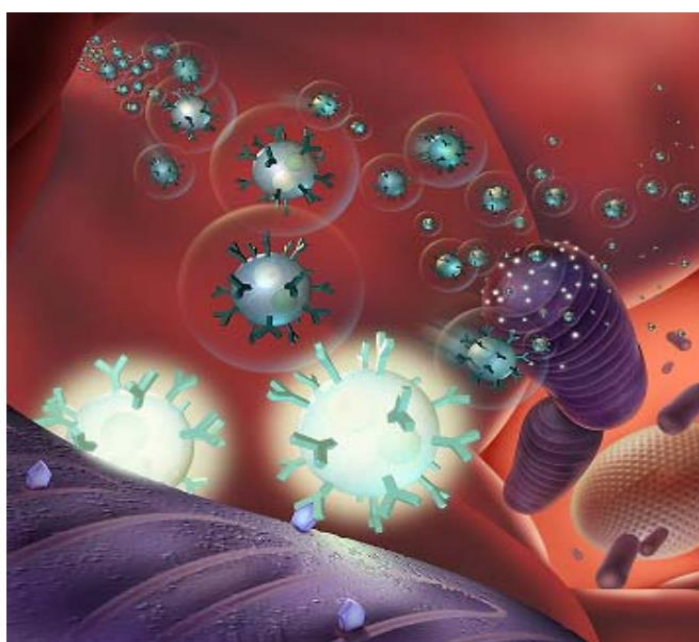
Fonte: [92].

Entregar o fármaco com precisão e segurança ao seu local de destino no período de tempo certo para ter uma liberação controlada e atingir o efeito terapêutico máximo continua sendo um parâmetro no projeto e desenvolvimento de novos sistemas de administração de fármacos. O conceito de direcionamento de medicamentos decorre da própria ideia de minimizar a relação risco-benefício. Os nanocarreadores, em suas diversas formas, têm a possibilidade de proporcionar infinitas oportunidades na área de liberação de fármacos e, por isso, estão sendo cada vez mais investigados para aproveitar seu potencial. A nanotecnologia, conforme definido pela Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (NNI), é o estudo e uso de estruturas aproximadamente na faixa de tamanho de 1 a 100 nm. O objetivo geral da nanotecnologia é o mesmo da medicina: diagnosticar com a maior precisão e o mais cedo possível e tratar da forma mais eficaz possível, sem quaisquer efeitos colaterais [93].

Sistemas de liberação nano-estruturados possuem a capacidade de proteger fármacos, através da encapsulação, acomodando o fármaco no interior da estrutura e protegendo-o das degradações enzimáticas e hidrolíticas no trato gastrointestinal, liberando no local alvo uma grande variedade de fármacos para diversas áreas do corpo podendo atuar de forma sustentada, através da via parenteral [94].

Os medicamentos para o tratamento do câncer que envolvem transporte de fármacos utilizam polímeros que devem apresentar, dentre outras características, biocompatibilidade e/ou biodegradabilidade e devem ser aprovados pelas agências reguladoras do país. O fármaco ou é disperso dentro da nanopartícula polimérica ou conjugado com a estrutura do polímero. No primeiro caso, o fármaco encapsulado é liberado por difusão e no segundo caso, uma erosão de superfície ou degradação da matriz do polímero exerce um papel na liberação do medicamento e várias técnicas podem ser utilizadas para ajustar a taxa de liberação. Recentemente, polímeros funcionais são produzidos para a finalidade de liberação controlada de fármacos, como enxerto de polímero, blocos de copolímeros, polímeros dendronizados e dendrímeros (figura 22) [29].

Figura 22: Idealização da circulação de dendrímeros na corrente sanguínea.

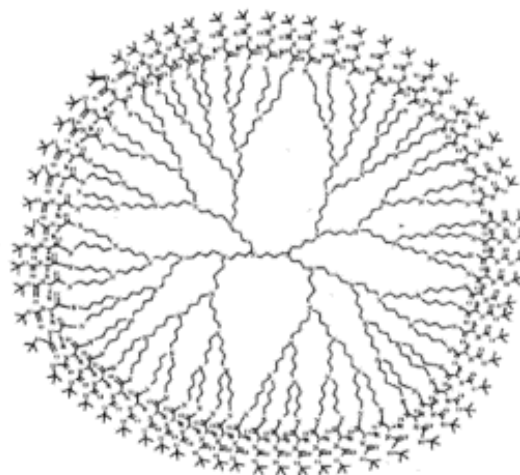


Fonte: [29].

Recentemente uma nova classe estrutural de macromoléculas poliméricas tem atraído a atenção da comunidade científica, que são os compostos poliméricos. Os dendrímeros, membros desta classe, são estruturas quase esféricas, de dimensão nanométrica, com grande número de subgrupos funcionais reativos e espaços interiores protegidos. Esta combinação única de propriedades torna-os perfeitos para aplicações em diferentes áreas da química e da medicina. A palavra dendrímero origina do grego, onde dendron significa árvore, galho e meros significa parte, segmento. Os dendrímeros são altamente ramificados, monodispersos, tridimensionais e assemelham-se a estrutura de uma árvore, têm escala nanométrica (2-6 nm), arquitetura globular e massa molecular bem definida, o que os torna potenciais candidatos a sistemas de liberação de fármacos. Estas moléculas foram descobertas no início de 1980 pela equipe de Donald Tomalia [94].

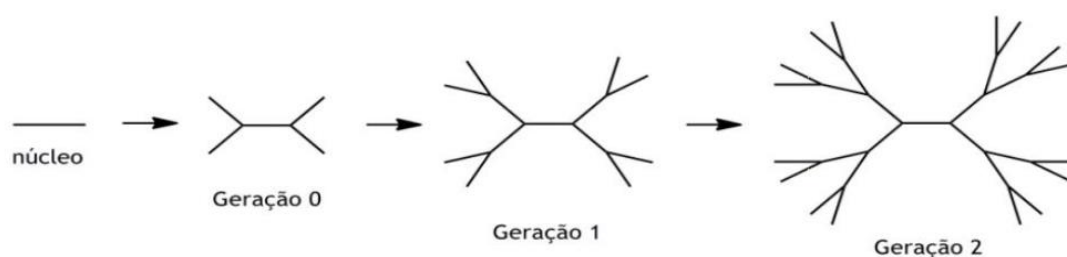
Os dendrímeros são polímeros globulares altamente ramificados, com cerca de 1-10 nm [95]. Essas moléculas são feitas pelo homem e possuem essas ramificações semelhantes a uma árvore; essas ramificações em desenvolvimento regular emanam de um núcleo (moléculas hiper-ramificadas). A ramificação cria uma grande área de superfície à qual vários ligantes podem ser ligados (figura 23). A mesma porção pode ter ligantes para diagnóstico e terapia ligados às suas ramificações, o que lhe permite fazer ambos in vivo [96].

Figura 23: Arquitetura do dendrímero.



Os dendrímeros são estruturas que diferem dos polímeros lineares tradicionais, pois além de possuírem formato globular, são simétricos, com baixo grau de polidispersão e possuem grande número de grupos funcionais periféricos. A estrutura básica de um dendrímero é definida na presença de três componentes principais: um foco central multifuncional; camadas de ramificações repetidas, conhecidas como monômeros ou dendrons, que partem desse foco central, e grupos de superfície funcionalizados. O foco central do dendrímero é denominado geração zero e a cada camada de dendrons adicionada determina-se uma nova geração (figura 24) [97].

Figura 24: Representação esquemática do crescimento dendrimérico.



Fonte: [95].

Os dendrímeros são constituídos de duas formas principais: Síntese divergente (ou como alguns autores chamam de método divergente) e síntese convergente. A síntese divergente é aquela onde os dendrímeros são constituídos a partir de um núcleo para a periferia. A síntese convergente constrói o polímero da periferia para o núcleo, porém, a principal desvantagem desse método é que ele está limitado somente a preparação de polímeros de baixa ordem de geração, pois quando os dendrons são muito grandes a reação no núcleo fica congestionada, então as interações dendriméricas caem abruptamente [98].

A utilização de dendrímeros como *Drug Delivery System* (DDS), principalmente para fármacos lipofílicos, pode resultar no aumento da solubilidade do fármaco por meio da sua encapsulação no interior da estrutura do nanomaterial. Além desta, outras vantagens na utilização dos dendrímeros em sistemas de liberação de fármacos são: ligar ou encapsular fármacos tanto

hidrofóbicos quanto hidrofílicos; possuem muitos grupos funcionais em sua periferia, o que permite sua utilização nas mais diversas aplicações, como a terapia direcionada ao câncer; liberação de fármacos “programada”, o que diminui a toxicidade, aumenta a biodisponibilidade e torna o tratamento mais simplificado [99].

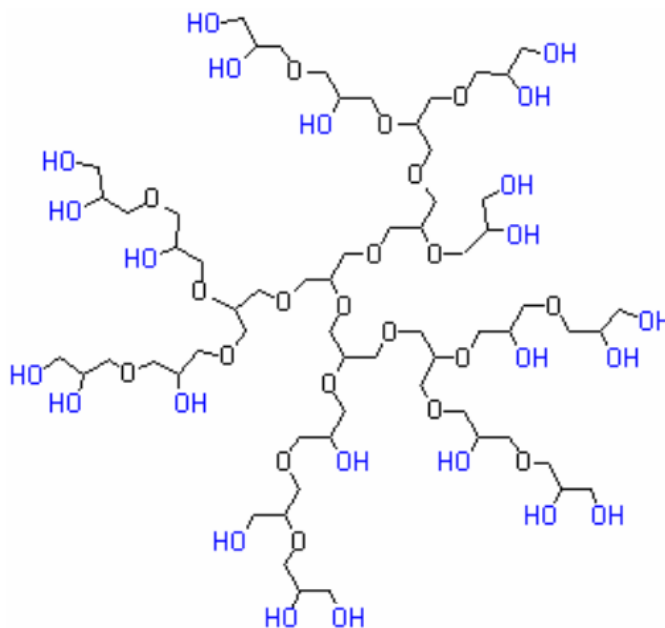
O uso de dendrímeros como sistemas carreadores de fármacos, principalmente para fármacos lipossolúveis, pode aumentar a solubilidade do fármaco por meio de sua encapsulação no interior da estrutura do dendrímero devido ao efeito hidrofóbico, já que o dendrímero apresenta cavidades hidrofóbicas no interior de sua estrutura. A interação entre o dendrímero e o fármaco também pode ocorrer pela formação de pontes de hidrogênio entre grupos polares da molécula do fármaco e aminas presentes no interior e na superfície dos dendrímeros. Para fármacos que apresentam carga positiva ou negativa, pode haver interações eletrostáticas com os grupos de superfície dos dendrímeros [94].

Os dendrímeros têm sido utilizados como carregadores de uma variedade de pequenas moléculas farmacologicamente ativas. Os agentes bioativos podem ser encapsulados no interior dos dendrímeros ou ser quimicamente anexados ou quimicamente absorvidos sobre a superfície do dendrímero, através de ligações covalentes ou complexação de transferência da carga, com a opção de personalizar as propriedades do transportador às necessidades específicas do material ativo e suas aplicações terapêuticas. Além disso, a alta densidade de superfície permite a fixação de grupos para terapia de alvo, bem como grupos que modificam o comportamento da solução ou toxicidade de dendrímeros [29].

A elevada funcionalidade e biocompatibilidade do dendrímero de poliglicerol (PGLD) parece trazer uma luz à busca de um tratamento mais eficiente com menores efeitos colaterais. O PGLD, é um polímero solúvel em água que contém grupos hidroxilas e ligações éter (figura 25). O PGLD apresenta baixa temperatura de transição vítrea (T_g) e alta densidade de grupos hidroxila locais, características que o tornam interessante. Estes grupos hidroxila funcionais podem ser modificados em um segundo passo sintético e utilizados

como sítios para imobilização de compostos bioativos. O PGLD é preparado seguindo a metodologia de síntese divergente devido ao grau de controle fornecido por essa técnica [29,100].

Figura 25: Dendrímero de poliglicerol.



Fonte: [100].

As características apresentadas pelo dendrímero de poliglicerol (PGLD) são favoráveis para utilização como carreador farmacológico. O PGLD é caracterizado pela presença de grupos hidroxilas e ligações éter, e é solúvel em água a baixas gerações. É possível transformar e utilizar os grupos hidroxilas funcionais como sítios para imobilização de substâncias de interesse biológico. A baixa citotoxicidade e a aprovação de polímeros ou oligômeros do poliglicerol pela FDA (*Food and Drug Administration*) como emulsificante nas indústrias farmacêuticas e alimentícia, fazem do PGDL um polímero bastante promissor para uso no campo da biomedicina [101].

O dendrímero poliglicerol super-ramificado, por exemplo, é utilizado no processo de encapsulamento e transporte de hospedeiros polares (tais como

corantes e drogas) e, também, na criação de microambientes especiais no seu núcleo. Através desta arquitetura núcleo-casca, o transporte seletivo e a liberação dos hospedeiros encapsulados são possíveis tanto no meio hidrofílico quanto no meio hidrofóbico [102]. A síntese de dendrímeros permite gerar arquiteturas moleculares similares às observadas em sistemas biológicos e, devido a isso, essas macromoléculas são conhecidas como proteínas artificiais [103].

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Essa proposta de pesquisa tem como objetivo geral avaliar o potencial citotóxico dos sistemas macromoleculares arborescentes potencialmente ativos para o tratamento do câncer. Para isso, foram sintetizados dendrímeros biomiméticos da enzima GPx, ou seja, contendo selênio em sua estrutura.

3.2. Objetivos específicos

- a) Verificar os efeitos do DPGLi-Se nos índices de proliferação celular das linhagens celulares MCF-7 e CHO-k1 através do ensaio de proliferação celular utilizando MTS.
- b) Investigar as propriedades antitumorais do conjugado DPGLi-Se, investigando o potencial de apoptose pelo método de anexina V.
- c) Testar se o DPGLi-Se causa a lise das hemácias, pelo método de hemólise.
- d) Testar o potencial de DPGLi-Se como agentes antioxidantes, mimetizando a atividade da GPx.

4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CEUA-IPEN). Mediante um aditivo foi aprovada a doação de material biológico (sangue) derivado de experimentos in vitro, sob registro 19/22 em responsabilidade de Débora Rocha Helfstein (ANEXO A).

4.1. Síntese e Caracterização do DPGLi-Se

A síntese e caracterização do DPGLi-Se foi realizado pelo Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz, Pesquisador Voluntário do Centro de Biotecnologia do IPEN através de Ressonância Magnética Nuclear e está descrito em publicação recente do grupo de pesquisa [104].

4.2. Ensaio Biológicos

4.2.1. Cultivos celulares

Neste trabalho foram utilizadas linhagens celulares de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), ambas da ATCC (ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, EUA). A metodologia utilizada para o cultivo de células ocorreu com o plaqueamento das células em frascos de cultura de 25 ou 75 cm², variando de acordo com o experimento. Para a cultura foi utilizado o meio RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, SP, BR) suplementado com 10% de soro (Soro fetal bovino – SFB, Gibco) e 1% de penicilina (10000 u) e estreptomicina (10 mg). A passagem das células foi realizada sempre que atingida confluência de 80%. Para a passagem foi utilizado uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) por no máximo 5 min, essa solução desfaz a aderência celular e assim possibilita o manuseio das células. As linhagens em cultura foram mantidas em estufa incubadora na temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Os procedimentos realizados em laboratório seguiram os protocolos necessários para manter a esterilidade dos materiais e evitar contaminações. Durante os experimentos, utilizamos uma capela de fluxo laminar para realizar os procedimentos, o que garantiu um ambiente controlado e livre de impurezas. Além disso, para que o padrão de número de células utilizado em cada amostra fosse adequado, realizamos a contagem em uma câmara de Neubauer. Essa etapa é fundamental para garantir a precisão e evitar erros que possam comprometer os resultados, possibilitando a apuração dos experimentos de maneira mais confiável.

4.2.2. Liofilização do dendrímero de selênio

Foi determinada a massa do dendrímero, que posteriormente foi diluído e alíquotado em frascos de vidro para liofilização. O equipamento utilizado foi o Liofilizador SP-Scientific modelo AdVantage Pro. com controlador Intellitronics. Foi realizado um pré-tratamento para levar a amostra de dendrímero até 0 °C, seguindo para um tratamento termal que levou a amostra até -40°C (temperatura de congelamento). Após atingida a temperatura de 40°C a amostra foi submetida a uma condição primária de sublimação (liofilização primária), na qual, a câmara apresentou vácuo de 200 mTorr e temperatura de -22°C, por um período de 480 min. Uma segunda condição foi estabelecida (liofilização secundária), na qual, a amostra foi levada para uma condição de vácuo máximo (0-10mTorr) e temperatura de 20°C, por 360 min. Os frascos foram fechados hermeticamente à vácuo de 10mTorr e posteriormente utilizados nos ensaios de viabilidade celular (citotoxicidade).

4.2.3. Avaliação de citotoxicidade de dendrímeros de selênio em células MCF-7 e CHO-K1

Este teste, foi determinado como uma primeira abordagem para avaliar a atividade antitumoral do composto, em contato com as células em cultura. Essa técnica permite avaliar a velocidade de crescimento e multiplicação das células cancerígenas e a seletividade do composto em relação às células normais do

organismo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e seguindo a norma internacional ISO 10.993-5 baseada no procedimento original desenvolvido por Borefreund e col. (1984), para avaliação de agentes citotóxicos em geral, sobre uma monocamada de células. O método é baseado na avaliação quantitativa da viabilidade celular em exposição a agentes tóxicos, pela incubação com corante vital MTS(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2Htetrazólico) e reagente acoplador de elétrons, PMS (fenazinametasulfato). A quantidade de MTS, marcador de viabilidade celular, absorvido por uma população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura. O potencial citotóxico dos materiais avaliados é expresso pelo índice de citotoxicidade (IC(50%)). Este índice corresponde à concentração do extrato do material analisado capaz de inibir 50% do crescimento celular [105].

As células aderidas (MCF-7 e CHO-K1) foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 poços de cultura de células. Foram semeadas 5×10^3 células/poço em um volume de 100 μ L de meio RPMI-1640 com 10% de SFB e 1% de ATB no 1º dia. Após incubar por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi retirado e só então as células foram expostas aos tratamentos. Para os ensaios foram utilizadas diferentes concentrações do dendrímero, (curva de diluição), sendo o ponto mais concentrado correspondente a 1000 μ g/mL de dendrímero em meio de cultura até 0,01 μ g/mL de dendrímero em meio de cultura.

Como controles do ensaio foram utilizados: um branco (apenas o meio de cultura); um controle positivo (DMSO 5%); e um controle de células (células sem tratamento). Em seguida a placa foi incubada a 37 °C e 5% de CO₂, o tempo de exposição para os tratamentos foi de 24h, 48h e 72 horas, conforme determinado pelo experimento. Após o tempo de incubação foi adicionado 20 μ L MTS (CellTiter 96® Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) a 2mg/mL e PMS (Phenazine methosulfate, Sigma-Aldrich) a 1mg/mL e novamente incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 2 horas. A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotometria no equipamento Multiskan (Thermo). O comprimento de onda utilizado foi de 490nm. Os gráficos com informações referentes a viabilidade celular foram obtidos com o software Microsoft EXCEL®.

4.2.4. Quantificação da apoptose

A apoptose é fundamental para a manutenção da homeostase do organismo. A detecção de células em apoptose é um importante método no estudo de doenças e no desenvolvimento de terapias. A investigação de células em apoptose ocorreu pelo método de anexina V.

As metodologias que incluem a avaliação e quantificação das populações celulares por citometria de fluxo fornecem análises mais precisas e reprodutíveis do processo de morte celular por apoptose. Na citometria de fluxo, a redução do volume celular e o aumento da granulosidade das células apoptóticas podem ser avaliados a partir de modificações nos padrões FSC (*forward scatter*) e SSC (*side scatter*) de dispersão da luz, respectivamente. A anexina V mostrou-se útil na detecção de células apoptóticas em decorrência da sua ligação preferencial a fosfolípidos negativamente carregados, como a fosfatidilserina exposta no início do processo apoptótico. A conjugação do corante Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) à anexina V, permite identificar e quantificar as células apoptóticas através da citometria de fluxo. Desse modo, esse marcador anexina permite detectar os estágios iniciais da apoptose [106].

As células aderidas (MCF-7 e CHO-K1) foram tripsinizadas e semeadas em placas de 6 poços de cultura de células. Foram semeadas 1×10^6 células/poço em um volume de 1mL de meio RPMI-1640 com 10% de SFB e 1% de ATB no 1º dia. Após incubar por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi retirado e as células foram expostas aos tratamentos. O ensaio foi realizado com uma curva de diluição, variando entre 0,39%, 1/10 e 10x do dendrímero em meio de cultura (v/v).

Como controles do ensaio utilizamos um controle positivo (DMSO 5%) e um controle de células (células sem tratamento). Em seguida a placa foi incubada a 37 °C e 5% de CO₂, o tempo de exposição para os tratamentos foi de 24 horas. Após o tempo de incubação as células foram coletadas pelo processo de tripsinização. As células foram separadas em 1×10^6 células/tubo em microtubos e os pellets foram ressuspensos em PBS a 4° C. Em seguida, a amostra foi centrifugada e os pellets ressuspensos em 100µL de tampão fornecido no kit (Annexin-Binding Buffer 1X). Foram adicionados 5µL do reagente FITC annexin V

e 1 µL de Solução de uso de iodeto de propídio (100 µg/mL). Após esse processo, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 minutos. Por fim, a amostra foi homogeneizada em 400 µL de tampão Annexin-Binding 1X. A amostra foi mantida em gelo picado e ao abrigo da luz, onde posteriormente foi quantificada por citometria de fluxo.

4.2.5. Ensaio de hemólise

O ensaio de hemólise com sangue de rato permite avaliar se determinada substância causa a lise das hemácias. O sangue utilizado no experimento foi coletado pelo Biotério do IPEN de uma linhagem de ratos Wistar, os frascos de coleta continham heparina como anticoagulante e foram mantidos sob refrigeração (4 á 8°C) até a utilização. Os ensaios de hemólise foram baseados nos estudos feitos por RANGEL et al [107].

Para verificar a destruição das hemácias do sangue, inicialmente foi necessário realizar uma lavagem do mesmo para retirada do plasma, leucócitos e metabólitos. Inicialmente o sangue foi diluído em 30 volumes de solução salina (PBS Gibco), e centrifugado durante 10 minutos a 900 rpm para retirada do soro e dos leucócitos, e obtenção de eritrócitos. Para reduzir a contaminação plasmática dos eritrócitos, este procedimento repetiu-se por mais duas vezes. O sedimento da última centrifugação foi suspenso em solução salina (PBS), para obter uma solução de 0,5% de eritrócitos.

Em seguida, foi adicionado diferentes concentrações do dendrímero à suspensão de eritrócitos. Foi utilizado concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL, (previamente disperso em PBS) em 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. Para referência, uma suspensão de eritrócitos sem o dendrímero foi utilizado como controle negativo (0% de hemólise) e outra suspensão de eritrócitos acrescida com Triton X-100 a 1% como controle positivo (100% de hemólise). Após esse período, as amostras foram incubadas a 22° C com agitação suave e constante por uma hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 900 rpm durante 10 minutos. A atividade hemolítica presente no sobrenadante foi quantificada por

espectrofotometria pela medida de absorbância em comprimento de onda de 540nm.

4.2.6. Ensaio de avaliação do potencial antioxidante

A família de GPx integra o grupo de selenoproteínas, que têm, em seu sítio ativo, o selênio (Se), que pode reduzir H_2O_2 e outros peróxidos a água ou álcool. O Se é reconhecidamente um elemento antioxidante, No organismo humano, a selenometionina ocupa o lugar da metionina nas proteínas e a selenocisteína é constituinte das selenoproteínas (selenocisteína é a forma na estrutura primária de todas as selenoproteínas, inclusive GPx). O intuito desse experimento é avaliar a ação antioxidante do DPGLi-Se em eritrócitos, adicionando ao lisado de hemácias esse composto [108]. O sangue utilizado no experimento foi coletado no Biotério do IPEN com uma linhagem de ratos Wistar, ao qual os frascos de coleta utilizaram heparina como anticoagulante e mantido sob refrigeração (4 a 8°C) até a utilização. Os ensaios de hemólise foram baseados nos estudos feitos por RANGEL et al [109].

Inicialmente, foi necessário realizar uma lavagem da suspensão de eritrócitos para retirada do plasma, leucócitos e metabólitos. Inicialmente o sangue foi diluído em 30 volumes de solução salina (PBS Gibco), e centrifugado durante 10 minutos à 900rpm para retirada do soro e dos leucócitos, e obtenção de eritrócitos. Para reduzir a contaminação plasmática dos eritrócitos, este procedimento repetiu-se por mais duas vezes. O sedimento da última centrifugação foi suspenso em solução salina (PBS).

Em seguida, foram adicionadas diferentes concentrações do dendrímero à suspensão de eritrócitos. Foram utilizadas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, (previamente disperso em PBS) em 2 mL da suspensão de eritrócitos na presença de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 40 mM para um volume final de 2,5 mL para obter uma solução de 0,5% de eritrócitos. Para referência, uma suspensão de eritrócitos sem o DPGLi-Se foi utilizada como controle negativo (0% de hemólise), uma suspensão de eritrócitos na presença de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 40 mM ao qual

teríamos o máximo de lise de hemácias por conta do efeito oxidante do H₂O₂, foi utilizado como controle positivo (100% de hemólise) e como referência, foi utilizada uma solução com eritrócitos, H₂O₂ (40 mM) e vitamina C (1000µg/mL). Logo após, as amostras foram incubadas a 22°C com agitação suave e constante por duas horas a 37°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 900 rpm durante 10 minutos. A atividade hemolítica presente no sobrenadante foi quantificada por espectrofotometria pela medida de absorbância em comprimento de onda de 540nm.

4.2.7. Ensaio de genotoxicidade

Micronúcleo (MN) é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmento de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose. A formação de Micronúcleos é uma das formas que o organismo dispõe para se adaptar ao dano gerado por agentes exógenos ou endógenos mantendo a célula viável [110]. Se os componentes genotóxicos estão presentes, eles podem intercalar-se com a molécula de DNA levando a danos genéticos em regiões de fundamental importância para o controle do ciclo celular e apoptose, acelerando o processo neoplásico [111].

O ensaio de frequência de micronúcleos é uma técnica importante utilizada para avaliar danos genotóxicos de agentes químicos ou físicos (como radiação ionizante) em células, baseado na quantificação de células contendo micronúcleos, que são fragmentos derivados de DNA danificado com coloração semelhante ao dos núcleos principais, mas com 5 a 30% do seu tamanho. Tradicionalmente, este ensaio é realizado usando microscopia de coloração convencional de acordo com Giemsa, mas atualmente esta técnica está sendo atualizada para uma abordagem automatizada que se baseia na dissolução da membrana plasmática por detergentes levando em conta apenas núcleos e micronúcleos com seu DNA corados por corantes fluorescentes, que podem discriminar núcleos de células viáveis das células inviáveis e permitir a contagem por citometria de fluxo [112]. Nesse ensaio, as membranas celulares foram lisadas na presença dos corantes SYTOX® Green e EMA.

Inicialmente, foi preparada uma solução de COLCHICINA (COLCH) para uma concentração de 0,36 µg/mL, sendo utilizada como controle positivo aneugênico. Para controle positivo clastogênico, foi preparada uma solução de MITOMICINA C (MTMC) com uma concentração de 0,8 mg/mL. Para controle negativo de genotoxicidade, foi preparado uma solução de NaCl 0,9% (v/v) e para controle positivo de citotoxicidade, uma solução de DMSO a 5% (v/v).

No primeiro dia, as células aderidas (MCF-7) foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 poços (conforme descrito no tópico 3.2.1). As mesmas foram semeadas 5×10^3 células/poço em um volume de 100 µL de meio RPMI-1640 com 10% de SFB e 1% de ATB. A placa foi mantida na incubadora por 48hs. Após esse período, foi aplicado 100 µL dos controles e das amostras diluídas em RPMI com 10% de SFB e 1% de ATB, e incubada a placa por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm a 20°C. O sobrenadante foi retirado, e uma solução de EMA foi aplicada e mantido no gelo por 30 minutos na fotoativação (luz azul). Posteriormente, foi aplicada uma solução de PBS + SFB e a placa foi centrifugada por 10 minutos, a 1500 rpm a 20°C. O sobrenadante foi retirado, e uma solução de Lise I completa foi aplicada, homogeneizando todos os poços. Em seguida, foi incubado por 1h15. Logo, foi adicionada uma solução de Lise II completa, ao qual foi homogeneizada nos poços e mantida em temperatura ambiente por 45 minutos. Todo o procedimento foi realizado evitando a exposição do material à luz. A leitura dos eventos foi realizada por citometria de Fluxo (BD Biosciences, modelo Accuri C6).

4.2.8. Análise estatística

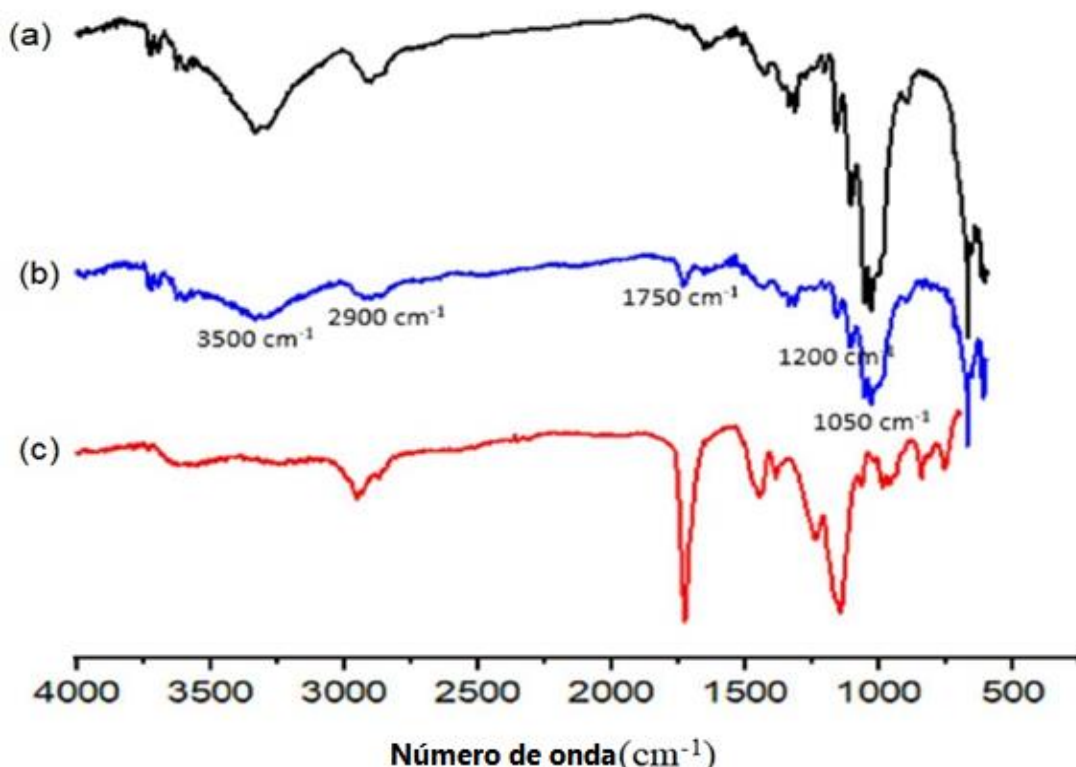
O experimento de avaliação de citotoxicidade por MTS foi realizado em sextuplicata, enquanto os demais experimentos foram conduzidos em triplicata para garantir a precisão dos resultados. Após a coleta dos dados, foi realizada a média dos valores obtidos, utilizando o cálculo de variância ANOVA.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do DPGLi-Se

A caracterização físico-química do DPGLi-Se foi realizada em colaboração com o Professor Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz e está descrita em publicação recente do grupo sobre os efeitos quimioterápicos desse sistema em carcinoma de células escamosas [104]. Os espectros FTIR-ATR do DPGLi e SeMeCys-DPGLi-Se registrados a temperatura ambiente (25°C) são apresentados na Figura 26. Os espectros de FTIR exibiram bandas na região de 3450 cm^{-1} , 2940-2900 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} características das vibrações de alongamento dos grupos hidroxila (ν_{OH}), alongamento antisimétrico e simétrico dos grupos metileno ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$, $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$) e vibrações de alongamento das ligações éter (C–O–C) de DPGLi-Se, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com a literatura descrita [113].

Figura 26: Espectros ATR-FTIR medidos a temperatura ambiente (25°C) de: DPGLi-Se (a) e SeMeCys-DPGLi-Se após 5 min (b) e 30 min (c) de reação de esterificação, respectivamente.



A banda que aparece em cerca de 1750 cm⁻¹ (Fig. 26 b,c) pode ser atribuída à vibração de estiramento C=O do grupo carboxílico esterificado SeMeCis e representa uma clara característica diferencial entre os espectros. Além disso, o espectro SeMeCis- DPGLi-Se (Fig. 26 b,c) mostra banda hidroxila significativamente reduzida e a banda em 2900 cm⁻¹ correspondente ao estiramento de grupos metila (CH₃) de SeMeCis aumentada, confirmando o consumo de grupos hidroxila de DPGLi durante o processo de esterificação (Fig. 26 b,c). Estes resultados confirmam o sucesso da reação de esterificação entre SeMeCis e DPGLi para formar SeMeCis- DPGLi-Se.

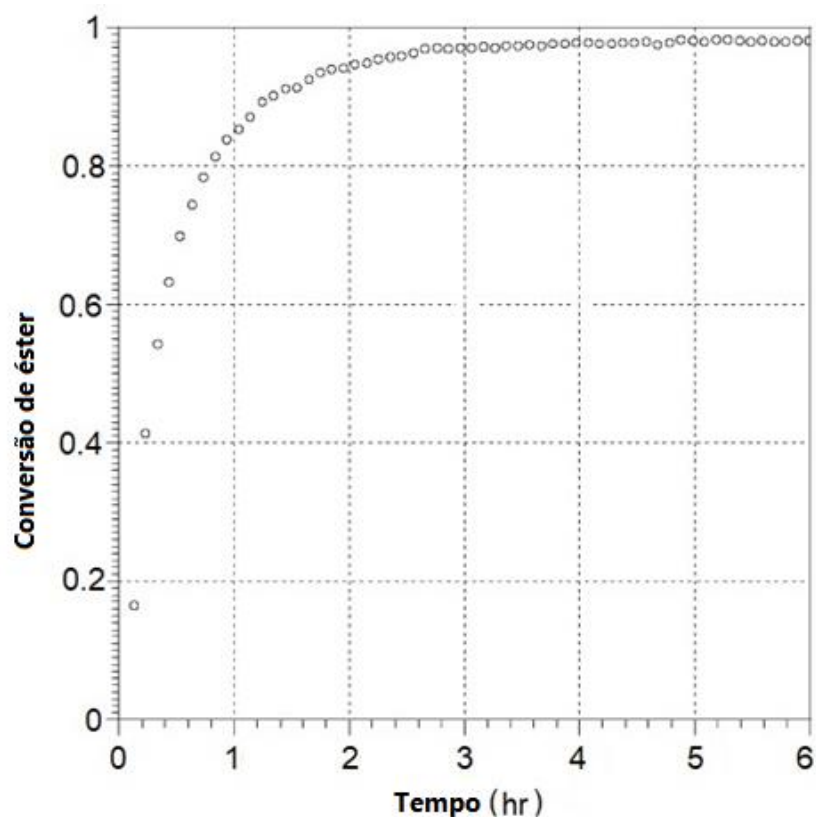
O aumento da intensidade da banda de absorção da carbonila atribuída a 1750 cm⁻¹ foi utilizado para monitorar a conversão do éster durante a reação de esterificação entre SeMeCis e DPGLi. A quantificação é baseada na lei de Lambert-Beer e o grau de conversão (p) foi calculado como a razão entre a absorbância do grupo éster e a de um padrão interno, grupo cuja concentração não muda durante o curso da reação de esterificação:

$$p = 1 - \left[\frac{\left(\frac{A_{C=O}}{A_{CH_2}} \right)_{t=t'}}{\left(\frac{A_{C=O}}{A_{CH_2}} \right)_{t=0}} \right]$$

sendo A = área da banda de absorção dos grupos éster (C=O) dos grupos SeMeCys- DPGLi e metileno (CH₂) do DPGLi do tempo inicial (t=0) e de reação (t=t'), respectivamente. A = -logT.

Neste estudo, foi utilizada a absorbância correspondente à região de estiramento do CH₂, designada em aproximadamente 2900 cm⁻¹. A Figura 27 mostra os dados extraídos de um experimento FTIR e a curva de conversão de éster calculada correspondente. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. A conversão (p) alcançada após 3 horas de reação foi de cerca de 100% de éster.

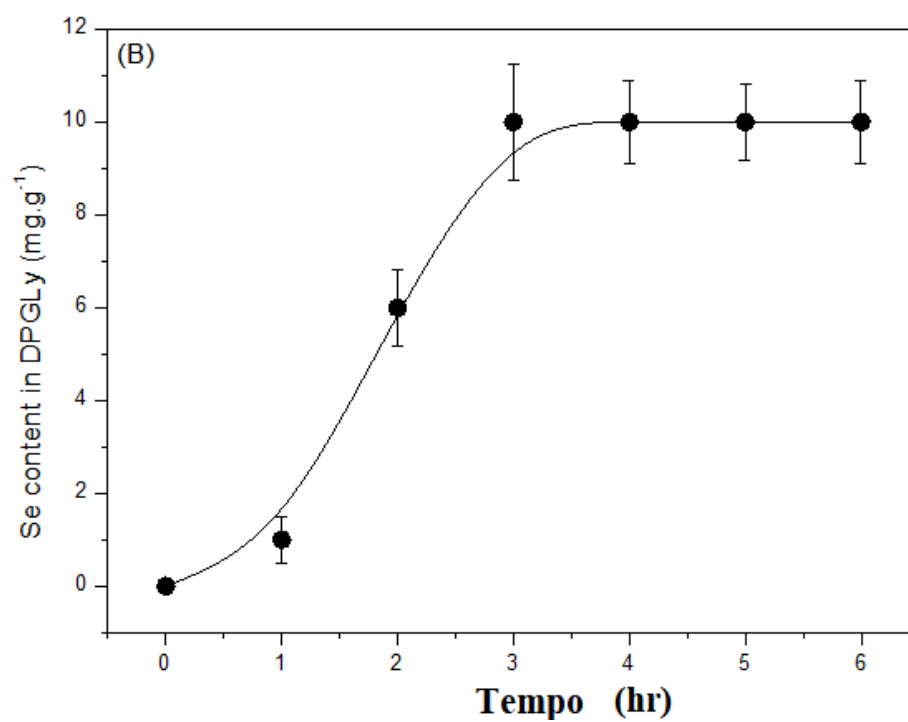
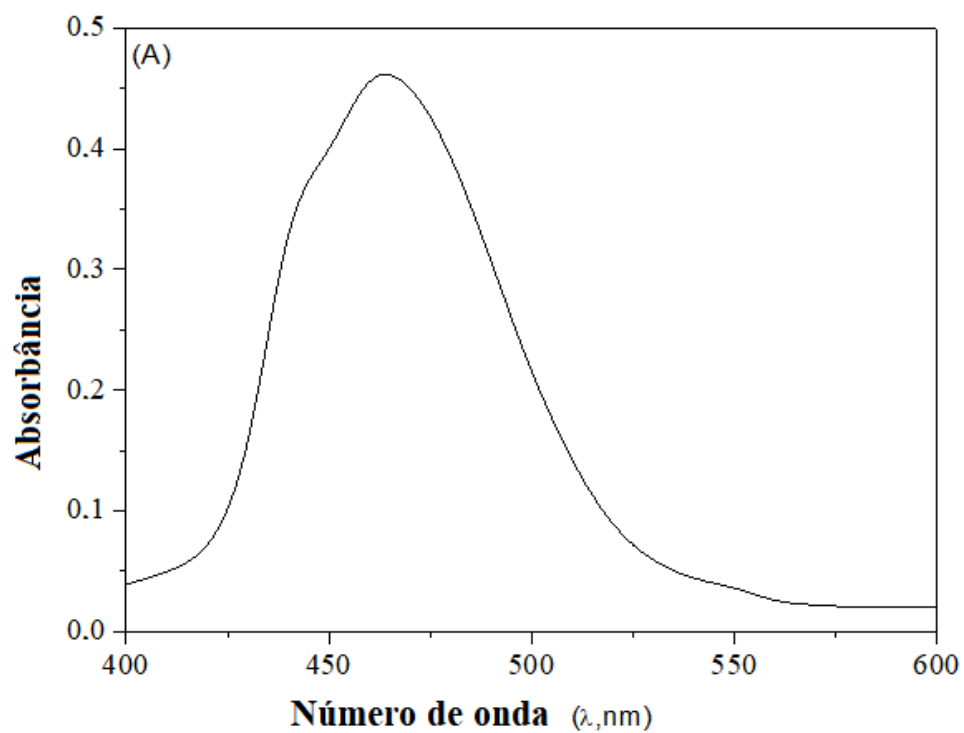
Figura 27: Conversão do éster durante a reação de esterificação entre Boc-SeMeCis e DPGLi usando DMAP/EDC a temperatura ambiente (25 °C).



O teor de Se acoplado a DPGLi no conjugado DPGLi-Se foi determinado por UV-Vis após redução de Se(VI) a Se(IV) em micro-ondas. A Figura 28 mostra os espectros de absorção UV-Vis do complexo formado entre DAHMP e Se(IV) a partir de SeMeCis-DPGLi-Se digerido. O espectro UV-Vis apresenta um máximo de absorção em 458 nm, devida à formação de transferência de carga do tipo ligante (π) \rightarrow $1B_{1g}$ (SeIV) e ligante (σ) \rightarrow $1B_{1g}$ (Se-IV), respectivamente, em um ambiente eletrônico planar ao redor do íon metálico [114].

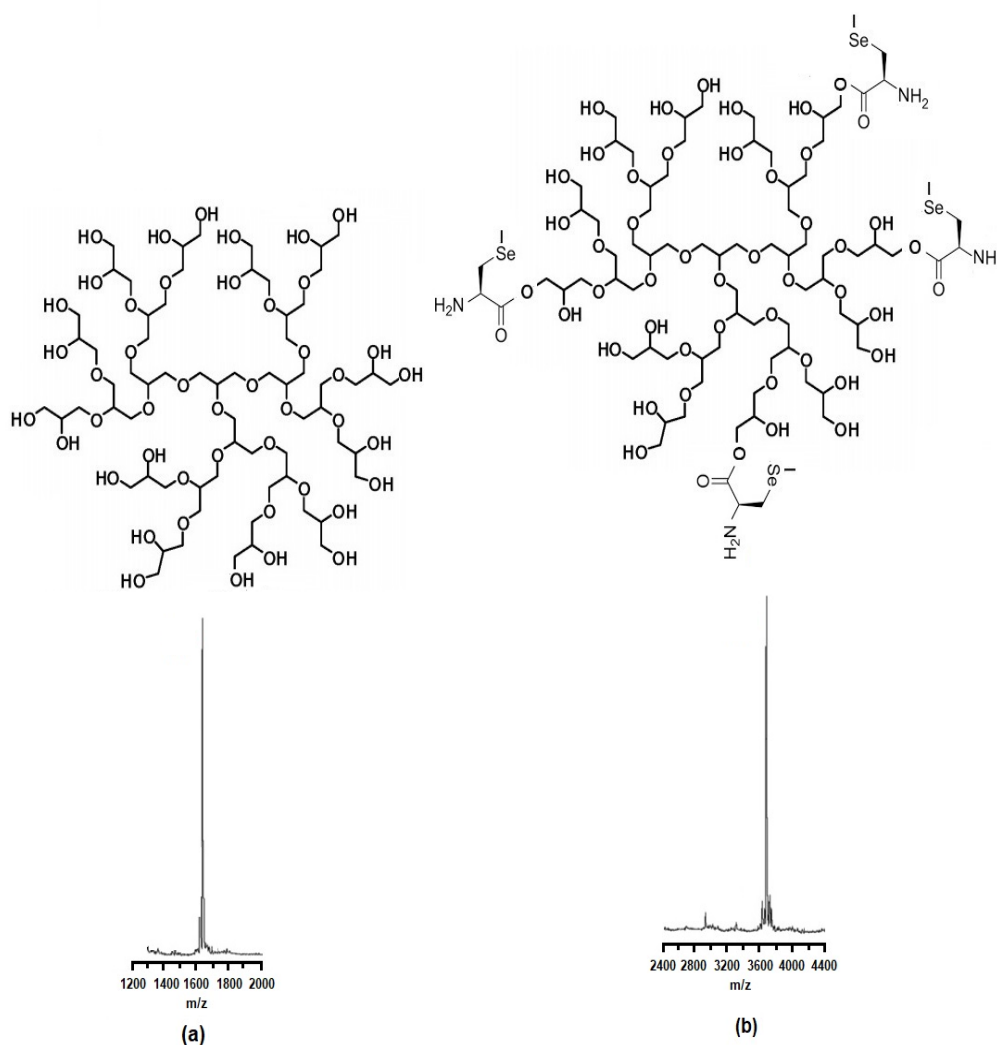
A quantidade de SeMeCis acoplada ao DPGLi atingiu um máximo de 10 mg por g de dendrímero após 3 h (Fig. 28), o que correspondeu a quase todos os grupos hidroxila primários no dendrímero.

Figura 28: (A) Espectro UV-Vis do complexo Se(IV):DAHMP e teor de Se em DPGLi resultante do acoplamento SeMeCis a DPGLi (B). A curva de calibração obedece à equação $A = 0,04018C$ (mg/mL^{-1}) + 0,0175, que possui coeficiente de Pearson ($r^2 = 0,9984$) em uma ampla faixa de concentração de 1-12 mg/mL^{-1} .



Os espectros de massa MALDI-TOF de DPGLi e SeMeCis-DPGLi são apresentados na Figura 29(a) e 29(b), respectivamente. O espectro MALDI-TOF de DPGLi (Fig. 29(a)) exibe um único pico no m/z em torno de 1.650 indicando a existência de núcleo de glicerol com 17 unidades monoméricas. O pico $[M + H]^+$ mais alto de SeMeCis-DPGLi é 3.646 (Fig. 29(b)). Como o peso molecular do DPGLi é 1.650, a diferença é 1.996. Esta diferença corresponde a 11 moléculas de SeMeCis combinadas com DPGLi e exclui a possível existência de conjugados não covalentes na amostra.

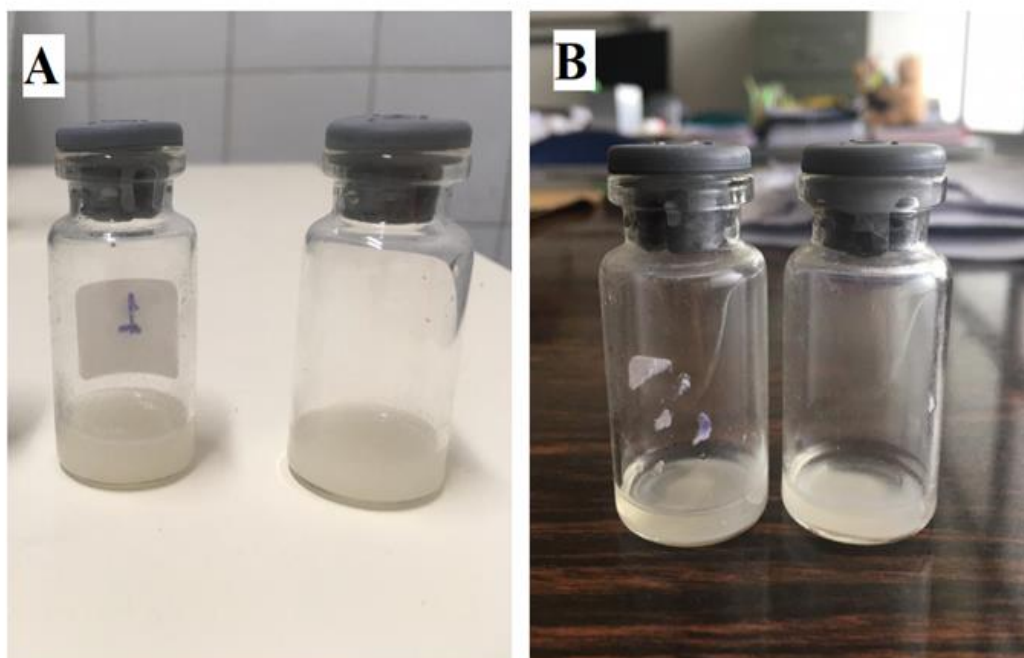
Figura 29: Espectro de massas MALDI do DPGLi (a) e seu conjugado SeMeCis-DPGLi (b).



5.2. Liofilização do dendrímero de selênio

A liofilização das amostras de DPGLi-Se foi realizada como uma etapa de separação (por sublimação) de rejeitos voláteis do processo de síntese. Uma vez que a temperatura de transição vítrea do DPGLi-Se está ao redor de -80°C , as amostras não sofreram congelamento total (Figura 30A). Portanto, o DPGLi-Se tende a persistir como uma camada líquida excluída durante a liofilização, uma vez que não congela em condições normais de liofilização. Entretanto, as impurezas resultantes do processo de síntese e água puderam ser removidas no processo de liofilização (Figura 30B), garantindo assim a integridade do DPGLi-Se. Para análise biológica inicial do composto de selênio realizou-se um teste piloto de avaliação da viabilidade celular via MTS/PMS. Esse ensaio teve como intuito de verificar a atividade antitumoral do dendrímero na linhagem de células MCF-7 e citotoxicidade em linhagem CHO-K1.

Figura 30: Imagem dos frascos com amostras de DPGLi-Se. A) Dendrímero de selênio antes da liofilização; B) Dendrímero de selênio após a liofilização.



5.3. Teste de viabilidade celular em células MCF-7 e CHO-k1

Para avaliar a ação do DPGLi-Se, foi realizado um teste de viabilidade celular, com uma curva de diluição de diferentes concentrações pelo período de 24, 48 e 72 horas nas linhagens celulares de carcinoma de mama (MCF-7) e as células de ovário de hamster chinês (CHO-k1).

O teste de viabilidade celular com as amostras do DPGLi-Se liofilizado foi realizada com uma curva de diluição de 1000µg/mL até 0,01µg/mL nas duas linhagens mencionadas (Figura 31 e 32). Para adequação e padronização dos experimentos o tempo escolhido para a aplicação do DPGLi-Se foi de 24 horas.

Figura 31: Gráfico obtido da avaliação da viabilidade celular em células MCF-7 do DPGLi-Se e controles: celular (CC) e DMSO 5% em células MCF-7.

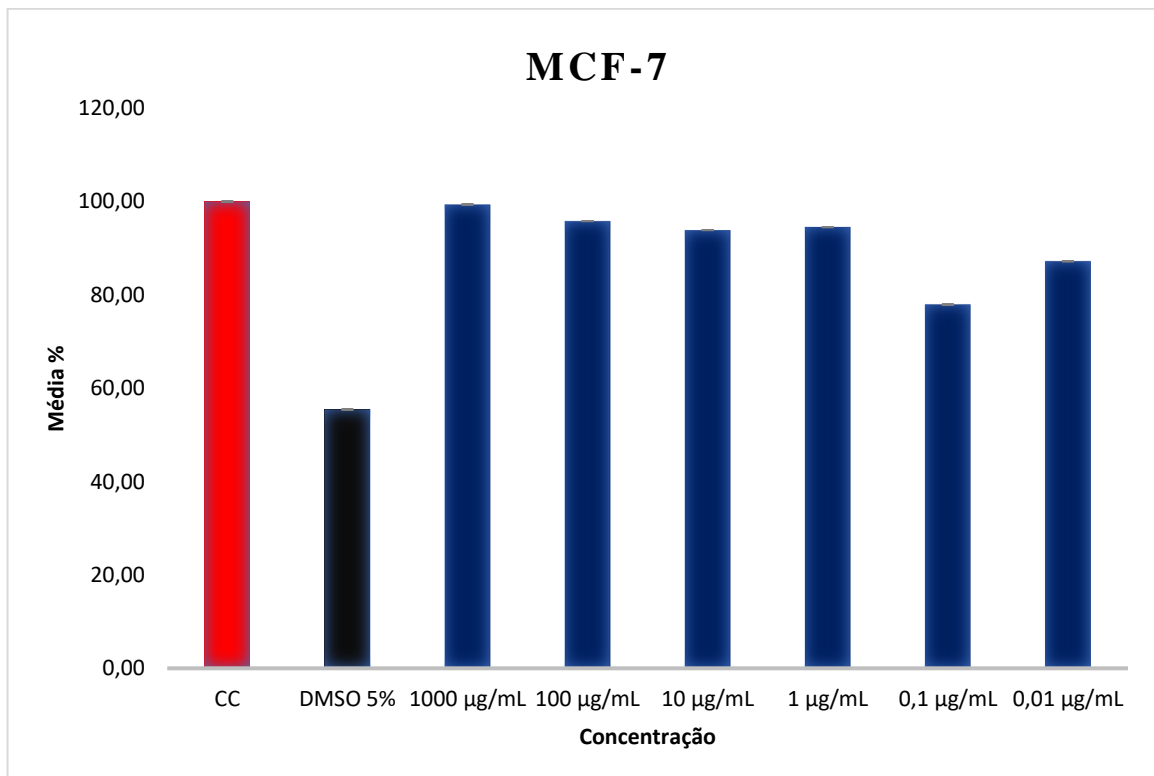
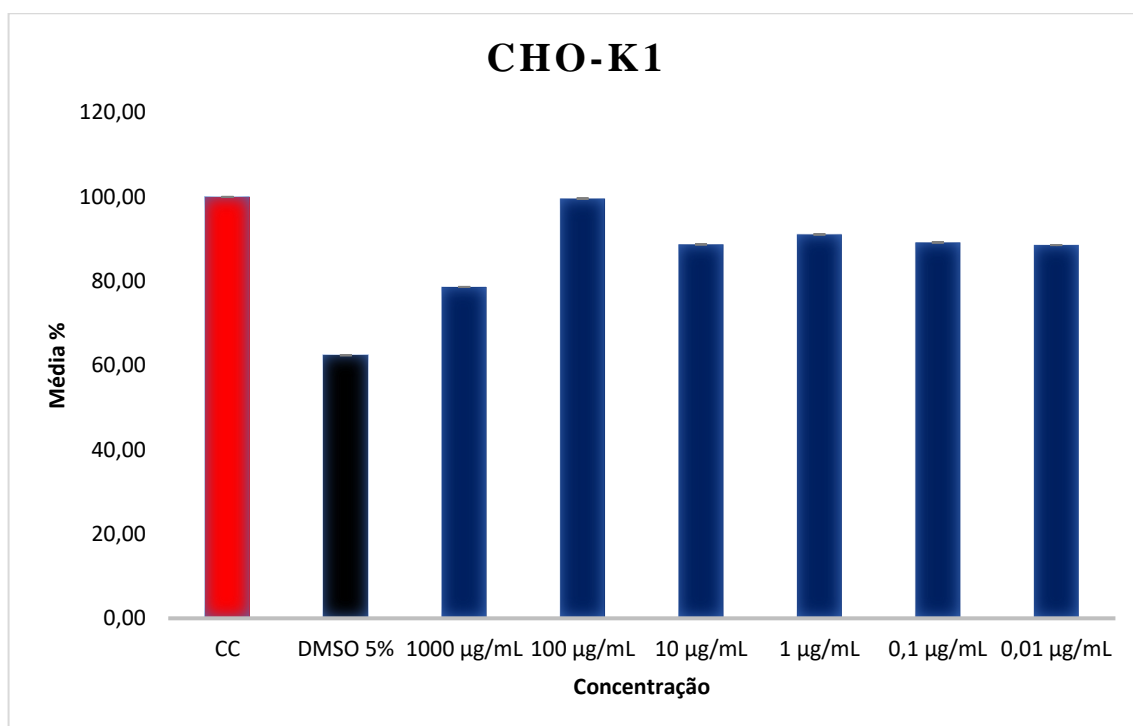


Figura 32: Gráfico obtido da avaliação da viabilidade celular em células CHO-k1 do dendrímero e controles: celular (CC) e DMSO 5% em células MCF-7.



Os resultados demonstram uma ação DPGLi-Se na proliferação celular em doses mais baixas (0,1µg e 0,01µg) no grupo de MCF-7. Mesmo diante do número de células viáveis do controle ser maior, é possível notar uma diferença da ordem de 10-12% em relação ao CC para as células CHO-K1 e ao redor de 25% para as células MCF-7. Na concentração 0,01µg a viabilidade é de 89,2 % para células CHO-k1 e 77,9% para células MCF-7. Esse pode ser um indicativo de uma seletividade do dendrímero para células MCF-7.

Como o esperado de um quimioterápico, o intuito é manter o mais alto possível a viabilidade celular das células de mamíferos (CHO-K1) e baixa a viabilidade celular das células tumorais (MCF-7). Sendo assim, avaliando que o desvio padrão é baixo e também a variância, o resultado é estatisticamente significativo. Entretanto, com o aumento das doses do DPGLi-Se, a quantidade de células viáveis aumenta consideravelmente diante do grupo de células MCF-7 e uma maior toxicidade na linhagem de CHO-k1. Diante desses resultados, foram realizados estudos com as mesmas concentrações utilizadas, porém com ensaios de 24, 48 e 72horas para avaliar a influência do tempo de incubação.

Figura 33: Gráfico obtido da avaliação da viabilidade celular em células MCF-7 no período de 24h, 48h e 72h.

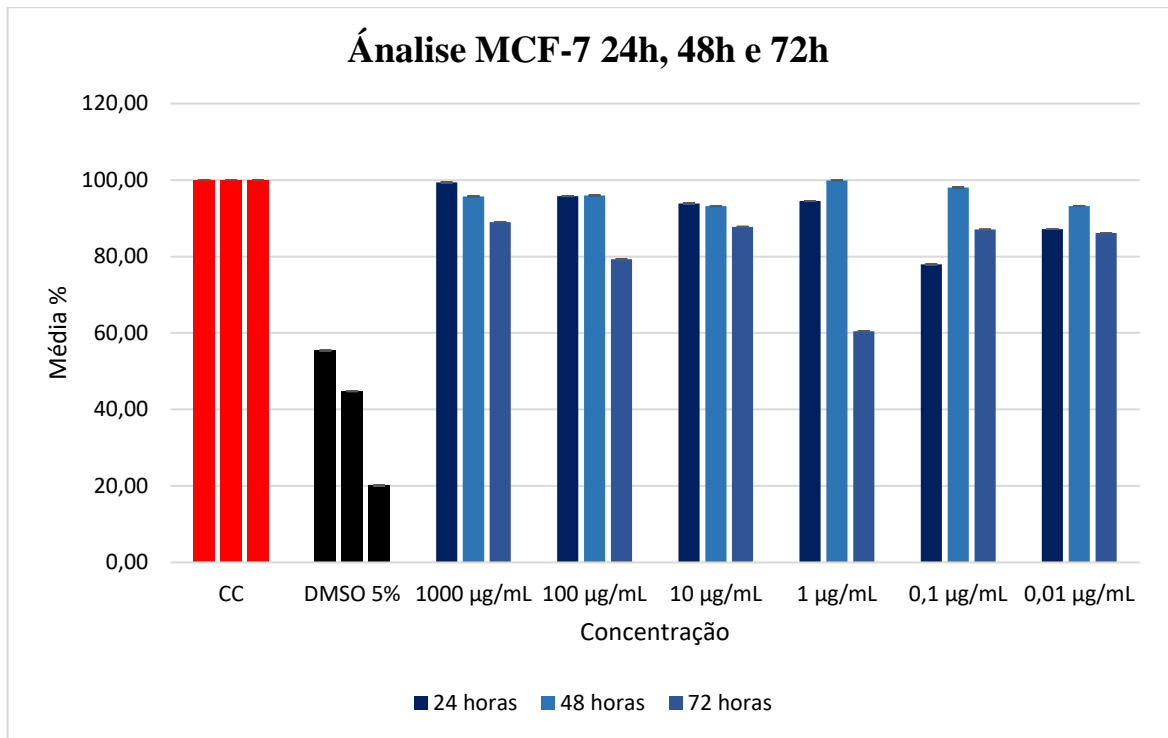
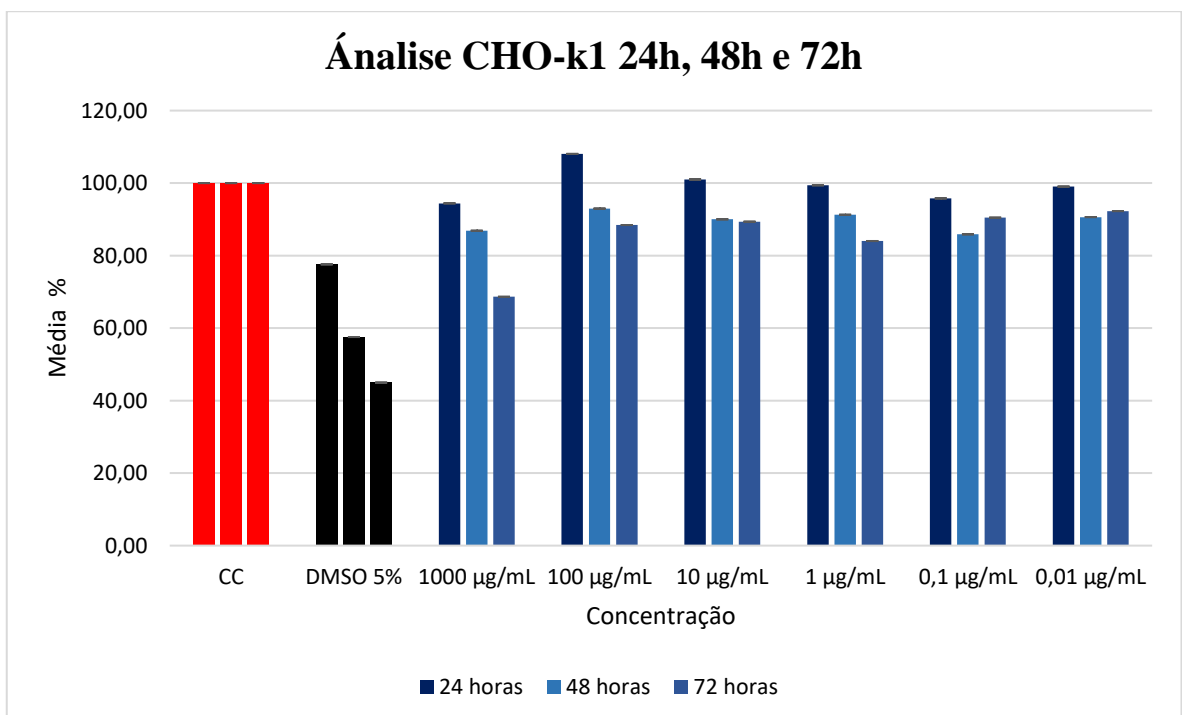


Figura 34: Gráfico obtido da avaliação da viabilidade celular em células CHO-k1 no período de 24h, 48h e 72h.



As células foram expostas ao DPGLi-Se por 24 horas, 48 horas e 72 horas com as concentrações: 1000µg/mL, 100µg/mL, 10µg/mL, 1µg/mL, 0,1µg/mL e 0,01µg/mL. Após esse período foi possível observar que altas concentrações em células não tumorais podem ser tóxicas quando exposta por 72 horas. Entretanto, esse resultado pode ser devido ao esgotamento de nutrientes no meio de cultura, facilitando a morte celular. Por outro lado, a concentração de 0,1µg/mL demonstrou uma toxicidade maior na linhagem MCF-7 do que na CHO-k1 nas primeiras 24h. Enquanto após 72h a concentração que demonstrou maior toxicidade foi a de 1 µg/mL, corroborando as análises anteriores de que o dendrímero de selênio apresenta uma atividade antitumoral maior em células MCF-7 diante das células CHO-k1. Por esse resultado, o DPGLi-Se demonstra uma atividade antitumoral específica em células MCF-7, nas concentrações mais baixas (Figura 33).

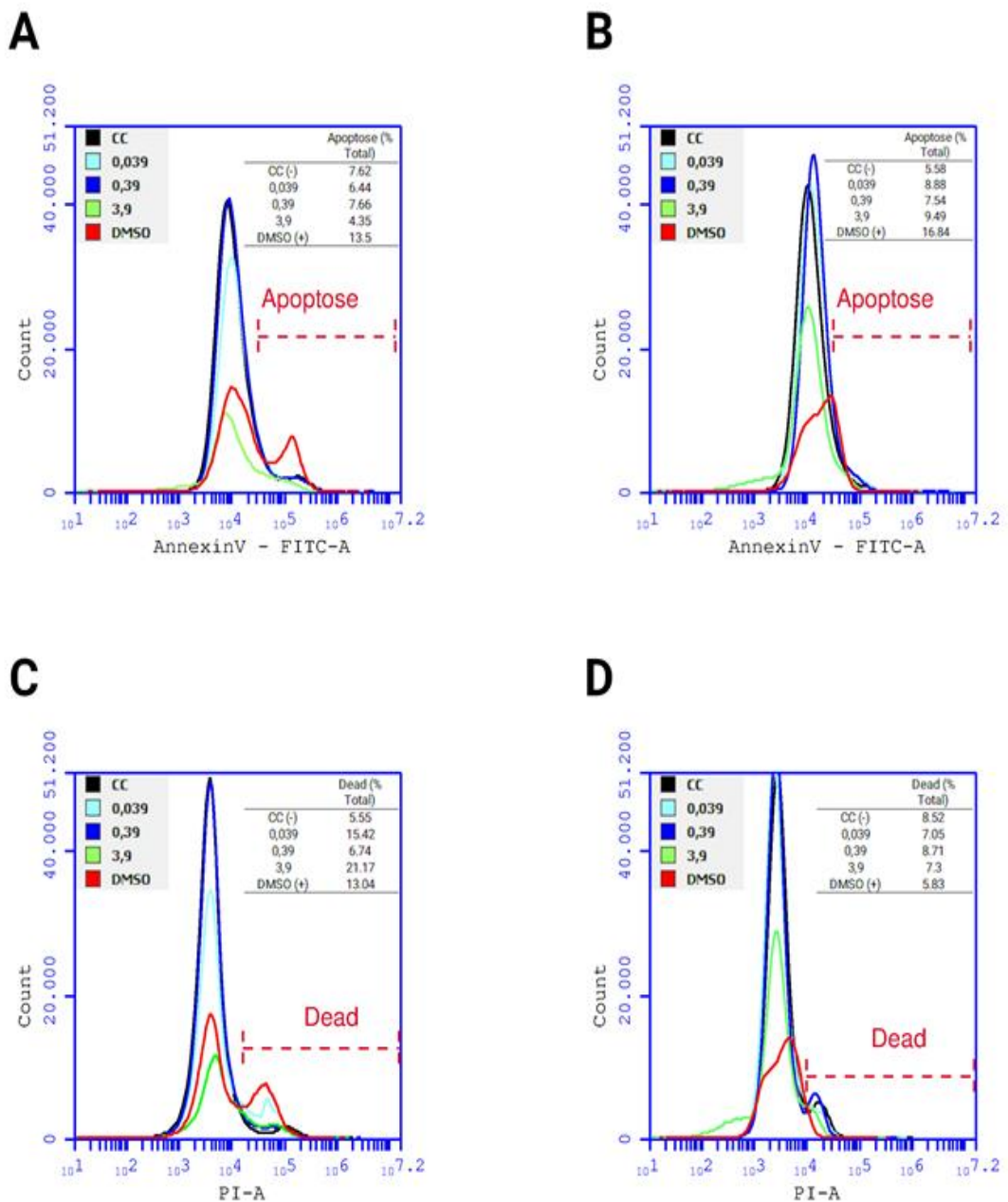
Já para a linhagem CHO-K1, os resultados de viabilidade celular se mantiveram similares nas diferentes concentrações (Figura 34), exceto na maior concentração onde é possível notar uma menor viabilidade diante das demais. As análises evidenciam, relativamente ao controle negativo que o dendrímero de selênio é mais tóxico para as células MCF-7 que para as células CHO-k1. Os primeiros resultados mostram uma toxicidade do DPGLi-Se próxima dos 30% relativamente ao controle negativo. Sendo assim, esse resultado indica uma seletividade da droga para a linhagem tumoral, possivelmente devido ao selênio ser um agente antioxidante.

5.4. Ensaio de apoptose

A análise de células em apoptose foi investigada pelo método de citometria de fluxo. A citometria de fluxo é um método utilizado para o estudo de células que permite avaliar características físicas e químicas de células isoladamente. Esta análise pode ser representada por gráficos avaliando por exemplo a intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo e as respectivas características morfológicas das células, afim de identificar as células em processo de apoptose.

Essa análise permitiu avaliar a influência do DPGLi-Se em induções de apoptose ou necrose em linhagens celulares de carcinoma de mama, sendo a MCF-7 a linhagem escolhida, e com isso foi utilizado a linhagem CHO-k1 como comparativo. O tratamento foi aplicado por 24 horas, e posteriormente quantificado o percentual de células apoptóticas por citometria de fluxo.

Figura 35: Frequência de apoptose em células CHO-k1 e MCF-7. Representação do gráfico de apoptose em células CHO-k1 (A) e em células MCF-7 (B), e de morte células em CHO-K1 (C) e MCF-7 (D);



A análise de apoptose permite observar que em MCF-7 na concentração de 3,9% o dendrímero induz a apoptose, entretanto quando comparado com a linhagem não tumoral, é possível avaliar que nessa linhagem, essa concentração demonstra toxicidade. A concentração exibiu maior toxicidade (curva verde) demonstrando um discreto estágio de apoptose em PI-A a partir da posição de 10^5 . Nessa condição, o dendrímero parece induzir apoptose, enquanto que o DMSO, não é possível observar a apoptose. Parece que o dendrímero apresenta um efeito apoptótico mais rápido nessa linhagem tumoral, o que pode implicar uma especificidade maior.

Por outro lado, o DMSO, no caso das células tumorais, tende a apresentar apoptose tardia, indicando que essa linhagem tumoral é realmente bastante resistente (Figura 35B). Esses resultados evidenciam o grande potencial dessa técnica nesse tipo de estudo, porém são necessárias análises mais abrangentes, avaliando a ação do DPGLI-Se em outras concentrações, em diferentes intervalos de tempo e a utilização de outros marcadores celulares mais específicos.

5.5. Avaliação hemolítica do dendrímero de selênio em sangue de rato Wistar

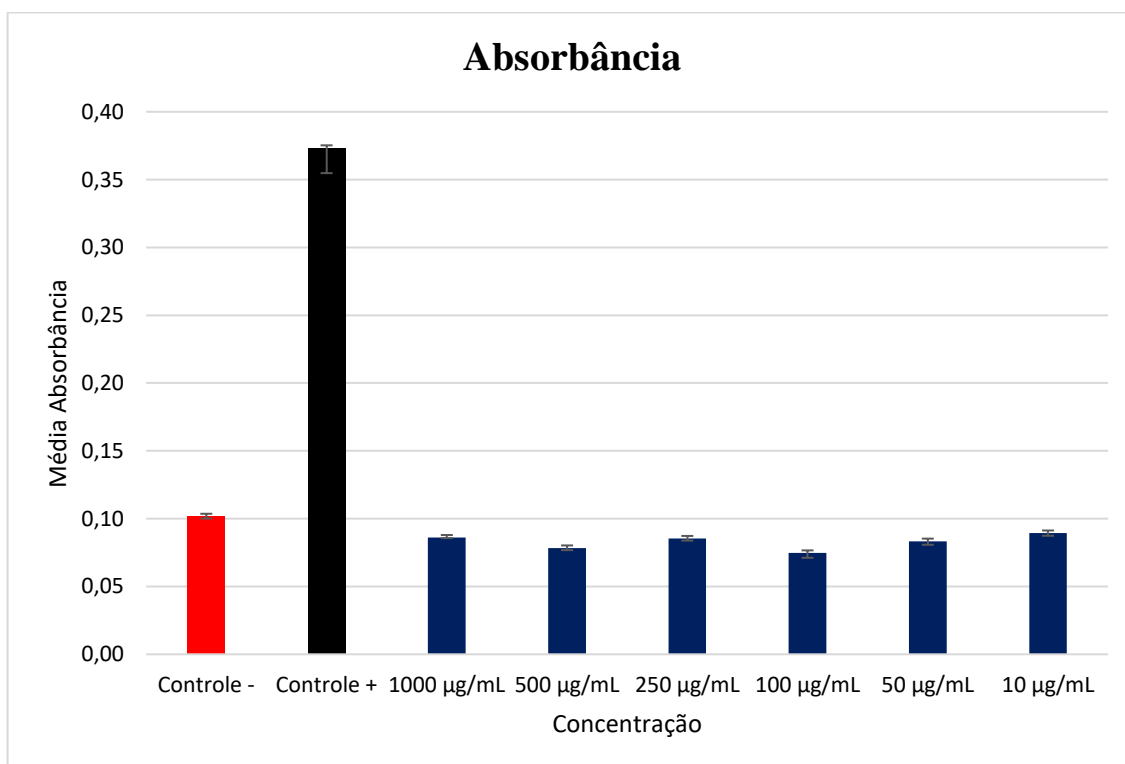
O desenvolvimento de novos fármacos necessita de estudos de toxicidade para reduzir os possíveis efeitos colaterais negativos ao ser humano. A alta atividade hemolítica provocando a liberação de hemoglobina pode levar a problemas nos rins (nefrotoxicidade) e no coração (efeito vasomotor) [115]. Além disso, diversas condições cardiológicas podem ocorrer com o uso de quimioterápicos como alterações metabólicas, hipertensão arterial sistêmica, síndromes coronarianas agudas, tromboembolismo arterial e venoso, arritmias entre outros [116].

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos da atividade hemolítica do DPGLI-Se em diferentes intervalos de concentrações na temperatura ambiente (22 °C) e a Figura 36, o gráfico correspondente.

Tabela 1: Demonstrativo de hemólise em diferentes concentrações de dendrímero.

Amostras	Absorbância
Controle –	0,10
Controle +	0,37
1000 µg/mL	0,09
500 µg/mL	0,08
250 µg/mL	0,09
100 µg/mL	0,07
50 µg/mL	0,08
10 µg/mL	0,09

Figura 36: Gráfico de hemólise em diferentes concentrações do dendrímero de selênio.



É de extrema importância que os compostos sejam considerados seguros, sem manifestações tóxicas ou sensibilizantes, que possam por em risco a saúde do usuário. Uma das maneiras de se avaliar a segurança é avaliar seu potencial citotóxico, ou seja, a capacidade do mesmo em provocar qualquer dano

ou alteração fisiológica em células selecionadas para o estudo. Dentre as metodologias mais empregadas, destaca-se a avaliação da citotoxicidade hemolítica, que avalia o grau de hemólise provocado por uma substância (ou extrato) quando incubada com uma suspensão padronizada de hemácias[117].

No ensaio de hemólise demonstrou que nas diferentes concentrações do DPGLI-se (Figura 36), o mesmo não demonstrou toxicidade hemolítica. As absorbâncias obtidas quando comparadas com o controle não alteraram significativamente. Com isso, o estudo que nas concentrações testadas o mesmo não induz a hemólise, indicando a segurança na utilização do DPGLI-Se.

5.6. Avaliação do potencial antioxidante do dendrímero de selênio em sangue de rato Wistar

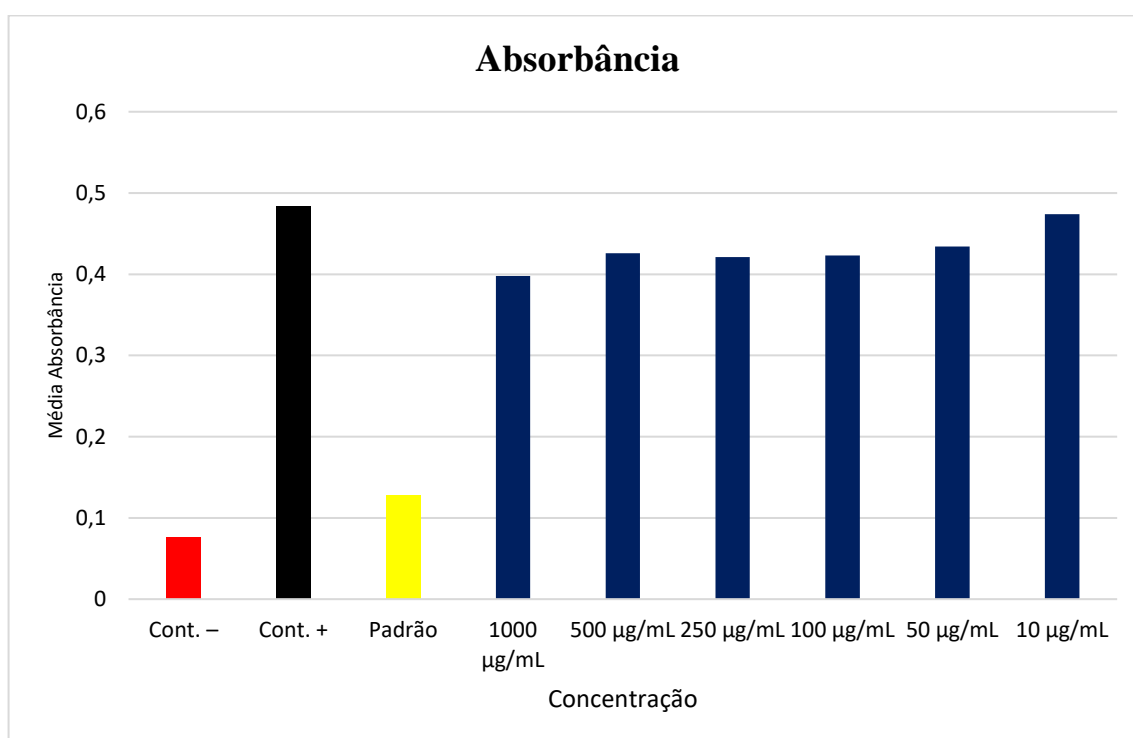
Radicais de oxigênio (ânion superóxido e radical hidroxila), espécies reativas de oxigênio não-radical como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete, são moléculas que podem ocasionar um estresse oxidativo, sendo responsáveis pela iniciação de cadeias de oxidação das cadeias de biomoléculas conduzindo a que conduz a danos no DNA e oxidação lipídica [118]. Evidências têm demonstrado que distúrbios do metabolismo são comuns em células tumorais, levando ao aumento do estresse oxidativo. A elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) associada à baixa atividade antioxidante tem sido relacionada a vários tipos de câncer. O selênio, micronutriente antioxidante, pode funcionar como um agente antimutagênico, prevenindo transformações malignas de células normais [119]. Um sistema de defesa antioxidante pode inativar tais radicais livres antes que estes possam interagir com o DNA [119].

A Tabela 2 apresenta os resultados da atividade antioxidante do composto DPGLI-Se em diferentes intervalos de concentração e a Figura 37 expressa graficamente esses resultados.

Tabela 2: Demonstrativo do potencial antioxidante em diferentes concentrações de dendrímero.

Amostras	Absorbância
Controle –	0,76
Controle +	0,484
Padrão	0,128
1000 µg/mL	0,398
500 µg/mL	0,426
250 µg/mL	0,421
100 µg/mL	0,423
50 µg/mL	0,434
10 µg/mL	0,474

Figura 37: Gráfico do potencial antioxidante em diferentes concentrações do dendrímero de selênio.



Os resultados apresentados (Figura 37) demonstram uma ausência de atividade antioxidante na menor concentração (10 µg/mL). Na maior

concentração (1.000 µg/mL) foi observada uma leve indicação da presença de ação antioxidante do dendrímero de selênio, apesar de não ser significativa perante o grupo de controle referência (vitamina C). A atividade antioxidante poderia potencializar os efeitos quimioterápicos do DPGLi-Se, levando à sua utilização em concentrações mais baixas induzindo a uma minimização dos efeitos colaterais.

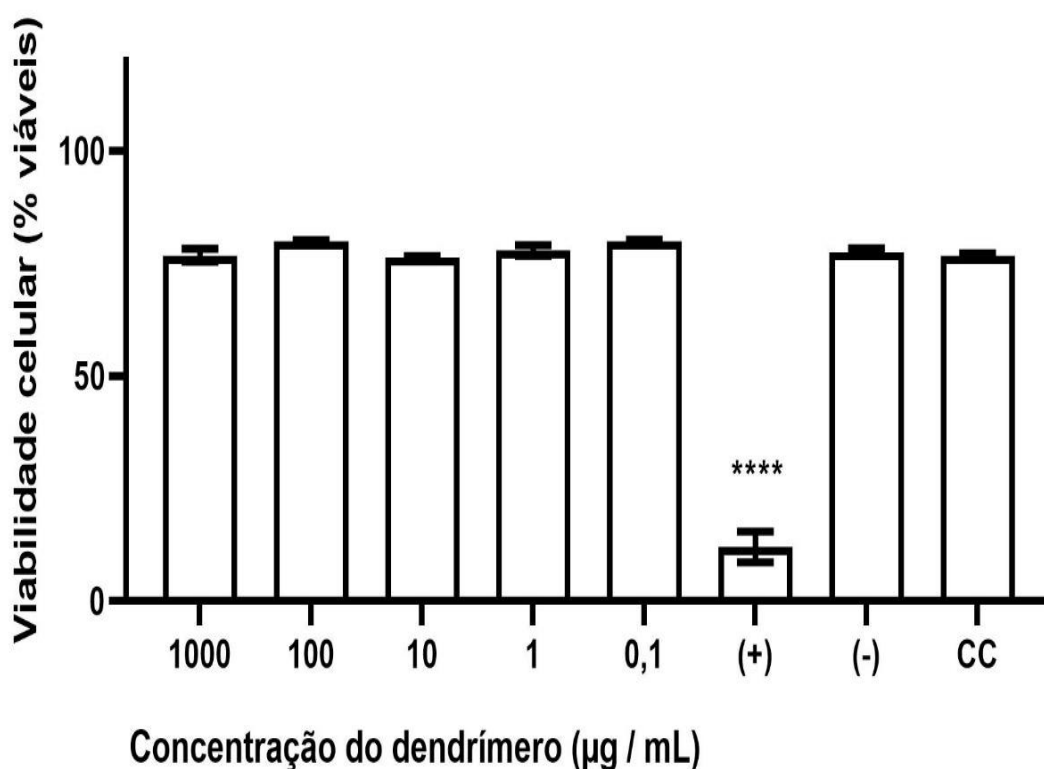
Embora o composto DPGLi-Se não tenha apresentado uma atividade antioxidante alta, a literatura também indica que não há evidências científicas suficientes para a utilização clínica de antioxidantes no tratamento oncológico [120]. A literatura também aponta que compostos antioxidantes possuem papéis não totalmente compreendidos na célula neoplásica. É fato sabido também da prática clínica que o excesso de substâncias antioxidantes podem se tornar pró-oxidativas na célula neoplásica devido ao processo redox e não são indicadas para pacientes muito oxidados, a exemplo dos tabagistas [121]. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho indicam que mais estudos são necessários para que seja possível entender o papel do baixa atividade antioxidante do DPGLi-Se na célula tumoral.

5.7. Ensaio de micronúcleos

Diaz e colaboradores (2007) usaram como critério de avaliação para porcentagem de frequência de micronúcleos os resultados positivos que apresentam diferença estatística significativa $p < 0,05$ comparados ao controle celular correspondendo a um aumento ≥ 3 vezes na porcentagem de frequência de micronúcleos. Estes autores classificam este dano igual ou menor a duas vezes o dano encontrado nos controles, sendo neste caso caracterizado como levemente genotóxico. Frequências de dano maiores que três vezes as encontradas nos controles são indicativas de compostos fortemente genotóxicos. A OECD 487 (2010) exige parâmetros de administração dos fármacos testes em vitro, para garantir seu não potencial genotóxico colocando critérios de aceitabilidade a serem cumpridas, os seguintes critérios são considerados para avaliação dos resultados. Um resultado positivo no ensaio de micronúcleo indica que a substância teste induz a perdas e quebras cromossômicas; um resultado

negativo indica que nas condições utilizadas a substância teste não induz quebras, perda ou ganho cromossômicos. Para considerar estes critérios foi necessário o uso de substâncias controles positivos com potencial genotóxico como são a MTMC e COLCH os quais mostraram interferência na cinética do ciclo celular e toxicidade nuclear em relação ao CC, como esperado por serem controles positivos e possuírem atividade aneugênica e clastogênica cumprindo com os critérios da OECD [122].

Figura 38: Gráfico da viabilidade celular.



Em resumo, os resultados observados na figura 38, demonstram que nesse estudo nenhuma das concentrações testadas de micronucleo apresentou efeitos citotóxicos, genotóxicos ou qualquer alteração no ciclo celular quando comparadas aos controles.

6. DISCUSSÃO

A importância do microambiente tumoral (TME) na progressão do câncer é um fato bem estabelecido pela literatura atual. Já que neoplasias são compostas por um tecido complexo que contém células tumorais e estroma circundante, preenchido por diferentes tipos de células mesenquimais e matriz extracelular. O TME desempenha um papel fundamental desde a carcinogênese até a metastização e o desenvolvimento de resistências terapêuticas nas doenças cancerígenas. A sua composição varia entre os tipos de tumor, mas as características marcantes incluem células imunes, células do estroma, vasos sanguíneos e matriz extracelular [123].

Resumidamente, TME é definido como o espaço onde fibroblastos associados ao cancro, células imunológicas, moléculas sinalizadoras, matriz extracelular e vascularização coexistem com células tumorais. Neste, as células tumorais conseguem mudar o seu fenótipo e adquirir propriedades funcionais que as tornam progressivamente mais mortais e são consideradas como hallmarks do cancro. Além de adaptarem-se às novas condições do meio onde proliferam [123].

A quimioterapia é a terapia líder a nível mundial, frequentemente combinada com cirurgia, ou cirurgia e radioterapia, dependendo do estado do tumor. Desde a descoberta de várias mutações importantes que contribuem para a carcinogênese, estas têm sido amplamente utilizadas como alvos para o desenvolvimento de medicamentos mais seletivos para combater o câncer. Apesar da sua eficácia, as resistências a múltiplos medicamentos têm aumentado, o que muitas vezes resulta na recidiva do tumor e na baixa qualidade de vida para os doentes. Um dos objetivos das terapias contra o câncer é eliminar as células transformadas ou, pelo menos, convertê-las num estado não proliferativo inofensivo. Dado o potencial de reeducar a natureza do TME em direção a uma imunidade anti-tumoral, nos últimos anos, muitos esforços têm sido dedicados para projetar novas estratégias eficazes capazes de atuar tanto nos componentes imunológicos, como os não imunes do TME [123].

Antes de avaliar o dendrímero, foi realizada uma liofilização para a remoção de impurezas e água resultantes do processo de síntese. Para avaliar o DPGLi-se, em uma primeira abordagem, foi utilizada um ensaio colorimétrico, que permite avaliar o efeito do dendrímero na proliferação celular e citotoxicidade. Nesse ensaio foi utilizada a metodologia de MTS/PMS (tetrazolium 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium / metossulfeto de fenazina) descrito por Cory et al. (1988) se baseia na capacidade das células vivas em reduzir o MTS, na presença de um acoplador de elétrons (PMS), em um produto solúvel (formazan) em meio de cultura, graças às enzimas desidrogenases mitocondriais. A quantidade de produto formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura [124].

Através da análise de proliferação celular, foram identificadas que o dendrímero de selênio mostra uma leve ação específica na inibição da proliferação das células tumorais MCF-7, em doses mais baixas. Além disso, ele apresenta uma atividade menos tóxica nas células CHO-K1, o que indica uma seletividade para as células MCF-7. Isso é exatamente o que esperamos de um quimioterápico, pois o objetivo é manter a viabilidade celular das células saudáveis e reduzir a viabilidade das células tumorais. Portanto, o dendrímero de selênio tem potencial como uma possível opção de tratamento para o câncer. Porém, à medida que a dose do composto aumenta, o número de células viáveis cresce significativamente em comparação ao grupo de células não tratadas, tanto na linhagem de CHO-k1 quanto na MCF-7. Durante os experimentos de 24h, 48h e 72h, percebemos que altas concentrações em células não tumorais podem ser tóxicas quando expostas por 72 horas. Porém, uma justificativa para esses resultados pode ser a carência de nutrientes no meio de cultura, ocasionando a morte celular.

Após constatar uma redução na quantidade de células viáveis e uma inibição na proliferação celular, é fundamental compreender qual mecanismo de morte celular está ocorrendo, se é por indução de apoptose ou se o dendrímero está causando necrose celular. Essa informação é crucial para entendermos como o DPGLi-Se está afetando as células e para direcionar futuras abordagens terapêuticas. Uma substância que consegue eliminar células neoplásicas

primariamente através de necrose não tem valia como quimioterápico pois irá desencadear sérios efeitos colaterais ao paciente [44].

No câncer, há uma perda de equilíbrio entre a divisão celular e a morte celular e as células que deveriam ter morrido não receberam os sinais para isso. O problema pode surgir em qualquer etapa ao longo do caminho da apoptose. Na década de 1970, Kerr et al haviam relacionado a apoptose com a eliminação de células potencialmente malignas, hiperplasia e progressão tumoral. Portanto, a apoptose reduzida ou sua resistência desempenha um papel vital na carcinogênese [125].

A morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfológicamente por aumento de volume citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular, provocando uma resposta inflamatória. Esse processo pode afetar células vizinhas, ou seja, nesta condição um grande número de células lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório, há alterações irreversíveis em todo tecido e/ou órgão. Por outro lado, o processo apoptótico envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração das organelas [44].

Com isso, foi realizado um ensaio de apoptose pela técnica de citometria de fluxo, o qual permite entender os mecanismos celulares envolvidos na morte programada das células. Com a capacidade de analisar a intensidade de fluorescência e identificar características morfológicas das células, possibilitando identificar as células que estão passando pelo processo de apoptose. A técnica consiste em analisar através de representações gráficas da intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo, o que permite compreender as respectivas características morfológicas das células. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o dendrímero de selênio não apresentou efeitos significativos de apoptose nas células nas concentrações testadas. Embora tenha sido observado um discreto estágio de apoptose em PI-A na concentração de 0,01, essa toxicidade foi considerada mínima.

A partir destes resultados, foi sugerido um ensaio para avaliar a ação hemolítica do dendrímero de selênio e avaliar o potencial antioxidante do dendrímero de selênio em sangue de rato. As atividades antioxidante e antitumoral podem ser antagônicas, uma vez que um dos possíveis mecanismos de ação de compostos com atividade antitumoral pode ser a inativação do sistema antioxidante, causando o acúmulo das EROS e a indução de morte por apoptose [126].

A hemólise é determinada fundamentalmente pela precipitação da hemoglobina e formação de corpúsculos de Heinz, pela oxidação dos grupos tiol das enzimas citoplasmáticas e da membrana celular e, secundariamente, pela oxidação de lípidos da membrana eritrocitária. A hemólise pode ser desencadeada por infecções e por algumas drogas com propriedades oxidativas como o ácido acetilsalicílico, a vitamina K e o cloranfenicol. Além de fatores externos como situações de estresse ou infecções, também podem precipitar crises hemolíticas. Normalmente a hemólise aparece de um a três dias após o contato com os fatores desencadeantes. Além disso, a hemólise pode ocasionar a anemia hemolítica, devido ao consumo de certas substâncias com caráter oxidante [127].

O teste de hemólise determina se uma substância é tóxica para as células vermelhas do sangue, conhecidas como hemácias. Neste estudo, o objetivo foi investigar se diferentes concentrações do DPGLi-Se apresentavam toxicidade hemolítica. Os resultados obtidos não demonstraram toxicidade nas diferentes concentrações do DPGLi-Se. Isso significa que a substância não causou danos às hemácias, o que é um indicativo importante para sua segurança. Para avaliar a toxicidade hemolítica, foram realizadas medidas de absorbância das amostras em diferentes concentrações do DPGLi-Se, comparando-as com um controle. Ao comparar as absorbâncias obtidas nas diferentes concentrações do DPGLi-Se com o controle, não foram observadas alterações significativas. Isso indica que a substância não causou ruptura das membranas das hemácias, que é um dos principais efeitos da toxicidade hemolítica. Esses resultados são extremamente relevantes, uma vez que a toxicidade hemolítica pode ter consequências graves para a saúde.

Ao analisar a ação antioxidante do dendrímero de selênio em sangue de rato em diferentes concentrações do composto, observou-se uma ausência de atividade antioxidante na menor concentração testada, de 10 µg/mL. No entanto, na maior concentração, de 1.000 µg/mL, foi possível identificar uma leve indicação de ação antioxidante do DPGLi-Se. No entanto, é importante ressaltar que nenhuma das concentrações testadas apresentou uma ação significativa quando comparadas aos controles. Esses resultados sugerem que é necessário investigar mais a fundo o potencial antioxidante desse dendrímero em diferentes concentrações e condições experimentais.

Em 1991, Tolbert, Shy e Allen sugeriram que em preparações citológicas para análise de micronúcleo fossem também computadas alterações indicativas de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada e picnose). Este procedimento aumenta a sensibilidade do teste sendo particularmente importante na prevenção do câncer, uma vez que a apoptose, ao eliminar células geneticamente defeituosas, exerce controle sobre a proliferação exacerbada que posteriormente poderia resultar em um tumor [128].

Por ser estimulada tanto por radiação ionizante quanto por substâncias químicas que se ligam ao DNA, a apoptose também pode ter um papel de vigilância, eliminando células com danos genéticos; Assim, a apoptose, acima dos níveis normais, pode ser um indicador de ação genotóxica [129].

Para análise da eficácia, e segurança do DPGLi-Se como agente tumoral, uma nova abordagem foi utilizada, foi estudada a ação genotóxica do dendrímero. Foi realizado o ensaio de micronúcleos, essa é uma análise citogenética utilizada para detectar danos no material genético das células, permitindo identificar a formação de micronúcleos, que são pequenas estruturas que carregam fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não são incorporados aos núcleos das células filhas durante a divisão celular.

Os grupos de células expostas ao dendrímero não demonstraram a formação de micronúcleos, a ausência de danos no material genético e, conseqüentemente, demonstrando a ausência de genotoxicidade nas células avaliadas. Validando os resultados obtidos anteriormente.

Uma pesquisa conduzida por Young SEO, Mark KELLEY e Martin SMITH, e publicada pela revista *Proceedings of the National Academy of Sciences*, apresentou uma nova hipótese. De acordo com o estudo, células que possuem a proteína p53 em sua forma normal teriam uma resposta distinta ao tratamento com Seleniometionanida (SeMet), em comparação com células que não possuem a proteína p53. Além disso, foi sugerido que a concentração de selênio seria um fator importante na atividade basal da p53, e que a proteção do DNA proporcionada pela SeMet estaria diretamente ligada à presença da p53.

A regulação redox é crítica para várias proteínas. No caso do p53, uma implicação importante é que a atividade do p53 pode ser aumentada por mecanismos antioxidantes, protegendo assim as células dos danos ao DNA. Na medida em que o reparo do DNA começa imediatamente após o dano ao DNA, a atividade basal de p53 e a expressão do gene efetor a jusante são críticas para a resposta de reparo. Existem 10 resíduos de cisteína no p53 humano completo que estão potencialmente sujeitos à regulação redox [130].

Embora a eliminação de células danificadas por meio da apoptose seja um mecanismo promissor para a prevenção do câncer, a p53 tem mostrado associação com apoptose apenas em certos tipos de linhagens celulares. No nosso estudo, não foi observada inibição do crescimento celular nem desencadeamento de apoptose em nenhuma das linhagens celulares investigadas. Isso, pode ser explicado pelo fato de que os níveis endógenos de dano ao DNA não terem sido suficientes para ativar o processo de apoptose. Ou, é possível que modificações adicionais, como a fosforilação, sejam necessárias para ativar a p53 e induzir a apoptose, considerando que o estado redox é apenas uma das muitas formas de regulação da p53.

As propriedades quimiopreventivas do câncer dos compostos de selênio estão bem documentadas, mas pouco se sabe sobre o(s) mecanismo(s) pelo qual esses agentes inibem a carcinogênese [128]. Essas descobertas são realmente fascinantes e podem abrir novas perspectivas na pesquisa do papel desempenhado pelo selênio em suas duas diferentes formas na resposta celular. Isso representa a oportunidade para avançarmos significativamente no desenvolvimento de terapias mais eficazes e direcionadas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho, com o DPGLi-Se, confirmaram a ausência de efeitos citotóxicos para as células CHO-K1, corroborando com estudos anteriores conduzidos pelo grupo. No entanto, apesar de promissores, os resultados obtidos até o momento pelo DPGLi-Se, realizados com a linhagem celular MCF-7, ao contrário do observado em trabalho anterior do grupo com relação à linhagem de tumor de pescoço (HNSCC), no caso da MCF-7, os efeitos citotóxicos foram menos específicos. O que indica a necessidade de novos estudos que possam elucidar os mecanismos envolvidos no comportamento citotóxico do composto, visando sua aplicação potencial na área da oncologia. Além disso, é fundamental expandir a pesquisa para outras linhagens celulares, a fim de verificar a especificidade do DPGLi-Se em diferentes contextos. Essa próxima etapa será fundamental para construir uma base sólida de conhecimento e alcançar avanços significativos na área.

As técnicas padronizadas e utilizadas no presente trabalho e os resultados obtidos têm potencial aplicação para o desenvolvimento de tratamentos tumorais mais eficazes e específicos. Os dendrímeros podem ser uma opção terapêutica importante, mas estudos avaliando diferentes linhagens tumorais são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Aunan J.R., Cho W.C., Soreide K. The biology of aging and cancer: a brief overview of shared and divergent molecular hallmarks. **Aging Dis.**, Vol. 8:628–642, 2017.
- [2] Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, **C.A. Cancer J. Clin.** Vol. 65:5-29, 2015.
- [3] Finkel T., Serrano M., Blasco M.A. The common biology of cancer and ageing, **Nature** Vol. 448: 767-774, 2007.
- [4] Zinger A., Cho W.C., Ben-Yehuda A. Cancer and aging- the inflammatory condition, **Aging Dis.** Vol. 8: 611-27, 2017.
- [5] López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging, **Cell.** Vol. 153: 1194-1217, 2013.
- [6] Verschoor M.L., Wilson L.A., Singh G. Mechanisms associated with mitochondrial-generated reactive oxygen species in cancer. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** Vol. 88:204-19, 2010.
- [7] Wang C., Youle R.J. The Role of mitochondria in apoptosis, **Annu. Rev. Genet.** Vol. 43: 95-118, 2009.

[8] Adams J.M., Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Curr. Opin. Immunol.** Vol. 19: 488-96, 2007.

[9] Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer.** Vol. 4: 592-603, 2004.

[10] Popa M.A., Wallace K.J., Brunello A., Extermann M., Balducci L. Potential drug interactions and chemotoxicity in older patients with cancer receiving chemotherapy, **J. Geriatr. Oncol.** Vol. 5: 307-14, 2014.

[11] Balducci L., Carreca I. Supportive care of the older cancer patient, **Critical Rev. Onc. Hemat.** Vol. 48: 65-70, 2003.

[12] Noyoselov S.V., Rao M., Onoshko N.V., Zhi H., Kryukov G.V., Xiang Y., Weeks D.P., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Embo J.** Vol. 21: 3681-3693, 2002.

[13] Labunskyy V.M., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. **Physiol Rev.** Vol. 94: 739-777, 2014.

[14] Lubos E., Loscalzo J., Handy D.E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Redox Signal** Vol. 15: 1957-97, 2011.

[15] Orian L., Mauri P., Roveri A., Toppo S., Benazzi L., Bosello-Travain V., De Palma A., Maiorino M., Miotto G., Zaccarin M., Polimeno A., Flohé L., Ursini F.

Selenocysteine oxidation in glutathione peroxidase catalysis: an MS-supported quantum mechanics study. **Free Radic. Biol. Med.** Vol. 87: 1-14, 2015.

[16] Gladyshev V.N., Kryukov G.V. Evolution of selenocysteine-containing proteins: significance of identification and functional characterization of selenoproteins, **Biofactors** Vol. 14: 87-92, 2001.

[17] Gladyshev V.N., Hatfield D.L. Selenocysteine-containing proteins in mammals. **J. Biomed. Sci.** Vol. 6: 151-60, 1999.

[18] Lisanti M.P., Martinez-Outschoom U.E., Lin Z., Pavlides S., Whitaker-Menezes D., Pestell R.G., Howell A., Sotgia F. Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis, **Cell Cycle** Vol.10: 2440-2449, 2011.

[19] Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R., Wessiohann L.A., Seliger B. Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells. **Cell Commun. Signal** Vol. 13: 1-19, 2015.

[20] Gouirand V., Guillaumond F., Vasseur S. Influence of the tumor microenvironment on cancer cells metabolic reprogramming, **Front. Oncol.** Vol. 8: 1-, 2018.

[21] GUEDES¹, Daniele Ramos; DA SILVA COUTINHO, Glenda; PIMENTEL, Josiana Alves. Mulheres que superaram o Câncer: À volta ao mercado de trabalho.

[22] INSTITUTO Nacional do Câncer. INCA, 2011. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>. Acesso em: 15 Maio 2023.

[23] THIBODEAU, Gary A. **Estrutura e funções do corpo humano**. Editora Manole Ltda, 2002.

[24] TEIXEIRA, D. A. PATOLOGIA GERAL. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n. 4, p. 177-87, 2003.

[25] MOURA, Elomar Rezende et al. Metaplasia e lesões histopatológicas de mucosa esofágica. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e29711225778-e29711225778, 2022.

[26] SILVA, Helen Vargas et al. Câncer de Próstata: Retrato de uma realidade dos pacientes, a importância e o preconceito com o toque retal Prostate Cancer: Portrait of a patients' reality, the importance and the prejudice with the rectal touch. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 4, p. 14551-14561, 2021.

[27] COIMBRA, Emerson Lucas Da Silva et al. AVALIAÇÃO DO CONHECIMENTO DO CIRURGIÃO-DENTISTA E GRADUANDOS DE ODONTOLOGIA NA IDENTIFICAÇÃO CLÍNICA DE UMA LESÃO PRÉ-MALIGNA E MALIGNA. **REVISTA DE TRABALHOS ACADÊMICOS-CAMPUS NITERÓI**, v. 1, n. 18, 2019.

[28] DE MELO, Vanessa Costa et al. Produção científica sobre envelhecimento e câncer: uma revisão integrativa.

[29] SILVA, Alexandra Rodrigues Pereira da. Estudo das propriedades bioquímicas de sistemas poliméricos arborescentes PGLD-AAS para o tratamento do câncer. 2008.

[30] MAUTNER, Beatrice; HUANG, David. Biologia Molecular e Imunologia. In: **Seminários em enfermagem oncológica** . WB Saunders, 2003. p. 154-161.

[31] ALMEIDA, Vera Lúcia de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

[32] BRAZIL, Luís Otávio Sottero. O câncer e as alterações no estado nutricional do paciente: importância da atenção farmacêutica. 2011.

[33] SILVA, Thalyta Mayara Andrade et al. Perfil nutricional de pacientes com câncer do trato digestório internados em um hospital universitário do estado do Pará. 2021.

[34] ALVAREZ ALDANA, Adalucy; SEPULVEDA ARIAS, Juan Carlos; SILLER LOPEZ, Fernando. CARCINOGENESE INDUCIDA POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO. **Investigar. andina** , Pereira, v. 14, n. 24, pág. 438-456, abril de 2012.

[35] GOMES-CARNEIRO, Maria Regina; RIBEIRO-PINTO, Luís Felipe; PAUMGARTTEN, Francisco José Roma. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 13, p. S27-S38, 1997.

[36] LEÃO, Myra Jurema da Rocha et al. Perfil epidemiológico e fatores de risco relacionados ao câncer de mama em mulheres atendidas em dois centros de referência em Alagoas. 2021.

[37] OLIVEIRA, Paula A. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da academia brasileira de ciências**, v. 79, p. 593-616, 2007.

[38] FERREIRA, Elides Borsari Pinto. Síntese e caracterização de nanopartículas com estrutura granada para tratamento do câncer por hipertermia. 2020.

[39] GONZÁLEZ, Raimundo P. et al. Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 15, p. 168-173, 2000.

[40] ANDRE, T. et al. Tumoral angiogenesis: physiopathology, prognostic value and therapeutic perspectives. **La Revue de Medecine Interne**, v. 19, n. 12, p. 904-913, 1998.

[41] PINHO, MSL Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Rev Bras Coloproctol** , v. 25, p. 396-402, 2005.

[42] VILLARROEL, Sara Yrma Piccinin et al. Angiogênese Pulpar: Biologia, Importância e Aplicações Terapêuticas–Uma Revisão de Literatura. 2019.

[43] SHAHI, Parham Khosravi; PINEDA, Israel Fernández. Angiogênese tumoral: revisão da literatura. **Investigação do câncer** , v. 26, n. 1, pág. 104-108, 2008.

- [44] MOURA, Renata Mendes. **Avaliação do potencial antiproliferativo do Dendrímero de Poliglicerol associado ao celecoxibe em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [45] ONUCHIC, Ana Cláudia; CHAMMAS, Roger. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de medicina**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.
- [46] FIGUEIREDO, Cláudia Roberta LV. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 55, p. 321-332, 2019.
- [47] CUNHA, Camila Adrielle Santos et al. Análise da Incidência e das Relações entre as Principais Doenças Reumatológicas em Pacientes com Câncer de Mama: Uma Revisão Integrativa. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 6676-6688, 2021.
- [48] CHUN, Kyung-Soo; SURH, Young-Joon. Vias de transdução de sinal que regulam a expressão da ciclooxigenase-2: potenciais alvos moleculares para quimioprevenção. **Farmacologia bioquímica**, v. 68, n. 6, pág. 1089-1100, 2004.
- [49] IADECOLA, Costantino; GORELICK, Philip B. The Janus face of cyclooxygenase-2 in ischemic stroke: shifting toward downstream targets. *Stroke*, v. 36, n. 2, p. 182-185, 2005.
- [50] MAZHAR, D.; GILLMORE, R.; WAXMAN, J. COX e câncer. **Qjm**, v. 98, n. 10, pág. 711-718, 2005.

[51] SOUZA, Waldemir Fernandes de et al. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 30-33, 2014.

[52] MAGALHÃES, Paula Lima et al. Imunomarcção dos receptores de Egf (Egfr E C-ErbB2) no carcinoma de células escamosas em cães. 2017.

[53] LEITE, C. A. V. G. et al. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, p. 130-142, 2012.

[54] DE LIMA, Tiago FO; DUARTE, Diego A.; SÁ, André Luís Braghini. FUNÇÃO MITOCONDRIAL. EM FOCO APOPTOSE, TERMORREGULAÇÃO E DNA MITOCONDRIAL.

[55] GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; DA ROCHA, Adriana Brondani. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

[56] LIMA, José Geraldo Bomfim et al. **Efeito da autofagia sobre a capacidade fagocítica e sobre a infecção de macrófagos de camundongos CBA/J por Leishmania amazonensis**. 2009. Tese de Doutorado.

[57] MEIJER, Alfred J.; CODOGNO, Patrice. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 12, p. 2445-2462, 2004.

[58] FELIPE, Karina Bettega et al. Estudo do mecanismo de ação antiproliferativa e antitumoral de extratos de *Casearia Sylvestris* e de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio. 2014.

[59] LOWE, Scott W.; LIN, Athena W. Apoptose em câncer. **Carcinogênese**, v. 21, n. 3, pág. 485-495, 2000.

[60] NETO, Ana Soares da Silva Rodrigues. **Glutaciona: Envolvimento em Defesa Antioxidante, Regulação de Morte Celular Programada e Destoxificação de Drogas**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa (Portugal).

[61] KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; FAUSTO, Nelson (Ed.). **Robbins & Cotran-Patologia**. Elsevier Brasil, 2005.

[62] GASQUES, Luciano Seraphim et al. Independência ou morte: a apoptose como mecanismo de defesa. **Arq Ciênc saúde UNIPAR**, n. 1, p. 49-53, 2013.

[63] GONZAGA, Amanda Cristina Reis. Estudo comparativo do perfil apoptótico ativado pelas vias intrínseca e extrínseca na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. 2013.

[64] GABRIEL, Gabriela et al. Definições e mecanismos moleculares em morte celular. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 26, 2017.

[65] RAMOS, Fábio Montanha et al. Aplicação de Realidade Virtual para construção de Atlas de Anatomia e Fisiopatologia do Câncer de Mama. 2006.

[66] Bernardes, António. "Anatomia da mama feminina." *Manual de Ginecologia* 2.12 (2011): 12-24.

[67] ÓRFÃO, Adelaide; GOUVEIA, Cristina. Apontamentos de anatomia e fisiologia da lactação. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 25, n. 3, p. 347-54, 2009.

[68] FERREIRA, AMANDA DE OLIVEIRA et al. MUTAÇÕES DOS GENES BRCA 1 E BRCA 2 E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER DE MAMA.

[69] DE ARAUJO FRANCO, Amanda et al. Contributos da alimentação saudável como estratégia de prevenção e enfrentamento do câncer: uma perspectiva da enfermagem. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 2, n. 4, p. e24214-e24214, 2021.

[70] RODRIGUES, Brena Carolina Leite et al. O EXERCÍCIO FÍSICO CONTRIBUI PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA. **BIUS-Boletim Informativo Unimotrisaúde em Sociogerontologia**, v. 18, n. 12, p. 1-6, 2020.

[71] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Deteção precoce do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2021b. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/deteccao-precoce-do-cancer_0.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2023.

[72] DINIZ, RAIMUNDO NONATO TEIXEIRA et al. ABORDAGENS FARMACOLÓGICAS NA TERAPIA DO CÂNCER DE MAMA: UMA REVISÃO SOBRE OS MODULADORES ESTROGÊNICOS. **Uningá Review**, v. 30, n. 2, 2017.

[73] OHL, Isabella Cristina Barduchi et al. Ações públicas para o controle do câncer de mama no Brasil: revisão integrativa. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 69, p. 793-803, 2016.

[74] PAULINELLI, Régis Resende; MOREIRA, Marise Amaral Rebouças; FREITAS JÚNIOR, Ruffo de. A importância do diagnóstico precoce do câncer de mama. **Femina**, p. 233-237, 2004.

[75] AUNAN, Jan R.; CHO, William C.; SØREIDE, Kjetil. A biologia do envelhecimento e do câncer: uma breve visão geral das marcas moleculares compartilhadas e divergentes. **Envelhecimento e doença**, v. 8, n. 5, pág. 628, 2017.

[76] FALLER, Jossiana Wilke et al. Perfil de idosos acometidos por câncer em cuidados paliativos em domicílio. **Revista Kairós-Gerontologia**, v. 19, p. 29-43, 2016.

[77] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>> Acesso em: 17 mar. 2023>.

[78] SCHNEIDER, Claudia Dornelles. Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos submetidos a diferentes intensidades de exercício em esteira rolante. 2002.

[79] RIBEIRO, Sonia Machado Rocha et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience journal**, v. 21, n. 3, 2005.

[80] PINHEIRO, Guilherme Junio. Análise da produção de oxigênio singlete durante a febre em ratos. 2015.

[81] HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. [1] Papel dos radicais livres e íons metálicos catalíticos em doenças humanas: uma visão geral. **Métodos em enzimologia** , v. 186, p. 1-85, 1990.

[82] SCHNEIDER, Cláudia Dornelles; OLIVEIRA, Alvaro Reischak de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.

[83] PESSOA, Adriano de Souza. Apocinina versus diapocinina como inibidor da produção de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso por neutrófilos ativados. 2009.

[84] MARTELLI, Felipe; NUNES, Francis Morais Franco. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.

[85] SANTOS, Anderson Ribeiro dos. Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica (in vitro) de produto seco por aspersão obtido a partir da solução extrativa de *Hyptis pectinata* (L.) Poit (Lamiaceae)(sambacaitá). 2015.

[86] AGARWAL, Ashok; GUPTA, Sajal; SHARMA, Rakesh K. Papel do estresse oxidativo na reprodução feminina. **Biologia reprodutiva e endocrinologia** , v. 3, p. 1-21, 2005.

[87] POLIZEL, Amanda et al. Avaliação laboratorial do estresse oxidativo e eletrocardiografia de cadelas submetidas a exercício. 2011.

[88] ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

[89] SOUZA, Marina Claro de. **Micelas de longo tempo de circulação contendo tamoxifeno como sistema nanocarreador para otimização da terapia do câncer de mama**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[90] PATRA, Jayanta Kumar et al. Sistemas de administração de fármacos baseados em nano: desenvolvimentos recentes e perspectivas futuras. **Journal of nanobiotechnology** , v. 16, n. 1, pág. 1-33, 2018.

[91] DA SILVA NEVES, Karen Juliana et al. Sistemas de entrega de drogas baseados em nanotecnologia: nanopartículas poliméricas para tratamento de câncer Nanotechnology-based drug delivery systems: review of recent nanodrug development for cancer treatment. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 24770-24787, 2022.

[92] APOLINÁRIO, Alexandra Conceição et al. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais 'espaço lá embaixo'. **Química nova** , v. 43, p. 212-225, 2020.

[93] MISHRA, BBTS; PATEL, Bhavesh B.; TIWARI, Sanjay. Nanocarreadores coloidais: uma revisão sobre tecnologia de formulação, tipos e aplicações para a administração de medicamentos direcionados. **Nanomedicina: Nanotecnologia, biologia e medicina** , v. 6, n. 1, pág. 9-24, 2010.

[94] TOPAN, José Fernando. **Dendrímeros: uma estratégia para a veiculação de um fármaco anticâncer**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[95] PRINCIVAL, Iza Mirela Rodini Garcia. **Síntese de Derivado de Furano ligados em Dendrímero bis-MPA e sua atividade anticâncer**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

[96] ASIYANBOLA, Bolanle; SOBOYEJO, Winston. Para o cirurgião: uma introdução à nanotecnologia. **Jornal de educação cirúrgica**, v. 65, n. 2, pág. 155-161, 2008.

[97] POLIDORO, Andressa. **Estudo da síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente cardiovasculares contendo rosuvastatina e ácido acetilsalicílico**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[98] SOUSA, Gleida Tayanna Conde de et al. Design de nano-antenas dendriméricas. 2015.

[99] AITA, Carolina Kimi. **Sistemas nanoestruturados de liberação de ingredientes ativos responsivos à radiação**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[100] DA SILVA, ALEXANDRA RP et al. Dendrímero de poliglicerol: nanoplataforma para o tratamento do cancer.

[101] MILITÃO, Luciana Veríssimo. Análise Físico-Química e Fotodinâmica de Clorofila em Dendrímeros de Poliglicerol. 2013.

[102] GIAROLA, Vanessa Moreira. Ressonância de plásmons de superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis. 2007.

[103] SANTOS, Alessandra Nogueira. Aspectos bioeletroquímicos de dendrímeros como nanoplataformas para aplicações clínicas. 2008.

[104] GONÇALVES CORREA, Nicoli Dolores et al. Dados citotóxicos in vitro de Se-metilselenocisteína conjugada com poli dendrítico (glicerol) contra células de carcinoma escamoso humano. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition** , v. 33, n. 5, pág. 651-667, 2022. See More

[105] LORENZETTI, Solange G. et al. Citotoxicidade do copolímero PEBD-e-PHENA obtido por radiação ionizante. 2005.

[106] GALHARDAS, Maria Joana Damásio. **Contribuição para o estudo da Anexina V na Apoptose celular em Concentrados de Eritrócitos**. 2014. Tese de Doutorado.

[107] RANGEL, Marisa e cols. Atividade hemolítica em extratos da diatomácea Nitzschia. **Toxico** , v. 35, n. 2, pág. 305-309, 1997.

[108] VASCONCELOS, Sandra Mary Lima et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

[109] RUBIO, Camila Peres; CERÓN, José Joaquin. Ensaios espectrofotométricos para avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em soro: Conceitos gerais e aplicações em cães e humanos. **BMC Veterinary Research** , v. 17, n. 1, pág. 226, 2021. See More

[110] CARRARD, Vinícius Coelho et al. Teste dos Micronúcleos: Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre. Porto Alegre. Vol. 48, n. 1/3 (jan./dez. 2007), p. 77-81, 2007.**

[111] FERREIRA, Fernanda G. et al. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de Pterogyne nitens (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em Tradescantia pallida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 61-67, 2009.

[112] CARVALHO, Luma Ramirez de. **Análise automatizada da frequência de micronúcleos em culturas celulares expostas a agentes genotóxicos físicos e químicos**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[113] CARNAHAN, Michael A.; GRINSTAFF, Mark W. Síntese e caracterização de dendrímeros de poli (ácido glicerol-succínico). **Macromoléculas** , v. 34, n. 22, pág. 7648-7655, 2001.

[114] IBRAHIM, Zianab T.; KHAMMAS, Zuhair AA; AL-ADILEE, Khalid J. Estudo espectrofotométrico e termodinâmico para separação e pré-concentração de vestígios de espécies de selênio após CPE. In: **Journal of Physics: Conference Series** . Editora IOP, 2020. p. 012075.

[115] DO NASCIMENTO SILVA, Ana Livia et al. Avaliação da ação antimicrobiana do látex de *Croton lechleri* Müll. Arg.(Euphorbiaceae) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. e84111637750-e84111637750, 2022.

[116] TEIXEIRA, Thais Machado et al. O papel do enfermeiro no cuidado com as cardiotoxicidades geradas na administração de quimioterápicos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e15111729732-e15111729732, 2022.

[117] DE HARO MORENO, Andréia et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. *Arquivos de Ciências Da Saúde*, v. 25, n. 1, p. 11-12, 2018.

[118] RIOS, Alessandro de Oliveira et al. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 2, p. 343-350, 2009.

[119] ALMONDES, Kaluce Gonçalves de Sousa et al. O papel das selenoproteínas no câncer. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 484-488, 2010.

[120] Luo M, Zhou L, Huang Z, Li B, Nice EC, Xu J, Huang C. Antioxidant Therapy in Cancer: Rationale and Progress. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jun 8;11(6):1128. doi: 10.3390/antiox11061128. PMID: 35740025; PMCID: PMC9220137.

[121] Astori, E., Garavaglia, M., Colombo, G., Landoni, L., Portinaro, N., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2022). Antioxidants in smokers. *Nutrition Research Reviews*, 35(1), 70-97. doi:10.1017/S0954422421000093

[122] OCAMPO, Ivette Zegarra. **Comparação e validação de técnicas clássicas e modificadas para estudos de potencial genotóxico de peptídeos utilizados na produção de radiofármacos**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[123] GONZÁLEZ, Michelle Valerie Ariza et al. **A importância do microambiente tumoral na carcinogénese**. 2021. Tese de Doutorado.

[124] VALGÔDE, Flávia Gomes Silva. **Avaliação do dano radioinduzido, capacidade de reparo e morte celular em células humanas tumorais (T-47D e MCF-7) e não tumorais (MCF-10) de mama**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

[125] WONG, Rebeca SY. Apoptose no câncer: da patogênese ao tratamento. **Jornal de pesquisa experimental e clínica do câncer**, v. 30, n. 1, pág. 1-14, 2011.

[126] CHE, Meixia et al. Expandindo papéis de superóxido dismutases na regulação celular e câncer. **Descoberta de drogas hoje**, v. 21, n. 1, pág. 143-149, 2016.

[127] DE OLIVEIRA PAULA, Ramon Alves et al. Prevalência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em uma população adulta. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 1, p. 127-134, 2013.

[128] ROCHA, Rodrigo dos Santos et al. Avaliação do uso do teste de micronúcleo em células esfoliadas como biomarcador para o desenvolvimento do câncer oral em usuários de bebidas alcoólicas e anti-sépticos bucais. 2011.

[129] TOLBERT, Paige E.; SHY, Carl M.; ALLEN, James W. Micronúcleos e outras anomalias nucleares em esfregaços bucais: desenvolvimento de métodos. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects** , v. 271, n. 1, pág. 69-77, 1992.

[130] SEO, Young R.; KELLEY, Mark R.; SMITH, Martin L. Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14548-14553, 2002.

Anexo A – Parecer do aditivo pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CEUA-IPEN).



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO – SOLICITAÇÃO DE ADITIVO

Certificamos que a solicitação de doação de material biológico (sangue) para utilização em experimento *in vitro* pelo grupo do pesquisador do IPEN Carlos Roberto Jorge Soares, referente à proposta intitulada “**Síntese e avaliação farmacológica do composto BL-230 como inibidor de fosfodiesterase 4 e 5**”, registrada com o nº **19/22**, sob a responsabilidade de **Débora Rocha Helfstein**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela CEUA-IPEN - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) em **20/12/2022**.

Finalidade:	Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Maio/2022 a Dezembro/2023
Espécie/linhagem/raça:	<i>Rattus norvegicus</i> - Wistar
Nº de animais:	70
Peso/Idade:	8-10 semanas
Sexo:	Machos
Origem:	Biotério da Faculdade de Medicina (FMUSP, USP, São Paulo)

São Paulo, 20 de dezembro de 2022.

Cibele Nunes Peroni
Coordenadora da CEUA/IPEN

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento,
associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**
