

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (Modalidade: Bacharelado)

MOXIDECTINA COMO UMA POTENCIAL DROGA ANTITUMORAL

ANA LUIZA DE ARAÚJO BUTARELLI

**SÃO LUÍS/MA
2021**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (Modalidade: Bacharelado)

MOXIDECTINA COMO UMA POTENCIAL DROGA ANTITUMORAL

ANA LUIZA DE ARAÚJO BUTARELLI

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

SÃO LUÍS/MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Butarelli, Ana Luiza de Araújo.

Moxidectina como uma potencial droga antitumoral / Ana Luiza de Araújo Butarelli. - 2021.

51 p.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.
Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís -MA, 2021.

1. Anti-helmíntico. 2. Apoptose. 3. Efeito antiproliferativo. 4. Potencial antineoplásico. I. dos Santos, Ana Paula Silva de Azevedo. II. Título.

ANA LUIZA DE ARAÚJO BUTARELLI

MOXIDECTINA COMO UMA POTENCIAL DROGA ANTITUMORAL

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 14/05/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

(Orientadora)

Dr^a. Josélia Alencar Lima

1º Membro

Dr^a. Lilaléa Gonçalves França

2º Membro

A todos aqueles que me ajudaram a chegar até aqui, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela vida e por ter me ajudado a chegar até aqui. Por todas as pessoas incríveis que colocou ao meu redor e por me permitir alcançar meus sonhos.

Aos meus pais, Ana Cristina e Edson, que me deram todo o amor e zelo do mundo. Obrigada por sonharem junto comigo, por me apoiarem não importando quais sejam as minhas decisões, por todos os abraços e consolos nos momentos em nada parece dar certo e por serem os melhores pais e amigos que eu poderia ter. Amo vocês incondicionalmente.

À minha melhor amiga, Ana Carolina. Que coincidentemente também é a minha irmã. Você é a pessoa que eu mais confio e acredito no mundo. A pessoa com quem eu sempre posso contar, que me aconselha e me inspira tanto na vida quanto na profissão. Obrigada por ser incrível e também por ser a minha pessoa. Te agradeço por me inspirar a ser a melhor versão de mim, por ser tão especial, dedicada e por sempre acreditar no meu potencial. Amo você.

À minha orientadora, que é, sem sombra de dúvidas, uma das pessoas mais inteligentes que eu conheço. Professora, muito obrigada por todos os ensinamentos, puxões de orelha, por ter acreditado em mim e também pela oportunidade na ciência. Quero ser igual à senhora quando eu crescer.

Aos meus amigos, que tanto me apoiaram e me encorajaram a seguir meus sonhos e a fazer o que me faz feliz. Nos meus momentos mais difíceis, ansiosos e solitários vocês me deram a força e o apoio que eu precisava para seguir em frente. Thauana e Gal, obrigada pela amizade, companheirismo e inspiração. Vocês são mulheres maravilhosas, inteligentes e inspiradoras que sempre terão um espaço de 1000 m² no meu coração. Leo, Robson, Lucas e Celso, obrigada por sempre estarem presentes, por me animarem nos momentos de dificuldade e pelos abraços reconfortantes (espero que possamos nos abraçar novamente em breve). Desejo todo o sucesso a vocês. Danrley, Juliana e Wagner, meu grupo de todos os trabalhos na graduação, mas também de laboratório, monitoria e desespero (rs). Sou grata por ter conhecido vocês, pela amizade e pelo apoio. Dividir a graduação com vocês deixou tudo mais leve.

Aos meus amigos e colegas de profissão do LIAC que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Aos meus colegas de iniciação científica com quem compartilhei os perrengues dos relatórios e SEMICs: Mariana, Danrley, Eduardo e Ana Paula. Um abraço virtual para os membros da comissão da pia.

Aos meus também amigos de laboratório e jornada, André e Sulayne, que são as pessoas mais dedicadas, inteligentes e amáveis que eu já tive a oportunidade de conhecer. Obrigada por dividirem comigo os momentos bons e ruins da vida científica, mas também por me ouvirem, aconselharem, ensinarem, ajudarem a executar os experimentos e também me acalmarem nos momentos de desespero. Admiro muito vocês dois e desejo que todos os seus sonhos se concretizem (até o de ser herdeiro(a)). Sem vocês esse trabalho não existiria.

Ao grupo PET, pelos 3 anos mais agitados e proveitosos da minha graduação. Agradeço à minha tutora e amiga, Mayara, por todo apoio e por sempre acreditar em mim. Um agradecimento especial para os amigos que fizeram parte dessa jornada comigo: Carolina, Léo, Winne, Eulália, Thauana, Robson, Greyck, Gabi Florêncio, Gabi Almeida, Thalita, Juliana, Lucas, Ítalo, Luís e Ricardo, pela amizade e momentos juntos até tarde da noite escrevendo resumos, preparando seminários e organizando eventos.

À Thalita pela amizade e por todos os momentos especiais que passamos juntas, tanto na faculdade como fora dela.

À Larissa Lillian, Wanessa e Silmara por todos os anos de amizade e por todo o apoio. Obrigada por dividirem comigo alegrias, angústias e entusiasmo desde o ensino médio.

Ao professor Lívio que foi quem abriu as portas do mundo da Moxidectina para mim. Muito obrigada pela confiança e pelo incentivo. Um agradecimento especial à Dauana, que se tornou uma grande amiga e com quem pude dividir meus sentimentos de angústia e preocupação. Seu apoio e encorajamento me deram muita força.

Aos professores e colaboradores do departamento de Ciências Biológicas por todos os ensinamentos e por todo o apoio. Em especial à Dna. Linair pela paciência e dedicação.

Aos professores e alunos do LIF e LPI pelo apoio, ensinamentos e parceria.

À Prof^a Vera, pela amizade, ensinamentos, apoio e acolhimento nos momentos de aperto. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e por dividir suas histórias comigo.

À todos os meus amigos da turma de 2016.1 por fazerem parte da minha jornada na UFMA e também por dividirem comigo momentos tão especiais e importantes. Juliana, Danrley, Wagner, Giovanna, Amanda, Lucas, Sara, Thayres, Larissa, Diogo, Fabrício, obrigada pela amizade e pelos momentos compartilhados, guardo todos eles com muito carinho.

Meu muito obrigada à todos os alunos da biologia por serem incríveis e tornarem o nosso curso um espaço tão legal.

Aos meus amigos que não estão por perto, mas que sempre têm um espaço reservado aqui dentro Jean, Hérica, Kleber, Thaynan, Ana Paula, Abdênego e Mariana.

*“As manhãs virão novamente
Porque nenhuma escuridão, nenhuma estação
Pode durar para sempre”*

(BTS - Spring Day)

RESUMO

A Moxidectina (MOX) é um anti-helmíntico de amplo espectro pertencente à família das lactonas macrocíclicas. Com base na filosofia de reaproveitamento de fármacos é possível descobrir novos alvos terapêuticos para drogas já disponíveis no mercado e, ao contrário de algumas drogas pertencentes à sua família, a MOX carece de estudos que explorem seu potencial antitumoral. Desta forma o presente estudo buscou avaliar o potencial antitumoral da MOX em linhagem tumoral de câncer de mama. Para tal, foram realizados testes de citotoxicidade com a MOX nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 nM durante 24, 48 e 72 horas nas linhagens MCF-7 (tumoral) e MCF-10A (normal). Em 24 horas de tratamento a MOX não provocou perda de viabilidade significativa na linhagem tumoral, sendo este efeito citotóxico observado no tempo de tratamento de 48 h, seguido de uma recuperação discreta após 72 h. Na linhagem normal, a MOX induziu uma queda de 20 a 30% da viabilidade nas primeiras 24h de tratamento e manteve o número de células viáveis constante nos tempos subsequentes. A concentração inibitória média (IC₅₀) e o índice de seletividade (IS) revelaram que a MOX exerceu efeito seletivo, principalmente nos tempos de tratamento de 48 (IS= 37,89) e 72 hs (IS= 2,78), causando citotoxicidade mais acentuada na linhagem tumoral. Para verificar a influência do tratamento da MOX na morfologia da célula tumoral foram adquiridas micrografias das células MCF-7 antes e após o tratamento de 48h nas concentrações de 25, 50 e 100 nM. Foram observadas características indicativas de processo apoptótico como diminuição do volume celular, granulação do citoplasma, alterações no padrão de aderência e alterações nucleares. Para verificar o mecanismo de indução da morte celular programada foi realizada a análise do ciclo celular. Os resultados demonstram que a MOX nas concentrações de 50 e 100 nM induziu a parada do ciclo celular na fase S, indicando efeito antiproliferativo. Trabalhos anteriores já apontavam que a MOX em linhagem de glioma reduziu a expressão de CDK2 e ciclina E, duas proteínas ligadas à síntese de DNA na fase S do ciclo celular. O ensaio de apoptose com anexina V e iodeto de propídeo ratificou os dados observados na avaliação morfológica, indicando que a MOX também é capaz de induzir as células tumorais à apoptose. Desta forma, sugere-se que a MOX causa a estagnação das células tumorais na fase S do ciclo celular, o que leva à indução da apoptose, demonstrando um bom potencial antitumoral.

Palavras-chave: Anti-helmíntico, potencial antineoplásico, efeito antiproliferativo, apoptose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química da Moxidectina (MOX). Fonte: American Chemical Society (2018). 19

Figura 2- Equação do Índice de seletividade (IS) de acordo com Zingue et al. (2016). O modelo tem como objetivo demonstrar se a MOX possui efeito seletivo para a linhagem tumoral. 26

Figura 3- À esquerda, método de identificação da população de interesse a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) na escala logarítmica. À direita, dot plot formado pelos parâmetros de fluorescência obtidos nos canais verde (GREEN-B), referente à marcação com Anexina 5-FITC (ANX), e canal vermelho (RED-B), referente à marcação com iodeto de propídeo (IP), na escala logarítmica. No gráfico Q1 se refere à população marcada apenas com ANX, indicando apoptose inicial, Q2 se refere à população celular com dupla marcação, indicando apoptose tardia, Q3 se refere à população marcada apenas com IP, indicando necrose, e por fim Q4 se refere à população duplo negativa, indicando a população de células viáveis. 28

Figura 4- Mox inibe a viabilidade das células da linhagem MCF-10A após tratamento com as concentrações indicadas nos gráficos durante 24, 48 e 72 horas de tratamento. * $P < 0,05$ em relação ao controle negativo (NC) e # $P < 0,05$ em relação ao controle positivo (PC). 1

Figura 5- Mox inibe a viabilidade das células da linhagem MCF-7 após tratamento com as concentrações indicadas nos gráficos durante 24, 48 e 72 horas de tratamento. * $P < 0,05$ em relação ao controle negativo (NC) e # $P < 0,05$ em relação ao controle positivo (PC). 1

Figura 6- Os gráficos expressam as curvas de dose resposta da MOX nas linhagens celulares MCF-10A e MCF-7. Os dados estão expressos como média \pm DP. 31

Figura 7- Efeito da Moxidectina na morfologia das células da linhagem MCF-7 tratada nas concentrações de 25, 50 e 100 nM de MOX durante 48h. (A-C) Micrografia das culturas de MCF-7 antes do tratamento com a MOX. As células foram plaqueadas em uma concentração de $2,5 \times 10^4$ suspensas em 400 μ L de meio suplementado. As fotos foram tiradas após 24h de incubação das placas a 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%. (D-F) Micrografia das culturas tratadas com MOX 25 nM durante 48h. Destacam-se os prolongamentos citoplasmáticos e o

aumento do volume celular. (G-I) Micrografia das culturas tratadas com MOX 50 nM durante 48h. Sinais apoptóticos evidentes podem ser observados na cultura como diminuição do volume celular, alterações nucleares e presença de vacúolos citoplasmáticos aberrantes. (J-L) Micrografia das culturas tratadas com MOX 100 nM durante 48h. Sinais de apoptose tardia podem ser observados como grânulos apoptóticos, células com volume reduzido, alteração da adesão celular e granulação intensa. (M-O) Micrografia das culturas tratadas com o Controle negativo (NC). 34

Figura 8- O gráfico representa a porcentagem de células da linhagem MCF-7 distribuídas nas fases G1, S e G2 do ciclo celular após o tratamento com MOX durante 48h. Os dados estão expressos como média \pm DP. *P <0,05 em relação ao controle negativo (NC). 37

Figura 9- Distribuição da população de células nas fases do ciclo celular. Em azul, a população observada na fase G1 do ciclo. Em amarelo, a população presente na fase S. Em verde, a população presente na fase G2. É possível observar o aumento da base dos picos da fase S ao longo dos tratamentos com MOX, em relação ao NC. Destaca-se também a discreta redução do número de células presentes na fase G1/G0 nas células depois de tratadas. 38

Figura 10- O gráfico demonstra a porcentagem de células da linhagem MCF-7 encontram-se viáveis, em estado de apoptose inicial, tardia ou necrose após tratamento com MOX durante 48 horas. Os dados estão expressos como média \pm DP. *P <0,05 e ** P <0,01 em relação ao controle negativo (NC). 41

Figura 11- Esquema hipotético do mecanismo antitumoral da MOX induzindo citotoxicidade seletiva em linhagem tumoral MCF-7. 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração inibitória média da MOX nas linhagens MCF-7 e MCF-10A nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas. 30

Tabela 2- Valores do IS das IC50 das linhagens MCF-7 e MCF-10. 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}/\text{kg}$:	Micrograma por quilo
μL :	Microlitro
adr:	Adriamicina ou doxorubicina
ANX:	Anexina V
BSA:	Albumina sérica bovina
CDK:	Quinase dependente de ciclina
cm:	Centímetro
CYP450:	Citocromo P450
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ER:	Receptor de estrogênio
GABA-A:	Receptor de ácido gama-aminobutírico
h:	Horas
IC ₅₀ :	Concentração Inibitória Média
IP:	Iodeto de propídeo
IS:	Índice de seletividade
IVM:	Ivermectina
LMs:	Lactonas macrocíclicas
MB:	Milbemicina
MDR:	Resistência à múltiplas drogas
mg/kg:	Miligrama por quilo
mg:	Miligrama
mL:	Mililitro
MOX:	Moxidectina
MRPs:	Proteínas associadas à multirresistência
MTT:	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NC:	Controle negativo
nM:	Nano molar
PBS:	Tampão Fosfato-Salino
PC:	Controle positivo
P-gp:	Glicoproteína P
PR:	Receptor de progesterona
RNase:	Ribonuclease
rpm:	Rotações por minuto
SFB:	Soro Fetal Bovino
μM :	Micro Molar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

1.1 CÂNCER 14

1.2 MODELO *IN VITRO* 15

1.3 LACTONAS MACROCÍCLICAS E SUAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS 16

1.4 MOXIDECTINA 17

1.4.1 Caracterização química 17

1.4.2 Aplicações terapêuticas 18

1.4.3 Potencial antitumoral 19

2. JUSTIFICATIVA 21

3. OBJETIVOS 23

3.1 OBJETIVO GERAL 23

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

4. METODOLOGIA 24

4.1 PREPARAÇÃO DA MOX 24

4.2 CULTURA DAS LINHAGENS CELULARES 24

4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE 24

4.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE 25

4.5 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR 25

4.6 APOPTOSE E CICLO CELULAR 26

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 28

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 28

5.1 CITOTOXICIDADE E SELETIVIDADE DA MOX 28

5.1.1 Citotoxicidade da MOX em MCF-7 e MCF-10A 28

5.1.2 Determinação da IC₅₀ e Índice de seletividade 30

5.2 MORFOLOGIA CELULAR 33

5.3 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR 35

5.4 INDUÇÃO DA APOPTOSE 40

6. CONCLUSÃO 42

REFERÊNCIAS 44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2020), o câncer está entre as principais causas de mortalidade no mundo, com aproximadamente 20 milhões de novos casos e 9,9 milhões de mortes somente no ano de 2020. Neste cenário, é esperado que a incidência aumente em 70% nas próximas duas décadas. No Brasil, mais de 590 mil casos de câncer foram registrados somente no ano passado (2020) (IARC, 2020; INCA, 2020). Sendo uma das principais doenças deste século e um importante problema de saúde pública, as pesquisas sobre o câncer têm sido um dos principais focos da ciência nos últimos anos, investigando, além de tratamentos e meios de prevenção, os complexos mecanismos que envolvem a formação, desenvolvimento e estabelecimento de tumores (DUARTE, 2010).

O câncer é um fenômeno que tem origem a partir de mutações na sequência de nucleotídeos no DNA que alteram vias cruciais responsáveis por regular a homeostase celular e tecidual, diferenciação, replicação e morte celular (VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006). As alterações genéticas podem ser resultado de fatores intrínsecos, como mutações hereditárias e erros aleatórios na replicação do DNA, ou de fatores extrínsecos, como danos causados por radiação, produtos químicos ou infecções por patógenos com potencial oncogênico (TANNOCK, 2005). Apenas 5 a 10 % de todos os cânceres são resultantes de defeitos genéticos hereditários, sendo os fatores ambientais os principais agentes promotores e iniciadores do processo neoplásico, como tabagismo, alcoolismo, raio ultravioleta, infecções virais, envelhecimento e dieta (ANAND et al., 2008).

Apesar de existirem diversos fatores e fenômenos moleculares e/ou ambientais que levam uma célula normal a se transformar em uma célula neoplásica em um processo denominado oncogênese ou carcinogênese (HANAHAN; A WEINBERG, 2000). O desfecho observado é quase sempre o mesmo: células com capacidade de multiplicação ilimitada, evasão de sinais supressores de crescimento, invasão de tecidos (metástase), resistência à morte celular programada (apoptose), estimulação da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), manutenção da sinalização proliferativa, reprogramação do metabolismo energético, evasão da vigilância e destruição imunológica, instabilidade do genoma e processo inflamatório não resolutivo (WANG *et al.*, 2017, HANAHAN; A WEINBERG, 2011). Embora se tenha conhecimento de um vasto número de tipos e subtipos de cânceres, as

características supracitadas são expressas de forma particular pela maioria dos tumores (HANAHAN; A WEINBERG, 2011; FOUAD; AANEI, 2017).

O tratamento de neoplasias malignas é, em grande parte, realizado a partir da utilização de agentes quimioterápicos, sendo estes utilizados no tratamento primário, na terapia adjuvante e na palição (MELLOR *et al.*, 2008). A toxicidade dos fármacos quimioterápicos, em algumas circunstâncias, cria obstáculos no tratamento do câncer com base na oncologia atual.

As drogas utilizadas no tratamento quimioterápico primariamente têm como alvo principal as células em proliferação constante e/ou rápida, sendo assim, deve interferir no programa bioquímico envolvido com a replicação celular e causar a morte celular (MELLOR *et al.*, 2008). Muitos agentes quimioterapêuticos que eliminam as células cancerígenas por vias de processos redox, como através da produção de espécies reativas de oxigênio e a indução de apoptose ou necrose de células tumorais; outros medicamentos ligam-se ao material genético da célula causando danos e indução da apoptose (BAXTER-HOLLAND *et al.*, 2018); enquanto outros atuam sobre vários componentes do metabolismo celular influenciando as atividades de diferentes enzimas necessárias para a divisão celular (VARGAS; APETOH, 2017). No entanto, apesar de apresentar certa eficácia no tratamento das células cancerosas, a maioria dos quimioterápicos causa diversos efeitos colaterais a partir da indução da morte de células saudáveis do organismo, induzindo o processo apoptótico das células normais (SAK, 2012; VARGAS; APETOH, 2017).

1.2 Modelo *in vitro*

A cultura celular é uma técnica que permite compreender a biologia celular, a morfologia tecidual, os mecanismos de doenças, a ação de drogas, a produção proteica e o desenvolvimento da engenharia de tecidos (SANYAL, 2014). Tal ferramenta é constantemente utilizada nas pesquisas pré-clínicas de diversos medicamentos, na pesquisa do câncer e em estudos sobre as funções de gene, com o intuito de elucidar os processos celulares, moleculares e genéticos neles envolvidos (KAPALCZYŃSKA *et al.*, 2016).

Os ensaios *in vitro* vêm ao longo de vários anos produzindo dados importantes para a triagem de possíveis fármacos de uso clínico, sendo capazes de prever com eficiência a sensibilidade dos tumores à potenciais novos tratamentos (HOFFMAN *et al.*, 1991). Os modelos *in vitro* simulam as condições *in vivo*, em vários graus, e podem fornecer uma

alternativa aos modelos animais, sendo possível realizar diversos testes funcionais com alta reprodutibilidade (KAPAŁCZYŃSKA *et al.*, 2016).

Para o estudo do câncer de mama, diversos modelos *in vitro* foram desenvolvidos com o objetivo de identificar e elucidar os mecanismos de ação de possíveis fármacos e produtos químicos encontrados no ambiente que podem ter efeitos sobre o processo de carcinogênese das células do tecido mamário. Estas pesquisas já foram capazes de identificar uma série de vias importantes que são alvos terapêuticos importantes no tratamento do câncer de mama (MORGAN *et al.*, 2020). Dois destes modelos de linhagem celular são as linhagens MCF-7 e a MCF-10.

As células da linhagem MCF-7 foram estabelecidas em 1973 tendo sido isoladas do derrame pleural de uma mulher de 69 anos com doença metastática (SOTIRIOU *et al.*, 2003). Amplamente utilizado, trata-se de um dos modelos de câncer de mama que mais gera dados no estudo e na aplicação clínica por representar o subtipo mais frequente de carcinoma mamário observado na população feminina mundial (COMŞA *et al.* 2015). Essas células da linhagem celular MCF-7 possuem receptores de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR) e pertencem ao subtipo molecular luminal A. Caracterizam-se por serem pouco agressivas e pouco invasivas, normalmente consideradas como tendo baixo potencial metastático (GEST *et al.*, 2013; SHIRAZI *et al.*, 2011).

Isoladas em 1990 e utilizadas como modelo de célula normal, as células da linhagem MCF-10A são derivadas de tecido mamário epitelial proliferativo benigno e imortalizadas espontaneamente sem fatores definidos. Além de não expressar receptores de estrogênio, a linhagem exibe algumas características do epitélio mamário normal como a falta de crescimento independente de ancoragem e a dependência de fatores de crescimento e hormônios para proliferação e sobrevivência (QU *et al.*, 2015; SOULE *et al.* 1990). Semelhante à MCF-7, a linhagem MCF-10A também é um dos modelos mais utilizados no estudo da resposta do tecido mamário, sendo utilizada em conjunto a linhagens tumorais no estudo do câncer como uma forma de controle (KHEILTASH *et al.*, 2020; BRAND *et al.*, 2019; ALAEE *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2008).

1.3 Lactonas macrocíclicas e suas atividades farmacológicas

As lactonas macrocíclicas (LMs) compõem um conjunto de compostos hidrofóbicos, estruturalmente relacionados, amplamente utilizados em animais e humanos e também para o controle de pragas em plantações (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012). As LMs são conhecidas por serem uma família de endectocidas que se destacam por sua atividade de amplo espectro, perfil de segurança e facilidade de administração (KITA *et al.*, 2007; MOLYNEUX *et al.*, 2003; MCKELLAR *et al.*, 1996), sendo eficazes contra cepas de nematóides resistentes a benzimidazol, levamisol e pirantel, características que representaram uma revolução na luta contra as parasitoses no final dos anos 1970 (MCKELLAR *et al.*, 1996). O mecanismo de ação das LMs em parasitas é relacionado à ligação desta família de compostos à canais de cloreto dependentes de ligante, especificamente os subtipos que são mediados por ácido gama-aminobutírico (GABA-A) e dependentes de glutamato (SHOOP *et al.*, 1995). A consequência desta ligação irreversível mantém o canal de cloreto aberto, levando a uma hiperpolarização ou despolarização muito duradoura do neurônio e/ou célula muscular e, portanto, bloqueando a função adicional do parasita, levando-o à morte (GAO *et al.*, 2010; COBB; BOECKH, 2009).

Dentro da grande família das LMs, as subfamílias das avermectinas e milbemicinas recebem destaque por atraírem a atenção da indústria química agropecuária devido sua grande atividade contra artrópodes e nematóides (endo e ectoparasitas), baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental, e modo único de ação. Essas subfamílias têm em comum o anel de lactona macrocíclica de 16 membros fundido com as funções benzofurano e espirocetal em um arranjo tridimensional, que é reconhecido por receptores de canais iônicos de cloreto específicos (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012; DAVIES; GREEN, 1986).

1.4 Moxidectina

1.4.1 Caracterização Química

A Moxidectina (MOX) é um endectocida potente de amplo espectro com atividade contra diversas espécies de nematóides, e artrópodes pertencente à subfamília das milbemicinas (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012; COBB; BOECKH, 2009). Foi isolada pela primeira vez em 1967, sendo uma derivada semissintética da metoxima do LL F-2924 α , conhecida como nemadectina, produto de fermentação da bactéria gram-positiva *Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* (ZULALIAN *et al.*, 1994; COBB; BOECKH, 2009).

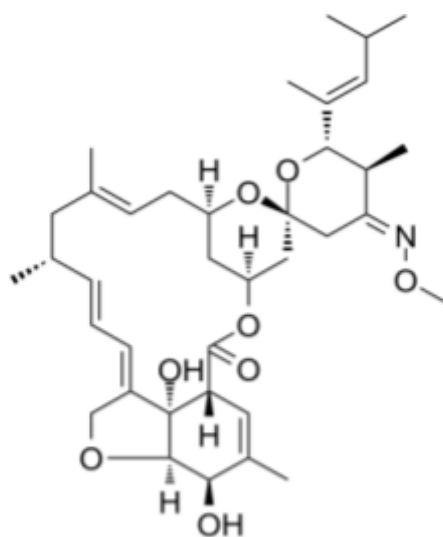


Figura SEQ Figura 1* ARABIC 1- Estrutura química da Moxidectina (MOX). Fonte: American Chemical Society (2018).

Apesar de pertencer à mesma família de compostos da ivermectina (IVM) e possuírem mecanismos de ação muito semelhantes, a MOX difere estruturalmente pela falta de fração de açúcar ligada ao carbono 13 do anel macrocíclico, na presença de uma cadeia lateral olefínica no carbono 25 e uma fração metoxima no carbono 23 (Figura 1) (MILTON *et al.*, 2020; PRICHARD *et al.*, 2012).

Devido a essas peculiaridades estruturais, a MOX apresenta também apresenta maior lipofilicidade, interação fraca com os transportadores da glicoproteína P (P-gp) em mamíferos, menor potencial neurotóxico e menor capacidade de causar superexpressão de P-gps e de proteínas associadas a multirresistência (MRPs) em nematoides que a IVM (JANKO; GEYER, 2013; ARDELLI; PRICHARD, 2008; LESPINE *et al.*, 2006).

Sendo um composto de Classe II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, a MOX apresenta alta permeabilidade e baixa solubilidade. Sua absorção é rápida, apresentando o pico de concentração de 3 a 4 horas (KORTH-BRADLEY *et al.*, 2012). Uma vez absorvida, a MOX apresenta grande distribuição e meia-vida longa, de cerca de 20 a 43 dias em seres humanos, que se deve principalmente por sua alta lipofilicidade, que permite maior retenção da droga no tecido adiposo (MILTON *et al.*, 2020; PRICHARD *et al.*, 2012).

Quanto ao seu metabolismo, a MOX não apresenta interações clinicamente importantes relacionadas às enzimas do citocromo P450 (CYP450) (MILTON *et al.*, 2020),

sendo considerada um substrato limitado às enzimas do metabolismo CYP em estudo *in vitro* com microsomas hepáticos de mamíferos (DUPUY *et al.*, 2001).

1.4.2 Aplicações terapêuticas

A MOX é principalmente utilizada no tratamento de parasitoses de importância veterinária devido sua estabilidade molecular, versatilidade, eficácia, segurança e lipofilicidade, característica que garante meia-vida longa e, por consequência, mais tempo de proteção contra infecções parasitárias (MILTON *et al.*, 2020; PRICHARD *et al.*, 2012). As doses utilizadas no tratamento das parasitoses variam de 3µg/kg a 2.5mg/kg e podem ser aplicadas na forma de comprimidos, injeções, géis, pastas orais ou soluções tópicas (PRICHARD *et al.*, 2012).

Na atualidade, a MOX é prescrita para o tratamento de um amplo espectro de parasitas internos e externos como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em ovelhas, *Dirofilaria immitis* em cães e gatos, *Otodectes cynotis* em cães, estágios imaturos e adultos de lombrigas e ancilostomídeos em cães e gatos, tricurídeos e vermes pulmonares de cães, ácaros da sarna sarcóptica e ácaros do gênero *Demodex*, nematódeos em equinos e em pequenos ruminantes (MILHES *et al.*, 2017; COBB; BOECKH, 2009; ZULALIAN *et al.*, 1994).

Em humanos, a MOX é utilizada no tratamento de Oncocercose (*Onchocerca volvulus*), no entanto já existem estudos em fase II que apontam a eficiência da MOX em conjunto com Albendazol contra Tricuríase (*Trichuris trichiura*) em adolescentes (KELLER *et al.*, 2019). Por ser um microfilaricida potente, de efeito prolongado e ter demonstrado desempenho clínico superior em relação à IVM, a MOX possui potencial para viabilizar e acelerar a eliminação da oncocercose no contexto mundial (MILTON *et al.*, 2020).

1.4.3 Potencial Antitumoral

No que diz respeito ao potencial antitumoral da MOX, poucas pesquisas foram realizadas. No trabalho de Song *et al.* (2018) a MOX apresentou atividade antitumoral em células de glioma das linhagens U251 e C6 *in vitro*, e *in vivo* a partir de xenotransplante em camundongos BALB/c. A MOX, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50µM foi capaz de diminuir a viabilidade das células tumorais e apresentou maior citotoxicidade nas linhagens celulares tumorais que na linhagem celular normal (SVG P12). Ainda *in vitro* a MOX diminuiu a capacidade clonogênica, induziu a apoptose, modulou a expressão de proteínas

pró-apoptóticas e associadas ao ciclo celular e induziu as células tumorais a parada na fase G0 e G1 do ciclo celular. *In vivo*, a MOX foi capaz de retardar o crescimento do xenoenxerto e aumentar a taxa apoptótica no tecido tumoral a partir da modulação proteica demonstrada nas etapas *in vitro*.

Na base de dados do PubMed foram identificados apenas 21 trabalhos com as palavras-chave *Moxidectin* e *cancer*, sendo que parte deles não utiliza a MOX como substância de estudo, apenas como citação. Apesar dos escassos trabalhos que demonstram o potencial da MOX na pesquisa relacionada aos tumores, já existem estudos que utilizam outras LMs na terapia antitumoral. Sabe-se, por exemplo, que as avermectinas, subfamília a qual pertence a IVM, em estudo realizado por Korystov *et al.* (2004), foram capazes de aumentar significativamente a sensibilidade de células tumorais das linhagens Hep-2 e P388 ao taxol e vincristina em um ensaio de sinergismo ou combinação. Estas propriedades podem ser usadas na terapia dos tumores, ao combinar a aplicação de avermectinas com preparações antitumorais com o objetivo de aumentar a efetividade dos tratamentos (KORYSTOV *et al.*, 2004).

Outras avermectinas como a avermectina C e a avermectina B1 também já se mostraram potentes agentes antitumorais no tratamento das linhagens de Carcinoma de Ehrlich, P388, CA-755 e B16 *in vivo*. Esses dois compostos reduziram em cerca de 70-80% o crescimento das linhagens tumorais. Quando injetadas após a administração de vincristina, as avermectinas foram capazes de aumentar a supressão induzida pelo quimioterápico no crescimento das células do carcinoma de Ehrlich, B16 e P388 (DRINYAEV *et al.*, 2004).

A IVM é bem caracterizada a nível experimental como um potencial agente anticâncer sendo eficaz no tratamento de linhagens de câncer de ovário humano e linhagem tumoral NF2 (HASHIMOTO *et al.*, 2009), linhagens de leucemias (SHARMEEN *et al.*, 2010), linhagens de câncer de mama (DOU *et al.*, 2016) e linhagens de câncer de cólon, glioma, melanoma e carcinoma bronquiolar de não pequenas células (MELOTTI *et al.*, 2014). Tais estudos indicam que a ivermectina é uma opção em potencial para o tratamento de diversos tipos tumorais. Por possuir semelhanças no mecanismo de ação da IVM, supõe-se que a MOX também se apresenta como um agente promissor no tratamento do câncer.

No grupo das lactonas macrocíclicas, a investigação da atividade antitumoral concentra-se, até o momento, na família das avermectinas, em especial a ivermectina, uma vez que esta representa a droga mais estudada e amplamente utilizada do grupo (JUAREZ *et al.*, 2018). Sua ação antitumoral já foi comprovada em células da linhagem de câncer de mama, entre elas a MCF-7. Por meio da ativação dos mecanismos autofágicos celulares, a

ivermectina levou a inibição tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstrando seu potencial quimioterápico, em adição a sua ação antiparasitária (DOU *et al.*, 2016).

Gao *et al.* (2011) utilizaram dois novos compostos de milbemicina, milbemicina β 14 e secomilbemicina D, na reversão da resistência a múltiplas drogas (MDR) de células de carcinoma de mama humano resistente à adriamicina (MCF-7/adr) *in vitro*. Foi observado que ambas as milbemicinas apresentaram potencial para aumentar a citotoxicidade da adriamicina em relação às células MCF-7/adr, sugerindo que os dois compostos de milbemicina representam agentes promissores para reverter a MDR na terapia do câncer.

Apesar das similaridades e diferenças entre a ivermectina e a moxidectina, além da comprovada atividade anti-helmíntica bem estabelecida (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012), ainda são poucos os trabalhos que exploram o potencial antitumoral da MOX em relação aos trabalhos referentes à IVM.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento rápido e invasivo de células com mutações em seu genoma. Essas alterações na expressão ou função de genes essenciais para a manutenção da homeostasia celular provocam a perda da capacidade da célula em responder aos sinais de proliferação, diferenciação e morte, adquirindo autonomia de crescimento e tornando-se independentes de controles externos e internos (FREITAS *et al.*, 2010). O tratamento das neoplasias é realizado, de forma mais frequente, a partir de radio ou quimioterapia, entretanto, ambas as alternativas não apresentam grande seletividade, podendo afetar de forma significativa as células saudáveis dos pacientes tratados (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Além da considerável inespecificidade de alguns medicamentos antitumorais, que comprometem parte das células saudáveis do organismo, outro obstáculo clínico enfrentado no tratamento dos cânceres é a responsividade parcial ou inexistente das células tumorais à drogas quimioterápicas, o que acarreta na variação da eficácia do tratamento de paciente para paciente (LAGE *et al.*, 2008).

Segundo previsões de estatísticas globais, em 2050 mais de 20 milhões de pessoas serão diagnosticadas com câncer em todo o mundo. Esse aumento excessivo do número de casos de neoplasias diagnosticadas terá grande influência dos casos de câncer colorretal, próstata e mama, que muitas vezes são incuráveis em estágios avançados com os tratamentos atuais (MCGUIRE, 2016). Desta forma, a busca de novos agentes terapêuticos capazes de

tratar com especificidade e segurança as neoplasias tem sido um dos grandes objetivos dos pesquisadores da área da oncologia. Entretanto, o processo de criação e testagem de uma nova droga demanda tempo e investimento, o que é convertido em altos preços, tornando muitas das novas drogas inacessíveis (SLEIRE *et al.*, 2017).

Com o objetivo de aplicar um fármaco em um tratamento diferente daquele para o qual foi originalmente aprovado, surgiu a filosofia do reaproveitamento ou reposicionamento de fármacos. A reciclagem de drogas tem recebido interesse como alternativa para a síntese de novas drogas (PANTZIARKA *et al.*, 2018), obtendo a vantagem de já possuírem uma grande variedade de dados já disponíveis na literatura, reduzindo assim a necessidade de estudos adicionais de farmacocinética e toxicidade (SLEIRE *et al.*, 2017).

O uso da Moxidectina nos estudos anticâncer também surge do reaproveitamento de fármacos. Possuindo semelhanças farmacológicas e estruturais com outras drogas de sua família que já demonstraram atividade antitumoral, como a ivermectina (JUAREZ *et al.*, 2018), a MOX também apresenta um grande potencial para demonstrar efeitos antitumorais que possam auxiliar no tratamento das neoplasias.

Entretanto, são escassos os trabalhos que avaliam o potencial antitumoral da moxidectina. Desta forma, o presente trabalho pretende analisar o efeito antitumoral desta substância sobre a linhagem de células tumorais MCF-7, uma vez que seria de grande interesse conhecer a capacidade de diferentes lactonas macrocíclicas em induzir respostas antitumorais e, se possível, elucidar seus mecanismos de ação no contexto tumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral da Moxidectina em linhagem tumoral de câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade das culturas tumorais e normais após o tratamento com MOX;
- Verificar possíveis alterações morfológicas das linhagens celulares utilizadas após tratamento com a MOX;
- Determinar a Concentração Inibitória Média (IC_{50}) na linhagem tumoral e normal;
- Analisar a influência da MOX nos mecanismos celulares de proliferação e morte celular.

4. METODOLOGIA

4.1 Preparação da MOX

Foram pesados 64 mg de Moxidectina, cedida pela *Zoetis Manufacturing* (Itália), em tubo de propileno tipo falcon de 15 mL que, em seguida, foram diluídos em 4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril para a obtenção da solução estoque de concentração de 0,025 M. A partir de 10 µL da solução estoque e 990 µL de meio DMEM sem suplementação foi preparada a solução mãe, de concentração igual a 250000 nM, de onde foram realizadas as diluições para a obtenção das menores concentrações de interesse. A concentração final de DMSO nas diluições a serem utilizadas nos experimentos não excedeu 0,1% do volume total. Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizadas as concentrações de 1000, 500, 250, 100, 50 e 10 nM com a finalidade de determinar a Concentração Inibitória Média (IC₅₀).

4.2 Cultura das linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares MCF-7 (linhagem de câncer de mama) e MCF-10A (linhagem celular epitelial não tumorigênica). As mesmas foram mantidas em garrafa de cultura de 75 cm² com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado a 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico, em atmosfera de 5% de CO₂, à 37 °C. Quando as células atingiram 80% de confluência na garrafa, foram repicadas para a obtenção da suspensão celular e realização dos ensaios posteriormente citados. O repique foi realizado utilizando Tampão Fosfato-Salino (PBS) para lavagem das células na garrafa, seguido da adição de 1mL de Tripsina 1x para a dissociação celular enzimática durante 5 minutos à 37 °C. A ação da tripsina foi inibida a partir do acréscimo de 3mL de meio DMEM + 10% SFB. As células suspensas foram contadas em câmara de Neubauer a partir da coloração com azul de Tripán a 0,04%. As células suspensas foram diluídas em meio de cultura de acordo com a viabilidade e o número de células necessárias em cada protocolo de experimentação.

4.3 Ensaio de Citotoxicidade

Para a determinação da citotoxicidade foi realizado o ensaio de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Foram plaqueadas em placas de 96

poços de fundo chato 1×10^4 células e, após 24h de incubação em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 , à 37°C (GAO *et al.*, 2010). As culturas foram tratadas com as concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 nM de MOX durante 24, 48 e 72h. Ao final de cada tempo de tratamento, foram adicionados 10 μL de MTT diluído em PBS por poço. As placas permaneceram incubadas durante 3 horas a 37°C em estufa. Após a formação e deposição dos cristais, as placas foram vertidas e foram adicionados 100 μL de álcool etílico 99% por poço para a diluição dos cristais. Em seguida, os poços foram homogeneizados e a absorbância de cada tratamento foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm (LIU *et al.*, 2014). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle negativo, sem tratamento.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicatas. Os dados obtidos foram analisados através do Excel e do *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, California) para a determinação das médias de viabilidade dos tratamentos e da concentração inibitória média (IC_{50}). A partir da obtenção da concentração inibitória foram determinadas as concentrações para os ensaios de ciclo celular e apoptose.

4.4 Índice de seletividade

Para avaliar a existência de efeito seletivo no tratamento com a MOX foi utilizado o cálculo do índice de seletividade (IS), cuja equação se encontra descrita na Figura 2. De acordo com Zingue *et al.* (2016) caso a taxa obtida pela divisão dos valores de IC_{50} das linhagens celulares não tumorais (MCF-10A) e tumorais (MCF-7) seja maior que 1.0 ($\text{IS} > 1.0$), assume-se que a substância testada é mais seletiva para células neoplásicas.

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ da linhagem normal}}{IC_{50} \text{ da linhagem tumoral}}$$

Figura SEQ Figura * ARABIC 2- Equação do Índice de seletividade (IS) de acordo com Zingue *et al.* (2016). O modelo tem como objetivo demonstrar se a MOX possui efeito seletivo para a linhagem tumoral.

4.5 Avaliação da morfologia celular

Para avaliação da morfologia da linhagem MCF-7 em resposta ao tratamento com a MOX, foram cultivadas $2,5 \times 10^4$ de células por poço em placas de 24 poços que foram incubadas durante 24 horas. Após a incubação, foram adquiridas micrografias dos poços anteriormente ao tratamento com MOX para posterior comparação. Logo após, foi realizada a

adição de 400 µL das concentrações de 25, 50 e 100 nM de MOX às culturas e, em seguida, foram capturadas 3 imagens de cada um dos grupos de tratamento, de dois experimentos independentes, antes e após 48h de exposição das células à MOX.

As micrografias foram tiradas através da utilização de um microscópio invertido com câmera fotográfica acoplada e objetiva de 20 vezes. As fotografias foram analisadas no *software* ImageJ para avaliação do formato celular, número aproximado de células por campo, presença de vacúolos, encolhimento celular, alterações de adesão, presença de bolhas na superfície celular e alterações nucleares (ALSAEDI *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2017).

As alterações observadas foram classificadas como leves/ausentes, quando presentes em até 30% das células; moderadas, quando presentes em 30 a 50% das células; e intensas, quando presentes em 50% ou mais das células presentes nos campos analisados.

4.6 Apoptose e Ciclo celular

Foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ de células da linhagem MCF-7 em placas de 48 ou 24 poços durante 24 horas, até a adesão das mesmas e formação da monocamada, em seguida, as mesmas foram tratadas por 48 horas com as concentrações de 25, 50 e 100 nM de MOX. Após o tempo de tratamento das culturas, os poços foram lavados com 200 µL de PBS em temperatura ambiente e em seguida, foram utilizados de 150 a 200 µL de Accutase por poço durante 3 minutos à 37 °C para a realização da desagregação celular enzimática. A ação da accutase foi interrompida com a adição de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. A suspensão celular obtida foi transferida para eppendorfs e centrifugadas sob refrigeração durante 5 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e os pellets obtidos foram lavados em 1 mL de PBS. Para a avaliação do ciclo celular as células foram rapidamente ressuspensas em 1 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 5 mM, centrifugadas durante 5 minutos e, em seguida, 1 mL de álcool etílico 70% diluído em água MiliQ foram adicionados para a fixação das células. As mesmas foram incubadas em freezer durante 48h. Após a incubação foram adicionados 500 µL de PBS contendo 1% de Albumina Sérica Bovina (BSA) às células seguida de centrifugação e lavagem com PBS 1x. As células foram ressuspensas em 300 µL de solução contendo Triton a 0,1%, Ribonuclease (RNase) a 20 mg/mL e Iodeto de propídeo (IP) a 50 µg/mL. Em seguida, as células foram incubadas durante 30 minutos em estufa a 37°C protegidas da luz e levadas para leitura em citômetro de fluxo Guava easyCyte™ HT System.

Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra no gate de interesse após a verificação da população celular através dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) na escala logarítmica. Para análise do ciclo celular foi utilizada o histograma da fluorescência da área do canal vermelho (red-B) como parâmetro de leitura. O programa FlowJo™ Software (Versão 10, Becton, Dickinson and Company, 2019) e o seu aplicativo de análise semiautomática do ciclo celular baseado no modelo de Dean-Jett Fox (DJF) foi utilizado para a discriminação das fases do ciclo.

Para a avaliação da apoptose as células, após desagregação enzimática e centrifugação, foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1x gelada, novamente centrifugadas e marcadas com o Apoptosis Kit (BD), sendo adicionados 100 µL de solução contendo Anexina V (ANX), Iodeto de propídeo (IP) por 15 minutos e depois mais 200uL do tampão de fixação para a diluição dos marcadores de acordo com as instruções do fabricante. As mesmas foram incubadas durante 15 minutos sob refrigeração e protegidas da luz e rapidamente levadas para leitura em citômetro de fluxo (CROWLEY *et al.*, 2016).

Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra no gate de interesse após a verificação da população celular através dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) na escala logarítmica. Para análise da apoptose foram utilizados dot plots formados pelos parâmetros de fluorescência dos canais verde (GREEN-B) referentes a anexina 5-FITC e do canal vermelho (RED-B) resultantes da marcação das células com iodeto de propídeo, sendo os dois na escala logarítmica. As leituras adquiridas foram analisadas através do programa FlowJo™ Software (Versão 10, Becton, Dickinson and Company, 2019) (Figura 3).

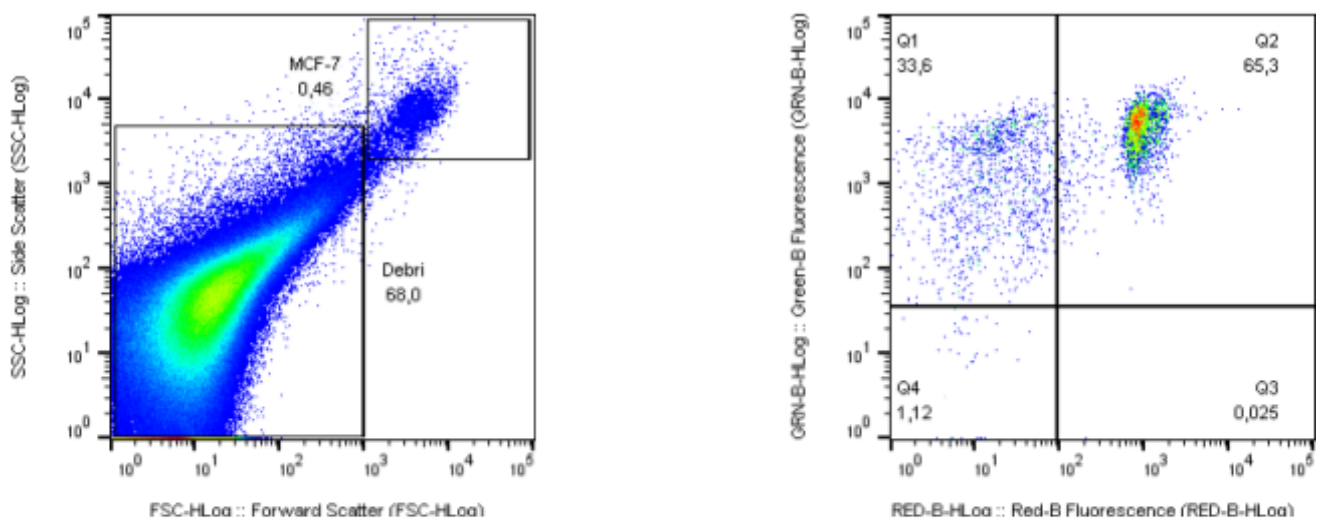


Figura SEQ Figura 1* ARABIC 3- À esquerda, método de identificação da população de interesse a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) na escala logarítmica. À direita, dot plot formado pelos parâmetros de fluorescência obtidos nos canais verde (GREEN-B), referente à marcação com Anexina 5-FITC (ANX), e canal vermelho (RED-B), referente à marcação com iodeto de propídeo (IP), na escala logarítmica. No gráfico Q1 se refere à população marcada apenas com ANX, indicando apoptose inicial, Q2 se refere à população celular com dupla marcação, indicando apoptose tardia, Q3 se refere à população marcada apenas com IP, indicando necrose, e por fim Q4 se refere à população duplo negativa, indicando a população de células viáveis.

4.7 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ou média \pm desvio padrão. A análise dos dados foi realizada empregando os testes one-way ANOVA, para dados com distribuição normal ou Kruskal Wallis, para dados com distribuição não normal. As análises estatísticas foram realizadas a partir do *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, California). O valor de P foi considerado significativo quando menor que 0.05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Citotoxicidade e seletividade da MOX

Para observar se a MOX é capaz de reduzir a viabilidade celular seletivamente, as linhagens normais e tumorais foram usadas no ensaio de citotoxicidade fundamentado pela redução do MTT, com diferentes concentrações e tempos de tratamento.

Foram testadas as concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 nM de MOX durante 24, 48 e 72 horas em ambas as linhagens celulares. As figuras 4 e 5 exibem, respectivamente, a viabilidade das culturas de MCF-7 e MCF-10A após os tempos de tratamento.

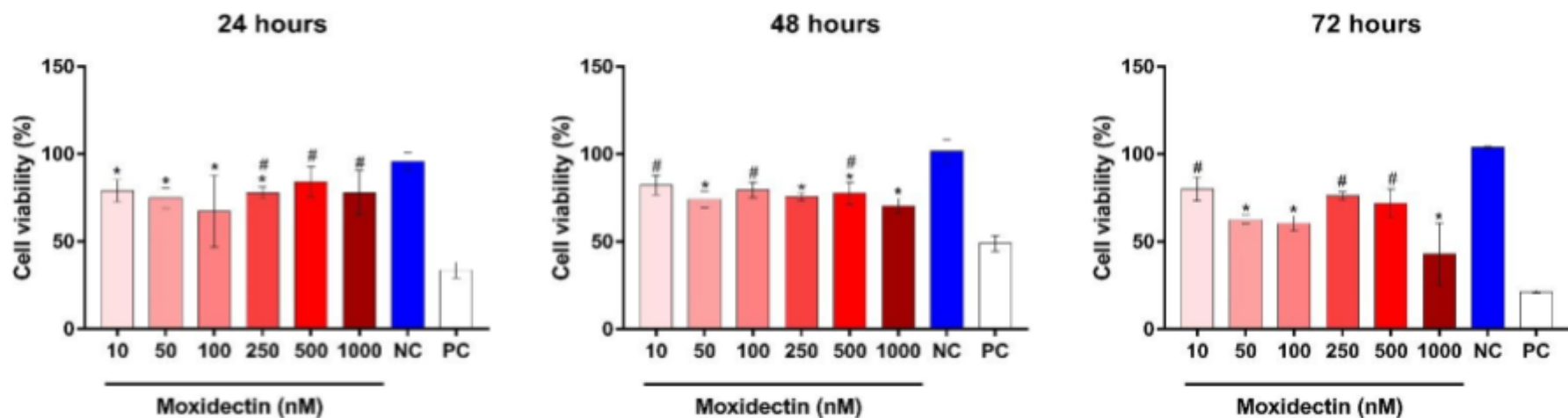


Figura 4- Mox inibe a viabilidade das células da linhagem MCF-10A após tratamento com as concentrações indicadas nos gráficos durante 24, 48 e 72 horas de tratamento. * $P < 0,05$ em relação ao controle negativo (NC) e # $P < 0,05$ em relação ao controle positivo (PC).

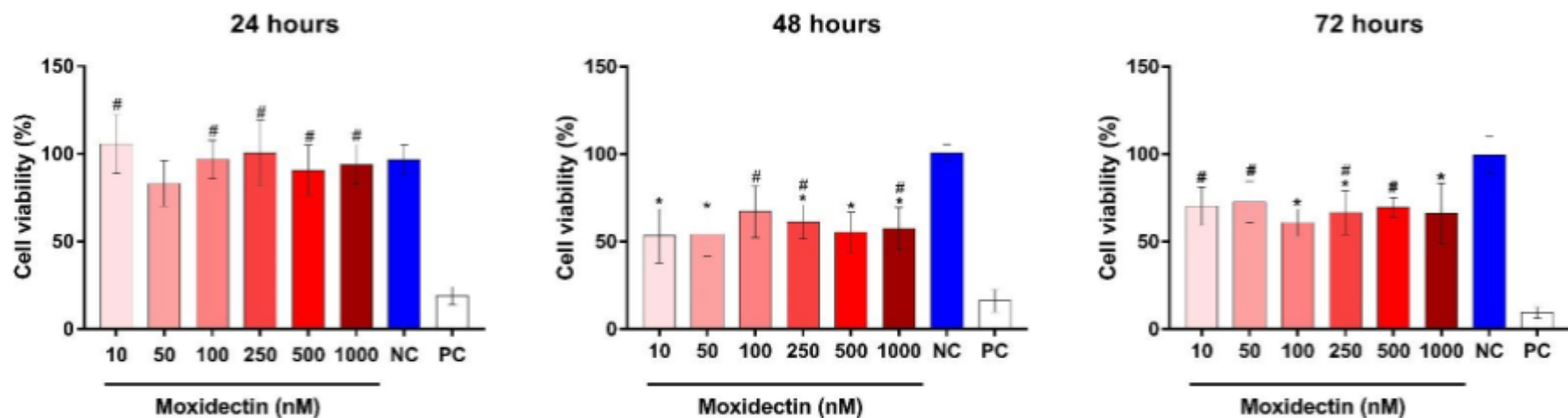


Figura 5- Mox inibe a viabilidade das células da linhagem MCF-7 após tratamento com as concentrações indicadas nos gráficos durante 24, 48 e 72 horas de tratamento. * $P < 0,05$ em relação ao controle negativo (NC) e # $P < 0,05$ em relação ao controle positivo (PC).

Na linhagem tumoral (MCF-7) não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) na viabilidade após as primeiras 24h de tratamento com a MOX. Em todas as concentrações utilizadas, a viabilidade média das culturas permaneceu semelhante ao controle negativo (NC), apresentando diferença estatística apenas em relação à média da viabilidade do controle positivo (PC).

Após 48h de tratamento, as culturas apresentaram queda significativa da viabilidade, indicando maior tendência citotóxica do composto até mesmo nas concentrações mais baixas. Não foi possível observar efeito dose-dependente em nenhum dos tempos de experimento. Os tratamentos diminuíram a viabilidade em quase metade em comparação ao controle negativo (NC), sendo a maior média de viabilidade pertencente a concentração de 100 nM, com 67,15% das células viáveis e a menor média pertencente a concentração de 10 nM, com 53,31% das células viáveis.

Nas 72h de tratamento a MCF-7 demonstrou uma recuperação da viabilidade, apresentando mais da metade de células vivas em todas as concentrações, sendo a menor média equivalente a 60,95% no tratamento com a diluição de 100 nM. Assim como nos tempos anteriores, a MOX à 100 nM demonstrou resposta diferenciada em relação aos outros grupos.

O padrão de resposta nas células normais diferencia-se de forma clara da que é observada nas células tumorais. Nas células MCF-10A foi possível perceber uma menor viabilidade nas primeiras horas de tratamento, com 76,8% de células vivas em média, em relação à MCF-7, que apresentou uma média de 95,1% de viabilidade nos tratamentos, tendo a MOX reduzido de 20 a 30% do número de células vivas das culturas.

Com exceção da concentração de 1000 nM em 72h, todas as diluições de MOX em todos os tempos de tratamento apresentaram viabilidade semelhante entre si na MCF-10A, com variação de 10% para mais ou para menos e nunca reduzindo a viabilidade média à valores menores que 50%, demonstrando certa estabilidade na linhagem normal, o que fica melhor evidenciado na curva de dose-resposta (Figura 5).

Os resultados obtidos indicam uma redução seletiva da viabilidade das culturas, sendo a linhagem tumoral mais suscetível à citotoxicidade da MOX. Em outro estudo a MOX também já havia apresentado efeito seletivo em linhagens tumorais de glioma (C6, U251) induzindo à um expressivo decaimento da viabilidade das linhagens tumorais em relação à uma linhagem de astrócito normal (SVG p12) (SONG *et al.*, 2018).

5.2 Determinação da IC₅₀ e índice de seletividade

A concentração inibitória média quantifica a concentração de inibidor necessária para reduzir pela metade a taxa de reação de uma resposta observada em condições de ensaio específicas (BURLINGHAM; WIDLANSKI, 2003). Deste modo, utilizando os dados previamente obtidos nos ensaios de citotoxicidade, foram determinadas as IC₅₀ em ambas as linhagens em cada um dos tempos de tratamento. Os resultados expressos em nM estão dispostos na Tabela 1.

Linhagem	24h	48h	72h
MCF-7	7805 nM	29,61 nM	206,9 nM
MCF-10A	1819 nM	1122 nM	576,7 nM

Tabela 1- Concentração inibitória média da MOX nas linhagens MCF-7 e MCF-10A nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas.

Apesar da alta concentração necessária para eliminar 50% da população de MCF-10A em 24h, o valor da IC tende a diminuir no decorrer do tempo de tratamento, podendo indicar efeito tempo-dependente do tratamento da MOX.

Com base em trabalhos anteriores que demonstram atividade da MOX no processo de replicação celular (SONG *et al.*, 2018), outra possibilidade seria que a MOX possuiria efeito citotóxico tanto em células normais quanto tumorais, entretanto, pela MCF-7 possuir maior tempo de replicação (de 1.8 dias (SWEENEY *et al.*, 1998) até 29 horas (ATCC, 2021)) as culturas não conseguiriam se recuperar na mesma velocidade que a linhagem MCF-10A (tempo de replicação entre 48 (GAJEWSKI *et al.*, 2007) e 19,4 horas (STARCEVIC *et al.*, 2003)). Por seu processo replicativo ser mais rápido, as células da linhagem normal conseguiriam reestabelecer sua viabilidade mesmo após o efeito citotóxico da MOX, isso explicaria a falta de tantas discrepâncias na média de viabilidade entre os diferentes tempos de tratamento. No entanto, com o passar do tempo e maior período em contato com a MOX na cultura, a linhagem normal perderia a capacidade de recuperação rápida da viabilidade, justificando o decaimento do número de células vivas no tratamento de 72h.

A MOX, em MCF-7, apresentou em 48h uma IC₅₀ cerca de 7 vezes maior que o observado na linhagem normal. Após 48 horas de tratamento, houve um aumento da toxicidade da MOX na linhagem normal, entretanto, o valor da IC₅₀ na MCF-7 ainda

demonstrou ser duas vezes menor nas células tumorais que o requerido para inibir 50% da população normal de células da linhagem MCF-10A.

Os valores de IC₅₀ da MOX na MCF-10A tiveram queda decrescente, diminuindo em quase metade a cada intervalo de 24 horas. O intervalo de 72 horas de tratamento foi identificado como o de maior toxicidade da droga na linhagem normal, onde a MOX, com uma concentração equivalente a quase metade da IC de 24 e 48 horas, induziu a morte de 50% da população de células. Esses resultados indicam que, diferentemente ao que ocorre na linhagem tumoral, a MOX talvez possua um efeito tempo-dependente na linhagem MCF-10A, onde quanto maior o tempo de exposição das células epiteliais à droga, maior a citotoxicidade do composto, mesmo em concentrações pequenas. Em suma, seriam necessários estudos mais aprofundados para determinar o mecanismo de ação da MOX na linhagem não tumorigênica de mama, MCF-10A.

Ainda avaliando a citotoxicidade da MOX nas linhagens MCF-7 e MCF-10A foram feitas regressões lineares com o intuito de verificar as curvas de dose resposta baseadas na IC₅₀ de ambas as linhagens (Figura 6). É possível observar um comportamento mais homogêneo da MOX nas curvas da linhagem normal, o que não se repete na linhagem tumoral. Ao contrário da resposta observada nas células de MCF-10A, a MOX mostrou um efeito mais instável nos diferentes tempos de tratamento da linhagem neoplásica, o que indica um efeito seletivo da lactona macrocíclica.

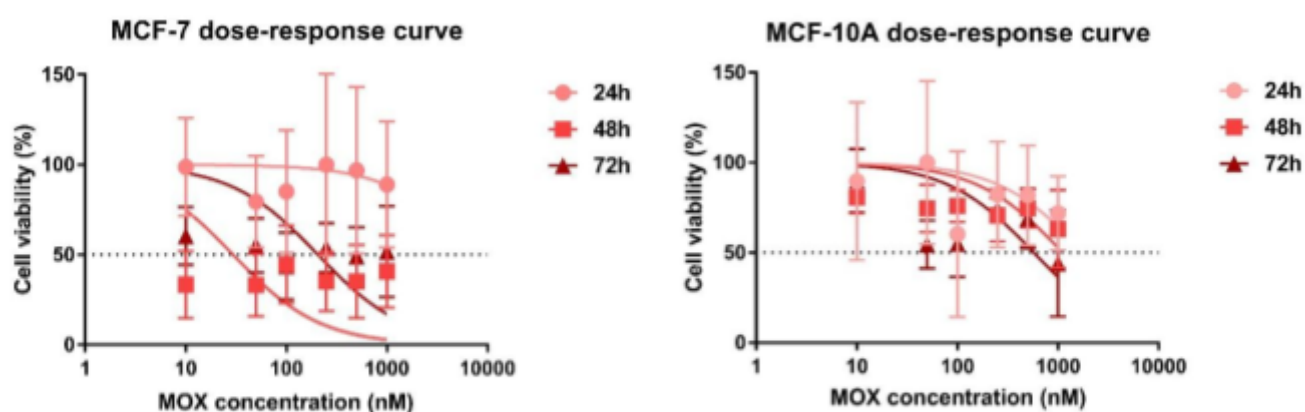


Figura 6- Os gráficos expressam as curvas de dose resposta da MOX nas linhagens celulares MCF-10A e MCF-7. Os dados estão expressos como média \pm DP.

De acordo com Juarez *et al.* (2020) a IC₅₀ do quimioterápico padrão para o tratamento de neoplasias mamárias ER positivas como a MCF-7, o Tamoxifeno, é de 2,8 μ M. Em comparação com os resultados obtidos neste trabalho e a comparação com o observado

na literatura, apesar de demonstrar ser necessário o triplo da IC do tamoxifeno para realizar o mesmo efeito nas 24h de tratamento, a MOX exibiu melhor performance nos tempos de 48 e 72h que a droga padrão utilizada na terapia oncológica.

Em comparação a outras lactonas macrocíclicas como a IVM, a MOX apresentou valor oito vezes menor de IC₅₀ durante 72h de tratamento na linhagem MCF-7 (IC₅₀ IVM- 1,66 µM) (JUAREZ *et al.*, 2020). Também utilizando a linhagem de carcinoma mamário, Xiang *et al.* (2010) durante 48h tratou as células com as lactonas Milbemicina A4 (MB A4 - 21.230 ± 2.280 µM), Milbemicina oxime 4 (MBO A4 - 11.860 ± 2.63 µM) e Milbemicina β₁ (MB β₁ - 12.610 ± 2.301 µM) e obteve valores de IC₅₀ muito acima do observado no mesmo tempo de tratamento com a MOX (MB A4 - cerca de 2200 vezes maior; (MBO A4 - 400 vezes maior; MB β₁ - 420 vezes maior). Em seu trabalho, Gao *et al.* (2011) obteve os seguintes valores de IC₅₀: Milbemicina β₁₄ (15.86 ± 1.59 µM), Secomilbemicina D (18.37 ± 0.42 µM). Tais divergências nos valores da concentração inibitória média entre outros compostos pertencentes à família das lactonas macrocíclicas e a MOX confirmam a citotoxicidade das lactonas macrocíclicas em linhagem tumoral de câncer de mama e demonstram o alto potencial terapêutico da Moxidectina, que é capaz de reduzir a viabilidade das células de MCF-7 em concentrações muito baixas.

Dentre os tempos de tratamento, a curva correspondente às 48 horas da MCF-7 demonstrou-se a mais estável, sendo este o critério escolhido para a utilização da MOX nos experimentos posteriores, utilizando concentrações próximas à IC₅₀ de 48h da MCF-7 (29,61 nM).

Com o objetivo de observar se a MOX apresentou resposta seletiva, ou seja, agindo de forma diferenciada na linhagem tumoral, causando maior perda de viabilidade em concentrações não danosas às linhagens normais, foi utilizado o Índice de Seletividade. O modelo visa verificar quanto a resposta da linhagem tumoral ao tratamento é diferente da resposta observada na linhagem não tumorigênica através de uma simples razão entre os valores de IC₅₀. A equação encontra-se descrita na Figura 4, previamente citada. Para Zingue *et al.* (2016), um resultado com o índice de seletividade > 1.0 indica que a substância utilizada foi mais ativa nas linhagens tumorais do que na linhagem não tumoral. Os valores do IS podem ser observados na Tabela 2.

	24h	48h	72h
Valor do IS	0,23	37,89	2.78

Tabela 2- Valores do IS das IC50 das linhagens MCF-7 e MCF-10.

Com exceção das 24 horas de tratamento, todos os valores de IS foram maiores que 1.0, indicando alta seletividade da MOX pela linhagem tumoral, afetando as células neoplásicas de forma mais específica sem tantos danos às células normais. O mecanismo pelo qual a MOX induziu a diminuição da viabilidade das células tumorais foi investigado através de avaliação da morfologia celular, ensaio de apoptose e ciclo celular após o tratamento com a MOX durante 48h, cujos resultados serão apresentados adiante.

5.2 Morfologia celular

Considerando os dados de IC₅₀, o tempo e a seletividade, foram investigados os efeitos da MOX na linhagem tumoral em 48h objetivando explorar os mecanismos associados a citotoxicidade. A linhagem celular MCF-7 é uma linhagem de células aderentes que formam agrupamentos compactos com células em formato poligonal epitelial típico. Nas colônias, as células apresentam contato próximo umas com as outras e algumas sofrem variação de formato nas bordas, apresentando formato fibroblástico e se distanciando do agregado celular (COMÇA *et al.* 2015).

Para o estudo morfológico foram adquiridas imagens das células e as mesmas foram avaliadas quanto ao seu formato, alterações nucleares visíveis, presença de vacúolos ou grânulos em seu citoplasma, tamanho, alterações na aderência celular e presença de brotamentos na membrana. O número de células por foto foi contabilizado bem como o número de células danificadas ou aparentemente mortas, sendo, ao final da análise, foi gerada uma média de cada um dos tratamentos. As micrografias podem ser observadas na Figura 7 seguidas da descrição dos achados morfológicos.

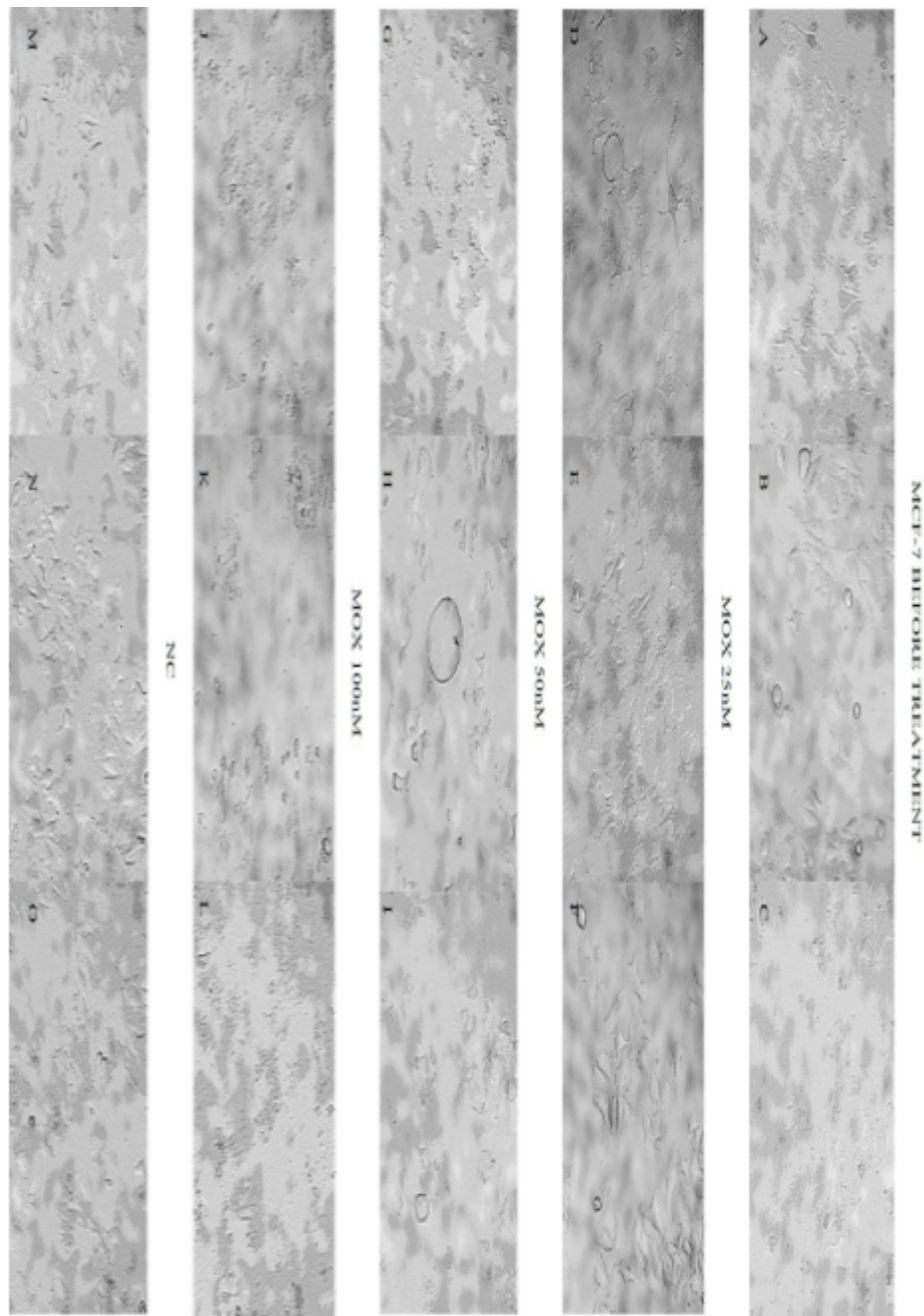


Figura 7- Efeito da Moxidectina na morfologia das células da linhagem MCF-7 tratada nas concentrações de 25, 50 e 100 nM de MOX durante 48h. (A-C) Micrografia das culturas de MCF-7 antes do tratamento com a MOX. As células foram plaqueadas em uma concentração de $2,5 \times 10^4$ suspensas em 400 μ L de meio suplementado. As fotos foram tiradas após 24h de incubação das placas a 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%. (D-F) Micrografia das culturas tratadas com MOX 25 nM durante 48h. Destacam-se os prolongamentos citoplasmáticos e o aumento do volume celular. (G-I) Micrografia das culturas tratadas com MOX 50 nM durante 48h. Sinais apoptóticos evidentes podem ser observados na cultura como diminuição do volume celular, alterações nucleares e presença de vacúolos citoplasmáticos aberrantes. (J-L) Micrografia das culturas tratadas com MOX 100 nM durante 48h. Sinais de apoptose tardia podem ser observados como grânulos apoptóticos,

Nas culturas anteriores ao tratamento foram contabilizadas em média 77,6 células por foto, sendo que destas, menos de 0,5% apresentou morfologia alterada ou indicativa de morte, como redução do volume celular, formato arredondado e perda aparente da aderência.

As células possuíam morfologia heterogênea variando entre uma aparência ora fusiforme ou poligonal, ora estrelada, com prolongações citoplasmáticas. Colônias celulares compactas foram observadas, indicando intensa adesão entre as células próximas. O núcleo era de boa definição e facilmente distinto do citoplasma, que não evidenciava a presença de vacúolos ou grânulos.

Após as 48h de tratamento com MOX à 25 nM, as células apresentaram morfologia homogênea, de formato estrelado e com longos prolongamentos citoplasmáticos e volume celular aumentado. Foram observadas em média 63 células por foto, onde menos de 5% aparentava sinais de morte celular evidente. A membrana nuclear sofreu alterações que diminuíram a nitidez dos núcleos e a granulação no citoplasma foi considerada leve. Também foi possível observar, ainda que em pequena quantidade, sinais de brotamentos na membrana de algumas células.

As células tratadas com MOX à 50 nM apresentaram média de 68 células por foto, sendo que cerca de 50% evidenciava sinais de morte celular sendo eles a redução do volume celular, forma da membrana indefinida, perda da adesão com a placa e/ou com as células vizinhas e núcleo indefinido. Foi observado o aumento do espaço intercelular e redução do número de células nos agrupamentos. Foi possível verificar a presença intensa de vacúolos/grânulos no citoplasma celular bem como de bolhas ou vacúolos aberrantes, podendo até mesmo ser bem maiores que as próprias células.

Os sinais morfológicos de morte celular se tornaram ainda mais evidentes e intensos nas células tratadas com a MOX em 100 nM. Das 55 células observadas por foto, em média, menos de 30% ainda aparentavam viáveis. As células observadas aparentavam inviáveis, com fortes indícios de dano celular ou colapsadas e não foi possível identificar o núcleo de grande parte delas (fenômeno melhor observável na imagem K). Numerosos vacúolos foram observados nas células que ainda possuíam a membrana estável, bem como indícios de brotamentos. Não foi possível observar agrupamentos celulares devido à intensa degradação das culturas. Foram observados diversos grânulos/debris dispersos, acredita-se que sejam corpos apoptóticos indicativos de apoptose tardia.

O processo apoptótico é um fenômeno fisiológico muito bem regulado de morte celular programada que desempenha papel relevante na homeostase de diferentes tecidos em resposta a numerosos estímulos em seres multicelulares. (BERGANTINI *et al.*, 2005; BRAS *et al.*, 2005). É caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos,

formação de vesículas sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (DUARTE, 2010).

O início do processo de morte programada se dá a partir do reconhecimento de um sinal de morte seguida da ativação de proteases aspárticas denominadas caspases que podem ser divididas em caspases efetoras e caspases iniciadoras. A partir da detecção do dano celular, as caspases iniciadoras (caspases 8 e 9) são ativadas a partir de procaspases inativas e passam a ativar as caspases executoras (caspases 3, 6 e 7) (D'ARCY *et al.*, 2019). A ativação de proteínas executoras dá início a uma cascata de eventos que resulta na fragmentação do DNA, destruição de proteínas nucleares e do citoesqueleto, reticulação de proteínas, expressão de ligantes que facilitem o reconhecimento de células apoptóticas pelas células fagocíticas e a formação de corpos apoptóticos (POON *et al.*, 2014).

Dentre as alterações morfológicas provocadas pela apoptose destacam-se, na fase inicial, o encolhimento celular, que torna o citoplasma mais denso, e a formação de núcleos picnóticos, que são resultado da condensação da cromatina, sendo esta a característica mais marcante do processo apoptótico. Na fase tardia, a formação de bolhas ou '*blebs*' na membrana plasmática, decorrente da perda da estabilidade do citoesqueleto, ocorre seguida da cariorrexe e separação de fragmentos celulares em corpos apoptóticos durante um processo denominado "brotamento". Os corpos apoptóticos consistem em materiais citoplasmáticos com organelas compactadas e que podem conter ou não um fragmento nuclear (ELMORE *et al.*, 2007).

Diante deste conhecimento e de todas as alterações observadas na morfologia das células de MCF-7 após o tratamento pode-se afirmar que a MOX induziu as células tumorais a entrarem em processo de apoptose. Foi possível observar com maior clareza os sinais de apoptose inicial na morfologia das células tratadas com MOX 50 nM e, em contrapartida, os sinais de apoptose tardia se mostraram mais visíveis no tratamento com a MOX 100 nM.

A fim de elucidar um possível mecanismo de indução da apoptose foram realizados os ensaios de ciclo celular e apoptose/necrose por citometria de fluxo.

5.3 Avaliação do ciclo celular

O processo de proliferação e escape dos mecanismos de morte celular são duas das principais características das células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Visando observar o mecanismo possivelmente envolvido no processo de morte celular induzido pela

MOX, o ciclo celular das células tumorais foi avaliado, sendo estes dados dispostos na Figura

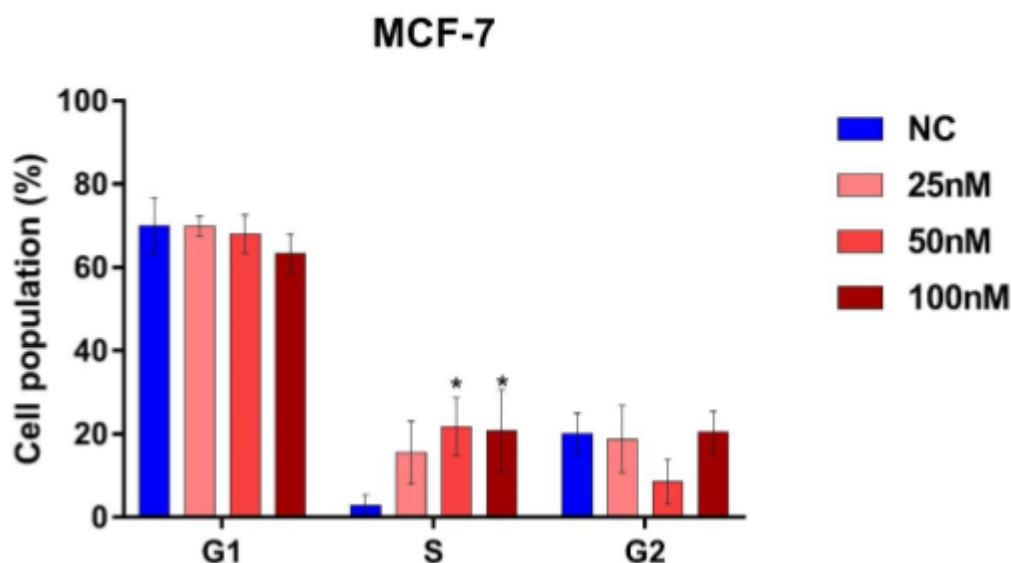
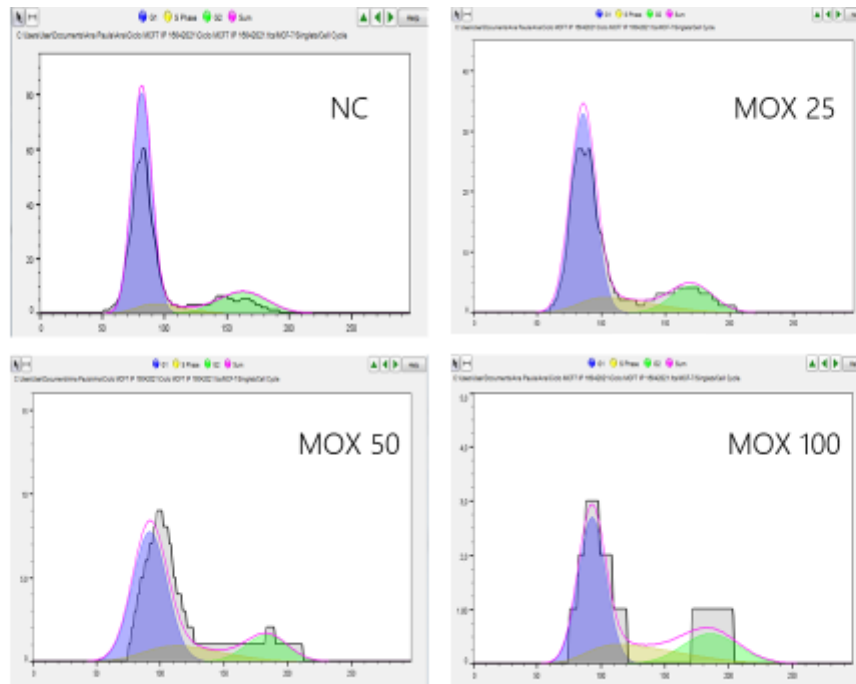


Figura 8- O gráfico representa a porcentagem de células da linhagem MCF-7 distribuídas nas fases G1, S e G2 do ciclo celular após o tratamento com MOX durante 48h. Os dados estão expressos como média \pm DP. *P <0,05 em relação ao controle negativo (NC).

8.

A MOX, nas concentrações de 50 e 100 nM, causou a estagnação das células na fase S do ciclo celular, o que indica um efeito antiproliferativo do composto. Destaca-se o decréscimo discreto do número de células em repouso ou no início do processo de mitose (G0/G1) seguido do aumento da população de células estacionadas na fase de síntese nos tratamentos com as concentrações mais altas de MOX.

O número de células na fase G1 foi próximo em todos os grupos representando de 70 a 60% das células analisadas. Na fase S, a MOX 25 nM apresentou 4,5 vezes mais células que o NC, a MOX 50 nM apresentou 7,5 vezes mais células que o NC e a MOX 100 nM apresentou 7,2 vezes mais células que o NC. Na fase G2, todos os grupos também apresentaram uma média de células semelhantes (Figura 9).



Nas células eucarióticas o ciclo celular é dividido em quatro fases distintas. G1 é a fase inicial a qual as células saem do estado de repouso e se preparam para o processo de replicação do DNA. Durante esta fase a célula integra os sinais mitogênicos e inibidores do crescimento e toma a decisão de seguir, parar ou sair do ciclo celular. A fase S é definida como o estágio em que ocorre a síntese de Ácido Desoxirribonucleico (DNA). G2 é a segunda fase, a qual a célula se prepara para o processo de divisão. M significa mitose, a fase em que os cromossomos replicados são segregados em núcleos separados e a citocinese ocorre para formar duas células-filhas (JOHNSON *et al.*, 1999).

Durante cada etapa do ciclo dois mecanismos básicos participam da regulação e controle da transição entre as fases e de pontos de verificação, que monitoram a finalização de eventos críticos. O primeiro tipo de controle envolve uma família de quinase altamente regulada que necessita de associação com uma subunidade de ciclina, sendo esta expressa temporariamente no período apropriado do ciclo celular. A partir da associação surge um agrupamento denominado quinase dependente de ciclina (CDK). A fosforilação e desfosforilação ajustam a atividade dos complexos ciclina CDK, garantindo transições bem delineadas entre os estágios do ciclo celular (OTTO *et al.*, 2017; COLLINS *et al.*, 1997).

O segundo mecanismo envolvido no controle da progressão do ciclo celular são os pontos de checagem ou *checkpoints*. Eles são responsáveis por detectar falhas nos eventos

críticos de cada etapa e são capazes de inativar as CDKs em resposta à danos no DNA (OTTO *et al.*, 2017; COLLINS *et al.*, 1997).

Nas células tumorais o ciclo celular tem atividade aberrante resultado de mutações nas vias de sinalização ou de modificações em genes codificantes de proteínas relacionadas ao ciclo celular. O descontrole da maquinaria de replicação celular é determinante para a progressão dos cânceres e garante uma vantagem proliferativa em relação as suas contrapartes normais, sendo esta uma das características mais marcantes das células neoplásicas (FOUAD; AANEI, 2017; OTTO *et al.*, 2017).

No estudo de Song *et al.* (2018) a MOX também foi responsável pelo aprisionamento de células de glioma durante o ciclo celular, no entanto, as células tumorais sofreram a interrupção em uma fase diferente, sendo esta a fase G0/G1. A estagnação se deu através da diminuição da expressão de CDKs como CDK2, CDK4, CDK6 e ciclinas como ciclina D1 e E.

Os complexos de ciclina E-CDK2 são responsáveis pela fosforilação de diversas proteínas essenciais para a progressão do ciclo celular, replicação do DNA e duplicação do centróssoma, como histona H1 e E14/NPAT (VERMEULEN *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2000). Durante a fase S, a ciclina E é rapidamente degradada e CDK2 se associa com a ciclina A2, recém-sintetizada, para formar complexos de ciclina A-CDK2 ativos (OTTO *et al.*, 2017).

Os complexos de ciclina D-CDK4/6 ativos fosforilam diversos alvos celulares, como a proteína supressora de tumor do retinoblastoma e as proteínas p107 e p130, que permitem assim que os fatores de transcrição ativem a transcrição de uma infinidade de genes envolvidos na entrada da fase G1 e progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S, replicação do DNA, modificação na estrutura da cromatina, segregação cromossômica e a ativação do ponto de verificação da montagem do fuso (OTTO *et al.*, 2017; VERMEULEN *et al.*, 2003).

Na linhagem MCF-7, a MOX aparentemente não foi capaz de diminuir a expressão das CDK 4 e 6 e da ciclina D1 como observado no trabalho de Song *et al.* (2018), por não demonstrar alterações na população celular presente na fase G1. Por haver aprisionamento das células na fase S, a MOX, assim como na linhagem de glioma, poderia alterar a expressão da CDK2 e/ou da ciclina E, que possuem atividade na fase S do ciclo celular, diminuindo a disponibilidade desses dois complexos proteicos e impedindo a sequência de eventos da fase de Síntese da replicação celular.

Outro mecanismo possível é a diminuição da expressão da ciclina A, que também se encontra intimamente ligada à progressão da fase S. Ela também é responsável pela ativação da CDK2 e, quando associadas, regulam o início da replicação do DNA a partir da fosforilação da Polimerase α -primase (PELLEGRINI *et al.*, 2012; VERMEULEN *et al.*, 2003).

Outras drogas também são capazes de induzir o aprisionamento das células tumorais na fase S do ciclo celular como a Shikonina, que impede o avanço da fase S em células de leucemia mieloide através do aumento da expressão do inibidor de CDK P21 (HAO *et al.*, 2020). Outros pesquisadores apontam drogas capazes de reter células da linhagem MCF-7 na fase de Síntese do ciclo celular como Chen *et al.* (2008), que apontaram como a selenocistina induziu a parada na fase S via diminuição da expressão das ciclinas A, D1 e D3 e CDKs 4 e 6, com indução concomitante de p21waf1/Cip1, p27Kip1 e p53. A parada na fase S também é especulada como um dos mecanismos de sensibilização do Resveratrol nas células da linhagem MCF-7, de acordo com Casanova *et al.* (2012), devido ao aumento dos níveis de p-Chk2 e diminuição da expressão de ciclina A.

5.4 Indução da morte celular

Além da maior vantagem adaptativa, as células tumorais também exibem outra característica marcante para sustentar seu desenvolvimento, sendo esta a fuga dos mecanismos de morte celular (FERNALD *et al.*, 2013). Desta forma as células tumorais desenvolvem diversos mecanismos de evasão da morte celular a partir da modulação de sinais apoptóticos a nível genômico e proteico. Portanto, drogas capazes de alterar a resistência tumoral à apoptose são de grande valia no tratamento oncológico (WONG *et al.*, 2011).

Para ratificar os resultados observados na avaliação morfológica das células de MCF-7 e verificar mecanismo pelo qual a MOX diminui a viabilidade das culturas a partir do aprisionamento na fase S do ciclo celular, foi realizado um teste de avaliação da morte celular (Figura 10).

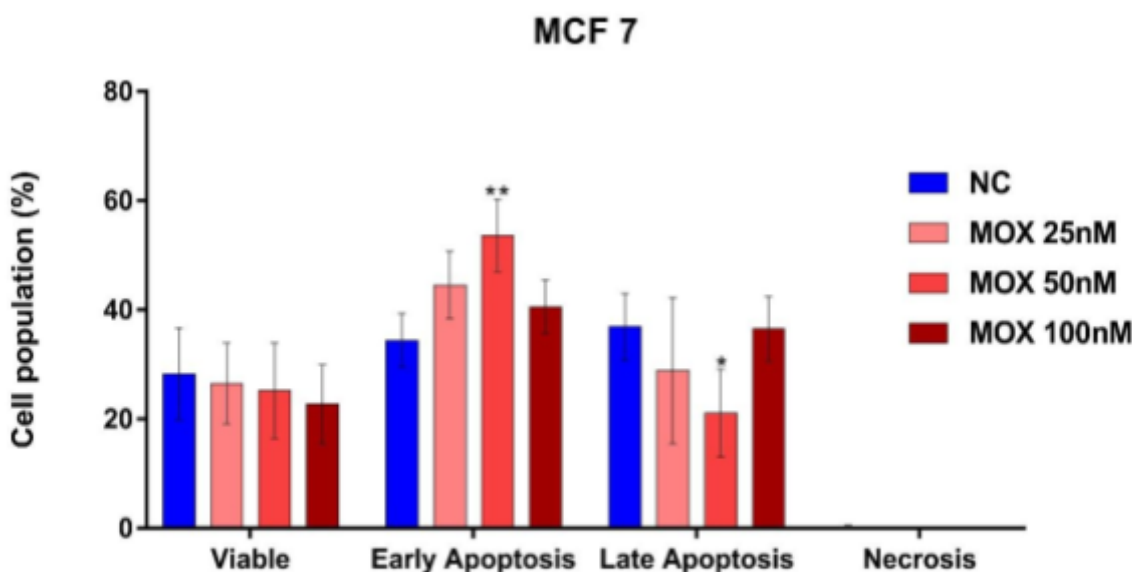


Figura 10- O gráfico demonstra a porcentagem de células da linhagem MCF-7 encontram-se viáveis, em estado de apoptose inicial, tardia ou necrose após tratamento com MOX durante 48 horas. Os dados estão expressos como média \pm DP. *P <0,05 e ** P <0,01 em relação ao controle negativo (NC).

Foi observado um aumento do número de células entrando no processo de apoptose inicial, em especial das concentrações de 50 e 100 nM, que demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao NC. Além da redução da viabilidade em mais da metade, foi possível observar um leve efeito dose-dependente do número de células encontradas em apoptose inicial. A concentração de 100 nM apresentou grande instabilidade nos resultados, apresentando um grande número de células em apoptose tardia.

Os eventos com marcação indicativa de necrose não tiveram evidência, devido ao baixo número de eventos observados nesta fase. Tal dado pode indicar que a morte celular observada nos grupos de tratamento foi induzida e seletiva, já que o processo necrótico é caracterizado por ser inespecífico e não controlado (D'ARCY *et al.*, 2019).

A concentração de 100 nM apresentou quase a mesma média de células na fase de apoptose inicial e na fase da apoptose tardia. No entanto, os resultados observados nos experimentos anteriores com esta concentração podem indicar instabilidade farmacológica.

No processo de morte celular programada existem duas vias principais: a via extrínseca ou do receptor de morte e a via intrínseca ou mitocondrial. A ativação da via intrínseca mediada pela mitocôndria é dirigida pelas proteínas da família Bcl-2 e é um dos principais mecanismos envolvidos na função de drogas antitumorais. Bcl-2 é uma molécula efetora e é uma potente supressora de apoptose. Bax/Bcl-2 regula a liberação do Citocromo C da mitocôndria para o citoplasma da célula, e o citocromo c, quando no citosol, inicia

cascatas de caspases (como a caspase-3/9), o que leva à apoptose celular (D'ARCY *et al.*, 2019; POON *et al.*, 2014; ELMORE *et al.*, 2007).

Segundo Song *et al.* (2018), a MOX induziu a apoptose em células de glioma a partir da diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e aumento concomitante da expressão da proteína pró-apoptótica Bax *in vitro*. *In vivo* a MOX foi capaz de aumentar a expressão das caspases - 3 e -9.

6. CONCLUSÃO

A Moxidectina foi testada em linhagem normal de mama (MCF-10A) e em linhagem de carcinoma mamário (MCF-7). A partir dos resultados obtidos é possível concluir que a MOX apresenta seletividade no tratamento antitumoral, apresentando maior citotoxicidade na linhagem tumoral de mama (MCF-7) comparada a linhagem normal (MCF-10A). Além disso, o tratamento com a MOX induziu alterações morfológicas e morte por apoptose, com maior frequência de células na fase S do ciclo celular, sugerindo que a parada nesta fase da divisão celular possa induzir a célula a morte, conforme o esquema abaixo (Figura 11).



Figura 11- Esquema hipotético do mecanismo antitumoral da MOX induzindo citotoxicidade seletiva em linhagem tumoral MCF-7.

Desta forma a MOX apresenta potencial como droga antitumoral bloqueando o ciclo celular e induzindo a apoptose, podendo ser aprofundado o estudo em ensaios pré-clínicos e clínicos ampliando o arsenal terapêutico de drogas antineoplásicas.

REFERÊNCIAS

ALAE, M. *et al.* Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Induces Apoptosis in Estrogen Receptor-Positive MCF-7 Breast Cancer Cells. **Journal Of Breast Cancer**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 20, 2017.

ALSAEDI, Iman IJ *et al.* Graphene nanoparticles induces apoptosis in MCF-7 cells through mitochondrial damage and NF-KB pathway. **Materials research express**, v. 6, n. 9, p. 095413, 2019.

ANAND, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.

ANDREWS, K. T. *et al.* Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p.95-111, 2014.

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (org.). **Molecule of the Week Archive: Moxidectin**. 2018. Disponível em: <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/m/moxidectin.html>. Acesso em: 16 set. 2020.

ARDELLI, B. F.; PRICHARD, R. K. Effects of ivermectin and moxidectin on the transcription of genes coding for multidrug resistance associated proteins and behaviour in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of nematology**, 2008.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p.673-683, 2004.

ATCC (org.). **MCF7 (ATCC® HTB-22™)**. 2021. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/htb-22.aspx#specifications>. Acesso em: 29 abr. 2021.

BAXTER-HOLLAND, M. *et al.* Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 320-327, 22 jan. 2018.

BERNET, M. F. *et al.* Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4121-4128, 1993.

BERGANTINI, A. P. F. *et al.* Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 120-125, jun. 2005.

BRAND, A. D. D. *et al.* Anti-tumor properties of methoxylated analogues of resveratrol in malignant MCF-7 but not in non-tumorigenic MCF-10A mammary epithelial cell lines. **Toxicology**, [S.L.], v. 422, p. 35-43, jun. 2019.

BRAS, M. et al. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Moscow)**, [S.L.], v. 70, n. 2, p. 231-239, fev. 2005.

BURLINGHAM, B. T.; WIDLANSKI, Theodore S.. An Intuitive Look at the Relationship of Ki and IC50: a more general use for the dixon plot. **Journal Of Chemical Education**, [S.L.], v. 80, n. 2, p. 214, fev. 2003.

BURTON, J. D. *et al.* The MTT Assay to Evaluate Chemosensitivity. **Chemosensitivity**, [S.L.], p. 069-078, 2005.

CASANOVA, F. *et al.* Resveratrol chemosensitizes breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 113, n. 8, p. 2586-2596, 15 jun. 2012.

CHEN, T. *et al.* Selenocystine Induces S-Phase Arrest and Apoptosis in Human Breast Adenocarcinoma MCF-7 Cells by Modulating ERK and Akt Phosphorylation. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 56, n. 22, p. 10574-10581, 26 nov. 2008.

COBB, R.; BOECKH, A. Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.1-8, 2009.

COMŞA, Ş.; *et al.* The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, 2015.

CROWLEY, L. C. *et al.* Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, [S.L.], v. 2016, n. 11, p. 953-957, nov. 2016.

D'ARCY, M. s *et al.* Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 582-592, 25 abr. 2019.

DAVIES, H. G.; GREEN, R. H. Avermectins and milbemycins. **Natural Product Reports**, v. 3, p. 87-121, 1986.

DE OLIVEIRA, J. C. *et al.* In vitro PLK1 inhibition by BI 2536 decreases proliferation and induces cell-cycle arrest in melanoma cells. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 11, n. 5, p. 587-592, 2012.

DOU, Q. *et al.* Ivermectin Induces Cytostatic Autophagy by Blocking the PAK1/Akt Axis in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 76, n. 15, p.4457-4469, 2016.

DUARTE, R. A. **Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratadas com alcalóides isolados de *Pterogyne nitens***. 2010. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biociências e Biotecnologia Aplicadas À Farmácia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2010. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/101196/duarte_ra_dr_arafcf.pdf;jsessionid=1B4C291AF3A36CA3A597A07EEAFAEA244?sequence=1. Acesso em: 12 abr. 2021.

ELMORE, S. *et al.* Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007.

FERNALD, K. *et al.* Evading apoptosis in cancer. **Trends In Cell Biology**, [S.L.], v. 23, n. 12, p. 620-633, dez. 2013.

FOURNIER, C. *et al.* Immunotherapeutic properties of chemotherapy. **Current opinion in pharmacology**, v. 35, p. 83-88, 2017.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C.. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

FREITAS, M. S. *et al.* Principais mecanismos de oncogênese. Em: Bases moleculares em clínica médica (ALVES, P. C. C.; DA POIAN, A. T.; ABRAHÃO, A.). Editora Atheneu, São Paulo, v. 1, p. 555-571, 2010.

GAJEWSKI, E. *et al.* Oxidative DNA base damage in MCF-10A breast epithelial cells at clinically achievable concentrations of doxorubicin. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 73, n. 12, p. 1947-1956, jun. 2007.

GAO, A. *et al.* Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro by doramectin and nemadectin. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 393-399, mar. 2010.

GILLET, J. P. *et al.* Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 47-76, 5 out. 2009.

GONG, Y. *et al.* Targeting PEPT1: a novel strategy to improve the antitumor efficacy of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma therapy. **Oncotarget**, [S.L.], v. 8, n. 25, p. 40454-40468, 15 abr. 2017.

HAO, G. *et al.* Acetylshikonin induces apoptosis of human leukemia cell line K562 by inducing S phase cell cycle arrest, modulating ROS accumulation, depleting Bcr-Abl and blocking NF- κ B signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 122, p. 109677, fev. 2020.

HANAHAN, D. ; A WEINBERG, R.. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.57-70, jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HOFFMAN, R. M. *et al.* In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 133-143, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (org.). **Estimativa 2020**. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>. Acesso em: 16 set. 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (org.). **Brazil fact sheets**. 2020. Disponível em:

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2021.

JANKO, C.; GEYER, J. Moxidectin has a lower neurotoxic potential but comparable brain penetration in P-glycoprotein-deficient CF-1 mice compared to ivermectin. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 36, n. 3, p. 275-284, 2013.

JUAREZ, M. *et al.* The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. **American Journal Of Cancer Research**, v. 8, n. 2, p.317-331, 2018.

KAPALCZYŃSKA, M. *et al.* 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of medical science: AMS**, v. 14, n. 4, p. 910, 2018.

KELLER, L. *et al.* Efficacy and Safety of Ascending Dosages of Moxidectin and Moxidectin-albendazole Against *Trichuris trichiura* in Adolescents: a randomized controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], p. 1193-1201, 2 maio 2019.

KHEILTASH, F. *et al.* Effects of 8-hydroxyquinoline-coated graphene oxide on cell death and apoptosis in MCF-7 and MCF-10 breast cell lines. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 871-878, jul. 2020.

KITA, K. *et al.* Advances in drug discovery and biochemical studies. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 5, p. 223-229, 2007.

KORTH-BRADLEY, J. M. *et al.* Relative Bioavailability of Liquid and Tablet Formulations of the Antiparasitic Moxidectin. **Clinical Pharmacology In Drug Development**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 32-37, 1 jan. 2012.

LAGE, H. *et al.* An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 65, n. 20, p. 3145-3167, 26 jun. 2008.

LESPINE, A. *et al.* Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). **Chemico-biological interactions**, v. 159, n. 3, p. 169-179, 2006.

LI, Q.s. *et al.* AFM indentation study of breast cancer cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 374, n. 4, p. 609-613, out. 2008.

LIU, F.. Mechanisms of Chemotherapeutic Drug Resistance in Cancer Therapy—A Quick Review. **Taiwanese Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.239-244, set. 2009.

LIU, G. *et al.* Effect of fraxetin on proliferation and apoptosis in breast cancer cells. **Oncology Letters**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 7374-7378, 5 out. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2017.7143>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7143?text=fulltext>. Acesso em: 15 abr. 2021.

LIU, R. *et al.* Itraconazole suppresses the growth of glioblastoma through induction of autophagy. **Autophagy**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1241-1255, 15 maio 2014.

NOVAC, N. Challenges and opportunities of drug repositioning. **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 5, p.267-272, 2013.

MAHRAOUI, L *et al.* Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 298, n. 3, p. 629-633, 15 mar. 1994.

MCGUIRE, S.. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: world health organization, international agency for research on cancer, who press, 2015. **Advances In Nutrition**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 418-419, 1 mar. 2016.

MCKELLAR, Q. A. *et al.* Avermectins and milbemycins. **Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 331-351, out. 1996.

MELLOR, H. R. *et al.* Resistance to Chemotherapy in Cancer: a complex and integrated cellular response. **Pharmacology**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 275-300, 2008.

MILHES, M. *et al.* A real-time PCR approach to identify anthelmintic-resistant nematodes in sheep farms. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 116, n. 3, p. 909-920, 18 jan. 2017.

MILTON, P. *et al.* Moxidectin: an oral treatment for human onchocerciasis. **Expert Review Of Anti-Infective Therapy**, [S.L.], p. 1-15, 26 jul. 2020.

MOLYNEUX, D. H. *et al.* Mass drug treatment for lymphatic filariasis and onchocerciasis. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 516-522, 2003.

MORGAN, M. M *et al.* Modeling chemical effects on breast cancer: the importance of the microenvironment in vitro. **Integrative Biology**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 21-33, fev. 2020.

PELLEGRINI, L. *et al.* The Pol α -Primase Complex. **Subcellular Biochemistry**, [S.L.], p. 157-169, 2012.

POON, I. K. H. *et al.* Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 166-180, 31 jan. 2014.

PRICHARD, R. *et al.* Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. Consanguinity but not identity. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s.l.], v. 2, p. 134-153, dez. 2012.

RODRIGUEZ, L. G. *et al.* Wound-Healing Assay. **Cell Migration**, [S.L.], p. 023-030, 2005.

SAK, K. Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents. **Chemotherapy Research And Practice**, [s.l.], v. 2012, p.1-11, 2012.

SANYAL, S. Culture and assay systems used for 3D cell culture. **Corning**, v. 9, p. 1-18, 2014.

SHIRAZI, F. H. *et al.* **Remarks in successful cellular investigations for fighting breast cancer using novel synthetic compounds**. Croatia: INTECH Open Access Publisher, 2011.

SHOOP, W. L. *et al.* Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 139-156, set. 1995.

SOTIRIOU, C. *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 100, n. 18, p. 10393-10398, 13 ago. 2003.

SOULE, H. D. *et al.* Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer research**, v. 50, n. 18, p. 6075-6086, 1990.

STARCEVIC, S. L. *et al.* Oxidative DNA Damage and Repair in a Cell Lineage Model of Human Proliferative Breast Disease (PBD). **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 74-81, 12 jun. 2003.

SWEENEY, K. J. *et al.* Lack of relationship between CDK activity and G1 cyclin expression in breast cancer cells. **Oncogene**, [S.L.], v. 16, n. 22, p. 2865-2878, jun. 1998.

SZAKÁCS, G. *et al.* Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 219-234, mar. 2006.

TANNOCK, I.F. **The basic science of oncology**. 4th ed. New York: McGraw Hill; 2005.

TOLIOS, A. *et al.* Computational approaches in cancer multidrug resistance research: identification of potential biomarkers, drug targets and drug-target interactions. **Drug Resistance Updates**, [S.L.], v. 48, p. 100662, jan. 2020.

VAN MEERLOO, J. *et al.* Cell Sensitivity Assays: the mtt assay. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 237-245, 2011.

VERMEULEN, K. *et al.* The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 131-149, jun. 2003.

VISSER, K. E. de; *et al.* Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.24-37, jan. 2006.

WONG, R. S. *et al.* Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 1-14, 26 set. 2011.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2020.

XIANG, W. *et al.* Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro by milbemycin compounds in adriamycin-resistant human breast carcinoma (MCF-7/adr) cells. **Toxicology In Vitro**, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 1474-1481, set. 2010.

ZHAO, F. Y. *et al.* PDGF mediates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration by regulating NFATc2. **Molecular Medicine Reports**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1-1, 10 nov. 2020.

ZULALIAN, J. *et al.* Absorption, tissue distribution, metabolism, and excretion of moxidectin in cattle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 381-387, 1994.