

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

NATAN DE DAVID

**Avaliação de mecanismos celulares em resposta a derivados
retinoides para o tratamento de câncer de mama.**

Dissertação de Mestrado

Campo Grande
2016

NATAN DE DAVID

**Avaliação de mecanismos celulares em resposta a derivados
retinoides para o tratamento de câncer de mama.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Renata Matuo

Campo Grande

2016

*Dedico este trabalho a DEUS, a ti meu PAI
toda honra e toda glória.*

AGRADECIMENTOS

A Nossa Senhora, minha mãezinha que concedeu força e coragem para nunca desistir;

Aos meus pais, Nilo de David e Dilce Salete de David, por todo apoio, carinho e força;

A todos os meus amigos, pelo companheirismo, pelo apoio e por proporcionarem momentos únicos de alegria e descontração;

Aos meus orientadores, professor Dr. Rodrigo Juliano Oliveira e professora Dra. Renata Matuo, pela paciência, dedicação e confiança em mim na condução deste projeto e, sobretudo, por me proporcionarem crescimento profissional;

Ao professor Dr. Adriano César de Moraes Baroni, pelo fornecimento dos compostos químicos utilizados neste trabalho;

A Dra. Eliane Borges de Almeida, pelo auxílio na execução e análise do experimento de ciclo celular por citometria de fluxo;

Aos professores, Dra. Renata Trentin Perdomo, Dr. Carlos Alexandre Carollo e Dr. Fabrício Garmus Souza, pelas contribuições no exame de qualificação;

Aos meus colegas de laboratório, Bárbara, Cláudia, Nayara, Juliana, Fabrícia, João, Lucas, Michel, Mariana e Ana Paula, pelo auxílio na execução do projeto e agradável convivência.

As técnicas de laboratório, Ana e Rose, pela dedicação, profissionalismo e agradável convivência durante a execução do projeto;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

Meus sinceros agradecimentos.

*“Uma mente que se abre a uma nova ideia
jamais retornará a sua dimensão original.”*

Oliver Wendell Holmes.

SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Centro de Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen) do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Auxílio à Pesquisa Científica (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo Edital Chamada FUNDECT/CNPq Nº 05/2011 – PPP (Processo #23/200.702/2012; Nº FUNDECT 0207/12; Nº 020937) e pelo Edital Chamada FUNDECT/CAPES Nº 12/2014 – BIOTA-MS (Processo #23/200.225/2014, Nº Fundect 79/2014; Nº SIAFEM 23629), e Programa de Educação Tutorial (PET-Farmácia/UFMS).

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum de câncer no mundo, correspondendo a aproximadamente 25% do total de novos casos anuais. Em regiões menos desenvolvidas corresponde à maior causa de morte entre as mulheres. A utilização de retinoides para o tratamento de tumores de mama é uma abordagem que vem ganhando força, principalmente em tumores estrogênio responsivos. Os retinoides são derivados naturais ou sintéticos da vitamina A que atuam principalmente pela ligação a receptores nucleares, modulando a expressão de genes alvos. O interesse na sua utilização para terapia antitumoral deriva da capacidade desses compostos em promover diferenciação, apoptose e controle de proliferação em linhagens tumorais, o que os torna promissores agentes antitumorais. A utilização de ligantes seletivos, a modificação molecular de compostos líderes e a combinação com outros agentes antitumorais, são estratégias adotadas para diminuir os efeitos colaterais e melhorar o perfil de toxicidade desses compostos. Este trabalho avaliou os mecanismos celulares envolvidos na resposta de células tumorais de adenocarcinoma mamário (MCF7) ao tratamento com duas novas moléculas retinoides, derivadas de modificações moleculares no composto líder AM580 e sua associação a doxorrubicina. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada juntamente com sua capacidade de induzir danos ao DNA, paradas de ciclo celular e apoptose. Os resultados demonstraram que os compostos diminuem a viabilidade celular e em períodos curtos de exposição causam morte celular por apoptose, sendo que o mecanismo de morte não está relacionado com danos no DNA. Além disso, demonstraram pronunciado efeito sobre o ciclo celular, induzindo paradas na fase G1. Quando combinados com a doxorrubicina potencializaram os danos no DNA e morte celular por apoptose induzidos pelo quimioterápico. Por fim, estas observações sugerem a possibilidade do desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos com a inserção de retinoides seletivos para o tratamento de tumores de mama.

Palavras-chave: Retinoides, Câncer de mama, AM580, MCF7, modificações moleculares.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common type of cancer worldwide, corresponding for approximately 25% of all new cases annually. In underdeveloped regions it corresponds to the major cause of death among women. Using retinoids for breast tumors treatment is an approach that has gained strength, especially in estrogen responsive tumors. Retinoids are natural or synthetic vitamin A derivatives which act primarily by binding to nuclear receptors, modulating the expression of target genes. The interest for anticancer therapy derives from the ability of these compounds to promote differentiation, proliferation and apoptosis in tumor cell lines, which makes them promising antitumor agents. Selective ligands, molecular modification of lead compounds and combination with other antitumor agents are strategies adopted to reduce side effects and improve toxicity profile of these compounds. This study evaluated cellular mechanisms in response to two new retinoids derivatives obtained from molecular modifications in the lead compound AM580 and its association with doxorubicin in breast adenocarcinoma tumor cells (MCF7). Cytotoxicity was assessed by the ability to induce DNA damage, apoptosis and cell cycle arrest. Results showed that compounds decreased cell viability and short-time exposure induced cell death by apoptosis, which was not related to DNA damage. Furthermore, retinoids presented pronounced effect on cell cycle, inducing G1 arrest. When combined with doxorubicin, retinoids potentiated DNA damage and cell death by apoptosis induced by the chemotherapeutic drug. Finally, these observations suggest the possibility of developing new therapeutic regimens with selective retinoids for breast tumors treatment.

Keywords: Retinoids, Breast cancer, AM580, MCF7, molecular modifications.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRA - *All trans-retinoic acid* - Ácido trans-retinoico

Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2* - Linfoma de células B 2

BRCA 1 - *Breast cancer 1* - Câncer de mama 1

BRCA 2 - *Breast cancer 2* - Câncer de mama 2

Cdk2 - *Cyclin-dependent kinase 2* - Cinase dependente de ciclina 2

FDA - *Food and Drug Administration*

HER2/neu - *Human Epidermal growth factor receptor 2* - Receptor de crescimento epidermal humano 2

IC50 - Growth Inhibitory concentration 50% - Concentração de inibição de crescimento de 50%

LPA - Leucemia promielocítica aguda

Mdr1 - *Multi-drug resistance protein 1* - Proteína de resistência múltipla a drogas 1

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

PML - *Promyelocytic leukemia* - Leucemia promielocítica

RAR: Receptor de ácido retinoico

RE: Receptor de estrogênio

RP: Receptor de progesterona

RXR: Receptor x retinoide

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo I	
Figura 1 — Estrutura mamária feminina normal (A) e principais localizações de tumores de mama. (B) Carcinoma lobular in situ (C) Carcinoma ductal in situ (D) Câncer de mama inflamatório. Adaptado AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014.	15
Figura 2 — Mecanismo de ação de retinoides. (Fonte: KAGECHIKA, 2009)	17
Capítulo II	
Figura 1 — Estrutura química dos derivados retinoides empregados neste estudo e de seu precursor AM580. Os retângulos em negrito demonstram os locais de modificações moleculares que originaram os compostos RT1 e RT2. Adaptado Garcia (2012).	34
Figura 2 — Avaliação dos efeitos de RT1 e RT2 sobre a viabilidade celular na linhagem tumoral de mama MCF-7. Diferentes concentrações de RT1 e RT2 foram avaliadas isoladas e em combinação com doxorubicina (Doxo) (0,3 μ M). Os tratamentos foram realizados por 72h. Os gráficos (A) e (C) representam as médias e o desvio padrão da média de três repetições independentes com cinco réplicas para o ensaio de viabilidade celular. Os gráficos (B) e (D) representam os valores de índice de combinação (CI) calculados segundo o método de Chou e Talalay para as combinações de RT1 e RT2 com a doxorubicina e a respectiva fração celular afetada (FA) pelo tratamento.	38
Figura 3 — Danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa na versão alcalina após o tratamento por 4h (barras cinza) e 4h seguidos por 16h (barras pretas) em meio livre de drogas com RT1 (A) e RT2 (B) em diferentes concentrações, associados ou não com doxorubicina (Doxo) (0,6 μ M), na linhagem tumoral de mama MCF-7. A análise foi realizada	39

com auxílio do software ImageJ/OpenComet, utilizando o parâmetro Tail Moment para comparação das células com danos no DNA. Os gráficos representam as médias e o erro padrão da média de duas repetições independentes. As diferenças estatísticas entre os tratamentos do mesmo tempo experimental (barras de mesma cor) foram analisadas por Kruskal-Wallis/Dunn, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). A comparação dos tratamentos entre os diferentes tempos experimentais foi feita por teste de Mann Whitney, chaves com asterisco indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

41

Figura 4 — Frequência de células apoptóticas observadas após o tratamento por 4h (barras cinza) e 4h seguidos por 16h (barras pretas) em meio livre de droga com as concentrações de $50\mu\text{M}$ e $20\mu\text{M}$ dos compostos RT1 e RT2, respectivamente, associados ou não com doxorubicina (Doxo) ($0,6\mu\text{M}$), na linhagem tumoral de mama MCF-7. Foram analisadas 100 células por réplica, classificadas pelo aspecto morfológico e coloração diferencial por brometo de etídio e acridina laranja. Os gráficos representam as médias e o erro padrão da média de duas repetições independentes com duas réplicas. As diferenças estatísticas entre os tratamentos do mesmo tempo experimental (barras de mesma cor) foram analisadas por ANOVA/Tukey, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). A comparação dos tratamentos nos diferentes tempos experimentais foi feita por teste de Mann Whitney, chaves com asterisco indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

42

Figura 5 — Efeito sobre o ciclo celular após tratamento por 4h (A) e 4h seguidos por 16h em meio livre de droga (B) com as doses de $50\mu\text{M}$ e $20\mu\text{M}$ dos compostos RT1 e RT2, respectivamente, associados ou não com doxorubicina (Doxo) ($0,6\mu\text{M}$), na linhagem tumoral de mama MCF-7. Foram adquiridos 10.000 eventos por repetição. Os gráficos representam as médias e o erro padrão da média da porcentagem de eventos nas diferentes fases do ciclo celular de duas repetições independentes.

SUMÁRIO

Capítulo I.....	13
1. Revisão da literatura.....	13
1.1. Câncer	13
1.2. Câncer de mama.....	13
1.3. Vitamina A.....	16
1.4. Retinoides e seu mecanismo de ação	16
1.5. Aplicação de retinoides na terapia antitumoral	18
1.6. Retinoides e câncer de mama	19
1.7. Perspectivas da utilização de retinoides.....	19
2. Referências bibliográficas	21
Objetivo geral	29
Objetivos específicos	29
Capítulo II – Manuscrito	30

Capítulo I

1. Revisão da literatura

1.1. Câncer

Câncer é um termo genérico para um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação celular descontrolada e invasão de tecidos adjacentes que podem, eventualmente, espalhar-se para outras partes do organismo (metástases) (IARC, 2015). O câncer pode se originar de uma única célula mutada. As alterações genéticas que contribuem para o desenvolvimento do mesmo, em geral, afetam três classes principais de genes: os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes relacionados ao reparo de DNA (NCI, 2015).

Os fatores de risco relacionados ao câncer podem ser herdados ou decorrentes da interação do organismo com agentes externos, como os agentes físicos (radiação ionizante e não ionizante), compostos químicos e agentes biológicos (infecções por determinados vírus, bactérias e parasitas) (INCA, 2016a). A idade é outro fator fundamental para o desenvolvimento do câncer, bem como a obesidade e o sedentarismo. Além disso, o acúmulo de mutações e a perda da eficiência dos sistemas de reparo favorecem o surgimento da doença (IARC, 2015).

Com cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em 2012, o câncer figura entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo (FERLAY et al., 2015).

1.2. Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum de câncer no mundo e o mais comum entre as mulheres, sendo responsável por 25% do total de novos casos de câncer anualmente e a quinta maior causa de morte entre todos os cânceres no mundo. Em regiões menos desenvolvidas corresponde à maior causa de morte entre as mulheres e a segunda maior causa em regiões mais desenvolvidas do mundo (FERLAY et al., 2015).

No Brasil a incidência e a mortalidade deste tipo de tumor são elevadas. Anualmente, 25% do total de novos casos correspondem a tumores de mama. Em números, são estimados 57.960 novos casos em 2016. A sobrevida média após

cinco anos é de apenas 61%, derivada principalmente de diagnósticos tardios (INCA, 2016b).

O câncer de mama é mais comum em mulheres do que em homens e dentre os fatores de riscos pode citar-se a idade avançada, o histórico familiar e mutações em genes específicos, tais como BRCA1 e BRCA2 (ACS, 2014a).

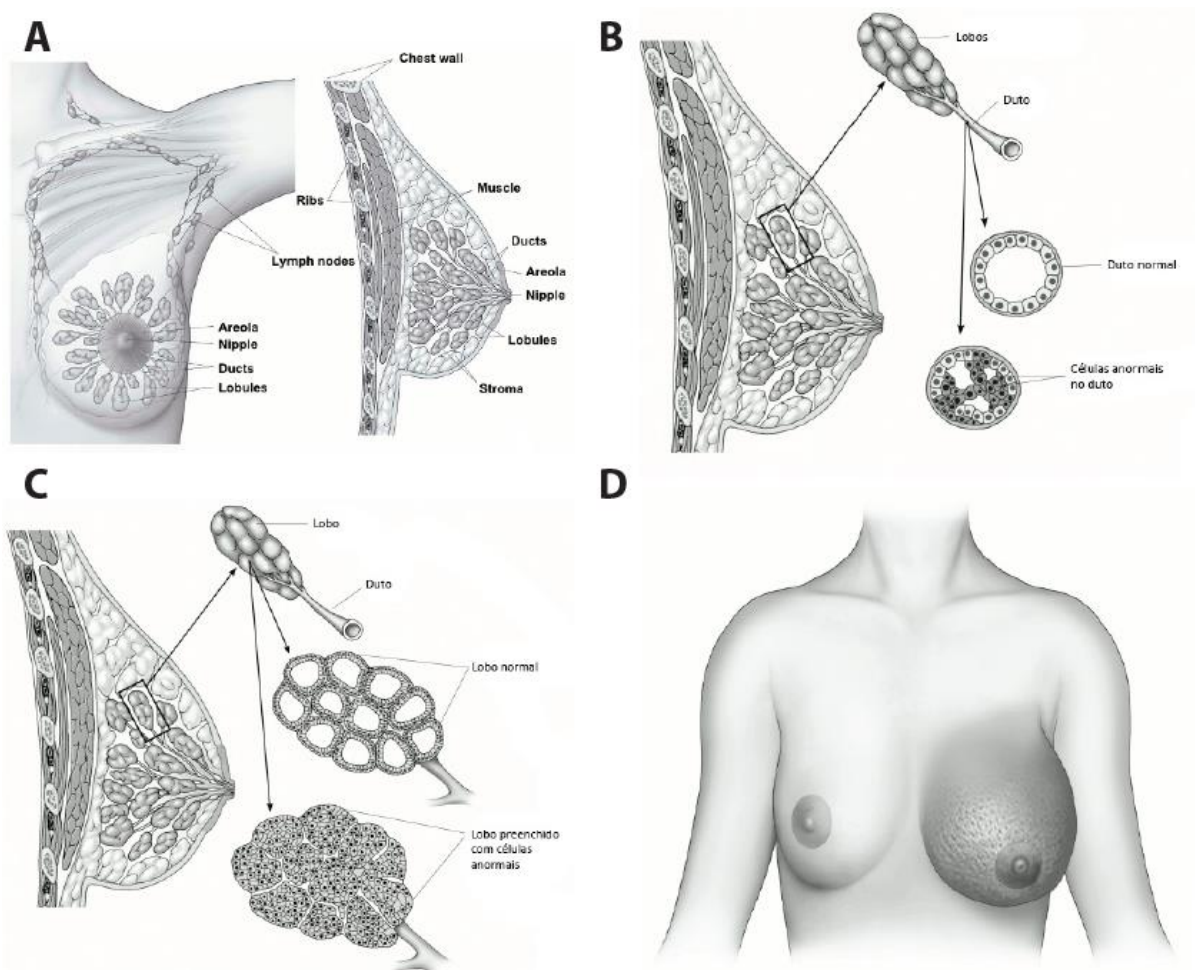
A mama é constituída por lóbulos de glândulas túbulo-alveolares, cada mama possui de 15 a 25 lóbulos que produzem o leite, pequenos ductos que conduzem o leite até o mamilo, vasos sanguíneos e linfáticos, tecido adiposo e conectivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008) (Figura 1A). O tipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma ductal invasivo que se inicia nas células dos ductos e pode invadir tecidos adjacentes. As células tumorais também podem manter-se confinadas no ducto, sendo este tipo de tumor denominado carcinoma ductal *in situ* (Figura 1B). O câncer que se inicia nos lóbulos é chamado de carcinoma lobular (Figura 1C) e outro tipo menos comum é o câncer de mama inflamatório (Figura 1D), que é provocado pelo bloqueio dos vasos linfáticos pelas células tumorais. Além da localização primária do tumor, o tamanho do tumor e o comprometimento de linfonodos também são levados em consideração na sua classificação.

Características moleculares dos tumores também são fatores importantes na classificação. A avaliação do *status* de receptores hormonais como o receptor para estrogênio (RE), progesterona (RP) e HER2, é indicada em todos os casos de câncer de mama por comitês de consenso oncológicos internacionais (GOLDHIRSCH et al., 2011), pois são biomarcadores preditivos de resultados na terapia e do prognóstico da doença. Além disso, muitos testes têm sido propostos para subestratificar os cânceres em grupos moleculares e identificar pacientes com câncer de mama de forma personalizada. A identificação de subgrupos moleculares (luminais A e B, HER2, basal e normal *breast-like*), utilizando expressão gênica ainda é pouco difundida, pois engloba a utilização de técnicas caras de diagnóstico e metodologicamente difíceis para uso rotineiro em laboratórios de anatomia patológica (SOTIRIOU et al., 2006).

O tratamento do câncer de mama está diretamente relacionado às características tumorais discutidas anteriormente, e envolve a utilização de remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, hormônio terapia e terapias alvo. A escolha do método baseia-se no objetivo da terapia, bem como os possíveis efeitos colaterais

(ACS, 2014a). Diferentes classes de quimioterápicos são utilizados na quimioterapia sistêmica de tumores de mama, incluindo as antraciclina (doxorubicina e epirrubicina), taxanos (paclitaxel e docetaxel), alquilante (ciclofosfamida), composto platinado (carboplatina), além de análogos de base (gencitabina e capecitabina) (COLEMAN, 2009). Em tumores com receptores hormonais ativos (RE+/RP+), a hormônio terapia é indicada após a ressecção cirúrgica para evitar o reaparecimento da doença, o medicamento mais utilizado é o tamoxifeno. Tumores com superexpressão do gene HER2/neu geralmente estão relacionados com prognóstico ruim da doença e são tratados com anticorpos monoclonais direcionados a proteína formada pela expressão do gene (terapia alvo), um dos medicamentos utilizado é o trastuzumab (COLEMAN, 2009; TELLI; CARLSON, 2009).

Figura 1 — Estrutura mamária feminina normal (A) e principais localizações de tumores de mama. (B) Carcinoma lobular in situ (C) Carcinoma ductal in situ (D) Câncer de mama inflamatório.



Fonte: Adaptado de ACS, 2014b.

1.3. Vitamina A

A vitamina A e seus derivados naturais não são sintetizados pelo organismo e necessitam serem ingeridos na alimentação, podendo ser obtidos de fontes animais ou vegetais (ROSS; HARRISON, 2013). Curiosamente, o interesse científico por estes compostos surgiu a partir de estudo de manipulação da dieta de ratos por Lunnin (1881). Nesse estudo os animais alimentados com leite integral desenvolviam-se normalmente, enquanto aqueles alimentados com caseína pura, sacarose, gordura, minerais e água, adoeciam e morriam (LUNIN, 1881). Em 1912, a hipótese de que pequenas quantidades de fatores alimentares acessórios presentes no leite integral poderiam ser responsáveis pelo crescimento normal dos ratos, foi levantada por Hopkins (1912). No mesmo ano, Casmir postulou o termo vitaminas, como aqueles nutrientes presentes em pequenas quantidades nos alimentos, que são responsáveis pelo desenvolvimento saudável dos mamíferos (CASMIR, 1975). Finalmente, em 1913, dois estudos comprovaram a teoria de que um componente minoritário não sintetizado pelo organismo, presente no leite integral, até então conhecido com *Fat-soluble A*, seria o responsável pelo desenvolvimento normal dos ratos (CHEMISTRY; MCCOLLUM, 1913; OSBORNE; MENDEL, 1913).

Nos anos seguintes, vários estudos foram conduzidos com a vitamina A e o seu ácido (do inglês, posteriormente conhecido como *all-trans-retinoic acid* (ATRA) – ácido trans-retinoico), identificando diversos processos relacionados à deficiência e ao excesso desses compostos no organismo, tais como malformações de genitálias (COHLAN, 1953), regulação e manutenção de vários tecidos (DOWLING; WALD, 1960) e disfunção visual (WALD, 1968).

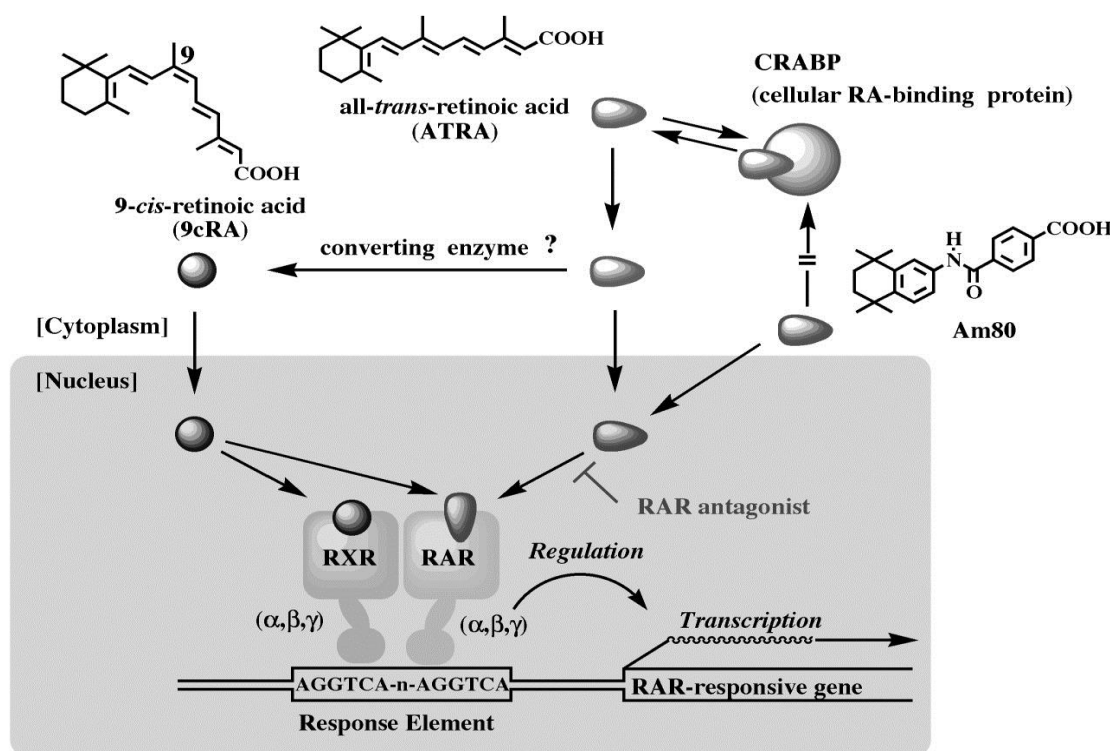
1.4. Retinoides e seu mecanismo de ação

Os retinoides são um grupo de mais de 4.000 substâncias estruturalmente/funcionalmente relacionados à vitamina A ou seus derivados naturais, o ácido trans-retinóico (ATRA) e o ácido cis-9-retinóico (ALIZADEH et al., 2014). Por definição, retinoides são substâncias que possuem a capacidade de interagir com os receptores retinoides (SPORN et al., 1986). Em 1973, M. Bashor formulou a hipótese de que a formação de um complexo hormônio-receptor que entra no núcleo e interage com componentes nucleares, afetando a transcrição de

genes, poderia ser o mecanismo responsável pela de ação dos retinoides (BASHOR; TOFT; CHYTIL, 1973). O trabalho de Giguere et al. (1987) revelou o receptor responsável pela atividade do ATRA, consolidando a hipótese de que o mecanismo de ação dos retinoides é mediado por interação com receptores nucleares.

Atualmente, sabe-se que a atividade biológica dos retinoides é derivada da interação com dois tipos de receptores nucleares, os receptores para ácido retinoico (RAR) (RAR α , RAR β e RAR γ) e os receptores x retinoide (RXR) (RXR α , RXR β e RXR γ). Os receptores RAR podem ser ativados pelo ácido *trans*-retinoico e pelo ácido 9-*cis*-retinóico, enquanto que os receptores RXR são ativados apenas pelo o ácido 9-*cis*-retinóico. A forma ativa do receptor consiste em um heterodímero formado pela união de um receptor RAR com um RXR, esse complexo reconhece sequências específicas de nucleotídeos na região promotora de genes e interage com co-ativadores ou co-repressores adicionais que podem, por fim, ativar a transcrição, alterando a expressão de genes alvos (DAS et al., 2014; DI MASI et al., 2015) (Figura 2).

Figura 2 — Mecanismo de ação de retinoides.



1.5. Aplicação de retinoides na terapia antitumoral

Os retinoides são amplamente estudados na prevenção e tratamento de câncer devido a capacidade de indução de diferenciação e apoptose, controle de proliferação e atividade antioxidante em modelos experimentais que utilizaram diversas linhagens celulares tumorais (TANG; GUDAS, 2011; CONNOLLY; NGUYEN; SUKUMAR, 2013; ALIZADEH et al., 2014).

Os retinoides foram os primeiros compostos utilizados para a prevenção do câncer e essa abordagem originou o termo “quimioprevenção” em 1976. A aplicação baseava-se na estabilização, retardo ou reversão de lesões pré-neoplásicas por agentes cito-diferenciadores, como os retinoides, prolongando ou revertendo o processo de carcinogênese (SPORN, 1976).

A mais bem sucedida aplicação de retinoides na terapia antitumoral é a utilização do ATRA para o tratamento de leucemia promielocítica aguda (LPA) (MASETTI et al., 2012). A LPA é caracterizada por uma translocação cromossômica t(15;17)(q22;q11) que leva a fusão dos genes PML e RAR α (DE THÉ et al., 1990). A expressão dos genes leva a formação do receptor PML-RAR α , cuja função é alterada. O receptor mutado, PML-RAR α , pode formar homodímeros que bloqueiam a capacidade de ligação a elementos responsivos na região promotora de genes alvos, conseqüentemente as células hematopoiéticas que expressam PML-RAR α não possuem a capacidade de diferenciação (FENRICK; HIEBERT, 1998; GRIGNANI et al., 1998). O ATRA atua como potente indutor de diferenciação das células de leucemia a granulócitos normais (FENAUX; WANG; DEGOS, 2007). O mecanismo proposto inclui a degradação do receptor mutado PML-RAR α (YOSHIDA et al., 1996) e parada de ciclo em G1, inibindo a proliferação celular (CASINI; PELICCI, 1999). A inserção do ATRA revolucionou o tratamento de LPA aumentando a taxa de remissão da doença para mais de 90% dos casos (TALLMAN et al., 1997).

Outras aplicações dos retinoides em câncer incluem a utilização de Bexaroteno (Targretin®), um ligante seletivo dos receptores RXR, para o tratamento de linfomas cutâneos de células T. O tratamento é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e está associado à remissão da doença refratária em mais de 50% dos casos (DUVIC et al., 2001). Além disso, vários ensaios clínicos investigam

a utilização de retinoides na prevenção e tratamento de diversos tumores sólidos, tais como o de cabeça e pescoço, pulmão, ovário e mama (CONNOLLY; NGUYEN; SUKUMAR, 2013).

Dentre as pesquisas em tumores sólidos verifica-se que modificações epigenéticas, como o silenciamento da expressão do receptor RAR β , estão entre os principais fatores que contribuem para os resultados negativos de ensaios clínicos (WIDSCHWENDTER et al., 1997; MEHROTRA, 2004). O gene RAR β atua como supressor tumoral e a perda da expressão deste gene é um evento importante na tumorigênese de diferentes tipos tumorais, incluindo câncer de pulmão (ZHANG; LIU; LEE, 1996), cabeça e pescoço (XU et al., 1994) e câncer de mama (WIDSCHWENDTER et al., 1997).

1.6. Retinoides e câncer de mama

Há um grande interesse na utilização de retinoides para o tratamento de câncer de mama. Diversos estudos pré-clínicos demonstram o potencial de derivados retinoides naturais, como o ATRA, ou sintéticos, na diminuição da proliferação celular de linhagens de câncer de mama *in vitro* (TOMA et al., 1998; SIMEONE; TARI, 2004) e prevenção da carcinogênese mamária em roedores (MOON; MEHTA, 1990). Entretanto, o sucesso em ensaios clínicos ainda não é relevante, principalmente porque aspectos celulares e moleculares dos tumores não são considerados no delineamento de ensaios clínicos (GARATTINI et al., 2014). De fato, dentre os subtipos de tumores mama, os estrogênio responsivos demonstram ser mais sensíveis a retinoides devido a uma relação positiva entre a expressão de receptores para estrogênio e a expressão do receptor RAR α (LU et al., 2005; CICATIELLO et al., 2010; ROSS-INNES; STARK, 2010), considerado o determinante primário da atividade de retinoides em tumores de mama (BOSCH et al., 2012). Notavelmente, a utilização de ligantes específicos para o receptor RAR α é mais efetiva no controle da proliferação celular de tumores de mama, do que ligantes inespecíficos, como o ATRA (BOSCH et al., 2012; BRIGGER et al., 2015).

1.7. Perspectivas da utilização de retinoides

A utilização de retinoides está relacionada a efeitos tóxicos a diferentes órgãos e tecidos como fígado, rim, sistema nervoso central e pele, além de teratogenicidade. Tais efeitos adversos tornam a utilização de retinoides dose e tempo limitados (ARAFÁ et al., 2000; ZUSI; LORENZI; VIVAT-HANNAH, 2002).

Uma possível estratégia para diminuição da toxicidade relacionada aos retinoides é a utilização de compostos seletivos RAR α , visto que essa abordagem pode reduzir certos aspectos de toxicidade sistêmica e limitante de dose, como erupções cutâneas e hipertensão intracraniana (GARATTINI; GIANNI; TERAÓ, 2007). Do ponto de vista químico estrutural, estratégias de modificações moleculares em composto líderes, como o AM580, um ligante seletivo RAR α , podem originar moléculas com melhores perfis de toxicidade, ligação e ativação do receptor RAR α (DE LERA et al., 2007). Outra possibilidade é a combinação com outros agentes quimioterápicos com mecanismos de ação complementar e diferentes perfis de toxicidade com intuito de aumentar a eficácia, permitindo uma redução substancial de toxicidade e prevenção de resistência (FREEMANTLE; SPINELLA; DMITROVSKY, 2003).

Frente ao exposto, este trabalho avaliou os aspectos celulares envolvidos na resposta ao tratamento de células tumorais de mama MCF-7 a duas novas moléculas retinoides, estrategicamente desenvolvidas a partir modificações moleculares do composto seletivo RAR α , AM580, a fim de proporcionar diminuição da toxicidade, melhoria da interação e ativação do receptor, bem como, aprimorar as características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas da molécula, podendo ser de grande valia na terapia do câncer.

2. Referências bibliográficas

ACS. What are the risk factors for breast cancer? **American Cancer Society**, 2014a. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

ACS. What is breast cancer? **American Cancer Society**, 2014b. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>>.

ALIZADEH, F.; BOLHASSANI, A.; KHAVARI, A.; BATHAIE, S. Z.; NAJI, T.; BIDGOLI, S. A. Retinoids and their biological effects against cancer. **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 43–49, jan. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576913004104>>.

ARAFI, H. M.; ELMAZAR, M. M.; HAMADA, F. M.; REICHERT, U.; SHROOT, B.; NAU, H. Selective agonists of retinoic acid receptors: comparative toxicokinetics and embryonic exposure. **Arch Toxicol**, v. 73, n. 10-11, p. 547–556, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10663386>.

BASHOR, M. M.; TOFT, D. O.; CHYTIL, F. In vitro binding of retinol to rat-tissue components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 12, p. 3483–7, 1973. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=427264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BOSCH, A.; BERTRAN, S. P.; LU, Y.; GARCIA, A.; JONES, A. M.; DAWSON, M. I.; FARIAS, E. F. Reversal by RARalpha agonist Am580 of c-Myc-induced imbalance in RARalpha/RARgamma expression during MMTV-Myc tumorigenesis. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 4, p. R121, 2012.

BRIGGER, D.; SCHLÄFLI, A. M.; GARATTINI, E.; TSCHAN, M. P. Activation of RAR α induces autophagy in SKBR3 breast cancer cells and depletion of key autophagy genes enhances ATRA toxicity. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 8, p. e1861, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cddis.2015.236>>.

CASINI, T.; PELICCI, P. G. A function of p21 during promyelocytic leukemia cell differentiation independent of CDK inhibition and cell cycle arrest. **Oncogene**, v. 18, n. 21, p. 3235–3243, 25 maio 1999. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1202630>>.

CASMIR, F. The journal of State Medicine. Volume XX: 341-368, 1912. The etiology of the deficiency diseases, Beri-beri, polyneuritis in birds, epidemic dropsy, scurvy, experimental scurvy in animals, infantile scurvy, ship beri-beri, pellagra. **Nutrition reviews**, v. 33, n. 6, p. 176–7, jun. 1975. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1095967>>.

CHEMISTRY, M.; MCCOLLUM, B. Y. E. V. Necessity of Lipins for Growth. 1913.

CICATIELLO, L.; MUTARELLI, M.; GROBER, O. M. V; PARIS, O.; FERRARO, L.;

RAVO, M.; TARALLO, R.; LUO, S.; SCHROTH, G. P.; SEIFERT, M.; ZINSER, C.;

CHIUSANO, M. L.; TRAINI, A.; DE BORTOLI, M.; WEISZ, A. Estrogen receptor

alpha controls a gene network in luminal-like breast cancer cells comprising multiple transcription factors and microRNAs. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 5, p. 2113–2130, 2010.

COHLAN, S. Q. Excessive Intake of Vitamin A as a Cause of Congenital Anomalies in the Rat. **Science**, v. 117, n. 3046, p. 535–536, 15 maio 1953. Disponível em:

<<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.117.3046.535>>.

COLEMAN, R. E. Advanced Breast Cancer: Diagnosis and Treatment. National Institute for Health and Clinical Excellence Guideline 2009 — An Opportunity Missed.

Clinical Oncology, v. 21, n. 5, p. 365–367, jun. 2009. Disponível em:

<<http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/11778/43414/43414.pdf>>.

CONNOLLY, R. M.; NGUYEN, N. K.; SUKUMAR, S. Molecular Pathways: Current Role and Future Directions of the Retinoic Acid Pathway in Cancer Prevention and Treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 7, p. 1651–1659, 1 abr. 2013.

Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-12-3175>>.

DAS, B. C.; THAPA, P.; KARKI, R.; DAS, S.; MAHAPATRA, S.; LIU, T.-C.;

TORREGROZA, I.; WALLACE, D. P.; KAMBHAMPATI, S.; VAN VELDHUIZEN, P.;

VERMA, A.; RAY, S. K.; EVANS, T. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 2, p. 673–83, 2014.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393720>>.

- DE LERA, A. R.; BOURGUET, W.; ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 10, p. 811–820, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd2398>\nfile:///Users/Eiji/Dropbox/@GTD/Library/papers3/266d882f-716e-4ec4-b2e8-a1a924402e63.pdf\npapers3://publication/doi/10.1038/nrd2398>.
- DE THÉ, H.; CHOMIENNE, C.; LANOTTE, M.; DEGOS, L.; DEJEAN, A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. **Nature**, v. 347, n. 6293, p. 558–561, 11 out. 1990. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/347558a0>>.
- DI MASI, A.; LEBOFFE, L.; DE MARINIS, E.; PAGANO, F.; CICCONE, L.; ROCHETTE-EGLY, C.; LO-COCO, F.; ASCENZI, P.; NERVI, C. Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 41, p. 1–115, fev. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299714000788>>.
- DOWLING, J. E.; WALD, G. The biological function of vitamin A acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 46, n. 5, p. 587–608, 1960.
- DUVIC, M.; HYMES, K.; HEALD, P.; BRENEMAN, D.; MARTIN, A. G.; MYSKOWSKI, P.; CROWLEY, C.; YOCUM, R. C.; BEXAROTENE WORLDWIDE STUDY GROUP. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma: multinational phase II-III trial results. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 19, n. 9, p. 2456–71, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331325>>.
- FENAU, P.; WANG, Z. Z.; DEGOS, L. Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia by Retinoids. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 313, p. 101–128, 2007.
- FENRICK, R.; HIEBERT, S. W. Role of histone deacetylases in acute leukemia. **Journal of cellular biochemistry. Supplement**, v. 30-31, p. 194–202, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9893271>>.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and

mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.

International Journal of Cancer, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 1 mar. 2015.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29210>>.

FREEMANTLE, S. J.; SPINELLA, M. J.; DMITROVSKY, E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7305–7315, 2003. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.onc.1206936>>.

GARATTINI, E.; BOLIS, M.; GARATTINI, S. K.; FRATELLI, M.; CENTRITTO, F.; PARONI, G.; GIANNI', M.; ZANETTI, A.; PAGANI, A.; FISHER, J. N.; ZAMBELLI, A.; TERAIO, M. Retinoids and breast cancer: From basic studies to the clinic and back again. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 6, p. 739–749, jul. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737214000024>>.

GARATTINI, E.; GIANNI, M.; TERAIO, M. Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 13, p. 1375–400, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506722>>.

GARATTINI, E.; GIANNI', M.; TERAIO, M. Cytodifferentiation by retinoids, a novel therapeutic option in oncology: rational combinations with other therapeutic agents.

Vitamins and hormones, v. 75, p. 301–54, jan. 2007. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672906750129>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

GIGUERE, V.; ONG, E. S.; SEGUI, P.; EVANS, R. M. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 624–629, 23 dez. 1987.

Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/330624a0>>.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THURLIMANN, B.; SENN, H.-J. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 1 ago. 2011. Disponível em:

<<http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/annonc/mdr304>>.

GRIGNANI, F.; DE MATTEIS, S.; NERVI, C.; TOMASSONI, L.; GELMETTI, V.; CIOCE, M.; FANELLI, M.; RUTHARDT, M.; FERRARA, F. F.; ZAMIR, I.; SEISER, C.; LAZAR, M. a; MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Fusion proteins of the retinoic acid

receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 815–8, 19 fev. 1998. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486655>>.

HOPKINS, F. G. Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietaries. **The Journal of physiology**, v. 44, n. 5-6, p. 425–460, 1912.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1512834&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

IARC., I. A. for R. on C. W. H. O. **Cancer: Fact Sheet 297**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

INCA. O que é o câncer? **Instituto Nacional do Câncer**, 2016a. Disponível em:

<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 20 jan. 2016.

INCA. Tipos de câncer: mama. **Instituto Nacional do Câncer**, 2016b. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>.

Acesso em: 6 jan. 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2008.

KAGECHIKA, H. **Medicinal Chemistry of Retinoid**. Disponível em:

<<http://sbsn.tmd.ac.jp/eng/faculty/eng-003.html>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

LU, M.; MIRA-Y-LOPEZ, R.; NAKAJO, S.; NAKAYA, K.; JING, Y. Expression of estrogen receptor alpha, retinoic acid receptor alpha and cellular retinoic acid binding protein II genes is coordinately regulated in human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 24, n. 27, p. 4362–4369, 2005.

LUNIN, N. Ueber die Bedeutung der anorganischen Salze für die Ernährung des Thieres. **Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 5, n. 1, p. 31–39, 1881.

MASETTI, R.; VENDEMINI, F.; ZAMA, D.; BIAGI, C.; GASPERINI, P.; PESSION, A. All- trans retinoic acid in the treatment of pediatric acute promyelocytic leukemia.

Expert Review of Anticancer Therapy, v. 12, n. 9, p. 1191–1204, set. 2012.

Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/era.12.101>>.

MEHROTRA, J. Very High Frequency of Hypermethylated Genes in Breast Cancer Metastasis to the Bone, Brain, and Lung. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 9, p.

3104–3109, 1 maio 2004. Disponível em:

<<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-03-0118>>.

MOON, R.; MEHTA, R. Chemoprevention of Mammary Cancer by Retinoids. In: KURODA, Y.; SHANKEL, D.; WATERS, M. (Ed.). **Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II SE - 18**. Basic Life Sciences. [s.l.] Springer US, 1990. 52p. 213–224.

NCI. “Drivers” of Cancer. **National Cancer Institute**, 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer/drivers-of-cancer>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

OSBORNE, T.; MENDEL, L. Relation on Growth to Diet. **J. Biol. Chem.**, v. 16, p. 423, 1913.

ROSS, A. C.; HARRISON, E. H. Vitamin A: Nutritional Aspects of Retinoids and Carotenoids. In: ZEMPLIENI, J. ET AL. (Ed.). **Handbook of Vitamins**. 5. ed. [s.l.] Crc Press, 2013. p. 1–40.

ROSS-INNES, C.; STARK, R. Cooperative interaction between retinoic acid receptor- α and estrogen receptor in breast cancer. **Genes & ...**, v. 3, n. 2009, p. 171–182, 2010. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/content/24/2/171.short>>.

SIMEONE, A.-M.; TARI, A. M. How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 12, jun. 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-004-4002-6>>.

SOTIRIOU, C.; WIRAPATI, P.; LOI, S.; HARRIS, A.; FOX, S.; SMEDS, J.; NORDGREN, H.; FARMER, P.; PRAZ, V.; HAIBE-KAINS, B.; DESMEDT, C.; LARSIMONT, D.; CARDOSO, F.; PETERSE, H.; NUYTEN, D.; BUYSE, M.; VAN DE VIJVER, M. J.; BERGH, J.; PICCART, M.; DELORENZI, M. Gene Expression Profiling in Breast Cancer: Understanding the Molecular Basis of Histologic Grade To Improve Prognosis. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 4, p. 262–272, 15 fev. 2006. Disponível em:

<<http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/djj052>>.

SPORN, M. B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. **Cancer research**, v. 36, n. 7 PT 2, p. 2699–702, jul. 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1277177>>.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B.; ROCHE, N. S.; KAGECHIKA, H.; SHUDO, K. Mechanism of action of retinoids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, n. 4 Pt 2, p. 756–64, out. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3021829>>.

- TALLMAN, M. S.; ANDERSEN, J. W.; SCHIFFER, C. A.; APPELBAUM, F. R.; FEUSNER, J. H.; OGDEN, A.; SHEPHERD, L.; WILLMAN, C.; BLOOMFIELD, C. D.; ROWE, J. M.; WIERNIK, P. H. All- trans -Retinoic Acid in Acute Promyelocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 15, p. 1021–1028, 9 out. 1997. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199710093371501>>.
- TANG, X.-H.; GUDAS, L. J. Retinoids, Retinoic Acid Receptors, and Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 345–364, 28 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol-011110-130303>>.
- TELLI, M. L.; CARLSON, R. W. First-Line Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 9, p. S66–S72, jun. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526820911706887>>.
- TOMA, S.; ISNARDI, L.; RAFFO, P.; RICCARDI, L.; DASTOLI, G.; APFEL, C.; LEMOTTE, P.; BOLLAG, W. RAR α antagonist RO 41-5253 inhibits proliferation and induces apoptosis in breast-cancer cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 78, n. 1, p. 86–94, 1998.
- WALD, G. The Molecular Basis of Visual Excitation. **Nature**, v. 219, n. 5156, p. 800–807, 24 ago. 1968. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/219800a0>>.
- WIDSCHWENDTER, M.; BERGER, J.; DAXENBICHLER, G.; MÄHER-HOLZNER, E.; WIDSCHWENDTER, A.; MAYR, A. Loss of Retinoic Acid Receptor β Expression in Breast Cancer and Morphologically Normal Adjacent Tissue but not in the Normal Breast Tissue Distant from the Cancer Advances in Brief Loss of Retinoic Acid Receptor β Expression in Breast Cancer and Morphol. **Cancer Research**, p. 4158–4161, 1997.
- XU, X. C.; RO, J. Y.; LEE, J. S.; SHIN, D. M.; HONG, W. K.; LOTAN, R. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. **Cancer research**, v. 54, n. 13, p. 3580–7, 1 jul. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8012985>>.
- YOSHIDA, H.; KITAMURA, K.; TANAKA, K.; OMURA, S.; MIYAZAKI, T.; HACHIYA, T.; OHNO, R.; NAOE, T. Accelerated Degradation of PML-Retinoic Acid Receptor α (PML-RARA) Oncoprotein by All-trans-Retinoic Acid in Acute Promyelocytic

Leukemia : Possible Role of the Proteasome Pathway Advances in Brief Accelerated Degradation of PML-Retinoic Acid Receptor a. **Cancer research**, v. 56, p. 2945–48, 1996.

ZHANG, X.; LIU, Y.; LEE, M.-O. Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 350, n. 1, p. 267–277, fev. 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0027510795001026>>.

ZUSI, F. C.; LORENZI, M. V.; VIVAT-HANNAH, V. Selective retinoids and rexinoids in cancer therapy and chemoprevention. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 23, p. 1165–1174, 2002.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar os mecanismos celulares envolvidos na resposta ao tratamento com duas novas moléculas retinoides em linhagem tumoral de mama MCF-7.

Objetivos específicos

Avaliar o potencial citotóxico dos retinoides pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio);

Investigar se os retinoides são capazes de potencializar a citotoxicidade do agente antitumoral indutor de danos no DNA doxorubicina pelo ensaio colorimétrico MTT;

Avaliar se os danos no DNA induzidos pela doxorubicina são potencializados pelos retinoides e se os mesmos interferem no reparo de DNA empregando o ensaio Cometa na versão alcalina ($\text{pH} > 13$), com cinética de reparo;

Avaliar se os retinoides aumentam a morte celular por apoptose e/ou necrose induzida pela doxorubicina;

Investigar a influência do tratamento com os retinoides sobre o ciclo celular pelo ensaio de ciclo celular por citometria de fluxo.

Capítulo II – Manuscrito

Novos derivados retinoides induzem morte celular por apoptose e parada de ciclo celular na linhagem tumoral de câncer de mama MCF-7

Natan de David^{1,2}; Adriano Cesar de Moraes Baroni²; Maria de Fatima Cepa Matos^{2,3}; Maria Tereza Ferreira Duenhas Monreal²; Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva^{1,3}; Eliane Borges de Almeida⁴; Fabrício Garmus Sousa²; Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2,3}; Renata Matuo^{2*}.

1. Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

2. Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

3. Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandetta” (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

4. Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Autores para correspondência:

Dra. Renata Matuo

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Cidade Universitária, S/N. Campo Grande/MS – Brasil. CEP: 79070-900.

E-mail: matuorenata@gmail.com.br

Resumo

Os retinoides são promissores agentes anticâncer que atuam principalmente pela ligação aos receptores nucleares, RAR(α,β,γ) e RXR(α,β,γ), que são reguladores de transcrição. A ativação seletiva do receptor RAR α é uma abordagem promissora para o tratamento de tumores de mama. Este trabalho avaliou o potencial citotóxico de duas novas moléculas retinoides derivadas de modificações moleculares no composto AM580 e sua associação à doxorrubicina na linhagem tumoral de mama MCF-7. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada pelo ensaio de MTT após tratamento por 72h. A capacidade dos compostos em induzir danos no DNA, morte celular e paradas de ciclo celular, foi avaliada pelos ensaios do cometa, ensaio morfológico de morte celular e ciclo celular por citometria de fluxo em tratamentos por períodos curtos (4h) seguidos ou não de recuperação em meio livre de droga (4h+16h). Nossos resultados demonstraram que ambos os retinoides diminuem a viabilidade celular e em tratamentos curtos causam morte celular por apoptose por um mecanismo que não está relacionado com danos no DNA. Quando combinados a doxorrubicina potencializam os danos no DNA induzidos pelo quimioterápico. Além disso, ambos retinoides demonstram pronunciado efeito sobre o ciclo celular, induzindo paradas de ciclo em G1. As modificações moleculares do composto AM580 avaliadas neste trabalho, produziram derivados retinoides com potencial terapêutico tanto como agentes únicos ou combinados com doxorrubicina. Estas observações sugerem a possibilidade do desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos com a inserção de retinoides seletivos RAR α como terapia alvo para o subgrupo de tumores de mama que expressam o receptor RAR α .

Palavras-chave: Receptores retinoides, AM580, RARA, modificações moleculares.

1. Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum de câncer no mundo e o mais comum entre as mulheres. É responsável por aproximadamente 25% do total de novos casos anuais de câncer no mundo (IARC, 2012). Trata-se de uma doença complexa, com diversos subtipos e características biológicas, que influenciam diretamente na escolha da terapia, nos resultados clínicos e no prognóstico (BRENTON, 2005).

Os retinoides são extensivamente estudados na terapia anticâncer. De maneira geral, a atividade biológica dos retinoides é derivada da interação com dois tipos de receptores nucleares: os receptores para ácido retinoico (RAR) e os receptores x retinoide (RXR), cada um com três subtipos diferentes (α , β e γ). Estes receptores formam homo- ou heterodímeros quando ativados, que funcionam como elementos ligante-dependentes para a transcrição de genes alvos (DI MASI et al., 2014). Os melhores resultados de retinoides na terapia anticâncer, consistem na aplicação do ácido trans-retinóico (ATRA) como agente cito-diferenciador no tratamento de leucemia promielocítica aguda, no qual sua combinação com antraciclinas é responsável pela remissão total da doença entre 90-95% dos casos (MASETTI et al., 2012).

Nos últimos anos, o interesse na utilização de retinoides para tratamento de tumores de mama tem ganhado força (GARATTINI et al., 2014). Estudos têm demonstrado uma estrita relação entre a expressão de receptores para estrogênio e a expressão do subtipo de receptor retinoide $RAR\alpha$ na linhagem tumoral de mama MCF-7 (LU et al., 2005; ROSS-INNES; STARK, 2010; TERAQ et al., 2011). Nesta linhagem, ligantes específicos $RAR\alpha$ demonstram melhores resultados sobre o controle da proliferação celular, do que ligantes inespecíficos RAR, como ATRA (CHRISTINE PRATT; NIU; WHITE, 2003; GARATTINI; GIANNI; TERAQ, 2007; BRIGGER et al., 2015). Estudos recentes chegaram à conclusão de que a ativação do receptor $RAR\alpha$ é determinante para o controle da proliferação celular, enquanto a interação com o subtipo de receptor retinoide $RAR\gamma$, está relacionada tanto com a indução da proliferação celular quanto com efeitos colaterais dos retinoides, tornando o receptor $RAR\alpha$ um novo alvo terapêutico para tumores de mama que apresentem maiores taxas de expressão entre o receptor $RAR\alpha/RAR\gamma$ (BOSCH et al., 2012; ALSAFADI et al., 2013; BRIGGER et al., 2015).

Dentre os subtipos de tumores de mama, aproximadamente 75% do total são positivos para expressão de receptores de estrogênio (YERSAL, 2014). Além disso, de 23-32% dos tumores positivos Her2/neu apresentam co-amplificação do gene RARA e conseqüentemente elevado nível do receptor RAR α (PARONI et al., 2012), constituindo potenciais alvos para a terapia com retinoides seletivos RAR α .

Embora os retinoides sejam promissores agentes para o tratamento de câncer de mama, sua utilização está associada com uma série de efeitos adversos, tais como toxicidade de pele e mucosas, hiperlipidemia, distúrbios visuais e teratogenicidade (ARAFÁ et al., 2000). Contudo, além dos excelentes resultados sobre o controle da proliferação celular, a utilização de ligantes específicos para o receptor RAR α está relacionada com a diminuição de toxicidade sistêmica (DE LERA et al., 2007; BOSCH et al., 2012). Outra importante estratégia para diminuição de toxicidade é a modificação molecular de compostos líderes com a finalidade de produzir derivados com melhor perfil de toxicidade e melhoria da atividade biológica (BENBROOK et al., 1997). Diante do exposto, este trabalho avaliou a resposta de células de adenocarcinoma mamário (MCF-7) ao tratamento com duas novas moléculas retinoides, obtidas a partir de modificações moleculares no ligante seletivo RAR α AM580, e o efeito da combinação das moléculas com doxorubicina.

2. Materiais e Métodos

2.1. Derivados retinoides

Os compostos utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Laboratório de Química Farmacêutica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. A rota de síntese foi descrita por Garcia (2012). Foram testadas duas moléculas inéditas, identificadas como RT1 e RT2 (Figura 1).

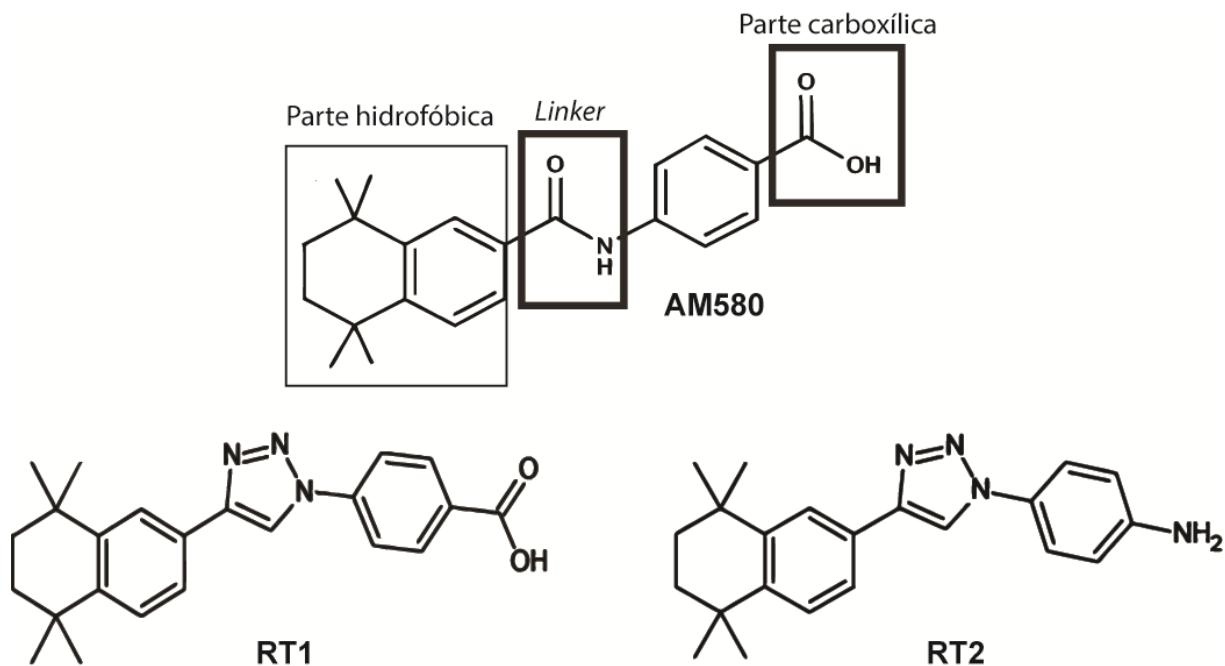


Figura 1. Estrutura química dos derivados retinoides empregados neste estudo e de seu precursor AM580. Os retângulos em negrito demonstram os locais de modificações moleculares que originaram os compostos RT1 e RT2. Adaptado Garcia (2012).

2.2. Linhagem celular e condições de cultivo

A linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM - Gibco®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®) (v/v), 0,1% de penicilina (100U/ml)/estreptomicina (100µg/ml) (v/v) (LGC biotecnologia®), em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

2.3. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo teste colorimétrico MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina - Invitrogen®), baseado no protocolo de Poindessous et al. (2003). Foram semeadas 3×10^3 células por poço em placas de 96 poços e mantidas por 24h em incubadora. Os tratamentos foram realizados por 72h com diferentes doses dos compostos isolados, RT1 (10, 25, 100 e 150µM) e RT2 (5, 10, 25, 50µM) e associados simultaneamente a IC₅₀ da doxorrubicina (0,3µM), previamente determinada por ensaio piloto para tratamento por 72h. Ao final dos tratamentos, as placas foram incubadas com MTT 0,3mg/mL por 4h. O meio de cultivo foi removido e adicionado DMSO para leitura da absorbância em 540nm. Para cada experimento foram realizadas três repetições

independentes com quintuplicatas. A partir das curvas de viabilidade celular dos retinoides em combinação com doxorrubicina, foram calculados os índices de combinação, segundo o método descrito por Chou e Talalay (1983) e Chou (2010) utilizando o *software* CompuSyn (<http://www.combosyn.com/>).

2.4. Ensaio do cometa

Para a avaliação da genotoxicidade foi empregado o ensaio Cometa na versão alcalina, segundo Singh et al. (1988), com modificações. Foram semeadas $1,0 \times 10^5$ células em placas de 12 poços e mantidas em incubadora por 24h. Os tratamentos foram realizados por I) 4h ou II) 4h seguido por 16h em meio livre de droga (4h + 16h), utilizando as concentrações de 25, 50 e 100 μ M, para RT1 e 10, 20 e 40 μ M para RT2 baseadas no resultado do ensaio de viabilidade celular, e a combinação com IC50 da doxorrubicina (0,6 μ M) previamente determinada por ensaios pilotos para o tratamento por 4h utilizando o *software* CompuSyn. As células foram coletadas por tripsinização, centrifugadas a 1.200rpm por 5min e o sobrenadante descartado. As lâminas foram preparadas com 20 μ L de suspensão celular e 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C, depositadas em lâmina pré-gelatinizada com agarose normal. Posteriormente, foram imersas em solução de lise gelada (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH = 10) por 1h. As lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese com tampão alcalino gelado (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH > 13) por 20min para a desnaturação do DNA, seguido pela eletroforese a 25V e 300mA por 20min. As lâminas foram neutralizadas com tampão Tris-HCl (pH 7,5) e fixadas em etanol absoluto. Para a análise, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (100 μ g/ml) e fotografadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. A análise foi realizada com auxílio do *software* ImageJ/OpenComet (<http://www.cometbio.org/>), utilizando o parâmetro *Tail Moment* (GYORI et al., 2014). Para cada experimento foram realizadas duas repetições independentes.

2.5. Avaliação de morte celular

A morte celular foi avaliada por ensaio morfológico, segundo o protocolo de Kasibhatla (2006), com modificações, diferenciando-as em apoptóticas ou necróticas. Foram semeadas 5×10^5 células em placas de 12 poços e mantidas em incubadora por 24h. Dois tempos diferentes foram avaliados: II) após 4h de

tratamento (4h); e II) 4h de tratamento seguidos por 16h em meio livre de droga (4h + 16h), utilizando as concentrações de 50 e 20 μ M para RT1 e RT2, respectivamente, e a combinação com doxorrubicina (0,6 μ M), baseadas no resultado do ensaio do cometa. As células foram coletadas por tripsinização, centrifugadas a 1.200rpm por 5min e o sobrenadante descartado. As lâminas foram preparadas com 20 μ L de suspensão celular e 2 μ L de corante contendo brometo de etídio (100 μ g/ml) e acridina laranja (100 μ g/ml), na proporção de 1:1. Foram realizadas duas repetições independentes com duas replicas, sendo analisadas 100 células por replica em microscópio de fluorescência em aumento de 400x.

2.6. Ciclo celular

O efeito dos retinoides sobre o ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo. Para tanto, 2 x 10⁶ células foram semeadas em placas de Petri e mantidas em incubadora por 24h. Os tratamentos foram realizados por I) 4h e II) 4h seguido por 16h em meio livre de droga (4h + 16h), utilizando as concentrações de 50 e 20 μ M para RT1 e RT2, respectivamente, e a combinação com doxorrubicina (0,6 μ M), baseadas no resultado do ensaio do cometa. As células foram coletadas por tripsinização, centrifugadas a 1.200rpm por 5min e o sobrenadante descartado. Posteriormente, 1,0 x 10⁶ células foram fixadas em etanol 70% gelado e armazenadas a -20°C até a análise.

A marcação foi realizada com 7-amino actinomicina D (7-AAD – 2 μ g/mL) por 20min. A aquisição foi realizada por citômetro BD FACSCalibur™ e analisada pelo *software* CellQuest. Foram realizadas duas repetições independentes, sendo analisados 10.000 eventos por repetição.

2.7. Análises estatísticas

Para comparar os resultados quantitativos dos diferentes tratamentos, testes paramétricos e não-paramétricos (ANOVA/Tukey, Kruskal-Wallis/Dunn e teste de Mann Whitney) foram empregados de acordo com a natureza da distribuição dos dados. Os tratamentos foram comparados em relação aos respectivos controles (barras com a mesma cor). As análises foram realizadas com o *software* Graph-Pad Prism (versão 5; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA), sendo diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ em todos os casos.

3. Resultados

3.1. Os retinóides diminuem a viabilidade celular.

Os resultados do ensaio do MTT demonstraram que ambos os retinoides reduzem a viabilidade celular após 72h de tratamento. Para as concentrações de 10, 50, 100 e 150 μ M de RT1 a viabilidade celular foi reduzida a $63,8\pm 5,0$; $55,2\pm 2,5$; $19,4\pm 2,3$; $7,6\pm 0,8$, respectivamente. Já a combinação com doxorubicina nas mesmas concentrações reduziu a viabilidade celular a $39,4\pm 7,6$; $30,3\pm 5,0$; $12,6\pm 1,3$; $7,3\pm 0,6$, respectivamente (Figura 2A). Os valores de índice de combinação para RT1 com doxorubicina foram de 0,94 (aditivo), 1,41 (fraco antagonismo), 0,91 (aditivo), 0,67 (sinérgico) para as doses de 10, 50, 100 e 150 μ M, respectivamente (Figura 2B). Para RT2 nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 μ M a viabilidade celular foi reduzida a $75,9\pm 1,1$; $54,3\pm 0,8$; $34,8\pm 1,4$; $2,5\pm 0,6$, respectivamente. A combinação com doxorubicina nas mesmas concentrações reduziu a viabilidade celular a $37,7\pm 3,8$; $33,5\pm 4,0$; $21,4\pm 1,2$; $3,5\pm 0,0$, respectivamente (Figura 2C). Os valores de índice de combinação foram de 1,02 (aditivo), 1,26 (fraco antagonismo), 1,59 (fraco antagonismo), 0,92 (aditivo) para as doses de 5, 10, 25 e 50 μ M, respectivamente (Figura 2D). Com base nesses valores, a IC₅₀ calculada pelo *software* CompuSyn para RT1 e RT2 foi de aproximadamente 25 μ M e 10 μ M, respectivamente.

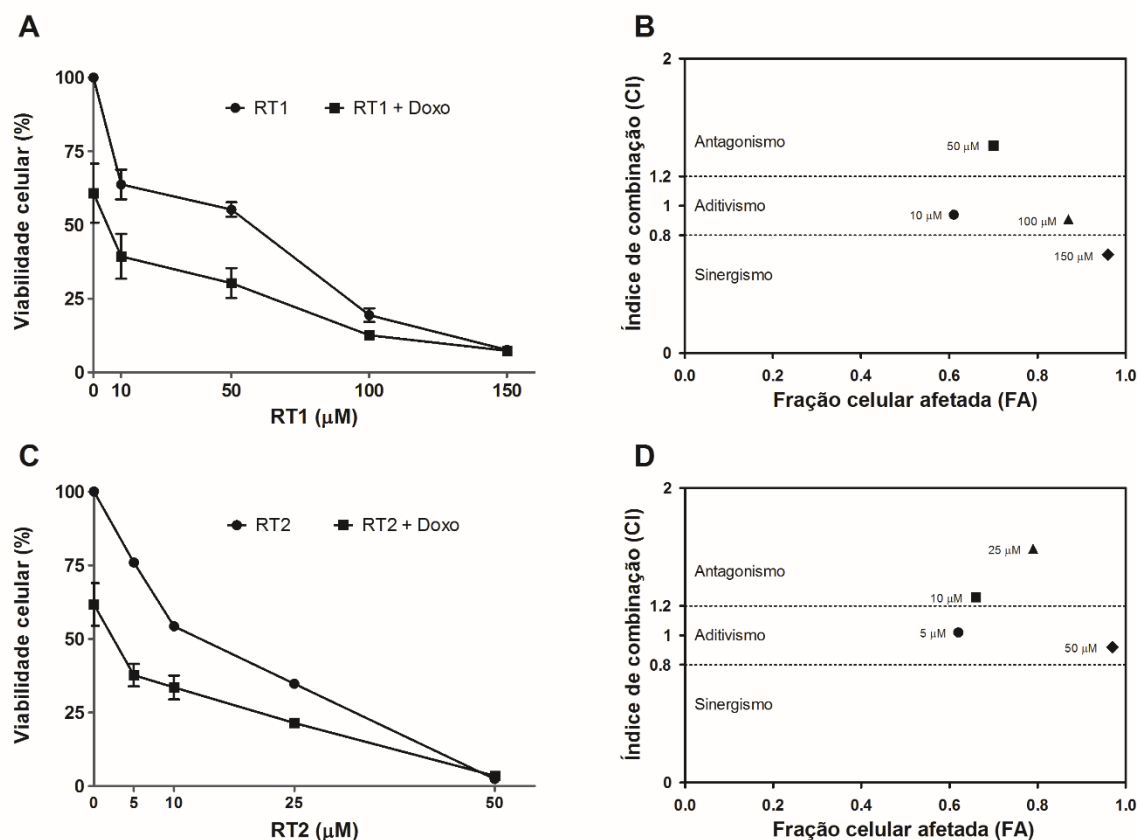


Figura 2. Avaliação dos efeitos de RT1 e RT2 sobre a viabilidade celular na linhagem tumoral de mama MCF-7. Diferentes concentrações de RT1 e RT2 foram avaliadas isoladas e em combinação com doxorubicina (Doxo) (0,3μM). Os tratamentos foram realizados por 72h. Os gráficos (A) e (C) representam as médias e o desvio padrão da média de três repetições independentes com cinco réplicas para o ensaio de viabilidade celular. Os gráficos (B) e (D) representam os valores de índice de combinação (CI) calculados segundo o método de Chou e Talalay para as combinações de RT1 e RT2 com a doxorubicina e a respectiva fração celular afetada (FA) pelo tratamento.

3.2. Os retinoides não induzem danos no DNA e potencializam o efeito genotóxico da doxorubicina.

Nos tratamentos realizados por 4h, RT1 não induziu danos no DNA em todas as concentrações avaliadas (Figura 3A – barras cinza). Quando combinado com doxorubicina, as concentrações de 25 e 50uM de RT1 não apresentam aumento significativo de danos, comparadas a doxorubicina. Já para a maior concentração (100uM), o aumento é estatisticamente significativo (Figura 3A – barras cinza). Nos tratamentos por 4h seguidos de 16 horas em meio livre de droga, RT1 em todas as concentrações avaliadas não induziu danos ao DNA comparado com o grupo controle (Figura 3A – barras pretas). Nas três concentrações avaliadas há diminuição significativa dos danos em relação ao tratamento por 4h (Figuras 3A – chaves). Todas as combinações de doxorubicina com RT1 apresentam aumento de

danos quando comparados a doxorubicina, porém não há diferença estatística ($p > 0,05$). A concentração de 50uM possui a maior média (Figura 3A – barras pretas). Para as concentrações de 25uM e 50uM combinadas com doxorubicina há aumento significativo de danos no DNA em comparação ao tratamento por 4h. Já a concentração de 100uM apresenta redução significativa de danos em comparação ao tratamento por 4h (Figura 3A – chaves). RT2 também não induziu danos no DNA em todas as concentrações avaliadas após tratamento por 4h (Figura 3B – barras cinza). A combinação de doxorubicina com RT2, na menor concentração (10uM) não apresenta diferença significativa em comparação com a doxorubicina. Já a combinação nas concentrações de 20 e 40uM de RT2, apresentam aumento significativo de danos no DNA (Figura 3B – barras cinza). Nos tratamentos por 4h seguidos de 16 horas em meio livre de droga, RT2 em todas as concentrações avaliadas não induziu danos no DNA comparado com o grupo controle (Figura 3B – barras pretas). Nas três concentrações avaliadas há diminuição significativa dos danos em relação ao tratamento por 4h (Figuras 3B – chaves). As combinações de doxorubicina com RT2 apresentam aumento de danos em comparação à doxorubicina, porém não há diferença estatística ($p > 0,05$). A concentração de 20uM de RT2 combinada possui a maior média de danos (Figura 3B – barras pretas). Em relação ao tratamento por 4h, a menor concentração combinada (10uM) apresenta aumento significativo de danos, a concentração de 20uM não apresenta diferença significativa e a combinação na concentração de 40uM apresenta redução significativa de danos (Figuras 3B – chaves).

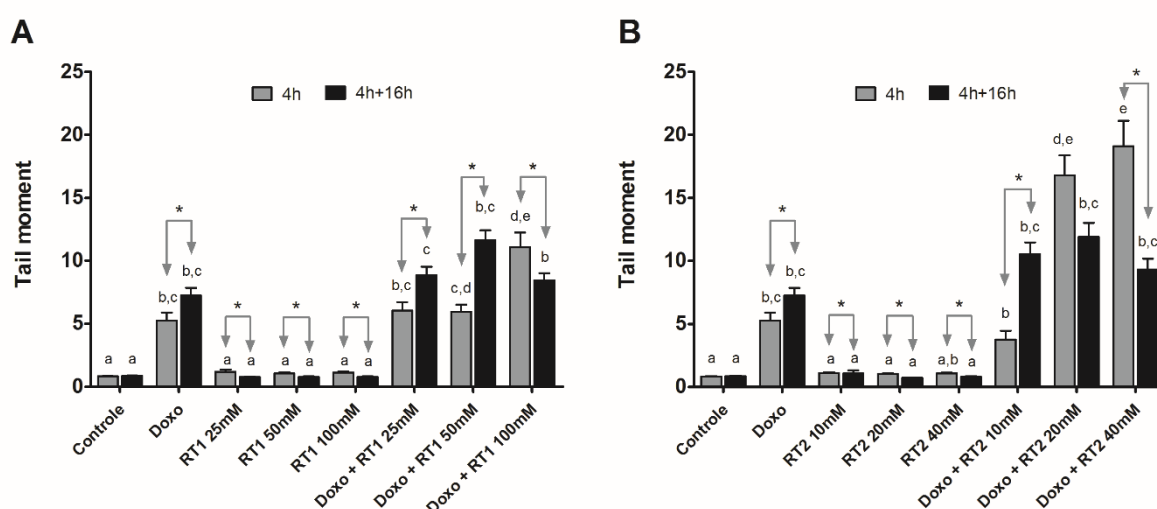


Figura 3. Danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa na versão alcalina após o tratamento por 4h (barras cinza) e 4h seguidos por 16h (barras pretas) em meio livre de drogas com RT1 (A) e RT2 (B)

em diferentes concentrações, associados ou não com doxorrubicina (Doxo) (0,6 μ M), na linhagem tumoral de mama MCF-7. A análise foi realizada com auxílio do *software ImageJ/OpenComet*, utilizando o parâmetro *Tail Moment* para comparação das células com danos no DNA. Os gráficos representam as médias e o erro padrão da média de duas repetições independentes. As diferenças estatísticas entre os tratamentos do mesmo tempo experimental (barras de mesma cor) foram analisadas por Kruskal-Wallis/Dunn, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). A comparação dos tratamentos entre os diferentes tempos experimentais foi feita por teste de Mann Whitney, chaves com asterisco indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.2. Os retinoides causam morte celular por apoptose.

Nos tratamentos realizados por 4h, RT1 apresenta tendência ao aumento do número de células apoptóticas ($p > 0,05$), sendo a média 2,03x superior a do grupo controle. Já para RT2 observou-se um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, com aumento da média de 3,88x (Figura 4 – barras cinza). A combinação de doxorrubicina com RT1 apresenta tendência ao aumento ($p > 0,05$) do número de células apoptóticas, a média é 1,37x superior à média da doxorrubicina. Já para a combinação com RT2, o aumento é estatisticamente significativo, sendo a média 1,87x superior a da doxorrubicina (Figura 4 – barras cinza). Nos tratamentos realizados 4h seguidos por 16h em meio livre de droga, há aumento estatisticamente significativo no número de células apoptóticas nos tratamentos com RT1 e RT2, em relação ao grupo controle, com aumento da média de 2,93 e 3,81, respectivamente (Figura 4 – barras pretas). As combinações de doxorrubicina com RT1 e RT2 apresentaram médias 1,16x e 1,10x superiores a da doxorrubicina, respectivamente. Porém, não há diferenças estatisticamente significativas (Figura 4 – barras pretas). RT1 e Doxo+RT1 apresentam aumento significativo de células apoptóticas no tratamento por 4h seguido por 16h meio livre de droga em comparação ao tratamento por 4h (Figura 4 – chaves). Células necróticas não foram observadas em nenhum tratamento.

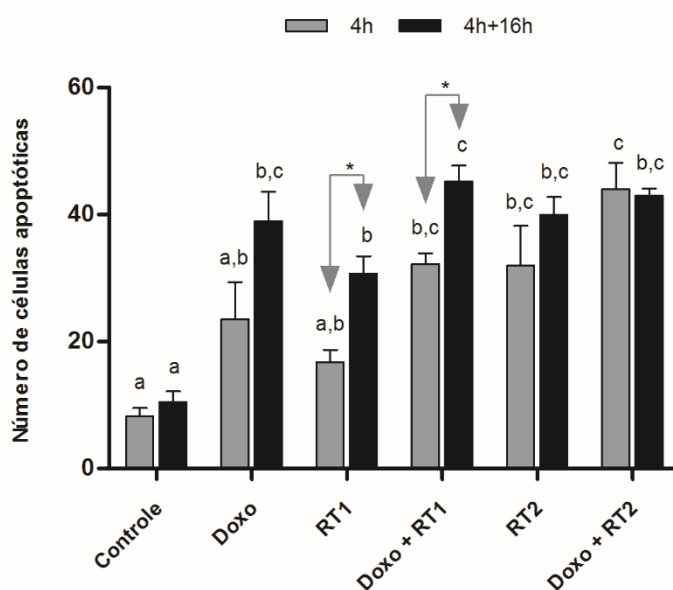


Figura 4. Frequência de células apoptóticas observadas após o tratamento por 4h (barras cinza) e 4h seguidos por 16h (barras pretas) em meio livre de droga com as concentrações de 50 μ M e 20 μ M dos compostos RT1 e RT2, respectivamente, associados ou não com doxorrubicina (Doxo) (0,6 μ M), na linhagem tumoral de mama MCF-7. Foram analisadas 100 células por réplica, classificadas pelo aspecto morfológico e coloração diferencial por brometo de etídio e acridina laranja. Os gráficos representam as médias e o erro padrão da média de duas repetições independentes com duas réplicas. As diferenças estatísticas entre os tratamentos do mesmo tempo experimental (barras de mesma cor) foram analisadas por ANOVA/Tukey, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). A comparação dos tratamentos nos diferentes tempos experimentais foi feita por teste de Mann Whitney, chaves com asterisco indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.3. Os retinoides induzem paradas de ciclo celular.

Os tratamentos por 4h já apresentam alterações na distribuição da população de células nas fases do ciclo celular, quando comparados ao grupo controle. A doxorrubicina induziu um aumento de 7,75 pontos percentuais no número de células na fase S e uma redução de 4,65 e 3,09 pontos percentuais do total de células em G1 e G2/M, respectivamente. Os tratamentos com RT1 e Doxo+RT1 resultam em aumento de 3,61 e 4,98 pontos percentuais no número de células em S, além de redução de 7,85 e 6,30 pontos percentuais do total de células em G2/M, respectivamente. O tratamento com RT2 e Doxo+RT2 produzem efeito similar, sendo que o aumento de células em S é de 2,96 e 3,69 e a redução em G2/M é de 4,59 e 4,78 pontos percentuais, respectivamente (Figura 5A). Já nos tratamentos por 4h seguidos por 16h em meio livre de droga, há acúmulo de células G1 em todos os tratamentos comparados ao grupo controle. Para doxorrubicina, o aumento de células em G1 foi de 20,11, derivado principalmente da redução do total de células em G2/M, que em pontos percentuais foi de 21,14. RT1 e RT2 induziram acúmulo

em G1, com aumento de 22,46 e 12,03 pontos percentuais, respectivamente. O aumento da população celular em G1 é derivado de reduções de 6,32 e 6,54 na fase S, e 16,14 e 5,49 pontos percentuais nas fases G2/M, para RT1 e RT2, respectivamente. Os tratamentos com Doxo+RT1 e Doxo+RT2 apresentam aumento de 8,31 e 13,57 pontos percentuais na população de células na fase G1. Para estes grupos foi observada uma grande redução da população celular na fase S, sendo de 13,18 e 13,57 pontos percentuais, para RT1+doxo e RT2+doxo respectivamente (Figura 5B).

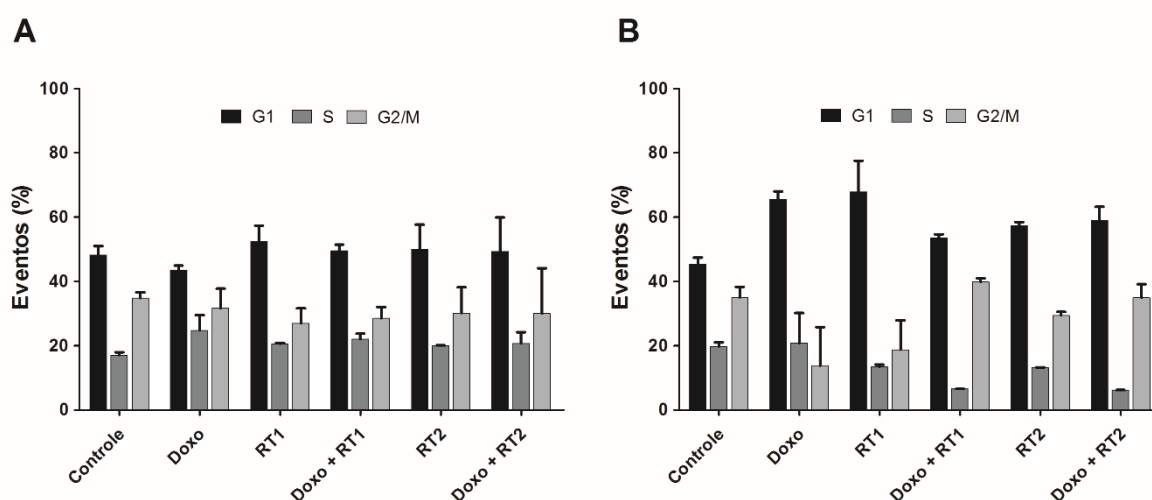


Figura 5. Efeito sobre o ciclo celular após tratamento por 4h (A) e 4h seguidos por 16h em meio livre de droga (B) com as doses de 50 μ M e 20 μ M dos compostos RT1 e RT2, respectivamente, associados ou não com doxorrubicina (Doxo) (0,6 μ M), na linhagem tumoral de mama MCF-7. Foram adquiridos 10.000 eventos por repetição. Os gráficos representam as médias e o erro padrão da média da porcentagem de eventos nas diferentes fases do ciclo celular de duas repetições independentes.

4. Discussão

Diversos estudos tem demonstrado o potencial anticâncer de retinoides em diversas linhagens tumorais, incluindo mama. Nos últimos anos, os esforços para caracterização molecular dos subtipos tumorais, bem como, o papel de cada subtipo dos receptores retinoides, proporcionaram a descoberta de novos alvos terapêuticos, como o receptor RAR α em tumores de mama estrogênio responsivos, considerado como o determinante primário da sensibilidade de tumores mama a retinoides (ROSS-INNES; STARK, 2010; BOSCH et al., 2012; ALSAFADI et al., 2013). A linhagem celular MCF7 foi a primeira linhagem tumoral de mama estrogênio responsiva isolada (LEVENSON; JORDAN, 1997). Outra característica importante

desta linhagem é a conservação da expressão de receptores retinoides, principalmente do receptor RAR α (HAN et al., 1997).

Os retinoides avaliados neste estudo derivam de modificações moleculares no composto líder AM580, um ligante seletivo RAR α (GIANNÍ et al., 1996). A troca bioisostérica do grupamento amida presente no *linker* do composto líder AM580 pelo anel triazólico em RT1 e RT2, proporciona diminuição da toxicidade e aumento da seletividade ao receptor RAR α , uma vez que essa modificação provoca restrição conformacional e diminui a susceptibilidade do composto a oxidação (BENBROOK et al., 1997; BENBROOK, 2002; GARCIA, 2012). A modificação na parte carboxílica da molécula tem por finalidade aumentar a potência do composto em células tumorais resistentes (SIMONI et al., 2000).

Nossos resultados demonstram que ambos retinoides são capazes de diminuir a viabilidade celular da linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7. A diminuição da viabilidade celular pode relacionar-se a dois processos: morte celular e/ou parada de ciclo celular. A indução de danos ao DNA é o principal mecanismo de ação de drogas citotóxicas clássicas utilizadas para o tratamento de câncer de mama, como a doxorrubicina. O ensaio do cometa é um dos métodos mais utilizados para avaliação de danos no DNA, a versão alcalina permite a detecção de quebras de fita de DNA e sítios alcalilábeis (SINGH et al., 1988). A avaliação de danos após períodos curtos de tratamentos possibilita mensurar a extensão total dos danos com a mínima interferência dos sistemas de reparo de DNA. Já os experimentos conduzidos com períodos de pós-incubação permitem investigar se ao remover o tratamento os danos são reduzidos por ocorrer o reparo de DNA, ou se são potencializados, uma vez que as lesões primárias podem se tornar lesões secundárias como resultado da tentativa do reparo.

Sabe-se que os efeitos biológicos dos retinoides estão relacionados à ligação a receptores nucleares e o controle da expressão de genes alvos (DI MASI et al., 2014). No estudo de CHRISTINE PRATT, NIU e WHITE (2003), o precursor dos compostos RT1 e RT2, AM580, foi capaz de alterar a expressão das proteínas survivin, Mdr1 e glicoproteína P, que participam de processos responsáveis pelo efluxo de diversas drogas da célula, incluindo doxorrubicina em câncer de mama (LIU et al., 2007; JIANG, 2010; LV et al., 2010). O bloqueio do mecanismo de efluxo da doxorrubicina por RT1 e RT2, pode ser responsável pelo incremento dos danos no DNA provocados pela combinação de RT1 e RT2 com a doxorrubicina após 4h

nas maiores concentrações, uma vez que RT1 e RT2 não causaram danos ao DNA celular. Curiosamente, as maiores concentrações de RT1 e RT2 combinadas que aumentaram os danos após 4h de tratamento, apresentaram redução significativa dos danos no tratamento 4h+16h, enquanto as menores concentrações apresentaram aumento significativo dos danos.

Danos ao DNA levam a célula a interromper o ciclo de divisão para que haja o reparo das lesões ou, quando em grande extensão, provocam morte celular. Ao correlacionarmos o resultado do ensaio do cometa com os do ensaio de apoptose, observa-se que a combinação de doxorrubicina com RT1 (50 μ M) apresenta aumento significativo do número de células apoptóticas no tratamento de 4h+16h em relação ao tratamento por 4h, o que se relaciona com o aumento de danos observado no ensaio do cometa. Já a combinação com RT2 (20 μ M), após 4h de tratamento, apresenta aumento significativo de células em apoptose, o que reforça a ideia de que o aumento da extensão dos danos observado no ensaio do cometa está relacionado com aumento de morte celular por apoptose, uma vez que RT2 (20 μ M) após 4h de tratamento, já apresentava aumento significativo de danos no DNA. Curiosamente, os retinoides mesmo não provocando danos ao DNA, são capazes de induzir morte celular por apoptose em ambos os tempos experimentais avaliados. Dados da literatura indicam que a ativação específica do receptor RAR α em MCF-7 pelo composto precursor AM580, está relacionada com a diminuição da expressão da proteína Bcl-2 (CHRISTINE PRATT; NIU; WHITE, 2003) considerada reguladora central de mecanismos de morte por apoptose e autofagia (CZABOTAR et al., 2013; MUKHOPADHYAY et al., 2014). Além disso, como já mencionado, os retinoides alteram a expressão da proteína survivin, que é uma proteína relacionada à inibição da apoptose e que possui expressão elevada em células tumorais, sendo responsável pela resistência a sinalização de morte em células cancerígenas (FULDA, 2009; KHAN et al., 2011). Sendo assim, a influência de RT1 e RT2 sobre a expressão de proteínas chaves que regulam processos de morte celular pode ser responsável pela diminuição da viabilidade celular encontrada neste estudo para RT1 e RT2 isolados, uma vez que os mesmos não são capazes de causar danos no DNA.

Outro importante processo regulado por RT1 e RT2 em nossos experimentos foi a progressão do ciclo celular. No tratamento com doxorrubicina, após 16h em meio livre de droga, houve um aumento de danos no DNA e morte celular, quando

comparado com tempo de 4h. A doxorubicina é um agente antitumoral que apresenta diferentes mecanismos de ação, tais como: formação de adutos com o DNA, bloqueio da atividade da topoisomerase II, interferência na síntese de DNA e RNA e geração de radicais livres (GEWIRTZ, 1999). Após 4h de tratamento, provavelmente pela interferência da droga sobre o mecanismo de replicação, interrompendo o processo de duplicação do DNA e levando a formação de danos no DNA, é possível identificar um acúmulo de células na fase S do ciclo celular. Em meio livre de droga as células tentam reparar os danos ocasionados pela doxorubicina. Entretanto, o aumento significativo de danos entre os tempos de 4h e 4h+16h detectados no ensaio do cometa, a diminuição da população celular nas fases S e G2/M ciclo celular e o aumento de células apoptóticas observado após as 16h em meio livre de droga, sugerem à formação de danos secundários que culminaram em morte celular. Já para RT1 e RT2, foi observado acúmulo de células em G1 nos tratamentos por 4h+16h, sendo que o efeito é derivado de reduções na população celular na fase S e G2/M do ciclo. Pratt, Niu e White (2003) reportaram que a ativação do receptor RAR α em MCF-7 pelo composto AM580, está relacionada com a diminuição de proteínas chaves para a progressão da fase G1 do ciclo celular, como ciclina D1 e Cdk2, corroborando com nossos resultados, uma vez que o acúmulo observado é apenas na fase G1 do ciclo celular. Já os tratamentos combinados apresentam menor aumento da população em G1 e diminuição apenas da população na fase S. Nestes tratamentos as células sofreram danos no DNA principalmente na fase S do ciclo celular, devido ao mecanismo de ação da doxorubicina, logo quando em meio livre de droga, ocorre a progressão do ciclo de divisão e um novo bloqueio no *checkpoint* da fase G2 para o reparo do DNA, que quando irreparável, culmina em morte celular.

A base da quimioterapia clínica atual é a combinação de múltiplas drogas com objetivo de obter melhor resposta, tolerabilidade e diminuição de desenvolvimento de resistência ao tratamento (PINTO; MOREIRA; SIMÕES, 2010). RT1 e RT2 em combinação com doxorubicina demonstram diferentes relações para cada dose, sendo predominante o efeito aditivo. Embora a combinação ideal de drogas seja aquela que apresenta efeito sinérgico sem aumento da toxicidade sistêmica, combinações com efeito aditivo com perfil de toxicidade favorável podem também ter benefício clínico (REYNOLDS; MAURER, 2005). Além disso, como discutido anteriormente, a influência dos compostos sobre mecanismos de efluxo de droga é

um ponto importante a ser considerado para o desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos.

Por fim, considera-se que as modificações moleculares do composto AM580, avaliadas neste trabalho, produziram derivados retinoides com potencial terapêutico para tumores de mama, tanto como agentes únicos, uma vez que são capazes de induzir morte celular e parada de ciclo celular por um mecanismo que não envolve danos no DNA, quanto em combinações, já que são capazes de potencializar os efeitos da doxorrubicina em períodos curtos de tratamento. Estas observações sugerem a possibilidade do desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos com a inserção de retinoides seletivos RAR α como terapia alvo para o subgrupo de tumores de mama com amplificação do gene RARA.

5. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e Programa de Educação Tutorial (PET Farmácia) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. David N e Matuo R receberam financiamento da CAPES e FGS da FUNDECT/CNPq.

A Roseana Leite e Ana Cristina Basso pelo auxílio na condução dos experimentos.

6. Referências Bibliográficas

ALSAFADI, S.; EVEN, C.; FALET, C.; GOUBAR, A.; COMMO, F.; SCOTT, V.; QUIDVILLE, V.; ALBIGES, L.; DIECI, M. V.; GUEGAN, J.; LAZAR, V.; AHOMADEGBE, J. C.; DELALOGÉ, S.; ANDRÉ, F. Retinoic acid receptor alpha amplifications and retinoic acid sensitivity in breast cancers. **Clinical Breast Cancer**, v. 13, n. 5, p. 401–408, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2013.02.001>>.

ARAFA, H. M.; ELMAZAR, M. M.; HAMADA, F. M.; REICHERT, U.; SHROOT, B.; NAU, H. Selective agonists of retinoic acid receptors: comparative toxicokinetics and embryonic exposure. **Arch Toxicol**, v. 73, n. 10-11, p. 547–556, 2000. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10663386>.

BENBROOK, D. M. Refining Retinoids with Heteroatoms. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, p. 277–283, 2002.

BENBROOK, D. M.; MADLER, M. M.; SPRUCE, L. W.; BIRCKBICHLER, P. J.; NELSON, E. C.; SUBRAMANIAN, S.; WEERASEKARE, G. M.; GALE, J. B.; PATTERSON, M. K.; WANG, B.; WANG, W.; LU, S.; ROWLAND, T. C.; DISIVESTRO, P.; LINDAMOOD, C.; HILL, D. L.; BERLIN, K. D. Biologically active heteroarotinoids exhibiting anticancer activity and decreased toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 22, p. 3567–83, 24 out. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9357524>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

BOSCH, A.; BERTRAN, S. P.; LU, Y.; GARCIA, A.; JONES, A. M.; DAWSON, M. I.; FARIAS, E. F. Reversal by RARalpha agonist Am580 of c-Myc-induced imbalance in RARalpha/RARgamma expression during MMTV-Myc tumorigenesis. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 4, p. R121, 2012.

BRENTON, J. D. Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application? **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 29, p. 7350–7360, 2005. Disponível em: <<http://www.jco.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2005.03.3845>>.

BRIGGER, D.; SCHLÄFLI, A. M.; GARATTINI, E.; TSCHAN, M. P. Activation of RAR α induces autophagy in SKBR3 breast cancer cells and depletion of key autophagy genes enhances ATRA toxicity. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 8, p. e1861, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/cddis.2015.236>>.

CHOU, T.-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440–446, 2010. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>>.

CHOU, T.-C.; TALALAY, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, n. November, p. 450–454, 1983.

CHRISTINE PRATT, M. A.; NIU, M.; WHITE, D. Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids. **J.Cell Biochem.**, v. 90, n. 4, p. 692–708, 2003.

CZABOTAR, P. E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J. M. Control of

apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy.

Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 15, n. 1, p. 49–63, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3722>>.

DE LERA, A. R.; BOURGUET, W.; ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 10, p. 811–820, 2007. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd2398>\nfile:///Users/Eiji/Dropbox/@GTD/Library/papers3/266d882f-716e-4ec4-b2e8-a1a924402e63.pdf\npapers3://publication/doi/10.1038/nrd2398>.

DI MASI, A.; LEBOFFE, L.; DE MARINIS, E.; PAGANO, F.; CICONI, L.; ROCHETTE-EGLY, C.; LO COCO, F.; ASCENZI, P.; NERVI, C. Retinoic acid receptors and cancer: From molecular mechanisms to therapy. **Molecular aspects of medicine**, v. 41, p. 1–115, 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25543955>>.

FULDA, S. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 23, n. 3, p. 467–76, 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19039324>>.

GARATTINI, E.; BOLIS, M.; GARATTINI, S. K.; FRATELLI, M.; CENTRITTO, F.; PARONI, G.; GIANNI', M.; ZANETTI, A.; PAGANI, A.; FISHER, J. N.; ZAMBELLI, A.; TERAIO, M. Retinoids and breast cancer: From basic studies to the clinic and back again. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 6, p. 739–749, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.01.001>>.

GARATTINI, E.; GIANNI, M.; TERAIO, M. Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 13, p. 1375–400, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506722>>.

GARCIA, T. de M. **Síntese de novos análogos triazólicos arotinoidais via click chemistry com potencial atividade anticâncer**. 2012. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2012.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin.

Biochemical Pharmacology, v. 57, n. 7, p. 727–741, 1999.

GIANNÍ, M.; LI CALZI, M.; TERAIO, M.; GUIISO, G.; CACCIA, S.; BARBUI, T.;

- RAMBALDI, a; GARATTINI, E. AM580, a stable benzoic derivative of retinoic acid, has powerful and selective cyto-differentiating effects on acute promyelocytic leukemia cells. **Blood**, v. 87, n. 4, p. 1520–1531, 1996.
- GYORI, B. M.; VENKATACHALAM, G.; THIAGARAJAN, P. S.; HSU, D.; CLEMENT, M.-V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. **Redox Biology**, v. 2, p. 457–465, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231714000032>>.
- HAN, Q. X.; ALLEGRETTO, E. A.; SHAO, Z. M.; KUTE, T. E.; ORDONEZ, J.; AISNER, S. C.; RISHI, A. K.; FONTANA, J. A. Elevated expression of retinoic acid receptor-alpha (RAR alpha) in estrogen-receptor-positive breast carcinomas as detected by immunohistochemistry. **Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B**, v. 6, n. 1, p. 42–8, fev. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9028736>>.
- IARC., I. A. for R. on C. W. H. O. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. **Globocan**, v. 2012, p. 3–6, 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?>.
- JIANG. Survivin transcription is associated with P-glycoprotein/MDR1 overexpression in the multidrug resistance of MCF-7 breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 23, n. 5, p. 223–230, 31 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/or/23/5/1469>>.
- KASIBHATLA, S. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 21, p. pdb.prot4493–pdb.prot4493, 2006.
- KHAN, S.; JUTZY, J. M. S.; ASPE, J. R.; MCGREGOR, D. W.; NEIDIGH, J. W.; WALL, N. R. Survivin is released from cancer cells via exosomes. **Apoptosis**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2011.
- LEVENSON, a S.; JORDAN, V. C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer research**, v. 57, n. 15, p. 3071–3078, 1997.
- LIU, F.; XIE, Z.-H.; CAI, G.-P.; JIANG, Y.-Y. The effect of survivin on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF-7 and its adriamycin resistant cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 12, p. 2279–83, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18057712>>.
- LU, M.; MIRA-Y-LOPEZ, R.; NAKAJO, S.; NAKAYA, K.; JING, Y. Expression of estrogen receptor alpha, retinoic acid receptor alpha and cellular retinoic acid binding

- protein II genes is coordinately regulated in human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 24, n. 27, p. 4362–4369, 2005.
- LV, Y.-G.; YU, F.; YAO, Q.; CHEN, J.-H.; WANG, L. The role of survivin in diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer. **Journal of thoracic disease**, v. 2, n. 2, p. 100–10, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3256445&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- MASETTI, R.; VENDEMINI, F.; ZAMA, D.; BIAGI, C.; GASPERINI, P.; PESSION, A. All- trans retinoic acid in the treatment of pediatric acute promyelocytic leukemia. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 12, n. 9, p. 1191–1204, set. 2012. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/era.12.101>>.
- MUKHOPADHYAY, S.; PANDA, P. K.; SINHA, N.; DAS, D. N.; BHUTIA, S. K. Autophagy and apoptosis: where do they meet? **Apoptosis**, v. 19, n. 4, p. 555–566, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10495-014-0967-2>>.
- PARONI, G.; FRATELLI, M.; GARDINI, G.; BASSANO, C.; FLORA, M.; ZANETTI, a; GUARNACCIA, V.; UBEZIO, P.; CENTRITTO, F.; TERAIO, M.; GARATTINI, E. Synergistic antitumor activity of lapatinib and retinoids on a novel subtype of breast cancer with coamplification of ERBB2 and RARA. **Oncogene**, v. 31, n. 29, p. 3431–43, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056878>>.
- PINTO, A. C.; MOREIRA, J. N.; SIMÕES, S. Combination Chemotherapy in Cancer : Principles , Evaluation and Drug Delivery Strategies. **Current Cancer Treatment**, p. 695–714, 2010.
- POINDESSOUS, V.; KOEPEL, F.; RAYMOND, E.; COMISSO, M.; WATERS, S. J.; LARSEN, A. K. Marked activity of irifolven toward human carcinoma cells: Comparison with cisplatin and ecteinascidin. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 2817–2825, 2003.
- REYNOLDS, C. P.; MAURER, B. J. Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models. **Methods in molecular medicine**, v. 110, n. 2, p. 173–183, 2005.
- ROSS-INNES, C.; STARK, R. Cooperative interaction between retinoic acid receptor- α and estrogen receptor in breast cancer. **Genes & ...**, v. 3, n. 2009, p. 171–182, 2010. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/content/24/2/171.short>>.
- SIMONI, D.; ROBERTI, M.; INVIDIATA, F. P.; RONDANIN, R.; BARUCHELLO, R.; MALAGUTTI, C.; MAZZALI, A.; ROSSI, M.; GRIMAUDO, S.; DUSONCHET, L.;

MELI, M.; RAIMONDI, M. V.; D'ALESSANDRO, N.; TOLOMEO, M. Programmed cell death (PCD) associated with the stilbene motif of arotinoids: discovery of novel apoptosis inducer agents possessing activity on multidrug resistant tumor cells.

Bioorg Med Chem Lett, v. 10, n. 23, p. 2669–73, 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11128648>>.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

TERAO, M.; FRATELLI, M.; KUROSAKI, M.; ZANETTI, A.; GUARNACCIA, V.; PARONI, G.; TSYKIN, A.; LUPI, M.; GIANNI, M.; GOODALL, G. J.; GARATTINI, E. Induction of miR-21 by Retinoic Acid in Estrogen Receptor-positive Breast Carcinoma Cells: BIOLOGICAL CORRELATES AND MOLECULAR TARGETS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 5, p. 4027–4042, 2011. Disponível em:

<<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.184994>>.

<<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.184994>>.

YERSAL, O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 412, 2014.

Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v5/i3/412.htm>>.