

INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA NO EFEITO CITOTÓXICO DO RESVERATROL E QUERCETINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA BASAL DE MAMA

Juliana Nunes Rosón¹; Paulo Luis de Sá Junior²

Estudante do curso de Farmácia; e-mail: juju.rosón@hotmail.com ¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: paulasaj2011@yahoo.com.br²

Área de conhecimento: cancerologia

Palavras-chave: Resveratrol; Quercetina; câncer de mama; hipóxia.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de mama é a segunda patologia que mais ocasiona mortes na população feminina, podendo ser classificado de acordo com seu grau de diferenciação e seus receptores, como: luminais, de receptor epidérmico humano 2 (HER2), e basais ou triplo negativas. Emoral tenha sido alcançado nas últimas décadas, muitos pacientes ainda sucumbem em decorrência de complicações advindas do câncer. Dentre os cânceres de mama, o triplo negativo é o de pior prognóstico. A linhagem MDA-MB-231 não expressa nenhum dos receptores hormonais clássicos e por isso é classificada como triplo negativo e conseqüentemente demonstra alta resistência aos tratamentos convencionais. (SILVA *et al.*, 2008). Assim, novas terapias para prevenção e tratamento deste tipo de câncer de mama se fazem necessárias. Pesquisas recentes têm sugerido que tanto o resveratrol quanto a quercetina desempenham um papel importante na prevenção do câncer. Estes resultados também sugerem que tais compostos podem ter importância no tratamento de diversos tipos de tumores, inclusive os de mama. Tanto resveratrol quanto a quercetina são polifenóis de origem vegetal com potente ação antioxidante, que contêm atividades anticancerosas. São capazes de alterar o metabolismo celular, reduzir a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), fatores pró-inflamatórios, modificam ciclo celular, inibem vias quinase e ativam apoptose, além de inibirem fatores de transcrição migratórios (ALQATHAMA; PRIETO, 2014).

Neste estudo analisamos o potencial citotóxico de resveratrol e quercetina em normóxia e em hipóxia aplicando várias técnicas de investigação utilizando-se células MDA-MB-231 como modelo.

OBJETIVO

Avaliar a atividade tumoral (tumor de mama) do resveratrol e da quercetina isoladamente ou associados tanto em normóxia quanto em hipóxia.

METODOLOGIA

Reagentes: Soluções estoque de resveratrol (Shaanxi J. Phytochem CO LTD, China), de quercetina (Sigma®, USA) em uma concentração de 1mM, e deferoxamina (Sigma-Aldrich®) 10mM foram preparadas em tampão (PBSx1, Invitrogen; 0.01M, pH = 7.4).

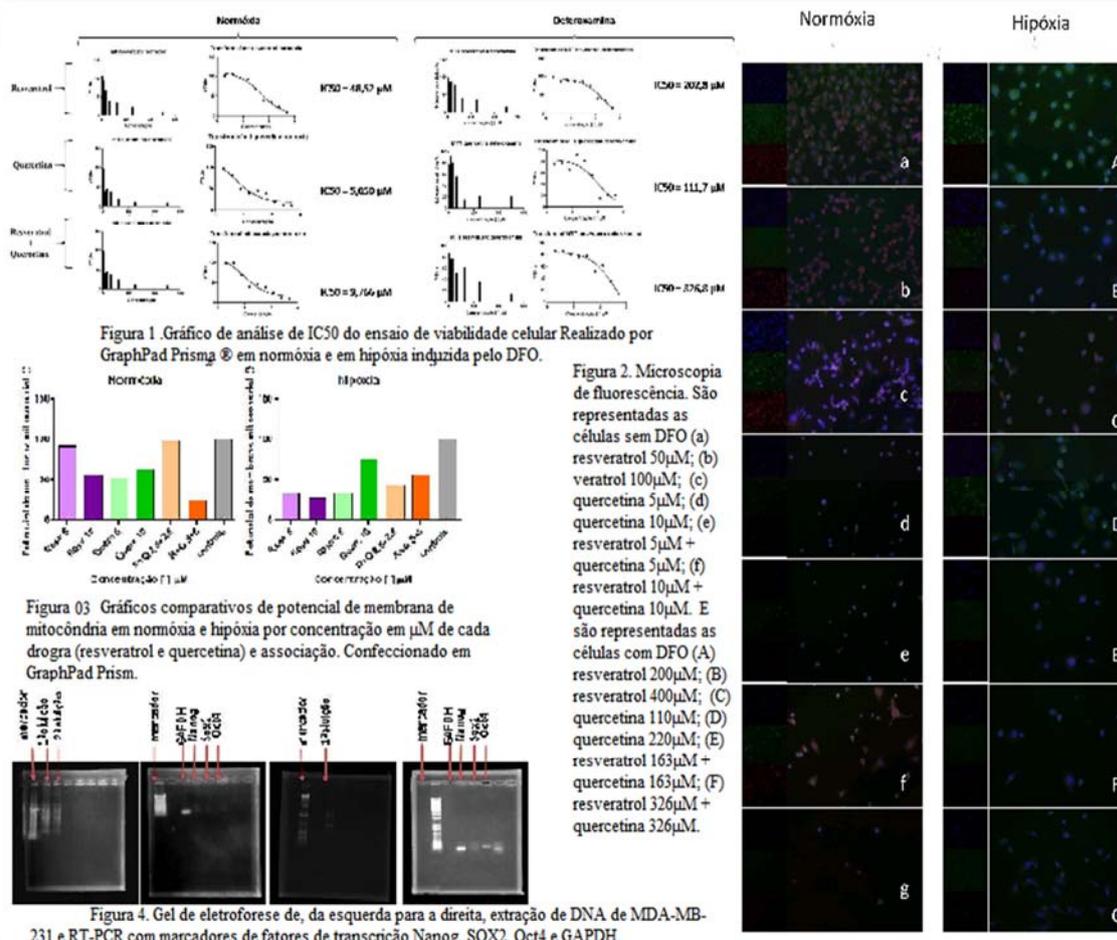
Cultivo celular: As células MDA-MB-231 (ATCC®) foram cultivadas em frascos de 25 cm² em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco) (10% soro bovino fetal inativo e 1% penicilina). Para plaqueamento as células são enzimaticamente tratadas com 0.25% de tripsina/EDTA (Invitrogen) e transferidas para placas de cultivo (Corning, New York, NY, USA). Todas as culturas são incubadas a 37°C em 5% CO₂ com atmosfera úmida.

Avaliação da citotoxicidade por MTT: plaqueamento em placas de 96 poços. Após aplicação das drogas (diluição seriada) as células foram incubadas por 24h. Depois de

24 h, foi aplicado 10µl de MTT (Sigma) em cada poço em uma concentração final de 5mg/ml, incubada de 2 a 4 horas em 37°C na estufa. O meio foi descartado e em 100µl de DMSO (Sigma) foram adicionados. Para indução da hipóxia, foram adicionados meio com 100uM de deferoxamina. Cada experimento foi realizado em duplicata e tirado uma média percentual. Gráficos feitos com Graph Prisma®. **Citometria de Fluxo (ciclo celular, potencial de mitocôndria e ROS):** As células MDA-MB-231 normóxia foram plaqueadas em placas de 6 poços, sendo 2 poços controle, um tratado com Em seguida, as células mortas e vivas foram colhidas por tripsinização, lavadas em tampão PBS. No ciclo, fixadas em etanol 70%, lavadas duas vezes em PBS1x, adicionou-se 300µl de Triton, lavadas, no pélete foram adicionados 500µl de PBS, e encubado 45 min com 10 mg/mL de RNase (Purelink™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), foi colocado 2µl Iodeto de Propídeo 1mg/mL (PI) (Sigma, St. Louis, Mo) por 30 min encubando, lidas por citometria de fluxo foi realizada utilizando o FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). No potencial de mitocôndria foi diluída a solução MitoTracker® na concentração de 1mM, encubada na estufa de 45 minutos. Após foram centrifugadas e ressuspendidas em 300 µL de PBS. No ensaio de ROS celular, foram tratadas com 40uL do marcador H₂DCF-DA (Sigma) após serem tripsinizadas e encubadas por 40 min, lavadas e ressuspendidas em PBS. O potencial e ROS foram lidos em FACSsort pelo citômetro Accuri® e analisados BD Accuri® software. **Microscopia de Fluorescência:** MitoTracker® -DeepRed (1mM), foi aplicado 1µL e encubadas em estufa de 45 minutos, centrifugadas e permeabilizadas com Triton 0,1% por 10 minutos, lavadas 2 vezes com PBS por 5 minutos. Em seguida foi adicionado Faloidina (Sigma) (1:1000 , 25µl) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, e seguida as lâminas foram montadas com 8 µl de Vecta Shield (Hoesch) (Sigma), seladas com esmalte, e observada no microscópio Nikon Eclipse Ni®. **Avaliação da expressão gênica (RT-PCR):** para extração de RNA foi usado o *kit da Qiagen* (Invitrogen), e quantificado no espectrofotômetro (ThermoScientific, Waltham, MA). Utilizando-se o *kit Gataq Green Master Mix RT-PCR* (Invitrogen) o cDNA foi construído e os genes de interesse foram ampliados utilizando-se os primers GAPDH, Nanog, Sox2 e Oct4. Em seguida os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de 1,2% agarose em tampão TAE, corados por um banho de imersão em brometo de etídio 4% (Invitrogen) e visualizado no mesmo transluminador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado principalmente, no ensaio de viabilidade celular para o cálculo de IC₅₀, pela microscopia de fluorescência, pelo potencial de mitocôndria, o efeito antiproliferativo de resveratrol e quercetina se comparado ao controle. Através do cristal de formazã, metabólito mitocondrial de MTT, pôde se observar a viabilidade celular. Os gráficos (figura 1) demonstram a ação citotóxica do resveratrol e da quercetina em normóxia e em hipóxia. Os resultados demonstram um maior potencial citotóxico da quercetina em relação ao resveratrol e quando associados ambos exercem um efeito sinérgico. Também foi observado nas células tratadas com a DFO diminuição do potencial citotóxico de ambas as drogas isoladas e associadas em relação ao estado de normóxia. As principais alterações celulares induzidas pelas drogas foram: redução do número total de célula, perda de adesão ao substrato, núcleo em cariorrexe, a diminuição não tão significativa da mitocôndria, devido a apoptose ocorrida e a fragilidade proporcionada na membrana celular, principalmente com o uso de resveratrol. Contudo as alterações morfológicas promovidas pela quercetina foram mais evidentes do que aquelas observadas com o resveratrol (figura 2). Em seguida, foi analisado o potencial de mitocôndria ($\Delta\Psi_m$). Nossos resultados indicam que o $\Delta\Psi_m$ foi



reduzido por ambos flavonóides em normóxia e em hipóxia, sendo melhor observada a redução na segunda dose da associação de quercetina com resveratrol (figura 3). Estudos indicam que perda de $\Delta\Psi_m$ é relativamente induzida por altas concentrações de resveratrol, (acima de 100µM em normóxia). Aventamos a hipótese de que hipóxia ao estresse das drogas tenha potencializado a redução do $\Delta\Psi_m$. Devido a elevada citotoxicidade da quercetina não foi possível avaliar o $\Delta\Psi_m$ nas maiores concentrações, provavelmente devido a ruptura das membranas celulares (citoplasmática e mitocondriais). Uma vez que a hipóxia é um fator que aumenta a resistência das células tumorais aos diversos quimioterápicos utilizados na clínica, nós avaliamos se a hipóxia induzida por DFO, mimetiza a hipóxia *in vivo*, aumentando a resistência celular ao resveratrol e a quercetina. Com isso, verificamos qualitativamente pela análise de RT-PCR que quando a célula é tratada com DFO é aumentada a expressão de Nanog, Sox2 e Oct4 (figura 4). Estes são fatores de transcrição envolvidos com autorrenovação de células tronco. Nossos resultados mostraram que a DFO induz a expressão destes genes, podendo levar a reprogramação de características epiteliais para mesenquimais.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível observar principalmente a ação de resveratrol e quercetina nas células tumorais em normóxia e em hipóxia (mimetizando hipóxia *in vivo*). Foi observado que em normóxia e baixas concentrações o resveratrol aumenta a proliferação celular por aumentar as fases S e G2/M. Este fato não foi observado quando utilizamos a quercetina, sobretudo devido ao seu maior efeito citotóxico. Além disso, a

quercetina foi capaz de induzir a fragmentação do DNA (fase sub-G/G1) indicando seu potencial como agente apoptótico. Além disso, foi observada a diminuição no potencial de membrana mitocondrial, sendo que este foi mais evidente nas condições de hipóxia. A produção de ROS que foi aumentada por ambas as drogas em normóxia, foi reduzida em condições de hipóxia evidenciando os efeitos antioxidantes das mesmas. . A análise morfológica das células tratadas demonstrou que ambas as drogas alteram a arquitetura celular, sobretudo em hipóxia e esses dados foram corroborados pela microscopia de fluorescência que nos permitiu avaliar a disposição do citoesqueleto.

Assim, nossos resultados corroboram resultados prévios sobre o potencial do resveratrol e da quercetina como possíveis agentes nutracêuticos/fitoterápicos para serem utilizados como possíveis adjuvantes no tratamento e prevenção do câncer de mama. Além disso, estas drogas demonstram um efeito sinérgico, sobretudo em hipóxia. Esses resultados, embora preliminares, evidenciam o potencial terapêutico tanto o resveratrol não só como antioxidantes naturais, mas também como possíveis protótipos para desenvolvimento de novas drogas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SILVA, F.; CARVALHO, S.; MILANEZI F.; SCHMITT, F. C. Carcinoma da mama de tipo basal. Artigo de Revisão - Acta Med Port, 21, 373-378. 2008.

ALQATHAMAAB; PRIETO, M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. The Royal Society of Chemistry 2015. Highlight. 2014.