

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCF – ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP

Amanda Blaque Becceneri

**Mecanismo de ação da cedrelona na morte celular
programada de células de câncer de mama**

São Carlos

2015

Mecanismo de ação da cedrelona na morte celular
programada de células de câncer de mama

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCF – ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP

Dissertação de Mestrado

Mecanismo de ação da cedrelona na morte celular programada de células de câncer de
mama

Amanda Blaque Becceneri

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Fisiológicas pelo Programa
Interinstitucional de Pós-Graduação
em Ciências Fisiológicas
UFSCar/UNESP

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Cominetti

São Carlos

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B388ma Becceneri, Amanda Blaque.
Mecanismo de ação da cedrelona na morte celular
programada de células de câncer de mama / Amanda
Blaque Becceneri. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
72 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

1. Câncer. 2. Mamas - câncer. 3. Produtos naturais. 4.
Cedrelona. I. Título.

CDD: 616.994 (20ª)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Amanda Blanque Becceneri, realizada em 30/03/2015:

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar

Profa. Dra. Keika Inouye
UFSCar

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
UEL

Dedico esse trabalho aos meus pais, José Carlos e Rossana

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre apoiaram minhas decisões e me incentivaram a seguir meus sonhos. Obrigada pelo exemplo que vocês são para mim. Gostaria de ter passado mais tempo com vocês nesses últimos dois anos, mas o tempo que passei, cada final de semana que parecia correr, foi especial e conseguiu me “reabastecer” para mais uma temporada longe do conforto do lar.

Aos meus avôs, João e Guilherme (*in memoriam*) pela eterna torcida e também às minhas avós, Elza e Angelina, pelo carinho e conversas diárias que sempre me ajudaram a “fugir” um pouco do estresse do dia-a-dia.

Ao meu irmão e minha cunhada, Larissa, que mesmo distantes, sempre estiveram na torcida pelo meu sucesso.

Ao meu querido namorado, João Vítor, por sempre estar ao meu lado me fazendo acreditar que posso mais que imagino e muitas vezes confiar mais em mim do que eu mesma confio. Obrigada sempre por me ajudar a melhorar, por me questionar, me escutar e estimular. Sua amizade, apoio, compreensão, amor e alegria fizeram esses dois anos de mestrado muito especiais.

Aos meus sogros, Célia e Luis Anibal e a suas famílias por me proporcionarem momentos excelentes, pelo incentivo e pela torcida. Obrigada pelo carinho!

À minha orientadora Profa. Dra. Marcia Cominetti, pela disponibilidade em me ajudar e pela compreensão e confiança em todos os momentos. Agradeço também cada momento compartilhado, que sempre foram de grande ensinamento. E também as saídas e comemorações que não podiam ter faltado.

Às minhas amigas, Luíza, Carol, Andreza, Damiana, Daniela e Jessyka que mesmo de longe sempre torceram e me ajudaram nesses últimos dois anos com momentos, mesmo que curtos, sempre muito especiais, que aliviavam a tensão e as preocupações.

Às especiais Labenzetes, pela ajuda em cada experimento que deu certo e por aqueles que não deram também (valeu a experiência), por cada gordice feita (não foram poucas), por cada risada, por cada angústia compartilhada, por cada almoço (seja no RU ou no Vila), por cada dificuldade, por cada carona, por cada parede pintada, por cada problema resolvido, por cada saída, por cada ida ao centro, mesmo que a trabalho, pelos estudos, pelos congressos e pela divisão de experiência e conhecimento. Obrigada

Labenzetes pela eterna parceria. Sem vocês os dias no Laben não seriam tão especiais. Não poderia deixar de agradecer cada Labenzete individualmente:

À Angelina por dividir seu conhecimento, seja sobre assuntos relacionados ao mestrado, seja sobre qualquer assunto, pelas conversas, pela amizade, caronas e sempre pelo bom humor.

À Cecília por sempre estar disposta a me ajudar, pelas caronas, pelas conversas, pelas aulas de carro, pela amizade e pelos estudos.

À Patrícia por sua disposição em me ajudar sempre que preciso, mostrar que temos que ser mais tranquilas e por cada momento de descontração e amizade.

À Francine por toda alegria e descontração que levou ao LABEN nos últimos dois anos e também pela sua disposição, ajuda e amizade.

À Marcela por em tão pouco tempo já ter me ajudado tanto, pela divisão de responsabilidade, pelo compartilhamento de seu conhecimento e momentos divertidos.

Agradeço também ao Júlio, Juliana e Gabriela pelos momentos e experiências compartilhados no LABEN.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) por sempre estar de portas abertas a mim e a todos os alunos do LABEN. Especialmente agradeço a Profa. Dra. Heloísa e suas alunas Carol, Kelly, Livia e Cynthia pela disposição e compartilhamento de conhecimento.

Ao Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI) e seus alunos pela disposição e ajuda, especialmente a Angélica pela amizade e pela disponibilidade para tirar dúvidas e transmitir sua experiência.

Ao departamento de Gerontologia por nos abrigar e ter nos fornecido um espaço adequado para desenvolvermos nossas pesquisas e por cada professor e funcionário presente que dividiram momentos pequenos, mas também importantes no dia-a-dia.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas e seus funcionários.

Ao financiamento da CAPES e FAPESP.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho.

RESUMO

O câncer está entre as maiores causas de morte do mundo, sendo que o câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres. O tratamento dessa doença requer uma cuidadosa seleção de um ou mais métodos de intervenção. A maioria das drogas usadas em quimioterapia atualmente provoca danos no DNA, tanto das células tumorais, como também das células normais, portanto o desenvolvimento de novos quimioterápicos é um desafio, uma vez que esses quimioterápicos devem ser capazes de agir seletivamente para matar ou inibir o crescimento apenas de células tumorais. Desde a antiguidade até hoje as plantas e seus produtos vêm sendo utilizados para o tratamento das doenças, sendo assim os compostos naturais podem proporcionar novas oportunidades para o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer. A cedrelona é um limonóide isolado do extrato metanólico do arilo de *Trichilia catigua*, uma planta nativa da flora brasileira que cresce abundantemente em várias regiões do país e que é popularmente conhecida como “cedrinho”, “catuaba” ou “catiguá”. Estudos demonstram que a cedrelona apresenta atividade inseticida e antifúngica, e em um estudo preliminar verificamos que a cedrelona inibe a proliferação de células tumorais da linhagem MDA-MB-231 com mais seletividade do que inibe a proliferação de fibroblastos humanos, inibe significativamente a adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno tipo I, e também possui um potencial excelente contra a migração e a invasão das células MDA-MB-231. A cedrelona também é capaz de induzir a apoptose em células da linhagem MDA-MB-231. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar o mecanismo de ação da cedrelona em células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231, por meio de análises da cedrelona, por meio do coeficiente de partição e do ensaio de atividade antioxidante e de ensaios de morfologia celular, formação de colônia, apoptose, como o de fragmentação de DNA e o de fragmentação nuclear, ciclo celular, pcr em tem real e western blotting. Os resultados demonstram que a cedrelona possui afinidade com membranas biológicas e não apresenta atividade antioxidante. Ainda, a cedrelona é capaz de induzir modificações morfológicas, diminuir o número e tamanho de colônias e induzir a apoptose aumentando a expressão gênica da proteína pró-apoptótica Bax e diminuindo a expressão gênica da proteína anti-apoptótica Bcl-2 nas células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231. Esses resultados indicam que a cedrelona tem potencial na terapia contra o câncer com base em sua ação antiproliferativa e efeitos de indução da apoptose.

Palavras-chave: câncer, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo, produto natural, limonóide, cedrelona, apoptose e ciclo celular.

ABSTRACT

Cancer is among the leading causes of death in the world and breast cancer is the type of cancer that affects more women. The treatment of this disorder requires a careful selection of one or more methods of intervention. The majority of drugs currently used in chemotherapy causes DNA damage in tumor cells and also in normal cells, therefore the development of new chemotherapeutic agents is challenging, since these chemotherapeutic agents should be able to kill or inhibit the growth only of tumor cells. From ancient times until today plants and their products have been used for the treatment of diseases, thus the natural compounds may provide new opportunities for the development of cancer drugs. Cedrelone is an isolated limonoid from methanol extract of *Trichilia catigua* aryl, a native Brazilian plant that grows abundantly in various regions of the country and is popularly known as "cedrinho", "catuaba" or "catiguá". Studies have shown that cedrelone has insecticidal and antifungal activity and previous studies performed by our research group have demonstrated that cedrelone is able to inhibit proliferation, colony formation, cell adhesion, migration, invasion and moreover, to induce apoptosis in triple negative breast cancer cells from the line MDA-MB-231. Therefore, the aim of this study was to identify the mechanism of action of cedrelone in triple negative breast tumor cells, MDA-MB-231, through cedrelone analysis, and through cell morphology assay, colony formation, apoptosis assays such as DNA fragmentation and nuclear fragmentation, cell cycle, qRT-PCR and western blotting. The results demonstrate that cedrelone has an affinity for biological membranes and no antioxidant activity. Furthermore, cedrelone is capable of inducing morphological changes, reduce the number and size of colonies and induce apoptosis by increasing the gene expression of pro-apoptotic protein Bax and decreasing gene expression of anti-apoptotic Bcl-2 in MDA-MB-231. These results indicate that cedrelone has immense potential in cancer therapy based on their antiproliferative and apoptosis inducing effects.

Keywords: cancer, breast cancer, triple negative breast cancer, natural product, limonoid, cedrelone, apoptosis and cell cycle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Anatomia da mama feminina. O mamilo e aréola são mostrados no exterior da mama. Os gânglios linfáticos, lobos, lóbulos, dutos e outras partes são mostrados no interior da mama.....	17
Figura 2 – O microambiente tumoral	20
Figura 3 – Os principais passos da formação da metástase.....	21
Figura 4 – Apoptose: via intrínseca e extrínseca.....	25
Figura 5 - Folha da <i>Trichilia catigua</i>	29
Figura 6- Estrutura molecular da cedrelona.	29
Figura 7 - Sobrevivência ao câncer nos Estados Unidos entre os anos de 1971 e 2012.	32
Figura 8 - Coeficiente de partição da cedrelona. Gráfico de distribuição da cedrelona em N-octanol e água.	42
Figura 9 - Determinação da atividade antioxidante da cedrelona e ácido gálico pela captura do radical livre DPPH. Inibição do DPPH após 15 minutos de incubação com a cedrelona (A). Inibição do DPPH após 30 minutos de incubação com a cedrelona (B). Os resultados foram comparados com o controle (sem cedrelona) (**P<0,001).....	43
Figura 10 - Efeito da cedrelona na morfologia das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. As células (1×10^5) foram tratadas com cedrelona (1, 10, 50 e 100 μ M) e fotografadas por diferentes períodos (2, 4, 6 e 24 horas). O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas representativas (40x) e as setas representam as alterações morfológicas relacionadas a apoptose.....	44
Figura 11- Efeito da cedrelona sobre a formação de colônias em células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231. As células (3×10^2) foram tratadas com cedrelona (1, 10, 50 e 100 μ M) por 2 horas. O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas representativa (A); Gráfico do número de colônias (B); Gráfico do tamanho das colônias (C). Os resultados foram comparados com o controle (sem tratamento) (*P<0,05; **P<0,001).	45
Figura 12 - Efeito de diferentes concentrações da cedrelona sobre a fragmentação nuclear das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. Como controle positivo foi utilizado a estaurosporina. As células (1×10^5) foram tratadas com cedrelona (1, 10, 50 e 100 μ M) por 2 horas. O experimento foi realizado em triplicata. A imagem	

corresponde a uma das triplicatas. As setas brancas nas imagens indicam alterações relacionadas a apoptose.	46
Figura 13 - Efeito da cedrelona sobre a fragmentação de DNA em células tumorais da linhagem MDA-MB-231 por meio do método de TUNEL. As células foram tratadas com 10µM de cedrelona por 1 hora. O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas representativas (A). O gráfico apresenta a porcentagem de células apoptóticas nas células do controle e nas células incubadas com cedrelona (10µM) (B). Os resultados foram comparados com o controle (sem tratamento) (**P<0,001).....	47
Figura 14 - Efeito da cedrelona no ciclo celular das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. As células (1x10 ⁶) foram tratadas com cedrelona (1, 10, 50µM) por 2 horas e analisadas por citometria de fluxo. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle (sem tratamento) (*P<0,05; ***P<0,001).	49
Figura 15 - Efeitos da cedrelona na expressão gênica de Bax, Caspase-3 e Bcl-2 nas células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231. As células (1x10 ⁶) foram tratadas por 2 horas com cedrelona. Efeitos da cedrelona na expressão gênica da Bax (A); Efeitos da cedrelona na expressão gênica da Bcl-2 (B); Efeitos da cedrelona na expressão gênica da Caspase-3(C).	50
Figura 16 - Efeito da cedrelona sobre a expressão proteica em células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231. Intensidade da banda da caspase-3 (A); Gráfico da expressão proteica da caspase-3 (B). Os resultados foram comparados com o controle (sem tratamento) (**P<0,001).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma16

Tabela 2– *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real40

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

cLogP – Coeficiente de partição octanol/água

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM – Meio Dulbecco's modificado

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FBS – Soro fetal bovino

IC₅₀ – Concentração capaz de inibir 50% da proliferação celular

PBS – Tampão Salina Fosfato

PI – Iodeto de Propídio

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

SDS-PAGE – Dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE) (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

TNF – Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

TUNEL – Marcação da extremidade livre com dUTP-biotina dependente de TdT (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Epidemiologia do Câncer	16
1.2	Câncer de mama	16
1.3	Patologia do Câncer	18
1.3.1	Apoptose	22
1.3.2	Ciclo Celular	25
1.4	Tratamento do Câncer	26
1.4.1	Produtos naturais no tratamento do câncer	27
1.4.1.1	Limonóides	28
1.4.1.1.1	Cedrelona	28
2	RESULTADOS PRELIMINARES	31
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVO	34
4.1	Objetivo Geral	34
4.2	Objetivos Específicos	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	Material	35
5.1.1	Extração, fracionamento e isolamento da cedrelona	35
5.2	Métodos	35
5.2.1	Análise da cedrelona	35
5.2.1.1	Determinação do Coeficiente de Partição	35
5.2.1.2	Avaliação da Atividade Antioxidante	36
5.2.2	Ensaio <i>in vitro</i> com a cedrelona e células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231	36
5.2.2.1	Cultura celular	36
5.2.2.2	Ensaio de Morfologia Celular	36
5.2.2.3	Ensaio de Formação de Colônias	37
5.2.2.4	Ensaio de Fragmentação Nuclear	37
5.2.2.5	Ensaio de Fragmentação de DNA – Ensaio de TUNEL	38
5.2.2.6	Ensaio de Ciclo Celular	39
5.2.2.7	Ensaio de PCR em Tempo Real	39
5.2.2.8	Ensaio de Western Blotting	40

5.2.3 Análise Estatística	41
6 RESULTADOS	42
6.1 Análise da Cedrelona.....	42
6.1.2 Determinação do Coeficiente de Partição	42
6.1.3 Avaliação da Atividade Antioxidante.....	43
6.2 Ensaio <i>in vitro</i> com a cedrelona e células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231	44
6.2.1 Ensaio de Morfologia Celular	44
6.2.3 Ensaio de Formação de Colônias	45
6.2.3 Ensaio de Fragmentação Nuclear	46
6.2.4 Ensaio de Fragmentação de DNA – Ensaio de TUNEL.....	47
6.2.5 Ensaio de Ciclo Celular.....	48
6.2.6 Ensaio de PCR em tempo real.....	49
6.2.7 Ensaio de Western Blotting	51
7 DISCUSSÃO	52
8 CONCLUSÃO.....	56
9 REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Câncer

O câncer está entre as maiores causas de morte do mundo. Essa doença foi responsável por 8,2 milhões de mortes no mundo em 2012, e o número de novos casos deverá aumentar de 14 milhões em 2012 para 22 milhões nas próximas duas décadas, influenciado, em parte, pelo aumento da população e pelo envelhecimento global. Os tipos que mais causam mortes são o de pulmão, fígado, estômago, colorretal e mama (WHO, 2008; WHO, 2014).

No Brasil, para os anos de 2014 e 2015, as estimativas sugerem 576 mil novos casos de câncer, evidenciando essa doença como um grande problema de saúde pública. O tipo mais incidente é o de pele não melanoma para ambos os sexos, seguido em homens pelos cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, pelos de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (BRASIL, 2014a). A tabela 1 apresenta a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 e válido também para 2015 por sexo, exceto pele não melanoma.

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.*

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Homens 	Mulheres 	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

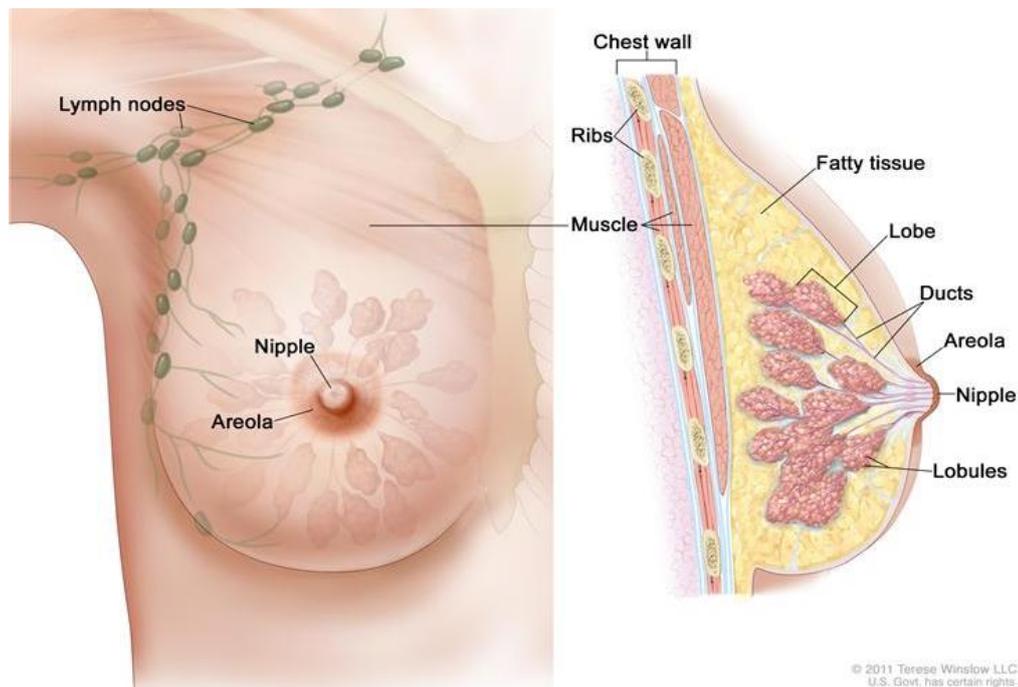
* Extraído e modificado de BRASIL, 2014a.

1.2 Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo. No Brasil, ele apresenta uma alta incidência, sendo que para os anos de 2014 e 2015 são esperados 57.120 novos casos em mulheres (BRASIL, 2014b). Esse tipo de câncer pode ser definido como o câncer que se forma nos tecidos da mama (figura 1) e ocorre em homens

e mulheres, embora o câncer de mama masculino seja raro. O tipo mais comum de câncer de mama em mulheres é o carcinoma ductal, que começa no revestimento dos ductos de leite, outro tipo bastante comum é o carcinoma lobular, que começa nos lóbulos (glândulas do leite) da mama (NCI, 2015).

Figura 1- Anatomia da mama feminina. O mamilo e aréola são mostrados no exterior da mama. Os gânglios linfáticos, lobos, lóbulos, dutos e outras partes são mostrados no interior da mama. *



* Extraído e modificado de NCI, 2015.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são: idade avançada, idade da menarca, idade da menopausa, alimentação, histórico familiar, entre muitos outros (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000). Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados (BRASIL, 2014b).

Os cânceres de mama mostram grande heterogeneidade, apesar da sua origem tecidual comum. Décadas de pesquisa em patologia e genética molecular têm mostrado uma série de subtipos distintos. Atualmente, apenas um número limitado de fatores clínicos, patológicos e moleculares auxiliam os médicos a tomarem decisões sobre a seleção da terapia e o prognóstico da doença. Os tumores de mama são classificados em três principais grupos

com base nos receptores de superfície das células tumorais que refletem as opções de tratamento disponíveis. Assim sendo um câncer de mama pode ser: receptor de estrogênio (RE) positivo ou negativo, receptor de progesterona (RP) positivo ou negativo e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) positivo ou negativo. O câncer de mama que não apresenta nenhum tipo de receptor hormonal ou amplificação do HER2 é chamado de câncer de mama triplo negativo (CMTN) (ENGEBRAATEN; VOLLAN; BORRESEN-DALE, 2013).

O CMTN representa cerca de 15% dos cânceres de mama que não têm expressão de RE e RP e não apresentam amplificação do HER2 (CRISCITIELLO et al., 2012). Os CMTNs formam um grupo heterogêneo de tumores, que exibem natureza agressiva com maiores taxas de recidiva e menor sobrevida global em comparação com outros subtipos de câncer de mama. Os benefícios da terapia direcionada para pacientes com câncer da mama RE-positivo/RP-positivo e HER2-amplificado não podem ser aplicados a pacientes com CMTN por causa da ausência de alvos moleculares bem definidos. A quimioterapia citotóxica é atualmente a única opção de tratamento sistêmico para CMTN (ABRAMSON et al., 2015).

1.3 Patologia do Câncer

O câncer é uma doença extremamente heterogênea e complexa (MICHOR; IWASA; NOWAK, 2004; PEDRAZA-FARINA, 2006). Esse termo é utilizado para um conjunto de mais de 100 doenças nas quais células anormais se dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos e se espalhar por outros órgãos (WHO, 2014; BRASIL, 2014c).

As causas do câncer são muito diversas devido à complexidade da doença e estão relacionadas a fatores externos e/ou internos ao organismo, como, por exemplo, os fatores genéticos, estilo de vida, exposição a diferentes tipos de agentes químicos e radiação. Esses fatores causais podem agir conjuntamente ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (ACS, 2014; BRASIL, 2014c).

O processo pelo qual uma célula normal adquire características tumorais ocorre por meio de mutações e mudanças epigenéticas que ativam oncogenes ou inibem a atividade de genes supressores tumorais (PEDRAZA-FARINA, 2006). Durante o desenvolvimento do tumor algumas alterações fisiológicas são comuns a todos os tipos de câncer, apesar da heterogeneidade da doença. Entre elas estão a auto-suficiência em sinais de crescimento, resistência a sinais inibitórios de crescimento e resistência a morte celular permitindo a imortalidade replicativa e a indução de angiogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Os

tumores malignos, além das propriedades anteriores, possuem também a capacidade de invadir tecidos e órgãos distantes, podem resultar em metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LAZEBNIK, 2010). Em uma publicação mais recente, duas características adicionais foram incorporadas como alterações relacionadas às células tumorais. A primeira envolve a capacidade de tais células modificarem ou reprogramarem o metabolismo celular, a fim de induzir a proliferação neoplásica. A segunda está relacionada ao fato de que as células tumorais podem passar despercebidas pelo sistema imune, em particular, por linfócitos T e B, macrófagos e por células *natural killers* (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

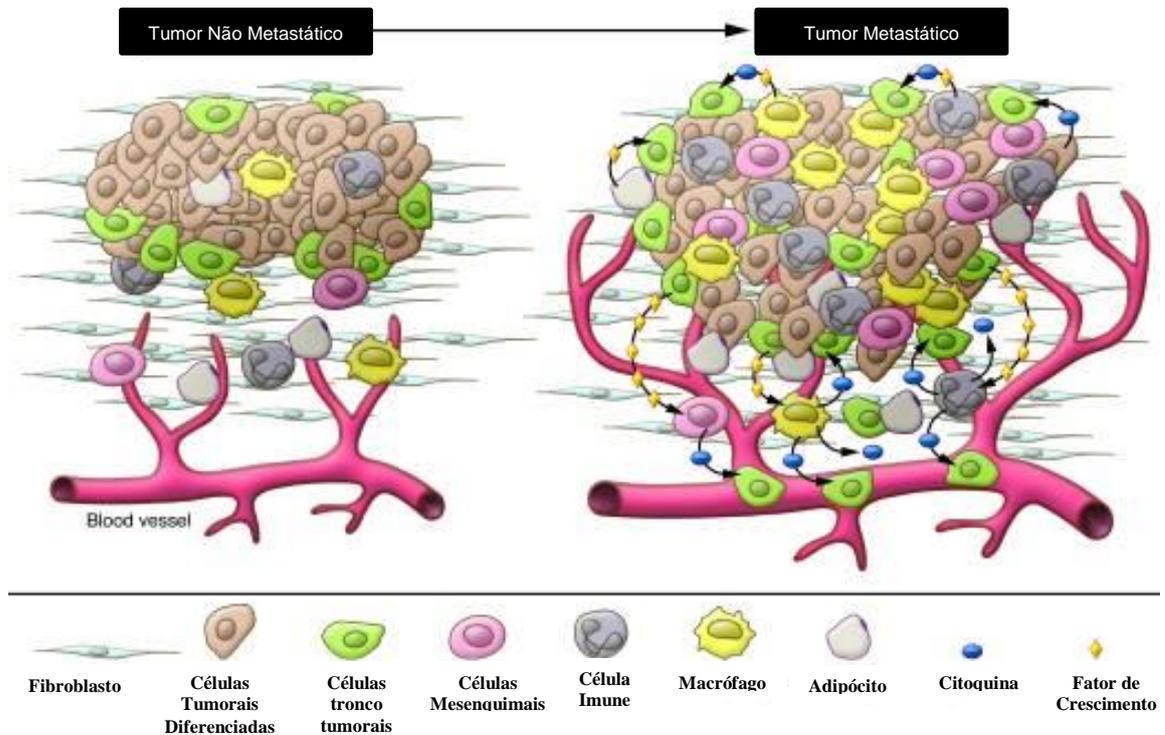
A p53 é um elemento chave na manutenção da estabilidade do genoma, na regulação da morte celular e em outros vários processos celulares. Embora seja mais conhecida pelo seu papel como supressora de tumor, a lista das suas funções inclui papéis reguladores no metabolismo do substrato, senescência celular, autofagia, reparo do DNA, estresse oxidativo e angiogênese (LIU et al., 2012; VOUSDEN; LANE, 2007; AGARWAL et al., 1998). Nos tumores humanos essa proteína, comumente, sofre uma mutação e a perda da sua função original pode ser essencial para a tumorigênese (ELLIS et al., 1997). Mutações no gene p53 resultam em um descontrole do ponto de checagem na fase G1 do ciclo celular e em apoptose (YU; ZHANG, 2005; AGARWAL et al., 1998).

Pesquisas recentes demonstram que os tumores são estruturas complexas (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). A maior parte dos tumores é mantida por uma subpopulação de células que apresentam características semelhantes às de células-tronco, sendo capazes de mediar a metástase e contribuir para a resistência aos tratamentos contra o câncer. Essas células-tronco tumorais (CTTs) são reguladas por complexas interações com os componentes do microambiente tumoral. Este é formado por células inflamatórias, fatores de crescimento solúveis, citocinas e pela matriz extracelular, que se comunica com as células tumorais (figura 2). Os níveis elevados de citocinas e fatores de crescimento produzidos pelas células tumorais aumentam a proliferação e sobrevivência das CTTs, induzem a angiogênese e recrutam macrófagos associados a tumores, neutrófilos e mastócitos, que segregam fatores de crescimento adicionais, formando um circuito fechado de realimentação positiva que permite a célula tumoral invadir tecidos e órgãos distantes (KORKAYA; LIU; WICHA, 2011). Embora várias células do sistema imune sejam recrutadas para o local do tumor, as suas funções antitumorais estão desreguladas, em grande parte, em resposta a sinais derivados de tumores (KORKAYA et al., 2011; WHITESIDE, 2008).

Portanto, essas interações contínuas no microambiente tumoral podem contribuir para promover o aparecimento de câncer, sustentar o desenvolvimento do tumor,

defender o tumor do sistema imune do hospedeiro, resistir a terapias e propiciar a metástase (KORKAYA et al., 2011; WHITESIDE, 2008).

Figura 2 – O Microambiente Tumoral.*



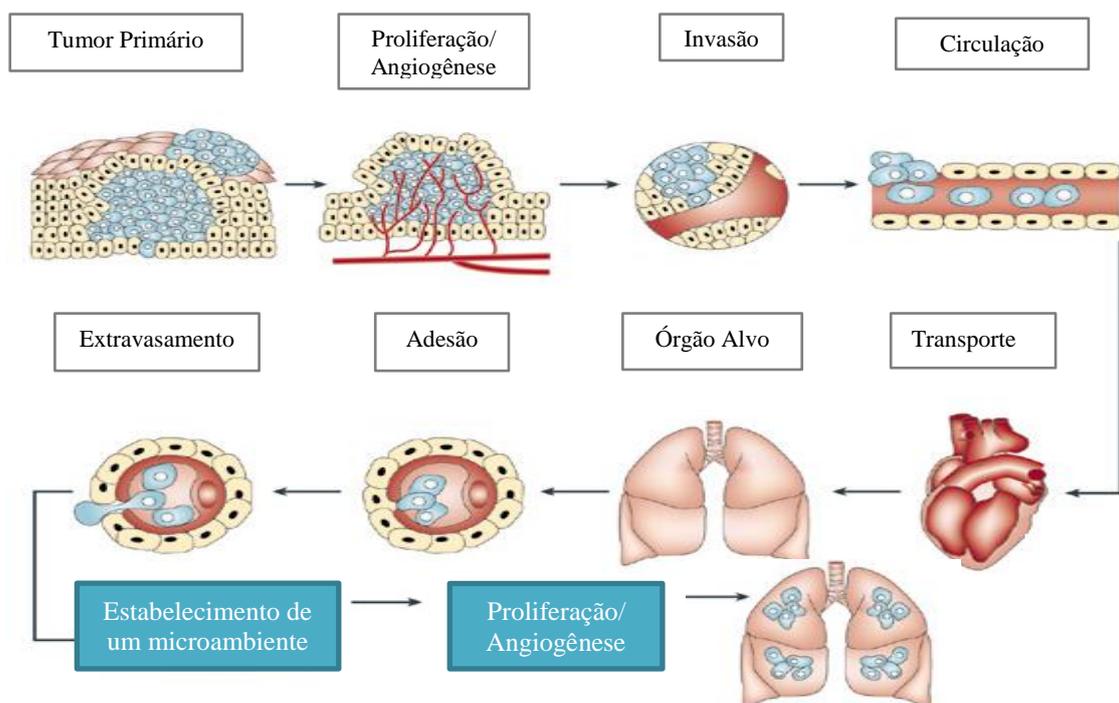
* Extraído e modificado de KORKAYA; LIU; WICHA, 2011.

A metástase tem sido estudada por mais de 100 anos, porém apenas recentemente foram conhecidos os mecanismos pelos quais células metastáticas surgem a partir de tumores primários e as razões pelas quais certos tipos de tumores tendem a metastatizar para órgãos específicos. Um extenso conjunto de dados clínicos e de investigação experimental confirmou a hipótese "da semente e do solo" proposta por Stephen Paget em 1889, a qual propõe que a metástase depende da interação entre células tumorais metastáticas (as "sementes") e o microambiente de um órgão específico (o "solo") (FIDLER, 2003; LANGLEY; FIDLER, 2011). A metástase, a propagação das células do tumor primário para órgãos distantes, e o seu crescimento rápido, é o aspecto mais temido do câncer. Apesar das melhorias significativas no diagnóstico, técnicas cirúrgicas, cuidados gerais do paciente e terapias adjuvantes locais e sistêmicas, a metástase ainda é causa principal de morte no câncer devido à resistência às terapias convencionais (FIDLER, 2003; WHO, 2014). Ela é decorrente de uma cascata molecular por meio da qual as células tumorais deixam o tumor

primário e migram para outros locais onde se proliferam dando origem a um tumor secundário (BROOKS et al., 2010).

As etapas envolvidas na cascata metastática, apresentadas na figura 3, podem ser resumidas da seguinte forma: primeiramente ocorre o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos para suprir as necessidades do tumor, processo denominado angiogênese; seguida pela evasão de células tumorais do tumor primário; invasão e migração por meio da membrana basal (MB) e da matriz extracelular (MEC) e disseminação para locais distantes através da circulação sanguínea ou linfática; adesão das células tumorais às células endoteliais do órgão alvo; invasão das células tumorais através da camada de células endoteliais e da MB; por fim o crescimento do tumor secundário no órgão alvo, seguido de novo processo angiogênico (FIDLER, 2003; CHAMBERS et al., 2002 apud BROOKS et al., 2010). Na cascata metastática apenas uma pequena parte das células tumorais circulantes colonizam os sítios secundários. A maior parte das células tumorais é morta pelo sistema imune ou por apoptose (SHUKLA; SINGH, 2007). A busca de novas moléculas que possam atuar em diferentes pontos do processo metastático e ativar a apoptose é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos tipos de tratamento, mais eficazes e com menos efeitos colaterais do que os observados na quimioterapia atual.

Figura 3 – Os principais passos da formação da metástase.*



* Extraído e modificado de FIDLER, 2003.

1.3.1 Apoptose

A homeostase celular nos tecidos é mantida por três mecanismos: proliferação, diferenciação e morte celular. Entretanto, durante anos as pesquisas contemplaram apenas os dois primeiros mecanismos, o de proliferação e de diferenciação celular, e pouca atenção foi destinada ao mecanismo de morte celular (ZHIVOTOVSKY, 2004). Pela primeira vez, em 1842, a observação de que a morte celular é parte de desenvolvimento normal foi realizada pelo alemão, Carl Vogt, mas o interesse nesta área permaneceu dormente por mais de um século. A redescoberta do tema ocorreu mais tardiamente em 1965, quando pela primeira vez o termo morte celular programada foi introduzido, por Lockshin e Williams, para se referir especificamente à morte celular durante o desenvolvimento. A cunhagem do termo “apoptose” ocorreu em 1972 por Kerr, Wyllie, e Currie que descreveram as mudanças morfológicas relacionadas a esse tipo de morte e concluíram que ela desempenha um papel complementar, mas oposto à mitose na regulação da população de células animais (LOCKSHIN; ZAKERI, 2001; KERR, WYLLIE; CURRIE, 1972; VOGT, 1842 apud DEGTEREV; BOYCE; YUAN, 2003). Desde então, muitas pesquisas relacionadas à apoptose foram desenvolvidas e por meio delas os genes e caminhos que controlam e influenciam, positivamente ou negativamente, a progressão da apoptose foram identificados (HOLCIK; KORNELUK, 2001).

O termo "apoptose" é derivado de palavras gregas que significam "cair fora" e referem-se a queda das folhas das árvores no outono (KERR; HARMON, 1991 apud WONG, 2011). A apoptose ou morte celular programada é essencial para a manutenção da homeostase e para a sobrevivência de organismos multicelulares. A desregulação desse processo pode levar a consequências catastróficas, e está envolvida em muitas doenças, tais como câncer, doenças neurodegenerativas e autoimunes. Portanto, o rígido controle do processo de apoptose é crítico para a sobrevivência celular (DANIAL; KORSMEYER, 2004; DEGTEREV; BOYCE; YUAN, 2003; HOLCIK; KORNELUK, 2001).

Durante a apoptose, as células adquirem formato esférico, perdem o contato com as células vizinhas, a cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. Então, a membrana começa a formar saliências, referidas como “*blebs*”, e o núcleo se fragmenta. Essas saliências da membrana celular culminam em pequenas vesículas, conhecidas como corpos apoptóticos (SARASTE; PULKKI, 2000; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos (HENSON; BRATTON, 2013). A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos suprime ativamente a inflamação pela

inibição da produção de citocinas inflamatórias e indução da produção de fatores anti-inflamatórios (FADOK et al., 1998).

A externalização de fosfatidilserina em células apoptóticas, mas não em células necróticas, é considerado como um marcador de apoptose (ZHIVOTOVSKY, 2004). As células que sofrem apoptose diferem daqueles que morrem por meio de necrose, que é sinalizada por mudanças irreversíveis no núcleo e no citoplasma. As células necróticas são geralmente reconhecidas pelo sistema imune como um sinal de perigo resultando em inflamação; em contraste, a morte por apoptose é tranquila e ordenada (MAJNO; JORIS, 1995; XU; SHI, 2007).

Outra característica marcante da morte celular por apoptose é a fragmentação do DNA, sendo os responsáveis por essa fragmentação, uma série de substratos de caspases (SARASTE; PULKKI, 2000; TAYLOR et al., 2008; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). As caspases (*cysteine aspartic acid-specific proteases*) pertencem a uma família de proteases que apresenta uma cisteína no sítio ativo e são responsáveis pela clivagem de substratos que contenham resíduos específicos de ácido aspártico. Para manter o programa apoptótico sob controle, as caspases inicialmente são expressas nas células na forma de precursores inativos, as pró-caspases e necessitam de oligomerização e/ou clivagem para sua ativação (OKADA; MAK, 2004; TAYLOR et al., 2008). Essas enzimas estão presentes no citosol de todos os animais e a ativação da cascata de caspases é o passo central da apoptose (STENNICKE; SALVESEN, 1998; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). A família das caspases pode ser dividida em iniciadoras, que são ativadas em resposta a certos estímulos, e em efetoras, que são essenciais para a desmontagem ordenada de estruturas celulares vitais por meio da clivagem de substratos (TAYLOR et al., 2008). As caspases clivam um grande número de diferentes substratos no citoplasma ou núcleo que levam a muitas das características morfológicas da apoptose (DEGTEREV; BOYCE; YUAN, 2003).

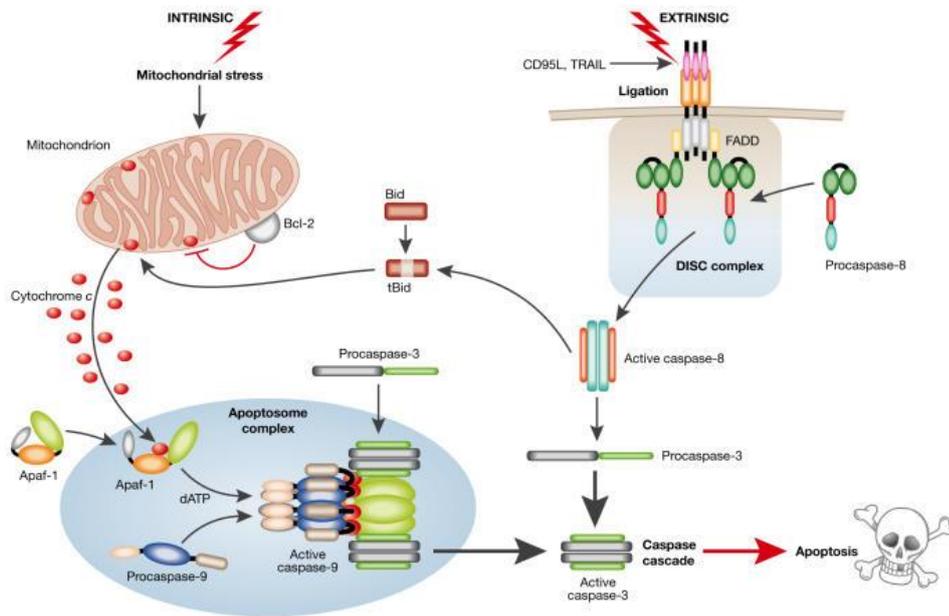
A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas principais maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (figura 4). A via extrínseca é ativada pela ligação de ligantes específicos a receptores de morte celular de superfície, tais como Fas e receptores ligantes de necrose tumoral (TRAIL) (DANIAL; KORSMEYER, 2004). Essa ligação promove a agregação de proteínas adaptadoras que se ligam ao domínio intracelular do receptor, que então se liga ao pró-domínio de caspases iniciadoras, resultando na formação do complexo DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), onde ocorre a ativação da pró-caspase-8, que pode clivar caspases efetoras, como a caspase-3, o que leva a apoptose

(ALGECIRAS-SCHIMNICH et al., 2002; BUDIHardJO et al., 1999; PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013).

Por outro lado, a morte celular pela via intrínseca é ativada por uma grande variedade de sinais, incluindo radiação, dano ao DNA, calor, medicamentos citotóxicos, estresse celular e a retirada dos fatores de crescimento. Em resposta a esses estresses, vias de sinalização são transduzidas e convergem, principalmente, para a mitocôndria, que sofre modificações de potencial de membrana interna e de permeabilidade de membrana. A permeabilização da membrana mitocondrial é mediada por alguns membros da família Bcl-2 que regulam a apoptose coordenadamente. Essa permeabilização permite a liberação de proteínas em condições apoptóticas, sendo que a primeira proteína mitocondrial a ser liberada para o citoplasma pela mitocôndria é o citocromo c, que forma um complexo com o fator de ativação associado à apoptose-1 (APAF-1) e com a pró-caspase-9, o que leva à ativação da caspase-9, desencadeando a ativação das caspase-3, -6 e -7, o que resulta na apoptose (KANG; REYNOLDS, 2009; OKADA; MAK, 2004; SAELENS et al., 2004; XU; SHI, 2007).

A família das proteínas Bcl-2 regula a permeabilidade da membrana mitocondrial e pode determinar se a célula iniciará ou abortará o processo de apoptose. Acredita-se que o principal mecanismo de ação da família Bcl-2 é a regulação da liberação de citocromo c das mitocôndrias da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (ELMORE, 2007). Esta família de proteínas é constituída por 25 membros pró-apoptóticos, como Bax, Bak, Bok, Bim, Bad, e Bid, e anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl/A-1, que interagem para manter o equilíbrio entre as células recém-formadas e as células que estão morrendo (SPIERINGS et al., 2005).

Figura 4– Apoptose: via intrínseca e extrínseca. *



* Extraído de MACFARLANE ; WILLIAM, 2004.

A compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer são importantes para o desenvolvimento de novas terapias para o câncer (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

1.3.2 Ciclo Celular

O ciclo celular é o mecanismo pelo qual as células se dividem e seu controle é um processo fundamental em eucariotas. Este mecanismo é dividido em duas principais fases: a intérfase e a mitose, processo de divisão nuclear. A intérfase é o período que precede a divisão celular com intensa atividade metabólica e é dividida em três fases: fase G1 (“Gap 1”), S (Síntese) e G2 (“Gap 2”). Na fase G1 a célula está se preparando para a síntese de DNA, que ocorre na fase seguinte, a fase S. Depois a célula segue para fase G2, na qual a célula se prepara para a mitose (M). A progressão ordenada de G1 para S e de G2 para a fase M é controlada por pontos de checagem. Em resposta a danos ao DNA, o ciclo celular pode parar nestes pontos de checagem para que a célula possa tentar repará-lo (NIGG, 2001; PAULOVICH; TOCZYSKI; HARTWELL, 1997; SCHAFER, 1998; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

As células humanas estão equipadas com mecanismos de controle da divisão celular, como a apoptose. Mutações no conteúdo genético das células podem perturbar estes mecanismos regulatórios e contribuir para a formação de doenças, como o câncer (RIVOIRE et al., 2001). Portanto, tratamentos que possam induzir a parada do ciclo celular nos pontos de checagem e/ou induzir a apoptose podem ser muito eficazes.

1.4 Tratamento do Câncer

No começo do século XX, apenas tumores pequenos e sem metástases eram curáveis por meio de cirurgias. Com o avanço nas pesquisas e tecnologia, a radiação começou a ser utilizada após a remoção cirúrgica do tumor. Mais tarde, a quimioterapia passou a ser empregada com a finalidade de destruir células tumorais que se espalharam a partir do tumor primário para outros locais (AMERICAN CANCER ASSOCIATION, 2014). Atualmente, o tratamento do câncer requer a escolha de intervenções, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia com o objetivo de curar a doença ou prolongar a vida, melhorando a qualidade de vida do paciente (WHO, 2014).

A cirurgia é um dos principais tratamentos para o câncer. Ela é um procedimento local que pode eliminar completamente o tumor se ele não tiver espalhado pelo corpo (CANCER RESEARCH UNITED KINGDOM, 2014a). A radioterapia é um tratamento no qual são utilizadas radiações para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem (BRASIL, 2014d). Já a quimioterapia é o tratamento com uma ou uma combinação de drogas que pode ser administrado via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intracranial ou tópica. No século XX, a quimioterapia foi dominada pelo desenvolvimento de drogas genotóxicas, iniciada pela descoberta das propriedades antitumorais da mostarda de azoto e da aminopterina, análoga do ácido fólico, na década de 1940 (BAGULEY, 2002). Atualmente existem mais de 100 diferentes tipos de drogas disponíveis e muitas estão em processo de desenvolvimento. Apesar da grande quantidade de medicamentos disponíveis os efeitos adversos desse tipo de tratamento são muito intensos e comprometem a qualidade de vida do paciente (CANCER RESEARCH UNITED KINGDOM, 2014b; BRASIL, 2014e).

O desenvolvimento de novos quimioterápicos é um desafio, pois esses quimioterápicos devem ser capazes de agir seletivamente para matar ou inibir o crescimento apenas de células tumorais. Porém, a maioria das drogas usadas em quimioterapia atualmente provoca danos no DNA, tanto das células tumorais, como também das células normais, levando a morte das células de rápida divisão e caracterizando os indesejáveis efeitos adversos associados (queda de cabelo, cansaço, enjoos, fraqueza, perda de peso, entre outros).

Além disso, as técnicas quimioterápicas utilizadas atualmente não são capazes de erradicar todas as células neoplásicas do tumor, mas apenas destroem uma proporção das células que foram expostas ao tratamento. Outra característica das drogas quimioterápicas é que muitas agem somente em estágios específicos do ciclo celular da célula tumoral, fazendo com que, em outros estágios, as células não respondam ao tratamento (CHAKRABORTY, 2007; CANCER RESEARCH UNITED KINGDOM, 2014b; BRASIL, 2014e).

O principal obstáculo para o tratamento de metástases é a heterogeneidade biológica das células tumorais no tumor primário e nas metástases. Além disso, o microambiente de um órgão específico pode modificar a resposta de uma célula tumoral metastática ao tratamento. Portanto, a compreensão da patogênese da metástase nos níveis sistêmicos, celulares e moleculares são metas importantes de pesquisas sobre o câncer (FIDLER, 2003).

Dentre os quimioterápicos mais importantes para o câncer, a vimblastina e a vincristina (extraídas de *Catharrantus roseus*), o etoposídeo, o teniposídeo e o taxol são respeitáveis fármacos introduzidos na terapêutica nos últimos 20 anos, fundamentais para o renascimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2007).

1.4.1 Produtos naturais no tratamento do câncer

Desde a antiguidade até hoje as plantas e seus produtos vêm sendo utilizados para o tratamento das doenças. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de parte diversas de plantas foi uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. As plantas produzem moléculas orgânicas que estão envolvidas na proteção contra bactérias, vírus e fungos, insetos, animais, ou outra planta que pode vir ameaçar sua sobrevivência. Muitos destes compostos químicos são biologicamente ativos quando isolados e, portanto, as plantas são fontes muito ricas de agentes químicos com atividade farmacológica que podem ser considerados medicamentos em potencial (PAGE et al., 2004; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2007).

Entre os anos de 1785 e 1928, a descoberta de produtos de origem natural, tal como a penicilina, extraída de um fungo, como fontes de drogas para o tratamento de doenças, corroboraram o surgimento da indústria farmacêutica (RISHTON, 2008). Na literatura, há referências de vários produtos naturais testados em células tumorais, como o Paclitaxel, nome comercial é Taxol®. Na década de 1970, o medicamento Taxol®, cujo princípio ativo é extraído da casca do teixo do pacífico (*Taxus brevifolia*), foi testada em

roedores que apresentavam câncer, verificando-se uma alta eficácia deste composto na inibição da proliferação de células tumorais. Feitos mais alguns testes com decorrer dos anos constatou-se que o Taxol® interfere nas funções normais necessárias para o aumento da proliferação das células tumorais e atuam sobre os microtúbulos, estabilizando-os no estado polimerizado (KINGSTON, 2007; RANG; DALE; RITTER, 2001).

Estudos demonstram que diversos compostos naturais, como o resveratrol, a genisteína, o ácido betulínico e os análogos da vitamina E tem suas atividades antitumorais mediadas pela modulação das vias de morte celular, incluindo a apoptose, em células tumorais (DHANDAYUTHAPANI et al., 2013; FULDA, 2010). Portanto, os compostos naturais podem proporcionar novas oportunidades para o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer, uma vez que podem modular as vias da apoptose, que são frequentemente bloqueadas em células tumorais. Logo, é crescente o interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos derivados de compostos (FULDA, 2010; DIMASI; GRABOWSKI, 2007). A quimioprevenção do câncer utilizando compostos naturais ou sintéticos para inibir o desenvolvimento de câncer também é uma área de investigação ativa (RAFFOUL et al., 2012).

1.4.1.1 Limonóides

O termo limonóide é derivado de limonin, que foi identificado pela primeira vez como o constituinte amargo de sementes de frutas cítricas em 1841. Os limonóides são encontrados nas famílias de plantas da família Rutales e também mais abundantemente nas famílias Meliaceae e Rutaceae. Os limonóides representam um grupo de metabólitos secundários, o qual exibe uma ampla gama de propriedades biológicas, incluindo antitumorais, agentes antibacterianos, antifúngicos, antimaláricos e antivirais (ROY; SARAF, 2006; TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI, 2014).

1.4.1.1.1 Cedrelona

O Brasil é um país de proporções continentais ocupando quase a metade da América do Sul e abrangendo várias zonas climáticas. Estas diferenças climáticas levam à diversidade ecológica, formando zonas biogeográficas distintas, como a Floresta Amazônica, o Pantanal, o Cerrado, a Caatinga, os Pampas e a Mata Atlântica. A variedade de biomas reflete a enorme riqueza da flora e da fauna brasileiras, sendo que o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta (BRASIL, 2015f). Portanto, uma multiplicidade de compostos

ativos pode ser utilizada como modelos na busca de novas moléculas antitumorais (SUFFREDINI; VARELLA; YOUNES, 2006).

A *Trichilia catigua* (figura 5) é uma planta nativa da flora brasileira que cresce abundantemente em várias regiões do país, tendo sua maior ocorrência de São Paulo até o Rio Grande do Sul. Ela é popularmente conhecida como “cedrinho”, “catuaba” ou “catiguá” e é amplamente utilizada na medicina tradicional como um tônico para o tratamento da fadiga, estresse, impotência, depressão, inflamação e contra os déficits de memória, sendo também utilizada como substância digestiva e purgante. Algumas indústrias farmacêuticas e de bebidas no Brasil utilizam a casca desta planta para preparar bebidas tônicas (MATOS et al., 2009; VIANA et al., 2011).

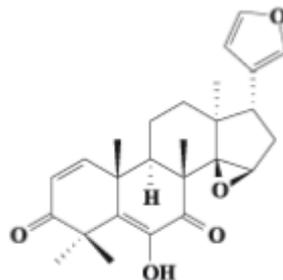
Figura 5- Flores, frutos e arilos e sementes da *Trichilia catigua*. *



* Disponível em: <http://www.colecionandofrutas.org/trichiliacatigua.htm> .

A cedrelona é um limonóide isolado do extrato metanólico do arilo de *Trichilia catiguá* (Meliaceae) (MATOS et al., 2009; VALMORBIDA et al., 2008; VIANA et al., 2011), cuja estrutura molecular está demonstrada na figura 6.

Figura 6- Estrutura molecular da cedrelona. *



* Extraído de Casal *et al.* (2010).

Estudos demonstram que a cedrelona apresenta atividade inseticida relevante e apresenta mortalidade larval moderada em *Spodoptera frugiperda* (MATOS et al., 2009). Em outro estudo, a cedrelona, isolada da espécie *Toona ciliata*, mostrou atividade antifúngica contra *Puccinia arachidis*, um patógeno da ferrugem (GOVINDACHARI et al., 2000). Cazal et al. (2010) avaliaram o efeito citotóxico de produtos isolados de membros das famílias *meliaceae* e *rutaceae* em células tumorais das linhagens MCF-7 (câncer de mama), NCI-H460 (câncer de pulmão) e A375-C5 (melanoma). Nesse estudo, a cedrelona mostrou-se o inibidor mais ativo do crescimento celular, apresentando valores de GI₅₀ abaixo de 4,20µM, em todas linhagens testadas (CAZAL et al., 2010).

2 RESULTADOS PRELIMINARES

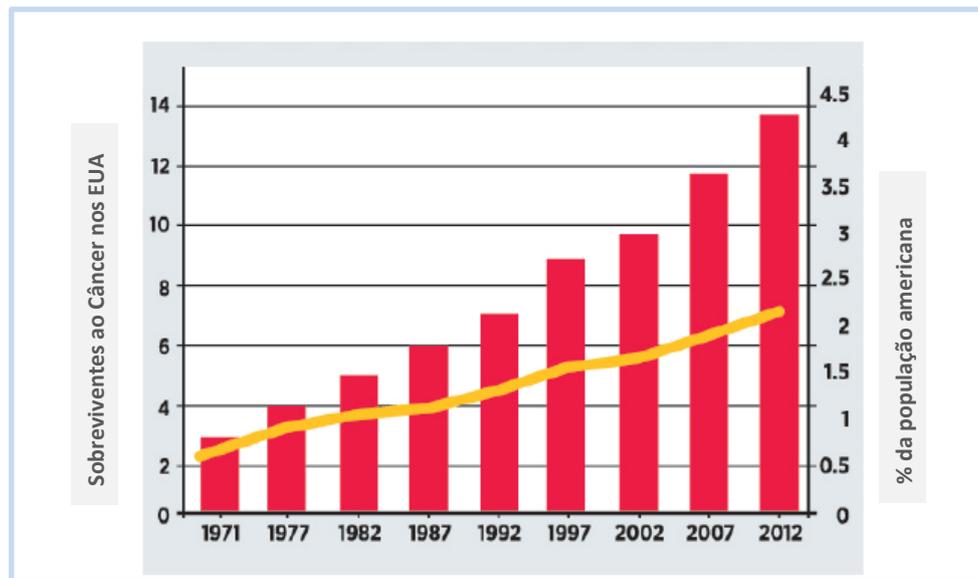
Em experimentos anteriores realizados no Laboratório de Biologia do Envelhecimento, LABEN, verificamos que a cedrelona inibe a proliferação de células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 (IC_{50} de $21,81 \pm 1,34 \mu M$) com maior especificidade do que inibe a proliferação de fibroblastos humanos (FH) (IC_{50} de $39,13 \pm 1,59 \mu M$). A cedrelona também inibe a formação de colônias de células MDA-MB-231 em quase 50% em concentrações tão baixas quanto $1 \mu M$; maiores concentrações impedem totalmente a capacidade de formação de colônias pelas células de tumor de mama (FUZER et al., 2013).

A cedrelona inibe significativamente a adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno tipo I, um componente da matriz extracelular com IC_{50} de $35,10 \pm 6,25 \mu M$. Foram realizados outros experimentos que demonstraram que a cedrelona possui um potencial excelente contra a migração e a invasão das células MDA-MB-231, com efeitos a partir de $10 \mu M$, em parte por inibir a atividade da MMP-9, como demonstrado por ensaios de zimografia. Por fim, a cedrelona foi capaz de induzir apoptose em células da linhagem MDA-MB-231, sendo que na concentração de $100 \mu M$ ela foi capaz de induzir significativamente a apoptose e a necrose em, aproximadamente, 95% das células MDA-MB-231 (FUZER et al., 2013).

3 JUSTIFICATIVA

O avanço nas pesquisas com objetivo de detectar, diagnosticar e tratar o câncer foi significativo nos últimos anos, segundo a Associação Americana para Pesquisas do Câncer (2013). Felizmente, o número de sobreviventes ao câncer nos Estados Unidos está crescendo desde 1971, nesse ano apenas 1 em cada 69 americanos sobrevivia ao câncer, mas hoje graças as pesquisas biomédicas, 1 em cada 22 americanos sobrevive ao câncer (AACR, 2014). Este fato pode ser observado no gráfico abaixo (figura 7). Apesar desse aumento da sobrevivência, nos Estados Unidos, o câncer está perto de se tornar a doença que mais matará americanos e é considerado um problema de saúde pública, visto que o tratamento é caro para o Estado. Segundo a associação, pesquisas diversas e de alta qualidade precisam ser desenvolvidas para continuarmos avançando contra o câncer (AACR, 2013).

Figura 7 - Sobrevivência ao câncer nos Estados Unidos entre os anos de 1971 e 2012. *



*Extraído e modificado de AACR, 2014.

A natureza heterogênea do câncer de mama tem implicações para os médicos e seus pacientes. Cada vez mais, os tratamentos são direcionados para marcadores moleculares (DENT et al., 2007). Portanto, a ausência de alvos específicos em CMTN é um grande desafio no tratamento de pacientes com este tipo subtipo de câncer de mama. Neste sentido, há uma necessidade urgente de novas moléculas específicas para CMTN.

Na literatura ainda são escassos os relatos sobre a cedrelona, sendo que ao realizar uma busca no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com a palavra-chave *cedrelone* são encontrados apenas 8 artigos, sendo um do nosso grupo de

pesquisa, demonstrando que esse composto foi pouco estudado e pode ter propriedades importantes ainda desconhecidas.

Portanto, de acordo com os dados anteriormente expostos cada vez mais faz-se necessário desenvolver pesquisas com o objetivo de buscar novas moléculas que possam atuar bloqueando diferentes pontos do processo metastático e induzir a apoptose. É de fundamental importância o desenvolvimento de novos tipos de tratamento, mais eficazes, mais baratos e com menos efeitos adversos do que os observados na quimioterapia atual.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi identificar o mecanismo de ação da cedrelona, extraída da *Trichilia catigua*, em células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a cedrelona por meio da determinação do seu coeficiente de partição e da determinação da sua atividade antioxidante, por meio do método do DPPH;
- Avaliar a capacidade da cedrelona modificar a morfologia das células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231.
- Avaliar a capacidade da cedrelona em inibir a formação de colônias de células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231, por meio do ensaio de formação de colônias;
- Avaliar o potencial de indução da apoptose da cedrelona nas células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231, por meio dos ensaios de apoptose: fragmentação nuclear e fragmentação do DNA – método de TUNEL;
- Avaliar a influência da cedrelona no ciclo celular das células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231, por meio da análise por citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito da cedrelona em proteínas relacionadas a apoptose, por meio dos ensaios de PCR em tempo real e western blotting.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Extração, fracionamento e isolamento da cedrelona

A cedrelona foi isolada pela aluna de doutorado Vanessa Domingues e disponibilizada pelo Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob responsabilidade do Prof. Dr. João Batista Fernandes.

Brevemente, para extração, fracionamento e isolamento da cedrelona, inicialmente os arilos dos frutos de *Trichilia catigua* foram secos em estufa de circulação de ar a 40°C, por aproximadamente 120 horas e pulverizados. Seus extratos foram obtidos por meio da extração dos pulverizados à temperatura ambiente com 900mL de solvente em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e metanol), de 3 a 5 vezes (ultra-turrax, repouso, filtração). Em seguida, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos brutos que foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Devido à similaridade dos extratos hexano e diclorometano, estes precisaram ser reunidos e submetidos à cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) no modo gradiente (hexano-diclorometano-metanol). A fração 8 forneceu o limonóide cedrelona (FUZER et al., 2013).

5.2 Métodos

5.2.1 Análise da cedrelona

5.2.1.1 Determinação do Coeficiente de Partição

Para analisar a tendência da cedrelona interagir com membranas biológicas ou permanecer na fase aquosa foi realizado o ensaio para a determinação do coeficiente de partição. Para tal, a cedrelona (1µM) foi adicionada à mistura de 1mL de n-octanol (fase orgânica) e 1mL de água (fase aquosa), a mistura foi mantida sob agitação durante 24 horas a 200rpm. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 200rpm, as duas fases foram separadas e as concentrações da cedrelona determinadas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível com auxílio do espectrofotômetro HP 2780. O $\log P$ foi obtido por meio da seguinte equação:

$$\log P = \log \frac{C_o}{C_a}$$

Onde, C_o equivale à concentração do complexo na fase orgânica e C_a equivale à concentração do complexo na fase aquosa (BAKA; COMER; TAKACS-NOVAK, 2008).

5.2.1.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante da cedrelona foi examinada utilizando o método do DPPH (MHADHEBI et al., 2014). Para tal, a cedrelona foi diluída em DMSO (1, 10, 50 e 100 μ M), as concentrações foram plaqueadas em placa de 96 poços, e em seguida foi adicionada uma solução de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (200 μ M) (Sigma, St. Louis, Mo., USA) em metanol (0,5mg/mL) e incubada, na ausência de luz e em temperatura ambiente, por 15 e 30 minutos. O ácido gálico foi utilizado como controle, já que é uma substância antioxidante. Então a medida da absorbância foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro (Labtech LT4000) em comprimento de onda de 517nm.

5.2.2 Ensaios *in vitro* com a cedrelona e células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231

5.2.2.1 Cultura celular

As células foram obtidas do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti. As células humanas tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231, foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e L-glutamina (2mM).

A linhagem celular foi mantida em um incubador úmido com 5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37°C para ser utilizada nos ensaios ou para ser cultivada em garrafas de cultura. As passagens celulares foram realizadas por tripsinização das células, que ocorre por incubação com 1mL de solução de tripsina (Sigma, St. Louis, Mo., USA) em estufa úmida com 5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37°C durante 5 minutos. A reação foi parada com a adição de 1mL de meio de cultura e seguida por centrifugação a 1000rpm por 5 minutos. As células foram homogeneizadas em meio de cultura e utilizadas para a finalidade desejada.

5.2.2.2 Ensaio de Morfologia Celular

Para analisar a capacidade da cedrelona modificar a morfologia das células tumorais de mama, as mesmas foram plaqueadas (1x10⁵ células/poço) em placas de 12 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado dos poços e diferentes concentrações (1, 10, 50 e 100 μ M) de cedrelona foram adicionadas. As células foram incubadas por 2, 4, 6 e 24 horas nas mesmas condições descritas acima e imagens foram capturadas com o auxílio de um microscópio

invertido (Nikon Eclipse TS100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3MP Live Resolution) em quatro campos diferentes por poço no aumento de 40x.

5.2.2.3 Ensaio de Formação de Colônias

Para avaliar a capacidade da cedrelona em inibir a formação de colônias e/ou diminuir o tamanho das colônias as células tumorais foram plaqueadas (3×10^2 células/placa) em placas de Petri de 6cm e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas em estufa de cultura de células. Após o período, foram adicionadas as concentrações (1, 10, 50 e $100\mu\text{M}$) de cedrelona e as células foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente por 2 horas. Após o período, o meio foi removido, as células lavadas delicadamente com tampão fosfato salino (PBS) e posteriormente foi adicionado o meio de cultura com 10% de FBS. As células foram novamente incubadas na mesma condição por 10 dias. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com uma solução de metanol e ácido acético (3:1) durante cinco minutos e coradas com uma solução de metanol e cristal violeta a 5% por 30 minutos. As placas foram fotografadas e em seguida as colônias foram contadas e seu tamanho foi medido com auxílio do *software* Image J.

5.2.2.4 Ensaio de Fragmentação Nuclear

Para verificar se a cedrelona induz a fragmentação nuclear, processo que ocorre durante a apoptose celular, as células tumorais de mama foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) em placas de 12 poços, que continham lamínulas circulares de 15mm e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações (1, 10, 50 e $100\mu\text{M}$) de cedrelona, durante 2 horas. Então, as células foram lavadas com PBS e, em seguida, fixadas com metanol durante 10 minutos. Depois de fixadas, as células foram coradas com 30nM de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (*Life Technologies*) diluído em meio de cultura sem soro por 10 minutos. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e as lâminas montadas em sala escura. As imagens foram capturadas com auxílio do software CoolSNAP, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cybernetics), acoplado à um microscópio de epifluorescência Olympus BX50 (Olympus Corporation) em quatro campos diferentes por lâmina no aumento de 100x.

A estaurosporina ($0,5\mu\text{M}$) foi utilizada como controle positivo de condensação nuclear (GODARD et al., 1999) por 5 horas. Núcleos normais foram identificados como não-

condensados, núcleos com cromatina dispersa e núcleos apoptóticos foram identificados como possuindo a cromatina condensada ou núcleos fragmentados (ZOU et al., 2012).

5.2.2.5 Ensaio de TUNEL

O ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) foi utilizado para verificar o efeito da cedrelona sobre a fragmentação do DNA celular. Para tal, as células tumorais foram plaqueadas (1×10^6 células/placa) em placas de Petri de 6cm e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com cedrelona (10µM) e mantidas por 1 hora nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, lavadas com PBS e adicionadas em lâminas previamente revestidas com uma solução aquosa de poli-lisina diluída em 1:10 em água. As lâminas com as células foram deixadas secar naturalmente dentro do fluxo, por 15 minutos, e em seguida foram fixadas utilizando uma solução 4% de paraformaldeído em PBS por 25 minutos, e posteriormente foram lavadas em PBS por 5 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram mergulhadas em uma solução 0,2% TRITON X-100 (em PBS) por 5 minutos, e em seguida em PBS por mais 5 minutos. O excesso de líquido foi removido e as células foram cobertas com 100µM de “tampão de equilíbrio” proveniente do *kit* por 10 minutos. As áreas equilibradas foram limpas com lenço de papel e 100µL de rTdT foram adicionados às lâminas, que então foram cobertas com lamínulas plásticas e incubadas a 37°C por 60 minutos em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas duas vezes em PBS fresco por 5 minutos. As peroxidases endógenas foram bloqueadas mergulhando as lâminas em 3% de peróxido de hidrogênio (em PBS) por 5 minutos. A solução de estreptavidina-HRP foi diluída na razão 1:500 em PBS e 100µL dessa solução foram adicionados em cada lâmina e incubadas por 30 minutos. Adicionou-se 50µL de substrato 3, 3' Diaminobenzidina (DAB) 20x Buffer para 950µL de água destilada e 50µL DAB 20x chromogen e 50µL de peróxido de hidrogênio 20x. Para a revelação de cada lâmina, 100µL dessa combinação com DAB foram adicionados até que o fundo da lâmina ficasse da cor marrom claro. Por fim, as lâminas foram lavadas várias vezes em água destilada. Para revelação do experimento, as lâminas foram preparadas com glicerol (100%). Foram capturadas cinco imagens por lâmina com o auxílio do *software* Motic e de uma câmara (Moticam 1000 – 1.3MP Live Resolution) acoplada ao microscópio (Oleman N-120). Uma análise quantitativa da marcação foi realizada por meio da contagem de 5 diferentes campos das lâminas com auxílio do *software* Image J. As células com intensa coloração marrom foram contadas e consideradas apoptóticas.

5.2.2.6 Ensaio de Ciclo Celular

Para detectar a proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular após o tratamento com cedrelona, o conteúdo de DNA das mesmas foi detectado por coloração com iodeto de propídio (PI) e as células foram analisadas por citometria de fluxo. As células foram plaqueadas (1×10^6 células/placa) em placas de Petri de 6 cm e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de cedrelona (1, 10 e $50\mu\text{M}$) durante 2 horas e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, as células foram coletadas, lavadas 3 vezes com PBS e ressuspensas em etanol 70% gelado. Então, as células ficaram a -20°C por, no mínimo, 12h. Após o período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em uma solução de RNase A ($0,02\text{mg/mL}$) em PBS a 37°C por 30 minutos, e depois foram coradas com PI ($1\mu\text{g/mL}$) em temperatura ambiente. Finalmente, o teor de DNA foi determinado por citometria de fluxo no citômetro de fluxo ACCURI C6 (BD) por meio da análise de 20000 eventos e os dados foram avaliados com o programa *BD CSampler*.

5.2.2.7 Ensaio de PCR em Tempo Real

A regulação da apoptose é mediada pela atividade integrada de várias vias de sinalização, algumas atuando para induzir a morte e outras para promover a sobrevivência celular. A expressão de genes relacionados a apoptose foi verificada por PCR em tempo real. Para tal, as células (1×10^6 células/placa) foram semeadas em placas de Petri de 6cm e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de cedrelona (1 e $10\mu\text{M}$) durante 2 horas e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após este período, as células foram lisadas com Trizol® (Invitrogen) e o RNA total das células foi isolado. Em seguida, as amostras de RNA foram quantificadas em equipamento Nanodrop (*Thermo Scientific*). As amostras de RNA foram então tratadas com DNase (Promega) para eliminar qualquer DNA contaminante. O RNA total ($1\mu\text{g}$) foi reversamente transcrito em cDNA pelo uso do kit Enhanced Avian First Strand Synthesis (Sigma Aldrich). O cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso. A reação de PCR em tempo real incluiu os seguintes reagentes: *primers* (500nM), cDNA (40ng) e SYBR® Green (Sigma Aldrich) e água bidestilada. Os *primers* utilizados para amplificação dos genes relacionados a apoptose estão descritos na tabela 2. As condições da PCR foram ajustadas para cada par de *primer*, dependendo de sua temperatura de *melting* usando o equipamento CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Biorad). Após a amplificação, análises da curva de *melting* foram realizadas entre 72-

95°C por monitoramento da fluorescência associada ao aumento da temperatura. Produtos específicos foram determinados como picos únicos em suas curvas de *melting*. O nível comparativo de expressão de cada condição foi calculado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (método do $\Delta\Delta Ct^1$), aonde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostra - ΔCt controle. Os valores de Ct das amostras e dos controles foram normalizados pela quantidade de β -actina (ΔCt do controle ou amostra = Ct do controle ou amostra - Ct β -actina do controle ou amostra).

Os *primers* *BAX* (NM_001291428.1) e *BCL-2* (NM_000633.2) foram desenhados e testados com auxílio do programa Genrunner (versão 5.0.63 Beta), com exceção do primer da *CASPASE-3* (NM_004346.3) (TSUBOY et al., 2014).

Tabela 2– *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real

	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
<i>CASP3*</i>	5'GTG CTA CAA TGC CCC TGG AT3'	5'GCC CAT TCA TTT ATT GCT TTC C3'
<i>BAX</i>	5'CAT CCA GGA TCG AGC AGG3'	5'CGA TGC GCT TGA GAC ACT C3
<i>BCL-2</i>	5'GGT GGG AGG GAG GAA GAA T3'	5'GCA GAG GCA TCA CAT CGA C3'
<i>β-actina</i>	5'GAC GGC CAG GTC ATC ACC ATT G3'	5'AGC ACT GTG TTG GCG TAC AGG 3'

*CASP3 = Caspase-3

5.2.2.8 Ensaio de Western Blotting

Para verificar a expressão da caspase-3 por meio de western blotting, as células tumorais de mama (1×10^6 células/placa) foram semeadas em placas de Petri de 6cm e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de cedrelona (1 e 10 μ M) durante 2 horas e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após este período, as células foram lisadas com tampão de lise (RIA Buffer) composto por NaCl 200mM, EDTA 10mM, Na₂HPO₄ 10mM, NP40 0,5%, SDS 0,1% e inibidores de protease (Sigma Fast). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (13000rpm) para obtenção do sobrenadante, o qual foi utilizado para mensuração da concentração proteica utilizando o *kit* BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). O volume necessário para trinta microgramas de proteína para cada amostra foi diluído em tampão de amostra para SDSPAGE [Tris-HCl 0,125M pH

6,8, SDS 4% (w/v), glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 0,1M e azul de bromofenol 0,02% (w/v)]. Um volume de 10 μ L do marcador padrão de massa molecular Precision Plus Kaleidoscope (BioRad) foi utilizado em todas as corridas. A corrida da eletroforese foi realizada durante 90 minutos a 120V e em seguida as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,2 μ m) por meio do sistema de transferência Transblot turbo (BioRad) em tampão de Tris-HCl (25mM), glicina (92mM), metanol (20%) e SDS (0,1%) a 25V, 1A (Ampere) por 30min. Para confirmar a eficiência da transferência, o gel de poliacrilamida foi corado com 0,25% de Comassie Blue R-250 (Sigma) dissolvido em 50% de isopropanol e 10% de ácido acético e a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 0,5% (m/v) em ácido acético 0,1% (v/v). As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio (BioRad) durante 4h e em seguida, incubadas com diferentes anticorpos primários anti-Caspase-3 (NB100-56709h - 1 μ g/mL) e anti-GAPDH (NB300-328H - 1:20000) (Novus Biological, Littleton, CO, USA). Após, as membranas receberam o substrato Clarity Western ECL (BioRad, Hercules, CA, USA) e foram levadas ao aparelho ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad). As bandas foram quantificadas pela intensidade dos pixels pelo *software* Image J. Como controle endógeno foi utilizado o GAPDH.

5.2.3 Análise Estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata, independentemente, e repetido três vezes para garantir a fidedignidade dos dados. Os dados foram planilhados no programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp., Estados Unidos). Os dados foram comparados por análise de variância One-way (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett, que compara cada experimento com um controle. Os dados foram analisados com o auxílio do *software* de estatística Graphpad (versão 6.0).

6 RESULTADOS

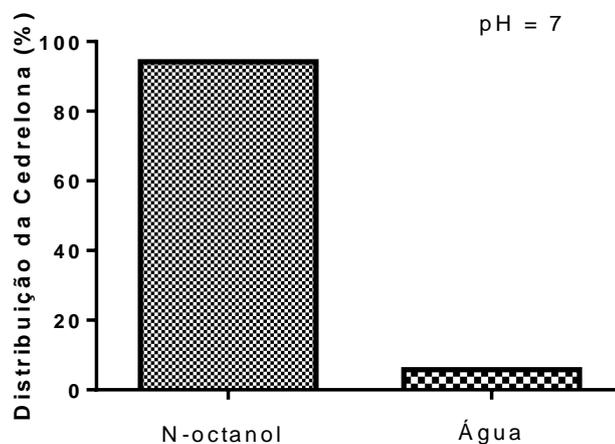
6.1 Análise da Cedrelona

O conhecimento das características de um composto é importante para entender seu mecanismo de ação. Portanto, foi analisado o coeficiente de partição e a atividade antioxidante da cedrelona.

6.1.2 Determinação do Coeficiente de Partição

A lipofilicidade é definida pelo coeficiente de partição de uma substância entre a fase aquosa e a orgânica e consiste na razão entre a concentração da substância na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa em um sistema em equilíbrio, no caso foram utilizados dois solventes praticamente imiscíveis, o n-octanol e a água (OECD, 1995; BARREIRO; FRAGA, 2001). O coeficiente de partição (logP) permitiu determinar a tendência da cedrelona em interagir com membranas biológicas ou permanecer na fase aquosa.

Figura 8 - Coeficiente de partição da cedrelona. Gráfico de distribuição da cedrelona em N-octanol e água.



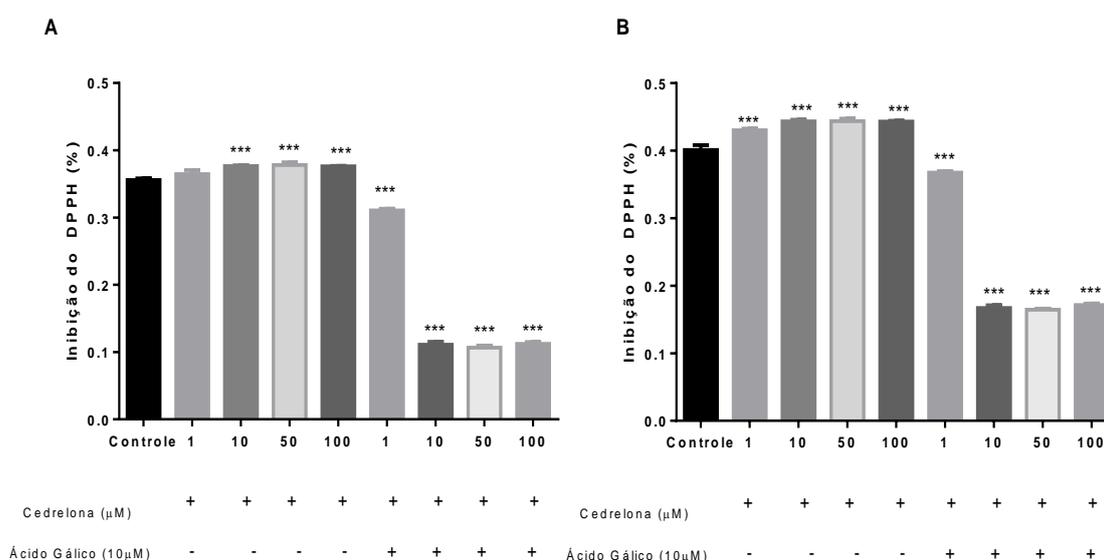
Os resultados demonstram que a cedrelona possui maior tendência para permanecer no n-octanol, que representa a fase orgânica, com logP de $1,27106 \pm 0,05674$, quando o pH é igual a 7 (figura 8). Por meio desse resultado foi possível avaliar a biodisponibilidade oral da cedrelona, segundo a regra dos cinco de Lipinski et al. (2001), que afirma que um fármaco para ter boa biodisponibilidade oral deve satisfazer os seguintes parâmetros: massa molecular menor do que 500 daltons; logP menor do que 5; máximo de cinco grupos doadores de ligação hidrogênio e máximo de dez grupos aceptores de ligação

hidrogênio. Essa condição ficou conhecida como “regra dos cinco”, porque para cada um dos quatro parâmetros, os valores encontrados eram próximos a cinco ou múltiplos de cinco. A cedrelona ($C_{26}H_{30}O_5$) possui massa molecular de 422,5134 g/mol, apresenta logP de 1,271067, 1 ponte doadora de hidrogênio e 5 pontes aceptoras de hidrogênio. Com bases nesses resultados, a cedrelona respeita a regra dos cinco demonstrando possível boa disponibilidade oral.

6.1.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

O método do DPPH é empregado para avaliar a atividade antioxidante de um composto baseado na transferência de elétrons. O DPPH é um radical livre estável que aceita elétrons ou hidrogênios de uma molécula antioxidante. Quando o DPPH é reduzido por antioxidantes ele perde sua cor violeta ficando com a cor amarela, então a intensidade da atividade redutora do radical livre é determinada pela diminuição da absorbância (HALABI; SHEIKH, 2014; MHADHEBI et al., 2014; NAIDU et al., 2014). Por esse método foi testada a atividade antioxidante da cedrelona.

Figura 9 - Determinação da atividade antioxidante da cedrelona e ácido gálico pela captura do radical livre DPPH. Inibição do DPPH após 15 minutos de incubação com a cedrelona (A). Inibição do DPPH após 30 minutos de incubação com a cedrelona (B). Os resultados foram comparados com o controle (sem cedrelona) (***) $P < 0,001$.



A cedrelona não possui atividade antioxidante, após 15 e 30 minutos de incubação com o DPPH, quando comparada ao ácido gálico, um potente agente antioxidante.

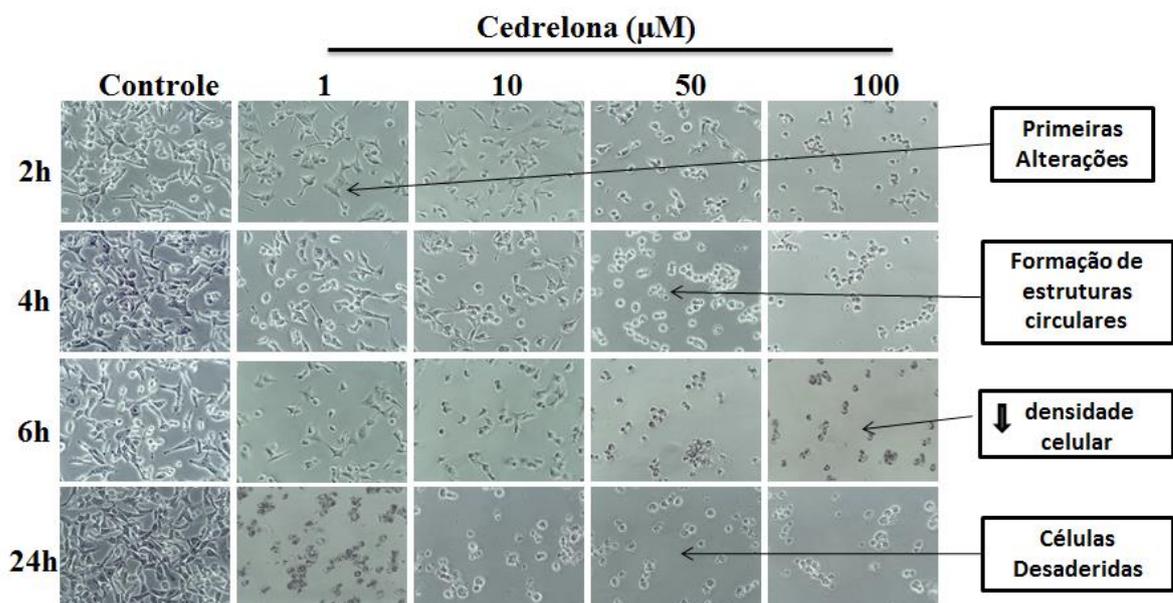
E ainda, a cedrelona não conseguiu reverter a ação antioxidante do ácido gálico em nenhuma concentração (figuras 9A e 9B).

6.2 Ensaios *in vitro* com a cedrelona e células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231

6.2.1 Ensaio de Morfologia Celular

Morfológicamente, a apoptose é caracterizada pela condensação da cromatina nuclear, formação de corpos apoptóticos, aquisição do formato circular e fragmentação do DNA. As alterações morfológicas relacionadas a apoptose incluem a diminuição da densidade de células, a formação de estruturas circulares, formação de saliências na membrana, conhecidas como “*blebs*”, perda de assimetria da membrana celular, encolhimento celular e o aparecimento de detritos celulares (DOSEFF, 2004). Para investigar essas mudanças morfológicas relacionadas a apoptose, as células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231 foram tratadas com a cedrelona (1, 10, 50 e 100 μ M) e, em seguida, foi realizada uma análise de microscopia de luz nestas células com diferentes períodos de exposição à cedrelona (2, 4, 6 e 24 horas).

Figura 10- Efeito da cedrelona na morfologia das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. As células (1×10^5) foram tratadas com cedrelona (1, 10, 50 e 100 μ M) e fotografadas por diferentes períodos (2, 4, 6 e 24 horas). O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas representativas (40x) e as setas representam as alterações morfológicas relacionadas a apoptose.

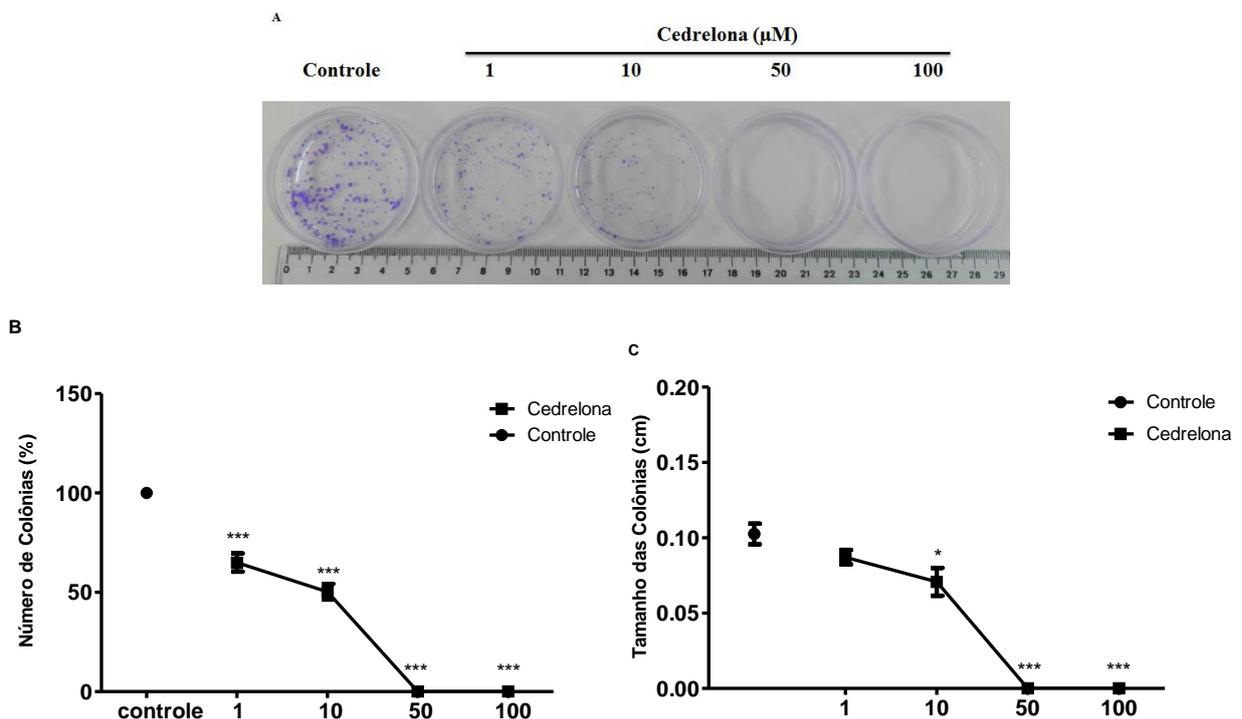


As células tumorais de mama, MDA-MB-231, tem sua morfologia alterada inicialmente no tempo de 2 horas na concentração de 1 μ M, sendo que na concentração de 50 μ M no tempo de 4 horas pode-se notar que as células começam a adquirir um formato circular e, na concentração de 100 μ M no tempo de 6 horas, ocorre a diminuição da densidade celular. No tempo de 24 horas na concentração de 50 μ M, podemos notar as células já desaderidas. As concentrações de 50 e 100 μ M em todos os tempos de incubação modificam drasticamente a morfologia das células da linhagem MDA-MB-231 e há o aparecimento de detritos celulares (Figura 10).

6.2.3 Ensaio de Formação de Colônias

O ensaio de formação de colônias ou ensaio clonogênico avalia a integridade de reprodução de células, testando a capacidade de todas as células em uma população sofrerem divisão ilimitada para formar uma colônia (FRANKEN et al., 2006). O efeito da cedrelona sobre a capacidade de inibir a formação, o tamanho e o número de colônias de células tumorais, da linhagem MDA-MB-231, foi analisado por meio desse ensaio. Esse ensaio já havia sido realizado em um trabalho anterior do nosso grupo (FUZER et al., 2013), porém ele foi repetido no presente trabalho com tempo diferente de incubação com a cedrelona.

Figura 11- Efeito da cedrelona sobre a formação de colônias em células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231. As células (3×10^2) foram tratadas com cedrelona (1, 10, 50 e 100 μ M) por 2 horas. O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas representativa (A); Gráfico do número de colônias (B); Gráfico do tamanho das colônias (C). Os resultados foram comparados com o controle (sem tratamento) (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).



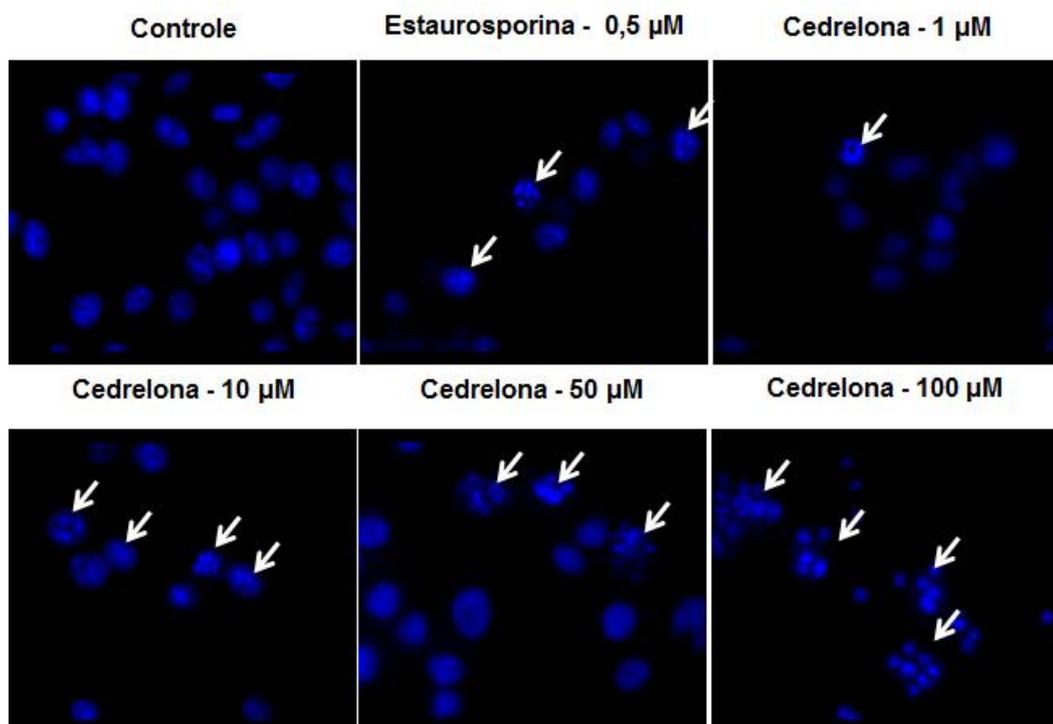
A cedrelona nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 μ M inibiu significativamente o número de colônias das células MDA-MB-231 quando comparado ao controle, as células não tratadas (figura 11B). Nas concentrações de 10, 50 e 100 μ M inibiu significativamente o tamanho das colônias, quando comparado ao controle (figura 11C). É possível observar que houve inibição de absolutamente todas as colônias nas concentrações de 50 e 100 μ M.

É possível concluir que a cedrelona é capaz de inibir a formação de colônias de células tumorais e de diminuir o tamanho dessas colônias, da linhagem MDA-MB-231, agindo de forma citotóxica e citostática (Figura 11A).

6.2.3 Ensaio de Fragmentação Nuclear

A fragmentação nuclear é um marcador de apoptose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). A coloração com o corante fluorescente DAPI, marcador de DNA, foi utilizada para verificar se a cedrelona era capaz de promover alterações indicativas de apoptose nas células, como a fragmentação dos núcleos, a formação de *blebs* nas membranas celulares e a condensação da cromatina das células.

Figura 12 - Efeito de diferentes concentrações da cedrelona sobre a fragmentação nuclear das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. Como controle positivo foi utilizado a estaurosporina. As células (1×10^5) foram tratadas com cedrelona (1, 10, 50 e 100 μ M) por 2 horas. O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas. As setas brancas nas imagens indicam alterações relacionadas a apoptose.

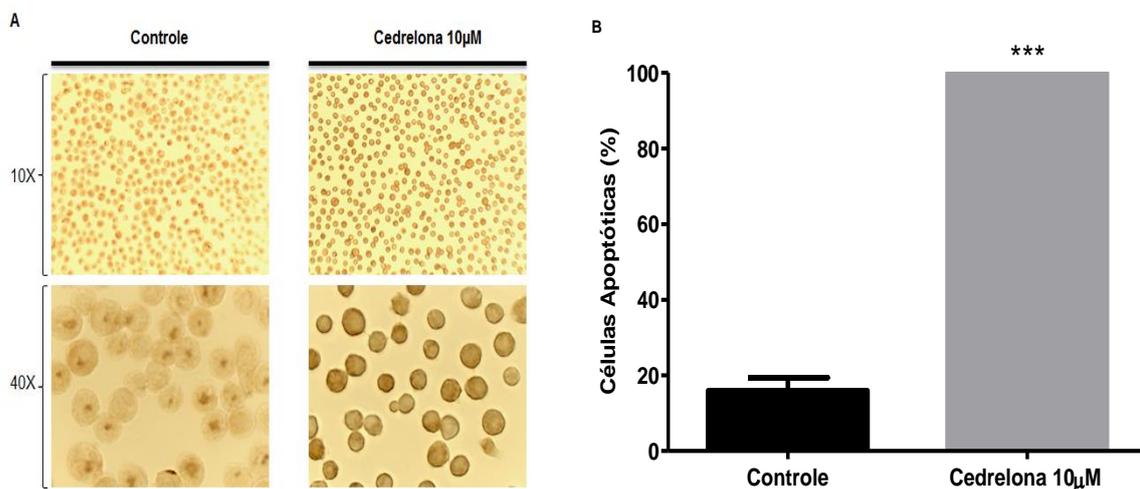


É possível observar, a partir dos resultados, que a incubação das células com a cedrelona por 2 horas promove a fragmentação dos núcleos e a formação de *blebs* nas membranas celulares, todos indicadores de apoptose em todas as concentrações de cedrelona e no controle positivo com estaurosporina. Na concentração de 100 μ M de cedrelona podemos observar a formação de corpos apoptóticos. Após tratamento com a cedrelona, a densidade celular também foi inferior em comparação com células de controle não tratadas. As setas brancas nas imagens indicam essas alterações (Figura 12).

6.2.4 Ensaio de Fragmentação de DNA – Ensaio de TUNEL

O efeito da cedrelona sobre a capacidade de induzir a fragmentação do DNA das células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231, foi analisado por meio do ensaio de TUNEL. Uma das características bioquímicas da apoptose é a geração de terminações 3'-OH livres nas extremidades de fitas duplas de DNA (HORNSBY; DIDENKO, 2011). No ensaio de TUNEL os nucleotídeos marcados com biotina são incorporados as terminações 3'-OH livres com auxílio da enzima transferase deoxinucleotidil terminal (TdT). Então a estreptavidina-HRP é ligada a esses nucleotídeos marcados, que são detectados utilizando o substrato de peroxidase, peróxido de hidrogênio e o corante DAB (PROMEGA, 2015). A coloração do núcleo das células apoptóticas aparece mais escura ou marrom, enquanto as células normais ficam com uma coloração mais clara (LIU et al., 2013).

Figura 13 - Efeito da cedrelona sobre a fragmentação de DNA em células tumorais da linhagem MDA-MB-231 por meio do método de TUNEL. As células foram tratadas com 10 μ M de cedrelona por 1 hora. O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas representativas (A). O gráfico apresenta a porcentagem de células apoptóticas nas células do controle e nas células incubadas com cedrelona (10 μ M) (B). Os resultados foram comparados com o controle (sem tratamento) (***) $P < 0,001$.



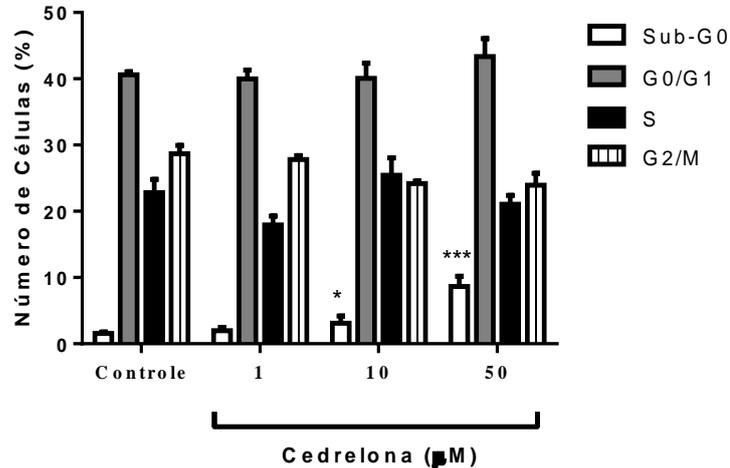
Nesse ensaio foram analisados os efeitos da cedrelona em fragmentar o DNA das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 (Figura 13). As células tratadas com 10 μ M de cedrelona durante 1 hora apresentam alterações de cor mais pronunciadas quando comparadas com células do controle, não tratadas (Figura 13A). Uma análise quantitativa da marcação foi realizada por meio da contagem de 5 diferentes campos das lâminas e notou-se que o controle, as células não tratadas, possui células com uma coloração marrom pouco intensa, já as células tratadas com cedrelona (10 μ M) por 1 hora com cedrelona apresentam coloração marrom bastante intensa, demonstrando maior atividade enzimática da TdT, ou seja, maior quebra de DNA (Figura 13B).

A concentração e o tempo de incubação com a cedrelona foram definidos por teste piloto e com base nos resultados anteriores, nos quais podemos notar que na concentração de 10 μ M as células ainda estão viáveis, porém já sofrem ação da cedrelona, já nas concentrações de 50 e 100 μ M as células já apresentam extrema fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos.

6.2.5 Ensaio de Ciclo Celular

A capacidade de um composto interferir na distribuição das fases do ciclo celular pode fornecer informações sobre seu mecanismo de ação (AL DHAHERI et al., 2013). As células apoptóticas apresentam baixa intensidade de fluorescência (fase sub-G0), em comparação com células na fase G1 do ciclo celular (NICOLETTI et al., 1991). Para analisar a distribuição das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 nas diferentes fases do ciclo celular após o tratamento de 2 horas com cedrelona foi realizado o ensaio de ciclo celular.

Figura 14 - Efeito da cedrelona no ciclo celular das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. As células (1×10^6) foram tratadas com cedrelona (1, 10, 50 μ M) por 2 horas e analisadas por citometria de fluxo. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle (sem tratamento) (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

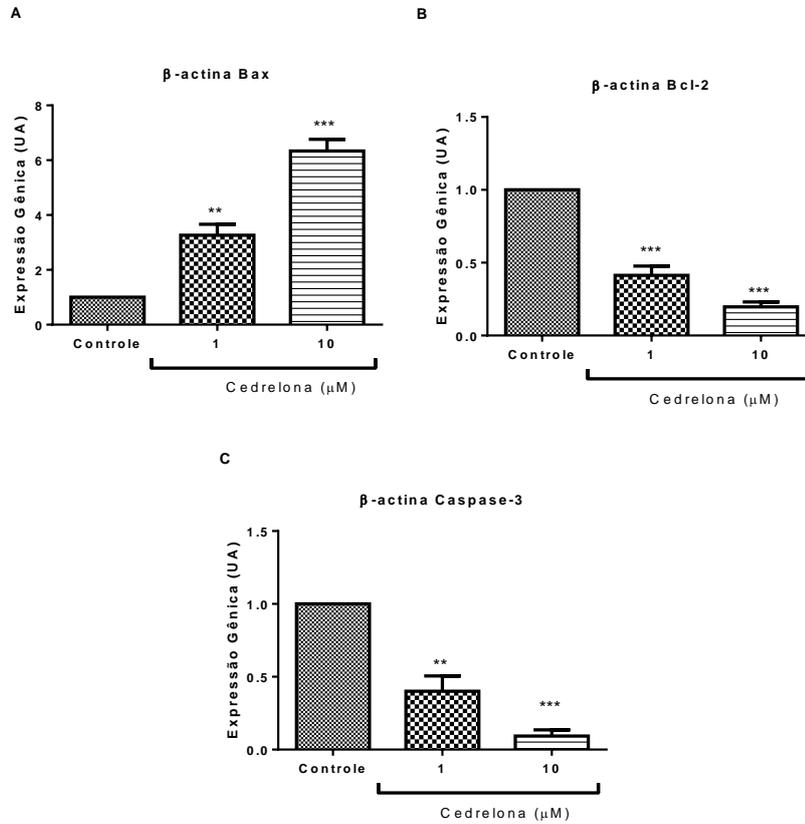


Os resultados indicam que não houve diferenças nas fases G0/G1, S e G2/M no número de células no controle com o número de células tratadas com cedrelona por 2 horas (figura 14). Porém, o número de células na fase sub-G0 aumentou significativamente em relação ao controle, após o tratamento de 2 horas com 10 e 50 μ M de cedrelona, demonstrando que as células já estão em apoptose. Esse resultado evidencia que a cedrelona induz a apoptose impedindo que as células entrem no ciclo celular, resultado esse confirmado pelos resultados de morfologia e fragmentação nuclear, os quais demonstram que nessas concentrações as células já estão em apoptose.

6.2.6 Ensaio de PCR em tempo real

A expressão de três genes relacionados à apoptose foi analisada após a incubação da cedrelona (2 horas) com as células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 por PCR em tempo real (figura 15). Dois genes codificam para proteínas pró-apoptóticas (Bax e Caspase-3) e um gene codifica para a proteína anti-apoptótica (Bcl-2).

Figura 15 - Efeitos da cedrelona na expressão gênica de Bax, Caspase-3 e Bcl-2 nas células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231. As células (1×10^6) foram tratadas por 2 horas com cedrelona. Efeitos da cedrelona na expressão gênica da Bax (A); Efeitos da cedrelona na expressão gênica da Bcl-2 (B); Efeitos da cedrelona na expressão gênica da Caspase-3(C).



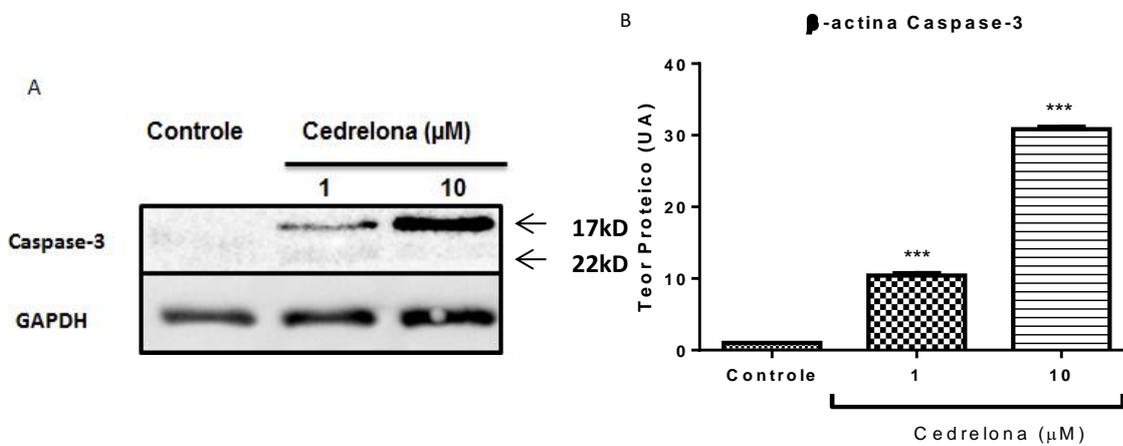
Os resultados indicam que a cedrelona na concentração de 1 e 10μM aumentou a expressão gênica da proteína pró-apoptótica Bax (figura 15A), diminuiu a expressão gênica da Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica (figura 15B) e também da proteína pró-apoptótica caspase-3 (figura 15C).

As concentrações de 1 e 10μM foram escolhidas para esse ensaio, pois nessas concentrações no tempo de 2 horas as células ainda estão viáveis, já na concentração de 50 e 100μM as células já apresentam o núcleo completamente fragmentado, ocorre a formação de corpos apoptóticos e muitas começam a desaderir da placa, como mostram os ensaios de morfologia celular e fragmentação nuclear. Portanto, não teria como avaliar a atividade do RNA mensageiro. Nesse ensaio também foi utilizado como controle o GAPDH (dados não apresentados), que teve o mesmo padrão de resposta da β-actina.

6.2.7 Ensaio de Western Blotting

Para verificar os níveis proteicos da caspase-3 após o tratamento de 2 horas das células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231, com diferentes concentrações (1 e 10 μ M) de cedrelona o ensaio de western blotting foi utilizado. A caspase-3 é a executora chave no processo da apoptose (HOTCHKISS et al., 2009).

Figura 16 - Efeito da cedrelona sobre a expressão proteica em células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231. Intensidade da banda da caspase-3 (A); Gráfico da expressão proteica da caspase-3 (B). Os resultados foram comparados com o controle (sem tratamento) (**P<0,001).



Os níveis proteicos da caspase-3 após o tratamento com a cedrelona aumentou (figura 16), porém o inverso ocorre nos resultados do ensaio de PCR em tempo real (figura 15). Desse resultado podemos inferir que ocorre uma diminuição de expressão gênica da caspase-3 no ensaio de PCR em tempo real, pois a proteína já está expressa, então com a incubação de 2 horas não há mais aumento de RNA mensageiro.

7 DISCUSSÃO

Em um estudo anterior, nosso grupo demonstrou que a cedrelona inibiu a proliferação, a formação de colônias, a adesão celular, migração, invasão e, além disso, induziu a apoptose em células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231 (FUZER et al., 2013). A indução da apoptose é um alvo importante para a terapia contra o câncer (FESIK, 2005). Desta forma, no presente trabalho buscamos conhecer as características da cedrelona e compreender os mecanismos que ela utiliza para induzir a apoptose nas células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231.

As propriedades biológicas, a atividade antitumoral e mecanismo de ação de alguns produtos naturais já estão bem descritos na literatura. O allicin, um composto natural presente no alho, inibiu a proliferação celular das linhagens SiHa (câncer cervical humano) L-929 (fibrossarcoma murino), SW480 (câncer de cólon humano) e HeLa (câncer cervical humano) de maneira dependente da concentração (1-100 μ M). Esse composto também causou alterações morfológicas relacionadas a apoptose, como a condensação nuclear e a fragmentação de DNA nas células SiHA e L-929. E ainda, nessas células ativou as caspases-3, -8 e -9 e clivou a poly (ADP-ribose) levando a apoptose (OOMMEN et al., 2004). Um outro estudo demonstrou que a curcumina induziu a inibição da proliferação em diferentes linhagens tumorais de leucemia (REH K562, JURKAT e MOLT-4). Especificamente, ensaios com as células JURKAT comprovaram que a curcumina é capaz de causar apoptose por meio da fragmentação nuclear, aumento de células na fase G0/G1, clivagem da PARP, aumento da expressão das caspases-3 e -9 e induzir a produção de EROs (GOPAL; PAUL; PAUL, 2014).

Dentre os produtos naturais, os limonóides possuem diversas propriedades biológicas já comprovadas, porém pouco é conhecido sobre o limonóide cedrelona e seus efeitos em células tumorais. Portanto, conhecer as características desse composto é de extrema importância para seu estudo. A lipofilicidade, que é medida pelo valor de logP, está intimamente relacionada com a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, além da propriedade do composto de penetrar a barreira hematoencefálica (GELDERN *et al.*, 1996; MARTIN, 2005; ISHIGAMI *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; KERNS *et al.* 2004; LIPINSKI *et al.* 2000 apud FU et al., 2012). Portanto, analisamos a lipofilicidade da cedrelona e os resultados demonstraram que ela é um composto bastante lipofílico e pode possuir boa biodisponibilidade oral já que obedece a “regra dos cinco” de Lipinski’s (2001). Pesquisadores verificaram que os derivados de xantonas também obedecem a “regra dos

cinco” demonstrando que esses compostos possuem boa biodisponibilidade oral (ALAM; KHAN, 2014). Estudos *in vivo* com a cedrelona são encorajados por esses resultados.

Em seguida, analisamos a atividade antioxidante da cedrelona e observamos que ela não apresenta a propriedade antioxidante quando comparada ao ácido gálico. De acordo com nossos resultados, os limonóides (LIM) e limonin 17- β -D-glucopyranoside (LG) também foram testados quanto à sua capacidade antioxidante e demonstraram atividade muito fraca de eliminação de radicais livres (YU et al., 2005). Porém, existem limonóides que apresentam atividade excelente de eliminação de radicais livres, como o ácido nomilínico 17 β -D-glucopyranoside (NAG), cuja atividade de eliminação é bem próxima a do ácido ascórbico (vitamina C). Esse limonóide além de apresentar atividade antioxidante inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose em células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, mas os mecanismos de ação para essa indução da apoptose ainda precisam ser investigados (POULOSE; HARRIS; PATIL, 2005).

O mecanismo fundamental dos antioxidantes para seus efeitos na saúde ainda é pouco conhecido e bastante discutido. Muitos antioxidantes são utilizados para prevenção de diversas doenças, como o câncer, mas seu uso para o tratamento ainda é contraditório, sendo que existe a preocupação de que os antioxidantes administrados juntamente com a radioterapia e alguns tipos de quimioterapia possam reduzir a oxidação de radicais livres gerados, impedindo a morte celular (LAMSON; BRIGNALL, 1999; LU; OU; LU, 2013). Os radicais livres são gerados em vários sistemas biológicos e também no organismo humano sob a forma de espécies reativas de oxigênio (EROS) (KOHEN; NYSKA, 2002). As EROs correspondem a uma variedade de moléculas e radicais livres (espécies químicas com um elétron não emparelhado) derivados de oxigênio molecular (TURRENS, 2003). Em altas concentrações, os radicais livres, são perigosos para os organismos vivos e danificam todos os principais constituintes celulares, portanto as EROs contribuem para a morte celular quando geradas no contexto do processo apoptótico (DROGE, 2002). A geração de EROs por fármacos antitumorais durante a quimioterapia pode estar associada com a ativação de moléculas de sinalização, bem com a desestabilização da membrana mitocondrial, provocando a libertação de agentes apoptóticos, como o citocromo c, resultando em toxicidade para as células tumorais (CHIBBER et al., 2012). Harish *et al.* (2009) demonstraram que o nimbolide aumentou a geração de EROs em células de coriocarcinoma humano (BeWo) sugerindo o envolvimento de EROs na citotoxicidade do nimbolide.

Na literatura, é possível encontrar diversos trabalhos descrevendo a ação dos limonóides no tratamento do câncer. Os efeitos do nimbolide, um limonóide presente nas

folhas e flores da árvore neem (*Azadirachta indica*), foram estudados em duas linhagens tumorais de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. Os autores comprovaram que as duas linhagens celulares de mama apresentaram alterações morfológicas significativas após o tratamento de 24h com o nimbolide. No ensaio de proliferação celular, o nimbolide reduziu significativamente a viabilidade das MCF-7 e MDA-MB-231 em 24h com valores de IC₅₀ de 4 e 6µM respectivamente. O ensaio de fragmentação nuclear com DAPI demonstrou que as células tratadas por 22h com o nimbolide mostraram claramente a cromatina condensada e fragmentação nuclear. Por meio de PCR em tempo real e western blotting verificaram que o nimbolide aumentou os níveis de Bax, diminuiu os de Bcl-2, atuando por meio da modulação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (ELUMALAI et al., 2012).

As células apoptóticas exibem várias modificações bioquímicas, tais como clivagem de proteínas, fragmentação de DNA, entre várias outras (HENGARTNER, 2000). Assim como o nimbolide, a cedrelona induziu alterações bioquímicas e morfológicas relacionadas a apoptose, como a fragmentação de DNA, fragmentação nuclear, aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas e a diminuição de proteínas anti-apoptóticas.

O aumento de células na fase sub-G0 indica a fragmentação do DNA (NICOLETTI et al., 1991). A cedrelona aumentou a população de células na fase sub-G0, indicando fragmentação do DNA, mas não modificou a distribuição das células nas outras fases do ciclo celular. Outro estudo demonstrou que a fração solúvel da árvore neem (*Azadirachta indica*), cujo principal agente citotóxico é o nimbolide, com incubação de 12 e 24h, aumenta o número de células apenas nas fases sub-G0 e S nas células da linhagem de glioblastoma, T98G. Porém, nas células de glioblastoma (U87EGFRvIII) que expressam EGFRvIII, um oncogene presente em 20-25% dos glioblastomas, o nimbolide, com 24h de incubação, parou o ciclo celular na fase G1, não permitindo que as células seguissem para replicação na fase S (KARKARE et al., 2014). Outra pesquisa demonstrou que a proteína F3 extraída das sementes da planta *Borreria hispida* é citotóxica para as células tumorais de pulmão (A549) e para as células de câncer cervical (HeLa) e aumentou o número de células na fase sub-G0 de ambas as linhagens, indicando apoptose (RUPACHANDRA; SARADA, 2014).

Outro estudo com o nimbolide demonstrou que ele induz mais a apoptose de células da linhagem tumoral de leucemia dependente de Bcl-2, RS4;11, através da modulação da Bcl-2, se comparado a células mutadas para Bcl-2, da linhagem Jurkat Bcl2^{Ser70-Ala}. E ainda, induz a apoptose pela via intrínseca de células de linfomas não-hodgkin do tipo Waldenströms macroglobulinemia. Testes *in vivo* com administração intraperitoneal de

nimbolide em camundongos com macroglobulinemia de Waldenstrom, um tipo de linfoma não-hodgkin, reduziu o crescimento tumoral (CHITTA et al., 2014).

Ainda, o nimbolide inibiu a proliferação e a formação de colônias em células de câncer colorretal, das linhagens, HCT-116, HT-29 e Caco-2. Em ensaios *in vivo*, o nimbolide (5 e 20mg/kg), injetado intraperitonealmente diminuiu o tamanho dos tumores por diminuir a expressão de proteínas envolvidas no crescimento tumoral (GUPTA; PRASAD; et al., 2013). O mesmo grupo demonstrou que a azadirone, outro limonóide, sensibilizou as células tumorais para TRAIL por meio do aumento da expressão de DR5 e DR4 (receptores do TRAIL), da diminuição de proteínas de sobrevivência celular, e aumento de proteínas pró-apoptóticas (GUPTA; FRANCIS; et al., 2013).

Esses estudos, presentes na literatura, estão de acordo com os resultados do presente trabalho demonstrando que os produtos naturais, como os limonóides, são capazes de diminuir a proliferação celular e induzir a apoptose por meio de diferentes mecanismos de ação.

8 CONCLUSÃO

O trabalho identificou parte do mecanismo de ação da cedrelona, extraída da *Trichilia catigua*, em células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231.

Ao analisar a cedrelona, concluiu-se que esse composto apresenta afinidades por membrana biológicas, pode apresentar boa disponibilidade oral e não possui atividade antioxidante. Ainda, a cedrelona modificou a morfologia das células tumorais de mama em curto período de incubação em todas as concentrações testadas. Além disso, inibiu a formação de colônias em altas concentrações e diminuiu o tamanho das colônias nas menores concentrações. A cedrelona também aumentou o número de células na fase sub-G0 do ciclo celular nas maiores concentrações testadas, indicando fragmentação do DNA. A indução da apoptose pela cedrelona foi confirmada pelos ensaios de fragmentação nuclear e fragmentação do DNA – método de TUNEL. Essa indução é decorrente do aumento da expressão do gene que codifica para a proteína pró-apoptótica Bax, aumento da expressão proteica da caspase-3 e diminuição da expressão gênica da Bcl-2.

Tomados em conjunto, os resultados indicam que a cedrelona tem imenso potencial na terapia do câncer, especialmente nos casos de CMTN, com base em sua ação antiproliferativa e efeitos de indução da apoptose. Mais estudos devem ser realizados a fim de demonstrar os efeitos e as doses ideais da cedrelona *in vivo*.

9 REFERÊNCIAS

ABRAMSON, V. G. et al. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 8-16, Jan 1 2015.

AGARWAL, M.L. *et al.* The p53 network. **J Biology Chemistry**, v. 273, 1998

AL DHAHERI, Y. et al. Mitotic arrest and apoptosis in breast cancer cells induced by *Origanum majorana* extract: upregulation of TNF-alpha and downregulation of survivin and mutant p53. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56649, 2013.

ALAM, S.; KHAN, F. QSAR and docking studies on xanthone derivatives for anticancer activity targeting DNA topoisomerase IIalpha. **Drug Des Devel Ther**, v. 8, p. 183-95, 2014.

ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. et al. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 1, p. 207-20, Jan 2002.

AMERICAN CANCER ASSOCIATION – ACS. **What are the key statistics about breast cancer?** Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/index>>. Acesso em 27 de Dez de 2014.

AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH - AACR. **Cancer progress report**. Disponível em:<<http://cancerprogressreport.org/2013/Pages/required.aspx>>. Acesso em 8 de Jan de 2015.

BAGULEY, B. C. A brief history of câncer chemotherapy. In: BAGULEY, B. C. (Ed.). **Anticancer drug development**. California (EUA): Academic Press, 2002.

BAKA, E.; COMER, J. E.; TAKACS-NOVAK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **J Pharm Biomed Anal**, v. 46, n. 2, p. 335-41, Jan 22 2008.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. In: (Ed.). **Aspectos Gerais da Ação dos Fármacos**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2014**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em 27 de Dez de 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Câncer de Mama**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em 15 de Jan de 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Câncer: O que é?** Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em 7 de Jan de 2015c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Tratamento**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>> Acesso em 11 de Nov de 2014d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Quimioterapia**, 2014. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/8e973c004eb686f794f896f11fae00ee/perguntas_qt.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=8e973c004eb686f794f896f11fae00ee> Acesso em 11 de Nov de 2014e.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Biodiversidade brasileira**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em 09 de Jan de 2015f.

BROOKS, S. A. et al. Molecular interactions in cancer cell metastasis. **Acta Histochem**, v. 112, n. 1, p. 3-25, 2010.

BUDIARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 269-90, 1999.

CANCER RESEARCH UK. **Surgery to treat cancer**. Disponível em:<<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/surgery/surgery-to-treat-cancer>>. Acesso em 15 de Nov de 2014a.

CANCER RESEARCH UK. **Chemotherapy**. Disponível em:<<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/chemotherapy/chemotherapy-side-effects>>. Acesso em 15 de Nov de 2014b.

CAZAL, C. M. et al. Evaluation of effect of triterpenes and limonoids on cell growth, cell cycle and apoptosis in human tumor cell line. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 10, n. 10, p. 769-76, Dec 2010.

CHAKRABORTY, B. S. Cancer drug development - key regulatory considerations. **Health Administrator**, v. 20, n. 1-2, p. 29-36, 2007.

CHIBBER, S. et al. Novel aspect of chemophototherapy in treatment of cancer. **Tumour Biol**, v. 33, n. 3, p. 701-6, Jun 2012.

CHITTA, K. et al. Nimbolide targets BCL2 and induces apoptosis in preclinical models of Waldenstroms macroglobulinemia. **Blood Cancer J**, v. 4, p. e260, 2014.

CRISCITIELLO, C. et al. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. **Ann Oncol**, v. 23 Suppl 6, p. vi13-8, Aug 2012.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-19, Jan 23 2004.

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8543-67, Nov 24 2003.

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 15 Pt 1, p. 4429-34, Aug 1 2007.

DHANDAYUTHAPANI, S. et al. Induction of apoptosis in HeLa cells via caspase activation by resveratrol and genistein. **J Med Food**, v. 16, n. 2, p. 139-46, Feb 2013.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G. The cost of biopharmaceutical R&D: is biotech different? **Manage. Decis. Econ.**, v. 28, p. 469–79, 2007.

DOSEFF, A. I. Apoptosis: the sculptor of development. **Stem Cells Dev**, v. 13, n. 5, p. 473-83, Oct 2004.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

ELLIS, P. A. *et al.* Absence of p21 expression is associated with abnormal p53 in human breast carcinomas. **Br J Cancer**, v. 76, n. 4, 1997.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007.

ELUMALAI, P. et al. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway. **Toxicol Lett**, v. 215, n. 2, p. 131-42, Nov 30 2012.

ENGBRAATEN, O.; VOLLAN, H. K.; BORRESEN-DALE, A. L. Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. **Am J Pathol**, v. 183, n. 4, p. 1064-74, Oct 2013.

FADOK, V. A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest**, v. 101, n. 4, p. 890-8, Feb 15 1998.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 11, p. 876-85, Nov 2005.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453-8, Jun 2003.

FLORA DIGITAL. **Flores, frutos e sementes e arilos da *Trichilia catigua* A. Juss.** Disponível em: <<http://www.colecionandofrutas.org/trichiliacatigua.htm>>. Acesso em 19 de Jan de 2015.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

FU, H. et al. Determination of log P by dispersive liquid/liquid microextraction coupled with derivatized magnetic nanoparticles predispersed in 1-octanol phase. **Anal Sci**, v. 28, n. 6, p. 589-94, 2012.

FULDA, S. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. **Planta Med**, v. 76, n. 11, p. 1075-9, Aug 2010.

FUZER, A. M. et al. Effects of limonoid cedrelone on MDA-MB-231 breast tumor cells in vitro. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 10, p. 1645-53, Dec 2013.

GODARD, T. et al. Comet assay and DNA flow cytometry analysis of staurosporine-induced apoptosis. **Cytometry**, v. 36, n. 2, p. 117-22, Jun 1 1999.

GOPAL, P. K.; PAUL, M.; PAUL, S. Curcumin induces caspase mediated apoptosis in JURKAT cells by disrupting the redox balance. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 1, p. 93-100, 2014.

GOVINDACHARI, T. R. et al. Antifungal activity of some tetratriterpenoids. **Fitoterapia**, v. 71, n. 3, p. 317-320, 2000.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte Celular por Apoptose. **Rev Bras Cancer**, v. 55, n. 3, p. 332-343, 2007.

GUPTA, S. C. et al. Azadirone, a limonoid tetranortriterpene, induces death receptors and sensitizes human cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) through a p53 protein-independent mechanism: evidence for the role of the ROS-ERK-CHOP-death receptor pathway. **J Biol Chem**, v. 288, n. 45, p. 32343-56, Nov 8 2013.

GUPTA, S. C. et al. Nimbolide, a limonoid triterpene, inhibits growth of human colorectal cancer xenografts by suppressing the proinflammatory microenvironment. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 16, p. 4465-76, Aug 15 2013.

HALABI, M. F.; SHEIKH, B. Y. Anti-proliferative effect and phytochemical analysis of *Cymbopogon citratus* extract. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 906239, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HARISH KUMAR, G. et al. Nimbolide a limonoid from *Azadirachta indica* inhibits proliferation and induces apoptosis of human choriocarcinoma (BeWo) cells. **Invest New Drugs**, v. 27, n. 3, p. 246-52, Jun 2009.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, Oct 12 2000.

HENSON, P. M.; BRATTON, D. L. Antiinflammatory effects of apoptotic cells. **J Clin Invest**, v. 123, n. 7, p. 2773-4, Jul 2013.

HOLCIK, M.; KORNELUK, R. G. XIAP, the guardian angel. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 7, p. 550-6, Jul 2001.

HORNSBY, P. J.; DIDENKO, V. V. In situ ligation: a decade and a half of experience. **Methods Mol Biol**, v. 682, p. 49-63, 2011.

HOTCHKISS, R. S. et al. Cell death. **N Engl J Med**, v. 361, n. 16, p. 1570-83, Oct 15 2009.

KANG, M. H.; REYNOLDS, C. P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 4, p. 1126-32, Feb 15 2009.

KARKARE, S. et al. Direct inhibition of retinoblastoma phosphorylation by nimbolide causes cell-cycle arrest and suppresses glioblastoma growth. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 1, p. 199-212, Jan 1 2014.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972.

KINGSTON, D. G. The shape of things to come: structural and synthetic studies of taxol and related compounds. **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 1844-54, Jul 2007.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v. 30, n. 6, p. 620-50, Nov-Dec 2002.

KORKAYA, H.; LIU, S.; WICHA, M. S. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. **J Clin Invest**, v. 121, n. 10, p. 3804-9, Oct 2011.

LAMSON, D. W.; BRIGNALL, M. S. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. **Altern Med Rev**, v. 4, n. 5, p. 304-29, Oct 1999.

LANGLEY, R. R.; FIDLER, I. J. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. **Int J Cancer**, v. 128, n. 11, p. 2527-35, Jun 1 2011.

LAZEBNIK, Y. What are the hallmarks of cancer? **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 4, p. 232-3, Apr 2010.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, Mar 1 2001.

LIU, Y. et al. Terpenoids from *Zingiber officinale* (ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012.

LIU, Q. et al. 6-Shogaol induces apoptosis in human leukemia cells through a process involving caspase-mediated cleavage of eIF2alpha. **Mol Cancer**, v. 12, n. 1, p. 135, 2013.

LU, L. Y.; OU, N.; LU, Q. B. Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells. **Sci Rep**, v. 3, p. 3169, 2013.

MACFARLANE, M.; WILLIAMS, A. C. Apoptosis and disease: a life or death decision. **EMBO Rep**, v. 5, n. 7, p. 674-8, Jul 2004.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol**, v. 146, n. 1, p. 3-15, Jan 1995.

MATOS, A. P. et al. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *trichilia elegans* e *t. catigua* (meliaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, 2009.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**, v. 321, n. 7261, p. 624-8, Sep 9 2000.

MHADHEBI, L. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative effects of aqueous extracts of three mediterranean brown seaweeds of the genus *cystoseira*. **Iran J Pharm Res**, v. 13, n. 1, p. 207-20, Winter 2014.

MICHOR, F.; IWASA, Y.; NOWAK, M. A. Dynamics of cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 3, p. 197-205, Mar 2004.

NAIDU, V. G. M. et al. Antioxidant, hepatoprotective and cytotoxic effects of ice texanes isolated from stem-bark of *Premna tomentosa*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 497–505, 2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Breast Cancer**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>>. Acesso em 5 de Janeiro de 2015.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-9, Jun 3 1991.

NIGG, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 1, p. 21-32, Jan 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. **OECD Guidelines (1995)**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948169.pdf>>26 de Janeiro de 2015.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, Aug 2004.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. . Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med**, v. 89, n. 1, 2010.

OOMMEN, S. et al. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. **Eur J Pharmacol**, v. 485, n. 1-3, p. 97-103, Feb 6 2004.

PAGE, C. P. et al. Plantas Mediciniais. In: PAGE, C. P.; CURTIS, M. J., *et al* (Ed.). **Farmacologia integrada**. Barueri - SP: Manole, 2004.

PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 6, Jun 2013.

PAULOVICH, A. G.; TOCZYSKI, D. P.; HARTWELL, L. H. When checkpoints fail. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 315-21, Feb 7 1997.

PEDRAZA-FARINA, L. G. Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. **Yale J Biol Med**, v. 79, n. 3-4, p. 95-103, Dec 2006.

POULOSE, S. M.; HARRIS, E. D.; PATIL, B. S. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. **J Nutr**, v. 135, n. 4, p. 870-7, Apr 2005.

PROMEGA. **DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System**. Disponível em: < <https://www.promega.com.br/products/cell-health-and-metabolism/apoptosis-assays/tunel-assays/deadend-colorimetric-tunel-system/> >. Acesso em 15 de Janeiro de 2015.

RAFFOUL, J. J. et al. Dietary agents in cancer chemoprevention and treatment. **J Oncol**, v. 2012, p. 749310, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Quimioterapia do câncer. In: RANG, H. P.; DALE, M. M., *et al* (Ed.). **Farmacologia**. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **Am J Cardiol**, v. 101, n. 10A, p. 43D-49D, May 22 2008.

RIVOIRE, W. A. et al. Bases biomoleculares da oncogênese cervical bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Rev Bras Canc**, v. 47, n. 2, p. 179-84, 2001.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 2, p. 191-201, Feb 2006.

RUPACHANDRA, S.; SARADA, D. V. Induction of apoptotic effects of antiproliferative protein from the seeds of *Borreria hispida* on lung cancer (A549) and cervical cancer (HeLa) cell lines. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 179836, 2014.

SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861-74, Apr 12 2004.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 3, p. 528-37, Feb 2000.

SCHAFER, K. A. The cell cycle: a review. **Vet Pathol**, v. 35, n. 6, p. 461-78, Nov 1998.

SHUKLA, Y.; SINGH, M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 5, p. 683-90, May 2007.

SPIERINGS, D. et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. **Science**, v. 310, n. 5745, p. 66-7, Oct 7 2005.

STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S. Properties of the caspases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1387, n. 1-2, p. 17-31, Sep 8 1998.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Cytotoxic molecules from natural sources: tapping the Brazilian biodiversity. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 6, n. 4, p. 367-75, Jul 2006.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 231-41, Mar 2008.

TSUBOY, M. S. et al. Genistein at maximal physiologic serum levels induces G0/G1 arrest in MCF-7 and HB4a cells, but not apoptosis. **J Med Food**, v. 17, n. 2, p. 218-25, Feb 2014.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. An overview on chemical aspects and potential health benefits of limonoids and their derivatives. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 54, n. 2, p. 225-50, 2014.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, Oct 15 2003.

VALMORBIDA, J. et al. Enraizamento de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss (catigua) em diferentes estações do ano. **Rev Árvore**, v. 32, n. 3, 2008.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif**, v. 36, n. 3, p. 131-49, Jun 2003.

VIANA, A. F. et al. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* Hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 120820, 2011.

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím Nova**, v. 30, n. 6, 2007.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. P53 in health and disease. **Nature reviews**, v.8, n.4, 2007.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904-12, Oct 6 2008.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 30, p. 87, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Cancer: fact sheet**, n. 297, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>. Acesso em 10 de Novembro de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world?** Ask the expert, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>>. Acesso em 29 de Dezembro de 2014.

XU, G.; SHI, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. **Cell Res**, v. 17, n. 9, p. 759-71, Sep 2007.

YU, J.; ZHANG, L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. **Biochem and Biophys Res Coms**, v. 331, 2005.

YU, J. et al. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 6, p. 2009-14, Mar 23 2005.

ZHIVOTOVSKY, B. Apoptosis, necrosis and between. **Cell Cycle**, v. 3, n. 1, p. 64-6, Jan 2004.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 124-8, Jun 2004.

ZOU, X. et al. Beta-asarone induces LoVo colon cancer cell apoptosis by up-regulation of caspases through a mitochondrial pathway in vitro and in vivo. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 10, p. 5291-8, 2012.

ANEXOS

Effects of Limonoid Cedrelone on MDA-MB-231 Breast Tumor Cells *in vitro*

Angelina M. Fuzer^{A†}, Júlio César C. Filho^{A†}, Amanda B. Becceneri^A, Damiana A. dos Santos^A,
 Maria Fátima das G. F. da Silva^B, Paulo C. Vieira^B, João B. Fernandes^B, Heloisa S. Selistre-de-Araujo^C,
 Cristiane M. Cazal^D and Márcia R. Cominetti^{A*}

^ADepartamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Lutz, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil; ^BDepartamento de Química, Rodovia Washington Lutz, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil; ^CDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Lutz, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil; ^DInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rodovia GO 060 Km 01 S/N, CEP 76200-000, Iporá, GO, Brazil

Abstract: Cancer is the second leading cause of death, preceded only by cardiovascular diseases, and there is epidemiological evidence that demonstrate this tendency is emerging worldwide. Brazil has an extensive vegetal biodiversity with more than 55,000 species listed. Such biodiversity collaborates with the finding of compounds which could be the basis for the design of new anti-tumor drugs, with fewer side effects than the conventional chemotherapy used currently. Cedrelone is a limonoid isolated from *Trichilia catigua* (Meliaceae) which is a native Brazilian plant. This study demonstrates that cedrelone inhibits proliferation, adhesion, migration and invasion of breast tumor cells from the line MDA-MB-231. The effects of cell migration and invasion on MDA-MB-231 cell may be explained, at least in part, by the ability of cedrelone to inhibit MMP activity. We also demonstrate that cedrelone is able to induce apoptosis in MDA-MB-231 cells. There are only a few works investigating the effect of limonoids in cellular processes closely related to tumor progression such as adhesion, migration and invasion. To the best of our knowledge, this is the first work describing the effects of a limonoid on tumor and non-tumor cell adhesion process.

Keywords: Apoptosis, cancer, cedrelone, cell adhesion, limonoid, natural products.

1. INTRODUCTION

Breast cancer is the third most frequent cancer in the world and one of the most common malignant diseases in women worldwide. In developing countries, it is the second highest cause of death in women after cervical cancer [1]. Excluding skin cancer, breast cancer is the most common malignancy among women, accounting for nearly 1 in 3 cancers diagnosed among women in the United States [2]. Brazilian data show that breast cancer is the leading type of cancer in women and that, over the past 30 years, mortality has increased [3]. The number of cancer-related deaths is expected to increase 45% between 2007 and 2030, influenced in part by population growth and global aging.

In order to treat breast and many other cancer types, chemotherapy is one of the most extensively studied methods. However, its efficacy and safety remain a primary concern as well as its toxicity and other side effects [4]. Another reason for concern regarding this method is the development of chemotherapy resistance, which is a major obstacle to the effective treatment of many tumor types, including breast cancer [4]. Tumor cells are found to adopt multiple mechanisms to resist drugs, such as decreased uptake, and/or enhanced efflux and altered drug metabolism. Alteration in drug targets, activation of detoxification systems, enhanced DNA repair ability, and inhibition of apoptosis are also cancer cell strategies to resist against chemotherapy drugs [5]. Therefore, the search for new natural products that may be used as an additional alternative to chemotherapy in an attempt to develop more effective drugs with fewer side effects is of great interest [6].

Brazil has an extensive vegetal biodiversity with more than 55,000 species listed. Such biodiversity collaborates with the

finding of compounds which could be the basis for the design of new anti-tumor drugs, with fewer side effects than the conventional chemotherapy used currently. The Meliaceae family is rich in limonoids, highly oxygenated tetracyclic triterpene derivatives, which are reported to possess a wide range of biological activities, including anti-tumor activity [7]. Cedrelone is a limonoid isolated from the Brazilian native plant *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae) [8] popularly known as "catuaba" or "catigua". Trees are approximately 10 m high and occur from Brazil's Southeast to South. It is widely used in folk medicine as a tonic for the treatment of fatigue, stress, erectile dysfunction, and against memory deficits, being also employed as a digestive and purgative substance [9].

In this paper we describe the effects of cedrelone on the colony formation, proliferation, adhesion, motility profile and apoptosis of MDA-MB-231 breast tumor cells. We observed that cedrelone was capable to inhibit the proliferation of MDA-MB-231 and human fibroblasts (HF) cells with IC₅₀ of 21.87±1.34 μM and 39.13±1.59 μM, respectively. Furthermore, cedrelone inhibited the adhesion of MDA-MB-231 cells to type I collagen with an IC₅₀ of 59.0±1.77 μM. Cedrelone was able to inhibit the migration and invasion of MDA-MB-231 breast tumor cells, in part by inhibiting the secretion of proMMP-9, as demonstrated by zymography assays. Finally, cedrelone was able to induce apoptosis in MDA-MB-231 cells. Taken together, these results show that this substance could be used as an important model for the design of a new anti-tumor drug to be used in chemotherapy. The molecular mechanisms under cedrelone biological effects should be further investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation of Crude Extract

The fruits (467 g) of *Trichilia catigua* were collected at the Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, Brazil and dried carefully by forced air at 40°C for 7 days. They were separated into aryl, seeds and exocarp. The aryls (36.0 g) were reduced to powder and extracted with CH₂Cl₂ and

*Address correspondence to this author at the Departamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Lutz, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil; Tel: +55-16-33066663; Fax: +55-16-33519658; E-mail: mrcminetti@ufscar.br

†Authors who contributed equally to this work.

[6]-gingerol as a Cancer Chemopreventive Agent: A Review of Its Activity on Different Steps of the Metastatic Process

Juliana Poltronieri¹, Amanda B. Becceneri¹, Angelina M. Fuzer¹, Julio Cesar C. Filho¹, Ana Carolina B.M. Martin², Paulo César Vieira³, Normand Pouliot^{4,5} and Márcia R. Cominetti^{1*}

¹Departamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil; ²Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil; ³Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil; ⁴Metastasis Research Laboratory, Peter MacCallum Cancer Centre, East Melbourne, VIC, Australia; ⁵Sir Peter MacCallum Department of Oncology and Pathology Department, The University of Melbourne, VIC, Australia

Abstract: For many years, ginger or ginger root, the rhizome of the plant *Zingiber officinale*, has been consumed as a delicacy, medicine, or spice. Several studies have been conducted on the medicinal properties of ginger against various disorders, including cancer. Cancer is the second leading cause of death, and chemoprevention is defined as the use of natural or synthetic substances to prevent cancer initiation or progression. Evidence that ginger-derived compounds have inhibitory effects on various cancer cell types is increasingly being reported in the scientific literature. In this review we focused on the cancer chemopreventive effects of [6]-gingerol, the major pungent component of ginger, and its impact on different steps of the metastatic process.

Keywords: Apoptosis, cancer, ginger, 6-gingerol, metastasis, natural product.

INTRODUCTION

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae) is a native plant from Southeast Asia, that has been used as an important condiment and medicinal agent for more than 2500 years [1]. Several studies have been conducted on the medicinal properties of ginger against various disorders. Ginger has been demonstrated to have anti-inflammatory, hypotensive, antioxidant, antimicrobial, and antiemetic properties and to regulate cholesterol levels [2, 3].

Ginger is composed of volatile oils (flavor and aroma) and non-volatile pungent compounds. The latter include gingerols, shogaols, paradols and zingerone, which are biologically active. Gingerols are found in greater abundance in fresh ginger, and differ in their chemical structure by the length of unbranched alkyl chains [4].

Metastasis is the leading cause of cancer death and can be described as a cascade of events, each being rate-limiting and providing potential opportunities for therapeutic intervention [5]. Normal cells are transformed into tumor cells due to mutations in genes that regulate critical pathways, producing an imbalance between proliferation and cell death that eventually leads to the formation of a primary tumor. Further interactions with the stromal microenvironment surrounding tumor cells, including endothelial cells, fibroblasts, macrophages and extracellular matrix (ECM) proteins, contribute to the formation of new blood and lymphatic

vessels [6]. These interactions facilitate tumor cell invasion of surrounding tissues, intravasation through newly formed vessels, and dissemination to other tissues, to form secondary tumors. During the metastatic process, cells must penetrate natural barriers in the microenvironment, survive in circulation as well as invade and populate a new tissue, the latter being helped by the establishment of a pre-metastatic niche [7-9].

The ECM plays a fundamental role in tumor metastasis. The ECM represents the non-cellular component of tissues, and is formed primarily of water, proteins and polysaccharides; however, its precise composition is tissue-specific [10, 11]. Cell-cell and cell-ECM interactions are important regulator of cell adhesion, migration, proliferation and survival. These processes, in turn, play critical roles during both normal physiological and pathological conditions, such as cancer and metastasis.

The aim of this review is to summarize the most recent studies on the cancer chemopreventive action of [6]-gingerol. We will focus on specific steps of the metastatic process, including cell adhesion, migration, invasion and angiogenesis and describe the effects of [6]-gingerol on each of these steps. We will, in particular, discuss the chemopreventive effects of [6]-gingerol focusing on its ability to inhibit tumor cell proliferation, and to induce apoptosis or reactive oxygen species (ROS) production. This review is divided into two parts describing first results from studies performed *in vitro* and then in different animal models *in vivo*. It was prepared using publications reported over the last 10 years (2003 to 2013) on the NLM-Pubmed and TS-Web of Science online bibliographic databases, using the keyword "[6]-gingerol"

*Address correspondence to this author at the Departamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luis, Km 235, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil; Tel: +55 16 3306 6663; Fax: +55 16 3351 9628; E-mail: mcominetti@ufscar.br