



Universidade de Brasília

FACULDADE DE CEILÂNDIA

FARMÁCIA

**INFLUÊNCIA DO 4-HIDRÓXITAMOXIFENO SOBRE A VIABILIDADE
DE CÉLULAS DA GRANULOSA SAUDÁVEIS CONSIDERANDO O
CONTEXTO DO CÂNCER DE MAMA**

JÉSSICA THALITA FERNANDES ALVES DA SILVA

BRASÍLIA

2016

JÉSSICA THALITA FERNANDES ALVES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO 4-HIDRÓXITAMOXIFENO SOBRE A VIABILIDADE
DE CÉLULAS DA GRANULOSA SAUDÁVEIS CONSIDERANDO O
CONTEXTO DO CÂNCER DE MAMA**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado à Universidade
de Brasília, Faculdade de Ceilândia
como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador(a): Prof(a). Dra. Danielle Kaiser de Souza

Co-Orientador(a): Prof(a). Dra. Loise Pedrosa Salles

BRASÍLIA

2016

JÉSSICA THALITA FERNANDES ALVES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO 4-HIDRÓXITAMOXIFENO SOBRE CÉLULAS DA
GRANULOSA SAUDÁVEIS CONSIDERANDO O CONTEXTO DO
CÂNCER DE MAMA**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof(a). Dra. Danielle Kaiser de Souza
(FCE/Universidade de Brasília)

Co-Orientador: Prof(a). Dra. Loise Pedrosa Salles
(Faculdade de Odontologia do Planalto Central/ Universidade de Brasília)

Prof(a). Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof(a). Dra. Kelb Bousquet Santos
(FCE/Universidade de Brasília)

BRASÍLIA

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a Ele recorri nos momentos de dificuldade, em oração pedia força e coragem para enfrentar esta jornada, e em nenhum momento Ele me abandonou.

Agradeço à minha família, à minha mãe Maria do Carmo por me encaminhar no caminho correto, incentivar nos momentos de cansaço e pela companhia e amizade. Ao meu pai José Fernandes pelos conselhos, preocupação e por me dar suporte para chegar até aqui, ao meu irmão Lincoln pelos sábios conselhos e à sua família pela presença amiga. Agradeço ao Ricardo, pelo carinho, conversas e companhia, independente de qualquer coisa, pois foi um ponto de conforto na caminhada.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Danielle por ter aceitado fazer este trabalho e me orientar, pelo conhecimento transmitido, por toda paciência nos meus momentos de teimosia, atraso ou falta de conhecimento e pelo convívio amigável. Agradeço à Profa. Loise pelo auxílio com equipamentos e reagentes e aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da Saúde. Agradeço também ao Prof. Fernando Araripe Torres pela colaboração técnica e científica e à Profa. Alzira Amélia Martins Rosa e Silva pela parceria científica com o meio patenteado.

Agradeço aos colegas de graduação que em algum momento me ajudaram de alguma forma, seja nos trabalhos em grupo ou conversas aleatórias, especialmente ao Fabricio, meu colega de todas as horas. Agradeço a cada um dos professores que transmitiram seus conhecimentos e que me possibilitaram chegar até aqui, minha admiração por todos, espero um dia ser como vocês.

Agradeço à todas as pessoas que encontrei ao longo do caminho e que me incentivaram e inspiraram de alguma maneira a chegar até aqui.

RESUMO

Introdução: O câncer é uma das doenças mais incidentes atualmente e dentre os tipos mais comuns está o câncer de mama. Este tipo de câncer é raro em mulheres antes dos 35 anos, porém mulheres nesta faixa etária também podem ser acometidas apresentando prognóstico pior quando comparado a mulheres mais velhas. Quando o câncer de mama apresenta resposta endócrina, o tratamento de escolha é a terapia endócrina, no qual há indicação na literatura do uso de tamoxifeno 20 mg/dia durante um período de 5-10 anos, sua metabolização resulta em produtos, como o 4-hidróxitamoxifeno.

Objetivos: avaliar os efeitos que o 4-hidróxitamoxifeno possui sobre a viabilidade de células da granulosa que compõem o folículo ovariano e influenciam diretamente a maturação ovocitária.

Métodos: As células da granulosa foram obtidas a partir de ovários bovinos (espécie *Bos taurus*). Para avaliar o efeito de 4-hidróxitamoxifeno, as células da granulosa foram cultivadas na presença de 0 μ M, 1 μ M e 2 μ M de 4-hidróxitamoxifeno, em seguida incubou-se as células com o metabólito por um período de 48 horas. Utilizou-se como metodologias de análise PCR *real time* para os genes *BAX*, *BCL2* e actina, o teste de exclusão por trypan blue, MTT e avaliação morfológica.

Resultados e discussão: o grupo 0 μ M apresentou maior proporção de células viáveis evidenciadas pelo padrão morfológico normal, baixas quantidades de células coradas por trypan blue (31,2%), alta atividade mitocondrial no teste de MTT e genes com perfil de expressão que denota atividade antiapoptótica. Os grupos 1 μ M e 2 μ M apresentaram 0% de viabilidade, baseado no trypan blue, e 31,15 e 29,8%, respectivamente, baseado na metodologia MTT. Assim, indica-se altas taxas de morte celular, sendo que a expressão gênica não foi concordante com o perfil de viabilidade encontrado *in vitro*.

Conclusão: Tamoxifeno foi citotóxico para as células da granulosa em cultura.

Palavras-chave: Tamoxifeno. Viabilidade celular / apoptose. Células da granulosa. Câncer de mama. Mulheres pré-menopausa.

ABSTRACT

Introduction: Cancer is one of most incident diseases in Brazil and, among them, is found the breast cancer. This type of cancer is rare in women younger than 35 years old, however when it is developed before this age the prognostic is worst compared to older women. Tumors, which demonstrates endocrine response detected by estrogen receptors presence, endocrine therapy is indicated: tamoxifen 20 mg/day during 5-10 years. Its biotransformation generates active metabolites, as 4-hydroxytamoxifen.

Objective: Evaluate 4-hydroxytamoxifen effects on granulosa cells viability that compose ovarian follicle and influence directly oocyte maturation.

Methods: Granulosa cells were obtained from bovine ovary (*Bos Taurus*). The 4-hydroxytamoxifen effects were evaluated on granulosa cells by culturing in presence of 0 μ M, 1 μ M and 2 μ M 4-hydroxitamoxifen during 48 hours. PCR real time analysis for Bax, Bcl-2 and actin, trypan blue exclusion test, MTT and morphological analysis were performed after culture.

Results: Group 0 μ M demonstrated higher levels of viable cells in terms of morphological aspects, 31,2% of unviable cells measured by trypan blue and gene expression that denotes antiapoptotic activity. After culture on 1 μ M and 2 μ M groups, 0% of viable cells, based on trypan blue, and 31,15 and 29,8% based on MTT. Death cells rates were higher while gene expression profile was not in accordance to viability in vitro.

Conclusion: Tamoxifen demonstrated cytotoxic effects on granulosa cells in culture.

Key-words: Tamoxifen. Cellular viability / apoptosis. Granulosa cells. Breast cancer. Pre-menopausal women.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias apoptóticas.	12
Figura 2: Representação esquemática da estrutura proteica da família Bcl-2.	12
Figura 3: Estrutura tridimensional de Bcl-XL.	13
Figura 4: Mudanças morfológicas na apoptose.	15
Figura 5: Comparação da estrutura química do tamoxifeno e 17- β estradiol.	16
Figura 6: Metabolização do tamoxifeno pelas enzimas do citocromo.	17
Figura 7: Perfil de expressão do gene <i>BAX</i> .	28
Figura 8: Perfil de expressão do gene <i>BCL2</i> .	29
Figura 9: Perfil de expressão do gene actina.	29
Figura 10: Análise de células da granulosa do grupo 0 μ M 4 OHT por Trypan blue.	30
Figura 11: Análise de células da granulosa do grupo do 1 μ M 4OHT.	31
Figura 12: Análise de células da granulosa do grupo 2 μ M 4OHT.	32
Figura 13: Proporção de células vivas segundo a absorbância após teste com MTT.	33
Figura 14: Aspecto das células da granulosa grupo 0 μ M 4OHT.	34
Figura 15: Aspecto das células da granulosa do grupo 1 μ M 4OHT.	35
Figura 16: Aspecto de células da granulosa do grupo 2 μ M 4OHT	36

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Classificação morfológica do câncer de mama.	5
Quadro 2: Classificação molecular do câncer de mama.	5
Quadro 3: Protocolos quimioterápicos em câncer de mama primário.	8
Tabela 1: Desenhos dos primers e o código GenBank para cada transcrito da espécie <i>Bos taurus</i> .	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL: microlitros

4OHT: 4-hidroxitamoxifeno

AND: androstenediona

BH: Domínio Homólogo de Bcl-2

BRCA1: Breast Cancer Suceptibility Gene-1

BRCA2: Breast Cancer Suceptibility Gene-2

cDNA: DNA complementar

CYC: ciclofilina

DCIS: Carcinoma Ductal *In Situ*

DFF: Fator de Fragmentação do DNA

EERB2: v-er-b2 erythroblastic leucemia viral oncogene homolog 2

ER: Receptor de Estrógeno

FAK: Quinase de Adesão Focal

IAP: Inibidores de Proteínas Apoptóticas

IDC: Carcinoma Ductal Invasivo

ILC: Carcinoma Lobular Invasivo

LCIS: Carcinoma lobular *In Situ*

MAP: *Mitogen-activated protein*

MLC II: *Myosin Light chain II*

mm: milímetros

mRNA: RNA mensageiro

MYC: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog

Pak-2: p21-activated kinase 2

PBS: solução tampão fosfato

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PR: Receptor de Progesterona

qPCR: PCR *real time*

ROCK: *Rho-Associated Coiled-Coil Forming Protein Kinase*

rpm: rotações por minutos

SERM: *Selective Estrogen Receptor Modulator*

TAM: tamoxifeno

TGF β : Fator de Crescimento Transformante β

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNM: Tumor, Nodo, Metástase

TP53: Tumor Protein p53

VEGF: Fator de Crescimento Tumoral

Sumário

1	Introdução	1
2	Revisão de literatura.....	2
2.1	Diversos aspectos do câncer	2
2.2	Câncer de mama	4
2.2.1	Tratamento	6
2.2.2	Câncer de mama e mulheres jovens	8
2.3	Células da granulosa	9
2.4	Apoptose.....	10
2.5	Tamoxifeno e viabilidade de células da granulosa.....	16
3	Justificativa.....	19
4	Objetivos	20
4.1	Objetivo Geral.....	20
4.2	Objetivos Específicos.....	20
5	Métodos.....	21
5.1	Coleta de células da granulosa.....	21
5.2	Cultura de células e meios de cultura	21
5.2.1	Grupos experimentais e condições de cultivo.....	22
5.2.2	Processamento das células da granulosa após cultivo.....	22
5.3	PCR real time.....	23
5.3.1	Isolamento de RNA e avaliação do isolado	23
5.3.2	Síntese de cDNA	24

5.3.3	Reação de qPCR.....	24
5.4	Avaliação da viabilidade celular.....	26
5.4.1	Teste de exclusão por Trypan blue.....	26
5.4.2	MTT	26
5.5	Avaliação morfológica das células da granulosa	27
5.6	Análise estatística.....	27
6	Resultados	28
6.1	qPCR dos genes Bax, Bcl-2 e actina.....	28
6.2	Viabilidade celular.....	30
6.2.1	Teste de exclusão por trypan blue	30
6.2.2	MTT	32
6.3	Avaliação morfológica.....	33
7	Discussão.....	37
8	Conclusão	40

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema mundial de saúde pública no qual os tipos mais incidentes são pulmão com 1,8 milhão de casos, mama e próstata com 1,7 milhão e 1,1 milhão, respectivamente, e intestino no qual foram registrados 1,4 milhões de casos. Na América Latina e Caribe foram registrados 1,1 milhão de casos novos em 2012, sem levar em consideração os casos de câncer de pele não melanoma, sendo que os tipos mais comuns em homens e mulheres foram os cânceres de próstata e mama, respectivamente, semelhante ao perfil de ocorrência mundial (INCA, 2015).

O aumento do número de casos de câncer está associado à exposição a fatores cancerígenos, o que leva não só a exposição a novas substâncias como ao envelhecimento da população e, por consequência, aumento na prevalência de doenças crônico-degenerativas, especialmente câncer (INCA, 2006).

O tamoxifeno pertence à classe dos Moduladores Seletivos do Receptor de estrógeno, e atua inibindo o crescimento de células cancerosas por ser um antagonista competitivo do estrógeno. Sua indicação é feita em casos de câncer de mama com resposta endócrina na dose de 20 mg ao dia (BRASIL, 2014). Este fármaco é metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 à N-desmetil tamoxifeno em maior quantidade e 4-hidróxitamoxifeno em menor proporção (JORDAN, 2014).

O câncer de mama acontece principalmente em mulheres perimenopausa contudo aquelas que se encontram em fase reprodutiva também podem ser acometidas e correspondem à 5 a 7% dos casos. Muitas mulheres tendem a adiar a gravidez para faixas etárias mais tardias por diversas razões (investimento em suas vidas profissional e educacional, por exemplo) que coincidem com as faixas etárias de acometimento do câncer de mama porém muitas tem ainda o desejo ter filhos (KASUM et al., 2014). As células da granulosa participam da esteroidogênese e passam por muitas modificações ao longo do desenvolvimento do folículo, o primeiro passo consiste na mobilização de colesterol, reorganização do complexo de Golgi, lisossomos, gotas de lipídeos e dos retículos endoplasmático tanto liso quanto rugoso para que ocorra transporte e armazenamento de colesterol para conversão em hormônios esteroides que são importantes na reprodução (VIREQUE et al., 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diversos aspectos do câncer

As células sadias do organismo são programadas para crescer, proliferar e modelarem-se para participarem da manutenção da arquitetura tecidual e repararem tal estrutura quando houver lesão. Devem também ser capazes de executar suas funções neste tecido, e quando programado realizarem o processo de morte celular. Entretanto, as células podem sofrer mutações nas quais a estrutura do material genético e, frequentemente, as informações por ele codificadas estão alteradas, e quando isso ocorre, todo o funcionamento celular normal pode estar comprometido. (WEINBERG, 2008)

As mutações que causam o câncer decorrem de fatores ambientais como: compostos químicos, luz ultravioleta e fumaça do tabaco (PFEIFER, 2015), porém podem acontecer mutações aleatórias também (CRUZ, 2015). As células mutadas, que adquirem fenótipos diferentes, proliferam-se de forma descoordenada, não obedecem ao processo de morte celular programada, não participam das funções fisiológicas normais e nem da manutenção tecidual, e tem-se então a formação dos tumores (WEINBERG, 2008) e tal quadro caracteriza a doença denominada câncer (ALBERTS, 2006).

Os tumores podem ser classificados quanto ao tipo de crescimento e quanto ao tipo celular que o deu origem. Os tumores que se desenvolvem a partir de tecidos epiteliais de diferentes origens embrionárias são denominados carcinomas e esses são os principais tipos de tumores nas diversas espécies de câncer (boca, esôfago, mama, etc). Esta classe pode ser subdividida em carcinoma de célula epitelial escamosa, quando o tumor se origina de células cuja finalidade é proteção das células mais internas, e adenocarcinoma, quando o tumor surge a partir de células que possuem a finalidade de secreção para proteção de tecidos localizados logo abaixo. Alguns tumores surgem a partir de tecidos conjuntivos com origem embrionária mesodérmica e são denominados sarcomas (WEINBERG, 2008).

Com relação ao tipo de crescimento da massa tumoral, existem vários estágios entre um tecido que cresce normalmente e um tecido que apresenta comportamento de crescimento maligno. Em um primeiro nível existe a hiperplasia,

quando as células proliferam-se intensamente, entretanto não é anormal. No próximo estágio está a metaplasia, no qual as células possuem certa semelhança ou diferença mínima, respectivamente, com as unidades formadoras normais do tecido, muito comum em zonas de transição entre epitélios. Um terceiro estágio é denominado displasia onde as células, além de apresentarem crescimento anormal, mostram graus de diferenças citológicas com as unidades formadoras normais do tecido, e tais diferenças consistem em cor e forma do núcleo durante a análise de lâminas, relação núcleo citoplasma alterada, aumento da atividade mitótica e perda das configurações citoplasmáticas. O tecido displásico constitui também os pólipos, que são grandes crescimentos que podem ser vistos a olho nu. E, por fim, tem-se o tecido canceroso no qual as células são totalmente diferentes das unidades formadoras normais e ainda adotam o comportamento invasivo. (WEINBERG, 2008)

Em geral, o tumor apresentará estruturas teciduais diferentes daquelas presentes em tecidos normais. As diferenças serão principalmente com relação à vasculatura e composição da matriz extracelular. A vasculatura tumoral será constituída por vasos sanguíneos imaturos, tal morfologia é decorrente da supra-regulação de fatores pró-angiogênicos em tumores tais como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), gerando vasos sanguíneos hiperpermeáveis, e este evento conduzirá a hipóxia tecidual e acidose que, por sua vez, resultam em um microambiente que permite a progressão tumoral, por impedirem as células do sistema imune de alcançarem o tumor além de favorecer o desenvolvimento de um fenótipo agressivo, no qual somente as células cancerosas poderão sobreviver. Haverá também a equalização da pressão intra e extravascular que impedirá o extravasamento de quimioterápicos. As anormalidades presentes na matriz extracelular tumoral são atribuídas à supra-regulação do Fator de Crescimento Transformante β (TGF β). O conjunto de modificações da matriz extracelular é denominado desmoplasia que contribui para a formação de massa tumoral mais densa, resultando na criação e acúmulo de forças mecânicas ocorrendo compressão de vasos sanguíneos e linfáticos, levando – os ao colapso além de limitar o espaço intertissular impedindo a penetração dos agentes quimioterápicos (GKRETSI et al, 2015).

Outro aspecto relevante no câncer diz respeito aos oncogenes e genes supressores de tumor. Os oncogenes são aqueles genes que quando ativados

levam à progressão tumoral. Existem vários modos de ativação de tais genes como a amplificação e translocação cromossomal. Já os genes supressores de tumor são aqueles cuja perda da função leva a promoção tumoral. Em geral estes genes são reguladores negativos de crescimento ou portam outras funções que devem interferir com o potencial invasivo e metastático. Em geral, ao invés de ocorrerem mutações em tais genes há alteração em sua função e expressão (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004).

2.2 Câncer de mama

A presença de mutações genéticas aumenta os riscos de desenvolvimento de câncer de mama, e a instabilidade genética é um dos primeiros fenótipos que se manifesta. Alguns dos principais oncogenes envolvidos na fisiopatologia do câncer de mama são *v-er-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2* (*ERBB2*, *HER2* na antiga nomenclatura) e *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog* (*MYC*, *c-myc* na antiga nomenclatura), enquanto dentre os genes supressores de tumores têm-se destaque para o *Tumor Protein p53* (*TP53*, *p53* na antiga nomenclatura), *BRCA1* e *BRCA2* (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004).

O gene *ERBB2* codifica o receptor de fator de crescimento tirosina-quinase, que leva a ativação de inúmeras vias relacionadas à proliferação, angiogênese, aumento da motilidade, metástase e resistência à apoptose. A amplificação e super-expressão deste gene no câncer de mama primário induz um comportamento clínico mais agressivo e o torna um alvo interessante no diagnóstico e tratamento. O *MYC* codifica uma fosfoproteína nuclear que age como regulador transcricional e atua na proliferação, diferenciação e apoptose. O *TP53* quando alterado torna-se um oncogene, que codifica proteína com múltiplas funções e em condições normais gera a parada no ciclo celular na fase G1 ou G2/M para permitir reparo do DNA e pode também disparar a apoptose e diferenciação. Por fim tem-se o gene *BRCA2*, que compartilha várias características com o *BRCA1*, muitas mutações neste gene são descritas, entretanto, as mutações em *BRCA2* não estão ligadas a um tumor de grau tão alto quanto aquelas mutações no gene *BRCA1* (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004).

O câncer de mama pode ser morfológicamente classificado em carcinoma *in situ* ou invasivo, e estes subdividem-se em ductal, quando preenchem os ductos

mamários, e os lobulares que ocorrem nos lóbulos mamários. Ainda há outros subtipos dentro dos ductais e lobulares, conforme mostrado no quadro 1, que diferem-se quanto a distribuição nestes locais (NOUNOU, et al., 2015).

Quadro 1 – Classificação morfológica do câncer de mama.

Tipo	Classificação	Subclassificação
Carcinoma in situ	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i> (DCIS)	-
	Carcinoma Lobular <i>In Situ</i> (LCIS)	Sólido
		Cibriforme
		Papilar
Carcinoma invasivo	Carcinoma Ductal Invasivo (IDC)	-
	Carcinoma Lobular Invasivo (ILC)	Clássica
		Sólida
		Alveolar
	Tubuloalveolar	

Fonte: adaptado de NOUNOU e colaboradores, 2015.

Além da classificação morfológica, existe a classificação molecular cuja classificação baseia-se em parâmetros como Receptor de estrógeno (*ER*), receptor de progesterona (*PR*), *ERBB2*, conforme mostrado no quadro 2 (NOUNOU, et al., 2015).

Quadro 2 – Classificação molecular do câncer de mama.

Classificação	<i>ERBB2</i>	<i>ER</i>	<i>PR</i>
Luminal A	Expresso	Expresso	Alta expressão
Luminal B	Expresso	Expresso	Baixa expressão
HER-2 amplificado	Muito expresso	*	*
Basal	Não expresso	Não expresso	Não expresso

Fonte: adaptado de NOUNOU e colaboradores, 2015. *Não informado no artigo.

O diagnóstico em câncer de mama deve ser feito com base em três parâmetros: avaliação clínica, exame laboratorial e diagnóstico patológico. Durante a avaliação clínica é necessário avaliar a história do indivíduo (OMS, 2006). O exame físico também faz parte da avaliação clínica, e é feito por meio de palpação bimanual das mamas e nodos linfáticos locorregionais (AEBI et al., 2011). Os exames laboratoriais incluem mamografia bilateral que pode ser acompanhada por ultrassom, raio X e tomografia computadorizada do tórax, ultrassom do abdômem e escâner ósseo. No diagnóstico patológico, a determinação de *ER* e *PR* são obrigatórias, enquanto que a determinação do status *ERBB2* deve ser considerada. A avaliação do estágio clínico em que se encontra o paciente é feito por meio do sistema de estadiamento Tumor, Nodos e Metástase (TNM). De acordo com este sistema pode-se avaliar a extensão da doença, escolher o tratamento e estimar o prognóstico (OMS, 2006).

2.2.1 Tratamento

Os tratamentos para câncer de mama incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia endócrina. A terapia adjuvante sistêmica inclui a quimioterapia e terapia endócrina, e a escolha de qual terapia seguir deverá ser feita de acordo com o quadro apresentado pelo paciente levando-se em conta principalmente o fenótipo dos parâmetros *ER/PR* e status *ERBB2*. O status de *ERBB2* é considerado de extrema importância para alguns autores, enquanto que em algumas diretrizes tal parâmetro é descrito como um fator que pode ser considerado. Muitos centros levam em conta o status nodal também (AEBI et al., 2011; NOUNOU et al., 2015; OMS, 2006).

A terapia endócrina deve ser considerada quando houver resposta endócrina, determinada pela presença detectável de ER (maior ou igual 1%). Neste tipo de terapia faz-se necessário detectar se a paciente encontra-se na pré ou pós-menopausa, e quando não é possível tal identificação realiza-se a dosagem de FSH (AEBI et al., 2011; NOUNOU et al., 2015).

- Mulheres pré-menopausa: segue-se terapia com tamoxifeno (TAM) 20 mg/dia durante 5-10 anos isoladamente como um padrão. Pode-se associar agonista de GnRH ao TAM para supressão ovariana temporária, e realizar ablação ovariana bilateral também para

supressão ovariana irreversível. Existe a opção de uso de Inibidores da Aromatase de forma isolada ou combinados com agonista de GnRH. Há ainda a possibilidade de associação entre TAM e quimioterapia (NOUNOU et al., 2015; AEBI et al., 2011).

- Mulheres pós-menopausa: há opção de utilização de TAM 20 mg/dia durante 5-10 anos, bem como o uso de inibidores da aromatase. Há indicativos, no caso de escolha do TAM, de que a terapia por 10 anos traz mais benefícios (NOUNOU et al., 2015; AEBI et al., 2011).

A quimioterapia é a opção para pacientes que não possuem resposta endócrina ou que super-expressam *ERBB2* e que possuem tumores maiores que 1 cm. Neste tipo de tratamento deve-se utilizar protocolos que associam múltiplos medicamentos (NOUNOU et al., 2015; AEBI et al., 2011; AMB, 2001). A revisão bibliográfica de Gandhi e colegas (2015) compilou diversos resultados de vários trabalhos que tratam de tal tema e como resultados têm-se que anti-metabólitos, incluindo o clássico CMF (Ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil), antraciclina e taxanos são muito utilizados neste tipo de câncer de mama. Os protocolos terapêuticos comumente utilizados no tratamento de câncer de mama primário estão descritos no Quadro 3 (GANDHI et al., 2015).

A terapia neoadjuvante é indicada quando houver tumor de grande volume e invasivo, inoperáveis ou câncer de mama inflamatório. A terapia neoadjuvante reduz o tamanho tumoral, tornando-o operável e diminuindo a extensão da operação. O mesmo padrão utilizado na terapia adjuvante sistêmica deve ser levado em consideração, porém, no cenário pré-operatório (AEBI et al., 2011; RAMPUARLA; ROCQUE; BURKARD, 2014; NOUNOU et al., 2015). Em caso de câncer de mama metastásico ou recorrente há indicação de terapia hormonal minimamente tóxica sempre que razoável em vez de quimioterapia citotóxica. O tratamento nestes tipos de câncer de mama prolonga a sobrevivência e melhora a qualidade de vida, mas não é curativo (OMS, 2006; VISOVSKI, 2014; SCHNEEWEISS; RUCKHÄBERLE; HUOBER, 2015). Os Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno (*Selective Estrogen Receptor Modulator* - SERM) permanecem como primeira linha de tratamento no câncer de mama metastásico, independentemente do *status* menopausal (VISOVSKI, 2014).

Quadro 3 – Protocolos quimioterápicos em câncer de mama primário.

Classe terapêutica	Protocolos
Anti – metabólitos	CMF (ciclofosfamida, metrotexato, 5 – fluorouracil)
Regime baseado em Antraciclinas	FEC (5 – fluorouracil, epirrubicina, ciclofosfamida)
	FAC (5 – fluorouracil, doxorubicina, ciclofosfamida)
	AC (doxorubicina e ciclofosfamida)
Taxanos	P – Paclitaxel
	T – Docetaxel
Trastuzumabe	TCH (Docetaxel, carboplatina, trastuzumab)
	AC →TH (doxorubicina, ciclofosfamida seguido por docetaxel, trastuzumabe)

Fonte: adaptado de GANDHI et al., 2015.

Em caso de indicação para quimioterapia, algumas diretrizes recomendam como primeira linha de tratamento CMF ou monoterapia com regime baseado em antraciclinas ou taxanos (OMS, 2006). Porém, há descrição na literatura de indicação de monoterapia com capecitabina e vinorelbine além de antraciclinas, taxanos e poliquimioterapia como primeira linha de tratamento. (SCHNEEWEISS; RUCKHÄBERLE; HUOBER, 2015).

2.2.2 Câncer de mama e mulheres jovens

No Brasil, em 2016 são esperados 57.960 novos casos de câncer de mama. A região do país onde esta patologia está mais presente é a Sul, com frequência de 74,30/100 mil, seguida da região Sudeste, com 68,08/100 mil, na terceira posição encontra-se a região Centro-Oeste, cuja frequência é 55,87/100 mil, e por fim a região Nordeste, com frequência de 38,74/100 mil. Na região Norte o câncer de mama ocupa a segunda posição entre os cânceres mais frequentes em mulheres perdendo para o câncer de colo do útero (INCA, 2016). Devido à alta incidência, morbidade e mortalidade a doença é considerada um problema de saúde pública (ANDRADE, 2014), e estes altos níveis são observados devido à dificuldade no diagnóstico e tratamento (PINHEIRO et al., 2013).

O câncer de mama é raro antes dos 35 anos, porém as mulheres em fase reprodutiva também podem ser acometidas correspondendo a 4-5% dos casos (ANDRADE, 2014; PINHEIRO, 2013). O câncer em mulheres jovens é mencionado no trabalho de Pinheiro e colegas (2013) como aquele que aparece antes dos 30, 35, 40, 45 e até mesmo 50 anos e que apresentam pior prognóstico. Ainda segundo este autor, as mulheres jovens estão propensas ao câncer de mama devido à dificuldade no diagnóstico, uma vez que muitos profissionais tem a falsa percepção que mulheres nesta faixa etária não estão propensas a esta doença levando-os a desprezar sintomas da doença. A maior densidade mamária nestas pacientes também dificulta a interpretação dos exames. O diagnóstico desta doença em mulheres nesta faixa etária constitui-se um desafio, pois estas encontram-se em fase reprodutiva, constituindo família e iniciando suas carreiras. Outro ponto de dificuldade é o tratamento, pois causa prejuízo sobre a estética, fertilidade e psicológico destas mulheres (PINHEIRO et al. 2013).

Em países desenvolvidos, observa-se também uma tendência no adiamento da gravidez para faixas etárias de 30-40 anos, fase que coincide na incidência de câncer de mama em mulheres jovens. Sendo assim, esta patologia pode afetar mulheres que ainda não completaram suas famílias. Estas mulheres são submetidas a terapia adjuvante sistêmica que, apesar de aumentar a sobrevivência, o tratamento aumenta a toxicidade a longo prazo, o que leva ao aparecimento de problemas tais como, indução de menopausa precoce e prejuízos na fertilidade (KASUM et al., 2013).

2.3 Células da granulosa

As células da granulosa estão localizadas ao redor do ovócito para formar o folículo, que é a unidade funcional do ovário, e juntamente com as células da teca participam da esteroidogênese, isto é a produção de esteroides sexuais. A granulosa é responsável pela produção de estrógenos enquanto a teca produz andrógenos. Devido ao fato de as células da granulosa não possuírem vasos sanguíneos estas limitam-se a atuar sobre os precursores que recebe das células da teca (SILVA et al. 2006).

No processo de esteroidogênese o colesterol é convertido em andrógenos nas células da teca e seguem para as células da granulosa, onde são convertidos a

estrógenos pela enzima aromatase (CYP19). A ativação desta enzima ocorre pela estimulação causada pelo FSH. O estrógeno formado agirá a nível corporal e nas próprias células da granulosa, aumentando a quantidade de receptores de FSH que causa o rápido crescimento do folículo e gera um *feedback* positivo, que por sua vez, aumenta a quantidade de LH e FSH, causando ovulação. Dessa maneira a secreção de estrógeno marca o sucesso do desenvolvimento do folículo ovulatório (KONO et al., 2014).

As células da granulosa participam no crescimento e diferenciação do ovócito, nutrição, meiose e maturação citoplasmática do ovócito. Sabe-se também que estas células estão intimamente relacionadas ao crescimento do ovócito, pois ambos estão em constante comunicação (KONO et al., 2014).

2.4 Apoptose

A apoptose ocorre em diversas ocasiões seja como um mecanismo homeostático para controle da população celular em um tecido, seja como um mecanismo de defesa em resposta a um prejuízo celular. Outros estímulos que podem desencadear apoptose são irradiação, drogas quimioterápicas que prejudicam o DNA, hormônios e corticosteroides. A apoptose é um mecanismo de morte celular sofisticado e dependente de energia. Este processo pode ocorrer por meio de duas vias, a extrínseca e intrínseca (Figura 1). Existem indícios de que ambas vias possam estar relacionadas pois moléculas de uma via podem atuar na outra. Além destas vias existem outras mediadas por células T citotóxicas e perforina/granzimas (ELMORE, 2007).

A via extrínseca é mediada por receptores transmembrana membros da família de receptores TNF (Fator de Necrose Tumoral). Estes receptores possuem um domínio designado como domínio da morte cujo papel consiste em transmitir o sinal da superfície celular para vias de sinalização internas. As principais moléculas que se ligam a este receptor são FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3 e Apo2L/DR4. Após o desencadeamento desta via devido interação de algum dos ligantes citados ao receptor TNF, diversas moléculas são recrutadas culminando na ativação auto-catalítica de pró-caspase-8 que se torna caspase-8 e dispara a apoptose (ELMORE, 2007).

A via intrínseca inclui estímulos não mediados por receptores que levam ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial resultando em perda do potencial transmembrana e liberação de moléculas tais como citocromo C, Smac/DIABLO e a serina protease HtrA2/Omi. O citocromo C leva a ativação de pró-caspase-9 em caspase-9 enquanto que Smac/DIABLO e HtrA2/Omi inibe os IAP (inibidores de proteínas da apoptose). Um segundo grupo de moléculas é liberado da mitocôndria durante a ativação da via intrínseca, e é constituído por AIF que transloca-se para o núcleo onde quebra o DNA e condensa a cromatina em estágio I, endonuclease G que também transloca-se para núcleo e quebra cromatina e DFF ou CAD que é responsável pelo estágio II de condensação, sendo que a condensação além de tardia é mais pronunciada (ELMORE, 2007).

A via intrínseca é controlada pela família de proteínas Bcl-2, que inclui proteínas antiapoptóticas tais como Bcl-2, Bcl-x e Bcl-XL, e pró-apoptóticas, que inclui Bax, Bcl-10 e Bad. Todos os membros da família possuem alguma das quatro regiões principais conhecidas como domínios homólogos do Bcl-2 representadas por BH1 à BH4 (Figura 2). As proteínas antiapoptóticas são caracterizadas pela presença dos domínios BH1 e BH2 quanto maior predominância dos domínios BH, mais semelhante à Bcl-2 é a proteína. Já proteínas pró-apoptóticas contém em sua estrutura os domínios BH1, BH2 e BH3, a função apoptótica está essencialmente ligada á presença do domínio BH3 (ADAMS; CORY, 1998).

Elmore (2007) descreve que Bcl-2 e Bcl-XL exercem seus efeitos antiapoptóticos por impedirem a liberação do citocromo C por um mecanismo não muito compreendido, bem como pela ativação de proteases de caspases; quando ambos são super-expressos causam infra-regulação dos demais genes da superfamília. Já o Bad exerce seus efeitos pró-apoptóticos ao se heterodimerizar com Bcl-2 ou Bcl-XL impedindo-os de realizarem suas atividades antiapoptóticas. O BAX quando supra-regulado, a proteína por ele expressa transloca-se para a mitocôndria diminuindo o potencial transmembrana e influenciando a liberação de citocromo C.

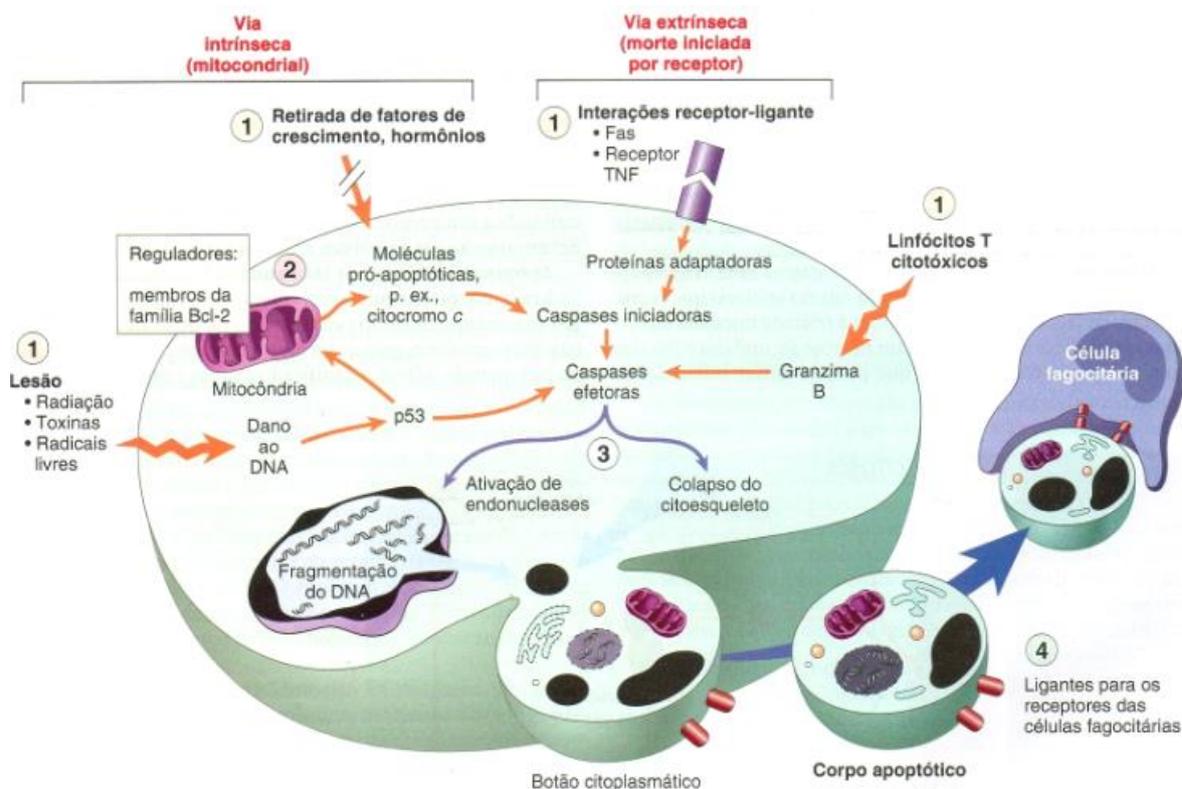


Figura 1: Vias apoptóticas.

Figura que ilustra a via extrínseca ativada pela ligação de Fas ao receptor TNF e a via intrínseca sendo desencadeada por estímulos não mediados por receptores que levam a liberação de moléculas pró-apoptóticas como o citocromo C, ambas levam a ativação das caspases que culmina na execução da apoptose. Disponível em: http://3.bp.blogspot.com/_kwl-ZVYwrB4/TP2CGpZtsEI/AAAAAAAAAGg/q5fNgLKP8ts/s1600/img163.jpg. Acesso em: 4, set. 2016.

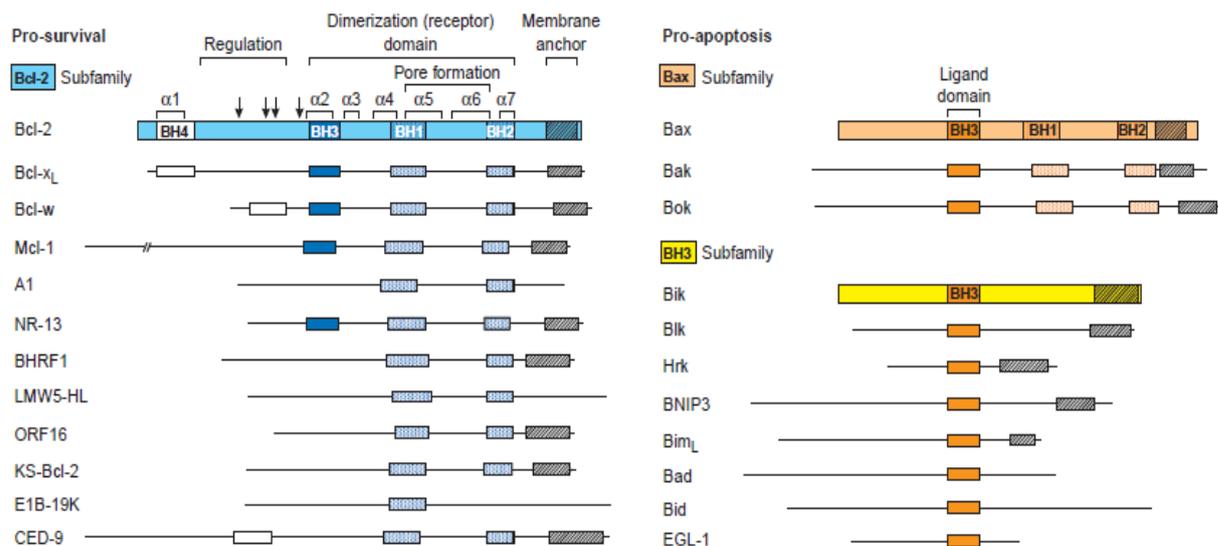


Figura 2: Representação esquemática da estrutura proteica da família Bcl-2. São mostrados os domínios BH em ambas, proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Fonte: ADAMS; CORY, 1998.

Em geral, proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas homo ou heterodimerizam-se para contrabalancear os efeitos uma da outra. A dimerização é explicada utilizando a proteína Bcl-XL como modelo. A coalescência das alfa-hélices contendo os domínios BH1, BH2 e BH3 desta proteína favorecem ao aparecimento de uma fenda hidrofóbica para que o domínio BH3 anfipático possa se ligar. Bax e proteínas com funções semelhantes a ela devem alternar suas conformações como Bcl-XL ou rotacionando o sítio BH3 para o exterior possibilitando a inserção no canal da proteína antiapoptótica (ADAMS; CORY, 1998).

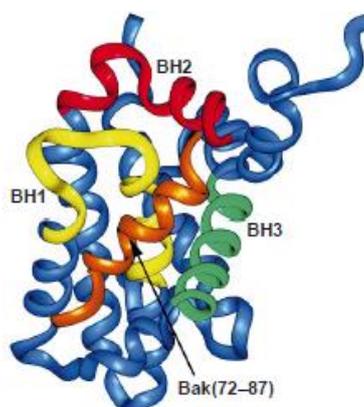


Figura 3: Estrutura tridimensional de Bcl-XL. Proteína Bcl—XL com domínios BH1, BH2 e BH3 em amarelo, vermelho e verde, respectivamente. Em laranjado está representado Bak que ligou-se na fenda hidrofóbica formada pela alteração conformacional dos domínios BH1, BH2 e BH3. Fonte: ADAMS; CORY, 1998.

A proteína Bcl-2 é encontrada na membrana externa da mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana nuclear onde se ancora através de sua extremidade -COOH, e nestes locais sua função é avaliar possíveis danos. Bcl-XL possui uma extremidade ancorada na membrana e Bax é citosólico até que algum estímulo apoptótico produza um domínio hidrofóbico. Fisiologicamente a proteína Bcl-2 é responsável por proteger as células contra danos causados por radiação ultravioleta, dexametasona e drogas citotóxicas. Experimentos com ratos mostraram presença tardia de lesões no intestino, neurônio e melanócitos e doença terminal dos rins na ausência de Bcl-2 apesar de desenvolvimento normal até certa altura de suas vidas. Experimentos semelhantes, com ratos em que *BAX* era ausente mostraram tendência no aumento de alguns tipos celulares como células da granulosa e células germinativas imaturas (ADAMS; CORY, 1998).

Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca convergem para um estágio em comum, a fase de execução, neste momento as caspases são ativadas (ELMORE, 2007). Algumas caspases são consideradas como iniciadoras, como por exemplo, as caspases-8 e -9 enquanto outras são consideradas como executoras ou efetoras, são exemplos as caspases-3, -6 e -7. Na fase de execução ocorrem várias alterações morfológicas que serão descritas adiante e tais mudanças são possíveis graças a quebras e rearranjos do citoesqueleto.

O citoesqueleto é composto por filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos. Os filamentos de actina e miosina participam dos eventos precoces de remodelamento na fase de execução enquanto os microtúbulos e filamentos intermediários são despolimerizados. O remodelamento do citoesqueleto é feito por meio da contração dos anéis de actina e miosina devido à foforilação da MLC II (Myosin Light chain II) e ROCK (Rho-Associated Coiled-Coil Forming Protein Kinase). Concomitantemente a este processo ocorre degradação dos filamentos intermediários e microtúbulos pelas caspases, facilitando a contração dos anéis de actina e miosina. A contração dos anéis de actina e miosina é um processo rápido que coincide com a entrada na fase de execução e ao final os filamentos de actina são também despolimerizados pelas caspases (OROPESA ÁVILA et al., 2015).

Morfologicamente, a célula que está morrendo apresenta formato arredondado para cima, formando “bolhas” que são protusões da membrana plasmática. As bolhas inicialmente projetam-se e retraem-se. Acredita-se que estes eventos morfológicos são consequência da ativação das caspases. Algumas proteínas que contribuem para a adesão, como por exemplo, a Quinase de Adesão Focal (FAK), ao serem quebradas pelas caspases levam ao desligamento da célula da matriz ao seu redor. A reorganização dos filamentos de actina também se faz necessária na formação das bolhas e é mediada por uma proteína denominada gelsolina (HÄCKER, 2000).

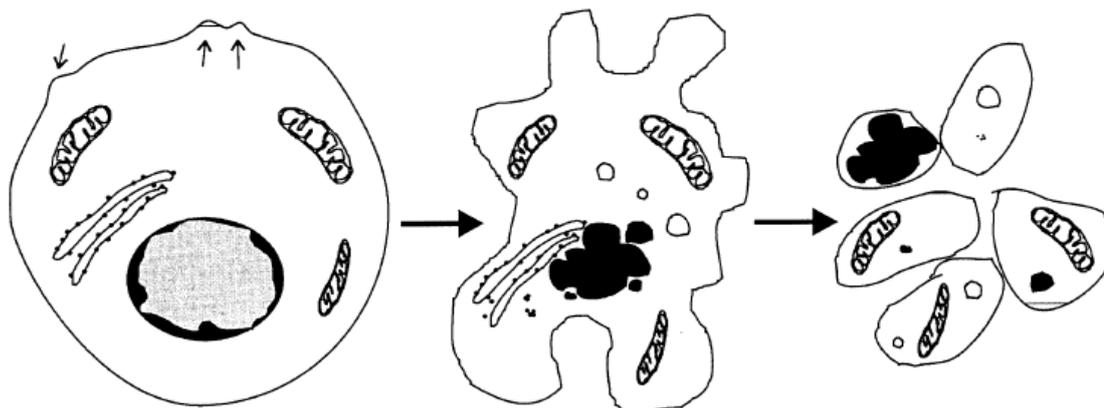


Figura 4: Mudanças morfológicas na apoptose. Desenho esquemático que ilustra as mudanças morfológicas que ocorrem durante apoptose. São ilustrados a formação das bolhas e corpos apoptóticos, pode-se perceber também as organelas intactas. Fonte: HÄCKER, 2000.

O núcleo apresenta-se condensado com forma de esfera ou anel e isto é possível porque a membrana nuclear estende-se para abranger o núcleo inteiro, em seguida o DNA é desmontado em diversos fragmentos. Os eventos bioquímicos responsáveis pela configuração morfológica do núcleo são proteólise de proteínas nucleares mediados por caspases e degradação do DNA cromossômico e ainda há indícios de que proteínas isoladas atuem como moléculas efetoras neste processo. As principais caspases envolvidas nos eventos apoptóticos nucleares são a caspase-3 e caspase-6 responsáveis pela quebra de proteínas tais como DFF (Fator de Fragmentação do DNA) e lâminas nucleares. A condensação da cromatina nuclear e fragmentação do DNA parecem estar relacionadas, a molécula DFF (em humanos) ou CAD (em ratos) estão envolvidas neste processo. Quando a DFF 45 é quebrada pelas caspases, a DFF 40 é originada e atua na quebra da dupla fita de DNA (HÄCKER, 2000).

A mitocôndria permanece intacta durante um bom tempo no decorrer do processo de apoptose e mantém certo grau de metabolismo, da mesma forma as organelas também permanecem intactas até que as outras mudanças tenham ocorrido. Ao fim dos processos interiores, a célula inteira é reorganizada em corpos apoptóticos que conterão diversas partes celulares tais como elementos citosólicos, organelas e partes do núcleo condensado. Por fim tanto células apoptóticas quanto os seus fragmentos, os corpos apoptóticos, sofrem fagocitose por macrófagos ou células não-especializadas e são degradados pela via lisossomal ou por autofagia (HÄCKER, 2000).

Várias alterações morfológicas podem ser vistas ao microscópio óptico e eletrônico. Ao microscópio óptico observa-se o encolhimento das células, formação das bolhas, o formato arredondado esférico do núcleo e picnose, isto é, o encolhimento do núcleo devido condensação da cromatina (ELMORE, 2007; HÄCKER, 2000). Ao microscópio eletrônico é possível observar as organelas no qual percebe-se a mitocôndria intacta, expansão do retículo endoplasmático, formação de vacúolos no citoplasma e perda de microvilosidades (HÄCKER, 2000).

2.5 Tamoxifeno e viabilidade de células da granulosa

O TAM pertence à classe dos SERM e as moléculas pertencentes a esta classe possuem semelhança com a molécula 17- β estradiol e são classificados em trifeniletilenos, benzotiofenos, benzopiranos e naftalenos. O TAM está incluso na classe dos trifeniletilenos. Seu mecanismo de ação consiste na ligação competitiva de suas moléculas ao ER alfa ou beta, gerando mudança conformacional que libera as *Heat Shock Proteins*, restando apenas um receptor monomérico que transloca-se do citosol em direção ao núcleo celular. Este complexo liga-se em genes modificando sua transcrição (FERREIRA et al., 2011). Em geral, tem-se que as células estacionam na fase G0 e G1, sendo o TAM um citostático (LACY; ARMSTRONG, GOLDMAN; LANCE, 2009).

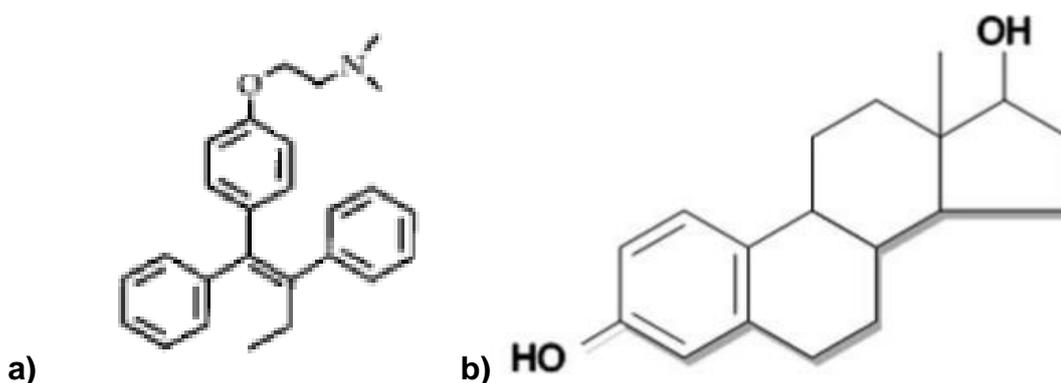


Figura 5: Comparação da estrutura química do tamoxifeno e 17- β estradiol.

Fonte: a) FERREIRA et al., 2011; b) Disponível em:

[http://www.infopedia.pt/\\$estrogenio,4?uri=portugues-ingles/l%C3%BAteo](http://www.infopedia.pt/$estrogenio,4?uri=portugues-ingles/l%C3%BAteo). Acesso em: 7, set. 2016

Após absorvido, o TAM distribui-se ligado a proteínas plasmáticas e é encontrado em altas concentrações no útero, endométrio e mama. Seu metabolismo

é hepático via enzima CYP3A4 e CYP2D6, e após sofrer metabolização é transformado principalmente em N-desmetil tamoxifeno, em menor quantidade em 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) e endotamoxifeno. Apesar de ser formado em pequenas quantidades, o 4OHT é um importante metabólito, pois sua afinidade pelos ER é aumentada o que o torna um padrão para estudos mecanísticos *in vitro*. Sua excreção é por meio de fezes e urina, a meia-vida é de 7-14 horas, a eliminação ocorre no período de 5-7 dias, enquanto que seus metabólitos levam até 14 dias para serem eliminados. As reações adversas ao TAM são inúmeras e diversas, apresentam-se nos sistemas cardiovascular, endócrino, gastrointestinal e geniturinário; observam-se também alterações neuromusculares e dermatológicas (LACY; ARMSTRONG, GOLDMAN; LANCE, 2009; JORDAN, 2014).

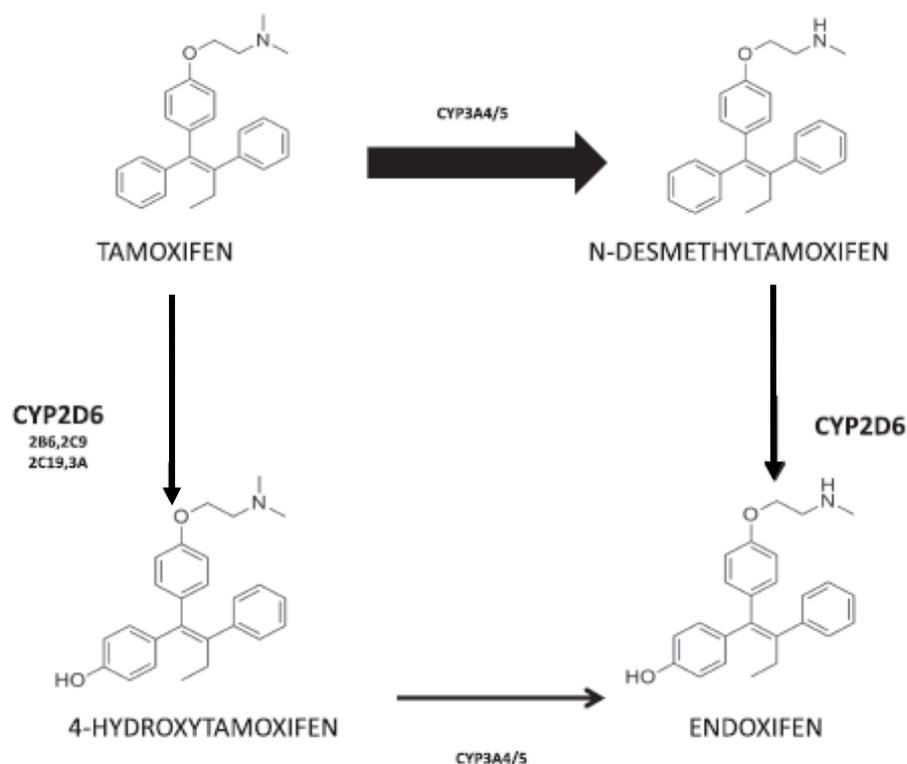


Figura 6: Metabolização do tamoxifeno pelas enzimas do citocromo. Representação da metabolização do tamoxifeno nos metabólitos N-desmetiltamoxifeno e 4-hiróxitamoxifeno via enzimas CYP 3A4 e CYP 2D6 respectivamente e ambos convergindo para formação de endotamoxifeno. Fonte: modificado de JORDAN, 2014.

Alguns tipos de relação entre TAM e apoptose em diversos tecidos são descritas na literatura. No trabalho de Piasecka-Srader e colegas (2015) é descrito

que o TAM previne a perda folicular e apoptose durante o tratamento com drogas tóxicas para os ovários como ciclofosfamida e doxorrubicina devido a diminuição da expressão de genes relacionados à inflamação e à supressão da expressão de receptor de TNF, o mediador central da apoptose. No estudo de Stackiewicz e colegas (2001), foi avaliada a relação entre TAM e apoptose no endométrio, encontrou-se que a via apoptótica era ativada em mulheres pré-menopausa já em mulheres pós-menopausa foram observados tanto efeitos pró-apoptóticos quanto efeitos antiapoptóticos, sugerindo-se que TAM modulava a via apoptótica. Para avaliar a apoptose neste estudo um dos parâmetros levado em consideração foi a proteína antiapoptótica Bcl2 cuja expressão foi variável.

Não foram encontrados na revisão de literatura para elaboração deste trabalho estudos que relacionavam apoptose em células da granulosa saudáveis após o tratamento para câncer de mama com TAM. Entretanto estudos com droloxifeno também pertencente à classe dos SERM, demonstrou que há indução de apoptose em células lúteas *in vitro* após tratamento com este fármaco e tal fato possivelmente está relacionado com a expressão de *MYC*, *BAX* e *BCL2* (LENG; GU; CAO, 2000).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença que acomete milhares de pessoas atualmente, sendo que o câncer de mama é um dos tipos mais incidentes. Outro fato que merece destaque é a incidência de câncer de mama em mulheres pré-menopausa. Quando há indicação para terapia endócrina, um dos medicamentos mais utilizados é o TAM em protocolos de longo prazo, e por ser um medicamento que compete com estrógeno por receptores torna-se interessante avaliar seus efeitos sobre a viabilidade de células da granulosa saudáveis uma vez que estas são produtoras de hormônios sexuais.

Buscou-se identificar alguma relação entre uso do TAM e apoptose de células da granulosa porque estas são produtoras de estrógeno e uma vez que este hormônio não está sendo utilizado fisiologicamente devido ao medicamento interferente pode haver algum mecanismo que desencadeie a morte celular nestas células. Ou até mesmo a toxicidade inerente ao fármaco pode desencadear efeito negativo sobre as células.

Além disso, faz-se necessário avaliar a viabilidade das células da granulosa saudáveis em mulheres expostas à terapia endócrina, pois muitas mulheres pré-menopausa que sobreviveram ao câncer de mama e adiaram a gravidez têm ainda o desejo de ter filhos e estas células estão diretamente associadas às funções reprodutoras destas mulheres.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade de células da granulosa cultivadas *in vitro* e expostas ao 4OHT, um dos metabólitos do TAM.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a morfologia das células por microscopia óptica após a cultura.
- Avaliar a expressão dos genes *BAX*, *BCL2* e actina.
- Avaliar a viabilidade celular.

5 MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, localizado no campus universitário Darcy Ribeiro, no segundo semestre de 2016. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal sob o protocolo UnBDoc nº 55621/2016.

5.1 Coleta de células da granulosa

Ovários bovinos (espécie *Bos taurus*) foram coletados em abatedouros localizados no Distrito Federal e cidades do entorno e transportados para o laboratório em solução fisiológica 0,9% em temperatura definida. Após recebimento, os ovários eram pré-estabilizados em banho-maria à uma temperatura em torno de 36°C. Iniciava-se então a aspiração dos folículos ovarianos utilizando-se agulha de punção e dispensando o fluido folicular em tubo Falcon alocado dentro do banho-maria.

Terminada esta etapa, com o objetivo de decantar as células da granulosa até então dispersa no fluido folicular, removia-se os ovócitos decantados dentro do tubo, e centrifugava-se o tubo Falcon por 5 minutos à uma velocidade de 200 rpm/min. e retirava-se o sobrenadante. Acrescentou-se 1000 µL de solução tampão PBS e centrifugava-se novamente nas mesmas condições anteriores e repetia-se o procedimento até obter o pellet mais clarificado quanto possível (3 vezes, no máximo). O pellet era ressuspensionado em solução tampão PBS estéril novamente para contagem das células.

5.2 Cultura de células e meios de cultura

Para a cultura foram definidas 500.000 células/ poço da placa de cultura, de acordo com Piccianato et al (2012). Realizava-se, então, a contagem de células da granulosa coletadas utilizando-se uma câmara de Neubauer, com um volume de 1,5-3,0 µL do centrifugado ressuspensionado em PBS/BSA, composta de tampão fosfato 10X (PBS) (GIBCO) diluído em água ultrapurificada (1:9); 0,003% de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma); 0,022 µg/mL de piruvato de sódio (Sigma); e 50

UI/mL de penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma). Dispensava-se na câmara onde 9 quadrantes na diagonal eram contados ao microscópio, em seguida realizava-se o cálculo para encontrar o volume no qual estavam contidas as 500.000 células.

O meio de cultura utilizado foi o meio patenteado pela Universidade de Brasília -Alpha MEM (B)- composto por alpha-MEM (GIBCO), e seus suplementos e este deveria ser preparado, no mínimo, 2 horas antes da utilização, homogeneizado e filtrado com seringas de vidro e filtros estéreis milipore (Millex®, 33 mm). Ao meio de cultura era adicionado o metabólito 4-hidróxitamoxifeno (Sigma Aldrich) na concentração 1 μM ou 2 μM com base em Sajadimajd, Yazdanparast e Roshanzamir, 2015, adaptado para as nossas condições de trabalho. Adicionava-se também androstenediona 10^{-7} M (Sigma Aldrich Corp).

5.2.1 Grupos experimentais e condições de cultivo

A cultura era realizada em placa de cultura de 96 poços estéril, onde eram preparadas três replicatas de cada grupo experimental. Foram definidos os seguintes grupos experimentais:

- 0 μM 4OHT (Grupo Controle);
- 1 μM 4OHT;
- 2 μM 4OHT.

Após preparo da placa, contendo 100 μL de meio, esta seguia para estufa à 37°C, 95% de umidade e 5% de CO_2 por 48 horas.

5.2.2 Processamento das células da granulosa após cultivo

Após a cultura as placas eram retiradas da estufa e observadas ao microscópio óptico para avaliar as alterações morfológicas entre os diferentes grupos experimentais.

Em seguida cada grupo de células cultivadas era transferido para tubos eppendorffs estéreis, adicionava-se 20 μL de tampão PBS/BSA e centrifugava-se por 5 minutos a 6.000 rpm. Retirava-se o sobrenadante, ressuspensava-se com aproximadamente 130 μL de tampão PBS/BSA e repetia-se o processo de centrifugação nas mesmas condições anteriores. Por fim, ressuspensava-se

novamente com PBS puro e centrifugava-se mais vez nas mesmas condições e retirava-se o sobrenadante era acrescentado 100 µL de Trizol Plus (Ambion, Life Technology) para armazenamento à -80°C. As amostras foram utilizadas na técnica de PCR *real time* para identificar a expressão do mRNA dos genes de interesse.

5.3 PCR real time

As etapas anteriores à realização de PCR *real time* (qPCR) são: isolamento de RNA, avaliação da concentração e qualidade do RNA isolado e síntese de DNA complementar. Buscou-se avaliar a expressão dos genes *BAX*, *BCL2* e actina por meio desta técnica.

5.3.1 Isolamento de RNA e avaliação do isolado

O isolamento de RNA das células da granulosa era realizado em capelas de fluxo laminar para evitar contaminação. A capela era previamente limpa com RNAase Zap (Applied Biosystem) e esterilizada com luz Ultravioleta. Todo o procedimento foi realizado seguindo o protocolo de isolamento de RNA que acompanha o Trizol Plus (Ambion, Life Technology).

Inicialmente homogeneizavam-se as amostras de células da granulosa com 300 µL de Trizol Plus e acrescentava-se 60 µL de clorofórmio (VETEC) e agitava-se vigorosamente, e ao término deixava-se a mistura em repouso por 3 minutos. Em seguida centrifugava-se o tubo eppendorff em centrífuga refrigerada à 4°C por 15 minutos e 12.000 xg, retirava-se a fase aquosa superior onde estava contido o RNA e transferia-se para tubos contendo 150 µL de isopropanol (VETEC) os quais permaneciam em repouso por mais 10 minutos, seguindo para nova centrifugação de 10 minutos em condições iguais a anterior.

Terminada a centrifugação retirava-se o sobrenadante e acrescentava-se 300 µL de etanol (VETEC) puro ao tubo contendo um pellet e centrifugava-se novamente por 5 minutos à 4 °C e 7.500 xg, retirava-se o sobrenadante e deixava-se em repouso por aproximadamente 1 hora para evaporação total do etanol. Ao fim deste processo ressuspendia-se o RNA isolado com água RNAase *free*.

O RNA de células da granulosa isolada era submetido a avaliação de qualidade e concentração no aparelho NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fischer

Scientific) para escolher quais amostras seguiriam para síntese de DNA complementar (cDNA). O procedimento nesta etapa consistia em pipetar com micropipeta automática 2 μ L do RNA em suspensão e dispensar no leitor do aparelho. O RNA que apresentasse absorvância na faixa de 1,8 à 2,0 eram selecionadas para síntese de cDNA.

5.3.2 Síntese de cDNA

O RNA isolado deveria dar origem à uma fita de DNA complementar que seria amplificada no qPCR. Ao longo da realização deste processo todos os reagentes deveriam permanecer resfriados no gelo.

A síntese de cDNA foi feita de acordo com o protocolo do kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen). Para o preparo da reação de cDNA eram adicionados gDNA *Wipeout Buffer*, 2 μ g de RNA total previamente isolado e a quantidade suficiente de água RNAase free para completar o volume da primeira etapa da reação. Esta reação era levada ao termociclador por 2 minutos à 42°C, e ao final devolvida para o gelo.

Em seguida a reação de transcrição reversa era preparada no qual adicionavam-se *Quantiscript Reverse Transcriptase*, *Quantiscript RT Buffer* e *RT primer mix*. Esta mistura era levada ao termociclador por 15 minutos à 42°C e em seguida por 3 minutos à 95°C visando inativar a *Quantiscript Reverse Transcriptase*. Ao final a mistura era devolvida para o gelo e estocada a -20°C até o momento da reação de PCR.

5.3.3 Reação de qPCR

Para cada um dos grupos experimentais (0 4OHT, 1 μ M ou 2 μ M 4OHT) eram realizados triplicatas de cada amostra para cada um dos genes estudados, isto é *BAX*, *BCL2* e actina e para o gene controle, ciclofilina A (*CYC*). Além disso, foram utilizados 3 a 4 amostras biológicas diferentes para estudo da expressão dos genes de interesse. Os primers utilizados nos experimentos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Desenhos dos primers e o código GenBank para cada transcrito da espécie *Bos taurus*.

Gene	Sequência dos primers	Código do GenBank
<i>CYC</i>	F: TGGCAAGTCCATCTATGGCGAGAA R: ATCCAACCACTCAGTCTTGGCAGT	NM_178320
<i>BAX</i>	F: GTTGTGCGCCCTTTTCTACTTTG R: AAGGAAGTCCAATGTCCAGC	NM_173894
<i>BCL2</i>	F: CCCTGT TTGATTTCTCCTGGCTGT R: TGGGCTTCACTTATGGCCCAG ATA	NM_001166486
<i>ACTINA</i>	F: GCTAGCACAGGCCTCTC R: ACGAGCGCAGCAATATCATC	NM_173979

Para realização do qPCR seguiu-se a metodologia de De Souza (2014) no qual preparavam-se um *mix* contendo cDNA, SYBR Green Fats (Applied Biosystems), água RNase free e os primers. Em seguida preparavam-se os tubos de reação cujo volume total por tubo era 20 μ L de reação. Após preparo dos tubos de reação para o PCR levava-se para o aparelho *Rotor gene* (Qiagen).

Os ciclos do qPCR eram 95°C por 20 segundos para ativação da enzima Taq polimerase, 95°C durante 3 segundos para abertura das fitas e 60°C por 30 segundos para montagem (extensão) da fita de DNA. Todo processo durava aproximadamente 1 hora. Após, realizava-se a curva de melting, segundo as instruções do fabricante do SYBR Green Fast, para identificação do produto de PCR amplificado, ou seja, se há apenas um produto ou outras contaminações.

Os dados foram analisados no Software do *Rotor gene* (Qiagen). Para cálculo da quantificação relativa de expressão gênica de cada gene foi utilizado o método $\Delta\Delta$ CT. Todos os valores de expressão foram padronizados pelo gene controle ciclofilina A (*CYC*) e o grupo 0 μ M 4OHT foi utilizado como calibrador.

5.4 Avaliação da viabilidade celular

5.4.1 Teste de exclusão por Trypan blue

O teste de exclusão por trypan blue foi um dos primeiros métodos empregados para avaliação da viabilidade celular e baseia-se no princípio de que células vivas possuem membrana íntegra logo são capazes de excluir o corante, enquanto que a membrana de células em processo de morte não são capazes de controlar a passagem de macromoléculas e captam trypan blue, como consequência se coram em azul. O requisito para realização deste método é que haja uma suspensão de células individuais que possam ser visualizadas e contadas com auxílio de um hemocitômetro seguido de realização do cálculo da porcentagem de células viáveis dentro da população (STODDART, 2011).

Após retirar da estufa de cultura, certa quantidade das replicatas de cada grupo era transferida separadamente para tubos eppendorffs identificados e tratados com hialuronidase 50 UI (Sigma-Aldrich) e agitados mecanicamente em vortex por 2 minutos (MEZZALIRA et al., 2005).

O teste de exclusão por trypan blue foi feito seguindo-se o protocolo de Freshney (2005) no qual era adicionado o corante Trypan blue 0,4% (Sigma-Aldrich) a células em suspensão por 2 minutos. Após este procedimento transferia-se 1µL da mistura para câmara de Neubauer, onde procurou-se quantificar por meio de observação visual e contagem das células que permaneciam viáveis.

Quando a contagem não era possível em virtude da grande quantidade de células mortas e da impossibilidade de separá-las, as mesmas foram avaliadas pela coloração e morfologia no microscópio invertido. Para isso, à suspensão de células separadas para realização deste teste, foi ressuspensa em tampão PBS para avaliação qualitativa por meio de observação visual de células vivas e mortas. A observação foi feita em microscópio invertido nos aumentos de 10x e 40x e fotografou-se 3 campos de cada grupo com câmera Motic 5.0.

5.4.2 MTT

O teste com MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5 difenil tetrazólio bromídeo) é utilizado para avaliar a citotoxicidade de diversas drogas em diferentes concentrações sem haver necessidade de quantificação (VAN MEERLOO, KASPERS; CLOOS, 2011).

O princípio do método consiste na conversão por redução do sal de MTT à cristais de formazan, que são insolúveis e apresentam coloração azul-violeta escuro. Os cristais de formazan são solubilizados para medição por espectrofotometria no comprimento de 540-720 nm. A reação de redução é realizada por mitocôndria de células vivas, sendo assim este método avalia a atividade mitocondrial da célula. Quanto maior atividade mitocondrial, maior o número de células viáveis uma vez que a atividade de mitocôndrias é constante em células vivas (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011; STODDART, 2011).

O teste com MTT foi realizado seguindo-se o método descritos por Salles (2012) no qual foi adicionada certa quantidade de MTT (Sigma-Aldrich) a cada um dos grupos em estudo (0 μ M 4OHT, 1 μ M 4 OHT e 2 μ M 4OHT). Em seguida, os grupos eram levados à estufa à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade por 3 horas. Ao fim do período de cultivo foram adicionado isopropanol acidificado para solubilização dos cristais de formazan. A placa foi levada ao espectrofotômetro e lida no comprimento de 570 nm e foi realizada uma duplicata para cada amostra biológica neste teste.

5.5 Avaliação morfológica das células da granulosa

Ao fim do período de cultura das células, os grupos experimentais eram observados em microscópio óptico invertido e avaliou-se o aspecto entre os diferentes grupos.

5.6 Análise estatística

A análise estatística para avaliar o nível de expressão dos genes *BAX*, *BCL2*, actina e MTT nos diferentes grupos experimentais foi realizada utilizando-se o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Adotou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O programa utilizado para realização destes testes foi o BioStat 5.3.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. **Science**, [S.], v. 281, n. 5381, p. 1322-1326, ago. 1998.

AEBI, S. et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology**, v. 22, n. suppl 6, p. vi12-vi24, 2011. Disponível em:

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BARROS, A. C. S. D. et al. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. **AMB/CFM-Projeto Diretrizes**, p. 1-15, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia**. Ministérios da Saúde, Brasília, 2014.

Ciências Médicas, Universidade de Brasília, 2014.

CORREIA, Marilena CDV; LOYOLA, Maria Andrea. Tecnologias de reprodução assistida no Brasil: opções para ampliar o acesso. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, 2015.

CRUZ, B.F. **AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE UM INIBIDOR DE TELOMERASE PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER**. 2015. 42 f., il. Monografia (Bacharelado em Farmácia)—Universidade de Brasília, Ceilândia-DF, 2015.

DE ANDRADE, S. A. F. Câncer de Mama: Um Problema de Saúde Pública. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 11, n. 23, p. 70-77, 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol**, [S.], v. 35, n.4, p. 495-516, dez. 2007.

FERREIRA, M. C. F. et al. Moduladores seletivos do receptor estrogênico: novas moléculas e aplicações práticas. **FEMINA**, [S.], v. 39, n.9, set. 2011.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4^o ed. John Wiley & Sons, Inc., 2005.

GANDHI, S. et al. Adjuvant chemotherapy for early female breast cancer: A systematic review of the evidence for the 2014 Cancer Care Ontario systemic therapy guideline. **Current Oncology**, v. 22, p. 82-94, 2014.

GKRETSI, V. et al. Remodeling components of the tumor microenvironment to enhance cancer therapy. **Frontiers in oncology**, [S.], v. 5, out. 2015..

GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 3, p. 608-616, 1997.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Res**, [S.], v. 301, n., p. 5-17, mar. 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Inca, Rio de Janeiro, 2015.

KASUM, M. et al. Fertility after breast cancer treatment. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. [S.], v. 173, p. 13-18, 2014.

KNET, M. et al. Analysis of porcine granulosa cell death signaling pathways induced by vinclozolin. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 927-939, 2015.

KONO, R. et al. 3,4-Dihydroxybenzaldehyde Derived from *Prunus mume* Seed Inhibits Oxidative Stress and Enhances Estradiol Secretion in Human Ovarian Granulosa Tumor Cells. **Acta histochemica et cytochemica**. [S.] v. 47, n. 3, p. 103, 2014.

LACY, C. F.; ARMSTRONG, L. L.; GOLDMAN, M. P.; LANCE, L. L. **Medicamentos Lexi-Comp Manole**. 1º ed. São Paulo: Manole. 2009.

LENG, Y; GU, Z; CAO, L. Apoptosis induced by droloxifene and c-myc, bax and bcl-2 mRNA expression in cultured luteal cells of rats. **European Journal of Pharmacology**. [S.], v. 409, n. 2, p. 123-131, 2000.

MEZZALIRA, A. et al. METODOLOGIAS DE DESNUDAMENTO PARCIAL DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS E SUBMETIDOS À VITRIFICAÇÃO. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 109-114, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2006. 120p.

NOUNOU, M. I. et al. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. **Breast cancer: basic and clinical research**, [S.], v. 9, n. Suppl 2, p. 17, 2015.

OROPESA ÁVILA, M. et al. Emerging roles of apoptotic microtubules during the execution phase of apoptosis. **Cytoskeleton**, v. 72, n. 9, p. 435-446, 2015

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogens and tumor suppressors genes in breast cancer: potencial diagnostic and therapeutic applications. **The oncologist**. [S.] V. 9, n. 4, p. 361-377, 2004.

PFEIFER, G.P. How the environment shapes cancer genomes. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 27, n.1, p. 71-77, 2015.

PIASECKA-SRADER, J. et al. Tamoxifen Prevents Apoptosis and Follicle Loss from Cyclophosphamide in Cultured Rat Ovaries. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**. [S.] v. 92, n. 5, p. 132, 2015.

PICCINATO, C. A. et al. Norepinephrine stimulates progesterone production in highly estrogenic bovine granulosa cells cultured under serum-free, chemically defined conditions. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2012.

PINHEIRO, A. B. et al. Câncer de mama em mulheres jovens: análise de 12.689 Casos. **Rev. bras. cancerol**, v. 59, n. 3, p. 351-359, 2013.

RAMPUARLA, M. M.; ROCQUE, G.B.; BURKARD, M. E. Update on Adjuvant Chemotherapy for Early Breast Cancer. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**. [S.], v. 8, p. 125, 2014.

SAJADIMAJD, Soraya; YAZDANPARAST, Razieh; ROSHANZAMIR, Fariba. Augmentation of oxidative stress-induced apoptosis in MCF7 cells by ascorbate–tamoxifen and/or ascorbate–juglone treatments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 52, n. 2, p. 193-203, 2016.

SALLES, L. P. et al. Aspectos biológicos e bioatividade de materiais a base de MTA em cultura de células: **Estudo In Vitro**. 2012. 137f. Dissertação (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, Universidade Estadual Paulista, 2012.

SCHNEEWEISS, A.; RUCKHÄBERLE, E.; HUOBER, J. Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer –An Anachronism in the Era of Personalised and Targeted Oncological Therapy?. **Geburtsh Frauenheilk**. [S.], v. 75, n.6, p. 574-583, 2015.

SILVA, Ana Carolina Japur de Sá et al. Aspectos fisiológicos do LH na foliculogênese. **Femina**. [S.] v. 34, n. 7, p. 469-476, 2006.

SOUZA, Danielle Kaiser de. **Avaliação da via fosfatidilinositol 3-cinase em células do cumulus provenientes de ovócitos maturados in vitro em meio definido**. 2014.126f. Dissertação (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em STACKIEVICS, R. et al. Tamoxifen Modulates Apoptotic Pathways in Primary Endometrial Cell Cultures. **Clinical Cancer Research**. [S.], v. 7, n. 2, p. 420-415, 2001.

STODDART, M. J. Cell viability assays: introduction. **Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols**, p. 1-6, 2011.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.L; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Cancer cell culture: methods and protocols**, p. 237-245, 2011.

VIREQUE, A. A. et al. Cultura de células da granulosa humanas com fenótipo de fase folicular: influência do sistema quimicamente definido na morfologia, ultraestrutura, secreção de esteroides e relaxina. **Reprodução & Climatério**, v. 28, n. 3, p. 92-103, 2013.

VISOVSKI, C. Treatment Considerations for the Management of Patients With Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. **J. Adv. Pract. Oncol**. [S.], v.5, n.5, p.321-330, set./out., 2014.

WANG, Y. et al. Antiproliferative effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor modulated by nimotuzumab in estrogen-dependent breast cancer cells. **Tumor Biology**, v. 33, n. 4, p. 957-966, 2012.

WEINBERG, R.A. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Guidelines for management of breast cancer. 2006.