



**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**

Stefanny de Fátima Guedes Cunha

Imitadores sintéticos de miR-7 na potencialização de efeitos *in vitro* do paclitaxel em células de carcinoma humano de mama e ovário

Brasília

2020

Stefanny de Fátima Guedes Cunha

Imitadores sintéticos de miR-7 na potencialização de efeitos *in vitro* do paclitaxel em células de carcinoma humano de mama e ovário

Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Titze-de-Almeida

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília

2020

Stefanny de Fátima Guedes Cunha

Imitadores sintéticos de miR-7 na potencialização de efeitos *in vitro* do paclitaxel em células de carcinoma humano de mama e ovário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovada em 03/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

Profa. Dra. Sônia Nair Bão (Membro Titular)

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo (Membro Titular)

Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida (Membro Suplente)

Brasília

2020

Dedico esse trabalho a todos que corajosamente lutaram
a árdua batalha contra o câncer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por toda a sabedoria e discernimento que Ele me concedeu para viver todas as oportunidades e aprendizados durante esse período.

Aos meus pais pelo caráter e comprometimento que sempre me ensinaram a realizar tudo o que faço.

Ao meu grande amor, João. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial, pela paciência e companheirismo durante esses dois anos e em especial durante a finalização desse trabalho. Obrigada por ser o abraço reconfortante que sempre me traz paz (prometo que não quero chorar 😊).

À minha família e amigos, que estão sempre me apoiando e encorajando a cada decisão tomada e vibrando a cada vitória “científica” ainda que sem compreender direito o que se trata!

Ao meu orientador, professor Ricardo Titze-de-Almeida, pela oportunidade, credibilidade e autonomia a mim concedida. Pelas longas e produtivas reuniões e experiências que totalizaram no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas do laboratório de Microscopia Eletrônica (Ingrid, Bruna, Aninha, Karen, Diogo, Eloísio, Melissa, Bárbara, Márcia, e todos os que posso ter esquecido) por toda disponibilidade, prontidão, ajuda, conselhos e pelas maravilhosas risadas na folga dos experimentos. Obrigada por deixarem a vida científica mais leve e feliz.

Agradeço aos professores, Sônia Nair Bão, Bergman Ribeiro, Renato Rezende Tatsuya Nagata e Kelly Magalhães, e seus respectivos alunos por gentilmente cederem, sempre que necessário, o espaço físico, equipamentos e materiais para a realização dos meus ensaios.

Ao professor José Raimundo Corrêa por gentilmente dar o suporte nas questões burocráticas.

A todos do laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica, especialmente à Fran, minha parceira nessa jornada louca de microRNAs e câncer. Obrigada por tanto!

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPQ, FINEP e FAP-DF e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, que fizeram possível a realização desse trabalho.

“...Ainda que eu conheça todos os mistérios e toda a ciência se não tiver amor, nada serei.”

I Coríntios, 13

Resumo

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais frequente e a mais comum em mulheres. O câncer epitelial de ovário, apesar de não estar entre as neoplasias malignas mais incidentes, é considerado o câncer ginecológico com maior índice de mortalidade do mundo. O tratamento padrão para esses tipos tumorais é baseado em terapias combinadas com uso de taxanos como o paclitaxel que, apesar de amplamente utilizado, pode causar efeitos adversos que afetam a qualidade de vida do paciente, bem como perder efetividade face à resistência das células tumorais, fatores que comprometem a terapêutica da doença. Estudos baseados em RNA de interferência (RNAi) mostram que microRNAs são alvos promissores para o tratamento do câncer devido à sua capacidade de controlar pós-transcricionalmente a expressão gênica de mensagens importantes para a carcinogênese. Neste sentido, miR-7 se destaca como supressor tumoral em diversos tipos de cânceres e a sua baixa expressão está relacionada com a alta atividade de genes envolvidos em vias de sinalização, proliferação celular e metástase. Assim, a reposição do conteúdo deste microRNA em células cancerosas, por meio de imitadores sintéticos, representa uma nova abordagem terapêutica da doença. No presente estudo, objetivou-se dar continuidade aos trabalhos do grupo sobre a capacidade do imitador sintético de miR-7 (*miR-7 mimics*) em sensibilizar células para os efeitos do paclitaxel. Foram estudadas células de tumor mamário triplo-negativo MDA-MB-231 e de tumor epitelial de ovário A2780. A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT e a análise morfológica por meio de microscopia óptica e de fluorescência. O tipo de morte celular foi analisado por citometria de fluxo por marcação de Anexina-V/PI. Espécies reativas de oxigênio foram quantificadas por DCFH-DA e CellROX Green Reagent. A associação simultânea entre paclitaxel (100nM) e miR-7 *mimic* (10nM) (PTX+miR-7) induziu efetiva redução na viabilidade celular das duas linhagens estudadas, comparativamente ao uso isolado do paclitaxel. Na linhagem MDA-MB-231 o tratamento PTX+miR-7 causou alterações morfológicas significativas na superfície das membranas plasmáticas, com aspecto mais rugoso/esponjoso, sugerindo perda de estabilidade das mesmas. Na linhagem A2780 a associação de paclitaxel a miR-7 resultou em alterações morfológicas semelhantes às vistas com o PTX isolado, havendo ainda redução do número de células e menor quantidade de células aderidas ao poço. Nas duas linhagens estudadas foi possível observar aumento do volume e fragmentação do núcleo da célula. A terapia combinada (PTX+miR-7) elevou majoritariamente o percentual de morte celular por apoptose em ambas as linhagens celulares, quando comparada ao quimioterápico isolado (PTX). Os dados mostram que a apoptose por miR-7 *mimics* é acompanhada de aumento significativo no estresse oxidativo (ROS) das células tumorais de mama MDA-MB-231. De forma oposta, os resultados sugerem que o mecanismo de miR-7 *mimic* para potencializar a citotoxicidade do paclitaxel não está relacionado ao aumento significativo de estresse oxidativo nas células tumorais de ovário A2780. Os resultados do presente estudo permitem concluir que o uso de imitador sintético de miR-7 em associação a paclitaxel representa abordagem promissora na terapêutica dos cânceres de mama triplo-negativos e de ovário, colocando-se em perspectiva testes pré-clínicos para análise de eficácia e segurança.

Palavras chave: câncer de mama; câncer de ovário; MDA-MB-231; A2780; miR-7; paclitaxel.

Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and the second most common cancer overall. Despite not being among the most incident oncology disorders, ovarian cancer is the leading cause of death among gynecologic tumors. Chemotherapy based on taxanes such as paclitaxel holds satisfactory anticancer efficacy. However, the inherent side effects of systemic therapy and drug resistance bring additional difficulties in the patient's medical, impacting the cancer progression. Studies based on RNA interference (RNAi) have revealed that microRNAs are promising targets for cancer treatment due to its ability to control genes expressed during the carcinogenesis process and potentiate, in addition, conventional antineoplastic drugs. In such sense, miR-7 have been described as tumor suppressor in several cancer types by exerting an RNAi-mediated silencing of oncogenes involved in cell signaling, tumor growth, and metastasis. Targeting specific microRNAs aberrantly expressed in cancer cells represents a wide avenue for drug development in oncology. In the present study, we aimed to continue previous work that evaluated whether miR-7 mimics could sensitize cancer cells to the effects of paclitaxel. MDA-MB-231 (triple-negative breast tumor cells) and A2780 (ovarian epithelial tumor cells) were studied. Cell viability was determined by MTT colorimetry assays, and morphological changes by optical and fluorescence microscopy. We examined cell death by flow cytometry using Annexin-V/PI staining. Reactive oxygen species (ROS) were quantified by DCFH-DA and CellROX Green Reagent. Our study found that an association between paclitaxel (100nM) and miR-7 mimic (10nM) (PTX + miR-7) causes a significant reduction in cell viability of both cell lines, in comparison to free paclitaxel. PTX + miR-7 treatment also induced significant morphological changes that might affect the stability of MDA-MB-231 cell membranes. In the ovarian cancer cell line (A2780), the combined treatment with paclitaxel and miR-7 resulted in morphological changes similar to those seen with free PTX. We observed in both cell lines an increase in volume and nuclear fragmentation. Combined therapy (PTX + miR-7) enhanced the percentage of cell death due to apoptosis in both cell lines, when compared to chemotherapy alone (PTX). In addition, our results indicate that apoptosis by miR-7 mimics is followed by a significant increase in ROS content in breast tumor cells MDA-MB-231. In contrast, miR-7 mimic mechanism to potentiate the paclitaxel cytotoxicity was not related to the significant increase in oxidative stress in A2780 ovarian tumor cells. Our results point miR-7 as a promising approach for gene therapy of breast and ovarian cancers and merits further investigation in pre-clinical models of the disease.

Key words: breast cancer; ovarian cancer; MDA-MB-231; A2780; miR-7; paclitaxel

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da proliferação celular na carcinogênese.....	17
Figura 2. Principais cânceres por país, taxas estimadas de incidência padronizada por idade (Mundo) em 2018, ambos os sexos, 0-74 anos de idade (excluindo câncer de pele não melanoma).....	19
Figura 3. Principais cânceres por país, taxas estimadas de mortalidade padronizada por idade (Mundo) em 2018, ambos os sexos, 0-74 anos de idade (excluindo câncer de pele não melanoma).....	19
Figura 4. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo exceto pele não melanoma.....	20
Figura 5. Esquema comparativo da Incidência versus Mortalidade dos principais tipos de câncer relacionados ao sistema reprodutor feminino.....	21
Figura 6. Esquema da estrutura anatômica da mama sadia.....	22
Figura 7. Tipos mais frequentes de carcinoma mamário humano.....	23
Figura 8. As três classes principais de células ovarianas das quais se originam as neoplasias malignas.....	25
Figura 9. Representação da estrutura química do paclitaxel.....	27
Figura 10. Modelo da biogênese dos microRNAs.....	29
Figura 11. Alvos de miR-7 em diferentes tipos tumorais.....	30
Figura 12. Diagrama esquemático do delineamento experimental com as linhagens celulares MDA-MB-231 e A2780.....	33
Figura 13. Morfologia característica das linhagens celulares utilizadas no estudo.....	34
Figura 14. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231 após tratamentos isolados com o paclitaxel (100nM) e com transfecção de miR-7 mimic (10 nM).....	43
Figura 15. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231 após associação simultânea de miR-7 ao paclitaxel.....	45
Figura 16. Avaliação da viabilidade celular em linhagem A2780 após tratamentos isolados com o paclitaxel (100nM) e com transfecção de miR-7 mimic (10 nM).....	46
Figura 17. Avaliação da viabilidade celular em linhagem A2780 após associação simultânea de miR-7 ao paclitaxel.....	47
Figura 18. Alterações morfológicas na linhagem MDA-MB-231 pela terapia combinada do paclitaxel ao miR-7 mimic.....	49

Figura 19. Alterações nos padrões de morfologia SSC/FSC na linhagem MDA-MB-231 induzidas terapia combinada do paclitaxel ao miR-7 <i>mimic</i>	50
Figura 20. Alterações morfológicas na linhagem A2780 pela terapia combinada do paclitaxel ao miR-7 <i>mimic</i>	52
Figura 21. Alterações nos padrões de morfologia SSC/FSC na linhagem A2780 induzidas terapia combinada do paclitaxel ao miR-7 <i>mimic</i>	53
Figura 22. Perfil de morte celular induzido pela terapia combinada do paclitaxel ao imitador sintético de miR-7 na linhagem MDA-MB-231.....	54
Figura 23. Perfil de morte celular induzido pela terapia combinada do paclitaxel ao imitador sintético de miR-7 na linhagem MDA-MB-231 representado por Dotplot.....	54
Figura 24. Perfil de morte celular induzido pela terapia combinada do paclitaxel ao imitador sintético de miR-7 na linhagem MDA-MB-231.....	55
Figura 25. Perfil de morte celular induzido pela terapia combinada do paclitaxel ao imitador sintético de miR-7 na linhagem A2780 representado por Dotplot.....	56
Figura 26. Perfil de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA em linhagem MDA-MB-231, após tratamentos livres com Paclitaxel ou miR-7 <i>mimic</i>	57
Figura 27. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA em linhagem MDA-MB-231 após terapia combinada de paclitaxel com miR-7 <i>mimic</i>	58
Figura 28. Perfil de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA em linhagem A2780, após tratamentos livres com paclitaxel e miR-7 <i>mimic</i>	59
Figura 29. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA em linhagem A2780 após terapia combinada de paclitaxel com miR-7 <i>mimic</i>	59
Figura 30. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), examinada por CellROX em linhagem MDA-MB-231 após terapia combinada de paclitaxel com miR-7 <i>mimic</i>	61
Figura 31. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), examinada por CellROX em linhagem A2780 após terapia combinada de paclitaxel com miR-7 <i>mimic</i>	62
Figura 32. Análise qualitativa do estresse oxidativo induzido pela terapia combinada de paclitaxel ao miR-7 <i>mimics</i> na linhagem MDA-MB-231.....	63
Figura 33. Análise qualitativa do estresse oxidativo induzido pela terapia combinada de paclitaxel ao miR-7 <i>mimics</i> na linhagem A2780.....	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Lista de materiais utilizados nos experimentos.....	35
Tabela 2. Imitadores sintéticos de miRNAs utilizados no estudo.....	36
Tabela 3. Grupos e condições experimentais dos ensaios de viabilidade celular com transfecção de miR-7.....	38
Tabela 4. Comparação de percentuais de viabilidade celular com desenhos experimentais diferentes de tratamento com a associação de miR-7 <i>mimic</i> e PTX.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS – American Cancer Society

ANOVA – Análise de variância

ATCC – *American Type Culture Collection*

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

BRAF - Proto-oncogene que expressa B-Raf

BRCA1 – Oncogene de susceptibilidade ao câncer de mama do tipo 1

BRCA2 – Oncogene de susceptibilidade ao câncer de mama do tipo 2

BCL2 - B-cell lymphoma 2 – proteína de sobrevivência celular

CA-125 - Marcador tumoral de câncer de ovário

CEO – célula epitelial de ovário

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

DCFH-DA- 2',7'-Dichlorofluorescin Diacetate

DMSO – Dimetilssulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*

ER – Receptor de Estrogênio

FSC - *Forward Scatter*

HER2 – Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

HUB – Hospital Universitário de Brasília

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KRAS - Oncogene que codifica GTPase KRas

L-15 - Leibovitz's medium

LNA – *Locked nucleic acids*

Mimic - Imitador Sintéticos de MicroRNA

mRNA – RNA mensageiro

MRP-1 - Proteína Associada com Resistência a Multidroga

MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

p53 – Proteína supressora de tumor p53

PARP - enzima poli(ADP-ribose) polimerase

PBS – Solução Salina Fosfatada Tamponada

PI – Iodeto de Propídio

PR – Receptor de Progesterona

Pré-miRNA – MicroRNA Precursor

Pri-miRNA – MicroRNA primário

PTX – Paclitaxel

RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

RNA – Ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

ROS – *Reactive Oxygen Species*

RPM – Rotações por minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute medium*

SFB – Soro Fetal Bovino

siRNA – Small-interfering RNA

SSC - *Side Scatter*

TNBC – Câncer de mama triplo-negativo (*Triple-negative Breast Cancer*)

UNB – Universidade de Brasília – UnB

UTR – *Untranslated region*

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
1.1.Biologia do Câncer	16
1.2.Aspectos epidemiológicos do câncer.....	18
1.3.O Câncer na população feminina.....	20
1.3.1.Câncer de mama	22
1.3.2.Câncer de ovário.....	24
1.4.Terapêuticas convencionais e suas limitações nos cânceres de mama e ovário.....	26
1.4.1.Paclitaxel	27
1.5.O uso de microRNAs na Terapia Gênica	28
1.5.1.O microRNA 7 e o câncer	30
2.JUSTIFICATIVA	31
3.OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos	32
4.MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Delineamento Experimental	33
4.2. Reagentes e Equipamentos	34
4.3. Cultivo Celular	35
4.3.O quimioterápico paclitaxel (PTX)	36
4.4.Imitadores sintéticos de microRNA 7 (miR-7 <i>mimics</i>) e sequência controle.....	36
4.5.Tratamento com o quimioterápico paclitaxel livre ou em associação a miR-7 <i>mimics</i>	37
4.6.Ensaio de viabilidade celular por MTT	38
4.7.Análise morfológica das células por microscopia de luz	39
4.8.Caracterização de tipo de morte celular induzida pelos tratamentos.....	39
4.9.Análise da presença de espécies reativas de oxigênio (ROS)	40

4.9.1.Quantificação de ROS por DCFH-DA	40
4.9.2.Quantificação de ROS por CellROX <i>Green Reagent</i>	41
4.10.Análise qualitativa de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por CellROX <i>Green Reagent</i>	41
4.11.Análise estatística	42
5.RESULTADOS	43
5.1. Teste dos efeitos dos tratamentos isolados com o quimioterápico paclitaxel (PTX) e com o imitador sintético de miR-7, sobre a viabilidade celular na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	43
5.2.Efeito do imitador sintético de miR-7 em associação ao paclitaxel (PTX), ambos administrados no mesmo ponto temporal, sobre a viabilidade celular na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	44
5.3.Teste dos efeitos dos tratamentos isolados com o quimioterápico paclitaxel (PTX) e com o imitador sintético de miR-7, sobre a viabilidade celular na linhagem de câncer de ovário A2780	45
5.4.Efeito do imitador sintético de miR-7 em associação ao paclitaxel sobre a viabilidade celular na linhagem de câncer de ovário A2780.....	47
5.5.Alterações morfológicas em células da linhagem MDA-MB-231 expostas à associação de miR-7 <i>mimics</i> e paclitaxel	48
5.6.Alterações morfológicas em células da linhagem A2780 expostas à associação de miR-7 <i>mimics</i> e paclitaxel	51
5.7.Determinação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento combinado de paclitaxel e miR-7 <i>mimics</i> na linhagem MDA-MB-231	53
5.8.Determinação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento combinado de paclitaxel e miR-7 <i>mimics</i> na linhagem A2780.....	55
5.9.Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA, induzidas pela terapia combinada de PTX e miR-7 <i>mimics</i>	56
5.10.Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA, induzidas pela terapia combinada com paclitaxel associado ao miR-7, na linhagem A2780.....	58

5.11.Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por CellROX Green, induzidas pelo tratamento combinado de paclitaxel e miR-7 <i>mimics</i> , nas linhagens MDA-MB-231 e A2780.....	60
5.12.Análise qualitativa do estresse oxidativo induzido pela terapia combinada com paclitaxel em associação a miR-7 <i>mimics</i> , nas linhagens MDA-MB-231 e A2780.....	62
6.DISSCUSSÃO	65
7. CONCLUSÃO	69
8. PERSPECTIVAS	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biologia do Câncer

Câncer, é o termo popularmente utilizado para definir o conjunto de doenças originadas pelo acúmulo de mutações no genoma celular, que se revertem em alterações nos mecanismos de reparo do DNA, resultando na proliferação desordenada de células com a perda da organização e funções normais, e com a capacidade de invasão a tecidos adjacentes (Weinberg, 2014; ACS, 2019; WHO, 2019).

Disfunções nos mecanismos celulares comumente ocorrem em resposta a estímulos internos ou externos ao organismo e podem resultar em anomalias na expressão gênica das células. Apesar de os estímulos internos exercerem papel relevante na formação de tumores malignos, eles contribuem significativamente para apenas 10% a 20% dos casos, e envolvem predisposições genéticas, fatores hereditários, desarranjos hormonais e imunes. Os fatores externos relacionados ao estilo de vida, tais como exposição a agentes potencialmente carcinogênicos, como o tabaco e o álcool, e aqueles oriundos da natureza ocupacional do indivíduo, hábitos de sedentarismo, má alimentação, inflamação crônica, entre outros, são fatores de risco ligados a mais de 80% das neoplasias malignas em seres humanos (Anand, 2008; Pomerantz & Freedman, 2011; Arem & Ioffield, 2017; ACS, 2019; INCA, 2019;). O envelhecimento também é fator de risco para o desenvolvimento do câncer, uma vez que os casos aumentam de forma significativa com a idade dos indivíduos. Pessoas idosas acumulam maior tempo de exposição a uma variedade de insultos químicos e genéticos, podendo também ocorrer associação entre idade e a tendência natural de perda de eficiência dos mecanismos de manutenção e reparo do DNA (Weinberg, 2014; Aunan *et al*, 2017; Zinger *et al*, 2017).

Erroneamente, pode-se supor que toda mudança na massa tecidual do organismo é, ou pode se transformar em um câncer. O desenvolvimento de uma neoplasia maligna é algo bem mais complexo, e resultante de falhas em funções celulares que mantêm a integridade estrutural e evitam a mutabilidade do DNA. Ou seja, a perda de mecanismos celulares que previnem fatores de riscos e interrompem os efeitos de agentes mutagênicos tem papel relevante na transformação das células cancerosas (ACS, 2019; INCA, 2019; NIH, 2020). Tal transformação de células normais em cancerosas ocorre, na maioria dos casos, através de um processo lento, progressivo e de múltiplas etapas, conhecido como carcinogênese (Weinberg, 2014) (Figura 1). A etapa de iniciação do crescimento celular na carcinogênese é denominada de hiperplasia, e geralmente ocorre devido a estímulos fisiológicos ou patológicos, em que as células normais passam a ter proliferação

acelerada, mas sem prejuízo de seu fenótipo e organização celular. Com o acúmulo de modificações em alguns genes, essas células hiperplásicas podem se tornar citologicamente anormais, com perda de características citoplasmáticas vistas no tecido normal, alterações no tamanho e forma do núcleo, bem como aumento da atividade mitótica. Denominada de displasia, essa etapa é fundamental na progressão para o crescimento neoplásico, que pode ser benigno, ou seja, aquele tumor sem infiltração ou invasão de tecidos adjacentes, ou então maligno, quando há invasão destes tecidos adjacentes. À medida que as células normais se transformam progressivamente para um estágio neoplásico, há aquisição de certas competências que as caracterizam como malignas. Células de uma neoplasia maligna – o câncer efetivamente dito, ignoram sinais que normalmente descontinuariam a divisão celular ou ocasionariam a morte celular programada (apoptose) em um ambiente homeostático. Além disso, a sinalização e a interação com moléculas e células normais para a formação do estroma associado ao tumor, permite a formação de um microambiente favorável à tumorigênese, portanto rico em vasos sanguíneos que fornecem oxigênio e nutrientes para o desenvolvimento e estabelecimento do tumor e, mais gravemente, que poderá levar à formação de novas colônias de tumores distantes do sítio primário, as metástases tumorais, situação em que o tumor é considerado clinicamente com baixa probabilidade de cura (Pan *et al*, 2011; Weinberg, 2014; Cairns & Mak, 2016; Fouad & Aanei, 2017; WHO, 2019; NIH, 2020).

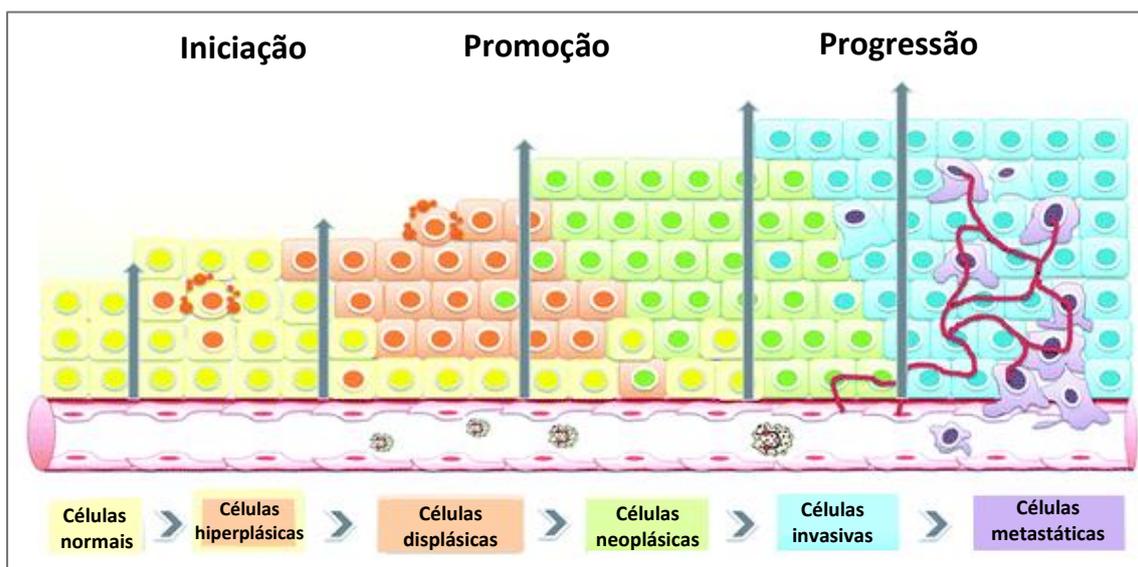


Figura 1. Etapas da proliferação celular na carcinogênese. Adaptado de (Pan *et al*, 2011). O acúmulo de modificações genéticas por estímulos internos e/ou externos são responsáveis pela iniciação da carcinogênese que se dá no crescimento hiperplásico. Células geneticamente alteradas (displásicas) são transformadas em células neoplásicas de forma lenta e gradual. A aquisição de certas competências em células neoplásicas, permite a angiogênese que favorece a progressão do tumor em locais distantes do sítio primário (metástase).

Em suma, o câncer é o resultado de uma sucessão de eventos biológicos desencadeados por estímulos internos e externos à célula, e que podem levar a mutações no material genético e à desregulação de genes e moléculas fundamentais ao controle da proliferação celular. Algumas dessas mutações repercutem em características determinantes para o sucesso da progressão tumoral, como aquelas que inativam genes supressores de tumor e/ou, ativam proto-oncogenes, possibilitando a imortalidade replicativa e a resistência à morte celular por apoptose. Outras mutações permitem que as células cancerosas escapem do sistema imune, induzam angiogênese, aumentem a sensibilidade a fatores de crescimento, reprogramem seu metabolismo energético, e venham a invadir tecidos adjacentes e causar metástases (Hanahan e Weinberg, 2004, 2011; Weinberg 2014).

1.2. Aspectos epidemiológicos do câncer

As neoplasias malignas são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública mundial, e os carcinomas – tumores originados a partir de células epiteliais, correspondem a mais de 80% de todos os casos de cânceres em humanos, incluindo os tipos com maior percentual de mortalidade, como o câncer cervical e de pulmão de células não pequenas (Weinberg, 2014; ACS, 2019). Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018) comprovam que mais de 70% dos óbitos decorrem de doenças crônicas não transmissíveis, sendo o câncer a segunda principal causa de morte em humanos, responsável por um em cada seis óbitos em todo o mundo ou 9,6 milhões de mortes ao ano (Bray *et al*, 2018; WHO, 2018). O ônus global da neoplasia maligna segue em escala ascendente; agências de vigilância e controle do câncer estimam que até 2040 a incidência global será de 29,5 milhões de novos casos, com 16,5 milhões de mortes por câncer (Siegel, 2019). Os dados epidemiológicos de incidência e óbitos ligados ao câncer variam consideravelmente de acordo com o nível de renda dos países (Figuras 2 e 3).

Países com elevado desenvolvimento econômico e social registram taxas de incidência do câncer associados à urbanização e hábitos de vida, tais como pulmão, próstata e mama. Já em países com baixo desenvolvimento, que passam por transições sociais e econômicas, as pessoas são mais afetadas em termos de qualidade e cobertura de saúde populacional, e as causas do câncer mais prevalentes relacionam-se com infecções, acometendo o colo do útero, estômago, esôfago e fígado (Bray *et al*, 2018, WHO 2019).



Figura 2. Principais cânceres por país, taxas estimadas de incidência padronizada por idade (Mundo) em 2018, ambos os sexos, 0-74 anos de idade (excluindo câncer de pele não melanoma). Adaptado de (WHO - GLOBOCAN, 2018). O câncer de mama é globalmente o tipo mais incidente de neoplasia, seguido de câncer de próstata. Países menos desenvolvidos apresentam alta incidência em cânceres decorrentes de infecções: colo do útero e fígado.



Figura 3. Principais cânceres por país, taxas estimadas de mortalidade padronizada por idade (Mundo) em 2018, ambos os sexos, 0-74 anos de idade (excluindo câncer de pele não melanoma). Adaptado de (WHO - GLOBOCAN, 2018). Países mais desenvolvidos economicamente apresentam elevada taxa de mortalidade decorrente de câncer de pulmão. Países com menor potencial econômico (sobretudo no continente africano) apresentam elevadas taxas de mortalidade relacionadas ao câncer de colo do útero.

No Brasil, foram estimados cerca de 1,2 milhões de novos casos de câncer para o biênio 2018-2019. O Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019) aponta que para cada ano do triênio 2020-2022 são esperados 625 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma, que continuará sendo o mais incidente em ambos os sexos, com 27,1% e 29,5% entre os homens e mulheres, respectivamente. Os tipos de

tumores malignos mais frequentes em homens serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), aparelho respiratório incluindo pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), aparelho respiratório e pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) (Figura 4).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%
			Mulheres				

Figura 4. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo exceto pele não melanoma. Números arredondados para múltiplos de 10. Adaptado de (INCA, 2019). Os cinco tipos de câncer mais incidentes na população masculina brasileira, estão relacionados a urbanização e hábitos de vida (próstata; cólon e reto; trato respiratório; estômago; cavidade oral). Nas mulheres, o câncer de mama será o tipo mais incidente no Brasil, seguido de tipos tumorais também relacionados a hábitos de vida (cólon e reto; colo do útero, trato pulmonar e tireoide).

1.3. O Câncer na população feminina

O câncer é certamente a doença não sexualmente transmissível que mais preocupa médicos e pacientes quanto à saúde reprodutiva da mulher. Dos mais de 316 mil novos casos de câncer em mulheres, previstos para cada ano do triênio (2020-2022) no Brasil, cerca de 96 mil casos serão relacionados ao sistema reprodutor feminino (INCA, 2019). Embora não seja propriamente uma doença do sistema reprodutor feminino, o câncer de mama está intimamente relacionado a ele. No plano epidemiológico, o câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais frequente em todo o mundo (após o câncer de pele não melanoma), acometendo mais de 2 milhões de mulheres, com 626.700 óbitos (McLaren & Janet, 2012; Ferlay et al, 2019). Dados estatísticos (WHO, 2018) mostram que este tipo tumoral correspondeu a 24,2% de todos os casos de câncer em 2018 em pacientes do sexo feminino, independente da condição socioeconômica do país.

Quanto ao câncer de ovário, também objeto do presente estudo, este não figura entre as neoplasias malignas mais incidentes em mulheres. Porém, foi responsável por mais de 184 mil óbitos dos 295.414 mil novos casos registrados em 2018, sendo considerado, portanto, o câncer ginecológico com maior índice de mortalidade no mundo (Bray *et al*, 2018; GLOBOCAN, 2018) (Figura 5).

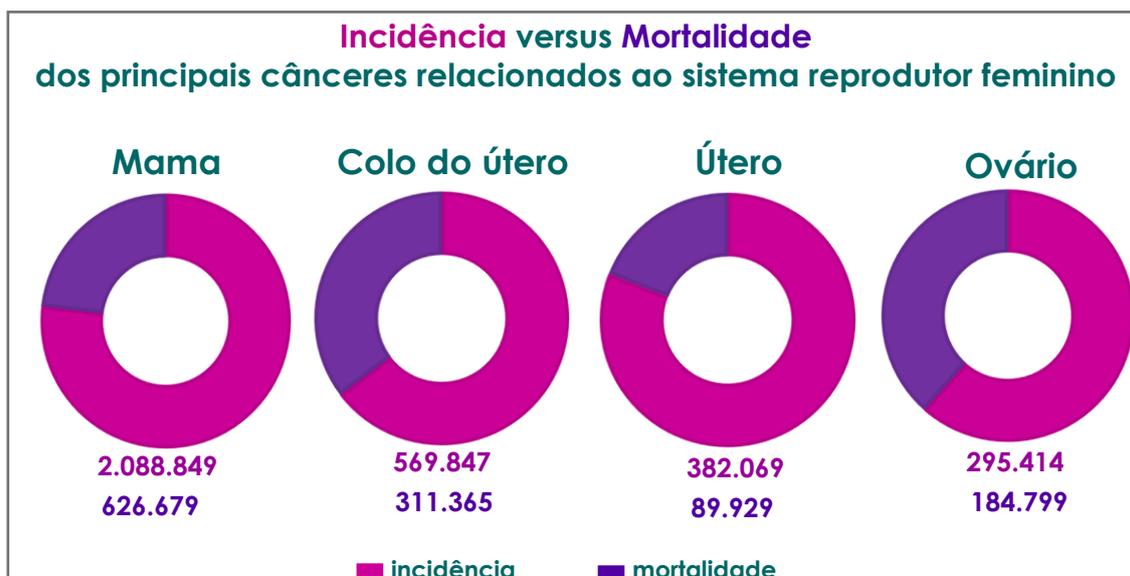


Figura 5. Esquema comparativo da Incidência versus Mortalidade dos principais tipos de câncer relacionados do sistema reprodutor feminino. Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO - GLOBOCAN, 2018). O câncer de mama representa a maior incidência tumoral de neoplasias relacionadas ao sexo feminino, precedido de câncer do colo do útero, câncer de útero e ovário. O câncer de ovário, apesar de ser o menos incidente, leva ao óbito mais de 60% das pacientes diagnosticadas com a neoplasia.

Assim como os demais tipos tumorais, os cânceres de mama e ovário também resultam de uma proliferação descontrolada de células anormais, que podem ter surgido de mutações genéticas hereditárias ou adquiridas. Neste último caso, principalmente pelo hábito de vida, incluindo-se os fatores predisponentes como sobrepeso, uso excessivo de bebidas alcoólicas e tabaco, sedentarismo, ou devido à intensa exposição a agentes carcinogênicos ambientais (Weinberg, 2014; Whiteman & Wilson, 2016; Arem & Loftfield, 2017). Os fatores de risco atribuídos a essas neoplasias em mulheres, são originados por várias vias e estão principalmente correlacionados ao contexto reprodutivo da mulher: menarca precoce com primeira menstruação antes dos 11 anos de idade, menopausa tardia com última menstruação após os 55 anos de idade, nuliparidade ou primeira gestação após os 30 anos de idade, uso de contraceptivos e, também, reposição hormonal sobretudo com estrógenos (Rooth, 2013; Sun *et al*, 2017; ACS, 2019; INCA, 2019).

Fatores genéticos hereditários também são relevantes para o desenvolvimento dos cânceres que afetam a população feminina. O principal exemplo de mutações herdadas refere-se à família do gene BRCA (BRCA1 e BRCA2), presente entre 5 e 10% de todos os casos de câncer de mama, incluindo o desenvolvimento da doença sobretudo em idade jovem e em homens (representando menos de 1% de todos os casos de câncer de mama) (Baretta *et al*, 2016; Cítole-Gonzalez *et al*, 2017; ACS, 2019). Mutações de BRCA1/2 tem alta penetração no subtipo triplo-negativo, que será abordado a seguir. Além disto,

tais mutações tem valor informativo na decisão cirúrgica pela mastectomia bilateral e, no sentido terapêutico, são condição necessária para o uso de inibidores da enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) como o olaparibe (Ahn & Port,2017; Waks & Winer, 2019).

Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 também estão presentes na maioria dos casos de câncer de ovário que ocorrem por gerações em uma mesma família (Paul & Paul, 2014). A Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society – ACS*, 2018) estimou que a cada 100 mulheres que possuem mutação no gene BRCA1, entre 35 e 70 desenvolvem câncer de ovário. Mutações em BRCA2 ocorrem em 10 a 30% das mulheres com idade próxima de 70 anos.

1.3.1. Câncer de mama

A maioria dos tipos de câncer de mama são adenocarcinomas, ou seja, tem origem nas células epiteliais glandulares. A mama é formada por um complexo de ductos ramificados a partir do mamilo, e essa ramificação se subdivide basicamente em: (1) lóbulos mamários, considerados a parte anátomo-funcional da mama por possuírem glândulas produtoras de leite; (2) ductos, que são os pequenos tubos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo e; (3) tecidos adiposo e conjuntivo que envolvem os ductos e lóbulos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos (Makki, 2015; ACS, 2019) (Figura 6).

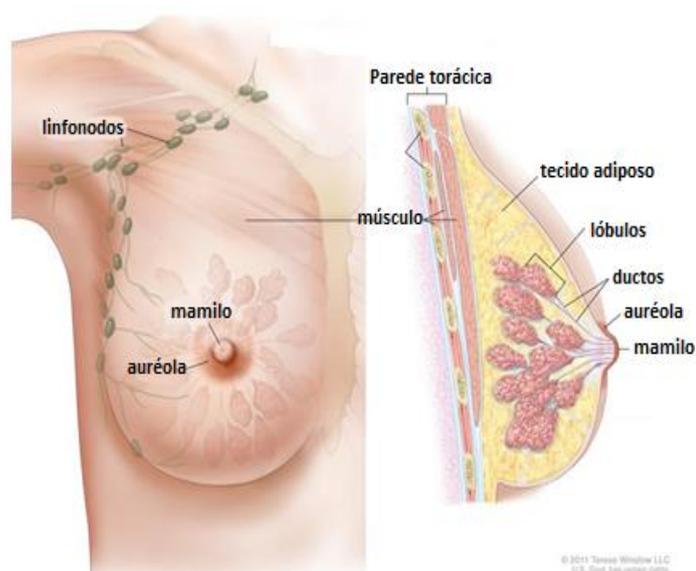


Figura 6. Esquema da estrutura anatômica da mama sadia. Adaptado de (*National Cancer Institute - NCI*, 2020). As mamas femininas estão localizadas na porção anterior e superior do tórax. São constituídas basicamente de glândulas responsáveis pela lactação e de pequenos tubos que transportam o leite – lóbulos e ductos, respectivamente.

Os tipos mais frequentes de carcinoma mamário são originados nas células dos ductos mamários ou lóbulos (Figura 7), e podem ser classificados de acordo com a sua capacidade de infiltrar os tecidos adjacentes. Carcinomas *in situ* são aqueles que permanecem restritos à camada na qual se desenvolveram. O carcinoma invasivo, ao contrário, invade tecidos circundantes e pode migrar para outras regiões do organismo, estabelecendo metástases (Sharma et al, 2010; Makki, 2015; ACS, 2019).

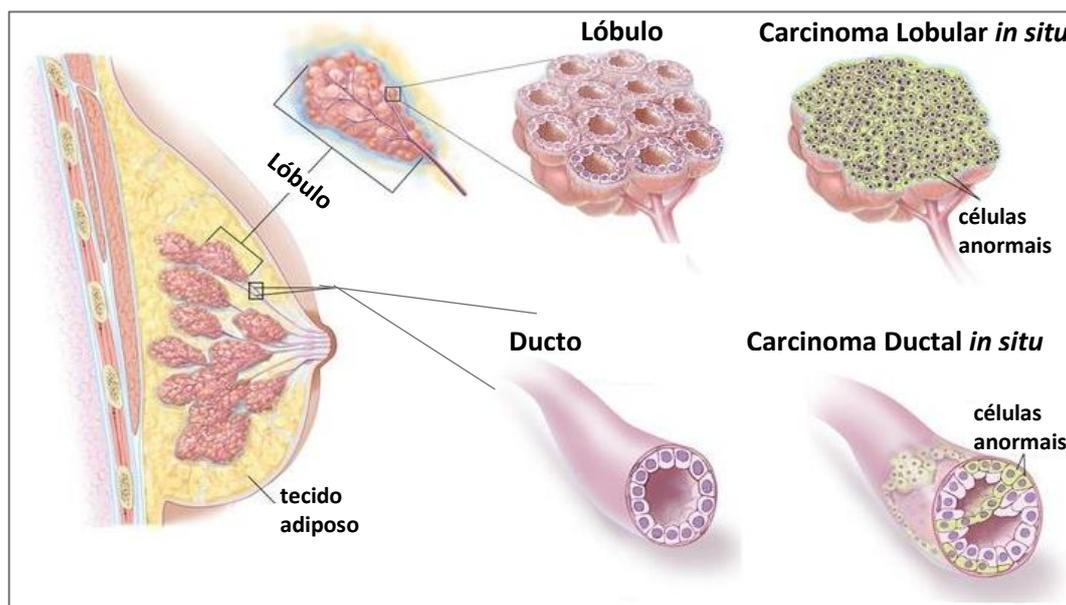


Figura 7. Tipos mais frequentes de carcinoma mamário humano. Adaptado de (National Cancer Institute - NCI, 2019). A proliferação descontrolada das células que revestem os lóbulos e ductos mamários ocasionam um bloqueio desses canais e induzindo a disfunção nesses órgãos.

O deslocamento das células cancerosas para outras partes do corpo depende do potencial metastático e do nível de agressividade do tumor original ou primário. Cerca de 90% dos carcinomas invasivos são de origem ductal e, nos casos de metástases, haverá deslocamento via corrente sanguínea ou vasos linfáticos principalmente para os ossos, pulmões, cérebro e fígado (Jin, 2015; ACS, 2019). Por se tratar de uma doença extremamente complexa e heterogênea nas características inter e intratumoral, o nível de malignidade depende da quantidade e da condição de hormônios e promotores de crescimento que influenciam o desenvolvimento da neoplasia. Existem dois principais biomarcadores que definem os três principais subtipos tumorais: receptores hormonais para estrógeno (ER) e/ou progesterona (PR) e receptores do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2/neu ou ERBB2) com expressão aumentada. O resultado (positivo ou negativo) do teste para esses marcadores, associado a outros parâmetros clínicos como presença de células no linfonodo e grau de estadiamento

tumoral, são aspectos fundamentais no diagnóstico, prognóstico e na escolha da terapia mais promissora para cada paciente. Resumidamente, tumores positivos para os hormônios estrógeno e/ou progesterona e negativos para superexpressão de HER2/neu – os denominados “hormônio-positivos”, são tratados com bloqueadores deste receptor, como o tamoxifeno, e devem receber quimioterapia adjuvante somente nos casos de maior agressividade. Já os tumores com superexpressão de HER2/neu respondem a tratamento com anticorpos monoclonais e podem receber bloqueadores hormonais se forem positivos para este biomarcador, além da quimioterapia clássica. Finalmente, há tumores negativos para os receptores de estrógeno, progesterona e para HER2/neu, o denominado ‘triplo-negativo’, que é o subtipo de câncer de mama com o pior prognóstico, maior potencial metastático, e maior limitação terapêutica, uma vez que as células cancerosas não dependem dos hormônios sexuais femininos ou do fator de crescimento epidérmico humano para proliferarem (Vuong *et al*, 2014; Jin, 2015; Makki, 2015; Kim *et al*, 2017; Sun *et al*, 2017; ACS, 2019; Waks & Winer, 2019). Esse subtipo representa 10-15% de todos os casos de câncer de mama, e acomete com maior frequência mulheres mais jovens (abaixo de 50 anos), afro-americanas ou hispânicas, e/ou pessoas com mutação para o gene BRCA1. O câncer de mama pode se manifestar antes que os sintomas sejam aparentes, por isso é de suma importância a frequência de exames de imagem como ecografias de mama e/ou mamografias, em especial para mulheres menos jovens (a partir dos 40 anos de idade), para evitar um diagnóstico tardio e conseqüentemente a dificuldade de tratamento e possível cura da doença (ACS, 2019).

1.3.2. Câncer de ovário

No sistema reprodutor feminino, os ovários compreendem um par de glândulas que produzem os hormônios sexuais que atuam no ciclo menstrual, estrógeno e progesterona, e as células reprodutivas femininas, os óvulos (Gibson & Mahdy, 2019). Os fatores ligados à evolução da neoplasia maligna nesse órgão relacionam-se com o contexto reprodutivo da mulher, mas ainda não foram devidamente elucidados. O câncer de ovário é uma doença altamente heterogênea, em decorrência dos diversos subtipos histológicos, da variedade de perfis genéticos e moleculares, e do comportamento biológico dos tumores. Os subtipos de neoplasias que surgem no ovário mantêm relação com os tipos de células presentes no sítio primário no qual o tumor se desenvolve. Assim, as três principais neoplasias do ovário são as de células epiteliais, de células germinativas e de

células estromais do cordão sexual (Mutalonis *et al*, 2016; Kossai *et al*, 2018; Stewart *et al*, 2019) (Figura 8)

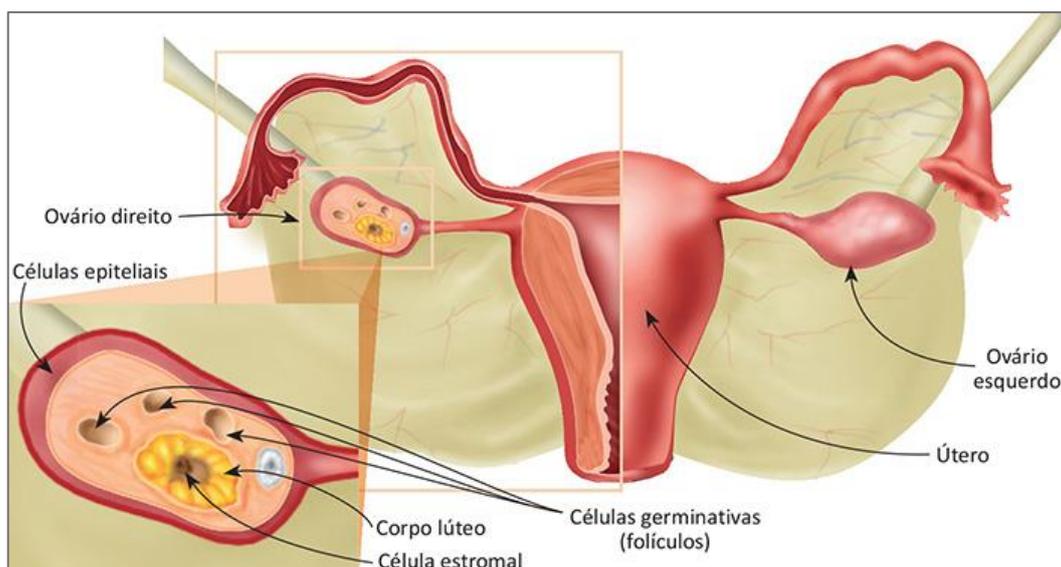


Figura 8. As três classes principais de células ovarianas das quais se originam as neoplasias malignas. Fonte: Maluf, 2018. Os ovários são duas glândulas situadas na cavidade pélvica, de ambos os lados do útero, logo abaixo das tubas uterinas. Mutações nos diferentes tipos celulares que compõem esse órgão, originam as principais neoplasias de ovário (células epiteliais, células germinativas e células estromais do cordão sexual).

A quase totalidade das neoplasias ovarianas (cerca de 90-95%) é decorrente de células epiteliais, que se subdividem nos tipos I, II e III (Mutalonis *et al*, 2016; Stewart *et al*, 2019). Carcinomas de ovário do tipo I são caracterizados por mutações que ocorrem em genes ligados à proliferação celular, tais como KRAS, BRAF e BCL2. Esses tipos tumorais são os serosos de baixo grau, endometrióide, de células claras e mucinosos. Carcinomas dos tipos II e III (serosos e endometrióides de alto grau, e mülleriano maligno) apresentam alta instabilidade genética, possuindo pior prognóstico e maior potencial de malignidade e invasão, quando comparado àqueles do tipo I. Correspondem a 70 – 80% de todos os casos de carcinoma de ovário e geralmente apresentam mutações em BRCA1/BRCA2 e p53 (Kossai *et al*, 2018; ACS, 2019).

Os receptores hormonais para estrógeno (ER) e/ou progesterona (PR) e receptores do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2/neu), biomarcadores já bem definidos prognóstico e preditivos para o tratamento no câncer de mama, são ainda pouco compreendidos nas neoplasias de ovário. Estudos evidenciam que a expressão dos receptores hormonais (ER e PR) é específica para cada subtipo histológico e está aumentada sobretudo em carcinomas de ovário serosos de alto grau e endometrióides, e de forma oposta, diminuída nos subtipos mucinosos e de célula clara. Elevados níveis de receptores de estrógeno (ER⁺) foram relacionados com a progressão, reincidência tumoral

e metástase em alguns tipos de câncer epitelial de ovário. Em contraste, a expressão de receptores de progesterona (PR⁺) tem sido associadas como bom biomarcador prognóstico (Voutsadakis, 2016; Chen *et al*, 2017). A expressão do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2/neu) é baixa em células epiteliais não-cancerosas de ovário. De forma oposta, a positividade para a superexpressão de HER2 foi vinculada ao pior prognóstico e menor taxa de sobrevida em pacientes com tumor de ovário nos diversos subtipos relacionados ao epitélio (Luo *et al*, 2018; Ndukwe *et al*, 2018).

A maioria dos diagnósticos de câncer de ovário é feito quando o tumor já está em estágios avançados, isso porque os estágios iniciais da neoplasia geralmente não assintomáticas. Destaque-se que a doença pode ser identificada mediante marcadores tumorais para a proteína CA-125 e também para elevados níveis de receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR), bem como as ecografias pélvica e transvaginal (Rooth, 2013; Stewart *et al*, 2019).

1.4. Terapêuticas convencionais e suas limitações nos cânceres de mama e ovário

As decisões sobre os protocolos terapêuticos para o câncer, incluindo a cirurgia, radioterapia, e fármacos antineoplásicos, irão considerar fatores tais como o tipo tumoral, localização, nível de estadiamento da doença no organismo, além da condição de saúde e idade do paciente (Jackson & Chester, 2015). As modalidades terapêuticas comumente empregadas para os cânceres de mama e ovário consistem em combinação de tratamentos loco-regionais e sistêmicos. A primeira opção consiste de cirurgias para remoção do tecido tumoral e radioterapia, que são sobretudo opções para os tipos de tumor menos agressivos e que não invadiram tecidos adjacentes. Dentro da modalidade de tratamentos sistêmicos estão a hormonioterapia, imunoterapia, terapia alvo, bem como a quimioterapia. Protocolos de quimioterapia são particularmente úteis para subtipos de tumores em estágios mais avançados ou com assinaturas genéticas de maior agressividade ou, ainda, para minimizar as chances de metástase e recidiva do tumor (Rooth, 2013; ACS, 2019; Waks & Winer, 2019).

O principal objetivo dos tratamentos, combinados ou não, é maximizar o controle do desenvolvimento tumoral, aliviar os sintomas, e aumentar a sobrevida do paciente pelo maior período possível. Com os avanços na compreensão da biologia tumoral, principalmente via biomarcadores para análise de agressividade e direcionamento terapêutico, houve grande avanço na relação risco-benefício dos tratamentos do câncer

(apesar do alto custo dos novos fármacos) e melhora na sobrevivência dos pacientes (de Zugazagoitia *et al*, 2016; Castro Sant' Anna *et al*, 2018). No entanto, o manejo padrão dos cânceres de mama e ovário em estágio avançado da doença, consiste de protocolos de quimioterapia baseados em derivados de platina (cisplatina ou carboplatina) e um taxano (paclitaxel ou docetaxel), que ainda causam efeitos extremamente negativos na qualidade de vida e autoestima da mulher (ACS, 2019; Stewart *et al*, 2019; Waks & Winer, 2019).

1.4.1. Paclitaxel

O agente antineoplásico paclitaxel é membro da classe dos taxanos, originalmente isolado e identificado em 1967 a partir da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*). Atualmente em seu formato semissintético (Taxol[®]), apresenta a fórmula química $C_{47}H_{51}NO_{14}$, peso molecular de 853.918 g/mol (Figura 9). Quanto ao principal mecanismo de ação, o paclitaxel liga-se à subunidade β -tubulina na superfície interna dos microtúbulos, e bloqueia a sua desmontagem. Como consequência, haverá prejuízo da reorganização de microtúbulos, interrompendo seletivamente as células na fase G2/M do ciclo celular e, conseqüentemente, ocorrerá morte por apoptose (Weaver, 2014; Alqahtani *et al*, 2019;).

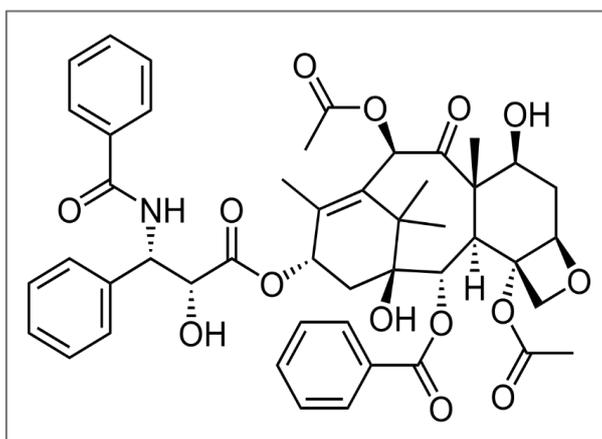


Figura 9. Representação da estrutura química do paclitaxel. Fonte: Chemical Book, 2017. O paclitaxel é constituído pela estrutura química $C_{47}H_{51}NO_{14}$.

O paclitaxel é um dos quimioterápicos mais utilizados no tratamento de vários tipos de cânceres. Pode ser empregado tanto em esquema adjuvante e neoadjuvante, sendo opções terapêuticas de primeira e segunda linhas em carcinomas de mama e ovário (Alqahtani *et al*, 2019). Apesar de ter sido demonstrada significativa redução de risco de morte com a inclusão do taxano em terapia combinada, uma das grandes limitações na

terapêutica sistêmica com paclitaxel contra os cânceres de forma geral é o aparecimento de efeitos adversos ocasionados pela alta toxicidade e baixa especificidade do quimioterápico. Por se tratar de uma terapia sistêmica, o paclitaxel age tanto nas células tumorais quanto nas células saudáveis do organismo, podendo causar vários efeitos adversos, tais como a perda de cabelo, náuseas, vômitos e diarreias, fadiga, perda de apetite e alterações no peso, leucopenia, neuropatia motora e sensorial, dentre muitos outros danos à qualidade de vida do paciente (ACS, 2019; INCA, 2020). Além disso, as características do câncer como o aumento na instabilidade genética e nas taxas de mutação, podem resultar no comprometimento da atividade quimioterápica, quando certa proporção de células tumorais apresenta resistência aos fármacos de eleição. A recidiva do tumor após o tratamento inicial, proveniente de células tumorais residuais, poderá evoluir para óbito da paciente devido à resistência à terapêutica antineoplásica (Weaver, 2014; Barbuti & Chen, 2015; Alqahtani *et al*, 2019).

Por essa razão, é imprescindível a busca de alternativas terapêuticas que sejam capazes de reduzir os fatores que comprometem o bom êxito dos tratamentos, e causam impacto negativo na progressão da doença e na qualidade de vida das pacientes.

1.5. O uso de microRNAs na Terapia Gênica

O crescente avanço e compreensão no campo do saber da biologia molecular permitiu o desenvolvimento de novas ferramentas e técnicas, como é o caso da terapia gênica, que consiste na introdução e/ou reposição de material genético dentro das células para compensar a atividade de genes anormais ou mutados que interferem na produção de produtos funcionais, como as proteínas por exemplo (Gonçalves & Paiva, 2017). A terapia gênica baseada em RNAs de interferência (RNAi) vem progressivamente se tornando alvo de estudos como alternativa para o tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer. Os RNAis são RNAs pequenos não codantes (*small non-coding RNAs* – sRNA), usualmente com 20 a 30 nucleotídeos, e que se classificam em duas principais categorias: siRNAs (*short interfering RNAs*) e microRNAs (ou miRNAs) (Carthew & Sontheimer, 2009).

A via de biossíntese de microRNAs em mamíferos (Figura 10) se inicia no núcleo da célula, originado pela atividade da RNA polimerase II (Pol II), que irá formar um transcrito primário de dupla fita em formato de grampo (“*hairpin*”) denominado o microRNA primário (pri-miRNA). O microRNA primário é clivado pelas enzimas Drosha e DGCR8 para a formação do RNA precursor (pre-miRNA), que será transportado

pela proteína exportina-5 para o citoplasma da célula, onde novamente será processado, mas agora, portanto, pela enzima Dicer em um complexo com as proteínas TRBP e PACT. Esse processamento resulta no duplex de microRNA com 18 a 25 nucleotídeos, que uma vez maduro, integra-se ao complexo RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), onde a fita *sense* (passageira) é removida e a fita *antisense* (guia) permanece ligada a este complexo de silenciamento. A fita guia, como o próprio nome indica, irá guiar o complexo RISC até RNAs-mensageiros (mRNA) alvos que possuam sequências complementares a esta fita na região 3'-UTR. A presença de RISC com a fita guia ligada ao RNAm alvo irá impedir a tradução desta mensagem e favorecer a sua degradação por ribonucleases (Carthew & Sontheimer, 2009; Titze-de-Almeida *et al*, 2017).

O conteúdo dos microRNAs expressos pela célula pode ser regulado por oligonucleotídeos exógenos. Imitadores sintéticos ou inibidores de microRNAs, *mimics* e *antimiR*, respectivamente, são moléculas exógenas que quando inseridas nas células, podem modular artificialmente para menos (*down-regulation*) ou para mais (*up-regulation*) o conteúdo de determinado microRNA, possibilitando ensaios para análise do papel do miRNA na condição em estudo ou o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Tan *et al*, 2018).

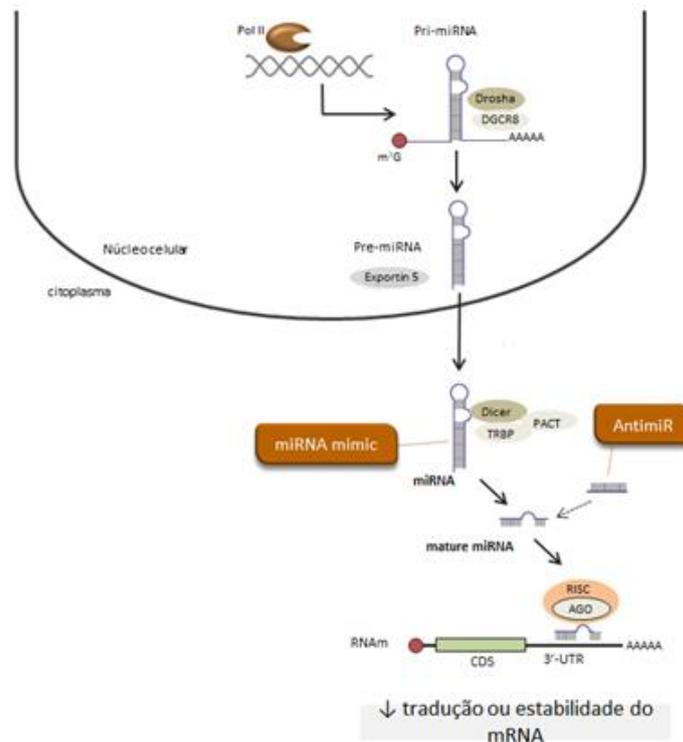


Figura 10. Modelo da biogênese dos microRNAs. Modelo da biogênese dos microRNAs. Adaptado de (Titze-de-Almeida *et al*, 2017). O microRNA primário (pri-miRNA) é formado no núcleo da célula pela transcrição de genes específicos pela enzima RNA polimerase II (Pol II). Será clivado pelas enzimas Drosha e DGCR8 para formação do precursor de microRNA (pre-miRNA). Após transportado para o citoplasma pela exportina 5, será novamente processado pela enzima Dicer e integrado ao complexo RISC. A fita guia do miRNA maduro irá reconhecer sequências complementares na região 3'-UTR de mRNAs-alvo, mantendo o complexo RISC ligado a estes RNAs. Desta forma haverá interferência de RNA mediante redução da tradução ou estabilidade do RNAm.

1.5.1. O microRNA 7 e o câncer

Em seres humanos, são conhecidos mais de 2000 diferentes microRNAs, havendo estimativa de que regulem cerca de 60% dos genes envolvidos nas mais diversas vias biológicas (Shu *et al*, 2017). Destaque-se que um único microRNA pode regular centenas de transcritos, e cada transcrito pode ter sítios de ligação para múltiplos microRNAs. Por essa razão, microRNAs têm emergido como importantes componentes no processo de carcinogênese e, dependendo do tipo de câncer, podem atuar como oncogenes ou supressores de tumor, a exemplo do microRNA 7 (miR-7) (Zhao *et al*, 2015).

A expressão aberrante de miR-7 tem sido associada com a agressividade e metástase em diversos tipos tumorais, incluindo cânceres de mama e ovário. Estudos mostram que o aumento do conteúdo de miR-7 em células que naturalmente apresentam baixa expressão basal de miR-7, como é o caso da linhagem tumoral de mama triplo-negativa MDA-MB-231, reduz a agressividade tumoral mediante supressão da angiogênese, invasão e motilidade celular (Cui *et al*, 2017; Schlemmer, 2019).

Embora não haja consenso quanto aos diferentes mecanismos de ação e efeitos de miR-7 nos tumores de mama e ovário em termos de conteúdo alto ou baixo, sabe-se que esse microRNA regula RNAs ligados a processos de proliferação, diferenciação, migração, metabolismo, resposta ao estresse celular, interação célula-célula e apoptose em vários tipos de cânceres (Cui *et al*, 2017; Flores *et al*, 2017) (Figura 11). Ademais, a reposição de miR-7 mediante imitadores sintéticos (miRNA *mimics*) foi capaz de sensibilizar células cancerosas à ação de quimioterápicos derivados de platina e taxanos (Vera, 2017; Schlemmer, 2019;)

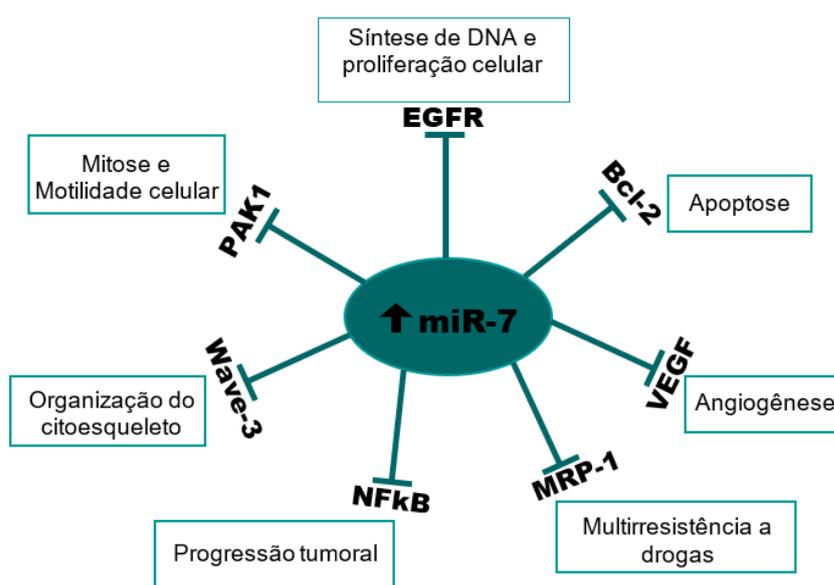


Figura 11. Alvos de miR-7 em diferentes tipos tumorais. Dados obtidos de (Swiercz *et al*, 2015; Zhao *et al*, 2015; Bi *et al*, 2017; Xia, *et al*, 2018). O aumento de conteúdo de miR-7 nas células tumorais, irá silenciar diversos alvos relacionados a vias de proliferação, motilidade e organização celular. O conteúdo de miR-7 no microambiente também regula a atividade de proteínas envolvidas nos processos de angiogênese, apoptose e progressão tumoral.

Muitos estudos também têm reportado o microRNA-7 como biomarcador prognóstico com base no seu perfil de expressão intratumoral e na sua correlação com proteínas relacionadas com o estágio, grau e sobrevida dos pacientes (Cui *et al*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama subtipo triplo-negativo é a forma mais agressiva de apresentação desta doença e com limitadas opções terapêuticas, já que não responderá aos inibidores hormonais, como o tamoxifeno e os inibidores de aromatase, bem como a terapias com anticorpos para HER2, uma vez que as células não expressam estes receptores. Já o carcinoma de ovário, apesar de pouco incidente, é o câncer ginecológico com maior índice de mortalidade no mundo; se faz necessária, portanto, a busca de novas abordagens terapêuticas que sejam mais efetivas e seletivas para células cancerosas ovarianas. Apesar de já existirem muitos quimioterápicos disponíveis, ainda há diversos fatores limitantes para o tratamento desses tipos tumorais, incluindo os efeitos adversos que prejudicam a qualidade de vida do paciente, a resistência adquirida a estes fármacos, e a recorrência tumoral. Neste sentido, estudos experimentais mostram que microRNAs são alternativa terapêutica promissora para potencialização de quimioterápicos, em particular para tumores avançados e metastáticos.

Em síntese, informações anteriormente publicadas e estudos prévios do grupo têm mostrado que miR-7 é alvo promissor em diferentes modelos experimentais. A motivação do presente estudo foi examinar se a reposição do conteúdo deste microRNA, mediante oligonucleotídeos imitadores deste alvo – miR-7 *mimics*, poderia sensibilizar células cancerosas à ação do paclitaxel, quimioterápico já consolidado para tumores de mama triplo-negativos e de ovário. As descobertas do presente trabalho podem revelar um alvo biotecnológico promissor no combate a células cancerosas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar se imitadores sintéticos de miR-7 (*miR-7 mimics*) potencializam efeitos do paclitaxel sobre células tumorais de mama MDA-MB-231 e de ovário A2780 *in vitro*, quanto aos fenótipos de viabilidade celular, apoptose e estresse oxidativo.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar efeitos da reposição de miR-7 via *miR-7 mimics*, em uso isolado ou em associação a paclitaxel no mesmo ponto temporal, sobre a viabilidade das células de câncer de mama e examinar, sob as mesmas condições, a viabilidade de células de carcinoma de ovário em estudo;

- b) Analisar se o aumento do conteúdo de miR-7 via *miR-7 mimics* potencializa os efeitos do paclitaxel sobre a morfologia de células de câncer mamário e ovariano;

- c) Identificar o tipo de morte celular induzida pelo tratamento combinado de paclitaxel e de *miR-7 mimics* em células de câncer de mama e de ovário das linhagens examinadas;

- d) Avaliar se o tratamento com paclitaxel combinado a *miR-7 mimics* altera a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células de câncer de mama e ovário em análise.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento Experimental

Os experimentos realizados neste projeto representam a continuidade dos trabalhos do grupo sobre o uso de imitadores de miR-7 para potencialização dos efeitos do paclitaxel no câncer de mama (Schlemmer, 2019) com duas alterações importantes. A primeira delas foi testar os efeitos dos compostos adicionados aos modelos de câncer no mesmo ponto temporal, visando facilitar o futuro procedimento de administração dos mesmos. A segunda diferença foi a inclusão da linhagem de câncer de ovário para examinar se os efeitos obtidos com câncer de mama poderiam ser estendidos para outro tipo tumoral, o que ampliaria o alcance do futuro produto. Quanto ao câncer de mama, optou-se por trabalhar somente com a linhagem de maior potencial invasivo e triplo-negativa (MDA-MB-231), que representa o subtipo tumoral com maior limitação terapêutica. Os experimentos com as linhagens de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e de ovário, A2780, descritos resumidamente no diagrama da Figura 12, foram realizados de acordo com padronizações de tratamento (doses, tempo e concentrações) definidas no trabalho prévio de Schlemmer (2019).

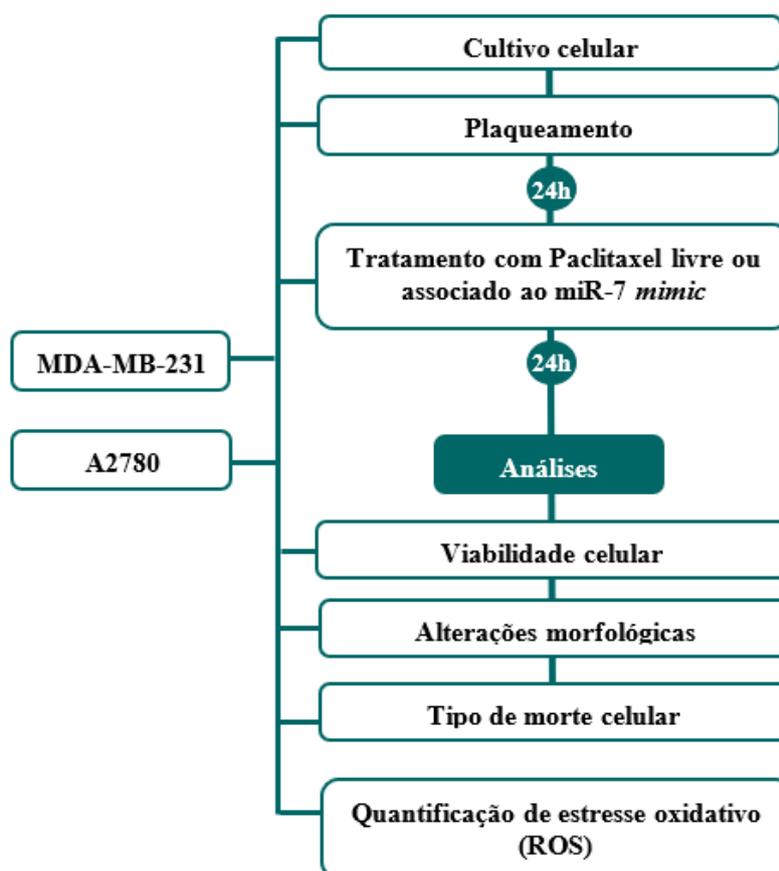


Figura 12. Diagrama esquemático do delineamento experimental com as linhagens celulares MDA-MB-231 e A2780.

4.2. Reagentes e Equipamentos

O presente estudo utilizou linhagens celulares oriundas de dois tipos tumorais, câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231, célula epitelial ductal), e câncer de ovário do tipo endometrióide (A2780, célula epitelial). Foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cedidas pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília. Morfologia celular apresenta-se abaixo, na Figura 13.

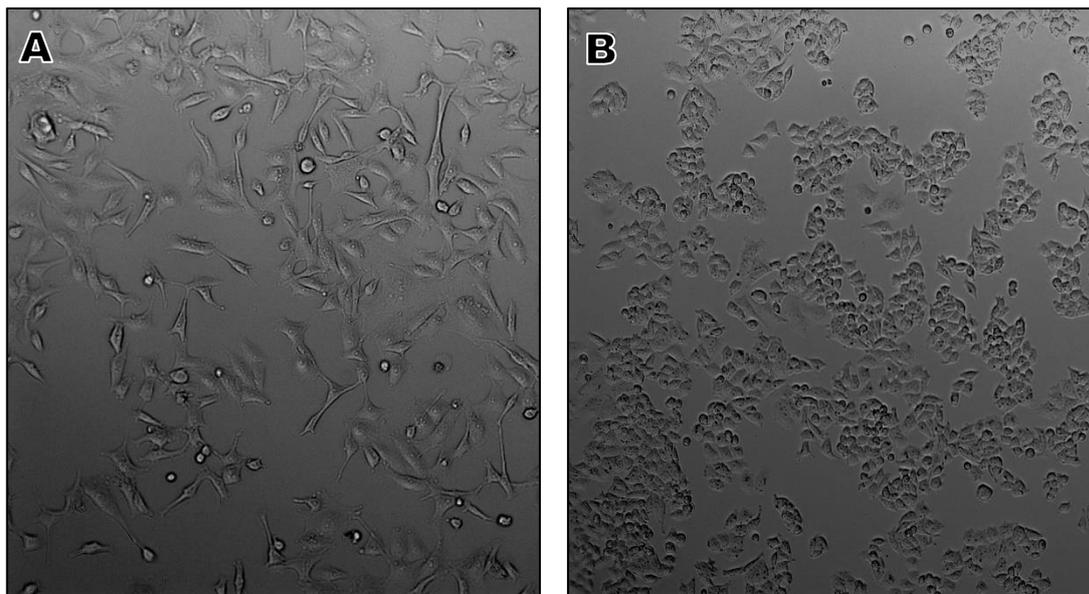


Figura 13. Morfologia característica das linhagens celulares utilizadas no estudo. A) Linhagem celular de carcinoma de mama (MDA-MB-231); B) Linhagem celular de carcinoma de ovário (A2780). Imagens capturadas por meio de microscópio óptico de luz com aumento de 10x.

Para leitura de absorvância e de fluorescência, foi utilizado o equipamento Spectramax M3, com os dados analisados pelo programa SoftMax Pro 6, ambos da Molecular Devices, LLC, EUA. As micrografias das linhagens celulares para análise morfológica foram realizadas pelo microscópio de luz Axiovert 100 e as imagens foram capturadas com o auxílio do software AxioVision 100 – ambos da Zeiss, Alemanha. Utilizou-se o microscópio óptico invertido Axio Vert. A1, Zeiss, para acompanhamento da taxa de crescimento das células durante cultivo celular. O citômetro de fluxo utilizado foi FACSCalibur, BD Biosciences, Inc., San Jose, CA, sendo a análise dos dados realizada via programa FlowJo v.10.0.7. Análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 6, GraphPadSoftware, Inc.

Os reagentes utilizados para a realização desse projeto seguem listados abaixo.

Tabela 1 – Lista de materiais utilizados nos experimentos.

FABRICANTE	MATERIAIS
ACCORD FARMACÊUTICA LTDA.	Paclitaxel de solução injetável (6 mg/mL)
GIBCO, EUA	<i>RPMI Media 1640</i> (RPMI); Soro Fetal Bovino (SFB); Tripsina 0,25% em EDTA
INVITROGEN, LIFE TECHNOLOGIES BY THERMO FISHER, EUA	CellROX Green Reagent; Anexina V conjugado com Alexa Fluor 488; DAPI; Opti-MEM; ProLong Gold Antifade
LABORCLIN, BRASIL	Tampão fosfato salino (PBS)
MOLECULAR PROBES, EUA	MTT; Iodeto de Propídeo
POLYPLUS-TRANSFECTION®	INTERFERin
QIAGEN	Negative Control miRCURY LNA miRNA mimic
RIBOXX	CONmiR mimic mmu-miR-7a-5p
SIGMA-ALDRICH, EUA	Azul de tripan; DCFH-DA; DMSO; <i>Leibovitz</i> - L15; Solução Antibiótica (penicilina e estreptomicina)

4.3. Cultivo Celular

O cultivo celular foi realizado segundo instruções da ATCC (*American Type Culture Collection*). As células de carcinoma de ovário (A2780) foram mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com HEPES (10 mM), D-glicose (2,5 g/L), bicarbonato de sódio (2 g/L); piruvato de sódio (1 mM); 10% de SFB inativado, e 1% de solução de penicilina e estreptomicina, em estufa com atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. As células de carcinoma de mama (MDA-MB-231) foram cultivadas com L-15 (*Leibovitz*) suplementado com 10% de SFB inativado e 1% de solução de penicilina e estreptomicina em estufa com atmosfera úmida a 37° na ausência de CO₂.

Para o acompanhamento da taxa de crescimento, as células foram visualizadas em microscópio óptico invertido. Cultivos celulares com mais de 70% de confluência foram submetidos a passagens para realização dos experimentos. Assim, os frascos (25cm² ou 75cm²) com cultivo celular foram lavados duas vezes com PBS 1x, e as passagens das células realizadas por meio da ação proteolítica de solução 0,25% de tripsina-EDTA com incubação entre 3 a 5 minutos a 37°C. A ação enzimática foi neutralizada pela

ressuspensão das células em meio de cultura com 10% de SFB, que em sequência foram transferidas para tubo falcon com posterior centrifugação a 1500 RPM por 3 minutos. A quantificação do número de células foi realizada mediante contagem direta em câmara de Neubauer, com auxílio do método de exclusão (células viáveis e inviáveis) pelo corante Azul de Tripán.

4.3.O quimioterápico paclitaxel (PTX)

O quimioterápico comercial paclitaxel (PTX) utilizado no presente estudo foi cedido pela farmácia do Hospital Universitário de Brasília (HUB). A partir da solução original apresentada em solução injetável em concentração de 7mM, foram feitas duas diluições seriadas de 1:100 no momento da utilização, em meio Opti-MEM, resultando em uma solução de trabalho na concentração de 700nM. Por fim, a solução de trabalho foi diluída em meio de cultura específico para cada linhagem, de maneira que a concentração final em cada poço fosse 100 nM.

4.4. Imitadores sintéticos de microRNA 7 (miR-7 mimics) e sequência controle

A transfecção dos *mimics* foi realizada após a aderência das células ao poço, conforme recomendações do fabricante do reagente de transfecção INTERFERin (Polyplus-transfection®). Trata-se de um polímero catiônico em solução hidroalcoólica, desenvolvido para oferecer alta eficiência de transfecção com baixas concentrações de miRNA. Os oligonucleotídeos utilizados foram: miR-7 *mimic* (CONmiR *mimic* mmu-miR-7a-5p, Riboxx) e *mimic* Controle Negativo - Scramble (Negative Control miRCURY LNA miRNA mimic, Qiagen) (Tabela 2). Os produtos liofilizados foram dissolvidos em água nuclease-free e aliquotados na concentração estoque de 10 µM.

Tabela 2– Imitadores sintéticos de miRNAs utilizados no estudo.

IMITADOR SINTÉTICO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DA FITA GUIA (GUIDE STRAND)
MMU-MIR-7A-5p*	5'-UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUG <u>CCCC</u> -3'***
SCRAMBLE	5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'

* A sequência de miR-7a-5p é idêntica em camundongos (mmu) e em seres humanos.

** Sublinhados os quatro nucleotídeos de citosina adicionados como parte da tecnologia do mimic.

4.5. Tratamento com o quimioterápico paclitaxel livre ou em associação a miR-7 mimics

O tratamento das células com 100nM de paclitaxel ocorreu de forma isolada ou combinada com a transfecção de 10nM de imitadores sintéticos de microRNAs (*mimics*) 24 horas após o plaqueamento, seguidas as condições experimentais detalhadas na tabela 3.

Para os ensaios realizados em placas de 96 poços, os microRNAs *mimics* foram diluídos em 50 µL de meio Opti-MEM (Gibco) e acrescidos 0,5 µL de INTERFERin para a formação do complexo de transfecção. Para reduzir a variabilidade intra-ensaio, preparou-se uma mesma mistura para todos os poços. Este complexo de transfecção foi homogeneizado em vórtex por 10 segundos e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Durante a incubação, o conteúdo dos poços foi substituído por 100 µL de solução de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (SFB) pré-aquecido a 37°C, com o quimioterápico paclitaxel diluído conforme item 4.4. Posteriormente, 50 µL do complexo de transfecção foram acrescidos aos grupos que receberam miRNAs *mimics* ou 50 µL de Opti-MEM adicionados aos poços dos grupos não transfectados, totalizando um volume final de 150 µL por poço.

Para ensaios de análise morfológica, tipo de morte celular e quantificação de espécies reativas de oxigênio por CellROX Green Reagent, realizados em placas de 12 poços, foi seguido o mesmo protocolo descrito acima, ajustando-se os volumes para 150 µL de Opti-MEM e 3 µL de INTERFERin por poço. O conteúdo dos poços foi substituído por uma solução de 650 µL de meio pré-aquecido (37°C) com o quimioterápico paclitaxel na diluição citada, e acrescidos posteriormente 150 µL do complexo de transfecção ou apenas Opti-MEM nos grupos controle, resultando em um volume final de 800 µL por poço, mantendo-se a mesma concentração dos reagentes utilizada nos ensaios nas placas de 96 poços. Quanto aos ensaios realizados em placas de 24 poços, o volume final de cada poço foi de 401,5 µL, sendo 100 µL de Opti-MEM e 1,5 µL de INTERFERin por poço e 300 µL de solução de meio pré-aquecido (37°C) com o quimioterápico Paclitaxel.

Tabela 3–Grupos e condições experimentais dos ensaios de viabilidade celular com transfecção de miR-7.

GRUPO EXPERIMENTAL (SIGLA)	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS
CN	Células não tratadas, apenas com meio de cultura
RT	Meio de cultura + reagente de transfecção
PTX	Tratamento com Paclitaxel isolado (100 nM)
MIR-7	Transfecção com miR-7 <i>mimic</i> (10nM)
SCRB	Transfecção com mimic controle negativo - scramble (10 nM)
PTX + MIR-7	Tratamento com Paclitaxel (100 nM) + Transfecção com miR-7 <i>mimic</i> (10 nM)
PTX+ SCR B	Tratamento com Paclitaxel (100 nM) + Transfecção com mimic scramble (10 nM)

4.6. Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). O método é baseado na ação de desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas, que irão reduzir os sais de tetrazolium (cor amarela) a cristais de formazan (cor púrpura) (Vistica *et al*, 1991).

As linhagens celulares foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços em quantidade de 3×10^3 por poço. Após 24 horas, as células foram tratadas de acordo com os grupos experimentais descritos previamente na tabela 3. Transcorrido o tempo de tratamento, o conteúdo de cada poço foi substituído por uma solução 150 μ L de solução de meio de cultura contendo 0,5 mg/mL de MTT e mantido por 3h a 37 °C. O meio com MTT foi removido e 150 μ L de DMSO foram adicionados a cada poço, para solubilização dos cristais de formazan formados. A quantificação dos cristais formados foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M3), calibrado para leitura de absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Ensaios realizados em quadruplicatas, em pelo menos três experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos foram considerados proporcionais ao número de células viáveis em relação ao controle negativo (CN). As médias dos grupos transfectados foram normalizadas com o grupo tratado somente com meio de cultura + reagente de transfecção (RT), e convertidos para percentual. Foi

utilizado um controle de DMSO (branco) em poços sem células para descartar a possibilidade de interferência desse reagente na análise.

4.7. Análise morfológica das células por microscopia de luz

As análises qualitativas das alterações morfológicas nas linhagens MDA-MB-231 e A2780 ocasionadas pelas condições experimentais do tratamento com o quimioterápico paclitaxel, em uso isolado ou em associação a miR-7 *mimics*, foram realizadas por microscopia de luz (Microscópio Zeiss Axiovert 100) com magnificação de 10x e 20x, com imagens capturadas mediante software AxioVision (Zeiss). Para isso, 1×10^5 células foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços e, após sua adesão, foram tratadas por 24 horas para obtenção das imagens.

4.8. Caracterização de tipo de morte celular induzida pelos tratamentos

O tipo de morte induzido pelos tratamentos foi examinado mediante marcação das células tumorais de mama (MDA-MB-231) e ovário (A2780) com Anexina-V conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 488, e Iodeto de Propídio (PI). Essa técnica permite a discriminação e quantificação de subpopulações de células que sejam viáveis, que estejam em apoptose inicial ou tardia, ou, finalmente, necróticas. Tal classificação é possível devido à alta afinidade da proteína Anexina V à fosfatidilserina (fosfolípido presente na superfície externa da bicamada lipídica em células apoptóticas), bem como ao marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídio (PI), que distingue células apoptóticas daquelas necróticas.

Em quantidade de 1×10^5 células foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços. Após aderidas, as células receberam os tratamentos de 100nM do quimioterápico paclitaxel isolado ou em associação a 10nM de miR-7 *mimic* por 24h. Vinte minutos antes de completar as 24 horas de tratamento, o grupo controle de apoptose foi tratado com 20% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o grupo controle de necrose foi aquecido à 100°C por 10 minutos. Após isso, as células aderentes foram tripsinizadas com 200 μ L de tripsina-EDTA 0,25%. A ação enzimática foi neutralizada pela ressuspensão das células em 400 μ L de meio de cultura com 10% de SFB. Posteriormente, todas as células foram recolhidas e centrifugadas a 1800 RPM por 5 min a 4°C para a retirada do meio e formação do *pellet*, que foi lavado com PBS, e as células centrifugadas novamente nas mesmas condições. Os *pellets* foram ressuspensos em 100 μ L de tampão de ligação de Anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de $CaCl_2$, água destilada – pH 7,4)

contendo 3 μL de anexina-V por 15 min à temperatura ambiente, protegidos da luz. Após este período, foram adicionados 400 μL do tampão de ligação da Anexina-V, tubos mantidos no gelo, seguido da adição de 500 μL da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio – para concentração final de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O grupo controle de apoptose foi marcado somente com anexina-V e o grupo controle de necrose somente com PI. As células foram incubadas por mais 5 minutos no gelo, lavadas com PBS 1X e ressuspendidas em 500 μL de PBS 1X. Em sequência 10.000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur) nos canais FL-1 e FL-2 com o auxílio do software FlowJo. Alterações morfológicas das células foram avaliadas pelos parâmetros SSC (*Side Scatter*) e FSC (Forward Scatter) pelo mesmo software. Todas as análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes em triplicatas.

4.9. Análise da presença de espécies reativas de oxigênio (ROS)

4.9.1. Quantificação de ROS por DCFH-DA

Para este ensaio, utilizou-se o reagente DCFH-DA (Diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína) (Sigma), que é sonda não fluorescente permeável às células. Devido à clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação, forma-se o DCF (2', 7'-diclorodihidrofluoresceína) altamente fluorescente. O DCFH-DA é sensível para detecção de espécies reativas de oxigênio geradas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroperoxil (HOO^\bullet) e peroxinitrito (ONOO^-).

Neste ensaio, cada linhagem celular foi semeada em placas de poliestireno de 96 poços em uma quantidade de 5×10^3 por poço. Foram determinados sete grupos experimentais: controle negativo (células sem tratamento); controle positivo (células tratadas com H_2O_2 na concentração de 200 μM , aplicado no momento da leitura das placas); paclitaxel e miR-7 *mimics* em uso isolado por 1h e 24 horas, e paclitaxel associado a miR-7 *mimics* por 24 horas. O reagente em pó foi dissolvido em etanol PA obtendo-se solução estoque a 50 mM e, a partir desta, diluiu-se novamente para obter-se solução de uso a 2 mM, que foi aplicada nos poços dos grupos experimentais e incubada a 37°C (com ou sem atmosfera de CO_2) por trinta minutos antes da leitura das placas. A leitura de cada placa ocorreu em 1h e 24 horas após o tratamento em espectrofotômetro (SpectraMax M3), calibrado para espectro de fluorescência de emissão a 504 nm e de excitação a 590 nm. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas.

4.9.2. Quantificação de ROS por CellROX Green Reagent

O reagente CellROX Green é sonda permeável, fracamente fluorescente, que irá exibir uma alta fluorescência foto estável verde com espectro de absorção de 485 nm e emissão máxima de 520 nm quando estiver em seu estado reduzido por oxidação, em decorrência de espécies reativas de oxigênio (sobretudo radicais hidroxila e ânions superóxidos).

Nas análises por citometria de fluxo, 1×10^5 células foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços e, após adesão, foram tratadas por 24 horas de acordo com os grupos experimentais, controle negativo, tratamento com paclitaxel isolado, ou paclitaxel em associação a miR-7 *mimics*. Trinta minutos antes do término do tratamento, as células foram incubadas a 37°C com o reagente CellROX Green, que foi acrescido em cada poço em volume de 1,6 µL com a concentração final de 5µM, de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, a solução de cada poço foi recolhida e armazenada em *ependorfs*. Após serem lavadas por duas vezes com PBS 1X, as células foram tripsinizadas com 200 µL de tripsina-EDTA 0,25%, sendo a ação enzimática neutralizada pela ressuspensão das células em 400 µL de meio de cultura com 10% de SFB. As células foram recolhidas e centrifugadas duas vezes (1800 RPM por 5 minutos à temperatura ambiente) juntamente com a solução anteriormente armazenada. Os *pellets* foram ressuspensos em 500 µL de PBS 1X e 10.000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur) no canal FL-1. A quantificação do estresse oxidativo das células nos diferentes grupos experimentais foi determinada utilizando-se a mediana do histograma de FL-1 no software FlowJo. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes em monoculturas.

4.10. Análise qualitativa de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por CellROX Green Reagent

Para visualizar qualitativamente as espécies reativas de oxigênio produzidas no núcleo e citoplasma celular, 7×10^4 células foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de poliestireno de 24 poços. Após a adesão, foram tratadas com Paclitaxel livre e associado ao miR-7 *mimics* por 24 horas. Trinta minutos antes do término do tratamento, as células foram incubadas a 37°C com o reagente CellROX Green, que foi acrescido em cada poço em um volume de 0,8 µL com a concentração de final de 5µM, em seguida, cada poço foi lavado duas vezes com PBS e as placas permaneceram no *shaker* (velocidade 3 e temperatura ambiente) num intervalo de cinco minutos. Em sequência, as

células foram fixadas com 300 μ L de formaldeído 3,7% por 15 minutos no shaker. Transcorrido o tempo, foram feitas três lavagens com PBS de forma gradual (3,5 e 7 minutos) e acrescidos 300 μ L de DAPI (300nM) para marcação do DNA celular por um tempo de sete minutos a temperatura ambiente. Novamente as células foram lavadas com PBS de forma gradual (3,5 e 7 minutos) e, por fim, as lâminas foram montadas com ProLong Gold Antifade (Invitrogen) e analisadas em Microscópio de Fluorescência Axiovert 100 nos filtros verde e azul com o auxílio do software AxioVision 100.

4.11. Análise estatística

Os dados foram previamente avaliados quanto à sua distribuição utilizando o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Todos os dados foram distribuídos normalmente e expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância one-way (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey ou Student's T-test, ou two-way (ANOVA) seguido de pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni, no programa estatístico *GraphPad Prism*® (versão 6.0). Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Teste dos efeitos dos tratamentos isolados com o quimioterápico paclitaxel (PTX) e com o imitador sintético de miR-7, sobre a viabilidade celular na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231

Como etapa de padronização inicial, paclitaxel e miR-7 *mimics* foram testados isoladamente. O tratamento com o paclitaxel promoveu a redução da viabilidade celular para 84,8%, corroborando resultados anteriormente obtidos pelo grupo (Figura 14). A transfecção de miR-7 *mimics* provocou a redução no percentual de células viáveis para 71,9%. O grupo transfectado com uma sequência aleatória de microRNAs (*scramble mimics*) apresentou resultado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle negativo (CN) (91,1%; $p < 0,05$). Entretanto, o uso de oligos com sequências direcionadas a miR-7 (*miR-7 mimics*) causou resultados significativamente mais expressivos que aqueles obtidos com sequências esdrúxulas (*scramble mimics*) (CN *versus* miR-7; $p < 0,001$), sugerindo que os efeitos sobre a viabilidade celular sejam alvo-dependente.

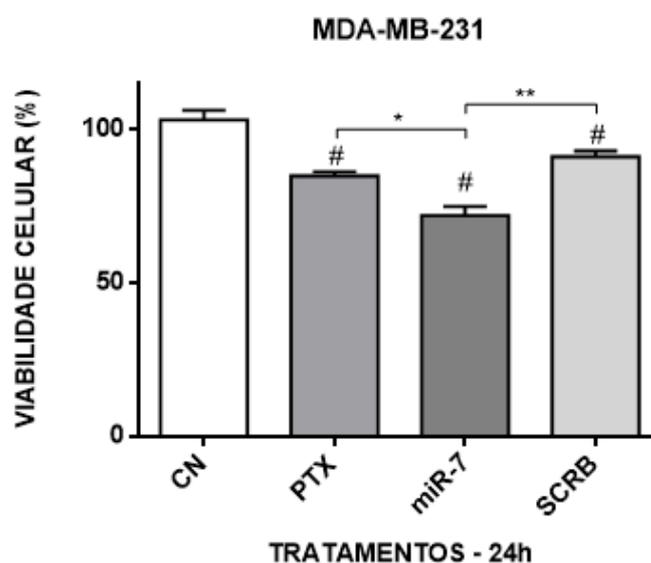


Figura 14. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231 após tratamentos isolados com o paclitaxel (100nM) e com transfecção de miR-7 mimic (10 nM). Avaliação da viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231 após tratamentos isolados com paclitaxel (100nM) e miR-7 mimic (10 nM). Os tratamentos separados com PTX, miR-7, e scramble (SCR) reduziram a viabilidade celular em relação ao grupo CN. Houve diferença significativa entre o grupo miR-7 e SCR. Três ensaios independentes, com quadruplicatas. Dados expressos como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.2. Efeito do imitador sintético de miR-7 em associação ao paclitaxel (PTX), ambos administrados no mesmo ponto temporal, sobre a viabilidade celular na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231

Os ensaios desta etapa experimental examinaram se o tratamento com miR-7 *mimics* poderia potencializar os efeitos causados pelo quimioterápico PTX sobre a viabilidade celular, ou seja, se a associação dos tratamentos seria mais efetiva que o uso isolado dos mesmos. Além do teste de potencialização do quimioterápico, o desenho experimental de uso simultâneo de ambos agentes foi planejado para oportunizar uma estratégia nanotecnológica para *delivery* de ambas moléculas e para otimizar a administração dos fármacos em uma futura abordagem clínica. No delineamento experimental utilizado em experimentos prévios pelo grupo (Schlemmer, 2019), o tratamento com paclitaxel (100nM) foi realizado 24 horas após a transfecção com miR-7 *mimic* (10 nM).

Os resultados obtidos demonstram semelhança nos valores do percentual de viabilidade celular nos diferentes delineamentos experimentais adotados (Tabela 4). Os dados gerados neste trabalho mostram que houve uma diferença de 15,8% entre os grupos PTX e PTX+miR-7, enquanto no trabalho de Schlemmer, essa diferença foi de 12,3%.

Tabela 4– Comparação de percentuais de viabilidade celular com desenhos experimentais diferentes de tratamento com a associação de miR-7 *mimic* e PTX.

GRUPO EXPERIMENTAL	PERCENTUAIS DE VIABILIDADE OBTIDOS NESTE TRABALHO	PERCENTUAIS DE VIABILIDADE OBTIDOS POR SCHLEMMER, 2019
PTX	85,0 %	85,6 %
PTX+miR-7	69,2 %	73,3 %
PTX+ SCRB	84,2 %	88 %

Os dados gerados neste trabalho mostraram que o tratamento com miR-7 *mimics* potencializou os efeitos do PTX sobre a viabilidade das células de tumor mamário MDA-MB-231. A associação entre paclitaxel e o imitador sintético de miR-7 (PTX+miR-7) causou redução da viabilidade celular para 69,2%, resultado significativamente superior ao obtido com o tratamento isolado com PTX, que foi de 85,0% (Figura 15). Ou seja, o uso da associação miR-7 *mimics* + PTX proporcionou um incremento de 15,8% no efeito causado por PTX, conforme citado acima.

Não houve diferença significativa entre os grupos PTX e PTX associado à sequência esdrúxula scramble (SCRB), que obtiveram respectivamente 85% e 84,2% de células viáveis, evidenciando que os efeitos de potencialização de PTX são dependentes da sequência nucleotídica de miR-7. Corroborando este racional de que miR-7 *mimics*, mas não a sequência scramble sensibiliza as células tumorais aos efeitos de PTX, observou-se efeito significativamente maior no grupo PTX+miR-7 (69,2%) em relação ao grupo PTX+SCRB (84,2%). Com base nos resultados e análises estatísticas, optou-se pelo prosseguimento dos ensaios sem o grupo PTX+SCRB.

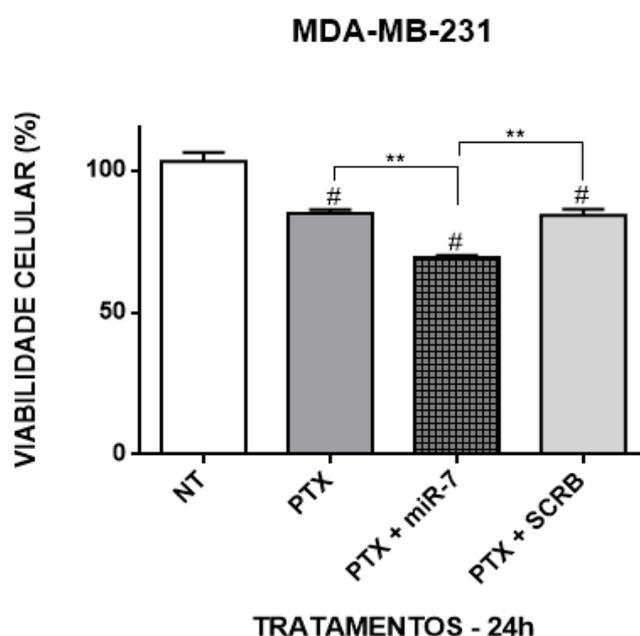


Figura 15. Avaliação da viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231 após associação simultânea de miR-7 ao paclitaxel. O tratamento em associação (PTX+miR-7) foi mais efetivo que tratamento isolado (PTX). A inexistência de diferença significativa entre PTX e PTX + SCRB bem como a diferença significativa entre os valores de PTX+miR-7 e PTX+SCRB mostram que a ação de miR-7 sobre a viabilidade celular foi alvo-dependente. Três ensaios independentes, com quadruplicatas. Dados expressos como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (** $p < 0,01$).

5.3. Teste dos efeitos dos tratamentos isolados com o quimioterápico paclitaxel (PTX) e com o imitador sintético de miR-7, sobre a viabilidade celular na linhagem de câncer de ovário A2780

Os ensaios desta etapa examinaram efeitos de miR-7 *mimic* e paclitaxel sobre células tumorais da linhagem A2780, avaliando a viabilidade celular pelo método de

MTT. Para padronização de experimentos, foram seguidos as mesmas concentrações e tempo de tratamento adotados nos ensaios com células de câncer de mama.

A linhagem A2780 se mostrou altamente sensível ao tratamento com paclitaxel a 100nM, que causou redução da viabilidade celular para 44,5% (Figura 16). A transfecção com miR-7 *mimic*, isoladamente, reduziu a viabilidade das células de câncer de ovário para 75%, resultado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle negativo (CN) e ao grupo transfectado com uma sequência aleatória *mimic* scramble (92,6%). Tais resultados sugerem que o efeito do oligonucleotídeo foi alvo-dependente, corroborando os dados obtidos com a célula de câncer de mama MDA-MB-231. Neste mesmo sentido, a transfecção com *mimic* controle negativo (SCRB) não apresentou efeito significativo na redução da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle negativo (CN). Ao contrário da linhagem de câncer de mama, o tratamento com paclitaxel causou efeitos superiores e significativos em relação ao miR-7 *mimics* nas células de câncer de ovário.

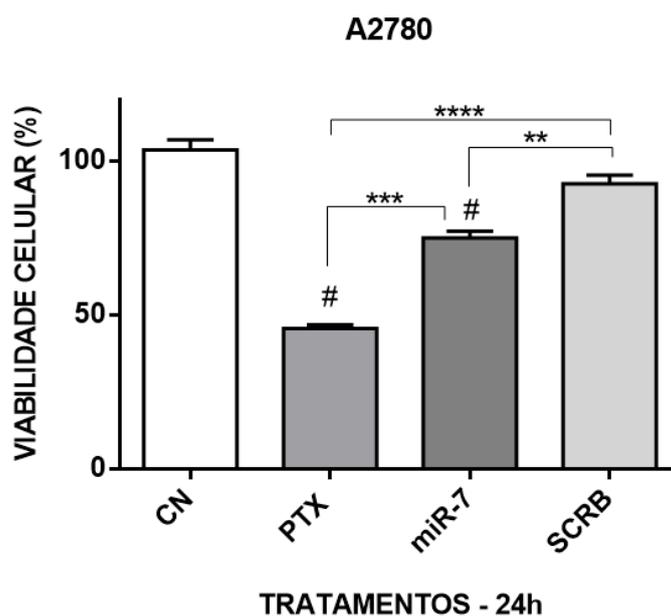


Figura 16. Avaliação da viabilidade celular em linhagem A2780 após tratamentos isolados com o paclitaxel (100nM) e com transfecção de miR-7 *mimic* (10 nM). Os tratamentos isolados de miR-7 e PTX reduziram a viabilidade celular em relação ao grupo CN. Houve diferença significativa entre o grupo miR-7 e SCR. Três ensaios independentes, com quadruplicatas. Dados expressos como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

5.4. Efeito do imitador sintético de miR-7 em associação ao paclitaxel sobre a viabilidade celular na linhagem de câncer de ovário A2780

A transfecção das células A2780 com miR-7 *mimics* potencializou os efeitos do quimioterápico paclitaxel (Figura 17). A associação PTX + miR-7 reduziu a viabilidade celular para 28,4%, efeito significativamente superior ao do paclitaxel isolado, que atingiu 42,9%. A transfecção com a sequência esdrúxula *mimic* scramble (SCRB) em associação a PTX causou certo efeito sobre a viabilidade celular, 37%, porém a diferença não foi significativa em relação ao uso de PTX isolado, o que evidencia que os efeitos de potencialização quando obtidos são alvo-dependentes. Neste mesmo sentido, os efeitos de PTX + miR-7 *mimics* (28,4%) foram significativamente superiores àqueles obtidos com PTX + scramble *mimics* (37%). Dessa forma, optou-se pelo prosseguimento dos ensaios sem o grupo PTX+SCRB.

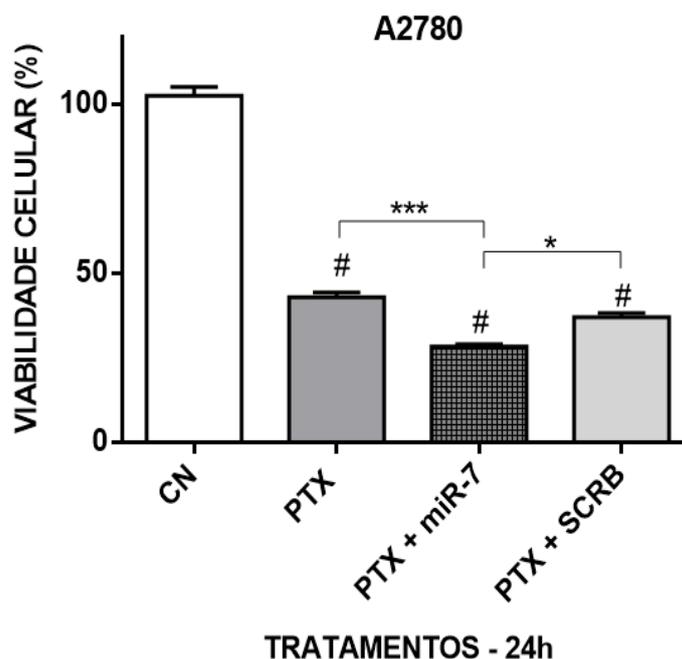


Figura 17. Avaliação da viabilidade celular em linhagem A2780 após associação simultânea de miR-7 ao paclitaxel. O tratamento em associação (PTX+miR-7) foi mais efetivo que tratamento isolado (PTX). A inexistência de efeitos significativos entre PTX e PTX + SCR assim como a diferença significativa entre PTX+miR-7 e PTX+SCR mostram que a ação de miR-7 sobre a viabilidade celular foi alvo-dependente. Três ensaios independentes, com quadruplicatas. Dados expressos como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

5.5. Alterações morfológicas em células da linhagem MDA-MB-231 expostas à associação de miR-7 *mimics* e paclitaxel

A análise da morfologia das células, realizada mediante microscopia de luz, evidenciou alterações na linhagem de câncer mamário após tratamento com paclitaxel em uso isolado ou em associação a miR-7 *mimics*.

Na linhagem MDA-MB-231, as células do controle negativo (CN) apresentaram característica típica da linhagem em transição epitélio-mesenquimal, com formato mais fusiforme (Figura 18 A; D). O paclitaxel em uso isolado causou alterações morfológicas proeminentes, incluindo arredondamento das células com perda do fenótipo afunilado nas extremidades, formação de vacúolos celulares, e aumento da granulosidade (Figura 18 B; E). Além das alterações vistas no tratamento isolado, a associação de paclitaxel com miR-7 *mimics* (PTX+miR-7) induziu maior perda dos pontos de adesão focal, bem como alterações morfológicas significativas na superfície das membranas plasmáticas, com aspecto mais rugoso/esponjoso, sugerindo perda de estabilidade destas membranas (Figura 18 C; F)

Os resultados promissores de microscopia motivaram ensaios complementares mediante citometria de fluxo (FACSCalibur). Foram identificadas alterações nos padrões de volume celular e na complexidade interna da célula, representados pelos parâmetros FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*), respectivamente. O grupo dos tratamentos combinados, PTX+miR-7, causou proeminente deslocamento para cima (*up*) no eixo Y quando comparado ao grupo do quimioterápico isolado (PTX) e, sobretudo, quando comparado ao grupo controle (CN). Tal mudança representa alterações na forma nuclear, granulosidade citoplasmática e rugosidade da membrana plasmática (Figura 19).

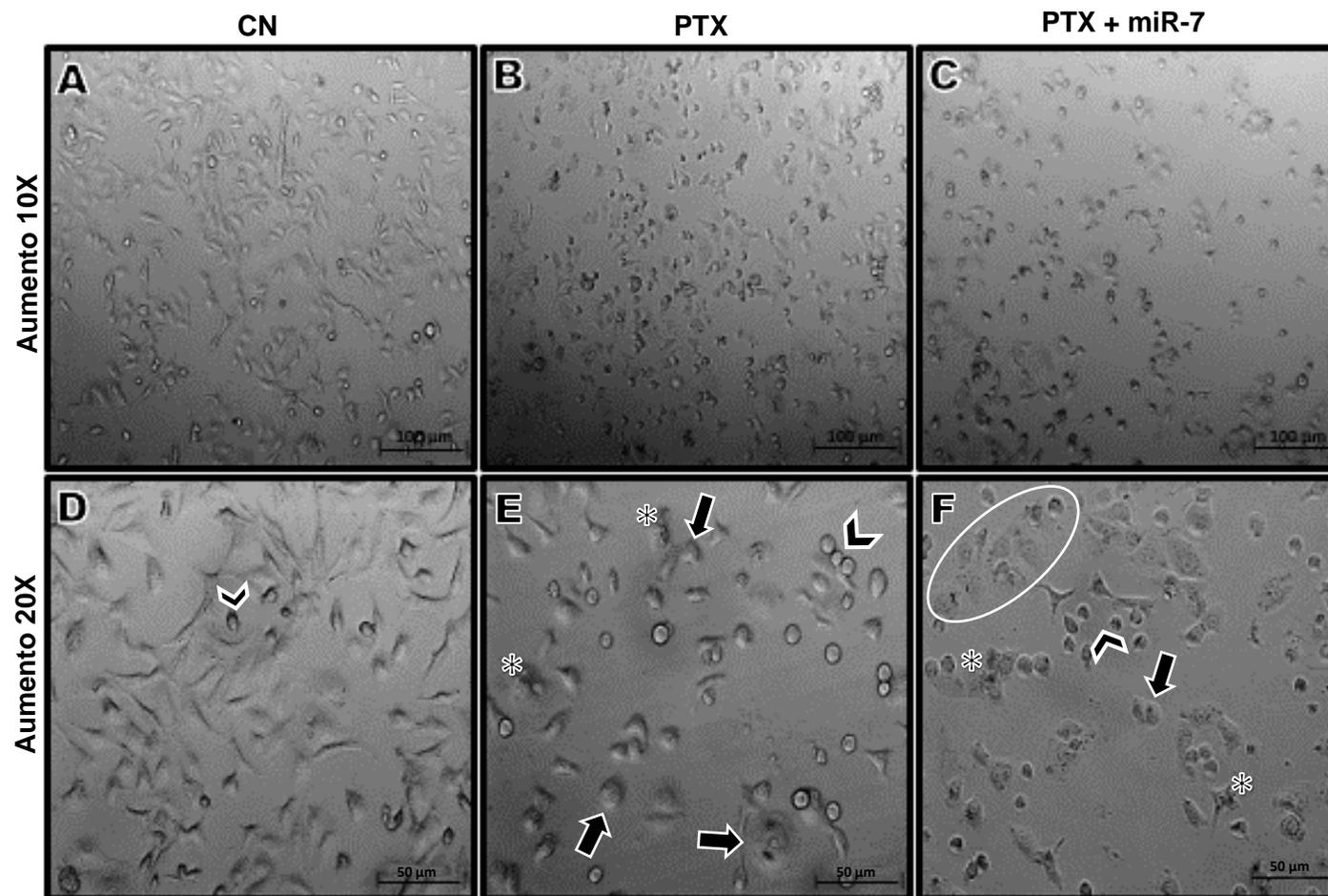


Figura 18. Alterações morfológicas na linhagem MDA-MB-231 pela terapia combinada do paclitaxel e miR-7 *mimic*. (A e D) células do grupo controle negativo (CN) com morfologia fusiforme característica da linhagem. (B e E) alterações morfológicas provenientes do tratamento com Paclitaxel livre. (C e F) alterações morfológicas causadas pela terapia associada Paclitaxel com miR-7 *mimic*. **Legenda:** células com morfologia arredondada (seta); células em suspensão (cabeça de seta); alterações morfológicas proeminentes na superfície das membranas plasmáticas (elipse); formação de vacúolos celulares (asterisco). Micrografias feitas em microscópio óptico de luz AxioVert 100. Aumento 10x, barra de referência 100 μm . Aumento 20x, barra de referência 50 μm .

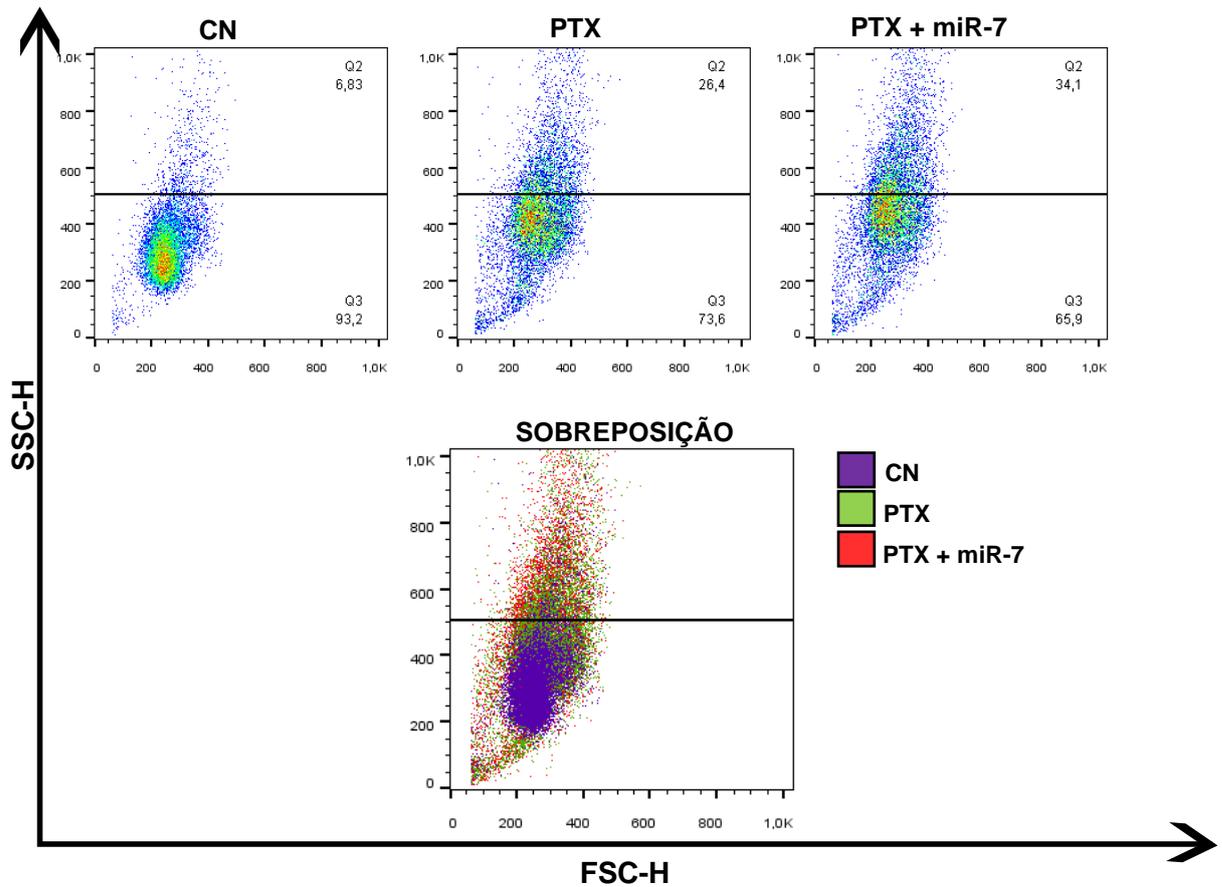


Figura 19. Alterações nos padrões de morfologia SSC/FSC na linhagem MDA-MB-231 induzidas terapia combinada do paclitaxel e miR-7 *mimic*. O tratamento livre (PTX) e associado (PTX+miR-7) induziu alterações morfológicas na população de células MDA-MB-231. Análise realizada por citometria de fluxo (FACScalibur) utilizando os parâmetros SSC-H (granulosidade/complexidade citoplasmática) e FSC-H (tamanho/volume celular). Todos os dados foram normalizados com o controle (CN). Os dotplots correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes.

5.6. Alterações morfológicas em células da linhagem A2780 expostas à associação de miR-7 *mimics* e paclitaxel

Células da linhagem A2780 não-tratadas do grupo controle negativo (CN) apresentaram-se como células epiteliais de muitas junções intercelulares que crescem formando colônias (Figura 20 A; D). A exposição ao paclitaxel em uso isolado promoveu aumento no citoplasma celular, perda da morfologia poligonal, e consequente arredondamento das células. Formaram-se pequenos vacúolos celulares, havendo aumento da granulosidade e perda dos pontos de adesão focal (Figura 20 B; E). A associação de paclitaxel a miR-7 *mimics* (PTX+miR-7) resultou em alterações morfológicas semelhantes às vistas com o PTX isolado, havendo ainda redução do número de células e menor quantidade de células aderidas ao poço (Figura 20 C; F).

A análise de morfologia realizada por citometria de fluxo (FACSCalibur) corroborou com as alterações vistas na microscopia de luz. O grupo experimental exposto à associação PTX+miR-7 apresentou proeminente deslocamento para cima (*up*), com pequena população de células deslocadas para baixo (*down*), ambas mudanças no eixo Y representado por SSC (*Side Scatter*). Quanto ao eixo X (representado por FSC), houve leve deslocamento à esquerda. Tais mudanças nos parâmetros SSC e FSC representam alterações no volume celular e na complexidade e granulosidade das células tratadas com PTX+miR-7 em relação ao grupo PTX isolado e, sobretudo, quando comparado ao grupo controle (CN) (Figura 21).

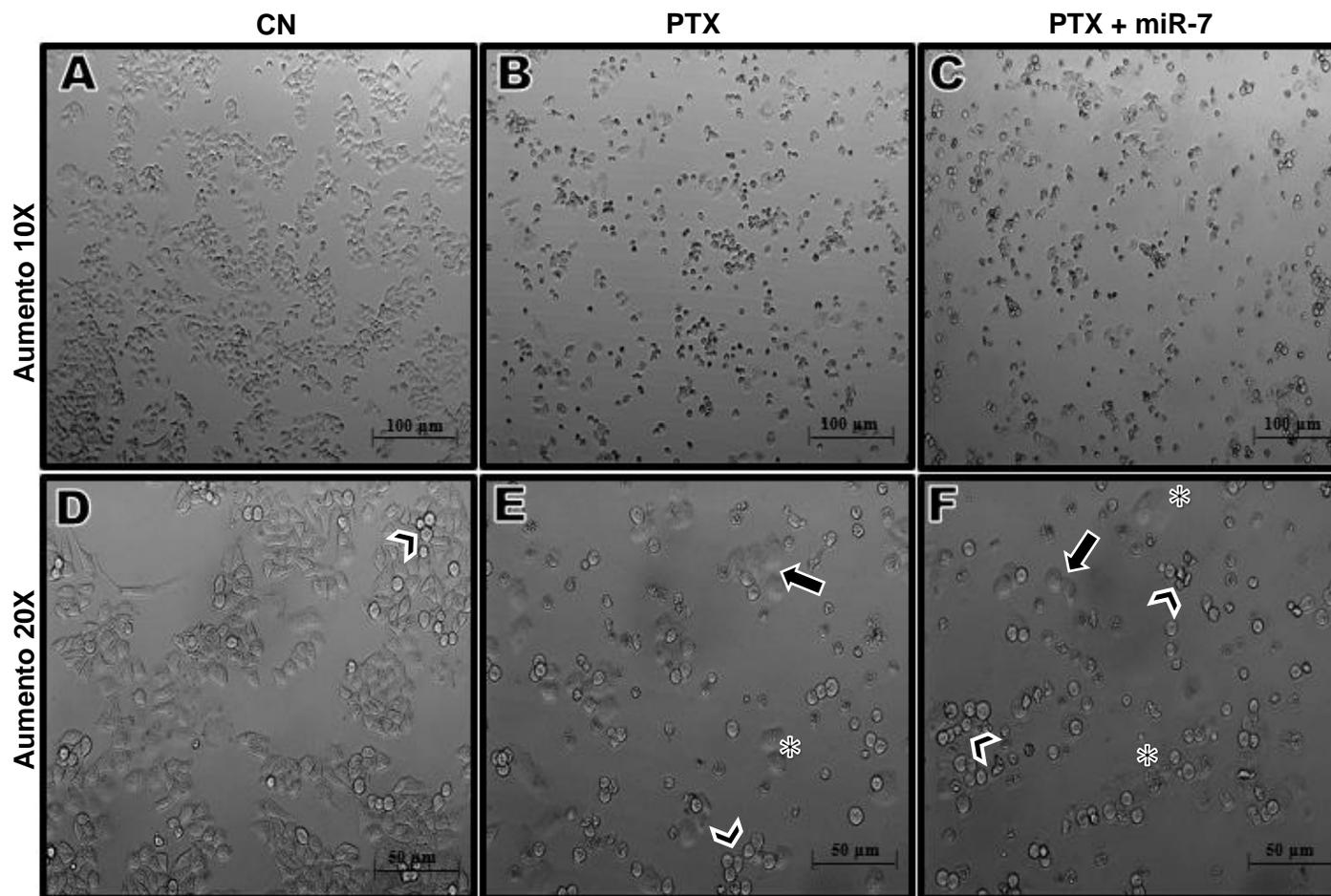


Figura 20. Alterações morfológicas na linhagem A2780 pela terapia combinada do paclitaxel e miR-7 mimic. (A e D) células do grupo controle negativo (CN) com morfologia epitelial característica da linhagem. (B e E) alterações morfológicas provenientes do tratamento com Paclitaxel livre. (C e F) alterações morfológicas causadas pela terapia associada Paclitaxel com miR-7 mimic. **Legenda:** células com morfologia arredondada (seta); células em suspensão (cabeça de seta); formação de vacúolos celulares (asterisco). Micrografias feitas em microscópio óptico de luz AxioVert 100. Aumento 10x, barra de referência 100 μm . Aumento 20x, barra de referência 50 μm .

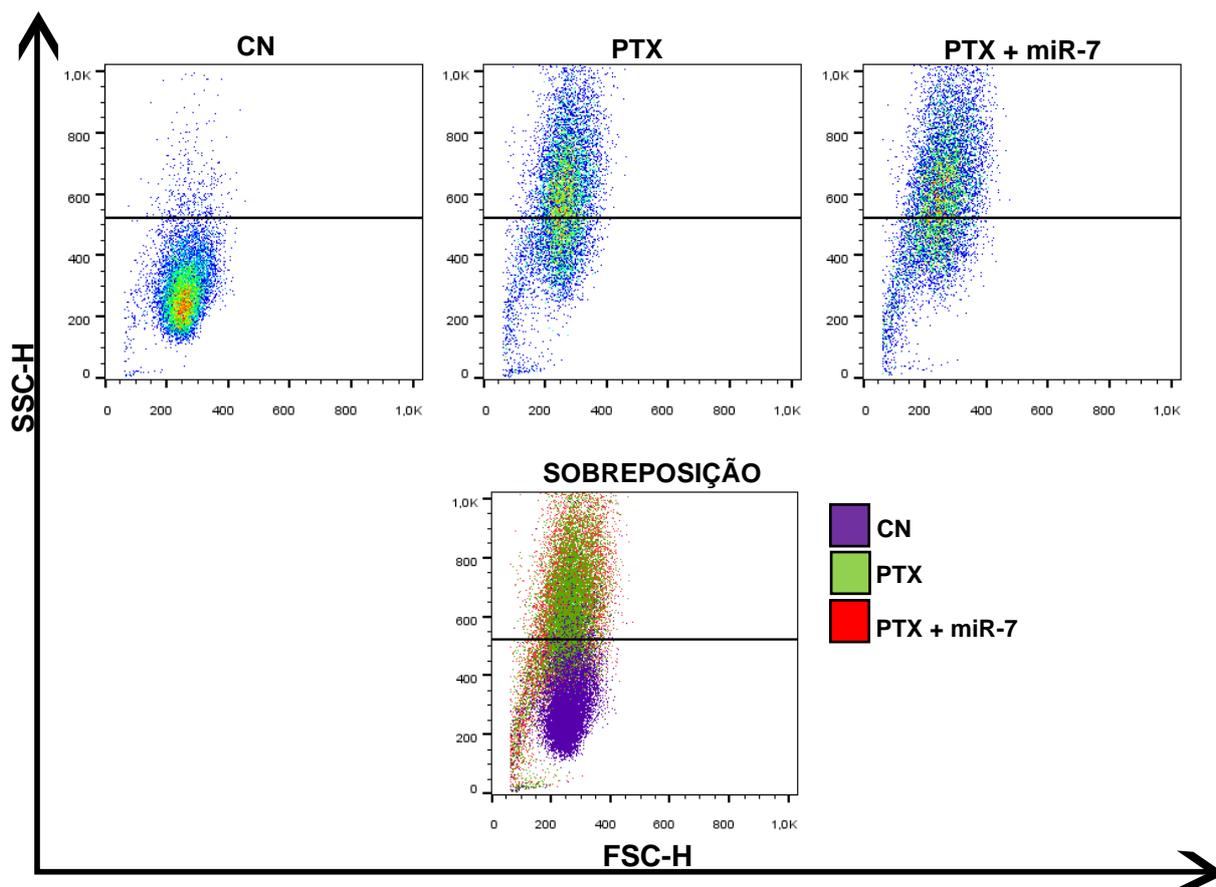


Figura 21. Alterações nos padrões de morfologia SSC/FSC na linhagem A2780 induzidas terapia combinada do paclitaxel e miR-7 *mimic*. O tratamento livre (PTX) e associado (PTX+miR-7) induziu alterações morfológicas na população de células A2780. Análise realizada por citometria de fluxo (FACScalibur) utilizando os parâmetros SSC-H (granulosidade/complexidade citoplasmática) e FSC-H (tamanho/volume celular). Todos os dados foram normalizados com o controle (CN). Os dotplots correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes.

5.7. Determinação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento combinado de paclitaxel e miR-7 mimics na linhagem MDA-MB-231

O ensaio de Anexina-V e PI sobre perfil de morte celular induzida por PTX e miR-7 *mimics* mostrou resultados concordantes com aqueles anteriormente obtidos nos testes de viabilidade por MTT. Houve morte celular por apoptose em 13,39% das células expostas a PTX, com 6,67% das células em apoptose inicial e o restante em apoptose tardia, 6,72%. Já a morte celular por necrose ocorreu em pequena porcentagem de células, 2,21%, que mostraram marcação para Iodeto de Propídio. A associação de miR-7 *mimics* com PTX provocou o aumento da morte celular por apoptose (inicial + tardia) de 13,39% para 21,62%, com favorecimento da apoptose tardia. Deste total de 21,62% de células apoptóticas, 13,55% (i.e., 62,67%) morreram por apoptose tardia. A morte celular por

necrose também foi aumentada, de 2,21% no grupo PTX isolado para 10,73% naquele PTX + miR-7 *mimics* (Figuras 22 e 23)

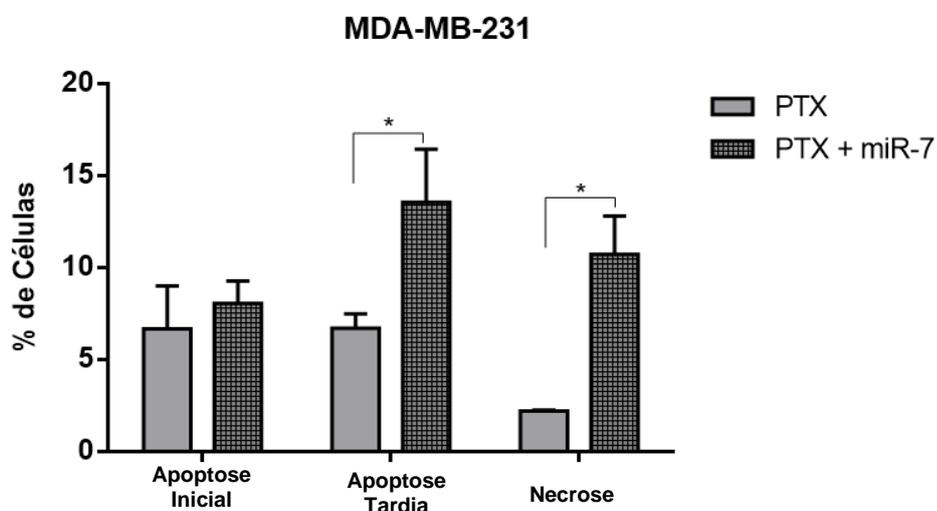


Figura 22. Perfil de morte celular induzido pela terapia combinada do paclitaxel ao imitador sintético de miR-7 na linhagem MDA-MB-231. O grupo PTX mostrou 13,39% de morte celular por apoptose. O tratamento com PTX + miR-7 elevou o percentual de morte celular por apoptose para 21,62%. Células marcadas para PI correspondem a 10,73% de morte por necrose causada pelo grupo (PTX+miR-7). Dados expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes e analisados por two-way ANOVA, seguida de pós-teste Bonferroni (* $p < 0,05$).

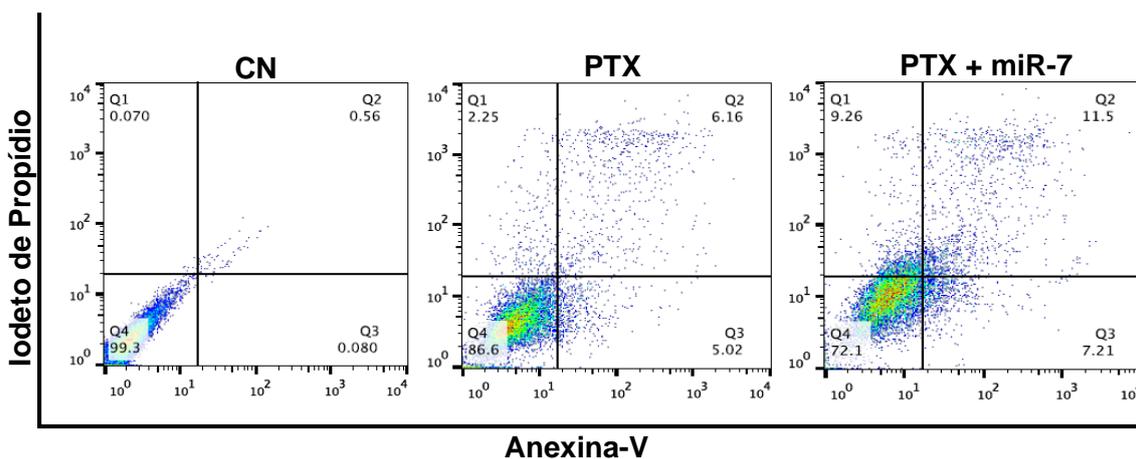


Figura 23. Perfil de morte celular induzido pela terapia combinada do paclitaxel e imitador sintético de miR-7 na linhagem MDA-MB-231 representado por Dotplot. A figura mostra a porcentagem de células em apoptose inicial ou tardia induzidas por 24h de tratamento com paclitaxel livre ou associado ao miR-7. Quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, quadrante inferior direito às células em apoptose inicial, o superior direito às células em apoptose tardia e o superior esquerdo às células necróticas. Todos os dados foram normalizados com o controle (CN). Os dotplots correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes.

5.8 Determinação do tipo de morte celular induzida pelo tratamento combinado de paclitaxel e miR-7 mimics na linhagem A2780

As células de ovário da linhagem A2780 mostraram o mesmo perfil de morte observado no câncer de mama, ou seja, a apoptose como tipo de morte prevalente nas células, porém com valor superior. A combinação PTX + miR-7 *mimic* provocou 70,8% de morte celular por apoptose, significativamente superior ao obtido com PTX isolado, que foi 56,1%. Deste percentual, 16,2% das células tiveram morte celular por apoptose inicial, enquanto 54,6% das células mostraram apoptose tardia. Os resultados de apoptose pelo ensaio de Anexina-V e PI corroboram aqueles anteriormente obtidos com o método de MTT. A associação PTX + miR-7 *mimics* também aumentou o percentual de células necróticas. O percentual de células marcadas com Iodeto de Propídio aumentou de 3,32% no grupo PTX para 7,58% na associação PTX + miR-7 *mimics* (Figuras 24 e 25).

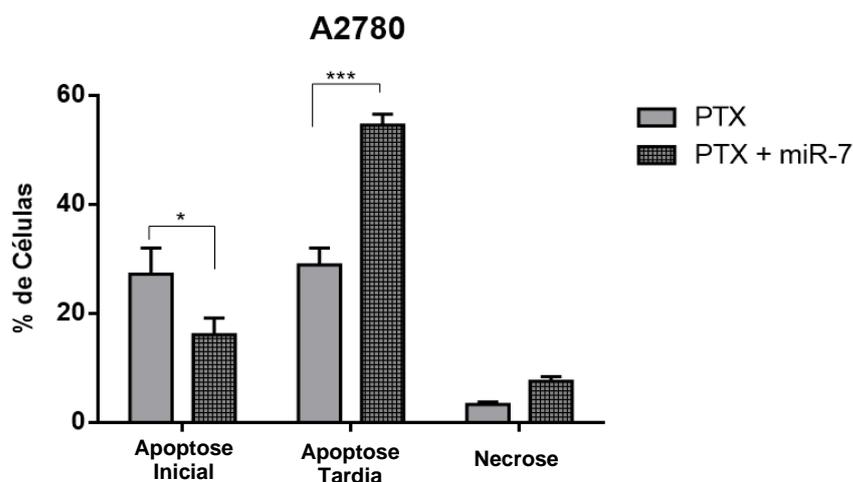


Figura 24. Perfil de morte celular induzido pela terapia combinada de paclitaxel e imitador sintético de miR-7 na linhagem MDA-MB-231. O grupo tratado com PTX + miR-7 mostrou proeminente aumento de morte celular por apoptose (16,2% e 54,6% inicial e tardia respectivamente) quando comparado ao grupo PTX, que apresentou 27,2% de apoptose inicial e 28,9% de apoptose tardia. Dados expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes e analisados por two-way ANOVA, seguida de pós-teste Bonferroni (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

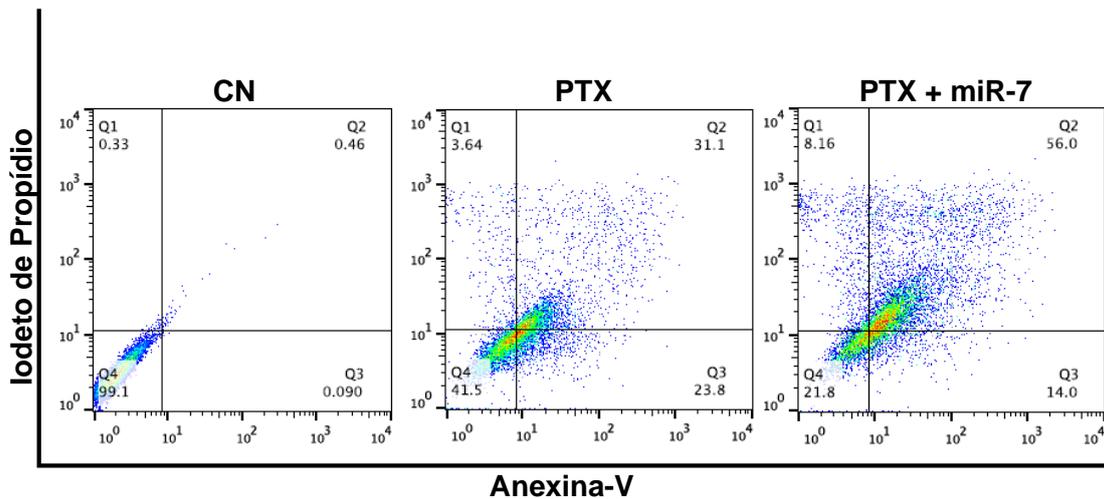


Figura 25. Perfil de morte celular induzido pela terapia combinada do paclitaxel e imitador sintético de miR-7 na linhagem A2780 representado por Dotplot. A figura mostra a porcentagem de células em apoptose inicial ou tardia induzidas por 24h de tratamento com paclitaxel livre ou associado ao miR-7. Quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, quadrante inferior direito às células em apoptose inicial, o superior direito às células em apoptose tardia e o superior esquerdo às células necróticas. Todos os dados foram normalizados com o controle (CN). Os dotplots correspondem a um experimento representativo de dois experimentos independentes.

5.9. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA, induzidas pela terapia combinada de PTX e miR-7 mimics

Os resultados desta etapa do projeto revelam fenótipos envolvidos na morte celular por apoptose induzida por PTX + miR-7 mimics, iniciando-se pela análise do estresse oxidativo celular. Os resultados a seguir mostram o efeito deste tratamento sobre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo aquelas geradas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxil (HOO^{\bullet}) e peroxinitrito ($ONOO^-$), mediante uso do reagente DCFH-DA.

Primeiro analisou-se o efeito dos tratamentos isolados sobre o estresse oxidativo das linhagens MDA-MB-231 e A2780 expostas aos tratamentos com PTX ou miR-7 mimics nos tempos de 1h ou 24 horas (Figura 26).

Na linhagem MDA-MB-231, a exposição ao paclitaxel por 1h ou 24 horas (PTX 1h e PTX 24h) elevou a produção de espécies reativas de oxigênio quando comparado ao grupo controle negativo (CN). Os grupos PTX 1h e PTX 24h apresentaram valores de quantificação relativa de fluorescência semelhantes (1,64 e 1,53, respectivamente), sem diferença estatística, indicando que o tratamento isolado com o PTX desencadeia aumento no conteúdo de espécies reativas de oxigênio a partir da primeira hora e que

persiste por ao menos 24 horas de tratamento. A transfecção com miR-7 *mimic* também provocou aumento de ROS nos dois tempos de tratamento, aqui denominados miR-7 1h e miR-7 24h, porém somente no grupo miR-7 1h houve diferença estatística em relação ao grupo controle (CN). A quantificação relativa de ROS em 1h foi elevada para 1,44, enquanto no tempo de 24h o valor foi de 1,19. Apesar dos dados mostrarem uma tendência na redução de ROS no grupo miR-7 24h comparado ao miR-7 1h, as diferenças não alcançaram significância estatística.

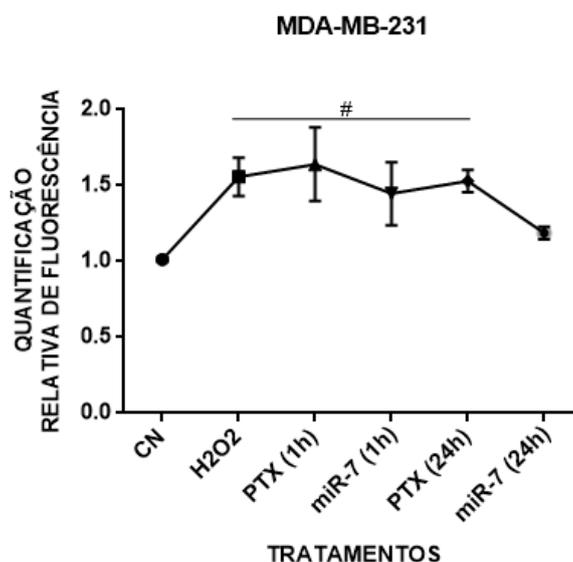


Figura 26. Perfil de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA em linhagem MDA-MB-231, após tratamentos livres com paclitaxel ou miR-7 *mimic*. Os grupos PTX 1h, PTX 24h, e miR-7 1h, mostraram aumento de ROS (quando comparados ao controle) para 1,64, 1,53, e 1,44, respectivamente. Os tempos de transfecção com o imitador sintético de miR-7, 1h e 24h, não apresentaram diferença estatística na produção de espécies reativas de oxigênio. Dados expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes em quadruplicatas e analisados por one-way ANOVA, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN).

Considerando os dados obtidos com os tratamentos isolados e os demais ensaios realizados neste trabalho, optou-se em avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) somente no tempo de 24 horas de tratamento combinado de PTX + miR-7 *mimics*. Esta associação elevou a produção de espécies reativas de oxigênio para 1,54, resultado estatisticamente superior ao grupo controle (CN) e ao tratamento isolado com PTX, que foi 1,47 (Figura 27). Os dados mostram que a apoptose por miR-7 *mimics* é acompanhada de aumento no estresse oxidativo das células tumorais de mama MDA-MB-231. Futuros ensaios funcionais com inibidores de ROS poderão elucidar se a morte das células foi dependente deste aumento no estresse oxidativo.

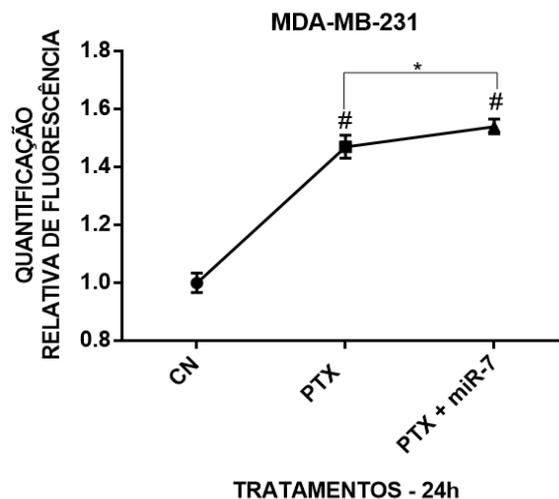


Figura 27. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA em linhagem MDA-MB-231 após terapia combinada de paclitaxel com miR-7 mimic. O grupo PTX + miR-7 mostrou aumento significativo de ROS quando comparada ao tratamento isolado (PTX), com valores de, respectivamente, 1,54 e 1,47. Dados expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes em quadruplicatas e analisados por one-way ANOVA, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (* $p < 0,05$).

5.10 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA, induzidas pela terapia combinada com paclitaxel associado ao miR-7, na linhagem A2780

Na linhagem A2780, os tratamentos isolados com PTX ou miR-7 *mimics* não causaram alteração significativa do estresse oxidativo quando comparados ao grupo controle negativo (CN) (Figura 28). Os grupos tratados com PTX isolado apresentaram aumento na produção de ROS entre os tempos de 1 hora, 0,96 de fluorescência relativa, e de 24 horas, 1,21. Observou-se tendência de aumento entre os tempos de 1 h e 24 h com o tratamento com miR-7 *mimics*, embora bem discreta, oscilando de 1,15 para 1,21.

Curiosamente, o nível de ROS obtido com a associação PTX + miR-7 *mimics* foi inferior ao observado no uso isolado de PTX no tempo de 24 horas, conforme apresentado na figura 29. A quantificação relativa de fluorescência de DCFH-DA no grupo PTX+miR-7, 1,09, foi significativamente menor em relação ao grupo PTX, 1,23. Ou seja, a presença de miR-7 *mimics* nas células tratadas com PTX preveniu o aumento estresse oxidativo causado pelo paclitaxel isoladamente, com níveis de ROS próximos dos valores do controle negativo. Este resultado sugere que mecanismo de miR-7 *mimic* para

potencializar a citotoxicidade do paclitaxel não está relacionado ao aumento de estresse oxidativo nas células tumorais de ovário A2780.

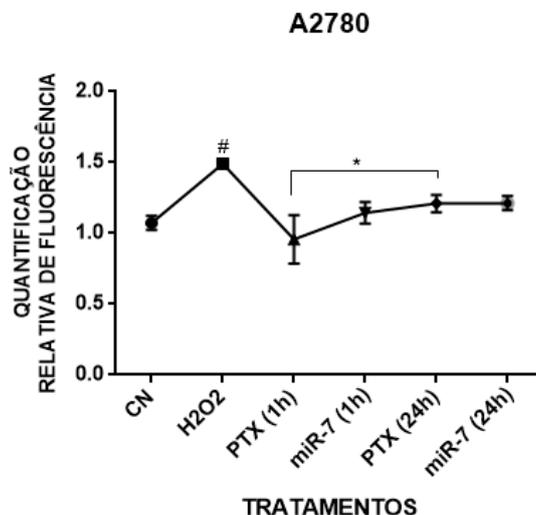


Figura 28. Perfil de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA em linhagem A2780, após tratamentos livres com paclitaxel e miR-7 *mimic*. Os tratamentos não induziram aumento significativo de ROS quando comparados ao grupo controle (CN). Há tendência de aumento de ROS nos grupos miR-7 (1 e 24h) e PTX (24h). Dados expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes em quadruplicatas e analisados por one-way ANOVA, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (* $p < 0,05$).

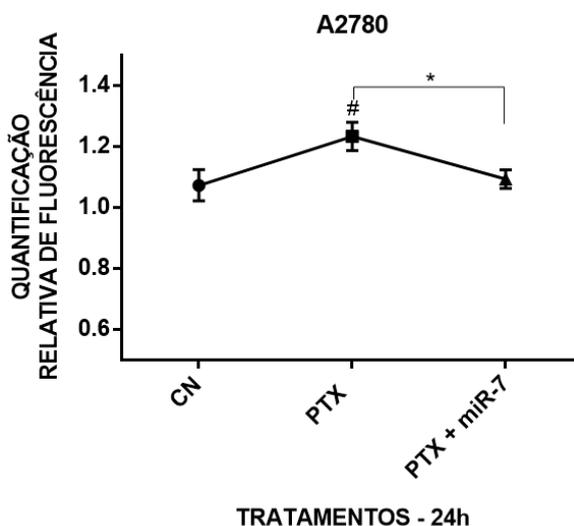


Figura 29. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por DCFH-DA em linhagem A2780 após terapia combinada de paclitaxel e miR-7 *mimic*. O tratamento associado (PTX + miR-7), reduziu estatisticamente a quantificação de ROS quando comparada ao tratamento isolado (PTX), com valores de, respectivamente, 1,09 e 1,23. Dados expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes em quadruplicatas e analisados por one-way ANOVA, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (* $p < 0,05$).

5.11 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por CellROX Green, induzidas pelo tratamento combinado de paclitaxel e miR-7 mimics, nas linhagens MDA-MB-231 e A2780

O presente estudo utilizou uma segunda metodologia para quantificação de ROS, visando confirmar os resultados anteriores de estresse oxidativo obtidos com DCFH-DA. Empregou-se o reagente CellROX Green, que detecta níveis de radicais hidroxila (OH•) e ânions superóxidos (O₂⁻) por citometria de fluxo.

Na linhagem MDA-MB-231, o tratamento com PTX isolado causou aumento significativo de ROS nas células, o que foi potencializado pela associação PTX + miR-7 mimics (Figura 30). A mediana da intensidade de fluorescência (*Median Fluorescence Intensity* – MFI) relativa para as células tratadas com PTX isolado por 24 horas foi de 1,63, ao passo que a combinação PTX + miR-7 mimics (PTX + miR-7) aumentou em quase duas vezes a intensidade de fluorescência, atingindo o valor de 3,06. Ademais, ambos os tratamentos apresentaram aumento significativo na produção de ROS em relação ao grupo controle. Tais achados corroboram resultados anteriores com ensaios de DCFH-DA, confirmando que os efeitos citotóxicos da associação PTX+miR-7 mimics são acompanhados por aumento do estresse oxidativo celular. Ensaios funcionais poderiam examinar se o aumento de ROS nas células é condição necessária para a citotoxicidade causada pelo tratamento.

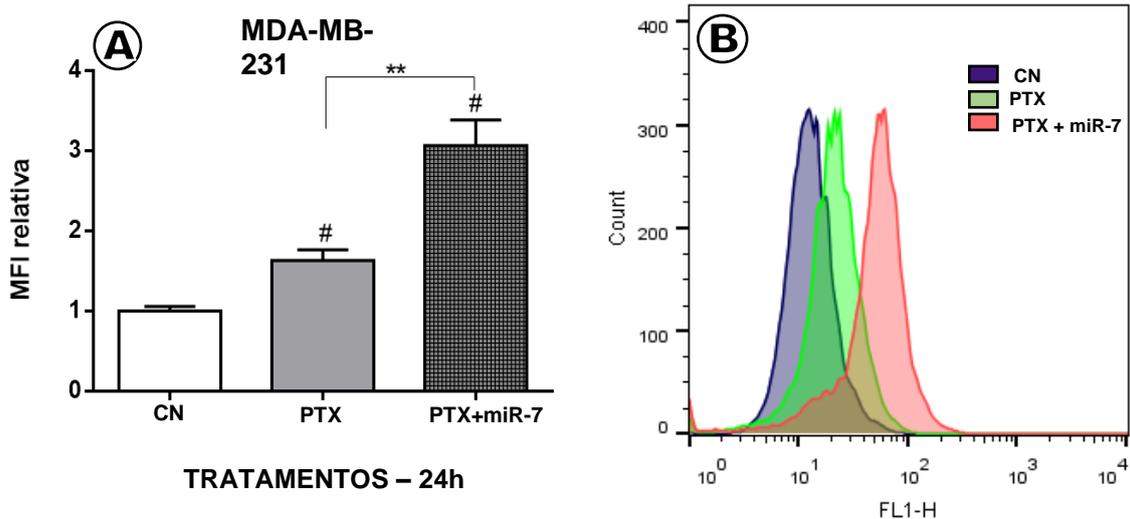


Figura 30. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), examinada por CellROX em linhagem MDA-MB-231 após terapia combinada de paclitaxel com miR-7 mimic. (A) A associação de miR-7 a paclitaxel (PTX + miR-7), induziu aumento significativo de ROS quando comparada ao tratamento isolado (PTX) e ao grupo controle (CN). Dados expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes em monoplicatas e analisados por one-way ANOVA, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (** $p < 0,01$). (B) Histogramas correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes. 10.000 eventos foram analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur) no canal FL-1. Todos os dados foram normalizados com mediana da intensidade de fluorescência do controle (CN) no software FlowJo.

Células de câncer de ovário A2780 também apresentaram aumento de estresse oxidativo pelo método CellROX Green em resposta ao tratamento com PTX ou com PTX em associação a miR-7 mimics (Figura 31). Células tratadas apenas com PTX mostraram aumento significativo da mediana da intensidade de fluorescência (*Median Fluorescence Intensity* – MFI) relativa para valor de 2,43. Diferentemente dos resultados de DCFH-DA, nos quais a terapia com PTX associado a miR-7 mimic (PTX+miR-7) induziu a redução do estresse oxidativo causado por PTX, o ensaio com CellROX Green detectou aumento desta resposta para valores de 3,0. O valor de estresse oxidativo neste grupo PTX+miR-7 foi superior àquele obtido no tratamento isolado com PTX, 2,43, porém sem significância estatística.

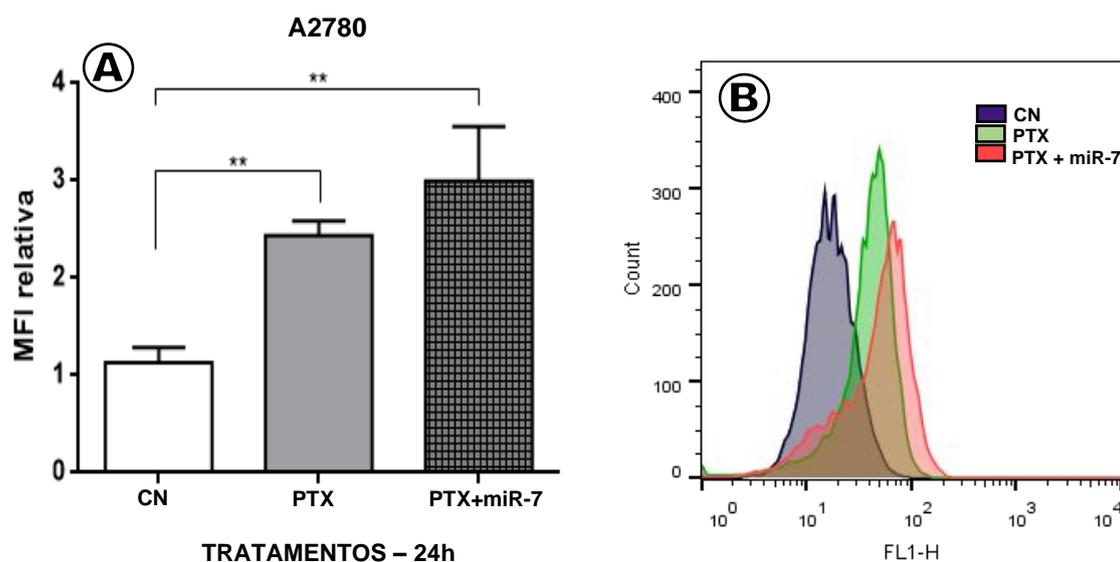


Figura 31. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), examinada por CellROX em linhagem A2780 após terapia combinada de paclitaxel com miR-7 *mimic*. (A) O tratamento com paclitaxel livre (PTX) e associado ao miR-7 (PTX + miR-7) induziu o aumento significativo na quantificação de ROS quando comparado ao grupo controle (CN). Não houve diferença estatística entre os grupos PTX e PTX+ miR-7. Dados expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes em monoplicatas e analisados por one-way ANOVA, seguida de pós-teste Tukey. # diferença significativa em relação ao controle negativo (CN). (** $p < 0,01$). (B) Histogramas correspondem a um experimento representativo de dois experimentos independentes. 10.000 eventos foram analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur) no canal FL-1. Todos os dados foram normalizados com mediana da intensidade de fluorescência do controle (CN) no software FlowJo.

5.12. Análise qualitativa do estresse oxidativo induzido pela terapia combinada com paclitaxel em associação a miR-7 *mimics*, nas linhagens MDA-MB-231 e A2780

Nesta etapa, apresentam-se resultados complementares sobre estresse oxidativo celular induzido por PTX e miR-7 *mimics*, buscando examinar qualitativamente esta alteração no núcleo e citoplasma de células fixadas com formaldeído 3,7%. O DNA nuclear mostra-se marcado em azul devido ao reagente DAPI, e as espécies reativas de oxigênio em verde, pela marcação com CellROX Green.

Células MDA-MB-231 apresentam morfologia característica com formato fusiforme e núcleo bem definidos, conforme anteriormente apresentado (item 5.5; Figura 18 A, D). Na sobreposição das imagens do grupo controle negativo CN (Figura 32 C), observa-se o estresse oxidativo basal mais intenso no citoplasma e mais brando no núcleo de algumas células. O tratamento com o quimioterápico paclitaxel (PTX), isoladamente, induz fragmentação e aumento do volume nuclear nas células (Figura 32 D), além de

modificar o citoplasma celular. Todas as células expostas a PTX apresentam marcação para CellROX, confirmando o aumento do estresse oxidativo celular (Figura 32 F). Além das alterações já percebidas nas células tratadas com PTX isolado, na terapia combinada de PTX e miR-7 *mimics* (PTX + miR-7), nota-se um discreto aumento na área para fluorescência verde (CellROX), indicando ligeiro aumento de estresse oxidativo celular (Figura 32 I).

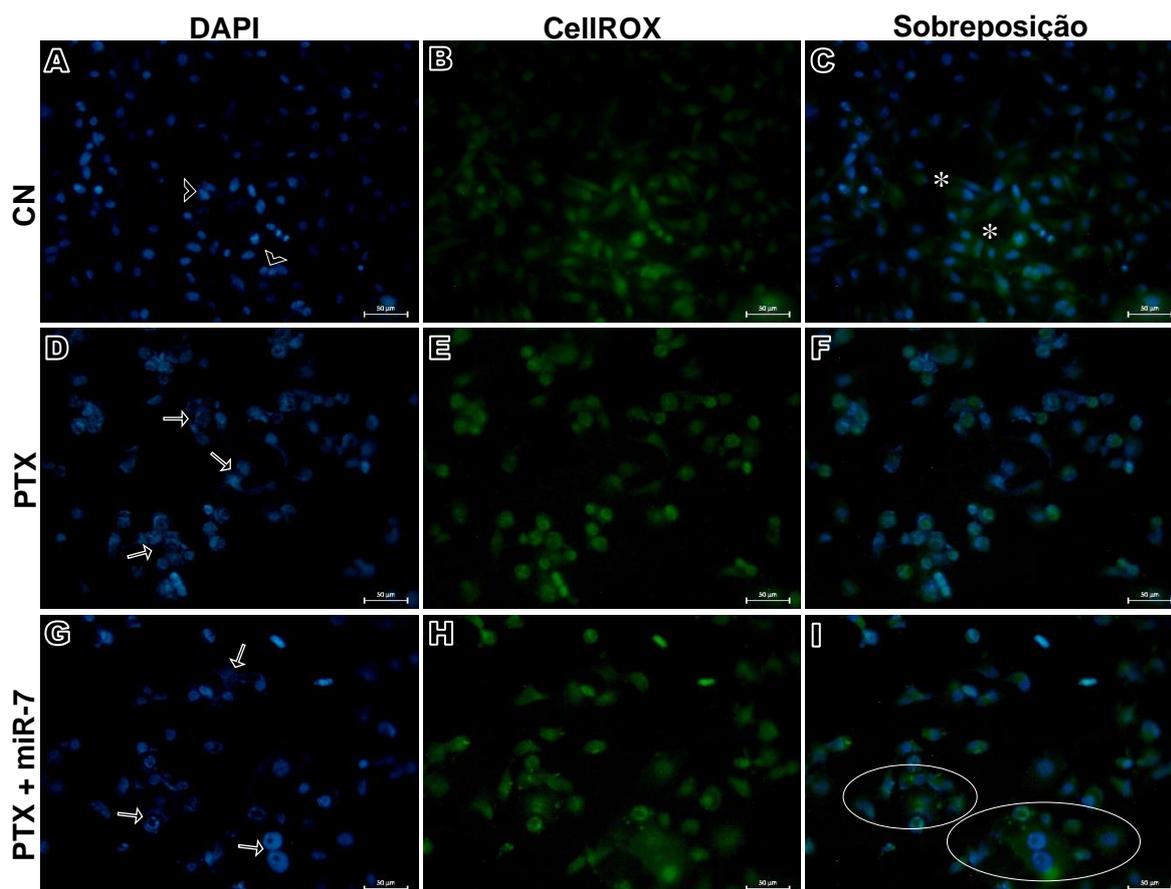


Figura 32. Análise qualitativa do estresse oxidativo induzido pela terapia combinada com paclitaxel associado a miR-7 na linhagem MDA-MB-231. Núcleo celular marcado com DAPI (azul). Espécies reativas de oxigênio produzidas no núcleo e citoplasma celular (mitocôndria) marcadas com CellROX (verde). **Legenda:** característica normal do núcleo celular (cabeça de seta); alterações no núcleo celular (seta); estresse celular basal no citoplasma da linhagem MDA-MB-231 (asterisco); aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (elipse). Micrografias feitas em Microscópio de Fluorescência Axiovert 100 nos filtros verde e azul com o auxílio do software AxioVision 100. Aumento 20x, barra de referência 50 µm.

No tocante às células da linhagem A2780, aquelas do grupo controle negativo (CN) mostram morfologia característica do tipo de carcinoma ovariano, com crescimento em colônias e pontos de adesão focal, corroborando análises morfológicas prévias (item 5.6; Figura 20 A, D). Nota-se na figura 33B um leve estresse oxidativo basal das células controle, sobretudo no núcleo celular. Resultados da combinação de PTX e miR-7 *mimic*

(PTX + miR-7) não diferiram qualitativamente daqueles obtidos com PTX (Figura 33 I vs. 33F). Ambos induziram proeminentes modificações no núcleo celular, incluindo fragmentação nuclear (Figuras 33 D e G) e aumento nítido do volume nuclear, corroborando as alterações na complexidade interna da célula vistas em ensaios de citometria (SSC/FSC) e também na microscopia de luz. Nota-se um aumento na intensidade do CellROX (verde) nos grupos PTX e PTX+miR-7 quando comparado ao grupo controle negativo, sugerindo o aumento de espécies reativas de oxigênio principalmente próximo do núcleo destas células tumorais de ovário (Figuras 33 E e H vs. 33B)

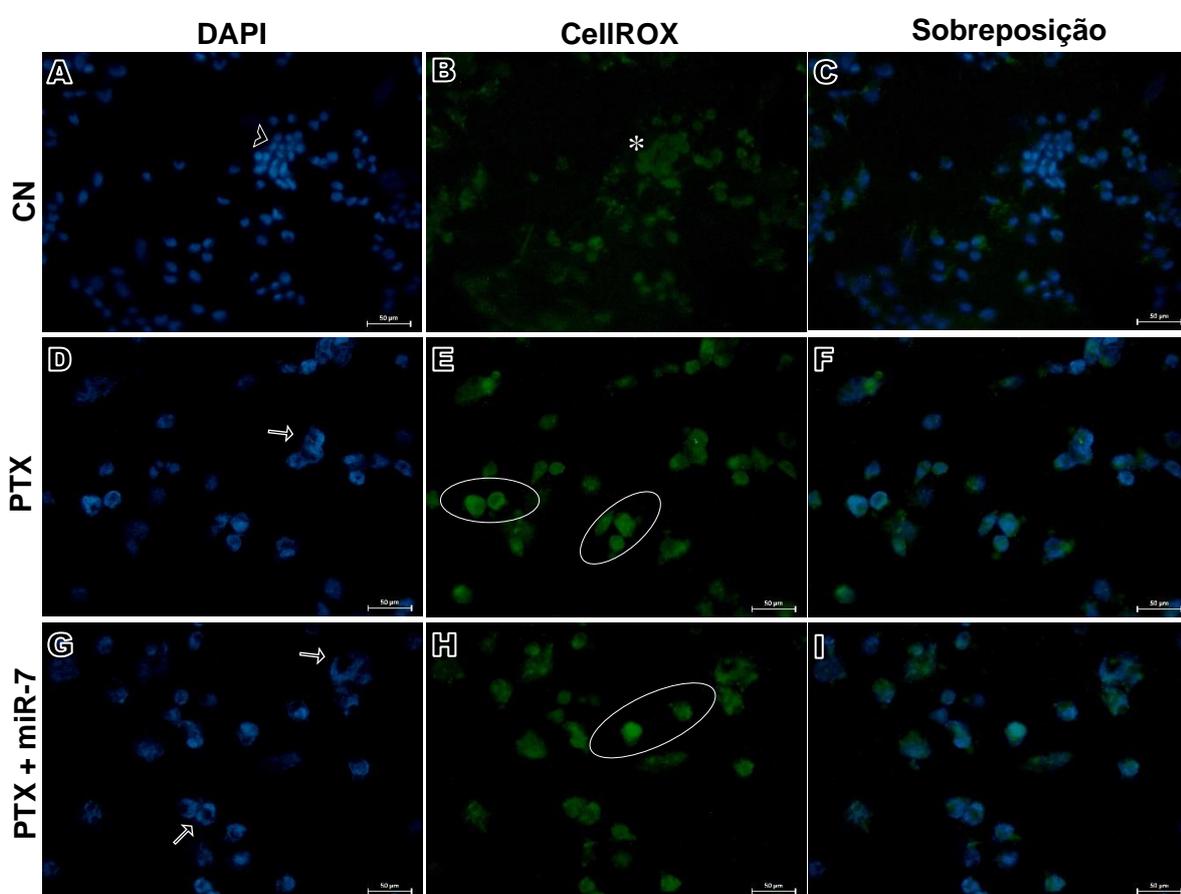


Figura 33. Análise qualitativa do estresse oxidativo induzido pela terapia combinada com paclitaxel associado a miR-7 na linhagem A2780. Núcleo celular marcado com DAPI (azul). Espécies reativas de oxigênio produzidas no núcleo e citoplasma celular (mitocôndria) marcadas com CellROX (verde). **Legenda:** característica normal do núcleo celular (cabeça de seta); alterações no núcleo celular (seta); estresse celular basal no citoplasma da linhagem A2780 (asterisco); aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (elipse). Micrografias feitas em Microscópio de Fluorescência Axiovert 100 nos filtros verde e azul com o auxílio do software AxioVision 100. Aumento 20x, barra de referência 50 µm.

6. DISCUSSÃO

A constante emergência dos estudos biotecnológicos tem permitido a descoberta de alternativas promissoras para o diagnóstico e tratamento do câncer. O uso da terapia gênica baseada em RNAs de interferência (RNAi) é um exemplo de ferramenta inovadora e que tem, progressivamente, assumido maior relevância na oncologia (Shu *et al*, 2015; Zhao *et al*, 2015; Tan *et al*, 2018; Hanna *et al*, 2019). O êxito na especificidade de alvo e redução de efeitos adversos, permitidos pela inserção exógena de material genético na célula, tem incentivado as indústrias farmacêuticas a investirem no desenvolvimento de oligonucleotídeos sintéticos com maior durabilidade e especificidade pelos alvos (Titzede-Almeida *et al*, 2017). No foco deste estudo, tais oligos devem ser eficazes em recuperar a homeostase no microambiente tumoral, ou seja, corrigir conteúdos aberrantes de transcritos de microRNAs.

Muitos estudos têm relatado a funções biológicas ligadas a miR-7 em células saudáveis e, também, que sua expressão aberrante contribui para o desenvolvimento de diversas doenças (Zhao *et al*, 2015). A escolha por miR-7 como foco do presente estudo se deu a partir de trabalhos prévios que mostram ações supressivas sobre células tumorais, pelo fato de que sua expressão basal está diminuída em células e tecidos cancerosos de prognóstico ruim. Consequentemente, há aumento de proteínas envolvidas na agressividade tumoral, como é o caso do câncer de mama triplo-negativo em comparação com outros subtipos menos agressivos, como o subtipo denominado ‘hormônio positivo’ (Cui *et al*, 2017). Estudo anterior de nosso grupo de pesquisa corroborou estes achados, mostrando uma expressão significativamente menor na linhagem triplo-negativa MDA-MB-231 em relação à linhagem MCF-7 que é positiva para receptor de estrógeno (Schlemmer, 2019). A mudança do conteúdo de miR-7 em células tumorais pode alterar seu fenótipo, possivelmente por reduzir a expressão de genes regulados por este miRNA. Na literatura, é possível encontrar relatos promissores, indicando que a reposição exógena de miR-7 causa silenciamento de genes envolvidos na proliferação e migração celular (EGFR, PAK1, Wave-3), angiogênese (VEGF), transição epitélio-mesenquimal e metástase (Vimentina e E-caderina), e multirresistência a drogas (MRP-1), em diversas linhagens de células cancerosas, entre elas as de mama e ovário (Zhou *et al*, 2014; Cui *et al*, 2017). Esta atividade de miR-7 em múltiplos tipos celulares amplia as possíveis aplicações dos achados do atual trabalho, para além dos cânceres de mama e ovário que foram os modelos *in vitro* objeto desta dissertação.

Apesar de termos observado resultados significativos com o uso isolado de miR-7 *mimics* em células cancerosas, um futuro movimento da tecnologia da bancada para a

clínica dependeria de efeitos positivos quando associados a quimioterápicos de escolha. O paclitaxel é comumente prescrito no tratamento de primeira linha para os cânceres de mama e ovário (Weaver, 2014; ACS, 2019; Alqahtani *et al*, 2019).

Estudos relatam, porém, uma gama de tipos celulares que desenvolveram resistência a este quimioterápico, fenômeno que representa grande obstáculo para o sucesso continuado da terapia antitumoral sistêmica (Alqahtani *et al*, 2019). Este aspecto é particularmente importante no tratamento de células cancerosas de mama triplo-negativas (TNBC), já que frequentemente surgem células residuais resistentes que podem levar à recorrência tumoral e metástases. Quanto ao câncer epitelial de ovário (CEO), sua baixa sobrevida é comumente relacionada à resistência a taxanos, incluindo o paclitaxel, que são as principais opções de quimioterapia para esta neoplasia (Byun *et al*, 2017; Qu *et al* 2017).

No presente estudo, utilizou-se a concentração de paclitaxel padronizada em uma curva de efeito dose-dependente (25 nM, 50nM, 100nM e 200nM) em trabalhos anteriores de nosso grupo com linhagens tumorais de mama (Schlemmer, 2019). Os resultados do trabalho mostraram que apesar da tendência na produção de efeitos superiores sobre a viabilidade celular com o aumento das concentrações do quimioterápico, na linhagem triplo-negativa (MDA-MB-231), não houve significância estatística intergrupos, e por esse motivo optou-se por trabalhar com uma concentração intermediária (100nM) objetivando somar com os efeitos de miR-7 *mimics* sobre a viabilidade das células. A concentração do quimioterápico (100 nM), escolhida para prosseguimento dos ensaios com ambas as linhagens no presente trabalho, causou efeitos maiores sobre a viabilidade de células CEO da linhagem A2780 (abaixo do IC₅₀) quando comparadas a linhagem de câncer de mama triplo-negativa MDA-MB-231. Apesar de uma comparação não ser devidamente adequada por se tratarem de células tumorais de órgãos diferentes, esse resultado é concordante com dados da literatura. A hipótese desta diferença pode estar relacionada com a característica da linhagem epitelial de ovário do tipo endometrióide (A2780) ter o perfil menos agressivo e mais responsivo ao tratamento, quando comparada às células TNBC, que apresentaram resistência ao paclitaxel em modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* (ACS, 2019; Nedeljković & Damjanović, 2019).

Há poucos estudos sobre as bases moleculares do sinergismo entre miR-7 e paclitaxel. Pode-se especular que haja relação com o mecanismo de ação e efeitos dos taxanos, que é o de estabilizar o citoesqueleto das células por atuarem nos microtúbulos. Neste sentido, expressão desregulada de miR-7 afeta, entre outros fatores, a própria motilidade celular (Zhou *et al*, 2014; Cui *et al*, 2017). Por esta razão, e porque planejou-se uma tecnologia

de fácil administração, objetivou-se a aplicação simultânea desses tratamentos, que já haviam mostrado efeitos significativos em uso isolado em células tumorais de mama (MDA-MB-231) e de ovário (A2780). A combinação de miR-7 *mimics* com o quimioterápico paclitaxel causou efeitos superiores ao uso isolado em termos de redução da viabilidade celular em ambas as linhagens do presente estudo. Os resultados aqui obtidos comprovam, portanto, que a reposição de miR-7 mediante uso de imitadores sintéticos tem capacidade de sensibilizar células cancerosas de dois diferentes tipos tumorais para os efeitos de paclitaxel, um quimioterápico já utilizado no tratamento de várias neoplasias malignas (Alqahtani *et al*, 2019).

O controle sobre a morte celular é fator crítico e característico do câncer, visto que células tumorais têm mecanismos desregulados de proliferação e morte celular programada quando comparadas a células saudáveis (Weinberg, 2014). Um dos grandes objetivos do tratamento do câncer é inibir a imortalidade replicativa das células, sem causar muitos danos aos tecidos vizinhos ao tumoral. Por esse motivo, a indução de morte celular por apoptose é sempre preferível, já que se trata de uma ‘morte limpa’ ou ‘silenciosa’. Células apoptóticas são rapidamente fagocitadas por macrófagos, evitando-se a ativação de vias inflamatórias prejudiciais ao organismo, possibilitando, ainda, o aproveitamento de componentes orgânicos pela célula fagocítica. Ao contrário, a morte celular por necrose pode causar resposta inflamatória potencialmente prejudicial ao ambiente celular próximo da massa tumoral (Alberts, 2002; Gerl *et al*, 2005; Weinberg, 2014).

Estudos recentes revelaram mecanismos moleculares para outros tipos de morte celular e que, apesar de distintos, se inter-relacionam. Tal progresso evidenciou formas não-apoptóticas de morte celular, particularmente necrose programada ou necroptose. Este tipo de morte celular é detectado por meio de ensaios bioquímicos baseados em inibição farmacológica ou genética de fatores apoptóticos e necróticos, incluindo caspases e proteína-quinase RIP1/RIP3 (Chen *et al*, 2018). Com base nessas descobertas, e considerando que ensaios de citometria de fluxo com marcação de Anexina-V e PI somente identificam células em apoptose ou em necrose (Pietkiewicz *et al*, 2015; Su *et al*, 2015), nós especulamos que o aumento no percentual de células da linhagem MDA-MB-231 marcadas com PI nos ensaios de citometria de fluxo, e decorrente do tratamento combinado de miR-7 *mimics* e paclitaxel, possa estar relacionado a uma morte por necroptose e não apenas por necrose. Ensaios futuros poderão responder a esta questão biológica. Quanto às alterações de estresse oxidativo e de morfologia, tais como o colapso do citoesqueleto celular e a fragmentação do DNA nuclear (Alberts, 2002; Weinberg,

2014), observados nas duas linhagens celulares – MDA-MB-231 e A2780 – estudadas no presente trabalho, estas também sugerem fenótipos de morte celular programada.

As espécies reativas de oxigênio (ROS), consoante com sua denominação, são moléculas altamente reativas e que desempenham duplo papel na manutenção da biologia celular. O aumento de ROS em níveis fisiológicos promove morte celular por apoptose, mediante mecanismo de sinalização mitocondrial; já o aumento exagerado de ROS pode contribuir para a progressão tumoral. Estudos mostram que células cancerosas estão sob constante estresse oxidativo e possuem, desta maneira, nível maior de ROS quando comparadas a células saudáveis (Ozben, 2007; Weinberg, 2014; Redza-Dutordoir & Averil-Bates, 2016). Tais moléculas reativas podem interagir com macromoléculas e promover danos oxidantes irreversíveis, sobretudo no DNA, além de afetar outras funções vitais da célula. Trabalhos recentes evidenciam que os microRNAs estão envolvidos na produção de ROS, assim como podem ser regulados pelas espécies reativas de oxigênio. MicroRNAs e ROS podem atuar sinergicamente ou antagonicamente na regulação do câncer, porém o entendimento dessa interação ainda é limitado, assim como ocorre para o papel de miR-7 nesse processo (He & Jiang, 2016; Babu *et al*, 2019). O aumento significativo na produção de ROS após tratamento com miR-7 *mimics* associado ao paclitaxel, somado ao perfil de morte celular da linhagem MDA-MB-231 observado no presente estudo, são achados concordantes com dados da literatura que relatam indução de estresse oxidativo como mecanismo frequentemente utilizado no uso de terapias contra o câncer (Consentino *et al*, 2019). Por outro lado, a atividade funcional do microRNA com relação à produção de ROS pode variar em função do tipo celular (Babu *et al*, 2019), o que pode explicar as diferenças nos níveis de estresse oxidativo entre a linhagem tumoral de ovário A2780 e a linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231).

As informações presentes na literatura científica, somadas aos resultados obtidos neste trabalho, reforçam a importância dos microRNAs como alvos terapêuticos promissores e aplicáveis a diferentes linhagens tumorais. A terapia experimental baseada na associação de miR-7 *mimics* ao quimioterápico paclitaxel tem mérito para posterior validação em ensaios *in vivo* utilizando modelos animais de câncer de mama e ovário, bem como oferece oportunidades para pesquisa básica sobre vias e alvos regulados por esta dupla intervenção na biologia tumoral.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a associação entre paclitaxel e miR-7 *mimics* é estratégia biotecnológica promissora para o tratamento dos cânceres de mama triplo-negativo e de ovário, considerando-se que:

- O uso isolado de imitadores sintéticos de miR-7 – miR-7 *mimics* – causa redução na viabilidade celular nas linhagens tumorais de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 e câncer de ovário A2780;
- A administração de miR-7 *mimics* potencializa os efeitos do quimioterápico paclitaxel sobre a viabilidade das células, também promovendo alterações morfológicas nas duas linhagens estudadas;
- O tratamento com o paclitaxel associado a miR-7 *mimics* induz aumento de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na linhagem MDA-MB-231, quando comparado ao tratamento livre com o quimioterápico;
- Finalmente, o tipo de morte celular mais desejável para o câncer, a apoptose, foi a principal forma de morte induzida por miR-7 *mimic* em associação ao paclitaxel em ambas as células tumorais, com efeitos mais proeminentes na linhagem de ovário A2780.

8. PERSPECTIVAS

A perspectiva prioritária do presente trabalho é a realização de estudo pré-clínico em modelos de câncer de mama triplo-negativo e de ovário, para teste da eficácia e segurança da associação miR-7 *mimics* e paclitaxel. Para tanto, será de extrema importância selecionarmos um sistema de *delivery* de miR-7 *mimics* para uso *in vivo*, que poderá utilizar partículas com capacidade de vetorização para a área tumoral, sobretudo no tumor mamário.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S. & PORT, E.R. Genetic Testing in Patients With Newly Diagnosed Breast Cancer: Room for Improvement. **Journal of Clinical Oncology**. 35(20):2221-2223. 2017.
- ALBERTS, B. et al. Programmed Cell Death (Apoptosis). **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition. New York: Garland Science. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26873/>
- ALGAHTANI, F.Y., et al. Paclitaxel. **Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.** 44:205-238. 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Cancer and figures 2019. Atlanta. Disponível em: <http://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html>.
- ANAND, P. et al. “Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes.” **Pharmaceutical research**. 25(9): 2097-116. 2008.
- AREM H., LOFTFIELD, E. “Cancer Epidemiology: A Survey of Modifiable Risk Factors for Prevention and Survivorship.” **American journal of lifestyle medicine**. 12(3) 200-210. 2017.
- AUNAN, J.R., et al. “The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks.” **Aging and disease**. 8(5):628-642. 2017.
- BABU, R.K. et al. The Yin-Yang Regulation of Reactive Oxygen Species and MicroRNAs in Cancer. **Int. J. Mol. Sci.** 20, 5335. 2019.
- BARBUTI, A.M. & CHEN, A.M. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy. **Cancers (Basel)**. 7(4):2360–2371. 2015.
- BARETTA, Z. et al. Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**. 95(40): 4975. 2016.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 0:1-31. 2018.
- BYUN, M. et al. Phosphorylation of caspase-9 at Thr125 directs paclitaxel resistance in ovarian cancer. **Oncotarget**. 9: 1041-1047. 2017.
- CAIRNS, R., MAK, T. The current state of cancer metabolism. **Nat Rev Cancer** 16: 613–614. 2016.
- CARTHEW, R.W. & SONTHEIMER, E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**. 136(4):642–655. 2009.
- CHEN, Q. et al. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Sig Transduct Target Ther**. 3, 18. 2018.

CHEN, S., *et al.* The positivity of estrogen receptor and progesterone receptor may not be associated with metastasis and recurrence in epithelial ovarian cancer. **Sci Rep.** **7**, 16922 2017.

CINTOLO-GONZALEZ, J.A. *et al.* Breast cancer risk models: a comprehensive overview of existing models, validation, and clinical applications. **Breast Cancer Research and Treatment.** 164(2), 263–284. 2017.

CONSENTINO, G. *et al.* MicroRNA and Oxidative Stress Interplay in the Context of Breast Cancer Pathogenesis. **International journal of molecular sciences.** 20(20): 5143. 2019.

CUI, Y. *et al.* MicroRNA-7 suppresses the homing and migration potential of human endothelial cells to highly metastatic human breast cancer cells. **Br J Cancer.** 117, 89–101. 2017.

DE CASTRO SANT'ANNA, C. *et al.* Molecular biology as a tool for the treatment of cancer. **Clin Exp Med.**18, 457–464. 2018.

FERLAY, J., *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int. J. Cancer.** 144: 1941-1953. 2019.

FOUAD, Y., ANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res.** 7(5):1016–1036. 2017.

GERL, R. *et al.* Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carcinogenesis.** 26(2): 263–270. 2005.

GIBSON, E. & MAHDY, H. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary. [Updated 2019 Aug 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545187>.

GLOBOCAN 2018. World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>.

GONÇALVES, G.A.R. & PAIVA, R.M.A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (São Paulo).** 15(3):369–375. 2017.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell.** 100 (1): 57-70, 2000.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell.** 144 (5): 646-674, 2011.

HANNA, J. *et al.* The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. **Front Genet.** 16(10):478. 2019.

HE, J. & JIANG, B. Interplay Between Reactive Oxygen Species and MicroRNAs in Cancer. **Curr Pharmacol.** **2**, 82–90. 2016.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2019.

- JACKSON, S.E. & CHESTER, J.D. Personalised cancer medicine. **Int J Cancer**. 137(2):262-6. 2015.
- JIN, X. & MU, P. Targeting Breast Cancer Metastasis. **Breast Cancer (Auckl)**. 9(1):23–34. 2015.
- KIM, A. et al. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Triple-Negative Breast Cancer. **J Breast Cancer**. 20(2):150–159. 2017.
- KOSSAI, M. et al. Genestie C.Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. **Pathobiology**. 85(1-2):41-49. 2018.
- LUO, H. et al. “The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies.” **PloS one**. 13(1). 2018
- MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clin Med Insights Pathol**. 8:23–31. 2015.
- MATULONIS, U. et al. Ovarian cancer. **Nat Rev Dis Primers**. 2:16061. 2016.
- McLAREN, et al. Fertility preservation in women of reproductive age with cancer **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. 207(6): 455 – 462. 2012.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- NEDELJKOVIC, M. & DAMIJANOVIC, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. **Cells**. 8(9): 957. 2019.
- NDUKWE, C.O., et al. Profile of human epidermal growth factor receptor 2 expression in epithelial ovarian carcinomas: A multicenter study from Southeast Nigeria. **J Sci Soc**. 45:57-62. 2018.
- NHI. National Cancer Institute. What is Cancer? 2015. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer?>
- OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **J Pharm Sci**. 96(9):2181-96. 2007.
- PAN, M.H., et al. Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate **Food Funct**. 2(2):101-10. 2011.
- PAUL, A. & PAUL, S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. **Front Biosci (Landmark Ed)**. 19:605–618. 2014.

- PIETKIEWICZ, S. et al. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. **Journal of Immunological Methods**. 423:99–103. 2015.
- POMERANTZ, M.M.; FREEDMAN, M.L. The genetics of cancer risk. **Cancer J**. 17(6):416–422. 2011.
- QU, Y. et al. Inhibition of paclitaxel resistance and apoptosis induction by cucurbitacin B in ovarian carcinoma cells. **Oncol Lett**.14(1):145–152. 2017.
- REDZA-DUTORDOIR, M. & AVERILL-BATES, D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**. 1863(12):2977-2992. 2016
- ROGALLA, S. & CONTAG, C. Early Cancer Detection at the Epithelial Surface. **The Cancer Journal**. 21(3):179–187. 2015.
- ROOTH, C. Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. **British Journal of Nursing**, 22(17): S23–S30. 2013.
- SCHLEMMER, F. Imitadores sintéticos de miR-7 e miR-34a associados ao paclitaxel na terapia experimental in vitro de câncer de mama. Dissertação (mestrado em ciências da saúde). Universidade de Brasília, 2019.
- SHARMA, G.N., et al. Various types and management of breast cancer: an overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, 1(2): 109–126. 2010.
- SHU, J., et al. Dynamic and Modularized MicroRNA Regulation and Its Implication in Human Cancers. **Sci Rep**. 7, 13356. 2017.
- SIEGEL, R.L., et al. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 69: 7-34. 2019.
- SOOJIN, A. et al. Genetic Testing in Patients with Newly Diagnosed Breast Cancer: Room for Improvement. **Journal of Clinical Oncology**. 35(20): 2221-2223. 2017.
- STEWART, C., et al. Ovarian Cancer: An Integrated Review. **Semin Oncol Nurs**. 35(2):151-156. 2019.
- SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Mol Cancer**. 14:48. 2015.
- SUN, Y.S., et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **Int J Biol Sci**. 13(11):1387–1397. 2017.
- TAN, W., et al. MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. **Oncol Lett**. 15(3):2735–2742. 2018.
- TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. **Pharm Res**. Jul;34(7):1339-1363. 2017.

- VERA, O., et al. DNA Methylation of miR-7 is a Mechanism Involved in Platinum Response through MAFG Overexpression in Cancer Cells. **Theranostics**. 7(17): 4118-4134. 2017.
- VISTICA, D.T., et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res**. 15(51):2515–2520. **1991**.
- VOUTSADAKIS, I.A. Hormone Receptors in Serous Ovarian Carcinoma: Prognosis, Pathogenesis, and Treatment Considerations. **Clinical Medicine Insights Oncology**. 10 17-25. 29. 2016.
- VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Arch**. 465:1–14 2014.
- WAKS A.G., et al. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA**. 321(3):288-300. 2019
- WEAVER, B. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Mol Biol Cell**. 25(18):2677–2681. 2014.
- WEINBERG, R. A. **The biology of Cancer**. second. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2014.
- WHITEMAN, D. & WILSON, L. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. **Cancer Epidemiol**.44:203-221. 2016
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer fact sheets 2018. Disponível em : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Noncommunicable diseases. Disponível em : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- ZHAO, J. et al. MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy. **Cancer Cell Int**. 15, 103. 2015.
- ZHOU, X. et al. MicroRNA-7 Inhibits Tumor Metastasis and Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition through AKT/ERK1/2 Inactivation by Targeting EGFR in Epithelial Ovarian Cancer. **PLoS ONE**. 9(5): 96718. 2014.
- ZINGER, A. et al. Cancer and Aging - the Inflammatory Connection. **Aging and disease**. 8(5): 611-627. 2017.
- ZUGAZAGOITIA, J. et al. Current Challenges in Cancer Treatment. **Clinical Therapeutics**. 38(7):1551-66. 2016.