

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

Papel de um derivado semissintético do [6]-gingerol (SSi6) na
morte celular e efeitos antimetastáticos no câncer de mama triplo
negativo: estudos *in vitro* e *in vivo*

Liany Johanna Luna Dulcey*

Tese apresentada ao Programa interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti

***Bolsista FAPESP**

São Carlos – SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Liany Johanna Luna Dulcey, realizada em 01/10/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (UFSCar)

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues (UFSCar)

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo (IFSC/USP)

Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo (FCFRP/USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para minha formação acadêmica e para tornar este trabalho possível.

Antes de tudo, estou muito grata a Deus por permitir tantas bênçãos e principalmente por ser a base da minha vida. Foi meu refúgio em todo momento.

Agradeço muito especialmente à minha orientadora, a Profa. Dra. Márcia Cominetti, pela oportunidade dada de fazer parte do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN). Sempre estarei muito grata pelo apoio, dedicação, confiança e incentivo para a realização deste e outros trabalhos.

Ao meu querido e amado esposo Isaac, pelo amor e compreensão durante esta jornada. Obrigada por sempre me motivar e pelo incentivo constante ao longo destes anos. Você é um suporte fundamental em todos os campos da minha vida. Espero continuar construindo minha vida ao lado de você. Te amo imensamente!

À minha família (meu pai Álvaro, minha mãe Susana, meus irmãos Iván Dario e Daniel, e meu lindo sobrinho Benjamín) pelo apoio incondicional durante toda minha trajetória. Vocês são a razão da minha vida!

Também, e não menos importante, gostaria de agradecer aos meus companheir@s do LABEN, pela troca de conhecimento, risadas e companheirismo. Foram quase sete anos de compartilhar momentos ótimos que ficaram sempre na minha memória. Obrigada a tod@s!

Gostaria de agradecer à minha querida amiga Kallyni, pela linda amizade e por sempre estar presente quando eu mais precisava. Muito obrigada!

Meus agradecimentos ao grupo do Dr. Miguel Quintela do *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas-CNIO* (Espanha), pela oportunidade de trabalhar na *Breast Cancer Clinical Research Unit* (BCCU). Agradeço especialmente à Gema e à Flora do *Animal Facility* e ao Dr. Eduardo Caleiras da *Histopathology Unit* do CNIO.

Meu agradecimento também, ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) pela eficiência e assistência nos serviços burocráticos prestados.

Agradecimento às agências de fomento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos nº 2018/05594-0 e 2019/12607-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Código de Financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP, CAPES e CNPq.

RESUMO

PAPEL DO SSi6 NA MORTE CELULAR E EFEITOS ANTIMETASTÁTICOS NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* – Na atualidade, o desenvolvimento de novos fármacos/compostos para o combate do câncer de mama é um dos principais desafios desta área de pesquisa. Entre os diferentes subtipos desta doença, o câncer de mama triplo negativo (CMTN) é considerado o mais agressivo e o de pior prognóstico, visto que não tem um alvo terapêutico específico. Neste sentido, o desenvolvimento de potenciais candidatos a medicamentos antitumorais para o tratamento deste subtipo é um dos maiores desafios clínicos e de pesquisa. Assim, no primeiro capítulo desta tese, foi mostrado o efeito citotóxico seletivo *in vitro* do SSi6 na linhagem triplo negativa de mama MDA-MB-231. Ao contrário do seu homólogo natural o [6]-gingerol (6G), este novo composto induziu a morte celular pela ativação de dois processos, a autofagia (ativação inicial ao tratamento) e a apoptose independente das caspases (indução tardia ao tratamento), promovidas pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Esta estratégia de induzir mecanismos combinados de morte celular é uma alternativa interessante para o tratamento de tumores triplo negativos resistentes às drogas que induzem a apoptose canônica. Dada esta atividade promissora, no segundo capítulo foram investigados os efeitos antitumorais e antimetastáticos do SSi6 nas células MDA-MB-231 em modelos xenográficos. Primeiro, foi demonstrado que o SSi6 não provoca efeitos tóxicos *in vivo*, evidenciado principalmente pelo monitoramento do peso corporal dos camundongos e por parâmetros hematológicos e histológicos. No modelo xenográfico ortotópico, o SSi6 (15 mg/kg) retardou o crescimento do tumor primário, como também a progressão metastática dos linfonodos axilares para os pulmões. Finalmente, no segundo modelo xenográfico com ressecção do tumor primário, foi confirmado que o SSi6 bloqueia a progressão das metástases dos linfonodos axilares para os pulmões e outros órgãos viscerais. Tomados em conjunto, os resultados demonstram que o SSi6 é um composto promissor a ser investigado em outros modelos pré-clínicos, o que permitiria no futuro sua aplicação em ensaios clínicos como terapia simples ou combinada para o tratamento do CMTN.

Palavras-chaves: câncer de mama triplo negativo; composto semissintético; efeitos citotóxicos; autofagia e apoptose; progressão metastática; modelos xenográficos.

ABSTRACT

ROLE OF SSi6 IN CELL DEATH AND ANTIMETASTATIC EFFECTS IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER: *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDIES – Nowadays, the development of new drugs/compounds to combat breast cancer is one of the main challenges of this research area. Among the different subtypes of this disease, triple negative breast cancer (TNBC) is considered the most aggressive and the one with the worst prognosis, since it has no specific therapeutic target. In this regard, the development of potential antitumor drug candidates for the treatment of this subtype is a major clinical and research challenge. Thus, in the first chapter of this thesis, the *in vitro* selective cytotoxic effect of SSi6 on the triple negative breast cell line MDA-MB-231 was shown. Unlike its natural homologue [6]-gingerol (6G), this new compound induced cell death by activation of two processes, autophagy (initial activation upon treatment) and caspase-independent apoptosis (late induction upon treatment), promoted by the generation of reactive oxygen species. This strategy of inducing combined mechanisms of cell death, is an interesting alternative for the treatment of triple negative tumors resistant to drugs that induce canonical apoptosis. Given this promising activity, in the second chapter the antitumor and antimetastatic effects of SSi6 on MDA-MB-231 cells in xenograft models were investigated. First, it was demonstrated that SSi6 does not cause toxic effects *in vivo*, shown mainly by monitoring the body weight of mice and by hematological and histological parameters. In the orthotopic xenograft model, SSi6 (15 mg/kg) slowed down the growth of the primary tumor, as well as the metastatic progression from axillary lymph nodes to the lungs. Finally, in the second xenograft model with resection of the primary tumor, the SSi6 was confirmed to block the progression of metastases from axillary lymph nodes to the lungs and other visceral organs. Taken together, the results demonstrate that SSi6 is a promising compound to be investigated in other preclinical models, which would allow its future application in clinical trials as a single or complementary therapy for the treatment of TNBC.

Keywords: triple-negative breast cancer; semisynthetic compound; cytotoxic effects; autophagy and apoptosis; metastatic progression; xenograft models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de novos casos de câncer no mundo em 2020.	2
Figura 2 – Número de novos casos de câncer no Brasil em 2020.	2
Figura 3 – Disseminação tumoral.	6
Figura 4 – Etapas do desenvolvimento e aprovação de novos fármacos.	8
Figura 5 – Semelhanças fisiológicas e anatômicas entre humanos e camundongos.	10
Figura 6 – Estrutura molecular dos compostos.	19
Figura 7 – Representação esquemática do mecanismo de ação do reagente JC-1 nas mitocôndrias.	22
Figura 8 – Alterações na morfologia das células tumorais e não tumorais.	28
Figura 9 – Alterações morfológicas provocadas pelo SSi6 em linhagens tumorais e não tumorais.	29
Figura 10 – SSi6 aumenta a taxa de apoptose nas células MDA-MB-231 em 14 horas de tratamento.	31
Figura 11 – SSi6 induz a formação de ERO e aumenta o potencial de membrana mitocondrial na MDA-MB-231.	33
Figura 12 – SSi6 aumenta os níveis da expressão de genes e proteínas relacionadas com a autofagia e apoptose independente de caspases nas células MDA-MB-231.	38
Figura 13 – SSi6 induz autofagia e apoptose através da produção de ERO.	41
Figura 14 – Silenciamento da LC3B atenua os efeitos apoptóticos do SSi6 nas células MDA-MB-231.	43
Figura 15 – SSi6 induz efeitos citotóxicos em um painel de células triplo negativas de câncer de mama (CMTN).	53
Figura 16 – As doses do SSi6 não provocam efeitos tóxicos <i>in vivo</i>	56
Figura 17 – SSi6 não provoca alterações morfológicas significativas em tecidos.	59
Figura 18 – SSi6 retarda o desenvolvimento de tumores e metástases espontâneas nos linfonodos axilares e na área torácica em um modelo xenográfico ortotópico.	63
Figura 19 – Tratamento de SSi6 evita metástases espontâneas nos pulmões em um modelo sem ressecção do tumor primário.	65
Figura 20 – Dados complementares do modelo xenográfico ortotópico.	67
Figura 21 – SSi6 diminui metástases de corpo inteiro e a recidiva do tumor primário.	69
Figura 22 – SSi6 inibe metástases de múltiplos órgãos e bloqueia o avanço das células MDA-MB-231/Luc dos linfonodos para os pulmões em um modelo xenográfico com ressecção do tumor primário.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios para estadiamento de tumores mamários de acordo com a classificação TNM da UICC.....	4
Tabela 2 – Primers utilizados na reação de PCR em tempo real.....	23
Tabela 3 – Valores de IC ₅₀ do tratamento de 6G, 2,4-DNFH e SSi6 nas linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-10A, HMEC, MCF-7 e SKBR3 após 48 horas.....	25
Tabela 4 – Valores IC ₅₀ do SSi6 nas linhagens de CMTN após 72 horas de tratamento.....	55
Tabela 5 – Hemograma dos grupos do modelo xenográfico sem ressecção de tumor.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIC – Apoptose Independente de Caspases
- AIF – *Apoptosis Inducing Fator*
- Atg – *Autophagy Related Genes* (genes relacionados com autofagia)
- BCA – *Bicinchoninic Acid*
- BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro
- CAFs – *Cancer-Associated Fibroblasts*
- cDNA – *complementary DNA* (ácido desoxirribonucleico complementar)
- CMTN – Câncer de Mama Triplo Negativo
- CNIO – *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas*
- Ct – *Cycle threshold* (ciclo limiar)
- CTCs – *Circulating Tumor Cells*
- DMEM – Meio Dulbecco's modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – *DeoxyriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)
- dNTPs – Desoxirribonucleótidos fosfatos (*deoxyribonucleotide Phosphates*)
- DP – Desvio Padrão
- EGF – *Epidermal Growth Factor* (fator de crescimento epidermal)
- ERO – Espécies reativas do oxigênio
- FBS – Soro fetal bovino (fetal bovine serum)
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FGF2 – *Fibroblast Growth Factor 2*
- FVB – *Friend Leukemia Virus B*
- H&E – Hematoxilina e Eosina
- H₂DCFDA – *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*
- HER2+ – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico
- HMECs – *Human Mammary Epithelial Cells* (células epiteliais mamarias humanas)
- IC₅₀ – Concentração inibitória do 50% da viabilidade celular
- IHC – *Immunohistochemistry*
- IS – Índice de Seletividade
- IVIS – *In Vivo Imaging System*
- JC-1 – *5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide*

kDA – Quilodaltons

LC3B – Proteínas associadas aos microtúbulos cadeia leve 3B

MAT – Microambiente Tumoral

MEC – Matriz Extracelular

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MMPs – *Matrix Metalloproteinases*

MTS – [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium]

MTT – [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

NAC – *N-acetyl-cysteine*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – Ficoeritrina

pGL4.51 – *Luciferase Reporter Vectors*

RE+ – Receptor de estrogênio

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

ROI – *Region of Interest*

RP+ – Receptor de progesterona

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

RT-qPCR – *Quantitative Reverse Transcription PCR*

SDS – *Sodium Dodecyl Sulphate* (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio

siRNA – *Small interfering RNA*

TAM – *Tumor-Associated Macrophage*

TN – Triplo Negativo

UA – Unidade Arbitrária

VEGF-A – *Vascular Endothelial Growth Factor A*

2,4-DNFH– 2,4-dinitrofenilhidrazina

6G – [6]-gingerol

7AAD – *7-Aminoactinomycin D* (7-aminoactinomicina D)

$\Delta\Psi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E VISÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. CAPÍTULO 1: mecanismos de morte celular induzidos pelo SSi6 nas células triplo negativas de câncer de mama MDA-MB-231	16
3.1. RESUMO DO CAPÍTULO	16
3.2. BREVE INTRODUÇÃO	17
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.3.1. Compostos químicos	19
3.3.2. Cultura celular	20
3.3.3. Viabilidade celular – Método do MTT	20
3.3.4. Morfologia celular.....	21
3.3.5. Detecção da apoptose por citometria de fluxo	21
3.3.6. Produção de espécies reativas do oxigênio (ERO)	21
3.3.7. Ensaio de potencial de membrana mitocondrial	22
3.3.8. Expressão gênica por PCR em tempo real	23
3.3.9. <i>Western Blotting</i>	23
3.3.10. <i>Small interfering RNA</i> (siRNA)	24
3.3.11. Análise estatística.....	24
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.4.1. Citotoxicidade e alterações na morfologia celular	25
3.4.2. Análise da taxa apoptótica induzida pelo SSi6 na linhagem MDA-MB-231	30
3.4.3. Geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) e alteração do potencial de membrana mitocondrial	32
3.4.4. Análise dos processos de autofagia e apoptose ativados pelo SSi6	36
3.4.5. Papel das espécies reativas do oxigênio na promoção de autofagia e apoptose	40
3.4.6. Efeitos do silenciamento da LC3B no processo de apoptose em MDA-MB-231.....	42
4. CAPÍTULO 2: estudo da inibição do crescimento tumoral e disseminação metastática em modelos pré-clínicos do tipo xenográfico no câncer de mama triplo negativo.....	45
4.1. RESUMO DO CAPÍTULO	45
4.2. BREVE INTRODUÇÃO	46
4.3. MATERIAIS E METÓDOS	46

4.3.1. Diluição do SSi6	46
4.3.2. Linhagens celulares	47
4.3.3. Estudos preliminares <i>in vitro</i>	47
4.3.3.1. Ensaio de viabilidade – CellTiter	47
4.3.3.2. Citotoxicidade por colônias	47
4.3.4. Estudos <i>in vivo</i>	48
4.3.4.1. Ensaios de toxicidade aguda e tolerância	48
4.3.4.2. Análises histológicas	49
4.3.4.3. Modelo xenográfico ortotópico - sem ressecção do tumor primário.....	49
4.3.4.4. Modelo xenográfico de metástase - com ressecção do tumor primário	50
4.3.4.5. Imagens de bioluminescência <i>in vivo</i>	51
4.3.4.6. Bioluminescência <i>ex vivo</i> dos órgãos	51
4.3.4.7. Análise histopatológica dos órgãos	51
4.3.5. Análises estatísticas.....	52
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.4.1. Efeitos do SSi6 na citotoxicidade e viabilidade das linhagens de CMTN: ensaios <i>in vitro</i>	52
4.4.2. Toxicidade aguda das doses do SSi6 <i>in vivo</i>	55
4.4.3. Estudo da inibição do crescimento do tumor primário e da progressão espontânea metastática das células MDA-MB-231 no modelo xenográfico ortotópico.....	62
4.4.4 Efeito da dose de SSi6 no bloqueio da progressão das metástases de múltiplos órgãos: modelo xenográfico com ressecção do tumor	68
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS FUTUROS	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO A (PRODUÇÃO ACADÊMICA)	
ANEXO B1 e B2 (CAPÍTULO 2)	

1. INTRODUÇÃO E VISÃO GERAL

Mudanças no modo e estilo de vida, além do envelhecimento da população mundial estão provocando o aumento do número de casos de doenças crônicas não transmissíveis, entre elas o câncer (BENNETT et al., 2018; BRAY et al., 2018). Hábitos de vida como uma má alimentação, aumento da massa corpórea, tabagismo, consumo excessivo de álcool, sedentarismo, etc., podem levar ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (LEWANDOWSKA et al., 2019). De fato, uma alta porcentagem (~30%) das mutações que causam o câncer deriva desses fatores de riscos e outros fatores ambientais, enquanto somente 5% correspondem à hereditariedade. No entanto, a maior porcentagem (~60%) das mutações associadas ao câncer estão relacionadas a erros aleatórios durante a divisão celular (TOMASETTI; LI; VOGELSTEIN, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), na atualidade o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (WHO, 2019). Somente em 2020 estimou-se que mais do 50% dos 19,3 milhões de novos casos diagnosticados de pacientes com câncer no mundo foram a óbito, ou seja, mais de 9,5 milhões de pessoas faleceram por conta dessa doença (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). O mais preocupante é que segundo projeções da OMS, espera-se que para 2040 o número de novos casos de câncer aumente cerca de 56%, chegando à cifra de 30,2 milhões de novos diagnósticos por ano (WHO, 2020). Este aumento poderia ser reduzido caso mudanças no estilo de vida das pessoas forem adotadas, como ter uma dieta saudável, praticar atividade física, evitar o consumo de álcool e tabaco, entre outras (BARNARD, 2004; ANAND et al., 2008).

Durante anos, o câncer de pulmão tem sido o tipo de câncer mais diagnosticado, porém, as estatísticas atuais mostram que o câncer da mama ultrapassou-o em número de casos, tornando-se o tipo de câncer de maior incidência e prevalência na população mundial (GLOBOCAN, 2020). Como pode ser observado na Figura 1, o câncer de mama representou 11,7% do total de novos casos diagnosticados no mundo em 2020 (mais de 2,2 milhões), seguido dos cânceres de pulmão (11,4%), colorretal (10%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%).

Particularmente no Brasil, o câncer também representa uma das principais causas de mortalidade na população. Em 2020, um total de 592 mil de novos casos foram diagnosticados e registradas mais de 260 mil novas mortes por câncer (WHO, 2020; INCA, 2020). A maioria destes novos casos foram diagnosticados nas regiões Sudeste (principalmente São Paulo e o Rio de Janeiro) e Nordeste do país (sobretudo Fortaleza e Recife), regiões onde está concentrada a maior parte da população brasileira. Do total dos novos casos, o câncer de próstata é o mais

prevalente no sexo masculino (97,2 mil casos; 32,4%) (vide Figura 2A), enquanto o câncer de mama é o mais predominante no gênero feminino (88,4 mil casos; 30,3%) (Figura 2B) (GLOBOCAN, 2020).

Figura 1 – Número de novos casos de câncer no mundo em 2020 (ambos os sexos e idades de 0-85 anos). Fonte: imagem adaptada de (GLOBOCAN, 2020).

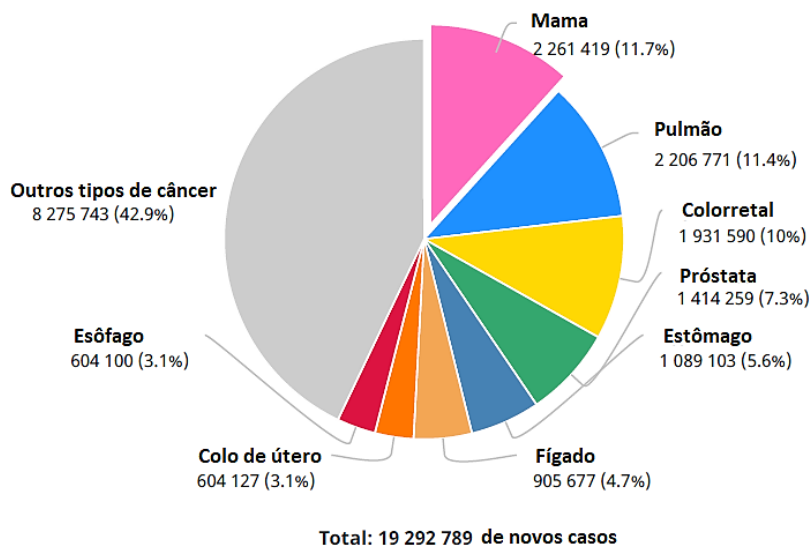
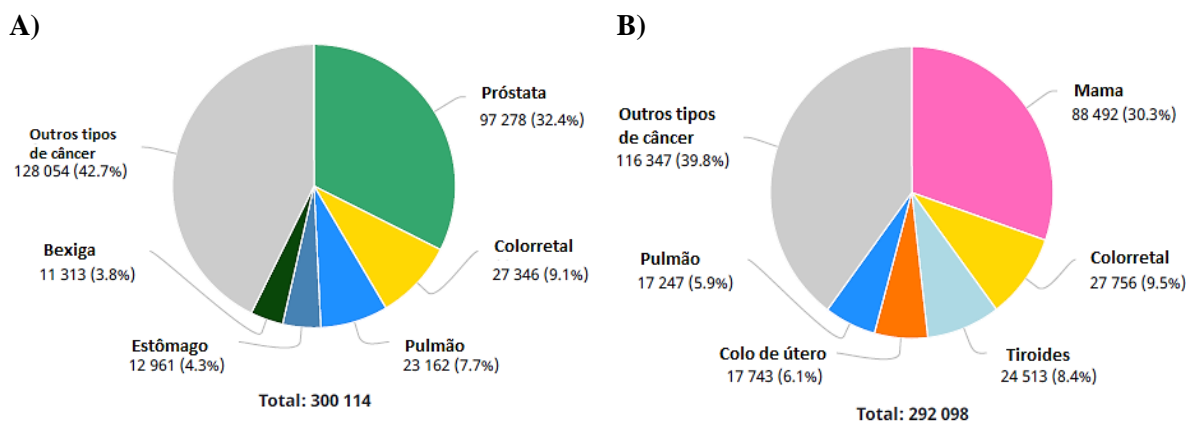


Figura 2 – Número de novos casos de câncer no Brasil em 2020: **A)** homens e **B)** mulheres de 0-85 anos. Fonte: imagens adaptadas de (GLOBOCAN, 2020).



Com relação especificamente ao câncer de mama, este é um grupo de carcinomas que recebe um foco especial, pois apresenta uma alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica, permitindo diferenciar diversos subtipos moleculares (SKIBINSKI; KUPERWASSER, 2015; TURASHVILI; BROGI, 2017; LÜÖND; TIEDE; CHRISTOFORI, 2021). Essa alta complexidade dificulta a definição de condutas clínicas, podendo por vezes resultar em tratamentos inadequados aos pacientes. Em nível molecular (análise imunohistoquímica), o câncer de mama se classifica em quatro subtipos principais, diferenciados pela expressão de receptores hormonais (receptor de estrogênio e receptor de progesterona), bem como na amplificação do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2)

(CIANFROCCA; GRADISHAR, 2009; TSANG; TSE, 2020). Esta classificação fornece informação fundamental para o médico na escolha do melhor plano terapêutico para os pacientes.

Os cânceres mamários positivos para a expressão de receptores hormonais representam cerca de 60-70% de todos os diagnósticos (LI, JIEHUA *et al.*, 2015). Dentre eles, o luminal A caracteriza-se pela presença do receptor de estrogênio (RE+) e/ou do receptor de progesterona (RP+), sendo negativos para a amplificação do HER2 (HER2-) (GAO; SWAIN, 2018). Além de ser um dos subtipos de câncer de mama mais prevalente, é também o que possui melhor prognóstico para os pacientes, uma vez que estes respondem facilmente ao tratamento endócrino ou hormonal. Esta característica deve-se a que este subtipo apresenta um índice ki67 baixo (<10%), o qual está associado com uma baixa proliferação das células tumorais (CHEANG *et al.*, 2009). De forma similar, os tumores encontrados no subtipo luminal B podem ser positivos para ambos os receptores hormonais (RE+ e RP+), porém, podem ser positivos também para o receptor HER2 (HER2+). Devido a que neste subtipo os tumores possuem um índice ki67 de 10-14%, o luminal B é considerado mais agressivo quando comparado ao luminal A (CHEANG *et al.*, 2009; ADES *et al.*, 2014).

Outro subtipo comumente diagnosticado é o HER2 (~10-15% do total dos casos de diagnosticados), que tal como o nome o indica, trata-se de um grupo de tumores que superexpressam o HER2 (HER2+) (ki67 >14%) (SLAMON *et al.*, 1987; FIGUEROA-MAGALHÃES *et al.*, 2014). Similares aos luminais A e B, as terapias alvo contra este subtipo são muito eficazes (LEHMANN *et al.*, 2011; DAI *et al.*, 2017). Por outro lado, um subtipo que gera muita preocupação é o triplo negativo (TN), devido a sua alta heterogeneidade e, principalmente, à ausência de alvos moleculares bem definidos (YIN *et al.*, 2020). Essa ausência evidencia-se pela baixa ou nula expressão de todos os marcadores moleculares anteriormente descritos, ou seja, os tumores deste subtipo são considerados RE-, RP- e HER2- (DAWSON; PROVENZANO; CALDAS, 2009). Em relação à heterogeneidade do câncer de mama triplo negativo (CMTN), Lehmann e colaboradores classificaram as linhagens triplo negativas em sete categorias: *basal-like 1*, *basal-like 2*, imunomoduladora, mesenquimal, mesenquimal *stem-like*, receptor luminal androgênico e o instável (LEHMANN *et al.*, 2011). Dada estas variações, o CMTN apresenta diferentes características e velocidades de progressão nos pacientes (DENT *et al.*, 2007), os quais apresentam o pior prognóstico de sobrevida entre os quatro subtipos de câncer de mama. O CMTN representa em torno de 15-20% do total de diagnósticos de câncer de mama invasivos (RAKHA *et al.*, 2006).

Tendo identificado o subtipo de câncer de mama no paciente, outro ponto de extrema relevância para escolher o melhor plano terapêutico é determinar o estágio da doença (ACS, 2018). Neste sentido, a determinação dos estágios, ou estadiamento do câncer de mama, é realizada tendo em conta um grupo de parâmetros como a localização, tamanho e volume do tumor, invasão direta e linfática (grau de disseminação do tumor), metástases distantes (órgãos afetados), diagnóstico histopatológico, manifestações sistêmicas, duração dos sinais e sintomas, sexo e idade do paciente, etc. (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017). Neste contexto, o sistema de estadiamento mais utilizado é o denominado sistema de classificação dos tumores malignos (TNM), indicado pela *Union for International Cancer Control* (UICC). Esse sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, considerando as características do tumor primário (T; doença localizada), as características dos linfonodos do órgão em que o tumor se localiza (N; localmente avançado), e a presença ou ausência de metástases à distância (M; metastático). Estes parâmetros recebem subclassificações mais complexas como mostrado na Tabela 1, as quais vão de T0 a T4 (relacionado ao tamanho e extensão do tumor primário), de N0 a N3 (o que indica a ausência ou a presença de metástases em linfonodos regionais) e de M0 a M1 (ausência ou presença de metástases distantes) (SAWAKI; SHIEN; IWATA, 2019).

Tabela 1 – Critérios para estadiamento de tumores mamários de acordo com a classificação TNM da UICC. Fonte: tabela adaptada e modificada de (SAWAKI; SHIEN; IWATA, 2019).

Classificação	Características	Estágio	Tumor primário (T)	Estágio do linfonodo regional (N)	Metástases distantes (M)
T-Tumor	Sem tumor	0	-----	N0	M0
T1	Tumor ≤ 2 cm	I	T1	N0	M0
T2	Tumor ≥ 2 cm, porém, ≤ 5 cm		T0	N1	M0
T3	Tumor ≥ 5 cm	IIA	T1	N1	M0
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta na parede torácica ou na pele		T2	N0	M0
N-Linfonodos	-----	IIB	T2	N1	M0
N0	Sem células tumorais em linfonodo regional		T3	N1	M0
N1	Metástases móveis regionais	IIIA	T0	N0	M0
N2	Sem metástases móveis regionais		T1	N2	M0
N3	Câncer nos gânglios linfáticos mamários internos		T2	N2	M0
M – Metástases	-----		T3	N1/N2	M0
M0	Sem metástases distantes	IIIB	T4	Qualquer N	M0
M1	Metástases distantes no fígado, pulmão, osso, etc.	IIIC	Qualquer T	N3	M0
		IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

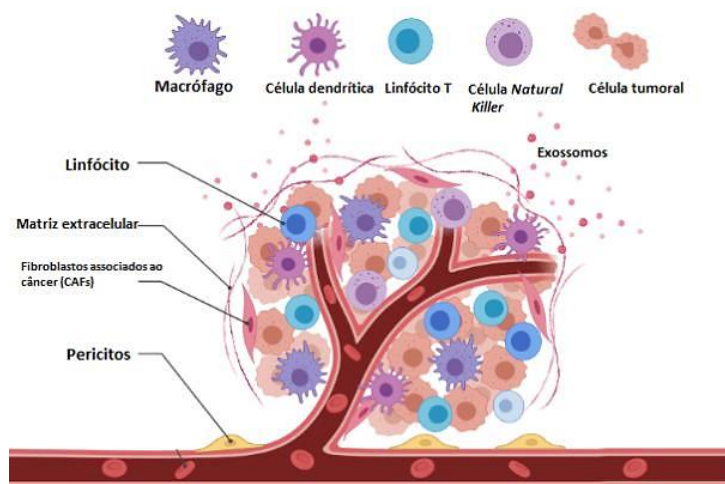
Um dos maiores problemas relacionados ao câncer de mama é a alta probabilidade da doença evoluir para metástase. Mundialmente, a doença metastática representa um sério problema de saúde pública, pois provoca de maneira direta ou indireta a maioria das mortes (>90%) relacionadas com o câncer (STEEG, 2006; QIAN; MEI; ZHANG, 2017). Apesar dos avanços no diagnóstico precoce e tratamento, uma em cada três mulheres pode apresentar metástases no momento do diagnóstico (WEIGELT; PETERSE; VAN'T VEER, 2005). Deste modo, várias são as questões não resolvidas que se enquadram no campo de pesquisa das metástases, incluindo a busca dos eventos moleculares fundamentais para o desenvolvimento do processo metastático, e que representariam alvos terapêuticos específicos (FARES et al., 2020).

A cascata metastática obedece a uma sequência altamente organizada de etapas, a qual requer da participação de células do estroma (ex., fibroblastos e células endoteliais), moléculas e fatores de crescimento específicos e componentes da matriz extracelular (MEC; colágeno, fibronectina, ácido hialurônico, laminina, entre outros), constituindo assim o microambiente tumoral (MAT) (JOYCE, 2005). Neste processo, as células tumorais controlam a função dos componentes celulares e não-celulares por meio de interações e redes de sinalização complexas para fazer com que as células do estroma trabalhem em seu benefício. Como consequência, tais vias de sinalização interligadas auxiliam na formação e manutenção do tumor, promovem a multirresistência aos fármacos antitumorais e criam uma resposta deficiente frente à quimioterapia (UNGEFROREN et al., 2011; LI et al., 2018).

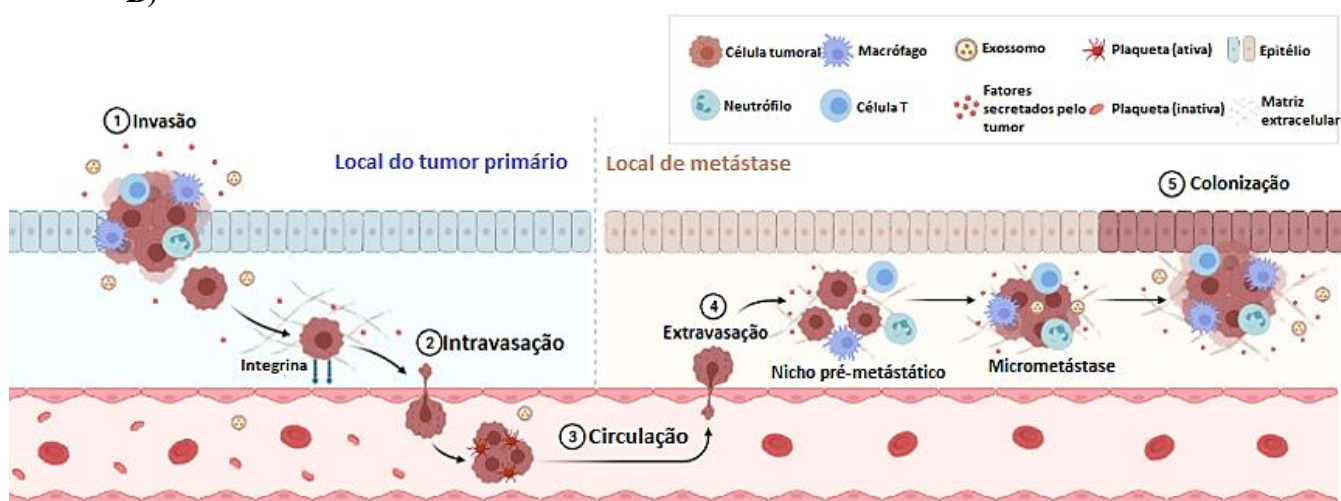
Como pode ser observado na Figura 3A (representação do MAT), a interação das células tumorais com seu ambiente é dinâmica e bidirecional, e inclui: (i) interação com células imunes como linfócitos, macrófagos e neutrófilos, que sintetizam citocinas anti-inflamatórias que favorecem a imunossupressão; (ii) interação com os *Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs)* e *Tumor-Associated Macrophage (TAM)*, o que leva à produção de diversos fatores como o *Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2)* e o *Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A)*, envolvidos no crescimento do tumor e nos processos de angiogênese e metástase. Além destas interações, a produção e liberação de exossomos pelas células tumorais transmite uma grande quantidade de informações relacionadas com as propriedades moleculares e genéticas do tumor para as células saudáveis, bem como para outras células residentes nas proximidades ou em locais distantes da região tumoral (UNGEFROREN et al., 2011). Deste modo, as interações das células tumorais com seu ambiente promovem a heterogeneidade das células neoplásicas, a expansão clonal e a resistência às drogas, resultando eventualmente na progressão metastática.

Figura 3 – Disseminação tumoral. **A)** O microambiente tumoral é o entorno que envolve um tumor, incluindo os vasos sanguíneos circundantes, células imunes, fibroblastos, moléculas de sinalização e a MEC. Os tumores podem influenciar o microambiente ao liberar sinais extracelulares, promovendo a angiogênese tumoral e induzindo a tolerância imunológica periférica. A partir dessa sinalização, ativa-se **B)** a cascata metastática. Esse processo inicia com a ruptura da lâmina basal, através da **invasão** da MEC. A invasão é seguida do **intravasamento**, fenômeno pelo qual a célula tumoral entra em um vaso sanguíneo ou linfático e continua a **circular** através do corpo. Os receptores de superfície celular determinam a parada da célula tumoral em um capilar. Após sua parada, a célula tumoral procede ao seu **extravasamento** para a matriz conectiva perivascular, para proliferar e **colonizar** em seu novo local e formar as metástases. Fonte: imagens adaptadas do *template* do software gratuito BioRender (www.biorender.com)

A)



B)



Como consequência dessas interações o processo metastático é iniciado (vide Figura 3B). Primeiro, as células tumorais do tumor primário perdem a sua polaridade celular e adesão célula-célula, e adquirem propriedades migratórias e invasivas para se tornarem células mesenquimais (processo conhecido como Transição Epitélio-Mesenquimal, TEM) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; YE; WEINBERG, 2015). Uma vez transformadas, na segunda etapa as células tumorais ligam-se a macrófagos que causam uma permeabilidade transitória na vasculatura, além disso, as células produzem metaloproteínas de matriz (MMPs) específicas que ajudam ao processo de intravasamento (entrada nos vasos sanguíneos) (REYMOND; D'ÁGUA; RIDLEY, 2013; WONG; SEARSON, 2017). Já na corrente sanguínea

(terceira etapa), a distribuição das células é determinada pelo fluxo sanguíneo e pelas interações entre as células tumorais e os órgãos secundários que elas colonizam, neste caso, as células tumorais circulantes (CTCs) podem ficar presas em pequenos capilares, ao mesmo tempo que podem expressar receptores que se ligam aos locais que suportam a metástase. Adicionalmente, durante este processo de circulação, a interação das CTCs com as plaquetas leva à formação de um escudo de revestimento em torno dos agregados de células tumorais, o que além de impedir a detecção das mesmas pelas células do sistema imune, fornece uma estrutura celular para tolerar as tensões físicas da circulação (ex., resistência às forças vasculares e à pressão mecânica) (GAY; FELDING-HABERMANN, 2011; PLACKE et al., 2012).

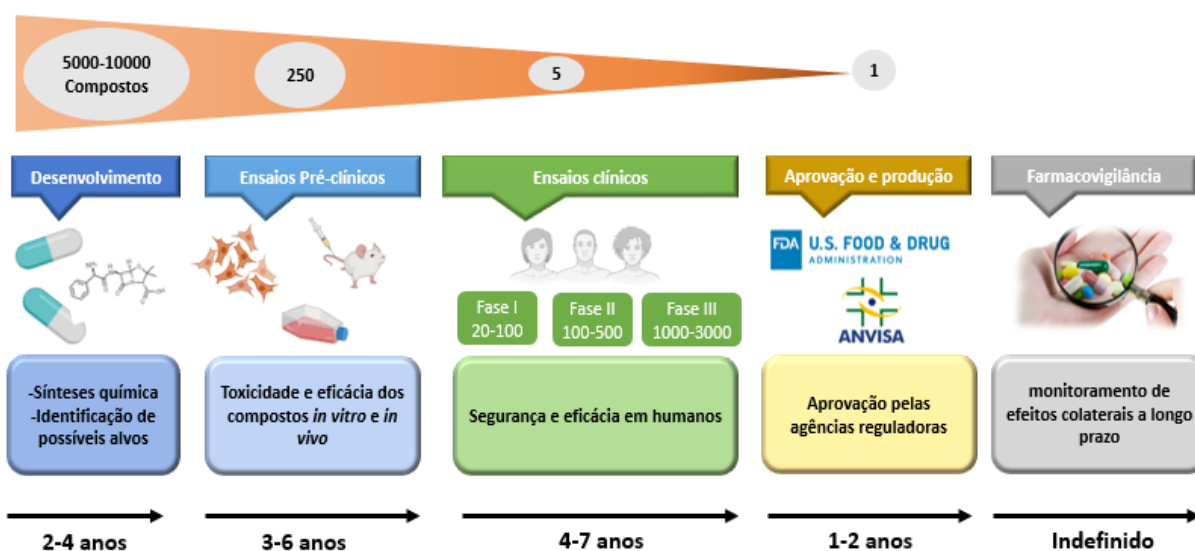
Na quarta etapa ou processo de extravasamento, ocorrem interações ligante-receptor que favorecem a ancoragem, organotropismo e a colonização das CTCs. Em diversos momentos, como no caso da circulação, as CTCs passam por pequenos capilares onde ficam aprisionadas, isto leva à ruptura microvascular e força as células a sofrerem extravasamento (MINN et al., 2005; NGUYEN; MASSAGUÉ, 2007). Neste caso, órgãos como o fígado, o pulmão e osso possuem capilares sinusoidais altamente permeáveis, e por esse motivo, são órgãos que geralmente apresentam uma elevada taxa de metástases (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016). Finalmente, na quinta etapa, as células tumorais colonizam órgãos metastáticos, por meio de uma nova diferenciação, partindo de um fenótipo mesenquimal para um fenótipo epitelial (Transição Mesenquimal-Epitelial, TME). Esta nova diferenciação se produz através de interações das células tumorais com o MAT, o que permite a expressão de fatores de crescimento que favorecem a evolução das macrometástases (PEINADO; LAVOTSHKIN; LYDEN, 2011).

Diante desta problemática, existe uma necessidade urgente de investigar, desenvolver e aplicar novas abordagens terapêuticas que possam impedir ou minimizar a progressão do processo metastático no CMTN. No entanto, o resultado dessas abordagens nem sempre é satisfatório, especialmente quando os fármacos utilizados possuem pouca seletividade para as células neoplásicas e como consequência baixa eficiência para bloquear o avanço deste processo. Além disso, a resistência das células tumorais frente aos fármacos utilizados na quimioterapia atual constitui outro desafio desta área de pesquisa. Neste contexto, o estudo de novos candidatos farmacologicamente ativos (naturais ou sintéticos) a serem utilizados no tratamento do câncer de mama, especialmente para o subtipo triplo negativo, são extremamente relevantes para a diminuição das mortes associadas à progressão das metástases.

Nas últimas décadas tem-se acentuado a importância da elaboração e implementação das fases pré-clínicas e clínicas para o desenvolvimento de novos medicamentos (HUGHES et al., 2011; MOHS; GREIG, 2017). No entanto, a elaboração de protocolos para o teste de novos fármacos é uma tarefa complexa e que implica na utilização de várias áreas do conhecimento, como a biologia molecular e celular, a farmacologia, a química, a informática, a toxicologia, a farmacêutica, o registro e *marketing*, entre outros (DREWS, 2000; VAN GOOL; HENRY; SPRENGERS, 2010). Neste sentido, decidir se um candidato a medicamento está pronto para testes clínicos, envolve extensos e exaustivos ensaios pré-clínicos, os quais fornecem informações preliminares sobre a eficácia, a toxicidade, a farmacocinética e a segurança do composto em estudo. Devido a isto, o desenvolvimento de um medicamento desde a descoberta do alvo até a aplicação clínica leva em média de 12 a 16 anos (DIMASI et al., 2010).

De forma geral, como esquematizado na Figura 4, o processo de desenvolvimento de novos fármacos segue cinco etapas básicas: (1) desenvolvimento do candidato a fármaco; (2) pesquisa pré-clínica; (3) pesquisa clínica; (4) revisão e autorização pela autoridade responsável pela regulação e controle de novos fármacos (no caso dos Estados Unidos e o Brasil, as agências reguladoras são a FDA e a ANVISA, respectivamente) e (5) monitoramento de segurança pós-*marketing* das agências reguladoras (RÉDA; KAUFMANN; DELAHAYE-DURIEZ, 2019; VAN NORMAN, 2019).

Figura 4 – Etapas do desenvolvimento e aprovação de novos fármacos. Fonte: imagem elaborada e adaptada pela autora de (RÉDA; KAUFMANN; DELAHAYE-DURIEZ, 2019).



Cabe destacar que na etapa 1, milhares de compostos (biologicamente ativos) podem ser catalogados como candidatos potenciais para o tratamento médico de uma determinada doença, porém, ao final do processo, somente um número bastante reduzido desses compostos

chegam até o final do processo. Os fármacos aprovados idealmente caracterizam-se por possuir uma alta afinidade e seletividade pelo alvo específico, poucos efeitos colaterais, alta eficácia de tratamento (uso de pequenas doses), estabilidade metabólica (tempo de meia-vida) e alta biodisponibilidade.

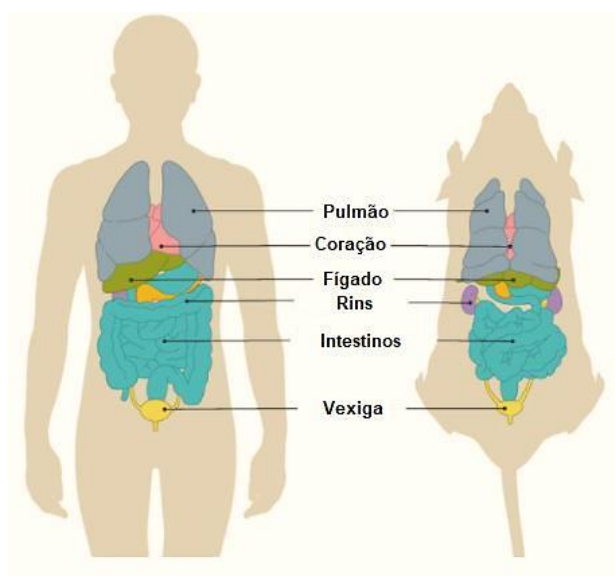
Uma vez feita a descoberta e o desenvolvimento do composto candidato a fármaco, tem início a parte dos estudos pré-clínicos, os quais pretendem determinar a eficácia, a farmacocinética (perfis de absorção, distribuição, metabolismo e excreção), a toxicidade e a segurança do composto em estudo. Esta etapa é realizada geralmente por meio do uso de modelos *in vitro* (cultura de células) e *in vivo* (modelos animais), além do estudo do perfil *in silico* das interações composto-alvo terapêutico utilizando ferramentas computacionais (DUGGER; PLATT; GOLDSTEIN, 2018).

Nos ensaios *in vitro*, as linhagens celulares tumorais e não tumorais derivadas de humanos e animais são tratadas com diferentes concentrações do composto em estudo, para avaliar o efeito que este possa ter na viabilidade celular, além do estudo de aspectos relacionados com seu modo de ação. Os modelos *in vitro* são relativamente baratos e fáceis de desenvolver em comparação com os ensaios *in vivo*, bem como fornecem dados preliminares confiáveis sobre o comportamento/efeito do composto nas células neoplásicas e não neoplásicas (ZOLI et al., 2001). Apesar disto, os modelos *in vitro* possuem uma grande desvantagem na sua concepção, já que não fornecem informação de como o composto interage com todos os tipos de células que existem dentro de um organismo vivo, ou seja, os modelos *in vitro* são modelos simplificados que podem não considerar eventos muito importantes como as interações célula-célula e processos bioquímicos que ocorrem durante o metabolismo. Especificamente nas pesquisas relacionados com o câncer, os modelos pré-clínicos *in vitro* têm enfrentado sérios inconvenientes, pois muitos dos compostos encontrados promissores utilizando esses ensaios não são eficazes quando testados em modelos *in vivo* (LORIAN, 1988; GHALLAB, 2013). Como resultado, estes estudos receberam a reputação de serem "menos traduzíveis" para o ser humano. Contudo, os estudos *in vitro* continuam sendo parte fundamental das pesquisas pré-clínicas, inclusive, para a determinação das atividades antitumorais de diferentes compostos frente ao CMTN (GILLETTE, 1984; GARGIULO, 2018).

Por outro lado, diferente dos testes *in vitro*, os modelos *in vivo* são realizados utilizando animais para seu estudo (como, por exemplo, camundongos, ratos, macacos, coelhos, entre outros), pois embora existam muitas diferenças entre humanos e animais, a maioria delas evidentes, em termos fisiológicos e anatômicos eles são notavelmente semelhantes (vide Figura

5) (CARSON BANKS, 2009). Animais como camundongos e macacos possuem os mesmos órgãos (coração, pulmões, cérebro, etc.) e os mesmos sistemas biológicos (respiratório, cardiovascular, nervoso, etc.) que os humanos, inclusive, desempenhando as mesmas funções. Deste modo, os ensaios *in vivo* conseguem superar a maior limitação dos estudos *in vitro*, pois permitem determinar, de uma forma mais próxima, a ação ou o comportamento de um composto em um organismo vivo, considerando todas as interações biológicas que não podem ser reproduzidas em uma célula isolada. Assim, os estudos pré-clínicos *in vivo* auxiliam os pesquisadores a prever de uma forma mais precisa parâmetros como a toxicidade, a eficácia e nível de segurança para sua aplicação de um candidato a fármaco (FDA, 2020). Além disso, os avanços na edição de genes têm ajudado aos cientistas a reproduzir algumas doenças humanas em animais com maior precisão, tornando cada vez mais realista a pesquisa em modelos *in vivo*.

Figura 5 – Semelhanças fisiológicas e anatômicas entre humanos e camundongos. Fonte: imagem modificada de (CARSON BANKS, 2009).



Não obstante, como todo modelo, os estudos pré-clínicos *in vivo* têm suas próprias deficiências e limitações (VAN NORMAN, 2019). Nesse sentido, os estudos com animais demandam muito tempo e recursos, exigindo treinamento avançado do pessoal e altas taxas de manutenção. Embora existam muitos modelos *in vivo* “humanizados”, existem ainda diferenças fisiológicas consideráveis entre animais e humanos, o que leva muitas vezes a diferenças significativas entre os resultados encontrados *in vivo* e nas etapas posteriores do processo de desenvolvimento e aprovação de um novo fármaco (MIWA et al., 2019). Apesar disto, os ensaios *in vivo* continuam sendo os mais aceitos para prever o comportamento dos compostos em estudo.

Por outro lado, os ensaios *in silico* também formam parte fundamental dos ensaios pré-clínicos (VICECONTI et al., 2021). Estes testes são realizados via simulação computadorizada da interação do composto sob estudo com sistemas biológicos, permitindo a identificação de alvos moleculares, efeitos no metabolismo, em potenciais enzimas metabólicas ou outras enzimas específicas. Tais simulações também permitem estimar as propriedades farmacocinéticas de um determinado composto na fase inicial da descoberta de medicamentos (FERREIRA et al., 2015; MAKHOURI; GHASEMI, 2018). Para tal, é preciso conhecer as estruturas tridimensionais tanto do ligante (composto) como do(s) sítio(s) de ligação de interesse no receptor, além da biomolécula alvo que pode ser uma proteína ou um ácido nucleico (PINZI; RASTELLI, 2019; TORRES et al., 2019). Espera-se que os avanços tecnológicos nesta área de pesquisa tornem cada vez mais popular o uso desta ferramenta computacional para compreensão do comportamento da dinâmica molecular dos medicamentos em sistemas biológicos.

Uma vez concluída a etapa de pesquisas pré-clínicas, o desenvolvimento de medicamentos continua com a fase de estudos clínicos, os quais são realizados, pela primeira vez no processo, em humanos (COMMISSIONER, 2020). Esta etapa requer de um adequado e rigoroso planejamento logístico para garantir seu sucesso, pois dada a elevada complexidade do desenho dos ensaios e os custos associados, qualquer pequena variação no desenvolvimento dos testes pode comprometer significativamente os resultados obtidos e conseqüentemente as conclusões dos ensaios clínicos. Esta etapa se compõe de três fases (I, II e III), cada uma com um nível de complexidade e características específicas.

Os testes de Fase I são os primeiros estudos clínicos de um novo candidato a medicamento, sendo realizados contemplando um pequeno grupo de indivíduos saudáveis (<100) (O'QUIGLEY; PEPE; FISHER, 1990; COMMISSIONER, 2019). As informações obtidas nesta fase estão relacionadas com a tolerância (dosagem considerada segura para seu uso), o perfil farmacocinético, e os efeitos secundários gerados nos humanos pela aplicação do composto em estudo (KIM, JANG HWAN, 2013; YIN, GUOSHENG; LI; JI, 2006). Nesta fase, é aplicado o sistema de dose ascendente (DDA), em que os sujeitos em estudo são tratados com doses crescentes do composto em pequenos grupos denominados coortes (FRANCIS et al., 2013; SHEN et al., 2019). Na primeira coorte, os sujeitos recebem uma dose muito baixa do composto em estudo ou um placebo. Na seguinte, é aumentada a dose, se a segurança e a tolerabilidade permitirem. O escalonamento da dose é interrompida quando a tolerabilidade máxima e/ou exposição máxima é atingida (STORER, 1989). Os estudos DDA são geralmente seguidos por estudos de doses múltiplas ascendentes (DMA), que possuem um

desenvolvimento muito semelhante ao DDA, em que os sujeitos são divididos em coortes e recebem doses múltiplas do medicamento em estudo ou placebo (SHEN et al., 2019; DESAI et al., 2021). Embora a segurança e a tolerância ainda sejam pontos finais importantes, a aplicação de doses múltiplas permite saber com anterioridade os efeitos farmacodinâmicos, além da farmacocinética dos compostos (FRANCIS et al., 2013). Dependendo do potencial de risco, segurança e tolerância revelada pelo estudo de DDA, muitos estudos de DMA já podem envolver pacientes em vez de indivíduos saudáveis.

Por outro lado, os estudos clínicos da Fase II avaliam a segurança e eficácia do medicamento em grupos maiores de pacientes (100-500) (COMMISSIONER, 2020). Geralmente, os estudos na Fase II são divididos em duas etapas (Fases IIa e IIb). A Fase IIa é projetada para avaliar os requisitos de dosagem e segurança, enquanto a Fase IIb tem por finalidade determinar a dose ideal em que o composto apresenta a máxima eficácia com o mínimo de efeitos colaterais (THALL; SIMON, 1994; YUAN et al., 2016). A concepção exata dos estudos da Fase II depende muito do mecanismo de ação do composto. Neste sentido, os estudos clínicos de Fase II ajudam a estabelecer as doses terapêuticas para os estudos de Fase III em larga escala (DE MARTINI, 2020).

Nos ensaios da Fase III avalia-se a eficácia da nova intervenção e seu valor na prática clínica. Deste modo, esta fase inclui ensaios multicêntricos controlados aleatoriamente e fornecem a maior parte dos dados de segurança a longo prazo do medicamento em estudo (ERDMANN et al., 2020). Neste ponto, é investigada a eficácia e a segurança definitiva do composto em uma grande população de pacientes (1.000-3.000, conforme a doença/condição médica estudada) durante um período de 4-7 anos ou mais (STALLARD; TODD, 2003). Devido ao tamanho da amostra e ao tempo prolongado da pesquisa, estes ensaios são os mais caros, demorados e difíceis de serem projetados e executados. Deste forma, os compostos que não apresentam bons resultados durante a execução da Fase II, dificilmente são estudados na fase III; de fato, estima-se que apenas 25-30% dos medicamentos estudados na Fase II prosseguem para a Fase III (ARRROWSMITH III, 2011; SERUGA et al., 2015).

Finalmente, quando o medicamento mostra resultados satisfatórios, é elaborado um documento contendo uma descrição completa e profunda de todos os estudos pré-clínicos e clínicos do composto, além dos procedimentos de fabricação, os detalhes de formulação e o prazo de validade do novo medicamento (THALL, 2008). Esta compilação de informações é enviada às agências regulatórias apropriadas de cada país, como, por exemplo, a FDA nos

Estados Unidos, ou a ANVISA no Brasil, para que estas estudem os dados e permitam a comercialização do medicamento (fase de revisão) (KASHOKI et al., 2020; RIMKUTÈ, 2020).

O processo de aprovação de fármacos finaliza com a etapa de vigilância pós-comercialização, também conhecida como Fase V (SUVARNA, 2010). Esta etapa envolve farmacovigilância e o suporte médico contínuo de um medicamento após receber a sua aprovação para venda. Neste sentido, a vigilância é projetada para detectar qualquer efeito adverso a longo prazo sobre uma população de pacientes muito maior e por um período mais longo (indefinido) (KIPROTICH, 2009).

O Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) tem como uma das suas linhas principais de pesquisa o estudo e aplicação de novos candidatos a fármacos antitumorais em ensaios pré-clínicos (modelos *in vitro* e *in vivo*). A maioria dos compostos testados no LABEN são sintetizados em parceria com vários laboratórios com demonstrada experiência na área de síntese de compostos orgânicos e inorgânicos biologicamente ativos, entre eles estão os laboratórios de Química Inorgânica da UFSCar, e laboratórios externos da Universidade de São Paulo (USP), da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e da Universidade Estadual Paulista (UNESP). A maioria dos compostos fornecidos ao laboratório são sintetizados à base de metais de transição como rutênio e cobre, os quais são amplamente conhecidos por serem biologicamente ativos frente a diferentes tipos de câncer (CUNHA et al., 2020; TELES et al., 2020; GRAMINHA et al., 2021). Por outro lado, compostos naturais como os gingeróis (principalmente o [6]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol) extraídos dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) são um grupo de compostos considerados promissores em testes pré-clínicos, devido a suas propriedades antitumorais e antimetastásicas frente a vários subtipos de câncer de mama, incluindo o triplo negativo (FUZER et al., 2017; MARTIN et al., 2017; DA SILVA et al., 2021).

Recentemente, durante o mestrado acadêmico da candidata, foi estudada a atividade antitumoral de um composto semissintético obtido a partir da modificação química do [6]-gingerol com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH). Este novo composto, chamado de SSi6, foi utilizado em ensaios pré-clínicos *in vitro* em uma linhagem triplo negativa de mama (MDA-MB-231), mostrando-se eficiente na inibição da migração, invasão e parada do ciclo celular (sub G1) (LUNA-DULCEY; DA SILVA; COMINETTI, 2020). Neste sentido, estudos mais aprofundados, incluindo novos testes pré-clínicos *in vitro*, bem como o uso de modelos *in vivo*, são de extrema relevância para elucidar de uma forma mais precisa e realística o mecanismo de

ação do SSi6, sua toxicidade em animais e a sua capacidade para bloquear a progressão das metástases do CMTN.

Diante do exposto, a proposta desta tese foi realizar estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, investigando o papel na morte celular e os efeitos antimetastásico do composto semissintético SSi6 no CMTN. Assim, no primeiro capítulo, foi abordada a elucidação dos processos celulares ativados na linhagem triplo negativa MDA-MB-231 exposta a diferentes concentrações do SSi6. Já no segundo capítulo, foi avaliada a toxicidade das doses utilizadas de SSi6 em camundongos imunossuprimidos (modelo xenográfico), bem como seus efeitos antitumorais e antimetastásicos frente ao CMTN. Estes ensaios *in vivo* tiveram como finalidade simular dois cenários clínicos de uma mulher com câncer de mama, visando uma melhor confiabilidade dos dados obtidos e uma futura aplicação deste composto nas posteriores etapas do desenvolvimento de um novo fármaco.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem por finalidade investigar por meio de ensaios pré-clínicos *in vitro* os efeitos do SSi6 nos processos de morte celular induzidos na linhagem triplo negativa MDA-MB-231, assim como avaliar em modelos *in vivo* do tipo xenográfico os efeitos antitumorais e antimetastáticos no câncer de mama triplo negativo.

2.2. Objetivos específicos

Especificamente, pretende-se:

- a) Determinar se o SSi6 induz os processos de autofagia e apoptose em diferentes linhagens de câncer de mama, especialmente na linhagem triplo negativa MDA-MB-231;
- b) Avaliar o papel do SSi6 na geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) na ativação dos processos de morte celular da linhagem MDA-MB-231;
- c) Analisar previamente a toxicidade de diferentes doses de SSi6 em camundongos imunossuprimidos, a fim de determinar a melhor dose a ser aplicada nos modelos xenográficos;
- d) Investigar os efeitos antitumorais e antimetastáticos do SSi6 em modelos *in vivo* do tipo xenográfico utilizando a linhagem MDA-MB-231;
- e) Confirmar por meio de análises *ex vivo* o bloqueio da progressão do processo metastático.

3. CAPÍTULO 1: mecanismos de morte celular induzidos pelo SSi6 nas células triplo negativas de câncer de mama MDA-MB-231

Este capítulo é uma adaptação do artigo intitulado “*Autophagy-dependent apoptosis is triggered by a semi-synthetic [6]-gingerol analogue in triple negative breast cancer cells*”, publicado na revista *Oncotarget* (fator de impacto = 5,168; 2018) por Liany Luna-Dulcey, Rebeka Tomasin, Marina A. Naves, James A. da Silva e Márcia R. Cominetti (anexo A, item 1). Neste capítulo são abordados alguns resultados obtidos durante o mestrado da autora, visto que formam parte fundamental para compreensão e complementação dos resultados apresentados nesta tese.

3.1. RESUMO DO CAPÍTULO

O [6]-gingerol (6G) é o composto mais abundante e estudado dos gengerois (compostos fenólicos extraídos dos rizomas do gengibre), apresentando diversas propriedades biológicas, com destaque para sua atividade antitumoral contra diversos tipos de câncer, principalmente no câncer de mama. Neste estudo, foi demonstrado que o composto semissintético SSi6, gerado pela modificação química do 6G com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH), possui efeitos citotóxicos seletivos nas células de mama triplo negativas MDA-MB-231. Além disso, e ao contrário do composto original (6G), o tratamento com SSi6 ativa um processo de morte celular combinado caracterizado pela indução de um processo autofágico seguido de apoptose independente de caspases. Foi comprovado que o processo de autofagia é iniciado nas primeiras horas de tratamento (2-6 h) pelo acúmulo de ERO (com o uso de *scavenger*) geradas pela exposição ao SSi6, o que por sua vez, induz apoptose independente de caspases (após 14 h de tratamento). Os resultados mostraram que o silenciamento do gene da LC3B (envolvido na autofagia), diminuiu o número de células apoptóticas após o tratamento com SSi6, indicando que a autofagia é um processo chave na promoção posterior da apoptose independente de caspases. Finalmente, os resultados deste estudo mostraram que as modificações estruturais de produtos naturais podem ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento de fármacos antitumorais, com modos de ação distintos e assim, poderiam ser utilizadas contra células de câncer de mama triplo negativas resistentes às drogas canônicas indutoras de apoptose.

3.2. BREVE INTRODUÇÃO

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) é um grupo heterogêneo de tumores mama agressivos, que apresentam maiores taxas de recidiva e menor sobrevida em comparação com outros subtipos de câncer de mama (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010; YIN et al., 2020). O CMTN é um subtipo definido por imuno-histoquímica por apresentar negatividade tanto para os receptores hormonais (receptores de estrogênio; RE-, e progesterona; RP-), como para a superexpressão do receptor de fator de crescimento epidérmico humano (HER2-) (DENT et al., 2007; LEHMANN et al., 2011). Na ausência de alvos moleculares bem definidos, geralmente o tratamento deste tipo de tumores inclui altas doses de fármacos quimioterápicos não-seletivos em concomitância com o uso de radiação, provocando além de inúmeros efeitos colaterais, tendência a desenvolver resistência às terapias (KIM, CHARISSA *et al.*, 2018). Diante desta problemática, torna-se essencial o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais mais seletivos para este subtipo de câncer de mama, que promovam a morte celular das células neoplásicas com o mínimo de efeitos adversos sobre as células normais.

A morte celular programada (MCP) é um processo ativo que inclui a ativação de uma série de sinais em cascata que levam à eliminação fisiológica de forma organizada de células danificadas e/ou alteradas geneticamente (FUCHS; STELLER, 2011; GALLUZZI et al., 2018). A MCP atualmente compreende vários tipos, sendo os mais estudados a autofagia e a apoptose (ELMORE, 2007; KROEMER; LEVINE, 2008).

De forma geral, a autofagia refere-se ao mecanismo de degradação lisossomal presente em condições fisiológicas, e deste modo, essencial para a sobrevivência, desenvolvimento, diferenciação e homeostase celular (BADADANI, 2012; GALLUZZI et al., 2014). É bem conhecido que a autofagia desempenha um papel fundamental em uma variedade de processos celulares, como o estresse oxidativo, metabolismo, sobrevivência e morte celular; no entanto, o papel da autofagia no câncer permanece controverso e ainda não está bem descrito (DALBY et al., 2010; JIANG; MIZUSHIMA, 2014). De fato, foi reportado que nos estágios iniciais a autofagia é um importante mecanismo antitumoral que evita a iniciação do câncer, porém, acredita-se que a autofagia também possa ajudar na progressão do câncer através de sua ação pró-sobrevivência das células tumorais (GUO; XIA; WHITE, 2013; DAS; BANERJEE; MANDAL, 2020).

A autofagia é regulada por uma rede de cascatas de sinalização (KLIONSKY; EMR, 2000). Uma proteína chave neste processo é a cadeia leve 3 associada a microtúbulos (LC3B), necessária para montagem dos autofagossomas (vesículas de dupla membrana) que capturam

material citoplasmático e o transportam até os lisossomos (TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2008; ABADA; ELAZAR, 2014). Esta proteína é comumente usada para estimar a abundância de autofagossomas e, portanto, do processo autofágico nas células (KUMA; MATSUI; MIZUSHIMA, 2007; TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2008).

Por outro lado, a apoptose é o tipo de MCP mais importante, estudada amplamente como um processo de resposta celular aos danos causados no DNA (FULDA; DEBATIN, 2006). O processo apoptótico é classificado fundamentalmente em dependente e independente da atividade das caspases, no entanto, a maioria das pesquisas atuais investigam o mecanismo de ação dos novos compostos antitumorais baseadas na morte celular mediada por caspases (SUSIN et al., 1999). Apesar dos poucos estudos relacionados com a morte celular via independente de caspases, as pesquisas neste tema são importantes para melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

A apoptose independente de caspases (AIC) é mediada por vários efetores, incluindo o fator indutor de apoptose (AIF, *Apoptosis-Inducing Factor*) (CREGAN et al., 2002; YE et al., 2002). Após a produção e/ou acúmulo das ERO e estímulos pró-apoptóticos, o AIF é liberado da mitocôndria e translocado para o núcleo, desencadeando a fragmentação do DNA em grande escala, provocando conjuntamente a condensação da cromatina e terminando no desencadeamento de uma cascata proteica independente da atividade das caspases (SUSIN et al., 1999; JOZA et al., 2001; KANG et al., 2004). Embora a ativação da autofagia e a apoptose seja bastante diferentes, a conexão entre os dois processos tem sido amplamente investigada nos últimos anos, porém, ainda pouco compreendida (GUMP; THORBURN, 2011). Neste contexto, estudos recentes relatam que tanto o processo de autofagia quanto a apoptose podem ser ativados como mecanismos de indução da morte celular em resposta ao tratamento com compostos antitumorais em diferentes tipos de câncer (SINGH et al., 2012; EL-KHATTOUTI et al., 2013).

As ERO são radicais livres derivados do metabolismo do oxigênio (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). É conhecido que as ERO desempenham papéis importantes em vários processos bioquímicos, incluindo apoptose e autofagia. Um excesso de ERO (conhecido como estresse oxidativo) pode danificar algumas organelas celulares, podendo ativar uma ou várias vias relacionada à morte celular (GIBSON, 2010). Tem sido reportado que alguns fármacos antitumorais ativam o processo de autofagia mediada pelas ERO, o que pode levar à promoção de uma regulação citoprotetora ou então à ativação do processo apoptótico (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015; SHEN, HAN-MING; LIU, 2006).

Assim, neste capítulo foram investigados os mecanismos de morte celular, principalmente autofagia e apoptose, induzidos na linhagem triplo negativa MDA-MB-231 como resposta ao tratamento com o SSi6. É importante ressaltar que para efeitos de comparação, todos os ensaios foram realizados utilizando o SSi6 e seu análogo não modificado 6G. A avaliação foi realizada considerando as alterações morfológicas das células sob tratamento, além do uso de ensaios como apoptose por citometria de fluxo, PCR em tempo real (RT-qPCR), *western blotting*, entre outros. De forma paralela, foi avaliado o papel das ERO na indução dos processos de morte celular. Finalmente, foi investigada por meio do *knockdown* de uma proteína chave (LC3B) da autofagia, a possível atuação deste processo na promoção posterior da apoptose.

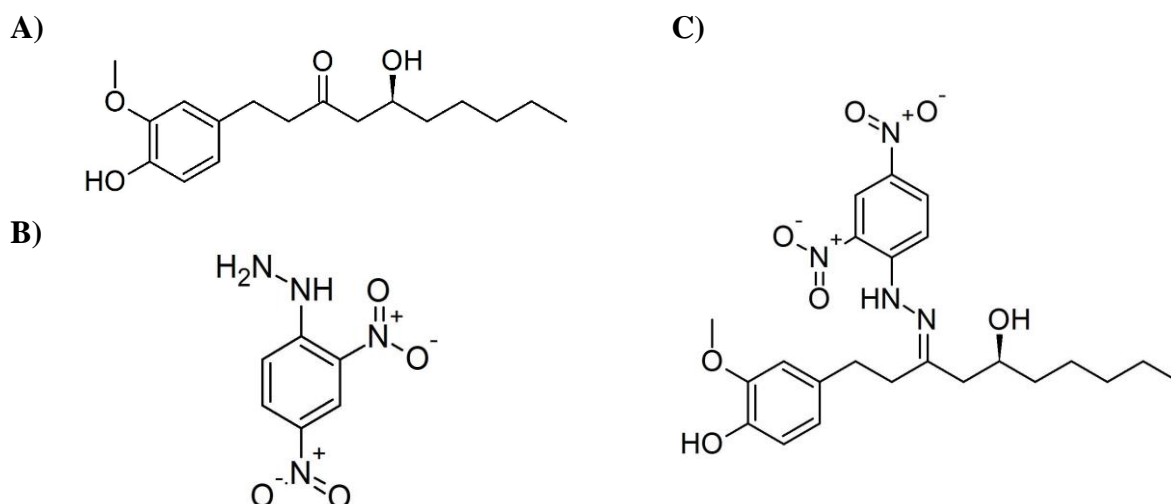
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1. Compostos químicos

O grupo do Prof. Dr. James Almada da Silva do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe sintetizou todos os compostos utilizados neste estudo (Figura 6). A síntese, caracterização, e elucidação estrutural destes compostos podem ser encontradas nas informações complementares descritas por Villalvilla e colaboradores (VILLALVILLA et al., 2014).

Para os ensaios, uma solução estoque de cada um dos compostos foi preparada em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO). Destas soluções, alíquotas convenientes foram retiradas e adicionadas ao meio de cultura com a finalidade de atingir a concentração indicada para cada ensaio (concentração final de DMSO = 1% V/V).

Figura 6 – Estrutura molecular dos compostos. (A) 6G, massa molecular = 294,38 g/mol; (B) 2,4-DNFH, massa molecular = 198,14 g/mol; (C) SSi6, massa molecular = 474,51 g/mol.



3.3.2. Cultura celular

A linhagem não tumoral MCF-10A representa células epiteliais humanas derivadas de tecido mamário não tumoral (doença fibrocística). Esta linhagem foi cultivada em meio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12*) suplementado com 5% de soro de cavalo, fator de crescimento epidérmico (EGF) 20 ng/mL, hidrocortisona 0,5 µg/mL, insulina 10 µg/mL e penicilina/estreptomicina 1%. Também foram utilizadas as células epiteliais de mama humanas HMEC, derivadas de tecido epitelial mamário saudável e cultivadas em meio MCDB-131 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), hidrocortisona 1 mg/mL, EGF 10 ng/mL, L-glutamina 10 nM e penicilina/estreptomicina 1%. As linhagens não tumorais foram usadas como controle de seletividade.

A linhagem triplo negativa humana MDA-MB-231 (RE-, RP- e HER2-) foi cultivada em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de FBS e antibióticos apropriados. A linhagem tumoral de mama MCF-7 (positivas para o RE+) foi cultivada em RMPI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 20% de FBS e antibióticos apropriados. Finalmente, a linhagem tumoral de mama SKBR3 (positivas para a expressão de HER2+) foi cultivada em RMPI 1640, suplementado com 10% de FBS e antibióticos apropriados. As células MDA-MB-231, MCF-10A e MCF-7 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem SKBR3 foi doada pelo *Peter MacCallum Cancer Center* da Austrália. Todas as linhagens foram mantidas a 37 °C em incubadora úmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂).

A contagem celular foi realizada utilizando um contador automático de células (Cell Counter TC20; Bio-Rad) que verifica o número e a porcentagem de células viáveis por mL de solução. O corante azul de tripano foi utilizado para a contagem celular seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (Thermo Scientific).

3.3.3. Viabilidade celular – Método do MTT

Os efeitos do 6G, 2,4-DNFH e o SSi6 na viabilidade das células MCF-10A, HMEC, MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR3 foram determinados por meio de ensaios colorimétricos usando o reagente MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] e conforme as diretrizes publicadas por Mosmann com algumas modificações (MOSMANN, 1983). As células (1×10^4 células/100 µL) foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ até confluência (~80%). Posteriormente, as células foram expostas a concentrações crescentes das substâncias (3,12; 6,25; 12,5; 20; 25; 50 e 100 µM) durante 48 horas. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram tratadas com

reagente MTT (1 mg/mL) por 2 horas a 37 °C e, em seguida, os cristais formados (denominados cristais de formazan) foram solubilizados em 100 µL de DMSO 100%. A absorbância foi medida utilizando um leitor de placa de ELISA (espectrofotômetro Labtech, LT-4000) no comprimento de onda de 540 nm. A determinação do valor IC₅₀ (concentração que diminui o 50% da viabilidade celular) foi calculado através de uma curva de concentração no *software* GraphPad®.

3.3.4. Morfologia celular

As células foram semeadas (1×10^5 células/poço) em placas de 12 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após este tempo, a linhagem MDA-MB-231 foi tratada com 6G (100 µM), 2,4-DNFH (100 µM) e SSi6 (25, 50 e 100 µM) por 6 e 24 horas. De forma similar, as células das linhagens MCF-10A, HMEC, MCF-7 e SKBR3 foram tratadas durante 6 e 24 horas, porém, somente com o SSi6 (25, 50 e 100 µM). Após os períodos de tratamento, imagens foram capturadas no microscópio invertido (Nikon eclipse, TS100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3 MP *Live Resolution*).

3.3.5. Detecção da apoptose por citometria de fluxo

A atividade dos compostos na apoptose da linhagem MDA-MB-231 foram analisadas por citometria de fluxo usando o kit *PE Annexin-V Apoptosis Detection* (BD Bioscience). As células (1×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com 6G, 2,4-DNFH (100 µM) e SSi6 (25, 50 e 100 µM) durante 6 e 14 horas. Após o tempo de tratamento, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C e, em seguida, os poços foram lavados com *phosphate buffered saline* (PBS 1X; 200 µL) e as células ressuspendidas em 200 µL de tampão de ligação (fornecido pelo kit). Em seguida, as células foram incubadas e coradas com 2,5 µL de fluoróforos *phycoerythrin* (PE) Anexina-V e 2,5 µL *7-Aminoactinomycin D* (7-AAD) por 15 minutos no escuro. Após a incubação, as células foram removidas dos poços com auxílio de um *scraper* e transferidas a microtubos de 1,5 mL para análise no citômetro de fluxo *Accuri C6* registrando 10.000 eventos para cada condição. A fluorescência emitida de cada corante foi quantificada no *software* CSampler (BD Bioscience) e é proporcional à porcentagem de células em apoptose. A taxa apoptótica foi comparada com o controle negativo de células (1% DMSO) e com o controle positivo da apoptose (camptotecina 200 µM) (ARANGO et al., 2003).

3.3.6. Produção de espécies reativas do oxigênio (ERO)

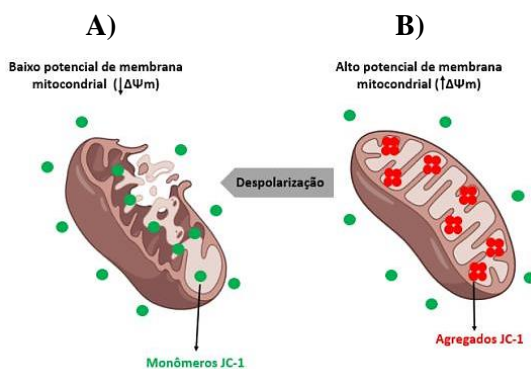
As células MDA-MB-231 e MCF-10A ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com diferentes concentrações do SSi6 (25, 50 e 100 µM) durante 1 e 8 horas, bem como com SSi6 na presença do *N-acetyl-L-cysteine* (NAC; 5 mM) utilizado

como *scavenger* das ERO. Após o tratamento, as células foram lavadas com 200 μL de PBS e coradas com *diacetato de 2', 7'Diclorodi-hidrofluoresceína* (H_2DCFDA ; 10 μM) por 30 minutos para serem analisadas por fluorescência. A intensidade da fluorescência foi medida utilizando um fluorímetro de microplacas *multimodal híbrido Synergy H1* nos comprimentos de onda de 492 nm (excitação) e 525 nm (emissão). A produção das ERO foi comparada com o controle negativo de células (1% DMSO) e controle positivo de geração intracelular de ERO (peróxido de hidrogênio; 200 μM) (THANNICKAL; FANBURG, 2000; RHEE et al., 2005).

3.3.7. Ensaio de potencial de membrana mitocondrial

As alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) na linhagem MDA-MB-231 promovidas pelo SSi6 foram analisadas usando o kit BD™ MitoScreen, que usa o corante *5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide* (JC-1). As células (1×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com SSi6 (25, 50 e 100 μM) por 8 horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com JC-1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos no escuro e, em seguida, lavadas duas vezes com 200 μL de PBS frio e analisadas por citometria. Um total de 10.000 eventos foram analisados utilizando o citômetro de fluxo *Accuri C6*. Em células saudáveis o JC-1 forma agregados de cor vermelha, enquanto que em células com baixo potencial de membrana, estes agregados são dissociados a monômeros emitindo uma fluorescência verde no citoplasma (vide Figura 7) (SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019). As alterações no $\Delta\Psi\text{m}$ foram calculadas como a razão da fluorescência vermelha e verde. A camptotecina (200 μM) foi usada como controle positivo (24 horas de tratamento).

Figura 7 – Representação esquemática do mecanismo de ação do reagente JC-1 nas mitocôndrias. (A) Nas células apoptóticas, o corante JC-1 também entra nas mitocôndrias (mas em menor grau), devido ao aumento da permeabilidade da membrana e à diminuição da carga negativa no interior das mitocôndrias pela perda do potencial eletroquímico. Nesta condição, o JC-1 não alcança a concentração suficiente para a formação de agregados, mantendo assim seu estado monomérico, visualizado na fluorescência verde original. (B) Em células saudáveis com um $\Delta\Psi\text{m}$ normal, o corante JC-1 entra e acumula-se nas mitocôndrias carregadas negativamente formando agregados fluorescentes na cor vermelha.



3.3.8. Expressão gênica por PCR em tempo real

Os efeitos do 6G e SSi6 sobre a expressão de genes relacionados com os processos de autofagia e apoptose foram analisados por qRT-PCR (*Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*). As células (1×10^6 células/placa) foram tratadas com 6G (50 μ M) e SSi6 (25 e 50 μ M) por 1 e 10 horas e coletadas para extração de RNA total usando o reagente Trizol[®] (Invitrogen). O RNA total foi ressuscitado em água ultrapura (*nuclease-free*) e armazenado a -80 °C até seu uso. O *Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific) foi usado para medir a concentração e a pureza do RNA (relação 260/280 nm e 260/230 nm). Em seguida, o RNA (1,5 μ g) foi transcrito reversamente a cDNA (*Complementary DNA*) com o kit *Enhanced Avian First Strand Synthesis* (Sigma Aldrich) e estocado a -20 °C. O sistema de detecção de PCR em tempo real *CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time* (Bio-Rad) foi utilizado para a reação qPCR. Em cada reação utilizou-se 20 ng de cDNA, 400 nM de cada *primer* e 5 μ L de SYBR[®] Green JumpStart™ (Sigma-Aldrich) em um volume total de 10 μ L por reação. Os *primers* específicos (listados na Tabela 2) foram adquiridos da empresa *Exxtend* e as condições da PCR foram ajustadas dependendo da temperatura de *melting* de cada par de primers. 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 nas suas curvas de *melting*. A expressão relativa dos produtos qRT-PCR foi determinada utilizando o método $\Delta\Delta Cq$, em que a expressão relativa foi calculada usando a seguinte equação: $fold\ induction = 2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O gene *Rpl37a* foi usado como controle endógeno ou de referência.

Tabela 2 – *Primers* utilizados na reação de PCR em tempo real.

Gene	Nome do gene	Acesso no NCBI*	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (3'-5')
MAP1LC3B	<i>Microtubule-associated proteins 1B light chain 3B</i>	NC_000016.10	GAG CAG CAT CCA ACC AAA A	CCA TGC TGT GTC CGT TCA
CASP3	Caspase-3	NM_004346.3	TCC TAG CGG ATG GGT GCT AT	CGA GCA CTC ACG AAA CTC TTC
AIF	Fator indutor de apoptose	NC_000023.11	AAG TCA GAC GAG AGG GGG TTA	GCC AAC TCA ACA TTG GGC T
<i>Rpl37a</i>	Proteína Ribossômica L37a	NC_000002.12	GCC AGC ACG CCA AGT ACAC	CCC CAC AGC TCG TCT CTT CA

* NCBI, *National Center for Biotechnology Information*.

3.3.9. Western Blotting

Células MDA-MB-231 (1×10^6 /placa) foram semeadas em placas de Petri de 6 cm e incubadas *overnight* a 37 °C e 5% CO₂. Posteriormente, as células foram tratadas com SSi6 e/ou

6G, 2,4-DNFH, dependendo da finalidade desejada. Para a lise celular, o reagente CelLytic™ foi utilizado conforme as instruções do fabricante para obter o conteúdo de proteína. Em seguida, os lisados obtidos foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. A quantificação proteica foi determinada usando o kit *Pierce*® *BCA Protein Assay*. As amostras de proteína foram misturadas com tampão de amostra (50 µL de β-mercaptoetanol e 950 µL de tampão *Laemmli*; Bio-Rad) e fervidas a 100 °C por 5 minutos. Amostras de 15 µg de proteína foram aplicadas em géis de 4-20% mini-PROTEAN® TGX™ pré-fabricado (corrida de 1 hora a 100 V) e por transferência úmida usando o tampão de transferência 1X à base de glicina e tris-base. Os géis foram transferidos a membranas de nitrocelulose de 0,45 µm. A correta transferência de proteínas, foi avaliada com uma solução de ponceau e, em seguida as membranas foram bloqueadas com solução de caseína 1% (Bio-Rad) por 1 hora para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos. As membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com os anticorpos primários anti-LC3B (1:3000; ab51520, Abcam), anti-caspase 3 (1:1000; ab179517, Abcam) e anti-AIF (1:200; sc-9416, *Santa Cruz Biotechnology*), e após sucessivas lavagens com tampão *Tris-Buffered Saline* (TBS) 1X, as membranas foram novamente incubadas com os anticorpos secundários correspondentes (1:5000; Abcam) por uma 1 hora a temperatura ambiente (~25 °C).

Finalmente, as proteínas foram analisadas por quimiluminescência utilizando o substrato *Clarity*™ *Western ECL* (Bio-Rad). As bandas específicas foram visualizadas com um gerador de imagens *ChemiDoc MP* (Bio-Rad) e a análise densitométrica foi realizada utilizando o *software* ImageJ (versão 1.51n), normalizado para o anticorpo β-actina (1:1000; sc-47778, *Santa Cruz Biotechnology*) usado como controle endógeno.

3.3.10. *Small interfering RNA* (siRNA)

Os siRNAs projetados para silenciar a proteína LC3B (s37748 “si-48” e s224886 “si-86”) e o controle não alvo (NT; AM4611) foram ressuspensos em água ultrapura estéril (*nuclease-free*) e transfectados nas células MDA-MB-231 usando o reagente *DharmaFECT 4* (*GE Healthcare*) na concentração final de 25 nM conforme as instruções do fabricante. Após 72 horas de transfecção, foram realizados ensaios de apoptose por citometria (seção 3.3.5) e *western blotting* (seção 3.3.9) como descrito anteriormente.

3.3.11. Análise estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata e de forma independente para garantir a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados. As análises foram realizadas no programa

estatístico GraphPad Prism (versão 7.0). Os dados foram calculados como média \pm desvio padrão (DP) e as comparações entre os grupos foram feitas através da análise de variância (nível de p aceitável $<0,05$) utilizando o teste *one-way* com pós-teste de Bonferroni que compara todos os grupos com o controle.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Citotoxicidade e alterações na morfologia celular

Na Tabela 3 são mostrados os valores IC_{50} relacionados aos efeitos citotóxicos das substâncias em estudo nas linhagens não tumorais (MCF-10A e HMEC) e tumorais de mama (MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR3). O SSi6 mostrou um valor mais baixo de IC_{50} na linhagem triplo negativa MDA-MB-231 (IC_{50} $22,90 \pm 0,35 \mu M$) quando comparado com as linhagens não tumorais MCF-10A (IC_{50} $34,17 \pm 2,4 \mu M$) e HMEC (IC_{50} $35,56 \pm 0,7 \mu M$) após 48 horas de tratamento. Neste caso, o índice de seletividade do SSi6 frente à linhagem tumoral (IC_{50} -não tumoral/ IC_{50} -tumoral) foi de aproximadamente 1,5. Em contraste, o 6G mostrou valores bastante elevados de IC_{50} para todas as linhagens em estudo, sendo de $404,5 \pm 7,6$, $985,8 \pm 0,57$, $316,2 \pm 0,61$ e $599,4 \pm 8,5 \mu M$ para a MDA-MB-231, MCF-7, SKBR3 e MCF-10A, respectivamente. Por outro lado, a 2,4-DNFH apresentou valores de $IC_{50} > 100 \mu M$ para todas as linhagens celulares testadas.

Tabela 3 – Valores de IC_{50} do tratamento de 6G, 2,4-DNFH e SSi6 nas linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-10A, HMEC, MCF-7 e SKBR3 após 48 horas. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

Compostos	$IC_{50} \pm DP^* (\mu M)$					IS ^{***}
	MCF-10A ^{**}	HMEC	MDA-MB-231 ^{**}	MCF-7	SKBR3	
6G	599,4 \pm 18,5	-----	404,5 \pm 17,6	985,8 \pm 0,5	316,2 \pm 0,6	1,48
2,4-DNFH	>100	>100	>100	>100	>100	-----
SSi6	34,17 \pm 2,4	35,5 \pm 0,7	22,90 \pm 0,3	31,01 \pm 3,2	23,93 \pm 0,6	1,49/1,55

*DP = desvio padrão

**Dados experimentais previamente obtidos (ref. dissertação Dulcey, Liany Luna 2017)

***Índice de seletividade; IS = IC_{50} MCF-10A/ IC_{50} MDA-MB-231; IC_{50} HMEC/ IC_{50} MDA-MB-231.

Os valores IC_{50} do 6G nas linhagens tumorais estão em concordância com os trabalhos reportados na literatura. Dentre eles, Silva e colaboradores reportaram que o valor IC_{50} do 6G na linhagem MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento foi de $666,2 \pm 134,6 \mu M$, o que é muito próximo ao determinado neste trabalho (SILVA et al., 2012). Kumara *et al.* estudaram a viabilidade do 6G na linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT5, registrando um valor IC_{50} de $100 \mu M$ após 24 horas de tratamento (KUMARA et al., 2017). Neste trabalho, o 6G mostrou-

se muito menos ativo que seu homólogo semissintético SSi6, confirmando que a modificação química realizada neste composto leva a uma melhora significativa nas suas propriedades citotóxicas, passando de $404,5 \pm 17,6 \mu\text{M}$ para $22,90 \pm 0,35 \mu\text{M}$ na linhagem triplo negativa de mama MDA-MB-231 (17 vezes menor).

Por outro lado, nas linhagens tumorais não triplo negativas MCF-7 e SKBR3, os valores de IC_{50} do SSi6 foram um pouco maiores em comparação ao obtido nas células MDA-MB-231 (Tabela 3). No entanto, como essas linhagens têm alvos específicos bem definidos para seu tratamento, optou-se por continuar com o estudo na linhagem triplo negativa MDA-MB-231. Neste sentido, os resultados apresentados nas próximas seções referem-se ao efeito do SSi6 nesta linhagem tumoral.

Em relação às alterações morfológicas induzidas pelo SSi6 na MDA-MB-231, estas são evidentes inclusive nas primeiras horas de tratamento. Na Figura 8A é possível observar uma intensa vacuolização citoplasmática (setas vermelhas) provocada pelo tratamento com SSi6 (50 e 100 μM ; 6 horas de tratamento) quando comparado com o controle negativo de células (DMSO 1%). Nesta mesma figura, também é possível evidenciar que os compostos constituintes do SSi6, o 6G e a 2,4-DNFH, não provocaram nenhuma alteração significativa na morfologia das células. Isto confirma que há um efeito sinérgico resultante da reação entre o 6G com 2,4-DNFH, gerando uma maior alteração morfológica nas células tumorais quando comparado ao tratamento individual por estes compostos.

Vários estudos relatam que a alteração celular em forma de vacúolos é uma característica da iniciação ou ocorrência de um processo autofágico (ESKELINEN, 2005; PARZYCH; KLIONSKY, 2014). Assim, a wortmanina, um composto que inibe/retarda a formação de autofagossomos via sinalização da PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) foi usada como controle negativo. A wortmanina (30 μM) usada de forma concomitante com SSi6 (50 μM) inibiu a formação de vacúolos induzida nas células MDA-MB-231. Neste caso, pode ser claramente observado (Figura 8A; tratamento wortmanina) que houve uma inibição quase total da formação destas estruturas nas células, inclusive ficando morfológicamente similares às células do controle negativo (DMSO 1%). Tal fato mostra, como será discutido nas seguintes seções, que a formação de vacúolos citoplasmáticos durante o tratamento com SSi6 está relacionada à ocorrência de um processo autofágico nas células.

As Figuras 8B e C mostram os efeitos do tratamento de SSi6 nas células não tumorais (MCF-10A e HMEC) e tumorais (MCF-7 e SKBR3) após 6 horas, respectivamente. Nota-se

que não houve formação de vacúolos no interior destas linhagens, o que complementa, além do valor de IC_{50} , a seletividade do SSi6 pelas células tumorais triplo negativas MDA-MB-231.

Figura 8 – Alterações na morfologia das células tumorais e não tumorais. **(A)** Detecção de vacúolos citoplasmáticos nas células MDA-MB-231 após incubação com o SSi6 por 6 horas (setas vermelhas). As células foram tratadas com 6G (100 μ M), 2,4-DNFH (100 μ M) e wortmanina (30 μ M + 50 μ M SSi6) por 6 horas. **(B)** Como controle, células MCF-10A e HMEC tratadas (6 horas) com SSi6 nas mesmas condições, não apresentaram vacúolos citoplasmáticos. **(C)** Células tumorais de mama MCF-7 e SKBR3, foram tratadas com SSi6, para mostrar a seletividade do composto nas células triplo negativas MDA-MB-231. Todas as linhagens foram examinadas usando um microscópio invertido (aumento de 200 \times), barra de escala = 50 μ m

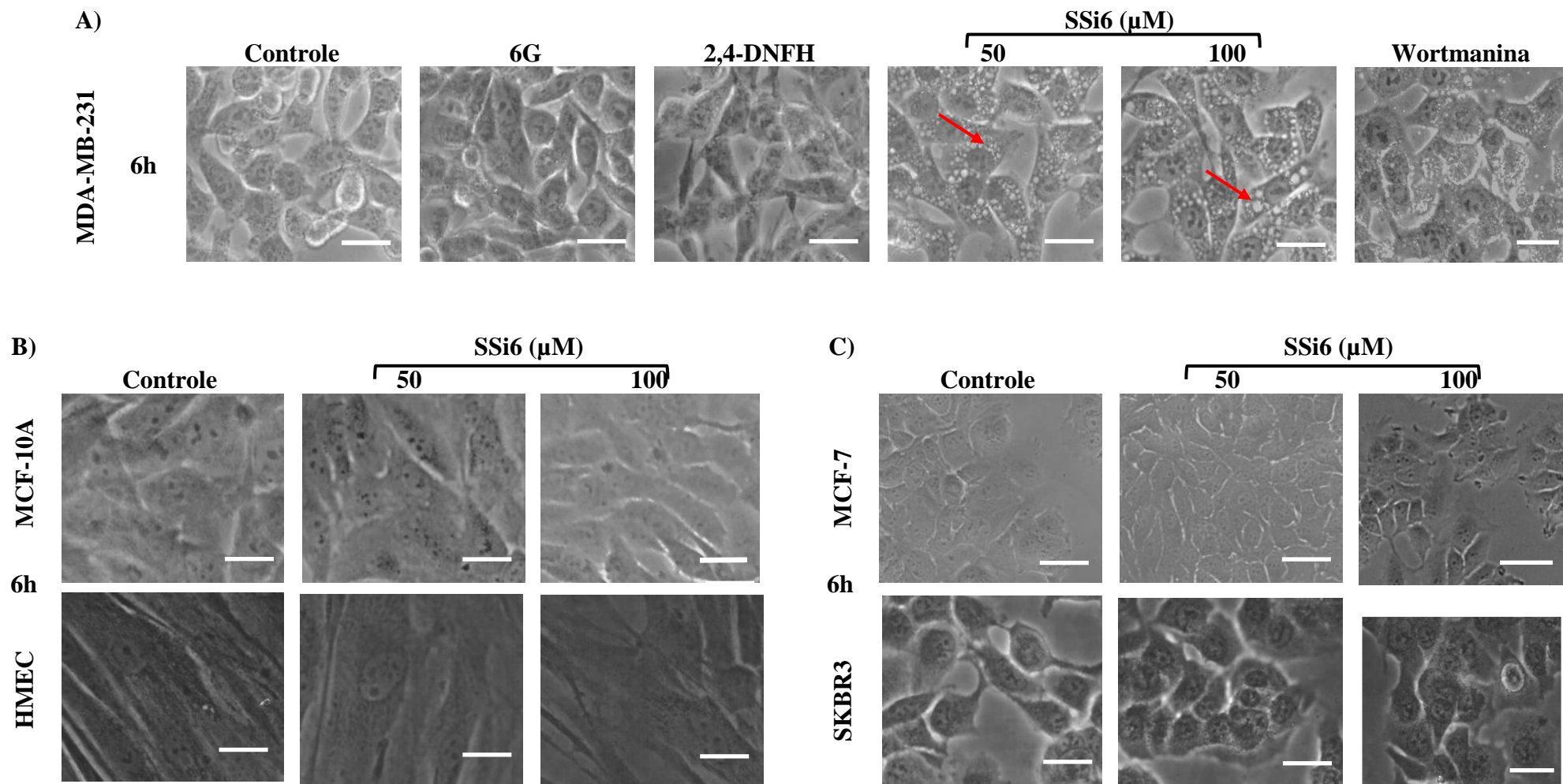
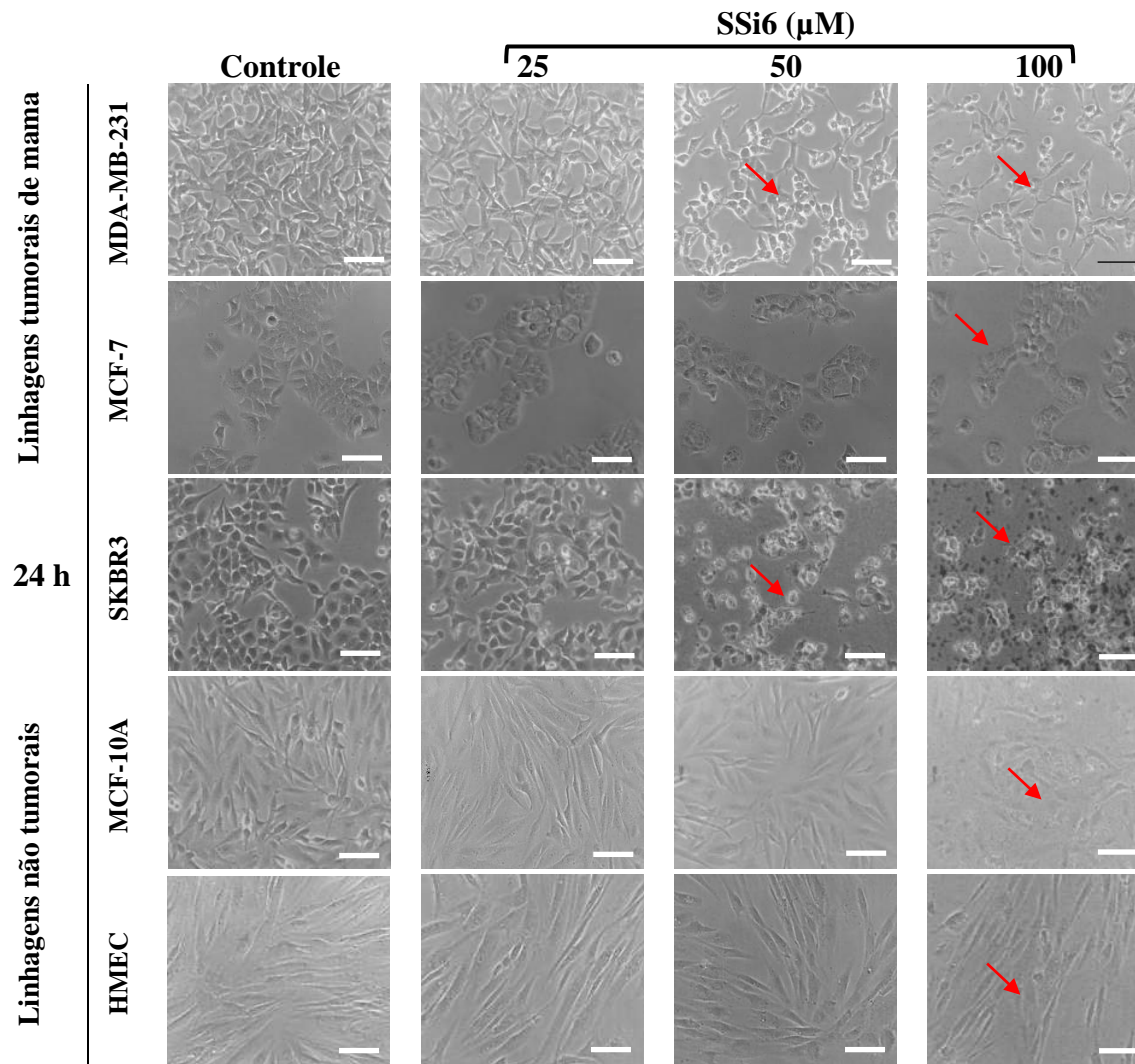


Figura 9 – Alterações morfológicas provocadas pelo SSi6 em linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens celulares (1×10^5) foram tratadas com o SSi6 (25,50 e 100 μM) e examinadas por 24 h. As mudanças na morfologia foram evidenciadas nas maiores concentrações (setas vermelhas). Barra de escala = 100 μm .



Adicionalmente, conforme mostrado na Figura 9, em 24 horas de tratamento o SSi6 nas maiores concentrações (50 e 100 μM) induziu mudanças morfológicas significativas principalmente nas células tumorais MDA-MB-231 e SKBR3 (positiva para HER2+). Nesse ponto, observou-se falta total de aderência e a presença de restos celulares, características da morte celular por apoptose. Em contrapartida, apenas mudanças leves foram observadas tanto na linhagem tumoral de mama MCF-7 (positiva para RE+) quanto nas não tumorais MCF-10A e HMEC.

3.4.2. Análise da taxa apoptótica induzida pelo SSi6 na linhagem MDA-MB-231

Para analisar de forma mais específica o tipo de morte celular associado às alterações morfológicas induzidas pelo SSi6 nas células MDA-MB-231, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo para determinar a taxa apoptótica utilizando os corantes PE-Anexina V e 7-AAD. Este ensaio também foi realizado para o 6G e a 2,4-DNFH, bem como para os respectivos controles. A interpretação e análise deste ensaio foi realizada observando os quadrantes da Figura 10, os quais tem os seguintes significados:

- Quadrante inferior esquerdo (Q1-LL, *lower left quadrant*): representa as células viáveis (Anexina V(-) e 7-AAD(-));
- Quadrante inferior direito (Q1-LR, *lower right quadrant*): representa a população de células que estão no início do processo apoptótico (Anexina V(+) e 7-AAD(-));
- Quadrante superior direito (Q1-UR, *upper right quadrant*): representa a população de células em apoptose tardia (Anexina V(+) e 7-AAD(+));
- Quadrante superior esquerdo (Q1-UL, *upper left quadrant*): representa a população de células inviáveis, ou seja células em necrose (Anexina V(-) e 7-AAD(+)).

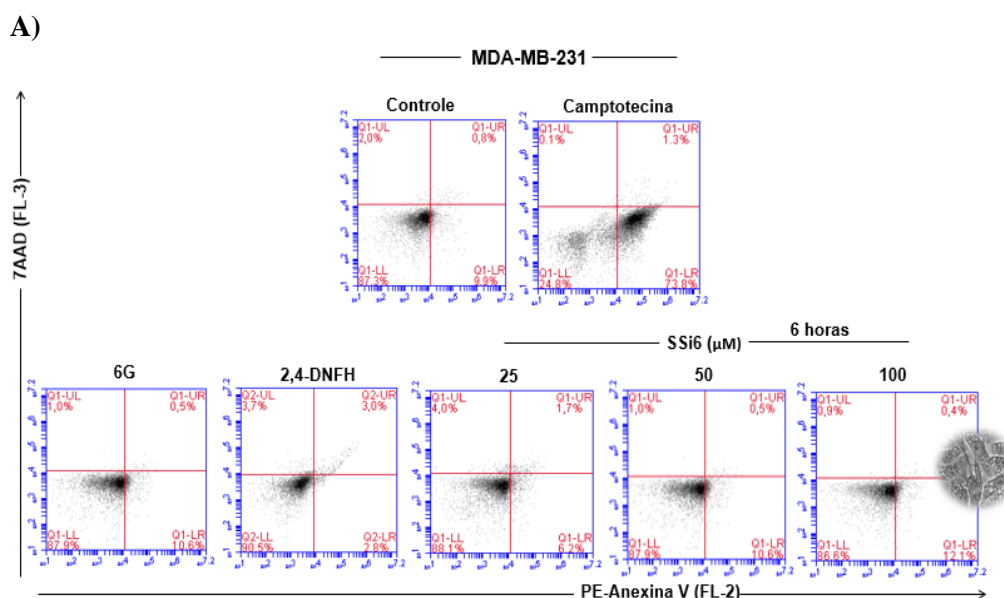
Como discutido anteriormente na Figura 8A (vacúolos citoplasmáticos), as alterações morfológicas das células MDA-MB-231 tratadas durante 6 horas com SSi6 parecem estar associadas à indução de autofagia, porém, em tempos elevados de tratamento (Figura 9), as alterações parecem ser mais características do processo apoptótico (células em formato circular). Neste sentido, a taxa apoptótica foi medida nos tempos de 6 e 14 horas de forma independente. Na Figura 10A, mostra-se que após 6 horas de tratamento com o SSi6, a percentagem de células em apoptose não foi significativa, tendo um comportamento muito similar ao controle negativo, já que quase a totalidade da população celular se encontra no quadrante Q1-LL. O anterior também pode ser observado na Figura 10B, em que nenhuma das concentrações do SSi6 leva a percentagens significativas de apoptose. Estes resultados confirmam que durante as primeiras 6 horas de tratamento, as células estão provavelmente sob

um processo autofágico, o que é novamente coerente com o relatado nos resultados dos ensaios anteriores. Por outro lado, após 14 horas de tratamento com o SSi6, as células apresentaram um aumento significativo na percentagem de apoptose em relação ao controle negativo, observado pelo aumento da população das células que se encontram nos quadrantes Q1-LR e Q1-UR (Figura 10C). A apoptose foi evidente em todas as concentrações de SSi6 testadas, porém, maiores nos casos de 50 e 100 μM de SSi6 (25% e 39,5%, respectivamente). Isto também pode ser observado na Figura 10D, indicando que as células se encontram em um processo de apoptose.

A incubação durante 6 horas com o 6G e a 2,4-DNFH (ambos com 100 μM) não resultou em aumento significativo de apoptose (todas as células estão viáveis, vide quadrante Q1-LL), processo que só ocorreu após 14 horas de incubação quando a porcentagem de células apoptóticas aumentou em relação ao controle negativo. As taxas apoptóticas foram de 21,6% e 13,4%, para o 6G e a 2,4-DNFH, respectivamente, o que indica que em tempos maiores de tratamento, o 6G também tem um papel importante na indução do processo de apoptose.

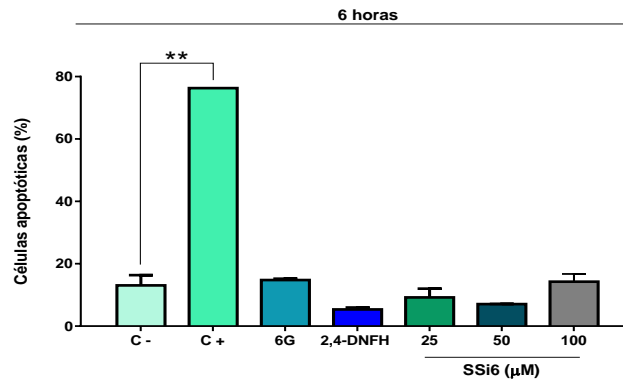
Levando-se em consideração o exposto, a hipótese é que o tratamento com SSi6 induz nas células tumorais inicialmente o processo autofágico e a maquinaria celular não conseguindo se restabelecer promove a entrada das células em apoptose ao final do tratamento. Seguindo esta lógica, os próximos ensaios estarão focados em elucidar e comprovar todos os processos envolvidos na promoção destes dois eventos celulares.

Figura 10 – SSi6 aumenta a taxa de apoptose nas células MDA-MB-231 em 14 horas de tratamento. As células (1×10^5) foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com SSi6 (25,50 e 100 μM), 6G e 2,4-DNFH (100 μM) por (A e B) 6 e (C e D) 14 horas. Como controle positivo da apoptose foi utilizada a camptotecina (C+; 200 μM). Os dados representam a média ($\pm\text{DP}$) de três ensaios independentes em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando *one-way*, seguido por uma análise post-hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ vs o controle negativo (C-).

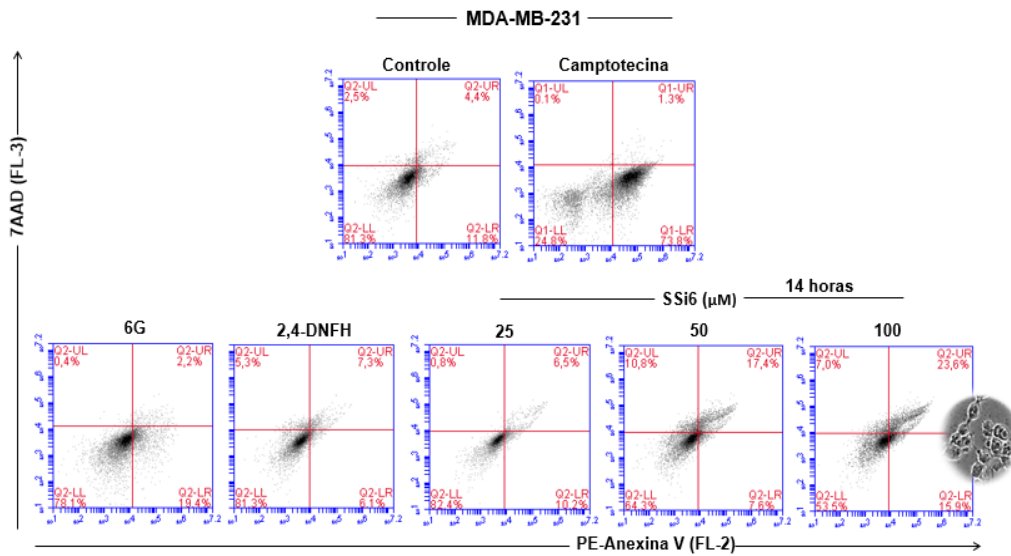


– Continuação **Figura 10**

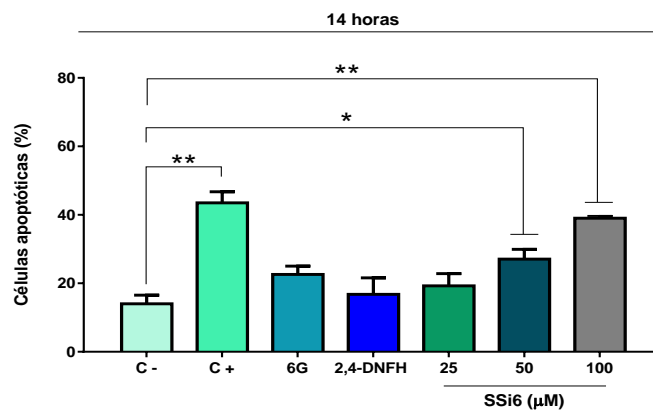
B)



C)



D)

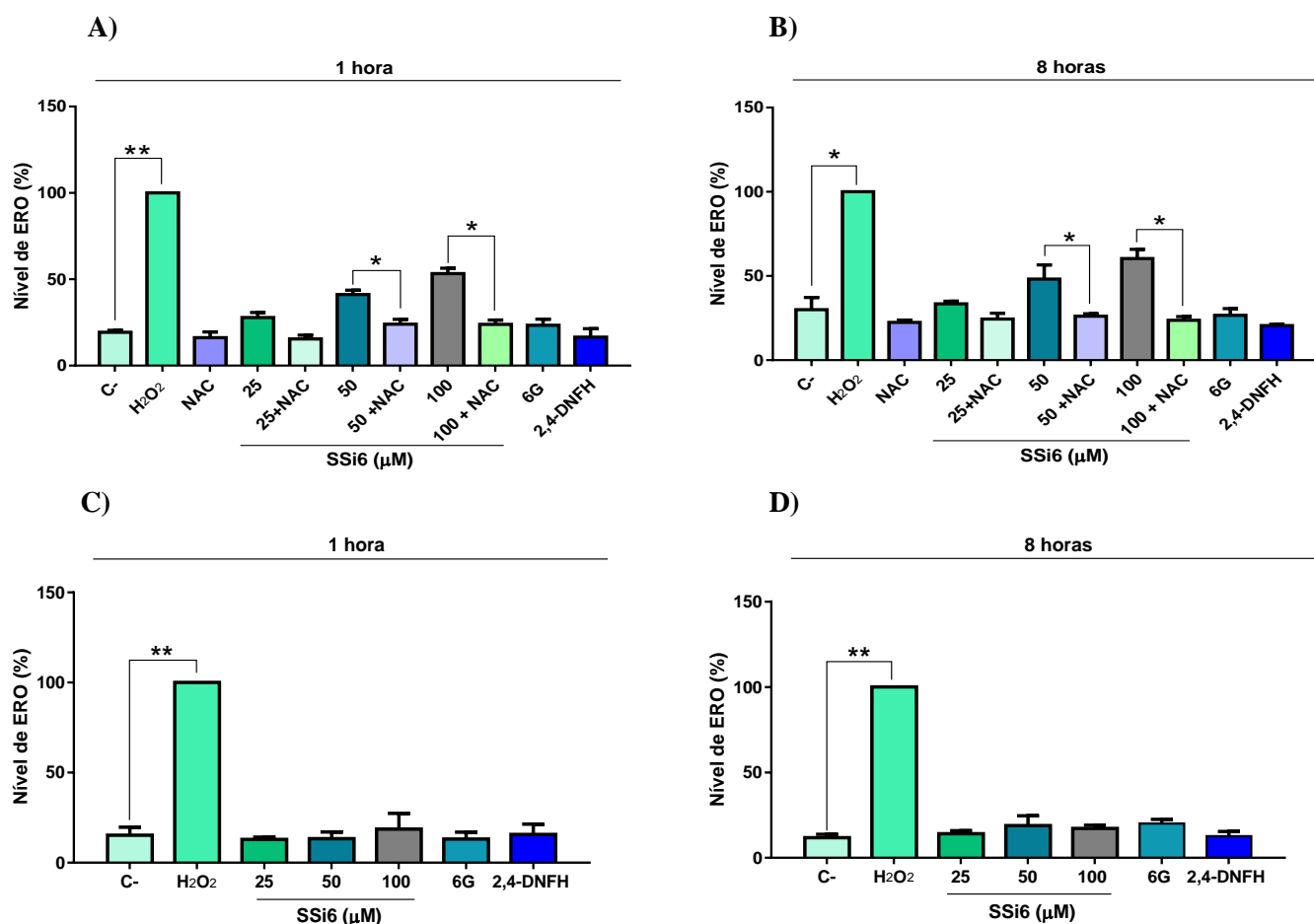


3.4.3. Geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) e alteração do potencial de membrana mitocondrial

Com a finalidade de elucidar os mecanismos subjacentes envolvidos na morte celular induzida pelo SSi6, foram estimadas as alterações nos níveis das ERO nas células MDA-MB-231 e MCF-10A utilizando o reagente diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H₂DCFDA). Este reagente fluorogênico detecta a geração intracelular das ERO (ex., radical hidroxila, hidróxido

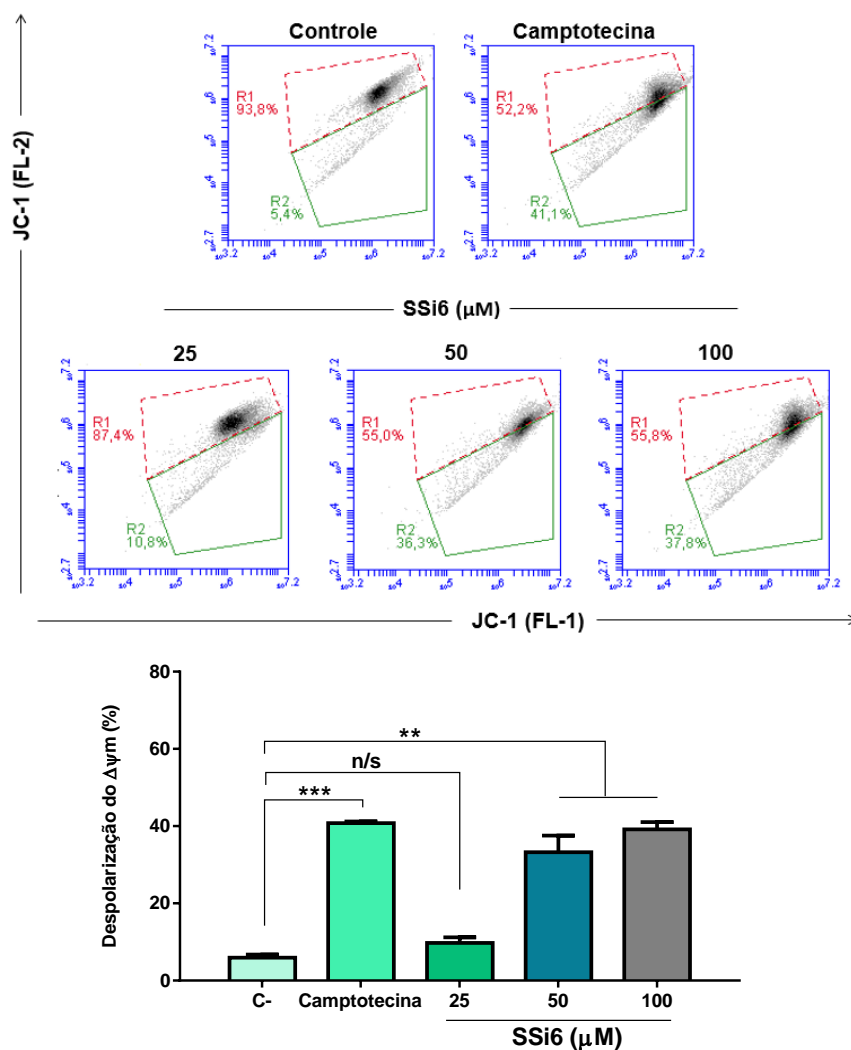
de hidrogênio, oxigênio singlete, entre outras) nas células, já que tem a capacidade de atravessar livremente as membranas celulares. Uma vez dentro das células, os grupos acetato ($C_2H_3O_2R$) que formam parte da estrutura molecular do H_2DCFDA , são clivados por esterases intracelulares, convertendo o H_2DCFDA não fluorescente em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), uma molécula altamente fluorescente (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005; CHEN et al., 2010).

Figura 11 – SSi6 induz a formação de ERO e aumenta o potencial de membrana mitocondrial na MDA-MB-231. As células MDA-MB-231 foram tratadas com as concentrações indicadas do SSi6, 6G e 2,4-DNFH (100 μM) com ou sem NAC (5 mM) durante (A) 1 e (B) 8 horas, seguida da incubação com H_2DCFDA . As células MCF-10A foram tratadas com as mesmas substâncias durante (C) 1 e (D) 8 horas e a intensidade de fluorescência foi analisada. A despolarização do $\Delta\psi_m$ foi monitorada por citometria de fluxo usando o marcador JC-1. (E) As células MDA-MB-231 foram tratadas com SSi6 durante 8 horas e coradas com JC-1 como descrito na sessão de materiais e métodos. A camptotecina (200 μM) foi utilizada como controle positivo (composto indutor da apoptose). A região R1 (quadrante vermelho) inclui células com membranas mitocondriais intactas e a região R2 (quadrante verde) representa células com perda do $\Delta\psi_m$. O gráfico representa as porcentagens dos valores da região R2 (JC1-1/FL-1). Os resultados foram comparados utilizando *one-way* ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; n/s, não significativo vs controle e/ou grupo SSi6 correspondente, seguido por uma análise post-hoc de Bonferroni.



– Continuação **Figura 11**

E)



Analisando-se a Figura 11A e B, nota-se que houve um aumento significativo no conteúdo da fluorescência nas células MDA-MB-231 após 1 e 8 horas de tratamento com o SSi6, respectivamente, refletindo no acúmulo das ERO nessas células. Em contraste, o 6G e a 2,4-DNFH não causaram geração de ERO nas células triplo negativas MDA-MB-231, pois tiveram um comportamento similar ao controle negativo. Por outro lado, para comprovar se de fato o SSi6 induz a formação de ERO nas células tumorais, foi utilizado a N-acetilcisteína (NAC) como *scavenger*, um agente antioxidante que reabastece a glutathiona intracelular e protege as células do estresse oxidativo (BENRAHMOUNE; THÉRON; ABEDINZADEH, 2000; NASH; AHMED, 2015). Deste modo, nos ensaios em que SSi6 e NAC foram utilizados de forma concomitante houve uma diminuição significativa da geração da fluorescência em ambos os tempos de tratamento (1 e 8 horas), ou seja, o NAC mostrou-se eficiente para sequestrar as ERO produzidas pelo tratamento com o SSi6. Em contrapartida, nas células MCF-

10A nos mesmos tempos de tratamento (1 e 8 horas) os níveis de ERO não foram significativos após a incubação com SSi6 (Figura 11C e D). Este resultado é muito relevante, pois explica os baixos efeitos citotóxicos do SSi6 nas células não tumorais MCF-10A.

As mitocôndrias são organelas que desempenham funções essenciais tanto no fornecimento da maior parte da energia para a atividade celular (respiração celular), quanto na promoção da morte celular programada, esta última dada por estímulos pró-apoptóticos. Esses estímulos relacionam-se principalmente com a ativação de proteínas pró-apoptóticas como Bax, tBid, Bad e Bad, e pelo aumento intracelular das ERO, fomentando assim, a ativação de caspases (processo conhecido como via intrínseca da apoptose) (LORETO et al., 2014). Na via intrínseca, a permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM) é o fator fundamental para promover este processo, pois é estimulado principalmente pelas mudanças no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (SCARLETT et al., 2000; GOTTLIEB et al., 2003). Neste sentido, uma alta PMEM estimulada por estas proteínas pró-apoptóticas, libera proteínas do espaço intermembranoso mitocondrial (EIM; citocromo c, Smac, Omi, serina peptidase HtrA2 e AIF) que promovem, na maioria das vezes, a translocação do citocromo c, permitindo uma atividade vigorosa das caspases, levando à morte celular rápida e organizada das células (apoptose dependente de caspases) (YOON et al., 2014). Não obstante, muitos trabalhos da literatura relacionam as ERO com a promoção da apoptose independente de caspases (AIC). O processo da AIC é geralmente associado com a liberação/translocação da proteína AIF para o citosol e posteriormente para o núcleo, desencadeando a fragmentação do DNA (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; HOLZE et al., 2018). Embora sejam poucos conhecidos os mecanismos envolvidos na indução da AIC, vários estudos na literatura sugerem que este pode servir como um mecanismo à prova de falhas, para garantir que a morte celular ocorra mesmo que as caspases estejam inibidas (TAIT; GREEN, 2008; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

Neste sentido, e sabendo que o SSi6 induz a geração de ERO e a ocorrência de um processo apoptótico tardio nas células MDA-MB-231, foi medida a despolarização do $\Delta\Psi_m$ utilizando o corante JC-1. Esta medida foi realizada no tempo de 8 horas, tempo intermediário entre a finalização da autofagia e o estágio inicial do processo apoptótico. Em células apoptóticas com baixo $\Delta\Psi_m$, o JC-1 permanece na forma monomérica (fluorescência verde; vide Figura 7A), no entanto, em células saudáveis com alto $\Delta\Psi_m$, o JC-1 forma agregados com fluorescência vermelha intensa (vide Figura 7B). Portanto, quanto maior a proporção de fluorescência vermelha para verde, maior será a polarização da membrana mitocondrial.

Conforme mostrado na Figura 11E, a porcentagem de despolarização do $\Delta\Psi_m$ aumentou significativamente de 25 μM (10,8%) para 50 μM (36,3 %) de SSi6, porém, manteve-se constante até a maior concentração testada (100 μM ; 37,8%). Contudo, uma despolarização do $\Delta\Psi_m$ é considerada significativa quando os valores são superiores ao 50%, mostrando neste caso, que o SSi6 provoca somente uma despolarização parcial da membrana. É provável que esta porcentagem aumente à medida que avança o tratamento, porém, como dito acima, o intuito de realizar a medida neste tempo específico foi verificar a ação das ERO na despolarização da membrana e a posterior liberação das proteínas iniciadoras do processo apoptótico.

Nesse sentido, na próxima seção será discutido se a despolarização parcial da membrana mitocondrial nas células MDA-MB-231 está relacionada com a translocação de proteínas do espaço intermembranoso da mitocôndria, ativando o processo de apoptose dependente ou independente da atividade das caspases (BACKES; HERRMANN, 2017; EDWARDS; EAGLESFIELD; TOKATLIDIS, 2021).

3.4.4. Análise dos processos de autofagia e apoptose ativados pelo SSi6

Com o intuito de confirmar se os processos de autofagia e apoptose são promovidos pelo tratamento com SSi6, ensaios de RT-qPCR e *western blotting* foram realizados para comprovar a ação conjunta destes dois processos de morte celular na MDA-MB-231. Inicialmente, foram determinados os níveis gênicos e proteicos da LC3B, utilizada para estimar a quantidade de autofagossomas (autofagia) induzidos pelo SSi6 nas células (TANIDA et al., 2005; TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2008). Por outro lado, também foram analisados utilizando os níveis da proteína caspase-3 (na sua forma ativa), proteína efetora do processo de apoptose dependente de caspases (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013; MCCOMB et al., 2019).

A expressão gênica de MAP1LC3B nas células MDA-MB-231 após o tratamento com SSi6 (1 e 10 horas) e 6G (1 hora) é apresentada na Figura 12A. Observa-se que houve uma regulação gênica positiva da LC3B após 1 hora de incubação com SSi6 nas concentrações testadas (25 e 50 μM) em relação ao controle sem tratamento, porém, isto não ocorreu em 10 horas de incubação com a substância, evidenciando-se pelo contrário, uma redução significativa da expressão do gene. Por outro lado, a regulação proteica da LC3B foi avaliada por meio de *western blotting* e mostrada nas Figuras 12B e C. O SSi6 nas concentrações de 25, 50 e 100 μM levou a um aumento significativo da lipidação (processo que adiciona a fosfatidiletanolamina) da LC3B-I a LC3B-II em 3 e 6 horas de tratamento, porém, o processo de autofagia não foi mais promovido após 14 horas de incubação com o SSi6 (Figura 12D). Esta conversão da

LC3B-I na sua forma lipidada (conhecida como LC3B-II) na glicina C-terminal é considerada um marcador chave do processo autofágico, pois associa-se à membrana das vesículas autofágicas (autofagossomas). Em contrapartida, o tratamento das células MDA-MB-231 com SSi6 (100 μM) na presença de wortmanina (30 μM) inibiu parcialmente a indução de autofagia, como demonstrado pelos níveis reduzidos da LC3B-II. Por outro lado, e como era esperado, o 6G e a 2,4-DNFH não tiveram efeito sobre os níveis da LC3B nas células triplo negativas. Isto corrobora mais uma vez com a hipótese de ocorrência da autofagia somente nos tempos iniciais de tratamento.

A Figura 12E mostra os resultados da expressão gênica da caspase-3 após o tratamento com SSi6 (25 e 50 μM) e 6G (100 μM). Pode-se observar claramente que após 1 hora de tratamento com o SSi6 não houve uma regulação gênica positiva, entretanto, no tempo de 10 horas a caspase-3 teve sua expressão regulada positivamente (na concentração de 50 μM). O aumento da expressão deste gene pelo 6G não foi significativa. Novamente, estes resultados são coerentes com a hipótese de que o tratamento com SSi6 induz a promoção inicial do processo autofágico seguida do evento apoptótico nos estágios finais. Embora este ensaio seja um indicativo da promoção do processo de apoptose dependente de caspase, é importante ressaltar que aqui foi medida a regulação gênica do mRNA (*messenger ribonucleic acid*) da caspase-3 total, o que pode não corresponder aos níveis proteicos da caspase-3 ativa, responsável pelo acionamento do processo de apoptose caspase dependente. Neste sentido, não é possível afirmar de forma conclusiva por meio deste ensaio a dependência ou não do processo apoptótico com a atividade das caspases.

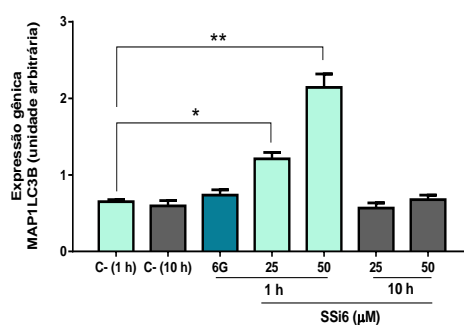
Para determinar o aumento dos níveis de caspase-3 na sua forma ativa, ensaios de *western blotting* foram realizados nas células MDA-MB-231 após 14 horas de tratamento com SSi6 (25, 50 e 100 μM) e 6G (50 e 100 μM). Conforme pode ser observado na Figura 12F, o nível da proteína pró-caspase 3 (forma inativa) foi significativo tanto após o tratamento com SSi6 quanto com 6G, porém, não foi observado o mesmo comportamento para a caspase-3 ativa. Isso pode ser explicado pois a caspase-3 só se torna funcionalmente ativa para iniciar o processo de apoptose quando é clivada em moléculas de aproximadamente 12 kDa, confirmando que a promoção do processo apoptótico induzido pelo SSi6 não é dependente de caspases.

A fim de determinar se o processo de apoptose ocorre então via independente de caspase, os níveis da proteína AIF (um marcador da apoptose independente de caspases) foram medidos mediante RT-qPCR e *western blotting* nas células triplo negativas. Neste caso, a

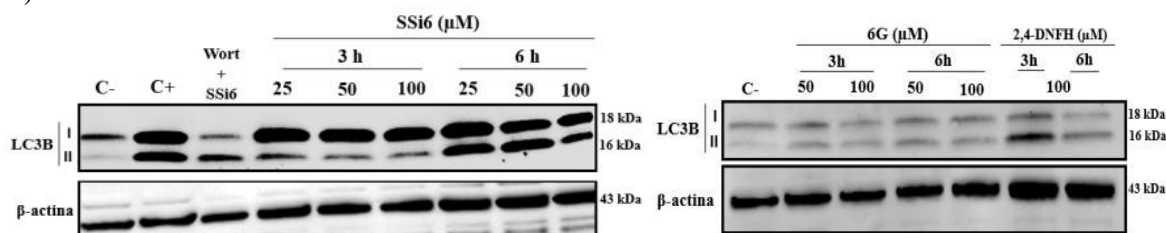
determinação da expressão gênica da AIF nas células tratadas com SSI6 é muito relevante, pois ao contrário da caspase-3, a simples expressão desta proteína já prediz o envolvimento do processo apoptótico independente de caspase. Em relação à expressão do mRNA da AIF, embora nenhuma mudança significativa tenha sido observada após 1 hora de incubação, houve uma expressão significativa aumentada após 10 horas de tratamento (** $p < 0,001$; Figura 12G). Além disso, a análise de *western blotting* da proteína AIF (Figura 12H) mostrou claramente que os níveis da proteína aumentaram após o tratamento, especialmente com SSI6. Isto permite confirmar de forma definitiva que o processo de apoptose induzido pelo SSI6 nas células MDA-MB-231 está intimamente relacionado com o mecanismo independente das caspases. Finalmente, estes resultados concordam com o explicado na despolarização parcial da membrana, que permite inicialmente a translocação de proteínas como a AIF do espaço intermembranoso para o citosol e que participam posteriormente na promoção de processos como a apoptoses independente de caspases.

Figura 12 – SSI6 aumenta os níveis da expressão de genes e proteínas relacionadas com a autofagia e apoptose independente de caspases nas células MDA-MB-231. O mRNA e proteínas totais foram extraídos e coletados para análise por PCR em tempo real e *western blotting*, respectivamente. As células foram incubadas com as concentrações indicadas do SSI6 e 6G em ensaios independentes como se indica: 1 hora-6G, 1 hora-SSI6 e 10 horas-SSI6 para determinar a expressão do gene (A) MAP1LC3B e o nível proteico da (B e C) LC3B em 3, 6 e (D) 14 horas de tratamento como se indica. O C+ (controle positivo), corresponde ao tratamento com a rampamicina (500 nM) por 24 horas e a W (wortmanina 30 μM + 100 μM SSI6- 6 horas), corresponde ao controle de inibição da autofagia. Para analisar a (E) expressão do gene da caspase-3 e (F) o nível proteico (pro-casp3 e casp3 ativa), as células foram tratadas como indicado e analisadas por PCR em tempo real e *western blotting*. De maneira similar, o gene da (G) AIF e (H) seu nível proteico, foram avaliadas pelas técnicas descritas. Os resultados representam a média (\pm DP) de ensaios em triplicata. Significância estatística: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ vs controle respectivo (C-; DMSO 1%).

A)

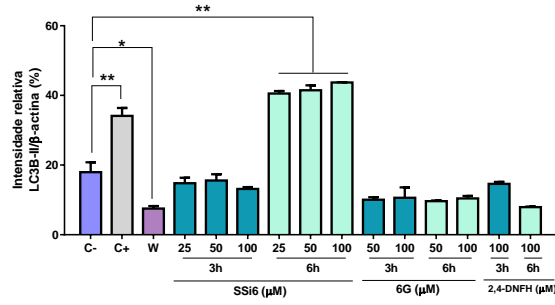


B)

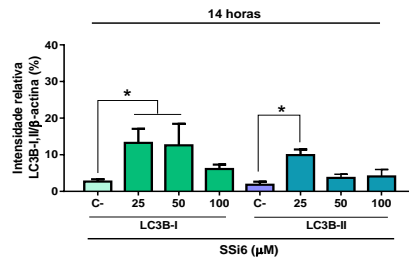
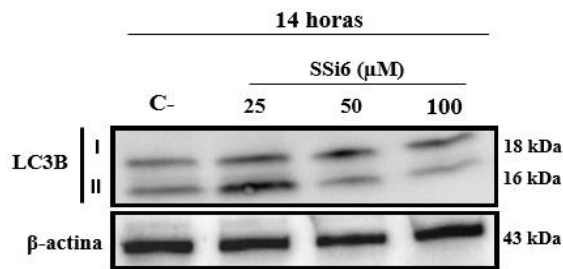


– Continuação **Figura 12**

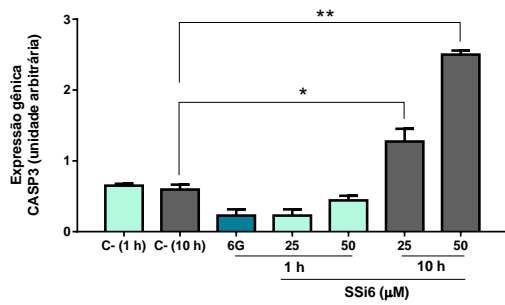
C)



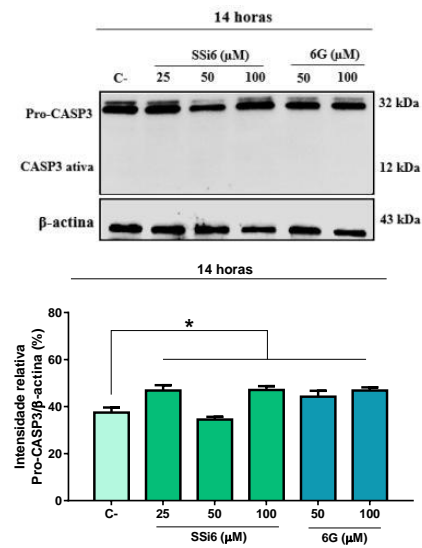
D)



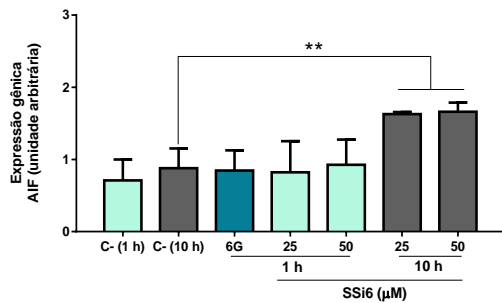
E)



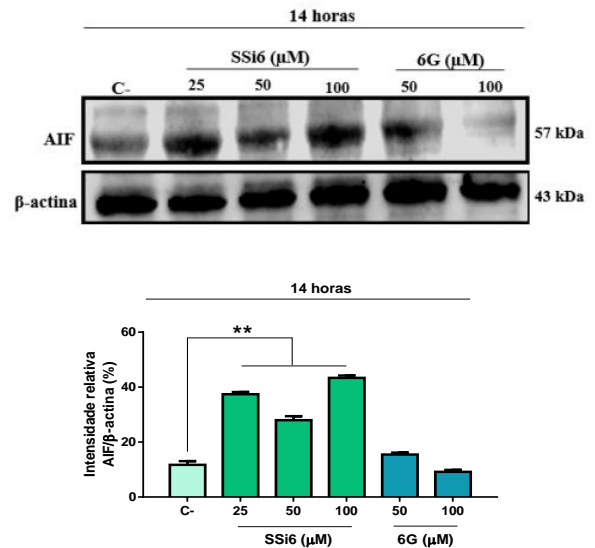
F)



G)



H)



3.4.5. Papel das espécies reativas do oxigênio na promoção de autofagia e apoptose

As ERO são descritas como um grupo heterogêneo de espécies instáveis, altamente reativas do oxigênio geradas pela oxidação ou redução do oxigênio molecular (O₂). Estas espécies desempenham um papel importante na ativação de diferentes tipos de morte celular, incluindo autofagia e apoptose (GAO et al., 2020; CHOI et al., 2021). As ERO podem causar várias tensões celulares como o dano oxidativo de lipídeos, proteínas e DNA, mediados por vários transdutores de sinais, que finalmente derivam no processo de apoptótico. Diversos integrantes da cascata apoptótica, tais como as caspases, a subfamília Bax e o citocromo c são redox sensíveis e, portanto, suas funções estão intimamente relacionadas à produção de ERO intracelular (HAMPTON; FADEEL; ORRENIUS, 1998; CIRCU; AW, 2010). Por outro lado, em relação à autofagia, uma quantidade crescente de evidências argumenta que o estresse oxidativo (gerado pelo acúmulo de ERO) atua como ponto de interconexão entre estes dois processos. Apesar disso, as vias que descrevem a conexão destes dois processos não estão bem elucidadas (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015).

Assumindo-se a participação das ERO em ambos os processos (autofagia e apoptose), foi investigado se o bloqueio destas espécies tem interferência na ativação de tais processos de morte celular na MDA-MB-231. Com o intuito de determinar quanto da taxa total de autofagia estava vinculada às ERO, as células foram tratadas concomitantemente com SSi6 (50 e 100 µM) e o *scavenger* NAC (5 mM) durante 6 horas e analisadas por meio de *western blotting*. Os resultados mostraram que houve uma redução muito significativa no nível das duas isoformas da LC3B, diminuindo de valores superiores ao 50% na ausência do *scavenger* para aproximadamente 10% utilizando SSi6 na presença de NAC (Figura 13A e B).

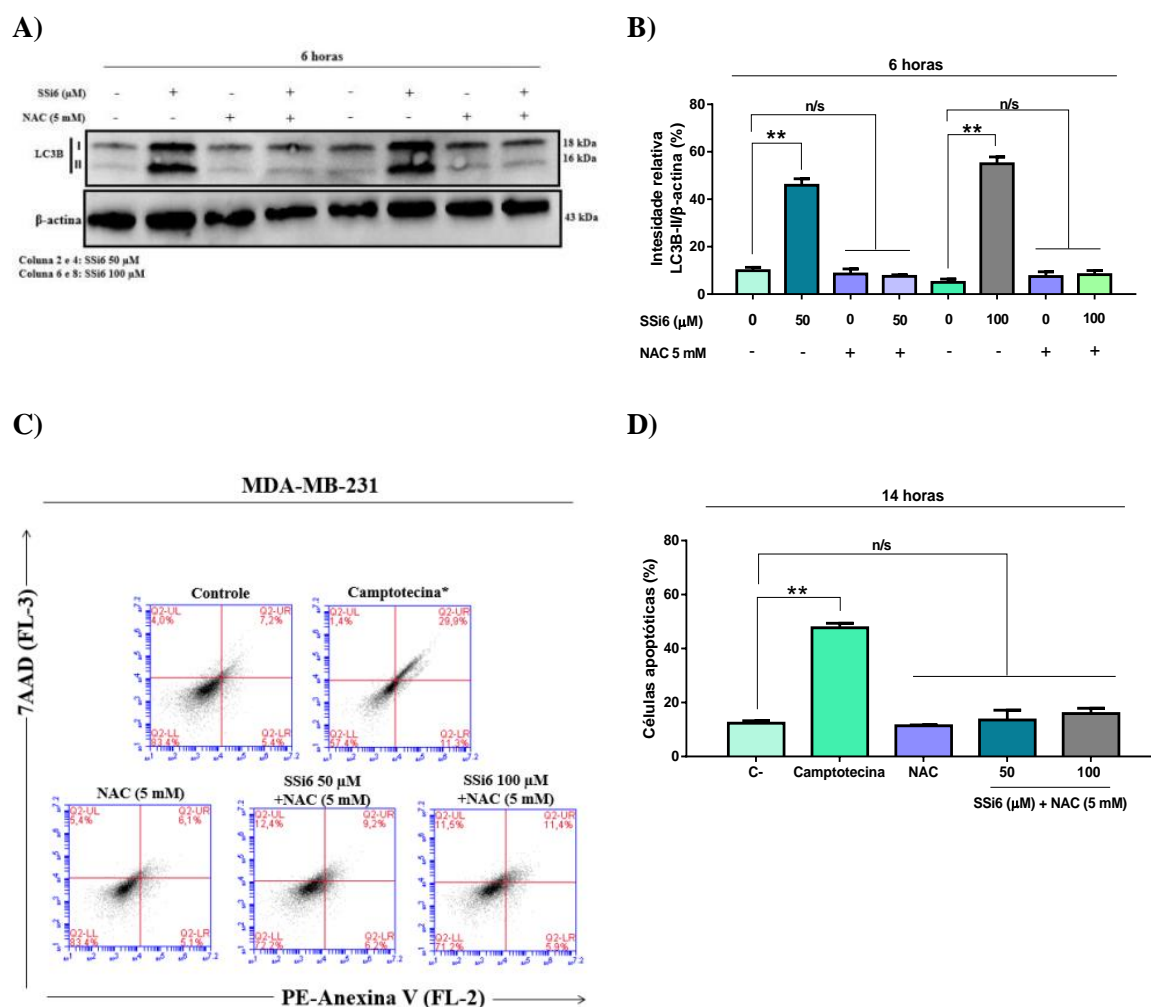
Também foi investigado o papel da geração das ERO na apoptose induzida pelo tratamento com SSi6 (50 e 100 µM). Para tal, e com o intuito de evitar inibir a indução inicial de autofagia, o NAC (5 mM) foi adicionado somente após 7 horas de tratamento nas células MDA-MB-231, para subsequentemente medição da taxa apoptótica após 14 horas, por citometria de fluxo. Após esse período, como observado nas Figuras 13C e D, as taxas apoptóticas diminuíram significativamente em relação às taxas apoptóticas encontradas no mesmo tempo de tratamento utilizando SSi6 na ausência do *scavenger* (vide Figuras 10A e B; apoptose 14 horas). O resultado foi especialmente evidente utilizando 100 µM de SSi6, mostrando uma redução da taxa apoptótica de 39,5% para um valor similar ao controle negativo.

Chen *et al.* reportaram um comportamento similar no tratamento de células de osteossarcoma utilizando Erianin, um produto natural derivado da *Dendrobium chrysotoxum*

(uma espécie de orquídea). Os pesquisadores mostraram que a utilização do NAC (5 mM) levou à diminuição da taxa apoptótica determinada por citometria de fluxo (usando PE-anexina V e 7AAD) e *western blotting* analisando proteínas relacionadas às vias extrínseca e intrínseca da apoptose (caspase -3, -8, -9 e Bcl-2). De forma similar, o NAC (5 mM) diminuiu a expressão de proteínas conexas à autofagia (LC3B, Beclin-1 e p62) analisadas por *western blotting* (CHEN et al., 2020).

Levando em consideração os resultados obtidos nesta seção, demonstramos o papel importante das ERO na promoção combinada dos processos de autofagia e apoptose independente de caspase induzidos pelo SSi6 na linhagem tumoral triplo negativa.

Figura 13 – SSi6 induz autofagia e apoptose através da produção de ERO. (A) Os lisados das células MDA-MB-231 tratadas com o SSi6 (50 e 100 μ M) com ou sem NAC (5 mM) por 6 horas foram analisados para detecção da LC3B-II por *western blotting*. (B) Os níveis de LC3B-II foram analisados. (C) As células foram tratadas com SSi6 (50 e 100 μ M) por 7 h e, depois tratadas com NAC (5 mM) por mais 7 h e analisadas por citometria de fluxo, usando Anexina-V e 7AAD. (D) A taxa apoptótica foi determinada por intensidade de fluorescência. Os resultados são apresentados como média (\pm DP) de três ensaios independentes (** $p < 0,001$ vs grupo controle, análise post-hoc de Bonferroni).



3.4.6. Efeitos do silenciamento da LC3B no processo de apoptose em MDA-MB-231

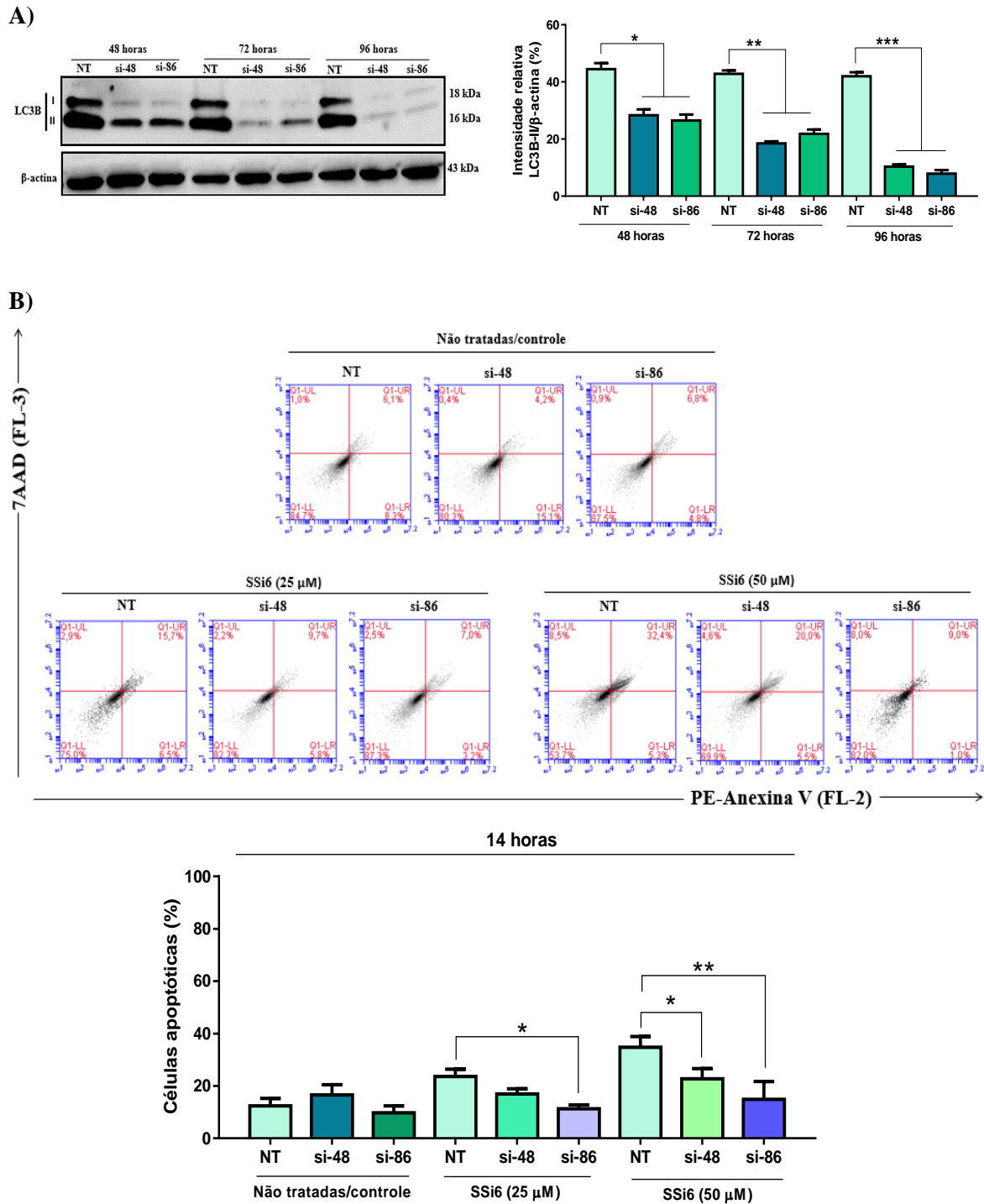
Diversos estudos relatam que a autofagia possui uma complexa interação com o processo de apoptose (SU; MEI; SINHA, 2013; MARIÑO et al., 2014). Proteínas autofágicas como a LC3B, a p62 e a Beclin-1 são provavelmente vitais na regulação de um número de moléculas pró e anti-apoptóticas (BOOTH et al., 2014). Como mostrado anteriormente por meio de análises de RT-qPCR e *western blotting*, a LC3B tem uma participação importante no processo autofágico induzido pelo SSi6 nas células MDA-MB-231.

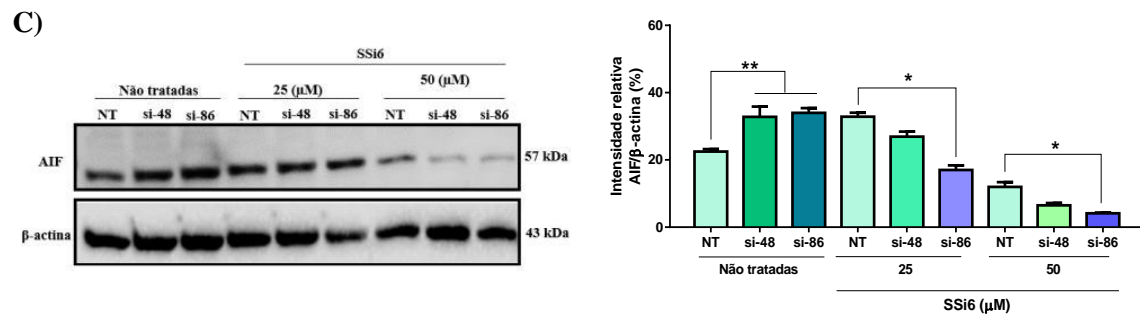
Neste sentido, a fim de determinar a importância desta proteína na conexão do processo de autofagia com o processo de apoptose independente de caspases, foi realizado o silenciamento da LC3B de forma transiente utilizando duas referências de siRNA (si-48 e si-86; nomes atribuídos para diferenciá-los). A ideia principal deste ensaio foi verificar se o silenciamento da LC3B teria influência ou não na ocorrência do processo apoptótico independente de caspases após o tratamento com SSi6.

Antes da realização do ensaio e com o intuito de validar os resultados posteriores, foi investigada a eficiência do silenciamento da LC3B utilizando as duas referências de siRNA. Neste caso, como observado na Figura 14A, os níveis da LC3B nas células MDA-MB-231 após 48, 72 e 96 horas de transfecção foram completamente suprimidos utilizando ambas as sequências de siRNA, demonstrando uma ótima efetividade no silenciamento desta proteína. Por outro lado, conforme mostrado na Figura 14B, o silenciamento da LC3B reduziu consideravelmente a percentagem da taxa apoptótica na concentração de 50 μ M de SSi6, principalmente utilizando o si-86. A taxa de apoptose diminuiu de 25% sem o silenciamento para 10% após o *knockdown* da LC3B. Contudo, a taxa apoptótica não foi completamente anulada quando a LC3B foi silenciada, pois, conforme relatado na literatura, alguns membros da família LC3 (principalmente a LC3A-II) também podem estar envolvidos no início do processo autofágico (BAI et al., 2012), que no caso deste estudo, leva ao processo de apoptose.

Por outro lado, foi comprovado que além do efeito do silenciamento da LC3B na diminuição da taxa apoptótica, o *knockdown* desta proteína também diminuiu os níveis de AIF após 14 horas de tratamento com SSi6, principalmente na concentração de 50 μ M (Figura 14C). A partir destes dados confirma-se mais uma vez, pelo menos até certo ponto, que a apoptose independente de caspase promovida pelo tratamento com SSi6, depende majoritariamente da iniciação do processo autofágico.

Figura 14 – Silenciamento da LC3B atenua os efeitos apoptóticos do SSI6 nas células MDA-MB-231. As células MDA-MB-231 foram transfectadas com siRNA direcionado para o gene da LC3B e com siRNA não alvo (NT). **(A)** O nível proteico da LC3B foi analisado após 48, 72, 96 horas por *western blotting*. **(B)** As células foram tratadas com as concentrações indicadas de SSI6 por 14 horas, e coradas com PE-Anexina V e 7-AAD para serem analisadas no citômetro de fluxo; si-48 (siRNA-ID: s37748) e si-86 (siRNA-ID: s224886). **(C)** A proteína AIF foi analisada por *western blotting*, após 14 h de tratamento com o SSI6. A β -actina foi usada como controle endógeno. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ vs controle NT, análise post-hoc de Bonferroni).



– Continuação **Figura 14**

Em resumo, este capítulo mostrou que o SSi6, uma substância semissintética derivada do 6G, induz de forma eficiente a produção de ERO em células triplo negativas da linhagem MDA-MB-231, interligando dois dos processos mais importantes da morte celular: autofagia e apoptose. Foi demonstrado que o processo de apoptose independente de caspases está condicionado à iniciação do processo de autofagia. Finalmente, a ativação desses dois mecanismos de morte celular pode ser usada como uma estratégia promissora para a terapia do câncer de mama, especialmente para tumores resistentes a agentes indutores de apoptose canônica como os encontrados no câncer de mama triplo negativo.

4. CAPÍTULO 2: estudo da inibição do crescimento tumoral e disseminação metastática em modelos pré-clínicos do tipo xenográfico no câncer de mama triplo negativo

Este capítulo é uma adaptação do artigo intitulado “[6]-gingerol-derived semi-synthetic compound SSi6 inhibits tumor growth and metastatic dissemination in triple-negative breast cancer xenograft models”, publicado na revista *Cancers* (fator de impacto = 6,639; 2021) por Liany Luna-Dulcey, James Almada da Silva, Veronica Jimenez-Renard, Eduardo Caleiras, Silvana Mouron, Miguel Quintela-Fandino e Marcia R. Cominetti (anexo A, item 2). Os resultados mostrados neste capítulo foram obtidos durante o estágio de pesquisa no exterior da autora (BEPE/FAPESP; 2019/12607-3), realizado no *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas* (CNIO) na Espanha.

4.1. RESUMO DO CAPÍTULO

A metástase do câncer de mama é a causa mais comum de morte nas mulheres em todo o mundo. Os cânceres de mama triplo negativos (CMTN) formam um grupo heterogêneo de tumores que apresentam maiores taxas de recidiva e menor sobrevivência em comparação com outros subtipos de câncer de mama. Assim, neste capítulo foi estudada a atividade antitumoral e antimetastática do SSi6 em células triplo negativas MDA-MB-231 utilizando modelos pré-clínicos do tipo xenográfico, simulando dois cenários clínicos típicos de uma mulher com câncer de mama. Primeiramente foi demonstrado que o SSi6 não provocou efeitos tóxicos *in vivo*, como mostrado na avaliação do peso corporal e outros parâmetros hematológicos e histológicos. A partir do modelo xenográfico ortotópico sem ressecção do tumor primário, foi evidenciado que o SSi6 retarda o crescimento do tumor, assim como também evita a progressão metastática dos linfonodos axilares para os pulmões. Além disso, o segundo modelo xenográfico com ressecção do tumor primário mostrou que o SSi6 também bloqueia a progressão das metástases dos linfonodos para outros órgãos viscerais vitais. Em conjunto, os resultados confirmam que o SSi6 é um composto promissor a ser investigado em outros modelos pré-clínicos e clínicos, visando sua futura aplicação como terapia simples ou combinada no tratamento do CMTN.

4.2. BREVE INTRODUÇÃO

O câncer de mama metastático, também conhecido como estágio IV ou câncer de mama avançado, é responsável pelo 90% das mortes de mulheres diagnosticadas (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010; BHATT; KLOTZ, 2016). A metástase no CMTN ocorre preferencialmente em órgãos viscerais, incluindo pulmão, fígado, glândulas adrenais e o cérebro (RAKHA; CHAN, 2011; AHN et al., 2013). Assim, o desenvolvimento de novos fármacos que inibam o crescimento do tumor primário e, conseqüentemente, bloqueiem a progressão do processo de metástase para órgãos vitais é um dos maiores desafios na área. Uma outra complicação importante nesta área de pesquisa está relacionada à resistência ao tratamento e à falta de seletividade terapêutica das drogas convencionais, o que resulta em diversos efeitos colaterais (O'DRISCOLL AND M. CLYNES, 2006; LONGLEY; JOHNSTON, 2005). Neste sentido, pesquisas para o descobrimento de compostos cada vez mais seletivos para as células tumorais (menos efeitos adversos) e que sejam mais eficientes para inibir a progressão da metástase, são extremamente relevantes para o tratamento do CMTN.

Os compostos naturais ou suas variantes modificadas, como os produtos semissintéticos, têm sido amplamente utilizados para o tratamento de várias doenças, incluindo o câncer de mama (NEDUNGADI et al., 2018; DE LIMA SILVA et al., 2020). Como mostrado no capítulo anterior, o SSi6, um composto obtido pela modificação do 6G com a 2,4-DNFH, apresentou uma promissora atividade antitumoral em células MDA-MB-231 em ensaio *in vitro*. Levando isto em consideração, estudos mais aprofundados, incluindo testes pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* (do tipo xenográfico), são importantes para elucidar o papel do SSi6 na inibição da progressão simultânea de metástases a múltiplos órgãos.

4.3. MATERIAIS E METÓDOS

4.3.1. Diluição do SSi6

Para os ensaios *in vitro*, uma solução estoque de SSi6 foi preparada em 100% de DMSO, e depois foram adicionadas alíquotas convenientes ao meio de cultura para preparar diferentes concentrações de SSi6. Em todas as concentrações, a porcentagem final de DMSO foi 1% (V/V). Por outro lado, para os experimentos *in vivo*, a composição das doses de SSi6 e veículo foi de 90% de soro fisiológico + 5% de DMSO + 5% de Tween80.

4.3.2. Linhagens celulares

Todas as linhagens celulares estudadas foram fornecidas pela *American Type Culture Collection* (ATCC) e preservadas a 37 °C em uma incubadora com 5% de CO₂. As linhagens de CMTN MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-157, Hs578T, HCC1937 e CAL-120 foram mantidas em DMEM com alta glicose (Sigma-Aldrich). As outras linhagens triplo negativas BT-549, HCC1143 e HCC38 foram mantidas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich). As células embrionárias de rim humanas HEK-293T (não tumorais) foram mantidas em DMEM e usadas como controle de seletividade. Ambos os meios (DMEM e RPMI-1640) foram suplementados com 10% de FBS (Sigma-Aldrich). Estas células foram usadas nos ensaios pré-clínicos *in vitro* descritos nas próximas seções.

Finalmente, a linhagem triplo negativa de células luminescentes MDA-MB-231 (MDA-MB-231/Luc) usada nos modelos xenográficos foi gerada por transfecção estável com um plasmídeo codificador da luciferase (pGL4.51 *luciferase reporter vector*; Promega), conforme descrito por (ZAGORAC et al., 2018).

4.3.3. Estudos preliminares *in vitro*

4.3.3.1. Ensaio de viabilidade – CellTiter

O efeito do SSi6 sobre a viabilidade *in vitro* das linhagens de CMTN e das células embrionárias de rim (HEK-293T), foi determinado usando o kit *CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Assay* (Promega, EUA). As células foram semeadas (5×10^3 células/100 µL) em placas pretas de 96 poços e expostas a concentrações crescentes de SSi6 (3,12, 6,25, 12,5, 20, 25, 50 e 100 µM) durante 72 horas. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram tratadas com MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) durante 15 minutos. A luminescência foi medida usando o equipamento VICTOR *Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer) a 544 nm. O ensaio de viabilidade foi analisado em comparação com as células de controle tratadas com 1% de DMSO.

4.3.3.2. Citotoxicidade por colônias

As linhagens de CMTN foram semeadas (3×10^3 células/3000 µL) em placas de 12 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight*. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de SSi6 (5, 10, 12,5 e 15 µM) durante 10 dias contínuos. Após este período, as células foram fixadas e coradas com 0,1% (m/V) de cristal violeta em metanol 10%

(V/V) por 15 minutos. Finalmente as placas foram escaneadas para a contagem das colônias no *software* ImageJ Fiji.

4.3.4. Estudos *in vivo*

4.3.4.1. Ensaio de toxicidade aguda e tolerância

Os animais utilizados neste estudo foram fornecidos pelo biotério do *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas* (CNIO). Todos experimentos *in vivo* foram aprovados pelo comitê de ética do CNIO e realizados seguindo as diretrizes estabelecidas pela *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* desenvolvidas pelo *Council for International Organizations of Medical Sciences* (PROEX 387/15).

Animais: os camundongos usados nestes experimentos foram fêmeas *Wild Type* da linhagem FVB (suscetíveis à leucemia do vírus B; *Mus musculus*) de 6-8 semanas e com massa corporal de 20 ± 1 g. Os animais foram mantidos em um ambiente climatizado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclos de 12 horas de luz/escuro com acesso *ad libitum* a ração e água.

Grupos: os animais foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada ($n = 5$) e classificados da seguinte forma: **grupo 1** – veículo (90% soro fisiológico + 5% DMSO + 5% Tween80); **grupo 2** – SSi6 5 mg/kg; **grupo 3** – SSi6 10 mg/kg e **grupo 4** – SSi6 15 mg/kg. As doses do veículo e do SSi6 foram administradas via intraperitoneal (i.p.: 100 μL) três vezes por semana, totalizando 4 semanas (1 mês) de tratamento.

Medições e registros durante o experimento: após da administração de cada dose, foi mensurada a massa corporal em balança eletrônica para registrar qualquer mudança. Além disso, durante estes procedimentos, análises comportamentais e condutais foram realizadas para verificar possíveis sinais de sofrimento e/ou dor decorrentes da administração do composto. As condutas analisadas foram: perda de locomoção, postura defensiva, diarreia, inapetência, perda aparente de massa corporal, mudanças na respiração, piloereção, mudanças na posição das orelhas ou morte. Estes e outros comportamentos foram registrados diariamente e de forma individual.

Coleta de sangue periférico: antes da eutanásia, amostras de sangue ($\sim 50 \mu\text{L}$) foram coletadas por punção facial/submandibular em tubos revestidos com EDTA (BD Biosciences, Vacutainer). Alíquotas ($\sim 3 \mu\text{L}$) de sangue de cada animal foram depositadas em lâminas de microscopia para realizar um esfregaço de sangue periférico. As lâminas foram secas naturalmente e, em seguida, fixadas com metanol absoluto por 3 minutos antes de serem coradas

com May Grundwald Giemsa, para verificar possíveis alterações nas células sanguíneas pelo tratamento. As imagens foram capturadas no microscópio ZEISS AXIO Imager.M2.

Eutanásia: os camundongos foram eutanasiados em câmaras de inalação de CO₂. Em seguida, os órgãos (intestino grosso e delgado, fêmur/medula óssea, coração, baço, fígado e rins) foram coletados, pesados e analisados macroscopicamente. Finalmente, os órgãos foram mantidos em formalina tamponada 10% para as análises histológicas.

4.3.4.2. Análises histológicas

Os órgãos coletados foram submetidos a um procedimento histológico compreendendo os seguintes estágios: desidratação (álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III), clarificação (xilol I e xilol II) e impregnação (parafina I e parafina II). Posteriormente, os órgãos foram embebidos em parafina e cortados longitudinalmente (espessura de 5 µm) para o processo de coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para sua análise morfológica e estrutural. As imagens das lâminas foram capturadas no Microscópio ZEISS AXIO Imager.M2 e analisadas pelo patologista da unidade de histopatologia do CNIO.

4.3.4.3. Modelo xenográfico ortotópico - sem ressecção do tumor primário

Neste modelo foi avaliado a inibição do crescimento tumoral e a formação de metástases espontâneas. Camundongos da linhagem *Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu* com 6 semanas de idade foram adquiridos dos laboratórios *Charles River* na França. As células MDA-MB-231/Luc (1×10^6 células) foram ressuspendidas em 50 µL de PBS e matrigel (1:1 V/V) e injetadas no tecido mamário subcutâneo direito entre a quarta e quinta mamas.

Grupos: quando o volume do tumor foi de aproximadamente 200 mm³ (para simular o estágio IIIA/doença localmente avançada), os camundongos foram aleatoriamente divididos em grupos de seis animais cada (n = 6) como segue: **grupo 1** – veículo (90% soro fisiológico + 5% DMSO + 5% Tween80) e **grupo 2** – SSi6 15 mg/kg. Durante o experimento, os animais foram mantidos a temperatura constante (24 °C) sob um ciclo de 12 horas de luz/escuro em gaiolas ventiladas individualmente e equipadas com filtros especiais de entrada controlada de umidade e gases.

Administração das doses, medições e registros durante o experimento: as doses foram administradas cinco vezes por semana via intraperitoneal (i.p.: 100 µL) totalizando 25 dias de tratamento. A massa corporal e o crescimento do tumor primário foram monitorados três vezes por semana com auxílio de uma balança eletrônica e um paquímetro digital, respectivamente. Os volumes tumorais foram calculados usando a seguinte equação 1 (ZAGORAC et al., 2018):

$$V (\text{mm}^3) = \frac{(D-d^2)}{2} \quad (1)$$

Onde **D** e **d** correspondem ao maior e menor diâmetro do tumor medido, respectivamente. Além disso, a porcentagem de inibição do crescimento tumoral (% ICT) foi calculada de acordo com a equação 2:

$$\text{ICT} (\%) = [1 - (\text{T}_F/\text{T}_0)_A/(\text{T}_F/\text{T}_0)_V] \times 100 \quad (2)$$

Onde **T_F** e **T₀** referem-se às medidas do volume nos tempos final e inicial, respectivamente. **A** corresponde ao grupo do SSi6 e **V** ao veículo (NAVARRO et al., 2016). As análises de bioluminescência *in vivo* executadas no equipamento *In Vivo Imagen System (IVIS) spectrum* foram realizadas uma vez por semana para analisar as metástases formadas nos linfonodos axilares e na área do tórax (detalhes serão descritos na seção de Bioluminescência *in vivo*). Antes da eutanásia, amostras de sangue foram coletadas via facial/submandibular e analisadas no contador hematológico LaserCell (CVM-LaserCell HT5). Finalmente, os animais foram eutanasiados em câmaras de inalação de CO₂ quando o volume do tumor atingiu o ponto final humano 1500 mm³ (diretrizes institucionais estabelecem eutanásia obrigatória quando os tumores crescem >1000 mm³) (NIH, 2000) ou em sinal de dor/angústia e os órgãos (pulmão, coração, baço, fígado e rins) foram coletados para sua posterior análise por bioluminescência *ex vivo* e histopatologia (vide seções 4.3.4.6 Bioluminescência *ex vivo* dos órgãos e 4.3.4.7 Análises histopatológicas).

4.3.4.4. Modelo xenográfico de metástase - com ressecção do tumor primário

Similar ao modelo anterior, as células MDA-MB-231/Luc (1×10⁶ células) foram ressuspendidas em 50 µL de PBS e matrigel (1:1; V/V) e injetadas no tecido mamário subcutâneo entre a quarta e quinta mamas.

Grupos: quando o volume do tumor atingiu ~500 mm³, os camundongos foram anestesiados com isoflurano (2-4%) em O₂ e os tumores foram ressecionados usando uma técnica de sutura de pontos interrompidos simples com fios de polipropileno 7.0. Após a ressecção, os animais foram aleatoriamente separados em dois grupos como segue: **grupo veículo** (n = 11) e **grupo SSi6** 15 mg/kg (n = 15). Todos os animais receberam analgesia com buprenorfina (0,1 mg/kg; 100 µL) via subcutânea cada 8 horas durante 3 dias.

Administração das doses, medições e registros durante o experimento: após uma semana de recuperação dos animais, o tratamento foi administrado cinco vezes por semana (i.p.; 100 µL). A massa corporal foi monitorada três vezes por semana antes, durante e após a ressecção

do tumor primário. Além disso, durante o experimento, a medida da bioluminescência *in vivo* foi realizada uma vez por semana para analisar metástases formadas no segmento superior (linfonodos axilares e área tórax) e no segmento inferior (área abdominal/recidiva do tumor primário) dos animais. Os camundongos foram eutanasiados em câmaras de CO₂ assim que mostraram sinais de dor/angústia. Os órgãos coletados (pulmão, coração, baço fígado, rins e linfonodos axilares) foram analisados por bioluminescência *ex vivo* e por histopatologia (vide seções correspondentes).

4.3.4.5. Imagens de bioluminescência *in vivo*

As análises de bioluminescência *in vivo* foram realizadas utilizando o sistema *Xenogen* IVIS-200. Para isto, os camundongos foram injetados via intraperitoneal com 200 µL de D-luciferina (15 mg/mL; BioThema BT11-1000K) e anestesiados com isoflurano 2-4% inalado em O₂. Para visualizar de forma adequada os linfonodos axilares e as metástases na área torácica (pulmão) no modelo xenográfico ortotópico, a alta luminescência emitida pelo tumor primário foi bloqueada com o auxílio de um material preto, quantificando somente os sinais emitidos pelas regiões de interesse (ROI) (DE CAMARGO et al., 2020). O *software Living Image* 4.7.3 foi usado para calcular e integrar o sinal luminescente de cada ROI. Finalmente, o valor do fluxo total (fótons/segundo) nas ROI de cada animal, foi determinado pela diferença entre o valor do fluxo total calculado pelo *software* e o valor do fluxo total de um camundongo controle (sem tumor) injetado com luciferina.

4.3.4.6. Bioluminescência *ex vivo* dos órgãos

Antes da eutanásia, 200 µL de D-Luciferina (15 mg/mL) foram injetados via intraperitoneal nos camundongos. Após 5 minutos de distribuição do substrato, os camundongos foram eutanasiados em câmaras de CO₂, e em seguida, os órgãos (baço, fígado, rins e pulmões) foram rapidamente removidos e analisados usando o sistema IVIS *Spectrum* série 200 (*Xenogen*) durante 1 minuto.

4.3.4.7. Análise histopatológica dos órgãos

Estas análises foram realizadas com o intuito de confirmar a presença de células tumorais nos órgãos coletados após a eutanásia. A preparação dos órgãos coletados para as análises histopatológicas, bem como a coloração com H&E, foram realizadas seguindo o procedimento descrito na seção 4.3.4.2 (Análises histológicas). Além destas análises, os linfonodos axilares dos animais avaliados no segundo modelo foram examinados para a

detecção específica das células tumorais de mama por imuno-histoquímica (IHC) utilizando o anticorpo anticitoqueratina (CK, clone AE1/AE3; Dako, IR053, 1:100).

4.3.5. Análises estatísticas

Cada experimento *in vitro* foi realizado de forma independente e em triplicata para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. As análises estatísticas foram realizadas usando *one-way* (nível de p aceitável $<0,05$), seguida do pós-teste de Bonferroni que compara todos os grupos com o controle. Para os gráficos de sobrevida *in vivo*, os grupos foram calculados pelas comparações das curvas de Kaplan-Meier, e os valores de p foram derivados do teste de *log-rank* (ou *Mantel-Cox test*). Os modelos xenográficos foram comparados usando o teste *t-student* no *software* GraphPad Prism[®] (versão 7.0). Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

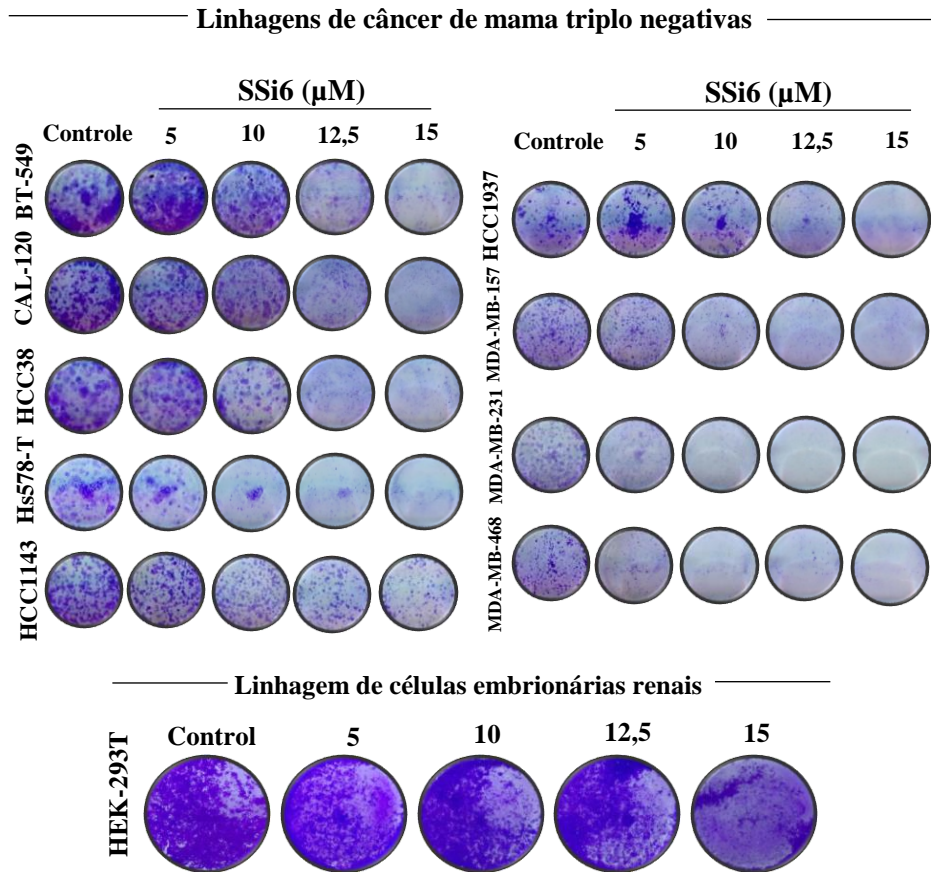
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Efeitos do SSi6 na citotoxicidade e viabilidade das linhagens de CMTN: ensaios *in vitro*

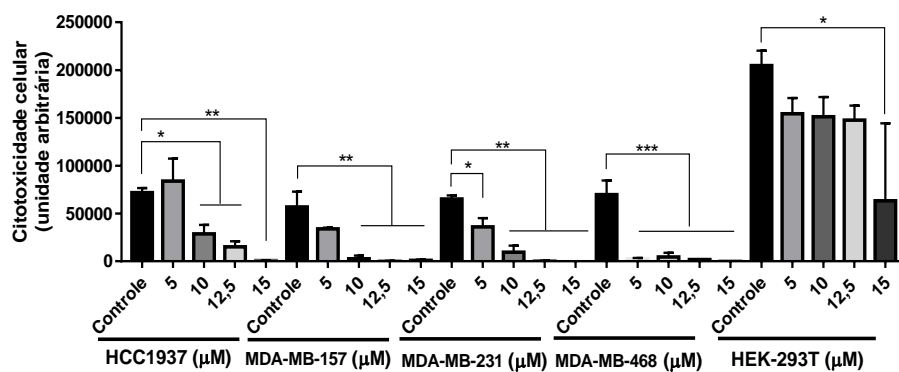
Primeiramente, foram realizados ensaios de colônias para determinar a atividade citotóxica do SSi6 em diferentes linhagens triplo negativas. Neste caso, as células foram mantidas com o tratamento durante 10 dias contínuos para determinar sua resistência frente ao SSi6 e sua capacidade de formar colônias. Assim, e considerando os resultados apresentados nas Figuras 15A e B, foi evidenciado que o número de colônias diminuiu significativamente em todas as linhagens triplo negativas (principalmente nas maiores concentrações de SSi6) em comparação com o controle negativo (células não tumorais de rim, HEK-293T). É importante destacar que os efeitos citotóxicos do SSi6 são mais significativos nas linhagens MDA (MDA-MB-157, MDA-MB-231 e MDA-MB-468), pois estas mostraram-se mais sensíveis em todas as concentrações testadas (5, 10, 12,5, e 15 μ M) quando comparadas às outras linhagens.

Figura 15 – SSi6 induz efeitos citotóxicos em um painel de células triplo negativas de câncer de mama (CMTN). (A) As células de CMTN foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com as concentrações indicadas durante 10 dias contínuos. (B) Os gráficos representam as unidades relativas da citotoxicidade do SSi6 nas células de CMTN. HEK-293T é uma linhagem de células renais embrionárias humanas, usada como controle negativo de seletividade. Os dados representam a média (\pm DP) de três ensaios independentes. Os resultados foram comparados usando *one-way* ANOVA, seguido pela análise de Bonferroni; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ vs controle.

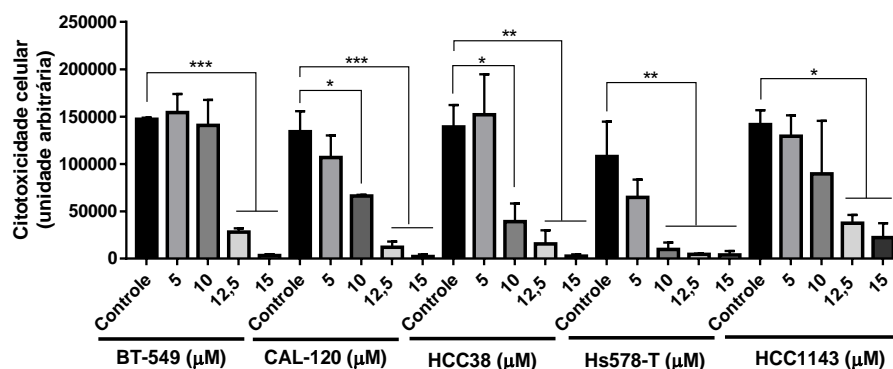
A)



B)



– Continuação **Figura 15**



Para complementar estes resultados, foi realizado um ensaio de viabilidade celular para determinar os valores IC_{50} do SSi6 nas células de CMNT. Neste caso, o tratamento com SSi6 causou uma diminuição significativa na viabilidade celular da MDA-MB-231 ($IC_{50} = 14,5 \mu M$) em comparação com outras linhagens triplo negativas, bem como com as células embrionárias de rim HEK-293T ($IC_{50} = 30,2 \mu M$) utilizadas como controle de seletividade (vide Tabela 4). Estes resultados concordam com os mostrados no capítulo anterior, em que o SSi6 apresentou maior atividade citotóxica na MDA-MB-231 ($IC_{50} = 22,90 \pm 0,35 \mu M$) em comparação com as células não tumorais de mama MCF-10A ($IC_{50} = 34,17 \pm 2,49 \mu M$) e com as células epiteliais de mama humano HMEC ($IC_{50} = 35,56 \pm 0,7 \mu M$). Por outro lado, o SSi6 mostrou um bom índice de seletividade frente à linhagem MDA-MB-231 ($IS = 2,08$), sendo recomendado um IS aceitável para uso farmacológico acima de 2,0 (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021). Deste modo, e tendo em conta que o SSi6 mostrou maior citotoxicidade na linhagem MDA-MB-231, os resultados apresentados nas próximas seções referem-se ao efeito do SSi6 somente nesta linhagem tumoral.

Vale ressaltar que os efeitos citotóxicos do SSi6 têm sido somente estudados por nosso grupo de pesquisa e, portanto, não existem evidências prévias que demonstrem os efeitos *in vitro* e *in vivo* do SSi6. Neste sentido, os resultados deste trabalho foram comparados com outros estudos pré-clínicos que demonstraram o papel terapêutico do 6G, composto base para a síntese do SSi6.

Vários estudos têm reportado o potencial citotóxico do 6G em distintas linhagens tumorais. Dentre estes, Xu *et al.* demonstraram a atividade do 6G em altas concentrações (10, 30, e 50 μM) em linhagens tumorais renais. Este trabalho mostrou que 6G inibiu o crescimento de colônias de forma dependente da concentração (7 dias de tratamento) nas células ACHN, 786-O e 769-P, principalmente em 30 e 50 μM (XU et al., 2020). Além disso, outro estudo de

Luo e colaboradores, mostrou o efeito da combinação do 6G (300 μM) com radiação ionizante para melhorar a atividade antitumoral do composto frente à linhagem de carcinoma gástrico humano HGC-27. Apesar da radiosensibilização das células, o valor de IC_{50} do 6G foi alto (386,3 μM) após 48 horas de tratamento (LUO et al., 2018). Claramente, nossos estudos mostram que o SSi6 é muito mais ativo que seu análogo 6G não modificado, visto que apresenta mesmo em baixas concentrações, melhor atividade citotóxica, evidenciada pela inibição da formação de colônias nas linhagens de CMTN, especialmente nas MDA-MB-231, MDA-MB-157, e MDA-MB-468. Além disso, os valores de IC_{50} calculados foram significativamente menores, demonstrando também a seletividade do SSi6 contra as células tumorais de mama.

Tabela 4 – Valores IC_{50} do SSi6 nas linhagens de CMTN após 72 horas de tratamento.

$\text{IC}_{50} \pm \text{DP}^*$ (μM)	
MDA-MB-231	14,5 \pm 2,4
MDA-MB-468	29,5 \pm 2,9
MDA-MB-157	28,5 \pm 0,8
CAL-120	27,9 \pm 3,3
HCC1937	26,1 \pm 1,9
Hs578.T	23,1 \pm 1,1
BT-549	20,2 \pm 0,6
HCC1143	30,6 \pm 1,2
HCC38	28,9 \pm 1,9
HEK-293T**	30,2 \pm 1,8
IS***	2,08

*Desvio padrão

**Linhagem de células embrionárias renais humanas

***Índice de seletividade = $\text{IC}_{50}\text{HEK-293T}/\text{IC}_{50}\text{MDA-MB-231}$

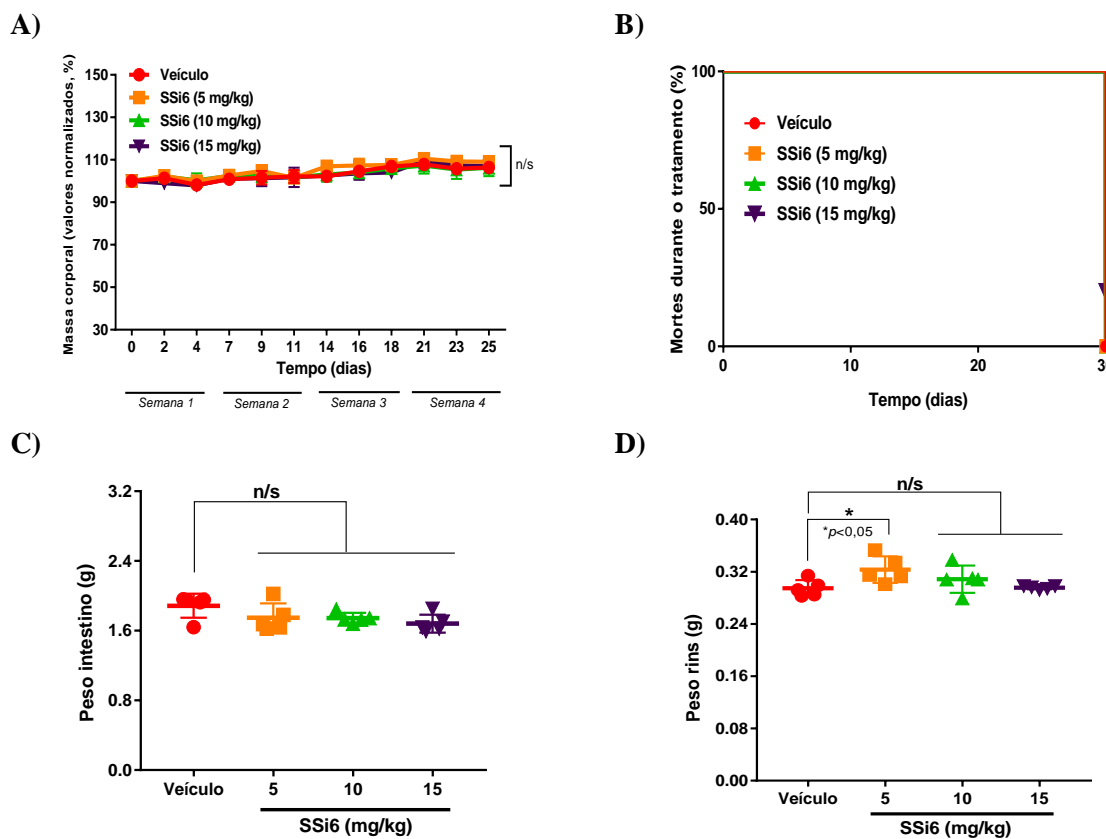
4.4.2. Toxicidade aguda das doses do SSi6 *in vivo*

Antes da realização de pesquisas clínicas de novos compostos antitumorais com resultados promissores *in vitro*, se faz necessário a realização de ensaios exaustivos para testar sua eficácia e segurança. Nesse sentido, os testes pré-clínicos que usam modelos animais são muito relevantes para determinar a dose ideal do composto a ser aplicada, ou seja, a dose com a melhor relação eficácia-segurança (CARNEIRO et al., 2015). Desta forma, a toxicidade aguda de diferentes doses (5, 10 e 15 mg/kg) do SSi6 em camundongos fêmeas selvagens (*wild type*) da linhagem FVB foi analisada usando como parâmetros avaliativos a massa corporal, indicadores hematológicos, alterações histológicas em vários órgãos, sinais físicos de dor/angústia e mortes no decorrer do experimento.

Analisando-se a Figura 16A, observamos que o SSi6 não provocou a diminuição da massa corporal em nenhuma das doses testadas. Os valores da massa corporal dos animais foram normalizados, pois os grupos veículo e 15 mg/kg iniciaram com pesos inferiores. Por outro lado, não foram observadas mortes durante o tratamento, mesmo na maior dose do SSi6

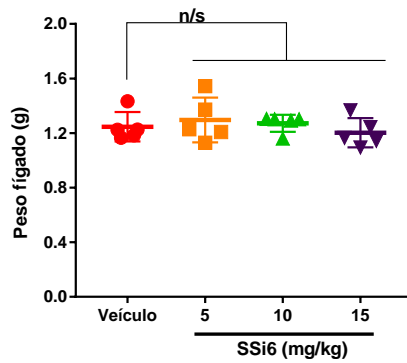
(15 mg/kg) (Figura 16B). Além disto, parâmetros como o aumento de peso ou tamanho dos órgãos específicos também foram considerados como sinais de toxicidade. Para tal, vários órgãos foram coletados (intestino, rins, fígado, baço, coração e fêmur) e pesados no dia da eutanásia para descartar *megalias* que poderiam ser causadas pela administração do SSi6. Conforme observado nas Figuras 16C a H, não houve um aumento significativo no peso dos órgãos dos animais tratados com as doses de SSi6 em comparação ao grupo controle (veículo), exceto para os rins da dose de 5 mg/kg de SSi6 nos quais houve uma diferença estatística significativa ($*p < 0,05$; vide Figura 16D).

Figura 16 – As doses do SSi6 não provocam efeitos tóxicos *in vivo*. Os camundongos fêmeas FVB foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos ($n = 5$ /por grupo) e tratados com diferentes doses de SSi6 (5, 10, e 15 mg/kg) e veículo. (A) Durante o experimento, a massa corporal foi monitorada desde o início do experimento até o dia da eutanásia. (B) Registro de mortes durante o tratamento foi monitorado. Na eutanásia, o valor do peso dos órgãos como (C) intestino, (D) rins, (E) fígado, (F) baço, (G) coração, e (H) fêmur, foi registrado para descartar qualquer *megalia* causada pelo tratamento. Os resultados foram comparados usando *one-way*, seguida pela análise post-hoc de Bonferroni. $*p < 0,05$ vs grupo controle (veículo). (I) Fotomicrografias de esfregaços de sangue periféricos dos camundongos FVB fêmeas que receberam tratamento com o veículo e as doses de SSi6 indicadas (barra de escala = 400 μ m).

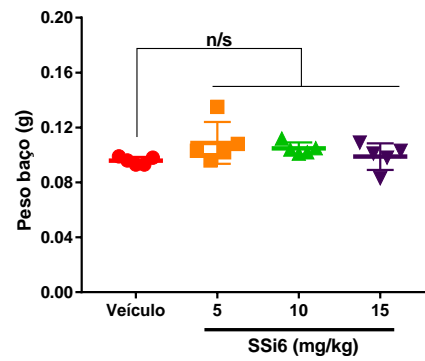


– Continuação **Figura 16**

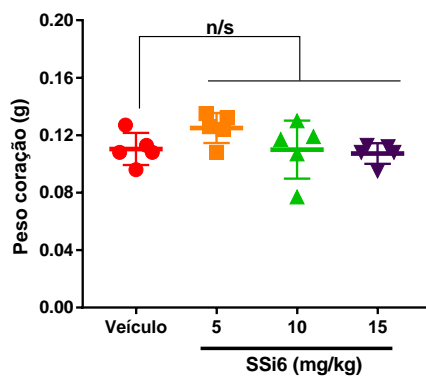
E)



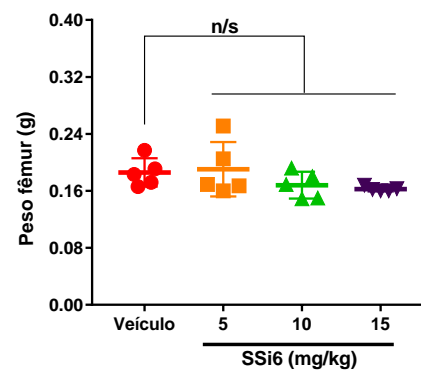
F)



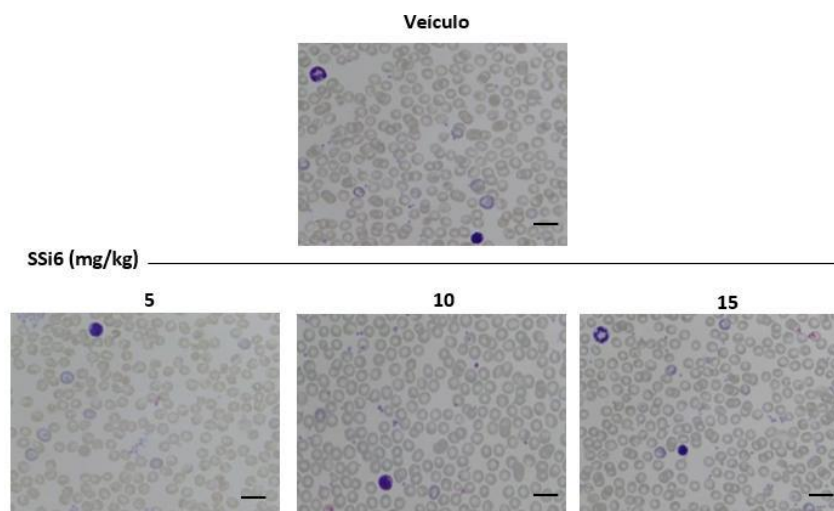
G)



H)



I)



Por outro lado, é importante mencionar que não foram observadas mudanças macroscópicas (cor ou morfologia) dos órgãos após tratamento com as doses de SSi6 (imagens não mostradas). Adicionalmente, após a administração das doses, os animais foram examinados individualmente para identificar possíveis alterações comportamentais decorrentes do tratamento com o composto. Em relação a isto, não foram observados sinais clínicos e nem físicos de toxicidade, tais como diarreia, ataxia, espasmos, sangramento, vômitos, dispneia,

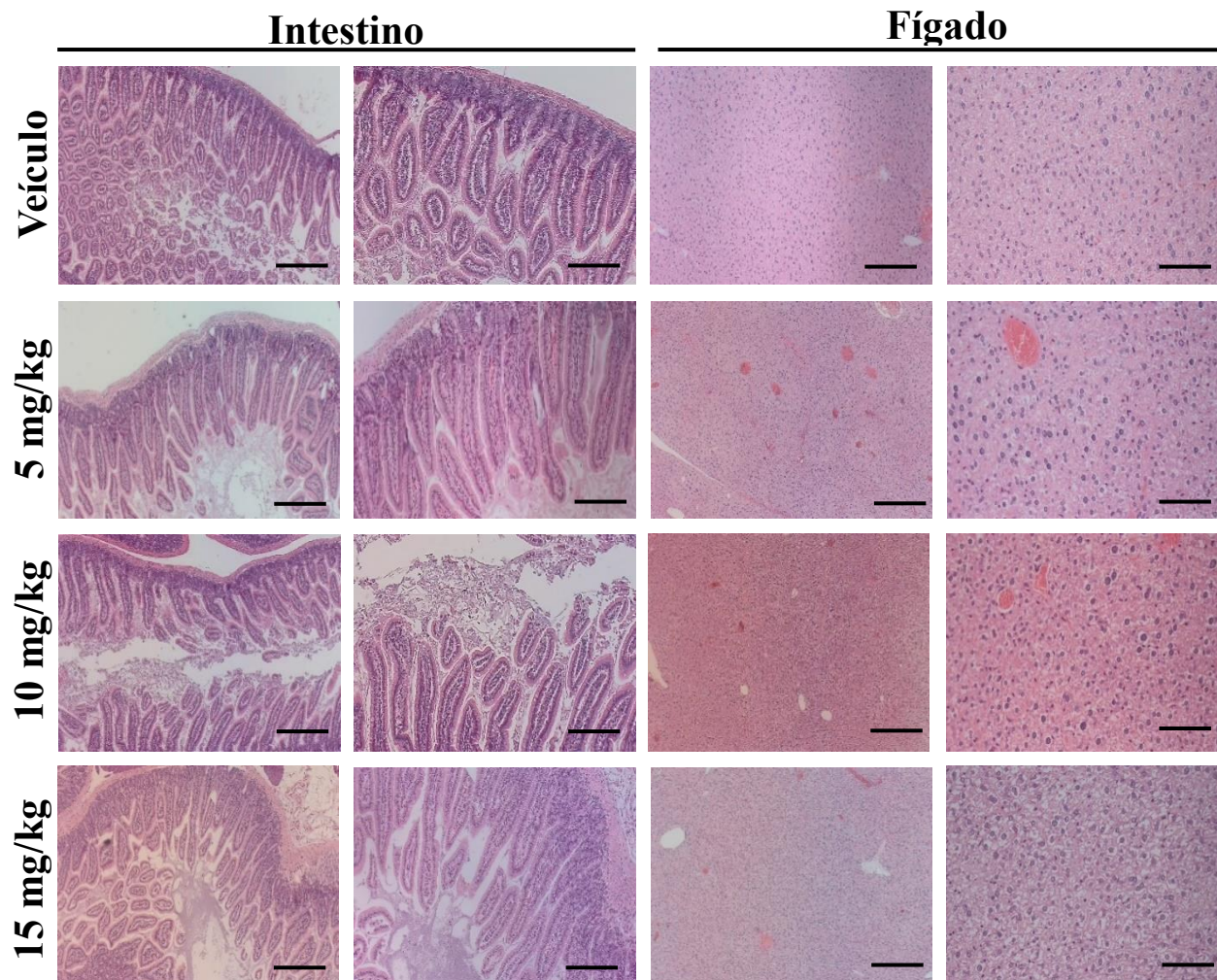
mudanças nos padrões condutais (falta de asseio, apetite, hipoatividade e postura agressiva) e morte na gaiola durante o tempo total de experimento (4 semanas). O mesmo resultado foi observado na análise do esfregaço de sangue periférico, ou seja, não foi evidenciada nenhuma alteração significativa nas análises das células sanguíneas (basófilos, eosinófilos, neutrófilos plaquetas e glóbulos vermelhos) após o tratamento com o composto.

De acordo com as análises histológicas das lâminas coradas com H&E não foram observadas alterações morfológicas e nem estruturais significativas entre os órgãos coletados (intestinos, fígado, baço, rins, coração e fêmur/medula óssea) dos animais tratados do grupo veículo com os grupos do SSi6 (Figura 17). Contudo, pequenas alterações no coração (pequena infiltração adiposa subendocárdica) e na medula óssea (alguns megacariócitos hiposegmentados) foram encontradas em alguns camundongos de ambos os grupos (vide setas pretas na Figura 17).

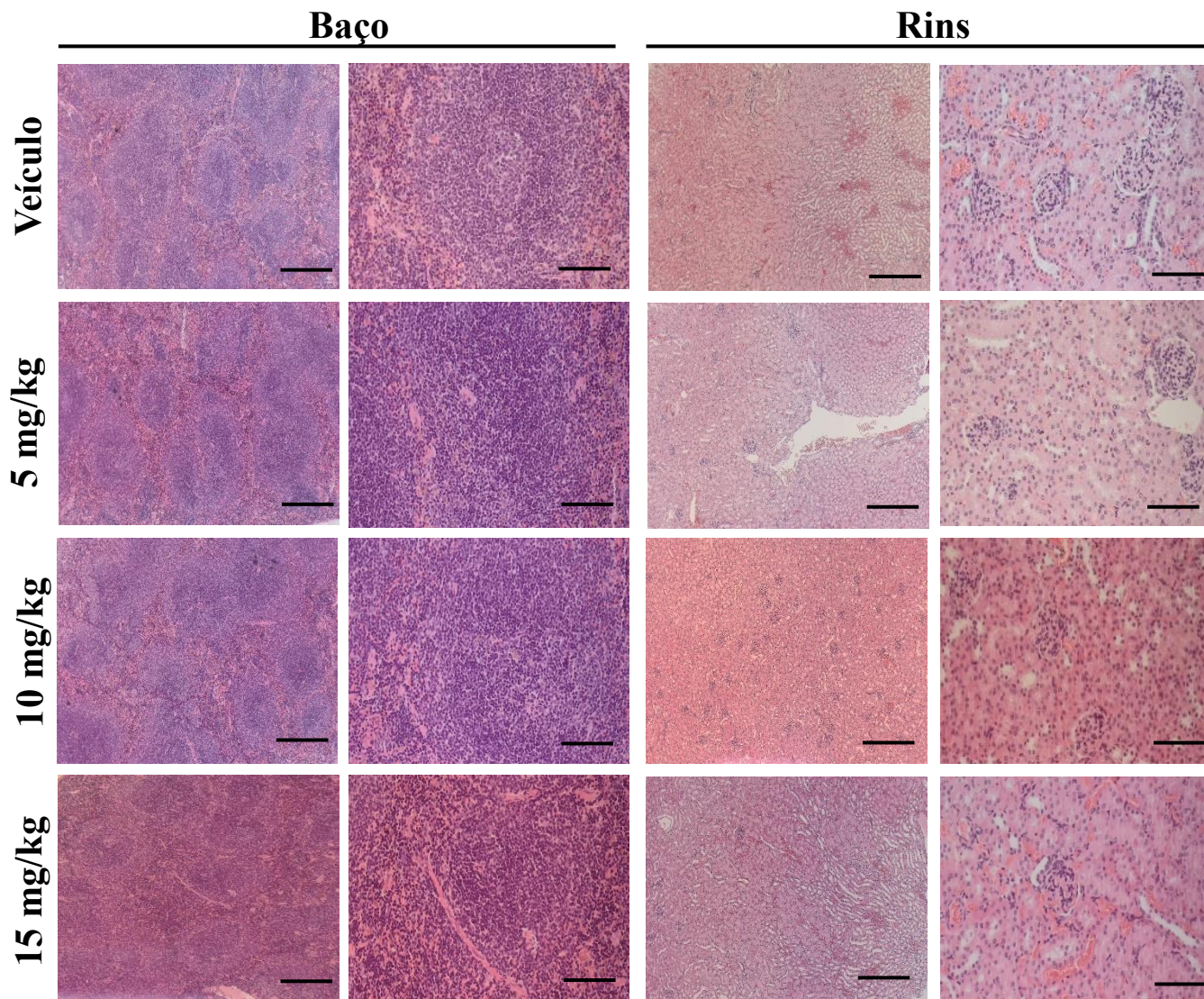
Estudos da literatura têm mostrado e relatado a baixa toxicidade aguda do 6G em modelos animais. Dentre estes, Rastogi e colaboradores demonstraram que doses do 6G (2,5 e 5 mg/kg) não alteraram o peso corporal de camundongos imunossuprimidos em um modelo xenográfico usando células tumorais HeLa. No mesmo estudo, as análises das enzimas alanina aminotransferase e da aspartato aminotransferase concluíram que 6G não é hepatotóxico para os animais (RASTOGI et al., 2015). De acordo com os nossos resultados, este trabalho mostrou resultados similares ao analisar a histopatologia e parâmetros sanguíneos, mostrando que o SSi6 não causa efeitos tóxicos nos camundongos da linhagem FVB, mesmo na maior dose de 15 mg/kg. Isto sugere que a modificação na estrutura molecular do 6G para sintetizar o SSi6 não tem influência na toxicidade aguda do composto, porém, tem um efeito muito importante no aumento da sua seletividade e dos seus efeitos citotóxicos nas células de CMTN.

Tomados todos esses dados em conjunto e sob as condições deste estudo, as doses de SSi6 não mostraram nenhum efeito tóxico por via intraperitoneal *in vivo*. Isto indica que SSi6 tem uma toxicidade relativamente baixa, a qual é uma característica indispensável de novos candidatos a fármacos. Além disso, os resultados obtidos nestes experimentos são muito relevantes para escolher a dose adequada a ser utilizada nos próximos estudos pré-clínicos. Neste caso, a dose de 15 mg/kg foi selecionada para realizar os seguintes experimentos relacionados com os modelos do tipo xenográfico, como pode ser visto nas próximas seções.

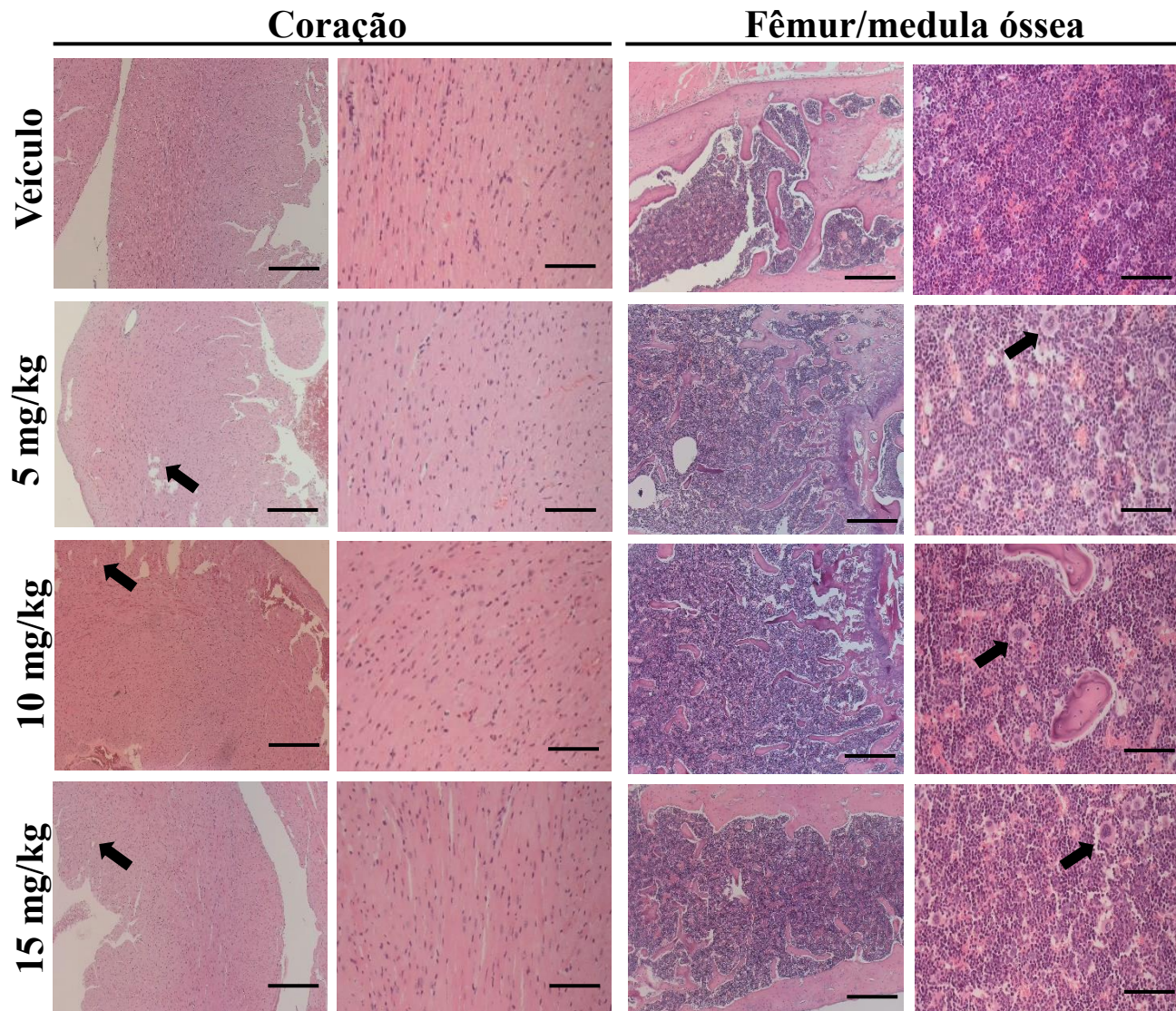
Figura 17 – SSi6 não provoca alterações morfológicas significativas em tecidos. Camundongos fêmeas da linhagem FVB foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=5/por grupo) e tratados com diferentes doses de SSi6 (5; 10, e 15 mg/kg) e veículo (5% DMSO + 5% Tween 80 + 90% soro fisiológico). Fotomicrografias representativas coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) do intestino, fígado, baço, rim, coração e medula óssea de camundongos fêmeas foram capturadas. As setas indicam alguns focos de infiltração de tecido adiposo subendocárdico no coração e alguns megacariócitos hiposegmentados na medula óssea. As imagens foram analisadas e capturadas com o microscópio ZEISS AXIO Imager.M2, barra de escala = 200 µm (baixo aumento) e 50 µm (alto aumento).



– Continuação **Figura 17**



– Continuação **Figura 17**



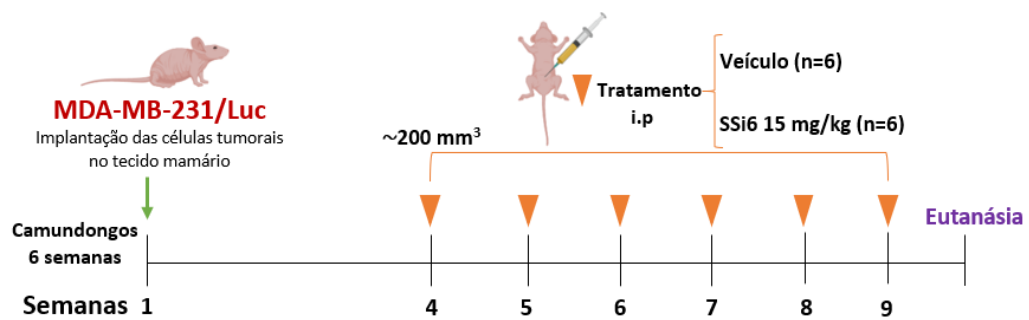
4.4.3. Estudo da inibição do crescimento do tumor primário e da progressão espontânea metastática das células MDA-MB-231 no modelo xenográfico ortotópico

O modelo pré-clínico ortotópico do tipo xenográfico foi realizado com o intuito de determinar a atividade do SSi6 (15 mg/kg) sobre a inibição do tumor primário, além de avaliar os efeitos sobre as possíveis metástases espontâneas produzidas. Um ponto importante deste modelo sem ressecção do tumor primário, é o fato de permitir a instalação/estabelecimento de metástases nos linfonodos axilares, simulando o cenário cotidiano de uma mulher com câncer de mama neste estágio. Diferente dos estudos *in vitro*, aqui foi utilizada a linhagem modificada MDA-MB-231/Luc, que expressa a enzima luciferase para avaliar a presença de metástases por bioluminescência tanto *in vivo* como *ex vivo*. Primeiramente, as células MDA-MB-231/Luc foram transplantadas cirurgicamente no tecido mamário entre a quarta e quinta mamas de forma subcutânea, e os tratamentos foram iniciados quando o volume do tumor atingiu $\sim 200 \text{ mm}^3$. Na Figura 18A é mostrada um esquema deste processo. A dose de SSi6 definida (15 mg/kg) é equivalente a 1,21 mg/kg em humanos (dosagem equivalente humana; DEH). Este valor também pode ser expresso em função da área de superfície de um ser humano médio (considerando 60 kg e 1,62 m² como peso e altura, respectivamente), obtendo-se um valor DEH de 45 mg/m² (NAIR; JACOB, 2016). Estes cálculos permitem realizar uma aproximação mais real sobre o uso desta dose de SSi6 em futuros modelos clínicos.

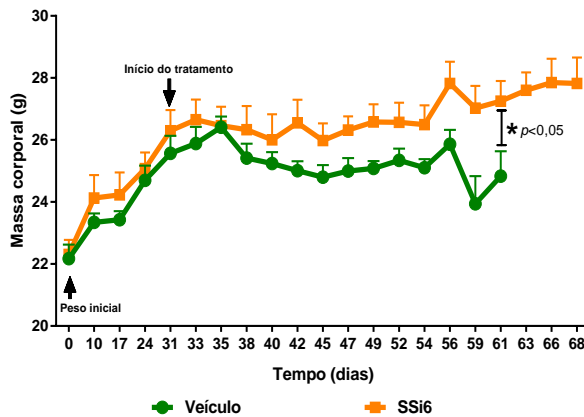
Analisando o gráfico da massa corporal dos grupos, conforme apresentado na Figura 18B, é observada uma diminuição significativa no grupo veículo, quando comparado com o grupo tratado com SSi6. Além disso, como mostrado nas curvas de sobrevida de Kaplan-Meier (Figura 18C), o grupo veículo ($*p < 0,05$) apresentou uma maior mortalidade do que o grupo tratado. Cabe ressaltar que os camundongos do grupo veículo chegaram mais rapidamente ao ponto final humano do tumor primário (1500 mm^3) e, portanto, foram eutanasiados quando atingiram tal valor. De acordo com os volumes tumorais medidos foi calculado (ICT; equação 2) que o grupo tratado com SSi6 teve uma redução parcial de $\sim 13\%$ no crescimento do volume tumoral (Figura 18D) em relação ao grupo veículo. Esses resultados podem ser atribuídos à já conhecida atividade citotóxica do SSi6 nas células MDA-MB-231, como demonstrado *in vitro* neste estudo, bem como no Capítulo 1 desta tese.

Figura 18 – SSi6 retarda o desenvolvimento de tumores e metástases espontâneas nos linfonodos axilares e na área torácica em um modelo xenográfico ortotópico. **(A)** As células MDA-MB-231/Luc (1×10^6) foram injetadas no tecido mamário subcutâneo de cada camundongo fêmea *Athymic Nude* de 6 semanas. Quando o volume dos tumores atingiu 200 mm^3 , os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos ($n=6$ /por grupo). Então, o grupo veículo (90% soro fisiológico, 5% DMSO e 5% Tween80) e SSi6 15 mg/kg foram injetados 5 vezes por semana por via intraperitoneal. **(B)** Peso corporal medido três vezes por semana desde o início até o final do experimento. $*p < 0,05$; teste *t-student*. **(C)** Curva de sobrevivência Kaplan-Meier de camundongos tratados com o veículo ou SSi6 15 mg/kg. A sobrevivência foi calculada a partir do início do tratamento. Diferenças estatísticas ($*p < 0,05$) entre o grupo tratado com a dose SSi6 e o grupo veículo (teste *log-rank*). **(D)** O volume tumoral foi medido três vezes por semana. A inibição do crescimento tumoral (ICT) foi calculada como T_f : ponto de tempo final (volume) e T_0 : ponto de tempo inicial (volume) do SSi6 e do grupo veículo. A ICT quantificada foi de 12,95%. **(E)** Imagens representativas do grupo veículo e SSi6 com metástases espontâneas em linfonodos axilares e área torácica durante a primeira até a última semana de tratamento. Os tumores primários foram cobertos para permitir a visualização de pequenos focos metastáticos. **(F)** Quantificação das metástases espontâneas nos linfonodos axilares e no tórax foram medidas pelo fluxo total de bioluminescência em fótons/segundos.

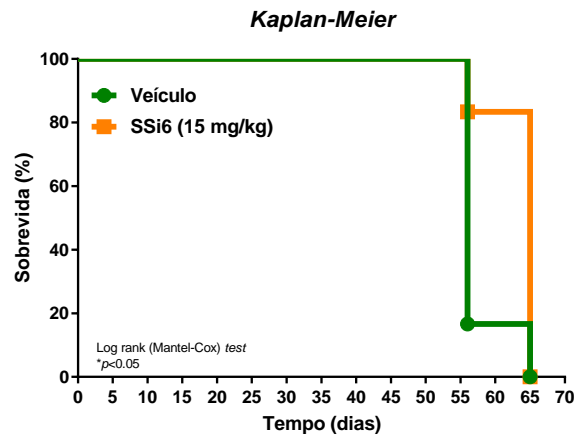
A)



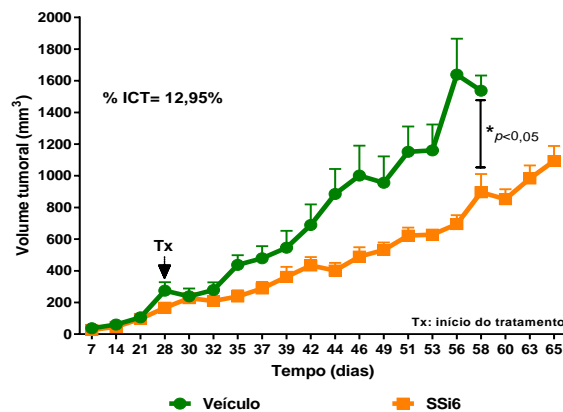
B)



C)

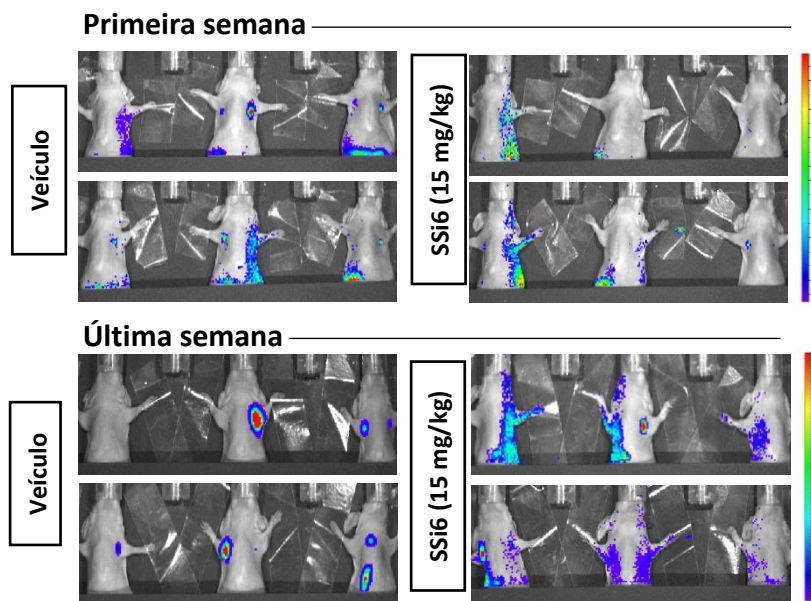


D)

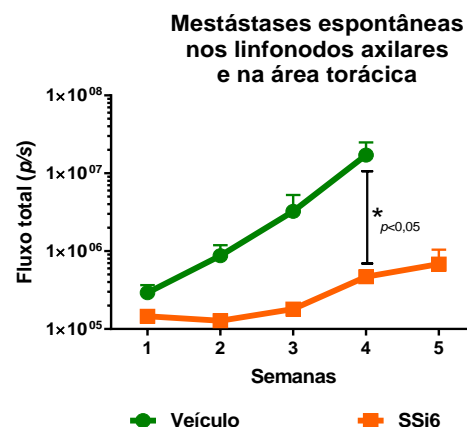


– Continuação **Figura 18**

E)



F)

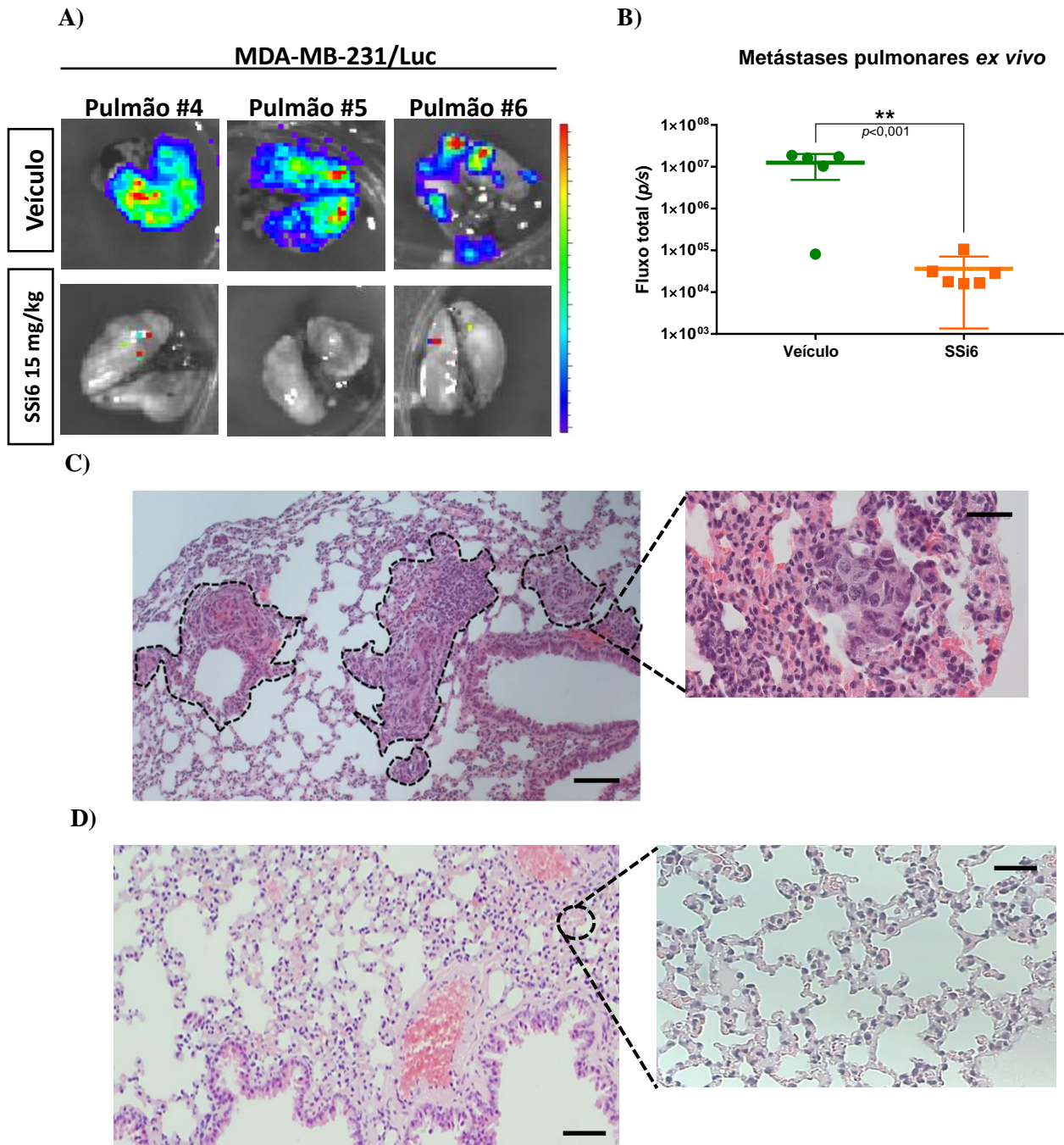


Por outro lado, análises *in vivo* de bioluminescência foram realizadas uma vez por semana para avaliar se a dose de SSi6 poderia inibir a progressão das metástases formadas espontaneamente a partir do tumor primário para os linfonodos axilares (doença metastática localmente avançada/estágio IIIA) até a região torácica (relacionada às metástases pulmonares). A Figura 18E mostra os camundongos de ambos os grupos tratados na primeira e última semana do experimento (imagens de bioluminescência realizadas no animal controle durante todo o ensaio encontram-se no Anexo B, Figura B1-A). O grupo veículo teve uma maior incidência de formação de metástases nos linfonodos axilares e na área torácica em comparação com os animais tratados com SSi6. Neste caso, o SSi6 causou um aparente bloqueio da progressão das metástases a partir dos linfonodos axilares até a área torácica, que inclui os pulmões (imagens capturadas ao longo do tratamento encontram-se na Figura B2-A do anexo B). Além disso, a representação quantitativa das bioluminescências da Figura 18F mostra claramente que não houve inibição da progressão metastática nos animais do grupo veículo.

Para complementar os resultados da progressão metastática, foram realizadas análises de bioluminescência *ex vivo* em diferentes órgãos viscerais vitais, tais como pulmão (órgão pelo qual as células MDA-MB-231 tem maior afinidade), baço, fígado e rins. Neste caso, como esperado, a bioluminescência *ex vivo* confirmou metástases principalmente no pulmão de 83% dos camundongos do grupo veículo (Figura 19A e B), porém, não em outros órgãos vitais (baço, fígado e rins). Em contraste, o grupo tratado com SSi6 teve uma porcentagem insignificante (~1%) de metástases no pulmão, o que confirma a inibição da progressão das metástases dos linfonodos axilares para este órgão, além de uma menor evolução das metástases para outros

órgãos vitais. As imagens *ex vivo* de todos os órgãos do animal controle, bem como dos grupos tratados encontram-se nas Figuras B1-B e B2-B, respectivamente, do anexo B.

Figura 19 – Tratamento de SSi6 evita metástases espontâneas nos pulmões em um modelo sem ressecção do tumor primário. A linhagem MDA-MB-231/Luc foi usada para rastrear células tumorais por bioimagem após a injeção de células no tecido mamário de camundongos imunossuprimidos. **(A)** Imagens representativas de bioluminescência *ex vivo* do pulmão do grupo veículo e SSi6 15 mg/kg. **(B)** Quantificação do fluxo total das metástases pulmonares ao final do estudo. Os valores de p foram gerados pelo teste *t-Student* ($*p<0,05$, $**p<0,001$). Imagens histológicas de pulmões corados com H&E com áreas marcadas com crescimento tumoral do grupo **(C)** veículo e **(D)** tratado com SSi6. As imagens representam resultados em cada grupo de tratamento, barra de escala = 200 μm (aumento menor) e 50 μm (aumento maior).



Estes resultados são congruentes com os obtidos nas análises histológicas dos pulmões. Neste caso, a maioria dos animais do grupo veículo (Figura 19C) apresentaram múltiplas áreas

com focos metastáticos em comparação com o grupo SSi6 (Figura 19D) que não mostraram áreas com metástases. Considerando os resultados obtidos até o momento, o SSi6 mostrou ter uma boa atividade antitumoral para retardar/inibir o crescimento acelerado do tumor primário em comparação com o grupo veículo. Notavelmente, o SSi6 (15 mg/kg) inibiu a progressão das metástases espontâneas dos linfonodos axilares para o pulmão na maioria dos camundongos do grupo, o que demonstra uma boa atividade antimetastática deste composto, inclusive em um estágio avançado da doença.

A maioria dos estudos *in vivo* que avaliam os efeitos antimetastáticos do 6G utilizam doses muito altas, devido provavelmente a sua baixa atividade *in vivo*. Como mostrado por Zhong *et al.*, apenas doses de 100 e 200 mg/kg de 6G (~10 vezes maior que a dose do SSi6 usada neste estudo) foram capazes de suprimir o crescimento do tumor e as metástases pulmonares e hepáticas em um modelo xenográfico usando a linhagem tumoral de câncer de mama MCF-7 (ZHONG *et al.*, 2019). No entanto, ao contrário de nosso estudo, o tratamento iniciou-se quando o volume do tumor era de aproximadamente 10 mm³, ou seja, quando a doença metastática não tinha atingido um estágio avançado nos gânglios linfáticos axilares.

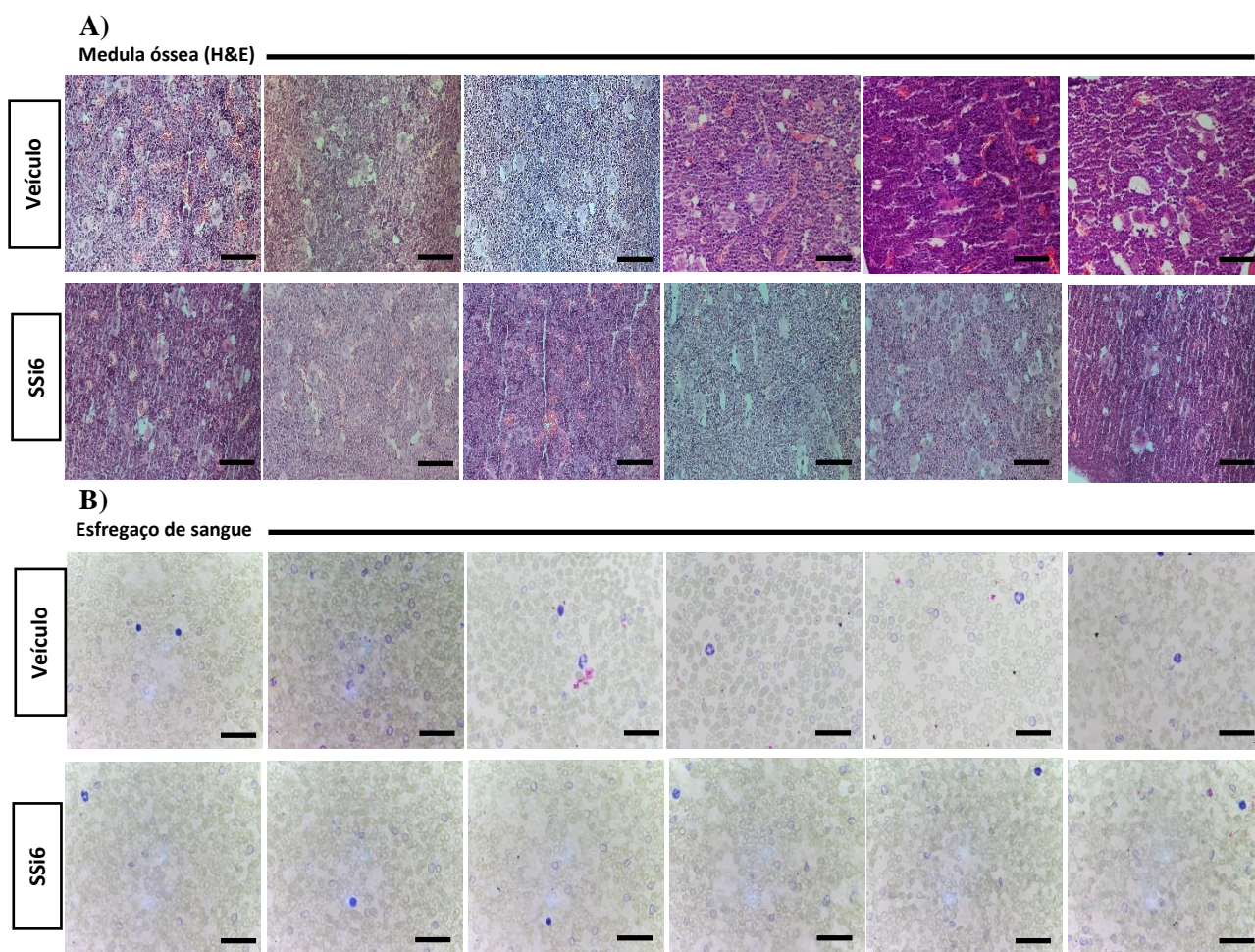
Tabela 5 – Hemograma dos grupos do modelo xenográfico sem ressecção de tumor. Valores alterados são destacados em vermelho. Os valores de *p* foram gerados pelo teste *t-Student*, grupo veículo vs grupo SSi6 (n/s, não significativo; **p*<0,05; ***p*<0,001). Os valores representam a média das análises de todos os animais.

Parâmetro	Grupo veículo	Grupo SSi6	Faixa normal	Unidade	<i>p</i> -valor
WBC	5,78	5,78	0,80-10,60	10 ⁹ /L	n/s
Neu#	5,00	2,36	0,23-3,60	10 ⁹ /L	* <i>p</i> <0,05
Lym#	2,28	2,82	0,60-8,90	10 ⁹ /L	n/s
Mon#	0,38	0,35	0,04-1,40	10 ⁹ /L	n/s
Eos#	0,17	0,22	0,00-0,51	10 ⁹ /L	n/s
Bas#	0,05	0,04	0,00-0,12	10 ⁹ /L	n/s
Neu%	58,24	39,17	6,5-50,0	%	* <i>p</i> <0,05
Lym%	32,58	49,38	40,0-92,0	%	* <i>p</i> <0,001
Mon%	6,38	6,48	0,9-18,0	%	n/s
Eos%	3,02	4,20	0,0-7,5	%	n/s
Bas%	0,88	0,77	0,0-1,5	%	n/s
RBC	8,41	8,16	6,50-11,50	10 ¹² /L	n/s
HGB	13,73	13,63	11,0-16,5	g/dL	n/s
HCT	39,65	40,92	35,0-55,0	%	n/s
MCV	47,13	50,07	41,0-55,0	fL	n/s
MCH	16,33	16,68	13,0-18,0	pg	n/s
MCHC	346,17	334,67	300-360	g/L	n/s
RDW-CV	14,27	16,10	12,0-19,0	%	n/s
RDW-SD	29,42	35,80	23,0-39,0	fL	n/s
PLT	756,33	358,54	400-1600	10 ⁹ /L	** <i>p</i> <0,001
MPV	5,77	5,93	4,0-6,2	fL	n/s

Abreviações: WBC, glóbulos brancos; hemácias, glóbulos vermelhos; HGB, hemoglobina; HCT, hematócrito; MCV, volume corpuscular médio; MCH, hemoglobina corpuscular média; MCHC, concentração média de hemoglobina corpuscular; RDW-CV, Faixa de Distribuição de Eritrócitos medida como Coeficiente de Variação; RDW-SD, Faixa de Distribuição de Eritrócitos medida como desvio padrão; PTL, plaquetas; MPV, volume médio de plaquetas.

A fim de determinar as alterações nas células sanguíneas de ambos os grupos, parâmetros hematológicos foram determinados e analisados no contador hematológico (Tabela 5). Cabe ressaltar que esta análise complementar fornece informações fundamentais sobre mudanças nos níveis das células hematopoiéticas, refletidas nos parâmetros de sangue periférico causadas pelo câncer induzido (como neste caso) ou por efeitos colaterais do composto testado (MAUCH et al., 1995). Neste caso, o grupo veículo apresentou leve neutrofilia e linfopenia, enquanto que no grupo SSi6 alguns animais apresentaram trombocitopenia (destacado em vermelho). Adicionalmente, foram realizados esfregaços de sangue periférico corados com Giemsa e lâminas histológicas da medula óssea coradas H&E. O intuito das análises de medula óssea foi determinar se as células tumorais poderiam também ter se infiltrado na medula óssea dos animais (MAUCH et al., 1995; KUO et al., 2018), assim como observado nas metástases pulmonares (observadas principalmente no grupo veículo). Os resultados apresentados nas Figuras 20A e B, confirmam que as células do sangue periférico e as células hematopoiéticas da medula óssea de ambos os grupos não sofreram alterações significativas durante o ensaio, mostrando uma boa relação mieloide e eritroide.

Figura 20 – Dados complementares do modelo xenográfico ortotópico. (A) Fotomicrografias de medula óssea coradas com hematoxilina e eosina (H&E) de camundongos imunossuprimidos fêmeas que receberam tratamento com veículo e SSi6 15 mg/kg (barra de escala = 50 μ m). (B) Esfregaço de sangue periférico preparado em lâminas para microscopia coradas com May-Gründwald Giemsa (barra de escala = 25 μ m).



4.4.4 Efeito da dose de SSi6 no bloqueio da progressão das metástases de múltiplos órgãos: modelo xenográfico com ressecção do tumor

Usualmente, a cirurgia é considerada uma intervenção importante que oferece uma chance de cura para os pacientes com câncer (TOHME; SIMMONS; TSUNG, 2017). No entanto, estudos na literatura sugerem que a ressecção cirúrgica do tumor primário está associada a um maior risco do crescimento acelerado da doença metastática, além de uma maior formação de novos focos metastáticos. É importante ressaltar que os focos metastáticos distantes são promovidos pelo desprendimento de células cancerígenas do tumor primário em direção à circulação durante a cirurgia. Neste contexto, durante o processo cirúrgico se produz uma lesão tecidual que leva a um processo inflamatório agudo nos pacientes. Assim, o trauma cirúrgico induz respostas inflamatórias locais e sistêmicas contribuindo para o crescimento acelerado das micrometástases (FARES et al., 2020).

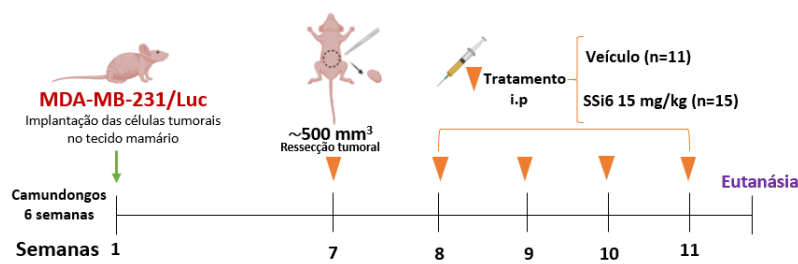
Para simular a situação em que a paciente detecta um crescimento anormal na mama, é diagnosticada com tumor e passa por retirada cirúrgica, foi utilizado um modelo de metástase com ressecção do tumor primário para analisar a eficiência do SSi6 na inibição das metástases em diversos órgãos vitais (pulmão, coração, fígado e baço), bem como para evitar a recidiva do tumor primário derivado do procedimento cirúrgico. Este cenário é comum na clínica e muitas vezes, o tumor é detectado em momentos em que a doença já está disseminada. Neste contexto, nos experimentos descritos a seguir, o tumor primário foi ressecionado com cerca de 500 mm³ (~7 semanas) após a formação das metástases iniciais (por exemplo, nos linfonodos axilares). Esta condição foi escolhida para avaliar adequadamente o efeito do SSi6 na inibição e progressão das metástases para múltiplos órgãos.

O SSi6 (15 mg/kg) foi administrado após uma semana de recuperação dos animais da ressecção do tumor primário, como esquematizado na Figura 21A. Como pode ser observado na Figura 21B, o SSi6 não representou nenhum efeito tóxico nos camundongos com relação à diminuição do peso durante o tempo total de experimento. Além disso, a curva de Kaplan-Meier, Figura 21C, mostrou que o grupo tratado com SSi6 teve uma porcentagem de sobrevida maior em comparação com o grupo veículo (* $p < 0,05$). Por outro lado, quando as imagens de bioluminescência *in vivo* das metástases nos linfonodos e na região torácica (pulmão) são analisadas verifica-se que estas foram desenvolvidas de forma muito mais evidente no grupo veículo do que no grupo SSi6 (Figura 21D e E). Consistente com estas observações, as imagens de bioluminescência da região abdominal mostraram que o grupo SSi6 teve uma menor progressão das metástases, ao mesmo tempo que o tratamento evitou de forma mais eficiente a recidiva do tumor primário (Figura 21F e G). A junção das imagens anteriores (imagens do

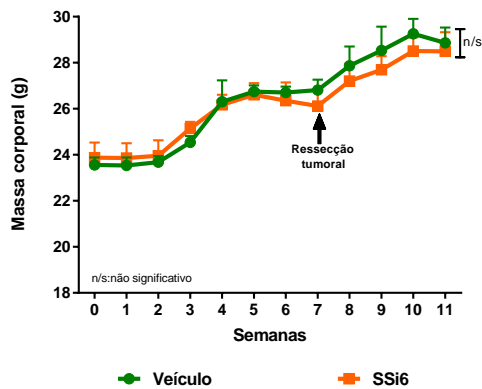
corpo inteiro do camundongo) pode ser vista na Figura 21H, em que se evidencia de forma mais clara o efeito do SSi6 na inibição da progressão tumoral para órgãos vitais do animal, bem como para evitar a recidiva do tumor primário. Finalmente, a quantificação da bioluminescência no corpo inteiro dos animais tratados com SSi6 foi significativamente menor quando comparada com o veículo (Figura 21I). As imagens de bioluminescência *in vivo* do animal do grupo controle (Figura B1-C) e de todos os animais (Figura B2-C) dos grupos veículo e SSi6 podem ser consultadas no anexo B.

Figura 21 – SSi6 diminui metástases de corpo inteiro e a recidiva do tumor primário. (A) O tumor formado por células MDA-MB-231/Luc foi removido com um volume de aproximadamente 500 mm³ em ambos os grupos (veículo n = 11; SSi6 15 mg/kg n = 15). Em seguida os tratamentos com SSi6 e veículo foram iniciados por via intraperitoneal e finalizou quando os camundongos mostraram sinais de dor/angústia. (B) A massa corporal foi monitorada três vezes por semana, antes e depois da ressecção cirúrgica dos tumores primários. (C) Curva de sobrevivência Kaplan-Meier. O valor *p* foi calculado por meio do teste *log-rank*. (D) Imagens representativas de bioluminescência *in vivo* e (E) quantificação do segmento superior (linfonodos axilares e região torácica), (F) segmento inferior, e (G) quantificação mostrando a região abdominal e a recidiva de tumores primários. (H) Imagens de corpo inteiro e (I) quantificação obtida da soma de cada segmento dos grupos tratados (veículo e SSi6).

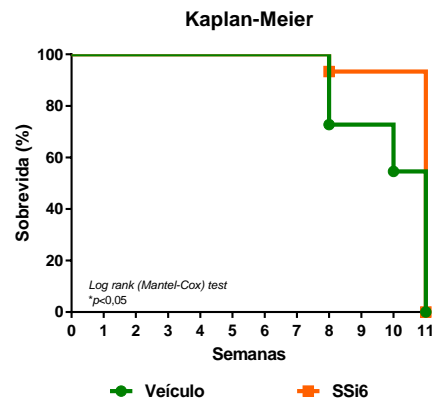
A)



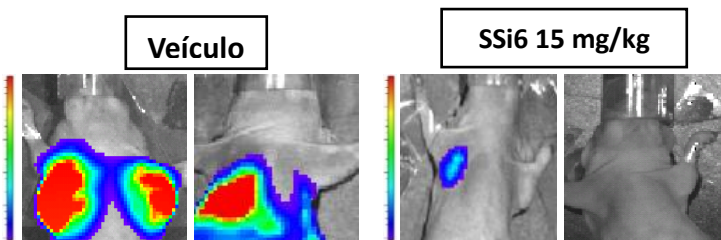
B)



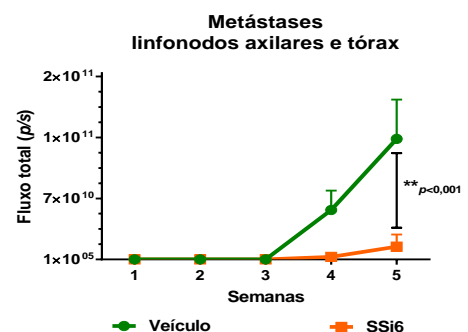
C)



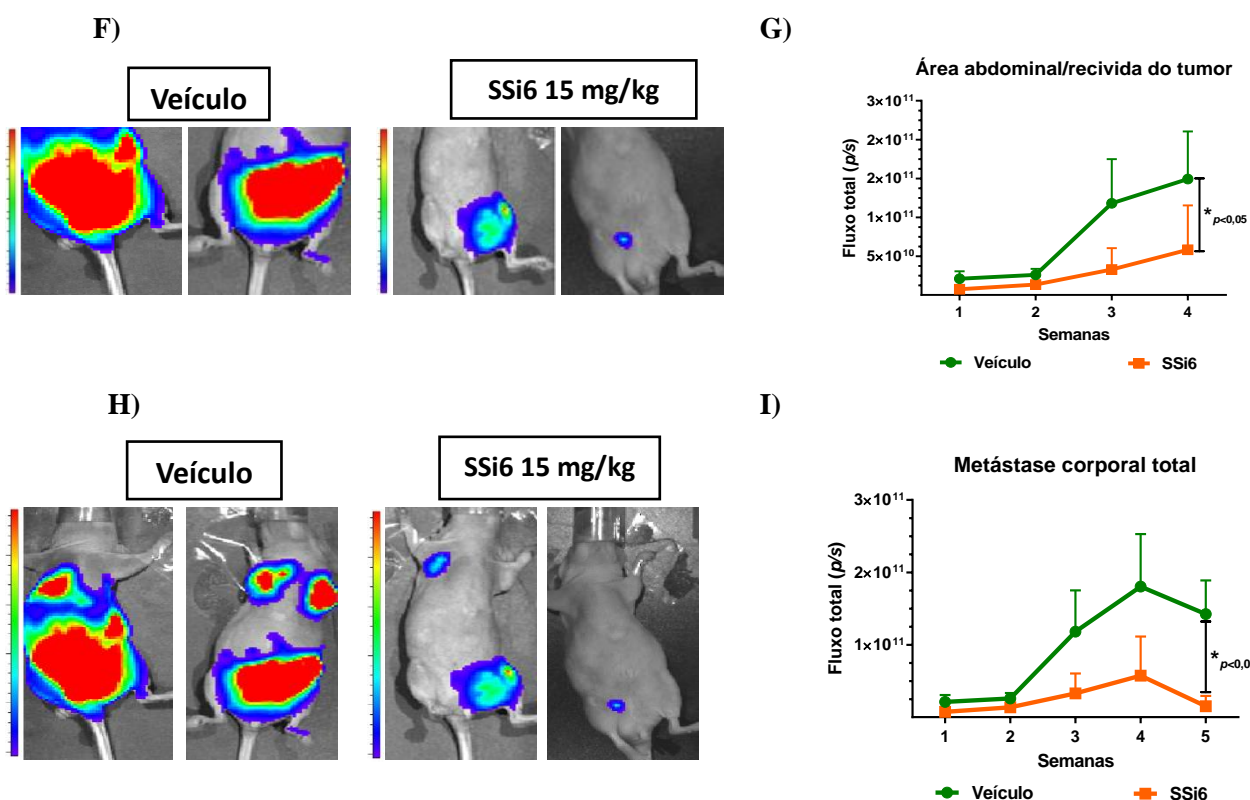
D)



E)



– Continuação **Figura 21**



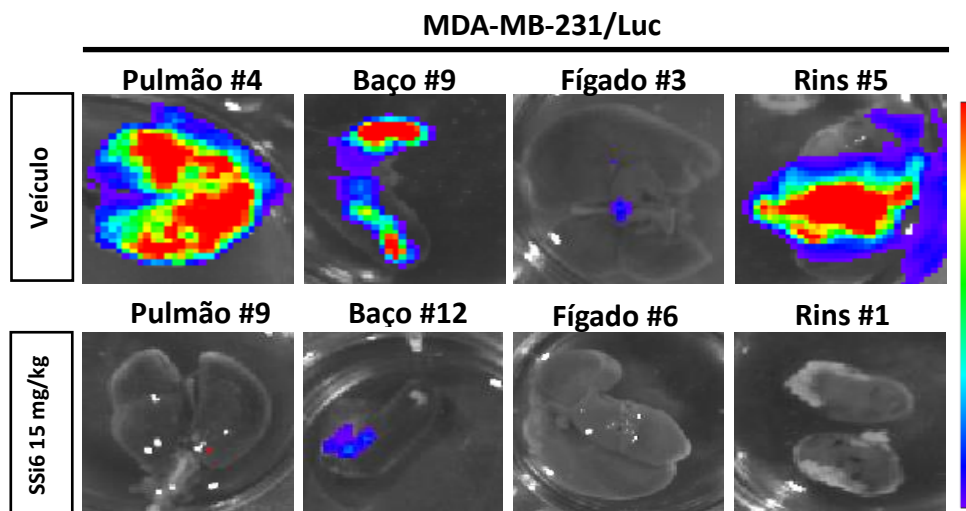
Por outro lado, as imagens de bioluminescência *ex vivo* e suas quantificações são mostradas nas Figuras 22A e B, respectivamente. Como esperado, para o grupo veículo, estas análises confirmaram as metástases na maioria dos órgãos avaliados, tais como pulmões (~45%), baço (~36%) e rins (~36%) (** $p < 0,001$, * $p < 0,05$). Em contrapartida, as percentagens de metástase encontradas nestes órgãos para o grupo SSi6 não foram significativas, sendo em alguns casos muito parecidas ao animal controle sem tumor. O anterior mostra mais uma vez a alta capacidade do SSi6 em inibir a progressão de metástases para múltiplos órgãos. Imagens *ex vivo* do animal controle (Figura B1-B) e de todos os animais (Figura B2-D) dos grupos veículo e SSi6 encontram-se no anexo B.

Para complementar os resultados obtidos nas imagens de bioluminescência *ex vivo*, foi realizada uma análise histológica H&E para analisar a inibição da progressão metastática dos linfonodos axilares para os pulmões e outros órgãos vitais. A Figura 22C (H&E) mostra que o tratamento com SSi6 inibe a progressão da doença metastática localmente avançada (gânglios linfáticos axilares) para os pulmões, ao contrário do observado no grupo veículo. Notavelmente, os resultados obtidos utilizando SSi6 são similares aos encontrados nas análises histológicas H&E (linfonodo e pulmão) realizadas no camundongo controle (anexo B Figura B1-D). Para validar que de fato as células tumorais de mama encontram-se instaladas nos linfonodos, análises de imuno-histoquímica (IHC) foram realizadas utilizando a citoqueratina AE1/AE3

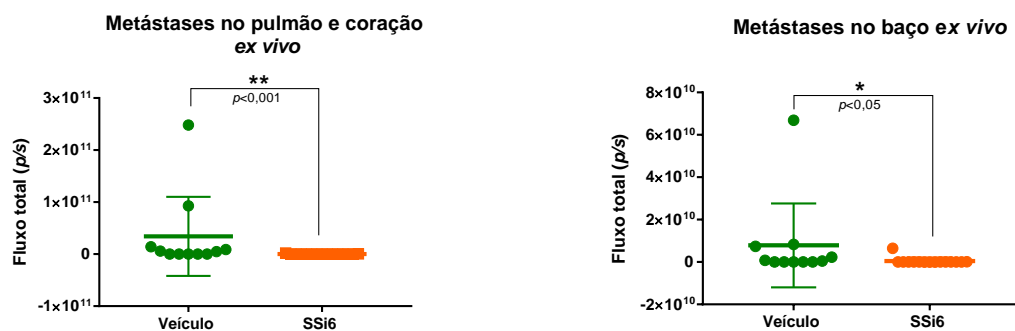
(CK), um marcador específico para a detecção de carcinomas/células de mama (XU et al., 2000). Os resultados da Figura 22C (IHC) mostram claramente que os linfonodos axilares tanto do grupo tratado com SSi6 quanto do veículo foram positivos para a marcação com CK, o que confirma a concepção experimental do modelo em estudo. Assim, os resultados indicam que a doença localmente avançada progrediu para os pulmões nos animais do grupo veículo, porém, esta progressão metastática foi claramente bloqueada nos animais tratados com SSi6. As análises histológicas H&E realizadas nos outros órgãos vitais (baço, rins e coração) comprovam que no grupo tratado com SSi6 não foram observadas áreas/focos de crescimento metastático (Figura 22D). As imagens das análises histológicas H&E dos órgãos do animal controle encontram-se no anexo B (Figura B1-E).

Figura 22 – SSi6 inibe metástases de múltiplos órgãos e bloqueia o avanço das células MDA-MB-231/Luc dos linfonodos para os pulmões em um modelo xenográfico com ressecção do tumor primário. **(A)** Imagens de bioluminescência *ex vivo* dos órgãos do grupo veículo (n = 11) e SSi6 15 mg/kg (n = 15). **(B)** Gráficos dos experimentos *ex vivo* medindo a bioluminescência do pulmão, baço, fígado e rins, respectivamente. Os valores *p* foram gerados pelos testes *t-Student* (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$). **(C)** Imagens da coloração de H&E e IHC de citoqueratina dos linfonodos axilares para confirmar a presença de células tumorais. **(D)** Imagens representativas de H&E mostrando nódulos metastáticos no baço, rins e no coração dos grupos. Barra de escala=200 μm e 50 μm .

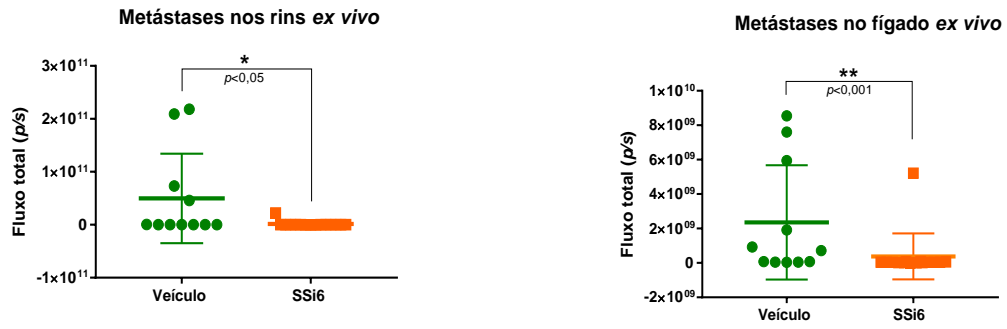
A)



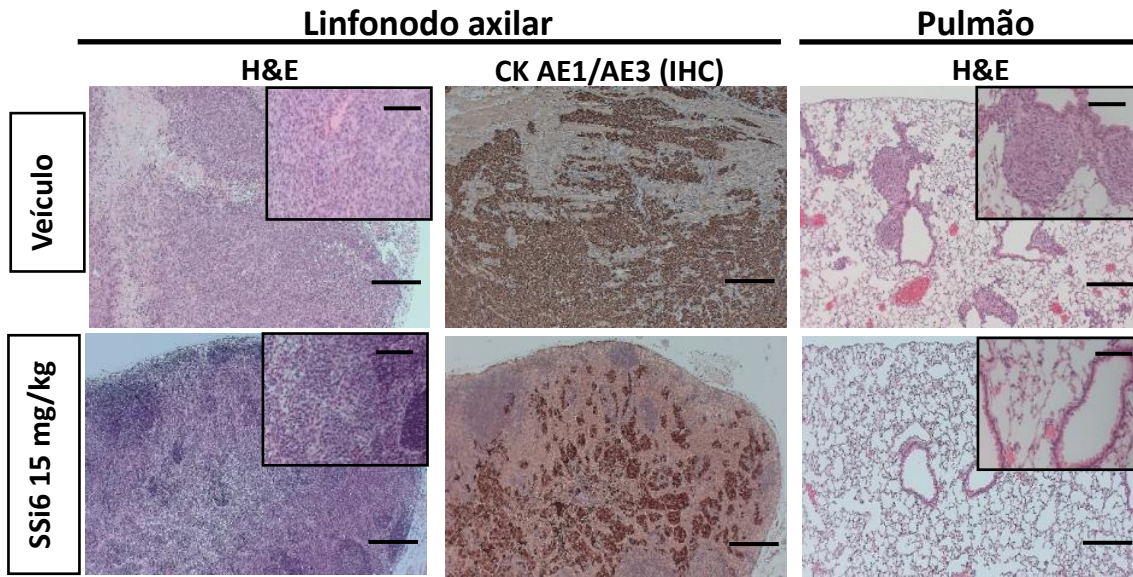
B)



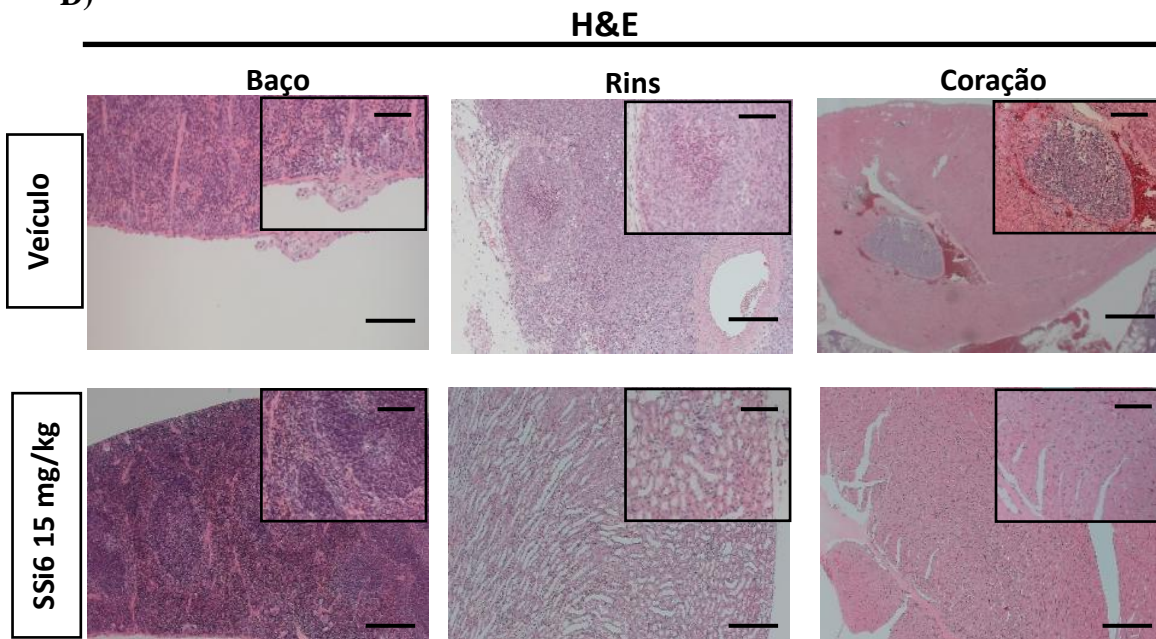
– Continuação **Figura 22**



C)



D)



Finalmente, os resultados conjuntos aqui apresentados fornecem fortes evidências de que os modelos xenográficos com doença localmente avançada, com e sem ressecção do tumor

primário, geram metástases simultâneas e, mais importante, que o SSi6 mostrou-se promissor em inibir a progressão metastática, principalmente dos linfonodos axilares para os pulmões, bem como para prevenir metástases em múltiplos órgãos.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS FUTUROS

Esta tese teve como objetivo investigar o papel do SSi6, uma nova substância obtida a partir da modificação do [6]-gingerol (6G), na indução dos processos de autofagia e apoptose, bem como seus efeitos antitumorais e antimetastáticos em modelos pré-clínicos do tipo xenográfico usando células de câncer de mama triplo negativas da linhagem MDA-MB-231.

No primeiro capítulo, mostramos evidências da atividade *in vitro* do SSi6 para induzir a morte celular na linhagem MDA-MB-231. Neste estudo, demonstramos que o SSi6 apresentou uma melhor seletividade e atividade citotóxica frente as células triplo negativas (MDA-MB-231) quando comparado a seu homólogo não modificado, o 6G. Desse modo, o SSi6 induziu a morte celular por ativação de duas vias, a autofagia e a apoptose independente de caspases, promovidas pela participação de espécies reativas de oxigênio geradas pelas células em resposta ao tratamento. Esta estratégia de induzir mecanismos combinados de morte celular poderia ser utilizada em tumores triplo negativos resistentes a compostos que induzem a apoptose canônica.

No segundo capítulo, e tendo em vista que não existem estudos que demonstrem os efeitos antitumorais e antimetastáticos do SSi6 *in vivo*, ampliamos o estudo deste composto por meio da aplicação de modelos pré-clínicos xenográficos, os quais permitiriam determinar de uma forma mais realística a eficácia terapêutica deste novo composto.

A aplicação do modelo xenográfico ortotópico sem ressecção do tumor nos permitiu comprovar que o SSi6 tem uma boa atividade antitumoral *in vivo*, demonstrada pela inibição parcial do crescimento do tumor primário, sem efeitos colaterais significativos sobre o peso ou a mortalidade dos camundongos. Além disso, os dados obtidos nos permitiram conhecer preliminarmente os efeitos antimetastáticos do SSi6, os quais foram verificados com mais detalhe no segundo modelo. Neste caso, nos ensaios xenográficos com ressecção do tumor primário, mimetizamos um cenário frequente em mulheres diagnosticadas com câncer de mama, em que uma vez detectado o tumor (comumente de forma tardia), as pacientes são submetidas primeiro a um processo cirúrgico para remover o tumor primário e depois ao tratamento com quimioterapia/radioterapia (neste caso, administração da dose de 15 mg/kg do SSi6 em camundongos imunossuprimidos). Os resultados da aplicação deste segundo modelo evidenciaram que o tratamento com SSi6 bloqueou a progressão da metástase dos gânglios linfáticos para os pulmões, bem como para múltiplos órgãos, incluindo as típicas metástases de órgãos viscerais do câncer de mama triplo negativo. Considerando que as metástases são responsáveis por 90% das mortes causadas pelo câncer, este resultado é promissor e incentiva

a realização de outros modelos pré-clínicos *in vivo*, utilizando, por exemplo, um regime terapêutico combinado com fármacos já aplicados na clínica.

Apesar de que os resultados deste estudo são muito promissores, outros estudos são necessários antes de avançar para etapas posteriores do desenvolvimento de novos fármacos. Por exemplo, estudos *in vitro* que permitam identificar o alvo biológico/molecular do SSi6 na linhagem MDA-MB-231 são extremamente relevantes para elucidar de forma detalhada o mecanismo pelo qual este composto induz os efeitos mostrados neste estudo. Além disso, uma avaliação da farmacocinética do SSi6 é fundamental para conhecer seu comportamento metabólico *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADA, A.; ELAZAR, Z. Getting Ready for Building: Signaling and Autophagosome Biogenesis. **EMBO reports**, v. 15, n. 8, p. 839–852, ago. 2014.

ADES, F. et al. Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 25, p. 2794–2803, 1 set. 2014.

AHN, S. G. et al. Prognostic Factors for Patients with Bone-Only Metastasis in Breast Cancer. **Yonsei Med J**, v. 54, n. 5, p. 1168–1177, set. 2013.

ANAND, P. et al. Cancer Is a Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 9, p. 2097–2116, set. 2008.

ARANGO, D. et al. C-Myc Overexpression Sensitises Colon Cancer Cells to Camptothecin-Induced Apoptosis. **British journal of cancer**, v. 89, n. 9, p. 1757–1765, 3 nov. 2003.

ARRROWSMITH III, J. Phase III and submission failures 2007–2010. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, p. 87, 2011.

BACKES, S.; HERRMANN, J. M. Protein Translocation into the Intermembrane Space and Matrix of Mitochondria: Mechanisms and Driving Forces. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 4, p. 83–83, 7 dez. 2017.

BADADANI, M. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. **ISRN Cell Biology**, v. 2012, p. 927064, 6 set. 2012.

BAI, H. et al. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. **Oncogene**, v. 31, n. 40, p. 4397–4408, 1 out. 2012.

BARNARD, R. J. Prevention of Cancer Through Lifestyle Changes. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 1, n. 3, p. 233–239, dez. 2004.

BENNETT, J. E. et al. NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4. **The Lancet**, v. 392, n. 10152, p. 1072–1088, 22 set. 2018.

BENRAHMOUNE, M.; THÉRON, P.; ABEDINZADEH, Z. The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 8, p. 775–782, 15 out. 2000.

BHATT, J. R.; KLOTZ, L. Overtreatment in cancer – is it a problem? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 17, n. 1, p. 1–5, 2 jan. 2016.

BOOTH, L. A. et al. The Role of Cell Signalling in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. **Cellular signalling**, v. 26, n. 3, p. 549–555, mar. 2014.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 nov. 2018.

BRIERLEY, J. D.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**. John Wiley & Sons, 2017.

CARNEIRO, M. L. B. et al. Acute and subchronic toxicity of the antitumor agent rhodium (II) citrate in Balb/c mice after intraperitoneal administration. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1086–1100, 1 jan. 2015.

CARSON BANKS, A. The Animal Research War. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 2, p. 242–242, 2 fev. 2009.

CHEANG, M. C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients with Luminal B Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736–750, 20 maio 2009.

CHEN, X. et al. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. **Free Radical Research**, v. 44, n. 6, p. 587–604, 1 jan. 2010.

CHEN, Y.-T. et al. Erianin Induces Apoptosis and Autophagy in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 48, n. 01, p. 183–200, 1 jan. 2020.

CHOI, H. D. et al. Dual role of reactive oxygen species in autophagy and apoptosis induced by compound PN in prostate cancer cells. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 41–50, 1 jan. 2021.

CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, n. 5, p. 303–313, 1 set. 2009.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive Oxygen Species, Cellular Redox Systems, and Apoptosis. **Free radical biology & medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 15 mar. 2010.

COMMISSIONER. **Step 3: Clinical Research. FDA 2019**, 18 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research>>. Acesso em: 23 jul. 2021.

COMMISSIONER. **The Drug Development Process 2020**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>>. Acesso em: 23 jul. 2021.

CREGAN, S. P. et al. Apoptosis-Inducing Factor Is Involved in the Regulation of Caspase-Independent Neuronal Cell Death. **The Journal of cell biology**, v. 158, n. 3, p. 507–517, 5 ago. 2002.

CUNHA, B. N. et al. Selective Coordination Mode of Acylthiourea Ligands in Half-Sandwich Ru(II) Complexes and Their Cytotoxic Evaluation. **Inorganic Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 5072–5085, 6 abr. 2020.

DA SILVA, J. A. et al. Preparation and characterization of [6]-gingerol/ β -cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, p. 102103, 1 fev. 2021.

DAI, X. et al. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 12 set. 2017.

DALBY, K. et al. Targeting the pro-death and pro-survival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. **Autophagy**, v. 6, n. 3, p. 322–329, 1 abr. 2010.

DAS, C. K.; BANERJEE, I.; MANDAL, M. Pro-survival autophagy: An emerging candidate of tumor progression through maintaining hallmarks of cancer. **Autophagic molecules, mediators and modulators in cancer**, v. 66, p. 59–74, 1 nov. 2020.

DE CAMARGO, L. C. B. et al. Extracellular vesicles produced by NFAT3-expressing cells hinder tumor growth and metastatic dissemination. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8964, 2 jun. 2020.

DE LIMA SILVA, W. C. et al. Novel [6]-Gingerol Triazole Derivatives and Their Antiproliferative Potential against Tumor Cells. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 161–169, 2020.

DE MARTINI, D. Empowering phase II clinical trials to reduce phase III failures. **Pharmaceutical Statistics**, v. 19, n. 3, p. 178–186, 1 maio 2020.

DENT, R. et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 15, p. 4429, 1 ago. 2007.

DESAI, A. et al. Pharmacokinetics of ASP4345 from Single Ascending-Dose and Multiple Ascending-Dose Phase I Studies. **Clinical pharmacokinetics**, v. 60, n. 1, p. 79–88, jan. 2021.

DIMASI, J. A. et al. Trends in Risks Associated With New Drug Development: Success Rates for Investigational Drugs. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 3, p. 272–277, 1 mar. 2010.

DREWS, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960, 17 mar. 2000.

DUGGER, S. A.; PLATT, A.; GOLDSTEIN, D. B. Drug Development in the Era of Precision Medicine. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 17, n. 3, p. 183–196, mar. 2018.

EDWARDS, R.; EAGLESFIELD, R.; TOKATLIDIS, K. The Mitochondrial Intermembrane Space: The Most Constricted Mitochondrial Sub-Compartment with the Largest Variety of Protein Import Pathways. **Open biology**, v. 11, n. 3, p. 210002–210002, mar. 2021.

EL-KHATTOUTI, A. et al. Crosstalk between Apoptosis and Autophagy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies in Cancer. **Journal of cell death**, v. 6, p. 37–55, 18 ago. 2013.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

ERDMANN, S. et al. Optimal Designs for Phase II/III Drug Development Programs Including Methods for Discounting of Phase II Results. **BMC medical research methodology**, v. 20, n. 1, p. 253–253, 9 out. 2020.

- ESKELINEN, E.-L. Maturation of Autophagic Vacuoles in Mammalian Cells. **Autophagy**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 28 abr. 2005.
- FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 28, 12 mar. 2020.
- FERREIRA, L. G. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015.
- FIGUEROA-MAGALHÃES, M. C. et al. Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 23, n. 2, p. 128–136, abr. 2014.
- FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377–388, 1 mar. 2015.
- FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938–1948, 11 nov. 2010.
- FRANCIS, M. et al. AN INTEGRATED FIRST-IN-HUMAN STUDY DESIGN INVOLVING SEQUENTIAL SINGLE AND MULTIPLE ASCENDING DOSE COHORTS: AN EMERGING TREND IN PHASE I CLINICAL TRIALS.: PI-19. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, 2013.
- FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742–758, 2011.
- FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798–4811, 1 ago. 2006.
- FUZER, A. M. et al. [10]-Gingerol Reverts Malignant Phenotype of Breast Cancer Cells in 3D Culture. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 9, p. 2693–2699, 1 set. 2017.
- FDA. **In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry 2020**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/vitro-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions>>. Acesso em: 23 jul. 2021.
- GALLUZZI, L. et al. Metabolic Control of Autophagy. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1263–1276, 4 dez. 2014.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 1 mar. 2018.
- GAO, J. J.; SWAIN, S. M. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. **The Oncologist**, v. 23, n. 5, p. 556–565, 1 maio 2018.
- GAO, L. et al. Targeting ROS-Mediated Crosstalk Between Autophagy and Apoptosis in Cancer. In: GUEST, P. C. (Ed.). **Reviews on New Drug Targets in Age-Related Disorders**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–12.

- GARGIULO, G. Next-Generation in Vivo Modeling of Human Cancers. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 429–429, 10 out. 2018.
- GAY, L. J.; FELDING-HABERMANN, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 123–134, 1 fev. 2011.
- GHALLAB, A. In Vitro Test Systems and Their Limitations. **EXCLI journal**, v. 12, p. 1024–1026, 12 dez. 2013.
- GIBSON, S. B. A matter of balance between life and death: Targeting reactive oxygen species (ROS)-induced autophagy for cancer therapy. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 835–837, 1 out. 2010.
- GILLETTE, J. R. Problems in Correlating InVivo and InVivo Studies of Drug Metabolism. In: BENET, L. Z.; LEVY, G.; FERRAILOLO, B. L. (Ed.). **Pharmacokinetics: A Modern View**. Boston, MA: Springer US, 1984. p. 235–252.
- GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, n. 2, p. 45–80, 31 dez. 2005.
- GOTTLIEB, E. et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, n. 6, p. 709–717, 1 jun. 2003.
- GRAMINHA, A. E. et al. A novel ruthenium(ii) gallic acid complex disrupts the actin cytoskeleton and inhibits migration, invasion and adhesion of triple negative breast tumor cells. **Dalton Transactions**, v. 50, n. 1, p. 323–335, 2021.
- GUMP, J. M.; THORBURN, A. Autophagy and Apoptosis: What Is the Connection? **Trends in cell biology**, v. 21, n. 7, p. 387–392, jul. 2011.
- GUO, J. Y.; XIA, B.; WHITE, E. Autophagy-Mediated Tumor Promotion. **Cell**, v. 155, n. 6, p. 1216–1219, 5 dez. 2013.
- GLOBOCAN. **Stages of Breast Cancer | Understand Breast Cancer Staging 2020**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/stages-of-breast-cancer.html>>. Acesso em: 28 jul. 2021.
- HAMPTON, M. B.; FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Redox Regulation of the Caspases during Apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, n. 1, p. 328–335, 1 nov. 1998.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.
- HOLZE, C. et al. Oxceptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. **Nature Immunology**, v. 19, n. 2, p. 130–140, 1 fev. 2018.
- HUGHES, J. P. et al. Principles of Early Drug Discovery. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, mar. 2011.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Chapter Six - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. In: AL-MAJED, A. A. (Ed.). **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. Academic Press, 2021. 46p. 273–307.

INCA. **Estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf 2020**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

JIANG, P.; MIZUSHIMA, N. Autophagy and human diseases. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 69–79, 1 jan. 2014.

JOYCE, J. A. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 7, n. 6, p. 513–520, 1 jun. 2005.

JOZA, N. et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 549–554, 2001.

KANG, Y.-H. et al. Caspase-Independent Cell Death by Arsenic Trioxide in Human Cervical Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 64, n. 24, p. 8960, 15 dez. 2004.

KASHOKI, M. et al. A Comparison of EMA and FDA Decisions for New Drug Marketing Applications 2014-2016: Concordance, Discordance, and Why. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 107, n. 1, p. 195–202, jan. 2020.

KIM, C. et al. Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. **Cell**, v. 173, n. 4, p. 879- 893.e13, 3 maio 2018.

KIM, J. H. Book Review: Fundamentals of Clinical Trials. 4th Ed. **International Neurourology Journal**, v. 17, n. 2, p. 96–96, jun. 2013.

KIPROTICH, S. L. **An insight on International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical products for human use (ICH)**. 2009. 2009.

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5497, p. 1717–1721, 1 dez. 2000.

KROEMER, G.; LEVINE, B. Autophagic Cell Death: The Story of a Misnomer. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 12, p. 1004–1010, dez. 2008.

KUMA, A.; MATSUI, M.; MIZUSHIMA, N. LC3, an Autophagosome Marker, Can be Incorporated into Protein Aggregates Independent of Autophagy: Caution in the Interpretation of LC3 Localization. **Autophagy**, v. 3, n. 4, p. 323–328, 16 jul. 2007.

KUMARA, M. et al. 6-Gingerol is the most Potent Anticancerous Compound in Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Journal of Developing Drugs**, v. 6, p. 1–6, 2017.

KUO, M. C. et al. Cancer stemness in bone marrow micrometastases of human breast cancer. **Surgery**, v. 163, n. 2, p. 330–335, 1 fev. 2018.

O'DRISCOLL AND M. CLYNES. Biomarkers and Multiple Drug Resistance in Breast Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 6, n. 5, p. 365–384, 2006.

- LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 1 jul. 2011.
- LEWANDOWSKA, A. M. et al. Environmental risk factors for cancer – review paper. **Ann Agric Environ Med.**, v. 26, n. 1, p. 1–7, 2019.
- LI, J. et al. Clinicopathological Classification and Traditional Prognostic Indicators of Breast Cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 7, p. 8500–8505, 1 jul. 2015.
- LI, W. et al. Molecular alterations of cancer cell and tumour microenvironment in metastatic gastric cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 36, p. 4903–4920, 1 set. 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.
- LONGLEY, D.; JOHNSTON, P. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 275–292, 1 jan. 2005.
- LORETO, C. et al. The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie’s Disease. **BioMed research international**, v. 2014, p. 616149–616149, 2014.
- LORIAN, V. Differences between in Vitro and in Vivo Studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 32, n. 10, p. 1600–1601, out. 1988.
- LUNA-DULCEY, L.; DA SILVA, J. A.; COMINETTI, M. R. SSi6 promotes cell death by apoptosis through cell cycle arrest and inhibits migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 31, n. 1, 2020.
- LUO, Y. et al. [6]-Gingerol enhances the radiosensitivity of gastric cancer via G2/M phase arrest and apoptosis induction. **Oncology Reports**, v. 39, n. 5, p. 2252–2260, 1 maio 2018.
- LÜÖND, F.; TIEDE, S.; CHRISTOFORI, G. Breast cancer as an example of tumour heterogeneity and tumour cell plasticity during malignant progression. **British Journal of Cancer**, v. 125, n. 2, p. 164–175, 1 jul. 2021.
- MAKHOURI, F. R.; GHASEMI, J. B. In Silico Studies in Drug Research Against Neurodegenerative Diseases. **Current neuropharmacology**, v. 16, n. 6, p. 664–725, 2018.
- MARIÑO, G. et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, 1 fev. 2014.
- MARTIN, A. C. B. M. et al. [10]-gingerol induces apoptosis and inhibits metastatic dissemination of triple negative breast cancer in vivo. **Oncotarget; Vol 8, No 42**, 2017.
- MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298–306, 1 jan. 2016.
- MAUCH, P. et al. Hematopoietic stem cell compartment: Acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 31, n. 5, p. 1319–1339, 30 mar. 1995.

- MCCOMB, S. et al. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. **Science Advances**, v. 5, n. 7, p. eaau9433, 1 jul. 2019.
- MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. a008656, 2013.
- MINN, A. J. et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 1, p. 44–55, 3 jan. 2005.
- MIWA, T. et al. Establishment of Peritoneal and Hepatic Metastasis Mouse Xenograft Models Using Gastric Cancer Cell Lines. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 33, n. 6, p. 1785–1792, 2019.
- MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug Discovery and Development: Role of Basic Biological Research. **Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)**, v. 3, n. 4, p. 651–657, 11 nov. 2017.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- NAIR, A. B.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27–31, mar. 2016.
- NASH, K. M.; AHMED, S. Nanomedicine in the ROS-Mediated Pathophysiology: Applications and Clinical Advances. **Nanomedicine :nanotechnology, biology, and medicine**, v. 11, n. 8, p. 2033–2040, nov. 2015.
- NAVARRO, P. et al. Targeting Tumor Mitochondrial Metabolism Overcomes Resistance to Antiangiogenics. **Cell Reports**, v. 15, n. 12, p. 2705–2718, 21 jun. 2016.
- NEDUNGADI, D. et al. 6-Shogaol induces caspase-independent paraptosis in cancer cells via proteasomal inhibition. **Experimental Cell Research**, v. 364, n. 2, p. 243–251, 15 mar. 2018.
- NIH. Animal Research Advisory Committee Guidelines 2000 | OACU**. Disponível em: <<https://oacu.oir.nih.gov/animal-research-advisory-committee-guidelines>>. Acesso em: 13 ago. 2021
- NGUYEN, D. X.; MASSAGUÉ, J. Genetic determinants of cancer metastasis. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 341–352, 1 maio 2007.
- O'QUIGLEY, J.; PEPE, M.; FISHER, L. Continual reassessment method: a practical design for phase 1 clinical trials in cancer. **Biometrics**, p. 33–48, 1990.
- PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 3, p. 460–473, 20 jan. 2014.
- PEINADO, H.; LAVOTSHKIN, S.; LYDEN, D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts. **The Biology of Cancer Metastasis**, v. 21, n. 2, p. 139–146, 1 abr. 2011.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.

PLACKE, T. et al. Platelet-Derived MHC Class I Confers a Pseudonormal Phenotype to Cancer Cells That Subverts the Antitumor Reactivity of Natural Killer Immune Cells. **Cancer Res**, v. 72, n. 2, p. 440–448, jan. 2012.

QIAN, C.-N.; MEI, Y.; ZHANG, J. Cancer Metastasis: Issues and Challenges. **Chinese journal of cancer**, v. 36, n. 1, p. 38–38, 3 abr. 2017.

RAKHA, E. A. et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 18, p. 3149–3156, 1 dez. 2006.

RAKHA, E. A.; CHAN, S. Metastatic Triple-negative Breast Cancer. **Clinical Oncology**, v. 23, n. 9, p. 587–600, 1 nov. 2011.

RASTOGI, N. et al. Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anti-cancer activity of 6-Gingerol in cervical cancer cells. **Oncotarget**; v. 6, No 41, 2015.

RÉDA, C.; KAUFMANN, E.; DELAHAYE-DURIEZ, A. Machine Learning Applications in Drug Development. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 18, p. 241–252, 26 dez. 2019.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 1 dez. 2016.

REYMOND, N.; D'ÁGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 858–870, 1 dez. 2013.

RHEE, S. G. et al. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. **Cell regulation**, v. 17, n. 2, p. 183–189, 1 abr. 2005.

RIMKUTĚ, D. Building Organizational Reputation in the European Regulatory State: An Analysis of EU Agencies' Communications. **Governance (Oxford, England)**, v. 33, n. 2, p. 385–406, abr. 2020.

SAWAKI, M.; SHIEN, T.; IWATA, H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 49, n. 3, p. 228–231, 1 mar. 2019.

SCARLETT, J. L. et al. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. **FEBS Letters**, v. 475, n. 3, p. 267–272, 23 jun. 2000.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current biology : CB**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 19 maio 2014.

SERUGA, B. et al. Failures in phase III: causes and consequences. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 20, p. 4552–4560, 2015.

SHEN, H.-M.; LIU, Z. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 928–939, 15 mar. 2006.

SHEN, J. et al. Design and Conduct Considerations for First-in-Human Trials. **Clinical and translational science**, v. 12, n. 1, p. 6–19, jan. 2019.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 1 jan. 2020.

SILVA, J. A. da et al. Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. **Journal of Chromatography B**, v. 903, p. 157–162, 15 ago. 2012.

SINGH, B. N. et al. Rottlerin induces autophagy which leads to apoptotic cell death through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway in human pancreatic cancer stem cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 9, p. 1154–1163, 1 nov. 2012.

SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. **Bio-protocol**, v. 9, n. 1, p. e3128, 5 jan. 2019.

SKIBINSKI, A.; KUPERWASSER, C. The origin of breast tumor heterogeneity. **Oncogene**, v. 34, n. 42, p. 5309–5316, 1 out. 2015.

SLAMON, D. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, n. 4785, p. 177, 9 jan. 1987.

STALLARD, N.; TODD, S. Sequential designs for phase III clinical trials incorporating treatment selection. **Statistics in medicine**, v. 22, n. 5, p. 689–703, 2003.

STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nature Medicine**, v. 12, n. 8, p. 895–904, 1 ago. 2006.

STORER, B. E. Design and analysis of phase I clinical trials. **Biometrics**, p. 925–937, 1989.

SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. **Journal of Oncology**, v. 2013, p. 102735, 5 jun. 2013.

SUSIN, S. A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441–446, 1 fev. 1999.

SUVARNA, V. Phase IV of Drug Development. **Perspectives in clinical research**, v. 1, n. 2, p. 57–60, abr. 2010.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6452–6461, 1 out. 2008.

TANIDA, I. et al. Lysosomal Turnover, but Not a Cellular Level, of Endogenous LC3 is a Marker for Autophagy. **Autophagy**, v. 1, n. 2, p. 84–91, 5 jul. 2005.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 and Autophagy. In: DERETIC, V. (Ed.). **Autophagosome and Phagosome**. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. p. 77–88.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231–241, 1 mar. 2008.

TELES, R. H. G. et al. Copper transporter 1 affinity as a delivery strategy to improve the cytotoxic profile of rationally designed copper(II) complexes for cancer treatment. **Toxicology in Vitro**, v. 67, p. 104922, 1 set. 2020.

THALL, P. F. A review of phase 2–3 clinical trial designs. **Lifetime data analysis**, v. 14, n. 1, p. 37–53, 2008.

THALL, P. F.; SIMON, R. Practical Bayesian guidelines for phase IIB clinical trials. **Biometrics**, p. 337–349, 1994.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 6, p. L1005–L1028, 1 dez. 2000.

TOHME, S.; SIMMONS, R. L.; TSUNG, A. Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. **Cancer Research**, v. 77, n. 7, p. 1548, 1 abr. 2017.

TOMASETTI, C.; LI, L.; VOGELSTEIN, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330, 24 mar. 2017.

TORRES, P. H. M. et al. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 15 set. 2019.

TURASHVILI, G.; BROGI, E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. **Frontiers in medicine**, v. 4, p. 227–227, 8 dez. 2017.

UNGEFROREN, H. et al. Interaction of Tumor Cells with the Microenvironment. **Cell communication and signaling : CCS**, v. 9, p. 18–18, 13 set. 2011.

VAN GOOL, A. J.; HENRY, B.; SPRENGERS, E. D. From biomarker strategies to biomarker activities and back. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 3, p. 121–126, 1 fev. 2010.

VAN NORMAN, G. A. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach? **JACC: Basic to Translational Science**, v. 4, n. 7, p. 845–854, 1 nov. 2019.

VICECONTI, M. et al. In silico trials: Verification, validation and uncertainty quantification of predictive models used in the regulatory evaluation of biomedical products. **Methods on simulation in biomedicine**, v. 185, p. 120–127, 1 jan. 2021.

VILLALVILLA, A. et al. 6-Shogaol inhibits chondrocytes' innate immune responses and cathepsin-K activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 2, p. 256–266, 1 fev. 2014.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591–602, 1 ago. 2005.

WONG, A. D.; SEARSON, P. C. Mitosis-Mediated Intravasation in a Tissue-Engineered Tumor–Microvessel Platform. **Cancer Research**, v. 77, n. 22, p. 6453, 15 nov. 2017.

WHO. **Breast cancer now most common form of cancer: WHO taking action 2020**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

WHO. **Cancer in the world 2019**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

XU, S. et al. 6-Gingerol induces cell-cycle G1-phase arrest through AKT–GSK 3 β –cyclin D1 pathway in renal-cell carcinoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 85, n. 2, p. 379–390, 1 fev. 2020.

XU, X. et al. Undesirable Cytokeratin Immunoreactivity of Native Nonepithelial Cells in Sentinel Lymph Nodes From Patients With Breast Carcinoma. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 124, n. 9, p. 1310–1313, 1 set. 2000.

YE, H. et al. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 9, p. 680–684, 1 set. 2002.

YE, X.; WEINBERG, R. A. Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 675–686, 1 nov. 2015.

YIN, G.; LI, Y.; JI, Y. Bayesian dose-finding in phase I/II clinical trials using toxicity and efficacy odds ratios. **Biometrics**, v. 62, n. 3, p. 777–787, 2006.

YIN, L. et al. Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtyping and Treatment Progress. **Breast cancer research : BCR**, v. 22, n. 1, p. 61–61, 9 jun. 2020.

YOON, S. et al. Caspase-dependent cell death-associated release of nucleosome and damage-associated molecular patterns. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 10, p. e1494–e1494, 1 out. 2014.

YUAN, J. et al. Seamless Phase IIa/IIb and Enhanced Dose-Finding Adaptive Design. **Journal of biopharmaceutical statistics**, v. 26, n. 5, p. 912–923, 2016.

ZAGORAC, I. et al. In Vivo Phosphoproteomics Reveals Kinase Activity Profiles That Predict Treatment Outcome in Triple-Negative Breast Cancer. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3501, 29 ago. 2018.

ZHONG, W. et al. 6-Gingerol stabilized the p-VEGFR2/VE-cadherin/ β -catenin/actin complex promotes microvessel normalization and suppresses tumor progression. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 285, 2 jul. 2019.

ZOLI, W. et al. In vitro preclinical models for a rational design of chemotherapy combinations in human tumors. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 37, n. 1, p. 69–82, 1 jan. 2001.

ANEXO A

- Este anexo contém a produção científica relacionada a esta tese, bem como outros trabalhos publicados em parceria durante o doutorado da candidata.

1. **LUNA-DULCEY, LIANY**; TOMASIN, REBEKA; NAVES, MARINA A.; DA SILVA, JAMES A.; COMINETTI, MARCIA R. *Autophagy-dependent apoptosis is triggered by a semi-synthetic [6]-gingerol analogue in triple negative breast cancer cells*. ONCOTARGET, v. 9, p. 30787-30804, 2018.
2. **LUNA-DULCEY, LIANY**; ALMADA DA SILVA, JAMES; JIMENEZ-RENARD, VERONICA; CALEIRAS, EDUARDO; MOURON, SILVANA; QUINTELA-FANDINO, MIGUEL; COMINETTI, MARCIA R. *[6]-Gingerol-Derived Semi-Synthetic Compound SSi6 Inhibits Tumor Growth and Metastatic Dissemination in Triple-Negative Breast Cancer Xenograft Models*. CANCERS, v. 13, p. 2855, 2021.

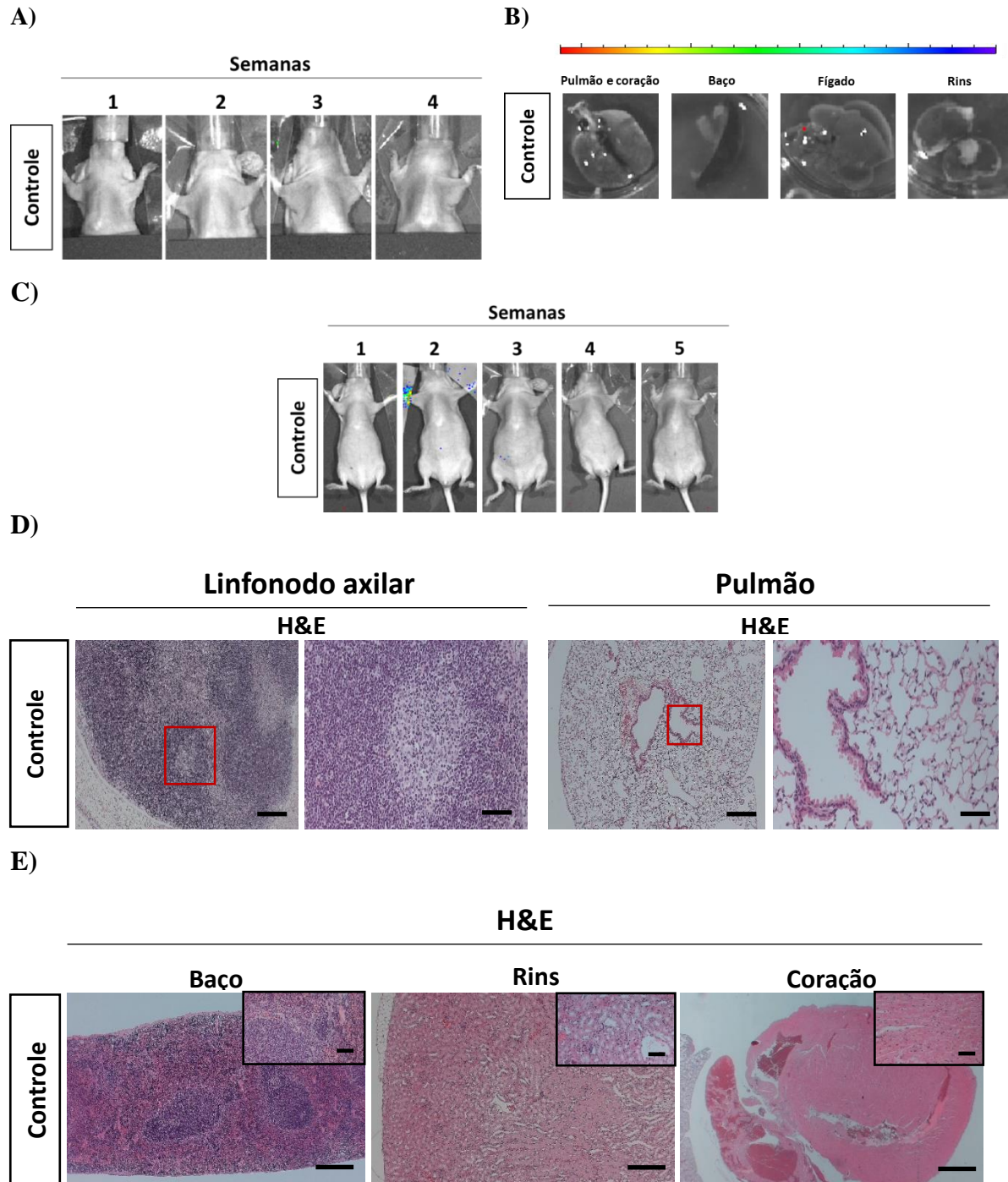
- Alguns trabalhos publicados em colaboração:

3. NAVES, MARINA A.; GRAMINHA, ANGELICA E.; VEGAS, LEGNA C.; **LUNA-DULCEY, LIANY**; HONORATO, JOÃO; MENEZES, ANTÔNIO C. S.; BATISTA, ALZIR A.; COMINETTI, MARCIA R. *Transport of the Ruthenium Complex [Ru(GA)(dppe) 2]PF6 into Triple-Negative Breast Cancer Cells Is Facilitated by Transferrin Receptors*. MOLECULAR PHARMACEUTICS, v. 16, p. 1167-1183, 2019.
4. CUNHA, BEATRIZ N.; **LUNA-DULCEY, LIANY**; PLUTIN, ANA M. ; SILVEIRA, RAFAEL G. ; HONORATO, JOÃO ; CAIRO, RAÚL R. ; DE OLIVEIRA, TAMIREZ D.; COMINETTI, MARCIA R. ; CASTELLANO, EDUARDO E. ; BATISTA, ALZIR A. *Selective Coordination Mode of Acylthiourea Ligands in Half-Sandwich Ru(II) Complexes and Their Cytotoxic Evaluation*. INORGANIC CHEMISTRY, v. 59, p. 5072-5085, 2020.
5. BAPTISTA MORENO MARTIN, ANA CAROLINA; TOMASIN, REBEKA; **LUNA-DULCEY, LIANY**; GRAMINHA, ANGÉLICA ELEN; ARAÚJO NAVES, MARINA; TELES, RAMON HANDERSON GOMES; DA SILVA, VINICIUS DUVAL; DA SILVA, JAMES ALMADA; VIEIRA, PAULO CEZAR; ANNABI, BORHANE; COMINETTI, MÁRCIA REGINA. *[10]-Gingerol improves doxorubicin anticancer activity and decreases its side effects in triple negative breast cancer models*. CELLULAR ONCOLOGY, v. 43, p. 915-929, 2020.
6. GIMENES, LEILA; **LUNA-DULCEY, LIANY**; BATISTA, JOAO M.; DOS SANTOS, FERNANDO M.; POPOLIN, CECÍLIA P.; COMINETTI, MARCIA R.; FERNANDES, JOAO B.; STAERK, DAN. *Structure Elucidation and Absolute Configuration Determination of Nortriterpenoids from Picramnia glazioviana*. JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, v. 83, p. 1859-1875, 2020.
7. DE OLIVEIRA, TAMIREZ D.; PLUTÍN, ANA M.; **LUNA-DULCEY, LIANY**; CASTELLANO, EDUARDO E.; COMINETTI, MÁRCIA R.; BATISTA, ALZIR A. *Cytotoxicity of ruthenium-N,N-disubstituted-N--acylthioureas complexes*. MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS, v. 115, p. 111106, 2020.

ANEXO B1

Este anexo contém informações relacionadas ao Capítulo 2 e inclui 05 FIGURAS

Figura B1 – Imagens do camundongo utilizado como controle. Nos modelos xenográficos sem e com ressecção do tumor primário foi selecionado um (01) camundongo como controle, para subtrair o valor da luminescência natural emitida pelo corpo do animal. **(A)** As imagens correspondem ao animal controle com medição da luminescência no segmento superior referente ao primeiro modelo e **(B)** Análise *ex vivo* dos órgãos realizada no IVIS *spectrum*. Imagens de **(C)** corpo inteiro referente ao segundo modelo com ressecção do tumor primário. **(D)** Imagens representativas de H&E mostrando linfonodos axilares, pulmão, **(E)** baço, rins e coração do animal controle. Barras de escala= 200 μ m e 50 μ m.

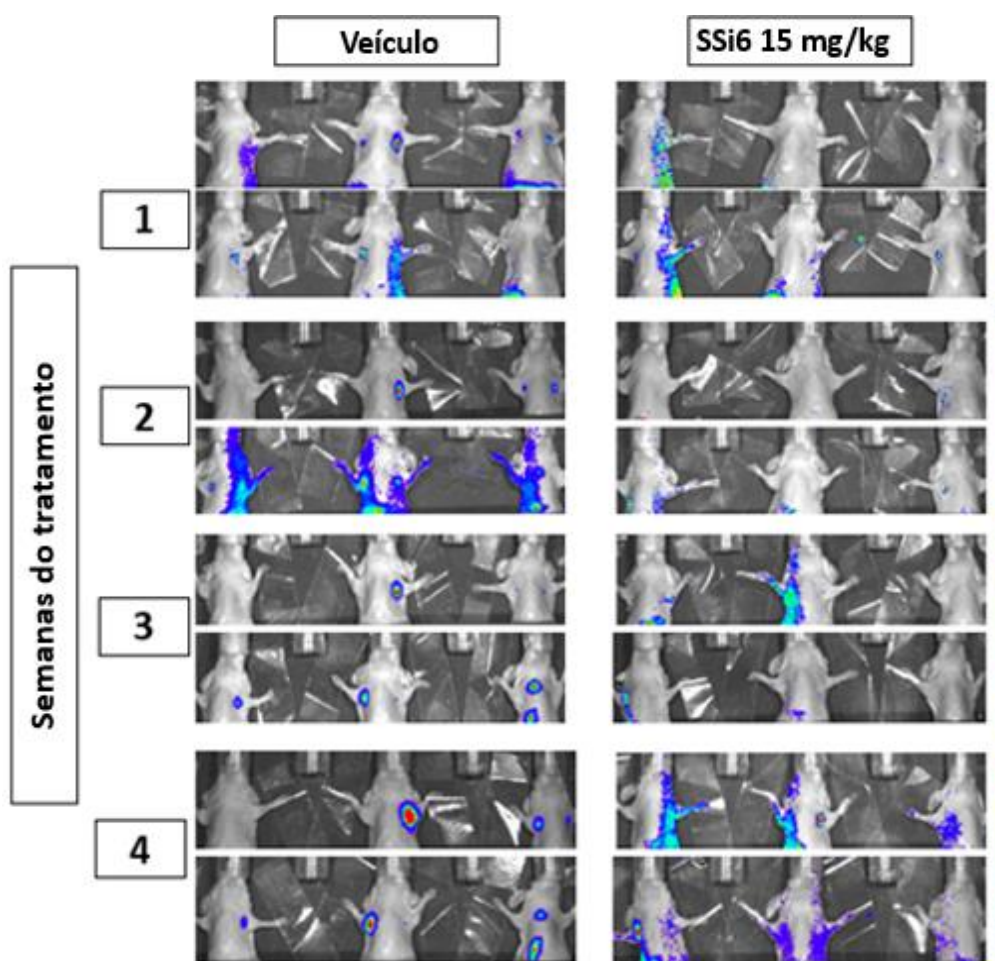


ANEXO B2

Este anexo inclui 04 FIGURAS

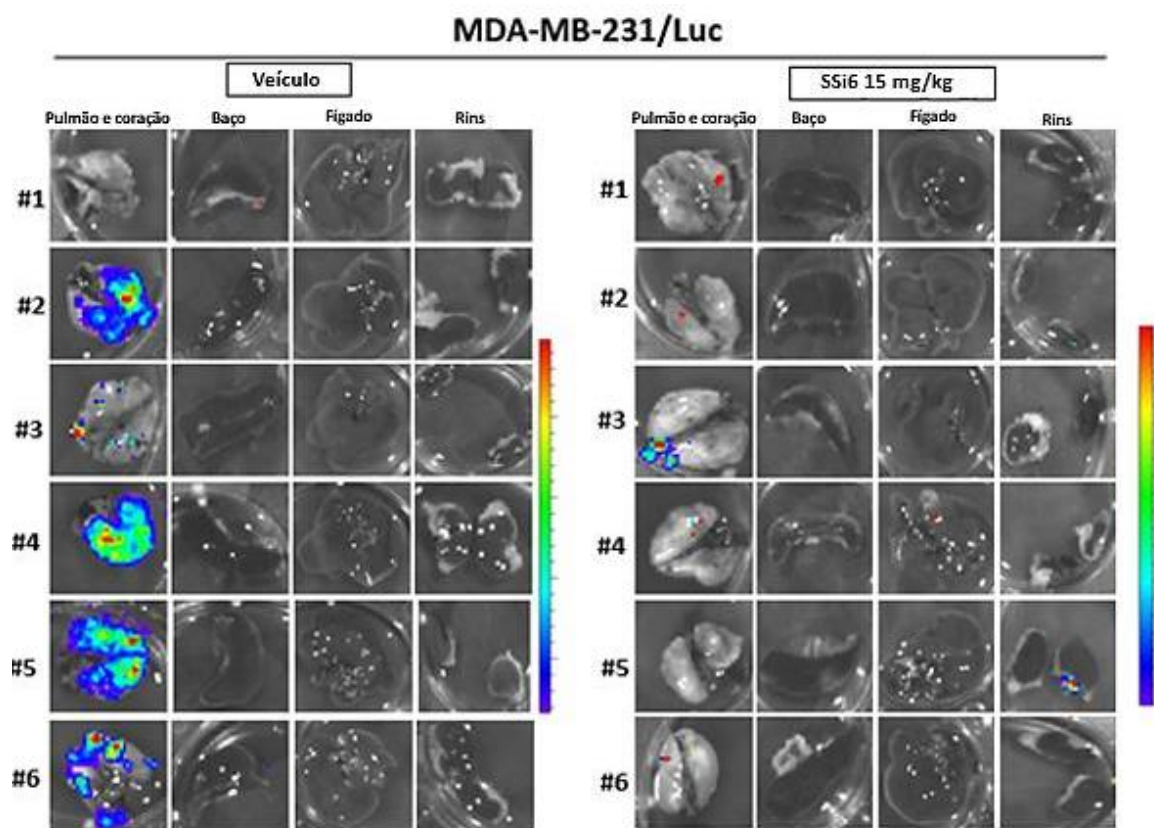
Figura B2 – SSi6 inibe as metástases espontâneas nos modelos xenográficos. Células MDA-MB-231/Luc foram cirurgicamente transplantadas no tecido mamário de camundongos fêmeas da linhagem *Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu*. **(A)** Imagens representativas do grupo veículo e SSi6 com metástases em gânglios linfáticos e área torácica nas semanas do tratamento. Os tumores primários foram cobertos para permitir a visualização de pequenos focos metastáticos. **(B)** Imagens *ex vivo* de bioluminescência de pulmão, baço, fígado e rins de todos os camundongos do grupo do veículo e tratados com SSi6 15 mg/kg do modelo xenográfico ortotópico. **(C)** Imagens de bioluminescência de corpo inteiro do modelo xenográfico de metástase com ressecção do tumor primário tanto do grupo veículo (n = 11) como do grupo tratado com SSi6 15 mg/kg (n = 15). **(D)** Antes da eutanásia, os camundongos dos grupos do segundo modelo foram injetados com luciferina (vide materiais e métodos) e os órgãos foram analisados por bioluminescência no equipamento IVIS *spectrum*.

A)



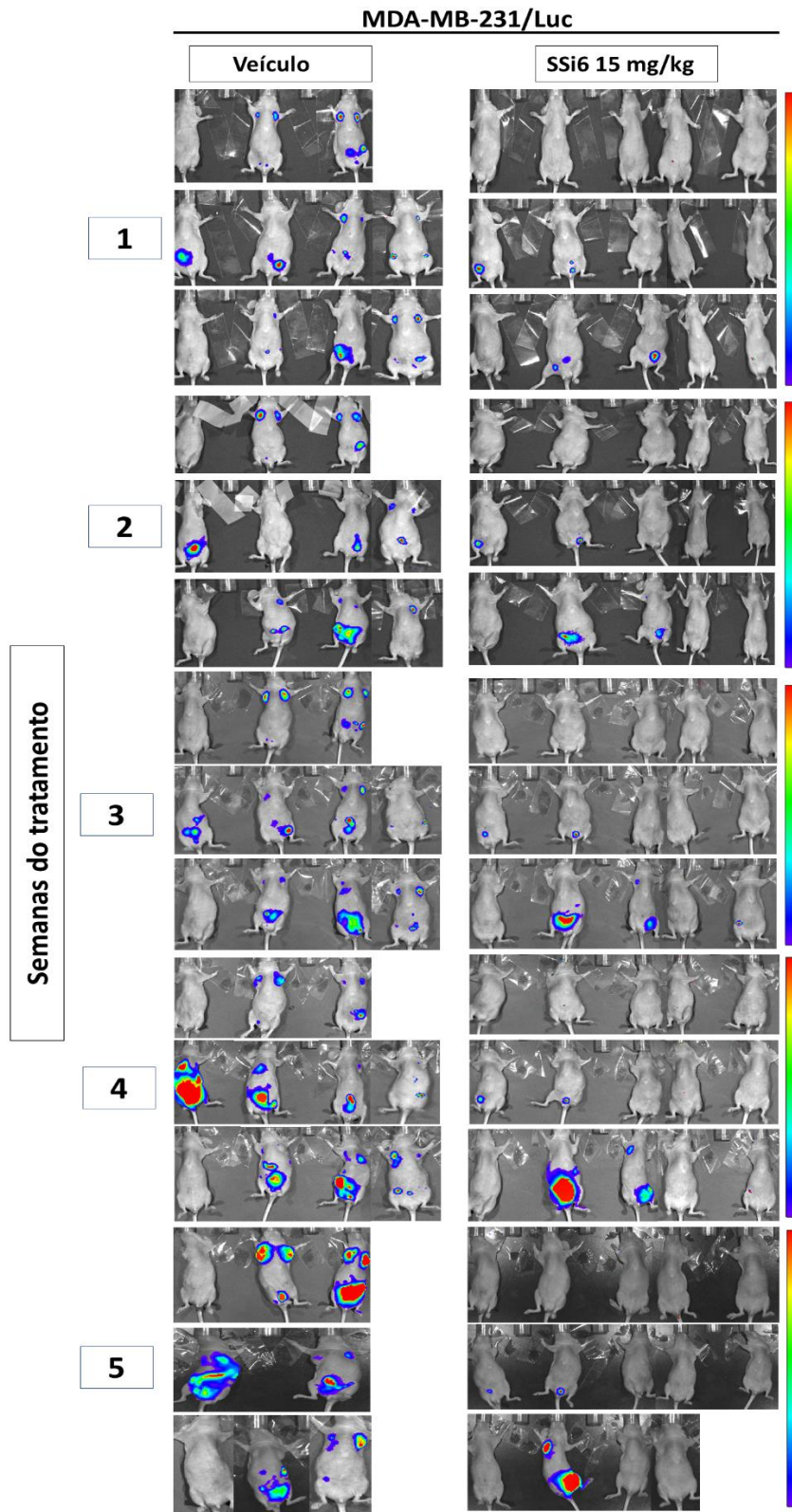
- Continuação **Figura B2**

B)



- Continuação **Figura B2**

C)



- Continuação **Figura B2**

D)

