



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF

**Efeitos de um derivado semissintético do [6]-gingerol na
autofagia e apoptose em células de câncer de mama**

Liany Johanna Luna Dulcey

São Carlos - SP

2017

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

**Efeitos de um derivado semissintético do [6]-gingerol na
autofagia e apoptose em células de câncer de mama**

Liany Johanna Luna Dulcey*

Dissertação apresentada ao
Programa interinstitucional de Pós-
graduação em Ciências
Fisiológicas, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti

***bolsista CAPES**

São Carlos - SP

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Uary Johanna Luna Dulcey, realizada em 09/05/2017:

Prof. Dra. Márcia Regina Cometti
UFSCar

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira
UFSCar

Prof. Dra. Cíelia Akiko Hiruma Lima
UNESP

Dedico este trabalho a meus pais e irmãos: Susana, Álvaro, Iván Dario e Daniel. Obrigada pelo grande apoio, compreensão e palavras de fortaleza. Amo vocês!

*¹El que habita al abrigo del altísimo
morará bajo la sombra del Omnipotente.*

*²Diré yo a Jehová: esperanza mía y castillo mío;
mi Dios en quien confiaré.*

Salmo 91: 1-2

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente:

A Deus, por acompanhar-me durante todo meu caminho tanto pessoal como profissional. Por me abençoar com oportunidades maravilhosas que permitiram cumprir todos meus sonhos.

Aos meus pais Susana e Álvaro, por me apoiarem incondicionalmente durante toda minha trajetória. Obrigada por oferecerem-me a oportunidade de cumprir este sonho, pelo esforço que eu sei que foi enorme para que eu chegasse até aqui. Espero algum dia pagar tudo o que vocês me deram. MUITÍSSIMO obrigada! Amo vocês imensamente.

Aos meus irmãos Iván Dario e Daniel, pelas palavras de apoio e carinho. Lembro-me cada dia, de todas nossas tardes de risadas, piadas e muita comida.

Ao meu namorado Isaac, pelo infinito apoio durante estes dois anos de mestrado, agradeço a Deus por colocar você em meu caminho. Obrigada por acreditar em mim, ainda quando eu mesma duvidava de minhas capacidades. Espero seguir construindo minha vida ao lado de você.

À minha orientadora Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti, pela orientação, dedicação e confiança para realizar este trabalho. Obrigada professora Márcia por permitir-me pertencer ao Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN), além das discussões científicas que contribuíram para meu crescimento profissional.

Às minhas colegas do LABEN, que sempre estiveram disponíveis para auxiliar-me tanto em assuntos profissionais quanto pessoais, tornando minha estadia no Brasil uma experiência prazerosa. Obrigada pelos momentos de descontração e principalmente pelas “gordices”.

À Katia Mara e Legna Colina do Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI), pela amizade e por contarem comigo para a realização de diversos trabalhos.

Ao Prof. Dr. James Almada da Silva, pela síntese e disponibilização das substâncias, [6]-gingerol, 2,4-dinitrofenilhidrazona e SSi6 para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Liliana Torcoroma García, quem me motivou a iniciar uma vida acadêmica na graduação. Agradeço também por permitir a ponte entre a Universidade Federal de São Carlos-UFSCar e a “Universidad de Santander”-UDES.

À Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, por me permitir realizar meu estágio no Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE) do departamento de Química da UFSCar. Agradeço também à toda sua equipe, que em seu momento estiveram sempre prontos para me ajudar.

Ao Programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela eficiência nos serviços burocráticos prestados.

Aos órgãos de fomento, em especial à CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Neste trabalho, descrevemos um derivado semissintético do [6]-gingerol chamado de SSi6, que induz efeitos citotóxicos sobre a linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, mostrando uma maior seletividade para estas células, quando comparado à linhagem não tumoral MCF-10A, além disso, foi determinado que a substância provoca a indução de autofagia e apoptose nas células tumorais, com efeitos menos pronunciados nas células não tumorais. A coexistência de ambos eventos (autofagia e apoptose) foi demonstrada através de citometria de fluxo, que evidenciou o aumento da porcentagem de células apoptóticas após 24 horas de tratamento, estes resultados também foram confirmados pela análise da expressão gênica e proteica da caspase-3 utilizando PCR em tempo real e *western blotting* respectivamente. A indução da autofagia nas células tratadas com SSi6 foi comprovada através dos ensaios de detecção das organelas vesiculares ácidas (AVOs) e a expressão dos genes que codificam para as proteínas associadas a microtúbulos LC3-I e II permitindo quantificar a abundância de autofagossomos nas células MDA-MB-231. Desta forma, esses resultados indicam que o SSi6 tem potencial para induzir autofagia e apoptose, além de possuir propriedades antitumorais e antimetastásicas nas células tumorais de mama MDA-MB-231.

Palavras chaves: câncer de mama, atividade antitumoral, autofagia e apoptose, compostos do gengibre, produtos naturais.

ABSTRACT

In this work, we describe a semisynthetic derivative of [6]-gingerol called SSi6, which induces cytotoxic effects on the MDA-MB-231 breast tumor, showing a greater selectivity for these cells when compared to the non-tumor MCF-10A. In addition, the substance was determined to induce autophagy and apoptosis in tumor cells, with less pronounced effects on non-tumor cells. The coexistence of both events (autophagy and apoptosis) was demonstrated by flow cytometry, which evidenced an increase in the percentage of apoptotic cells after 24 hours of treatment, these results were also confirmed by the analysis of the gene and protein expression of caspase-3 using Real-time PCR and western blotting respectively. Induction of autophagy in SSi6-treated cells has been demonstrated through acid vesicle organelle (AVOs) detection assays and the expression of genes encoding the LC3-I and II microtubule-associated proteins to quantify the abundance of autophagosomes in MDA-MB-231 cells. Thus, these results indicate that SSi6 has the potential to induce autophagy and apoptosis, as well as antitumor and antimetastatic properties in MDA-MB-231 breast tumor cells.

Keywords: breast cancer, antitumor activity, apoptosis and autophagy, ginger compounds, natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais causas de câncer.....	2
Figura 2 - Processo de metástase.....	6
Figura 3 - Processo de transição epitelial mesenquimal.....	7
Figura 4 - Vias de sinalização da apoptose.....	9
Figura 5 - Etapas do processo de autofagia.....	13
Figura 6 - Possível conexão entre apoptose e autofagia.....	15
Figura 7 - Estrutura molecular das substâncias.....	21
Figura 8 - Efeitos do SSi6 na morfologia celular das células MDA-MB-231.....	33
Figura 9 - Efeitos do SSi6 na morfologia das células não tumorais de mama MCF-10A.....	34
Figura 10 - Efeitos das substâncias na morfologia celular das células MDA-MB-231 e MCF-10A.....	35
Figura 11 - Efeitos do SSi6 e 6G sobre a viabilidade celular.....	36
Figura 12 - Efeitos do SSi6 e 6G na formação de colônias de células MDA-MB-231..	38
Figura 13 - Efeitos do SSi6 e 6G na formação de organelas ácidas vesiculares (AVOs).....	40
Figura 14 - Efeitos do SSi6 e 6G na indução de autofagia através do ensaio de imunocitoquímica.....	42
Figura 15 - Efeitos de SSi6 na distribuição do ciclo celular de células MDA-MB-231.	43
Figura 16 - Efeitos do SSi6 e 6G na indução da apoptose em células MDA-MB-231..	45
Figura 17 - Efeitos do SSi6 e 6G sobre a expressão de genes relacionados à autofagia e apoptose em células MDA-MB-231.....	47
Figura 18 - Efeitos do SSi6 e 6G sobre o nível proteico da LC3 e caspase-3 em células tumorais MDA-MB-231.....	49
Figura 19 - Efeitos do SSi6 na migração de células MDA-MB-231 (ensaio de <i>Wound Healing</i>).....	51
Figura 20 – Efeitos do SSi6 na invasão de células da linhagem MDA-MB-231.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – As dez principais causas de morte por câncer no Brasil segundo o sexo	2
Tabela 2 – Principais fármacos antitumorais derivados de plantas medicinais.....	17
Tabela 3 – Primers da reação de PCR em tempo real	27
Tabela 4 – Valores de IC ₅₀ do [6]-gingerol (6G), 2,4-DNFH e do SSi6 nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A	36

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-DNFH – 2,4-dinitrofenilhidrazona

6G – [6]-gingerol

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

AO – Laranja de acridina (*Acridine Orange*)

Atg – Genes relacionados com autofagia (*Autophagy Related Genes*)

AVOs – Organelas ácidas vesiculares (*Acidic Vesicular Organelles*)

CAS3 – Caspase-3

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (*Complementary DNA*)

DAPI – 4', 6-diamino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DMEM – Meio Dulbecco's modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

dNTPs – Desoxirribonucleótidos fosfatos (*Deoxyribonucleotide phosphates*)

EGF – Fator de crescimento epidermal (*Epidermal growth factor*)

ER+ – Receptor de estrogênio

FBS – Soro fetal bovino

HER+ – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico

HF – Fibroblastos humanos

HS – Soro de cavalo

HSA – Albumina soro humana

IC₅₀ – Concentração inibitória do 50% da viabilidade celular

MAP1LC3B – Proteínas associadas aos microtúbulos 1A/1B cadeia leve 3B

MEC – Matriz extracelular

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MMP-2 – Matriz metaloproteínase 2

MMP-9 – Matriz metaloproteínase 9

MMPs – Metaloproteínases da matriz extracelular

mTOR – Alvo da rapamicina (*Mechanistic target of rapamycin*)

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

P62 – Complexo proteico associado ao envelope nuclear

PAS – Local de montagem do fagóforo (*Phagophore assembly site*)

PBS – Tampão fosfato salina

PCD – Morte celular programada (*Programmed Cell Death*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – Ficoeritrina

PI – Iodeto de propídio

PR+ – Receptor de progesterona

RNA – Ácido ribonucleico

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

TN – Triplo negativo

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia do câncer	1
1.2 Epidemiologia do câncer de mama	2
1.3 Classificação molecular do câncer de mama	3
1.4 Processo de metástase	5
1.4.1 Transição epitelial-mesenquimal associada à progressão tumoral e metástase	6
1.5 Morte celular programada.....	7
1.5.1 Autofagia	10
1.5.2 Relação da autofagia com apoptose.....	14
1.6 Produtos naturais como fonte de novos fármacos antitumorais	16
1.6.1 Gengibre e ações farmacológicas atuais.....	17
1.6.2 Modificação de produtos naturais: qual é sua finalidade?.....	19
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Materiais	21
3.1.1 [6]-gingerol, 2,4-DNFH e SSi6.....	21
3.1.2 Linhagens e cultivos celulares	22
3.2 Métodos	23
3.2.1 Morfologia Celular	23
3.2.2 Citotoxicidade.....	23
3.2.3 Ensaio clonogênico (formação de colônias).....	24
3.2.4 Detecção das organelas vesiculares ácidas (AVOs).....	24
3.2.5 Imunocitofluorescência	25
3.2.6 Ciclo celular.....	25
3.2.7 Determinação de taxa apoptótica com Anexina V por citometria de fluxo	26
3.2.8 PCR em tempo real (qPCR)	26
3.2.9 Análise do nível proteico por <i>western blotting</i>	28
3.2.10 Ensaio de migração celular <i>Wound Healing</i>	28
3.2.11 Invasão Celular em Matrigel	29

3.2.12	Análise estatística	30
4.	RESULTADOS	31
4.1	Morfologia celular	31
4.2	Citotoxicidade	36
4.3	Ensaio clonogênico (formação de colônias)	37
4.4	Determinação das Organelas Ácidas Vesiculares (AVOs).....	39
4.5	Imunocitofluorescência.....	41
4.6	Ciclo celular	43
4.7	Determinação de taxa apoptótica com Anexina V por citometria de Fluxo	44
4.8	PCR em tempo real (qPCR).....	46
4.8	Análise do nível proteico por <i>western blotting</i>	48
4.9	Ensaio de Migração celular <i>Wound Healing</i>	50
4.10	Invasão celular em Matrigel.....	52
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer

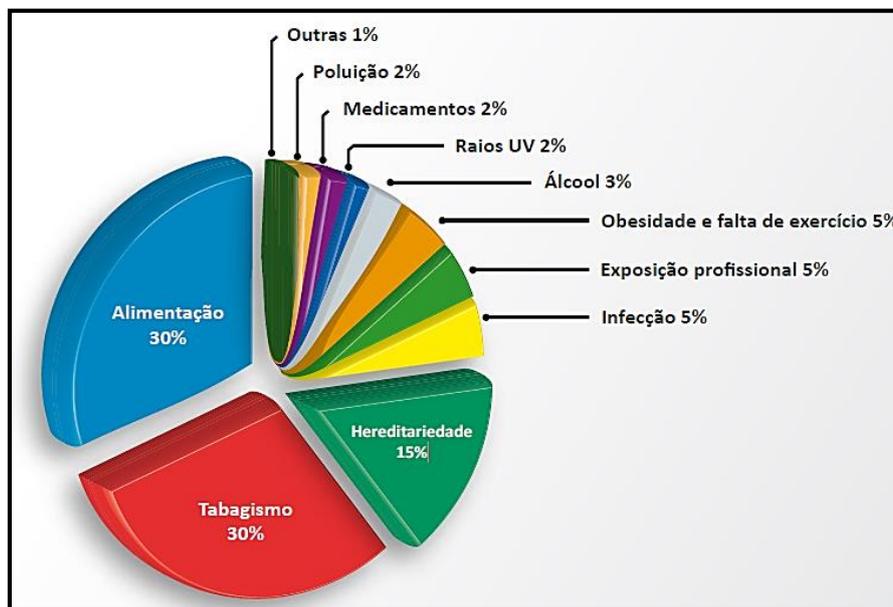
Na atualidade o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, precedido somente pelas doenças cardiovasculares (OMS, 2014). Apesar dos avanços terapêuticos na área, o número de novos casos aumentou em aproximadamente 70% nos últimos 20 anos (OMS, 2014). Durante o ano 2012, um estudo realizado pelo projeto Globocan/IARC (*International Agency for Research on Cancer*), determinou que dos 14 milhões de novos casos de câncer, mais de 60% são de países em desenvolvimento e 70% das mortalidades constatadas (8 milhões de óbitos) também ocorreram nesses países (AICR, 2008; COLEMAN et al., 2008; INCA, 2016). Portanto, caso medidas preventivas não forem amplamente aplicadas e formas mais eficazes de tratamento não sejam desenvolvidas, os casos de câncer continuarão aumentando e causando mortes tanto em países em desenvolvimento e em países desenvolvidos.

O termo câncer é descrito como um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011). Sua origem se dá por condições multifatoriais, esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (carcinogênese) (ROBLES ALMENTA; ITARTE, 2014). Aproximadamente 30% da mortalidade por câncer ocorre devido a fatores de risco como hábitos de vida e dieta. O consumo de tabaco e álcool, índice de massa corporal elevado, consumo reduzido de frutas e verduras, inatividade física e algumas infecções crônicas são fatores de risco para o câncer, sendo significativos em países com renda baixa e média (IARC, 2012) (Figura 1). As abordagens orientadas para enfrentar esse problema de saúde pública são necessariamente múltiplas, incluindo: ações de educação para saúde em todos os níveis da sociedade, prevenção orientada para indivíduos e grupos, geração de opinião pública, apoio e estímulo à formulação de legislação específica para o enfrentamento de fatores de risco relacionados à doença e o fortalecimento de ações em escolas e ambientes de trabalho (LACEY et al., 2009).

No Brasil, a estimativa para os anos de 2016 e 2017, é de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer (esta cifra não inclui os casos de câncer de pele não-melanoma) (INCA, 2016). Estudos epidemiológicos mostram que o câncer de próstata em homens e de mama em mulheres serão os mais frequentes na população, com valores de 61 e 58 mil de novos casos. Outros tipos de câncer comuns na população masculina serão pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas

mulheres, o câncer de intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (Tabela 1) (AICR, 2008; INCA, 2016).

Figura 1 - Principais causas de câncer. *



*Extraído de (CÂNCER, 2011; IARC, 2012).

Tabela 1 – As dez principais causas de morte por câncer no Brasil segundo o sexo. Com exceção do câncer pele de tipo não melanoma. *

Localização Primária	Casos	%		Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	♀ ♂	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%		Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%		Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%		Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%		Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%		Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%		Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%		Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Extraído e modificado de (INCA, 2016).

1.2 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é o mais prevalente em mulheres em todo o mundo. Para o ano 2012, aconteceram 1,67 milhões de novos casos em nível mundial, sendo responsável por 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. Neste mesmo ano foram considerados 500 mil mortes por câncer de mama nas mulheres, o que corresponde a 15% de todos os óbitos por câncer no sexo feminino, devido a isto, é

considerada a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos, somente atrás do câncer de pulmão (INCA, 2016). As estimativas no Brasil, para os anos 2016/2017, indicam que são esperados aproximadamente 58.000 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (CÂNCER, 2011).

Diversos fatores de risco são conhecidos para o câncer de mama, porém, na maioria das mulheres afetadas não é possível identificar os fatores de risco específicos (BLACK et al., 1997). Alguns fatores conhecidos envolvidos são: envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher (menopausa tardia e idade média dos primeiros partos), história familiar de câncer de mama, consumo intenso de bebidas alcoólicas, sobrepeso/obesidade, sedentarismo, além de alterações e mutações em genes supressores de tumores como o *BRCA1*, *BRCA2* e *P53*, os quais estão relacionados à morte celular programada por apoptose (PARKIN, 2001). Mutações neste último gene são encontradas em torno de 40% de todos os cânceres de mama (AAS et al., 1996; ESTEVES et al., 2009; NAROD et al., 2002).

O câncer de mama pode se iniciar em diversas áreas da mama, como nos ductos, lóbulos e em alguns casos no tecido intermediário (YANG, J. et al., 2016). A maioria é do tipo carcinoma, um câncer que se inicia nas células epiteliais que revestem os tecidos da mama. Um subtipo do câncer carcinoma que é muito frequente nas mulheres, é o adenocarcinoma, que tem sua origem em células que constituem o revestimento de glândulas de secreção externa (glândulas do leite, lóbulos da mama). Como este câncer é originado em células que estão em contínua divisão celular, apresenta o maior risco de mutações (WEIGELT; REIS-FILHO, 2009). Outros tipos de câncer que ocorrem com menos frequência na mama, são os sarcomas, que podem se iniciar nas células musculares, adipócitos ou no tecido conjuntivo (RAMALHO et al., 2016).

1.3 Classificação molecular do câncer de mama

Os carcinomas de mama representam um grupo de tumores que apresentam alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. Tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas (STRICKER; BROWN, 2017). Essas diferenças são justificadas pela existência de diversos subtipos moleculares do carcinoma de mama. Essa complexidade torna difícil a definição de condutas clínicas, podendo por vezes propiciar tratamentos inadequados. Nos últimos anos, a tecnologia de microarranjos de DNA permitiu a análise paralela de mais de 8 mil genes, correlacionando perfis de expressão

gênica dos cânceres de mama com a evolução clínica dos pacientes e com as respostas às terapias utilizadas (YEO et al., 2017).

Panéis imunoistoquímicos tem sido propostos, identificando-se diferentes subtipos moleculares (CIANFROCCA; GRADISHAR, 2009; ZEPEDA-CASTILLA et al., 2008). O subtipo luminal A é o que apresenta o melhor prognóstico, já que são tumores que são positivos (na sua maioria) para o receptor de estrogênio (ER+) e apresentam baixo grau histológico (SOTIRIOU et al., 2003). Por outro lado, os tumores luminais B são positivos para receptores hormonais (ER+, PR+ “receptor de progesterona”) e se caracterizam por expressarem baixos níveis de receptores do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+) e maior taxa de proliferação, sendo na maioria das vezes de alto grau histológico (SØRLIE et al., 2003). O subtipo que super expressa o HER2, como o próprio nome indica, possui elevada expressão do oncogene HER2, porém apresenta negatividade para receptores hormonais (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004). Esse subgrupo possui uma elevada taxa de recorrência, entretanto se beneficia de terapias alvo específicas, tais como a herceptina, um anticorpo específico para HER2. Por outro lado, o subtipo basal triplo negativo (TN), apresenta ausência de imunomarcacão tanto para os receptores hormonais (ER-, PR-) quanto para a superexpressão do HER2, portanto, torna-se o subtipo de câncer mais agressivo e conseqüentemente o que possui o pior prognóstico (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004). Por conseguinte, os tratamentos tradicionais como a terapia hormonal (tamoxifeno e inibidores da aromatase) e fármacos dirigidos contra o HER2 não são eficazes (IRVIN; CAREY, 2008). Dependendo do estágio de seu diagnóstico, o câncer de mama triplo negativo (CMTN) pode ser particularmente mais invasivo e com maior probabilidade de recorrência do que os outros subtipos de câncer de mama (NARAYANAN; DALTON, 2016).

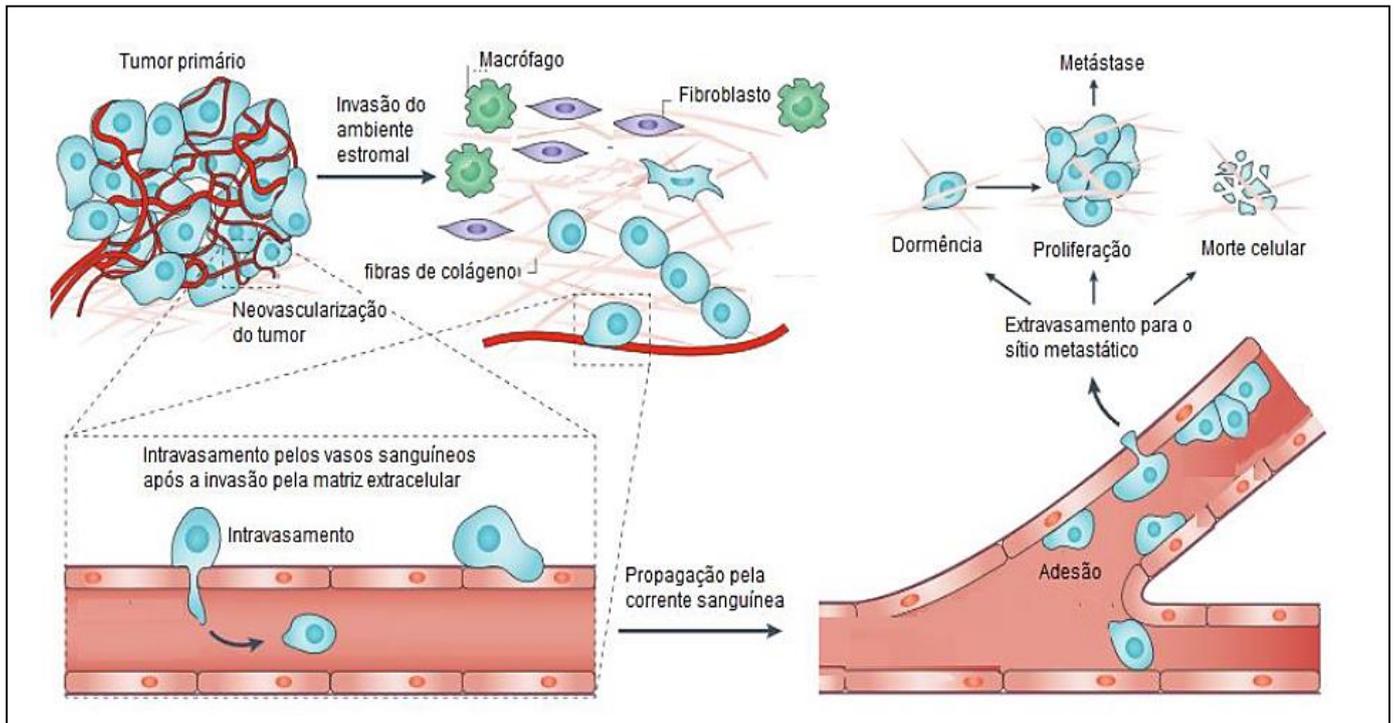
Devido à grande heterogeneidade do câncer de mama, o desenvolvimento de fármacos antitumorais é um dos maiores desafios da área. Os medicamentos quimioterápicos ideais devem agir seletivamente para matar ou inibir o crescimento das células neoplásicas, deixando as células normais intactas (BOYD; PAULL, 1995). Atualmente a maioria desses medicamentos antitumorais ocasionam graves danos no DNA, tanto nas células tumorais, como também nas células normais, provocando diversos efeitos colaterais associados à terapia. Estas particularidades impõem um grande desafio para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, a qual é uma tarefa difícil e complexa, mas indispensável.

1.4 Processo de metástase

O papel da disseminação dos tumores sólidos provoca de maneira direta ou indireta a maioria das mortes (90%) relacionadas com o câncer (HÜSEMANN et al., 2008; PERRET; CREPIN, 2008). A metástase é consequência de interações entre as células tumorais e seu ambiente. Essa interação faz com que as células tumorais sejam capazes de evadir a vigilância imunológica, ativar a angiogênese e a invasão, além de dar suporte à resistência terapêutica (JOYCE; POLLARD, 2009; RELATION; DOMINICI; HORWITZ, 2017). Muitas pesquisas tem como objetivo elucidar os aspectos biológicos e genéticos que contribuem à difusão das células tumorais para tecidos adjacentes. Estas pesquisas recentemente determinaram que a difusão das células neoplásicas se devem a fenômenos de cooperação das moléculas na adesão celular, degradação da matriz extracelular (MEC) pelas proteases e pela vascularização tumoral (angiogênese) (CLARK; VIGNJEVIC, 2015; TANABE; LIST, 2017). Os constituintes da MEC cooperam diretamente ou indiretamente no processo de metástase, pelo fato de conter componentes moduladores de adesão, proliferação e migração celular. Adicionalmente, a MEC pode regular o comportamento celular por meio de vários mecanismos: primeiro, através da composição de suas proteínas em um determinado tecido e segundo, por interações sinérgicas entre fatores de crescimento e moléculas de adesão (ERDOGAN; WEBB, 2017). Neste contexto, a Figura 2 mostra a cascata metastática, onde pode ser observada a proliferação celular para formar uma massa tumoral primária até a formação do tumor secundário no órgão alvo. No tumor primário ocorre a formação de novos vasos sanguíneos (vascularização tumoral) para prover os nutrientes que o tumor necessita para crescer, processo conhecido como angiogênese (SHRIHARI, 2017). As células tumorais possuem a característica de se dividir para promover a invasão celular, nesta etapa, as células neoplásicas atravessam duas estruturas importantes que são a membrana basal e o estroma intersticial, que por meio da secreção de uma variedade de enzimas proteolíticas (proteases-metaloproteínases) degradam a MEC (FODA; ZUCKER, 2001; STEEG, 2016). Estas enzimas são produzidas por vários tipos de células como as tumorais, células do estroma e por alguns tipos de leucócitos, que formam o microambiente tumoral e que são capazes de provocar a proteólise da MEC e de cada um de seus componentes, acentuando ainda mais o processo de invasão celular. Como resultado deste processo, ocorre a disseminação massiva de células tumorais pela corrente sanguínea para locais determinados, onde as células aderem ao endotélio vascular do

órgão alvo e proliferam, formando o tumor secundário ou metástases (NGUYEN; BOS; MASSAGUÉ, 2009; STEEG, 2016).

Figura 2 - Processo de metástase. A colonização metastática representa a interação entre as células tumorais e seu microambiente. Os passos básicos deste processo incluem a progressão do tumor primário, que permite a invasão das células tumorais através dos vasos linfáticos ou sanguíneos até órgãos adjacentes ou distantes, formando as metástases. *



*Extraído e Modificado de (REYMOND; D'AGUA; RIDLEY, 2013).

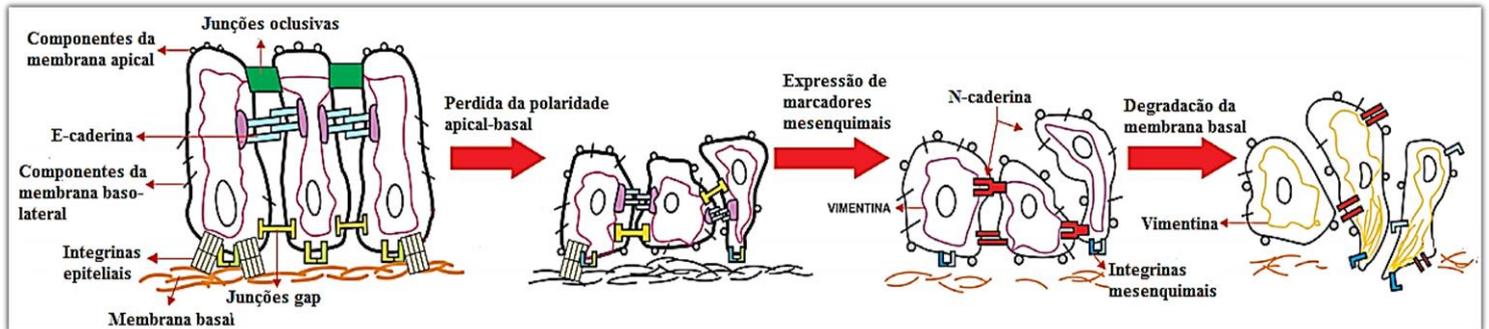
1.4.1 Transição epitelial-mesenquimal associada à progressão tumoral e metástase

A transição epitelial-mesenquimal (TEM), é um processo biológico no qual as células epiteliais polarizadas que normalmente interagem com membrana basal, perdem a sua organização e junções intercelulares, o que permite adquirir um fenótipo mesenquimal (podem se diferenciar em uma variedade de tipos de células) (KALLURI; ZEISBERG, 2006). A TEM é essencial para vários processos de desenvolvimento, incluindo a formação de mesoderma e tubo neural, além de participar na cicatrização de feridas e principalmente no início da metástase para a progressão tumoral. Esse processo começa com a perda da polaridade apical basal, acompanhado da diminuição da expressão de claudinas e ocludinas (proteínas transmembranares, importantes na junções oclusivas) (RADISKY, 2005). Proteínas de superfície como a E-caderina e integrinas, que mediam as conexões entre as células vizinhas e a membrana basal são substituídas por N-caderina

e integrinas, que induzem à células a fazer conexões e uniões transitórias, adquirindo finalmente o fenótipo mesenquimal (vide Figura 3).

Figura 3 - Processo de transição epitelial mesenquimal. Processo pelo qual as células epiteliais perdem sua polaridade celular e adesão célula-célula, e ganham propriedades migratórias e invasivas para se tornar células-tronco mesenquimais. A TEM é essencial para vários processos de desenvolvimento, além de ser fundamental no início da metástase para a progressão do câncer.

*



*Extraído e modificado (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014).

Na sua fase inicial, os carcinomas são caracterizados por um aumento da proliferação de células epiteliais e da angiogênese. A aparição subsequente do processo de invasão celular ocorre na fase final do processo, levando eventualmente a disseminação metastática (KALLURI; ZEISBERG, 2006). As alterações genéticas e epigenéticas que sofrem as células tumorais durante a formação do tumor primário, provocam que essas células respondam às sinais indutoras de TEM, que vêm do estroma associado ao tumor. Alguns fatores de crescimento (TGF- β e EGF) e seus receptores, que são moléculas relacionadas com a MEC e várias vias de sinalização celular, são importantes para que o processo de TEM seja iniciado (KALLURI; WEINBERG, 2010). O regulamento molecular da TEM é muito complexo, pois envolvem um grande número de vias de sinalização que agem de forma independente ou interligadas, a maioria destas vias convergem no controle da expressão de E-caderina, cuja regulação é de vital importância neste processo, pois leva à perda de junções intercelulares e desestabilização da arquitetura epitelial (TIWARI et al., 2012).

1.5 Morte celular programada

A morte celular programada (MCP) é um processo ativo que inclui uma série de sinais que levam à morte das células (LEIST; JÄÄTTELÄ, 2001). Diferentes doenças, lesões e infecções podem influenciar para que este processo seja ativado. A MCP foi classificada em vários tipos, sendo caracterizada pela morfologia celular durante o

processo de morte. Encontra-se descritos diversos tipos de morte celular (KROEMER, G et al., 2009; OUYANG et al., 2012), sendo os três principais, a apoptose (morte celular tipo I), autofagia (morte celular tipo II) e a necrose (morte celular tipo III) (GODLEWSKI; KOBYLINSKA, 2016; SHAKERI; KHEIROLLAHI; DAVOODI, 2017).

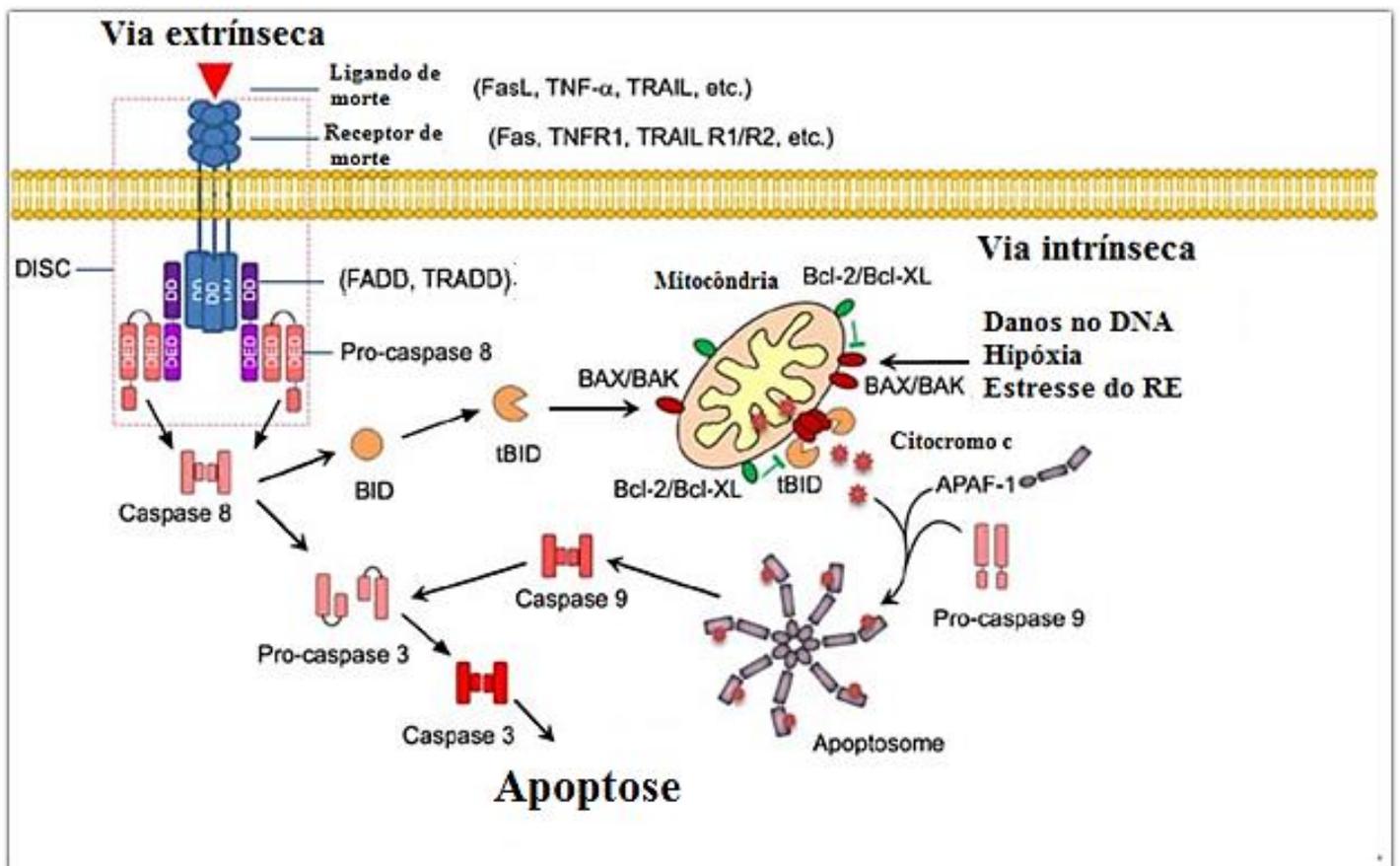
A apoptose é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, importante para eliminar as células que já não são necessárias ou que estão defeituosas (ELMORE, 2007). Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características. A primeira característica é a condensação da cromatina que se concentra junto à membrana nuclear, esta última não sofre nenhuma alteração. Em seguida, a membrana celular forma prolongamentos denominados *blebs* e o núcleo se desintegra em pequenos fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e se rompem, originando estruturas contendo material celular. Estas porções celulares envoltas por membrana são denominadas corpos apoptóticos, que por sua vez são fagocitados por macrófagos e eliminados sem causar um processo inflamatório. Outra característica muito importante da morte por apoptose é a fragmentação do DNA, a qual possui um padrão característico, devido à ação de uma endonuclease que gera fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de bases (ONDROUSKOVA; VOJTESEK, 2014).

Um grupo de proteases que participam deste processo de morte são as caspases (*cysteine-dependent aspartate specific proteases*), que reconhecem e clivam substratos que possuem resíduos de aspartato (RIEDL; SHI, 2004). Estas proteases estão diretamente envolvidas nas vias de sinalização da apoptose, levando à condensação e fragmentação nuclear, externalizando fosfolípidios de membrana que irão sinalizar para que estas células sejam fagocitadas pelos macrófagos.

Diferentes fatores podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação, choque térmico, estresse oxidativo e baixa quantidade de nutrientes (PORTT et al., 2011). A ativação da apoptose é iniciada por duas vias diferentes: pela via extrínseca ou pela via intrínseca (Figura 4). A via extrínseca é promovida pela ligação de ligantes específicos aos receptores de morte celular de superfície, como o receptor do fator de necrose tumoral (rTNF) e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Os membros da família rTNF possuem um domínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes (FULDA; DEBATIN, 2006). Quando os receptores de morte reconhecem

um ligante específico, seus domínios intracelulares interagem com a FADD (*fas-associated death domain*), essa molécula tem a capacidade de recrutar a pró-caspase-8 (caspase inativa). Devido à união dessas moléculas, há a formação de um complexo denominado DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), que ativa a pró-caspase-8, que imediatamente ativa a caspase-3, executando assim a morte por apoptose.

Figura 4 - Vias de sinalização da apoptose. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. Esse fenômeno biológico, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado a inúmeras doenças, como o câncer. *



*Extraído e modificado de (OUYANG et al., 2012).

Por outro lado, a morte celular pela via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia, medicamentos citotóxicos e ativação de oncogenes, entre outros sinais. Como resposta a esse estresse, esses sinais dirigem-se principalmente para a mitocôndria, o que ocasiona a perda da permeabilidade mitocondrial e consequentemente a liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma (HENGARTNER, 2000). A liberação de moléculas pela mitocôndria, leva à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS), isto provoca

a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso da membrana mitocondrial (GREEN; KROEMER, 2004). Conseqüentemente, ocorre a liberação do citocromo c, que ao interagir com a APAF-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) e a pró-caspase-9, formam um complexo chamado de apoptossomo. Este complexo promove a clivagem da pró-caspase-9 (forma inativa), ativando-a (caspase-9). Uma vez ativa a caspase-9, ativa a caspase-3, que é a responsável pela morte celular (RUPNARAIN et al., 2004).

O segundo tipo mais comum de morte celular é a autofagia. Relatos recentes sugerem que este processo desempenha um papel importante na determinação do destino da célula (CHEN, S. et al., 2010; MARINO et al., 2014). Neste processo, as células não apresentam condensação da cromatina e há um aumento excessivo de vesículas autofágicas (vacuolização) no citoplasma (HE; KLIONSKY, 2009), concomitantemente, acontece a digestão de partes da célula, desde agregados de proteínas, como também de organelas danificadas (mitocôndrias, ribossomos, entre outras) (GALLUZZI et al., 2012b). Nas três subseções seguintes, será explicado com mais detalhe o processo autofágico, já que é um processo chave no entendimento do tipo de processo/morte causado pela substância sob estudo nesta dissertação.

Na necrose, as células caracterizam-se pelo inchaço das organelas e a formação de espaços no citoplasma, portanto, diferente da apoptose, neste processo não há condensação da cromatina, o que origina uma degradação massiva da membrana plasmática, liberando-se todo o conteúdo intracelular e provocando uma resposta inflamatória local (SINHA et al., 2002). Neste sentido, espera-se que fármacos antitumorais, induzam preferencialmente a morte celular por apoptose ou autofagia, visto que estes dois processos não estimulam a ativação do sistema imune (HAMAÏ; BOTTI; CODOGNO, 2016).

1.5.1 Autofagia

A apoptose é amplamente estudada como uma resposta celular ao dano do DNA, porém, relatos recentes sugerem que a autofagia desempenha um papel importante na determinação do destino (sobrevivência ou morte) da célula (LEI et al., 2017). A autofagia assumiu um papel importante nas pesquisas sobre os processos de morte celular. Esta importância surgiu devido às características morfológicas das células autofágicas, como por exemplo, o aumento significativo de vacúolos autofágicos citoplasmáticos, tal característica, foi observada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Desta forma, foi possível observar que este tipo de morte ocorre na ausência de condensação da

cromatina, acompanhada principalmente pelo aumento significativo de vacúolos autofágicos no interior das células (GOMES; VESSONI; MENCK, 2016).

O termo autofagia é derivado do grego “auto” (auto) e “fagia” (comer), e faz referência ao mecanismo de degradação lisossômica essencial para a sobrevivência, desenvolvimento, diferenciação e homeostase celular (BADADANI, 2012; BAEHRECKE, 2005). A morte celular por autofagia é um processo em que a célula manifesta e desencadeia uma extensa formação de vesículas no citoplasma, digerindo partes da célula, desde agregados de proteínas até organelas danificadas (GALLUZZI et al., 2012a; REBECCA; AMARAVADI, 2016). Este tipo de morte desempenha um papel fundamental em diversos mecanismos fisiológicos, como o crescimento celular e a imunidade inata, e também em mecanismos patológicos, como as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e distintos tipos de câncer (RAVIKUMAR et al., 2010).

Estudos recentes determinaram que os processos autofágicos são altamente conservados e complexos nas células eucariotas o que permite reciclar parte de seu citoplasma para posterior degradação no lisossomo (CARDOSO et al., 2010). Este processo inicia como um mecanismo de sobrevivência celular, tentando resistir a diversas situações adversas (falta de nutrientes e excesso de radicais livres “estresse oxidativo”). Caso a célula não consiga superar todas essas condições adversas, o processo autofágico continua até provocar a perda da viabilidade celular, ocasionando finalmente a morte das células (MEJIAS-PENA et al., 2017; REBECCA; AMARAVADI, 2016).

1.5.2 Mecanismos moleculares da autofagia

Os mecanismos moleculares da autofagia foram preservados ao longo do tempo, existindo nos genes de diversos organismos. Inicialmente tais mecanismos foram descritos e estudados em leveduras, o que permitiu identificar um conjunto de genes denominados *Atg* (*Autophagy related genes*), os quais estão envolvidos em cada uma das etapas relacionadas aos mecanismos moleculares da autofagia (STRØMHAUG et al., 2004). Estes genes codificam para proteínas que apresentam diversas funções na autofagia e estão implicadas principalmente no sistema de conjugação da ubiquitina e na formação dos autofagossomos, estes últimos são vesículas de dupla membrana que capturam material citoplasmático e o transportam até os compartimentos azídicos (lisossomos) da célula, para ser finalmente degradados (KLIONSKY, 2005).

A autofagia ocorre nas seguintes etapas sequenciais: indução ou iniciação, alongamento e maturação (vide Figura 5).

Indução/iniciação

A iniciação da autofagia engloba a formação de uma estrutura inicial chamada de fagóforo (dupla membrana lipídica de isolamento). A ação conjunta de um complexo proteico formado pelas proteínas Beclina-1 e VPS34 (LINDMO; STENMARK, 2006), permite a nucleação deste fagóforo, que conseqüentemente leva à formação do sitio de montagem do fagóforo (SMF/PAS) (HOSOKAWA et al., 2009). A partir da formação do SMF/PAS, há um reconhecimento de cada um dos materiais (organelas e proteínas danificadas) por parte do fagóforo. O complexo de proteínas mencionado acima é controlado pelo complexo ULK-1 (*Serine/threonine-protein kinase*), formado pelo ULK-1, Atg13, Atg101 e FIP200 (JUNG et al., 2009). A proteína mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) é um regulador da fase de iniciação. Esta proteína é um inibidor da autofagia quando está na forma ativa, porém, em condições de ausência de nutrientes, a mTOR é inibida permitindo deste modo a ativação da proteína ULK1, o que conduz ao início do processo de autofagia.

Alongamento

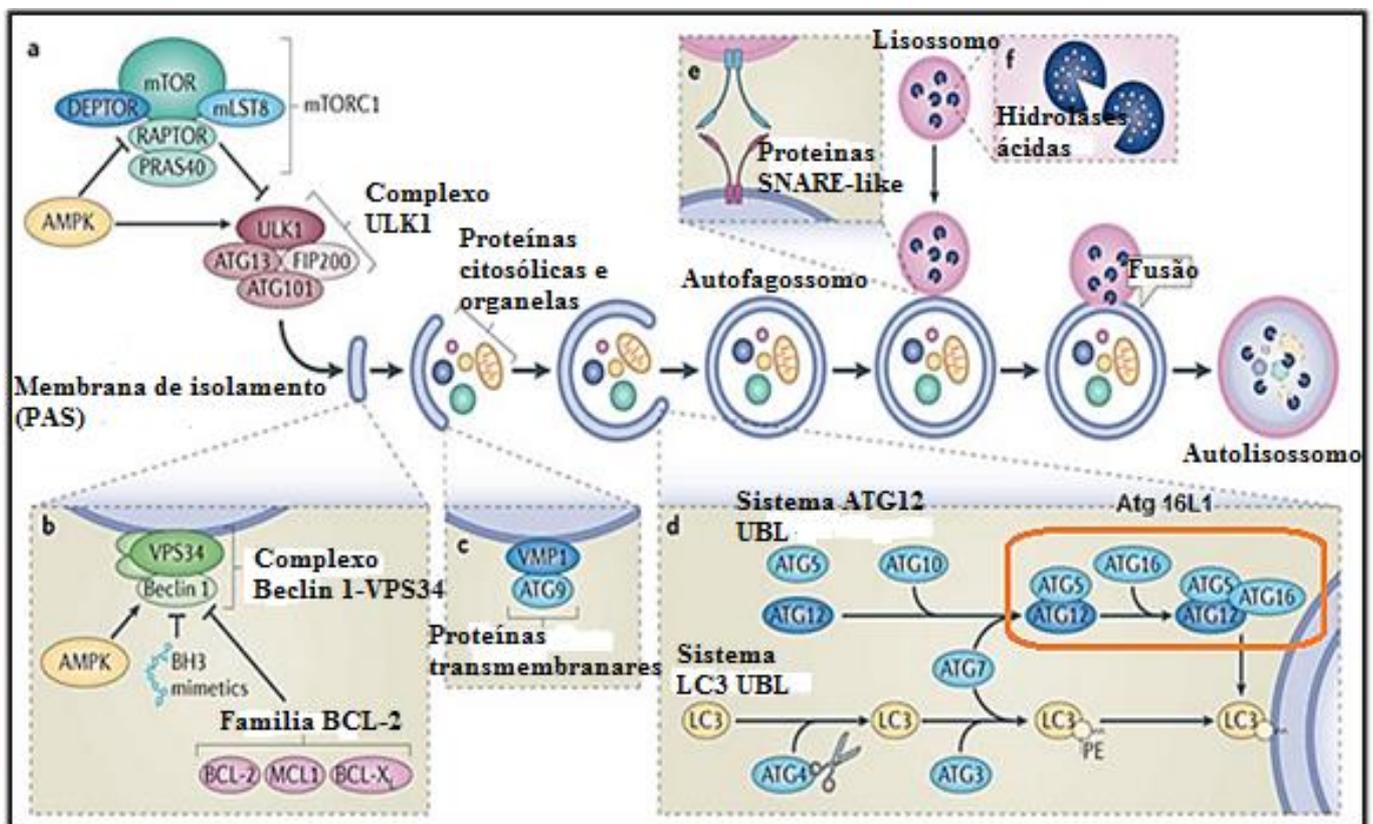
Nesta etapa ocorre a expansão da membrana autofágica mediada pelas proteínas Atg5 e Atg12, as quais interagem com as proteínas Atg10 e Atg7 para conduzir à formação do complexo Atg16L1. Este complexo proteico auxilia no recrutamento de outras proteínas para a membrana, como a LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) (ITAKURA et al., 2008). Esta proteína é processada por uma cisteína protease (Atg4) deixando um resíduo de glicina exposto para uma posterior conjugação com fosfatidiletanolamina (PE), formando uma das duas isoformas da LC3 (LC3-II). A LC3-I é uma isoforma que encontra-se no citosol e a sua derivada proteolítica, a LC3-II, permanece ancorada à membrana do fagóforo (ITAKURA et al., 2008; RODRIGUEZ-ROCHA et al., 2011).

A LC3 é a única proteína Atg que se encontra em células eucarióticas associada ao autofagossomo maduro. A quantificação da LC3-II é normalmente utilizada para estimar a abundância de autofagossomos nas células. Após a fusão do autofagossomo com o lisossomo, esta proteína é degradada (KLIONSKY, 2005; KLIONSKY; EMR, 2000).

Maturação

A formação dos autofagossomos ocorre no citoplasma, estes se fundem primeiro com endossomos e em seguida com os lisossomos, formando finalmente os autolisossomos. A fusão ocorre por atuação de diversas proteínas, tais como a SNAREs (*soluble attachment protein receptors*), ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) e proteínas Vps (*vacuolar protein sorting*) classe C, que promovem a fusão dos endossomos tardios com os lisossomos.

Figura 5 - Etapas do processo de autofagia. A ativação da autofagia envolve diversos componentes moleculares, incluindo: (A) ULK1 (*Serine/threonine-protein kinase*), FIP200 (*kinase family interacting protein of 200 kD*) e o complexo proteico Atg13, Atg101, que são funcionalmente acoplados ao regulador negativo da autofagia, o complexo mTOR1 (*mechanistic target of rapamycin*), e inicia a autofagia. (B) As proteínas Vps34 (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) e Beclina-1 (inativados por proteínas anti-apoptótica) auxiliam na nucleação da membrana de isolamento. (C) As proteínas transmembrana, Atg9 e VMP1 (*vacuole membrane protein 1*) participam no recrutamento de lipídios para a membrana de isolamento. (D) A conjugação da Atg12 com a Atg5 forma um complexo proteico denominado de Atg16L1, que auxilia na conjugação da LC3 com fosfatidiletanolamina (PE), formando a isoforma que está ancorada na membrana do autofagossomo (LC3-II) (E) Várias proteínas como a SNARE-like medeiam a fusão entre os autofagossomos e lisossomos, formando os autolisossomos. (F) Enzimas lisossomais hidrolisam proteínas, lipídios e ácidos nucleicos dos autolisossomos, finalizando o processo autofágico.*



*Extraído e modificado de (MARIÑO et al., 2014).

1.5.2 Relação da autofagia com apoptose

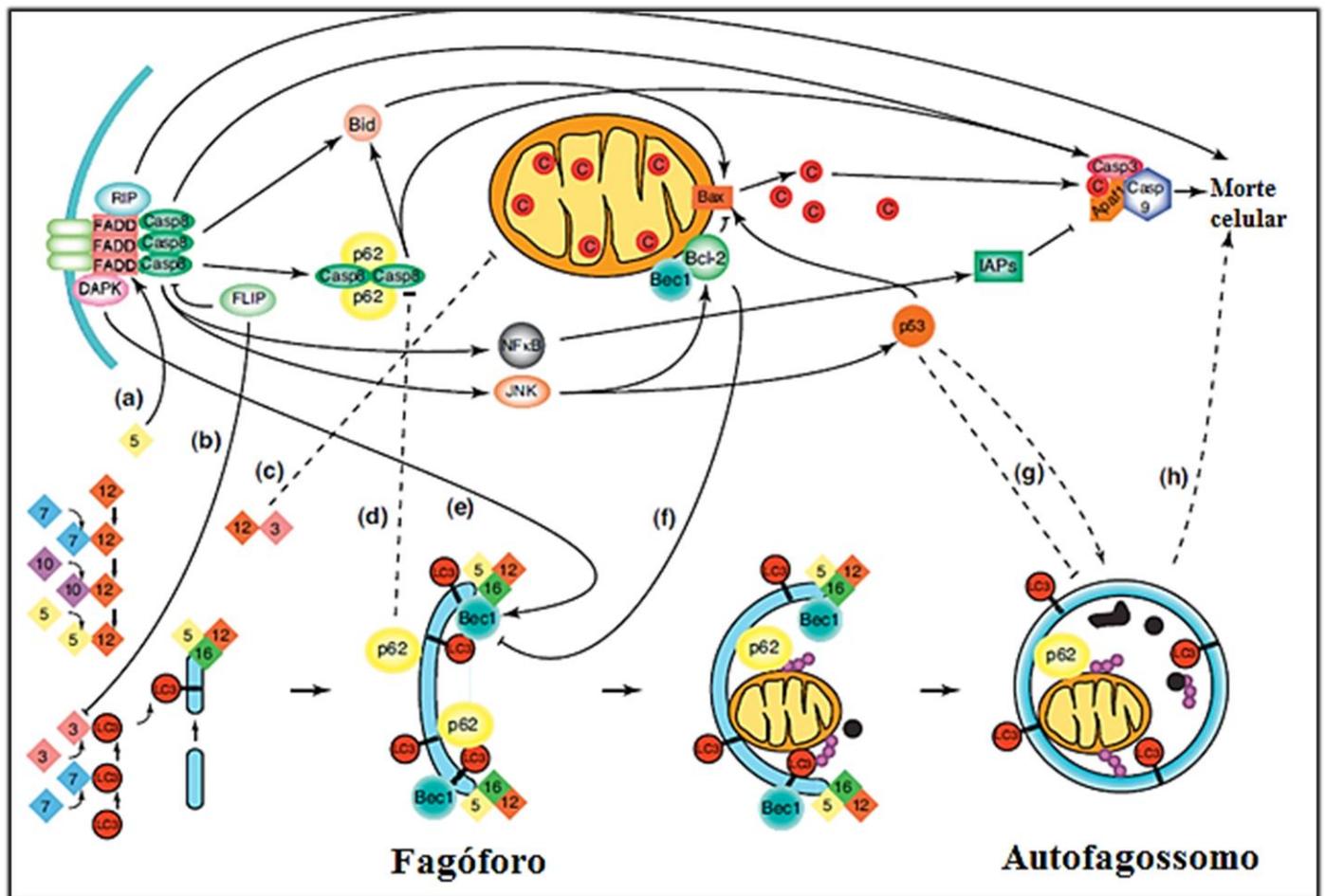
A relação entre autofagia e apoptose está sendo muito estudada. As conexões entre a autofagia e a morte celular por apoptose são complexas e ainda não estão muito bem compreendidas. A autofagia funciona, como anteriormente mencionado, como um mecanismo de sobrevivência contra as tensões celulares, como a privação de nutrientes, estresse oxidativo, danos na membrana celular, entre outras. Entretanto também existem relatos na literatura que sugerem que este processo pode provocar a morte celular programada nas células, por meio da degradação ativa dos componentes celulares indispensáveis como as mitocôndrias, até o ponto das células já não puderem sobreviver (KROEMER, GUIDO; LEVINE, 2008; YU et al., 2006).

A interação entre a maquinaria apoptótica e as proteínas que participam no processo da autofagia, é esquematizada na Figura 6. Uma proteína chave nestas conexões é p62, que está relacionada a um complexo proteico associado ao envelope nuclear, fundamental na degradação autofágica seletiva de muitas proteínas e organelas não funcionais. A p62 é conhecida por interagir diretamente com várias proteínas das vias de sinalização da autofagia e apoptose, incluindo a caspase-8 e o TRAF6 (*receptor associated factor*), que modulam as vias de sobrevivência do NF-KB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e a ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) (DIKIC; JOHANSEN; KIRKIN, 2010; MOSCAT; DIAZ-MECO, 2009). A interação entre a caspase-8 e a p62 é particularmente intrigante, pois a p62 permite a ativação da caspase-8, porém, a caspase-8 pode clivar à p62 em resposta à ativação do receptor de morte. Além disso, a caspase-8 pode ser degradada pela via da autofagia presumivelmente pela p62 (HOU et al., 2010). Isto cria um paradigma onde a autofagia e a apoptose podem estar envolvidas em um complicado equilíbrio em que a autofagia altera a extensão e a cinética da apoptose, e está por sua vez altera a degradação autofágica da p62.

A Beclina-1 é outro regulador crítico da autofagia que interage diretamente com a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (CHIPUK et al., 2010; DJAVAHERI-MERGNY; MAIURI; KROEMER, 2010). Quando a Bcl-2 e a Beclina-1 estão ligadas, esta última é incapaz de ativar a cascata de sinalização da autofagia. O processo anterior pode ser revertido quando a ligação da Beclina-1 e a Bcl-2 é clivada por proteínas pró-apoptóticas chamadas BH3 (*interacting-domain death agonist*) (WEI et al., 2008). A Beclina-1 também participa em outro processo de inibição da autofagia, no qual a inibição é induzida pela apoptose, ou seja, pela clivagem da caspase-3. Este processo provoca a

formação de uma Beclina-1 defeituosa, incapaz de promover autofagia, conduzindo assim à inibição completa deste processo. Estes exemplos mostram que pode haver regulação mútua dos processos de apoptose e autofagia, de modo que quando a apoptose é promovida, a autofagia é reduzida para que a apoptose promova a morte celular. Portanto, a Beclina-1, é uma proteína muito importante, e que tem que ser considerada para entender melhor o mecanismo de autofagia (LUO; RUBINSZTEIN, 2010).

Figura 6 - Possível conexão entre apoptose e autofagia. (A) Atg5 ativa DISC através de uma interação com FADD. (B) FLIP inibe a associação de Atg3 a LC3 e portanto inibe a indução de autofagia. (C) A conjugação de Atg12-Atg3 inibe a fissão mitocondrial e a apoptose independente da autofagia. (D) p62 promove a ativação e agregação da caspase-8. (E) A fosforilação da DAPK (*Death-associated protein kinase*), promove ativação da Beclina-1 ativando a autofagia. (F) A interação da Bcl-2 com a Beclina-1 inibe o processo de autofagia. (G) A p53 pode tanto inibir como promover a autofagia, dependendo do contexto. As linhas contínuas representam ligações bem estabelecidas entre os processos de apoptose e autofagia, e as ligações menos estabelecidas são mostradas com traços.*



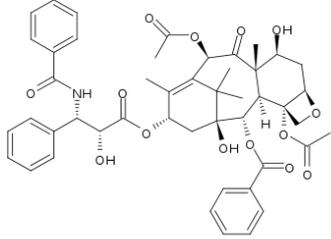
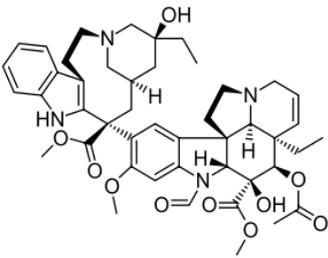
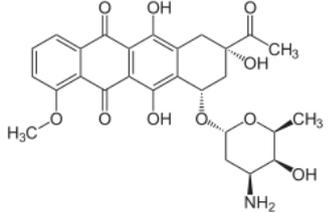
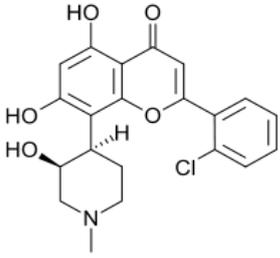
*Extraído de (GUMP; THORBURN, 2011).

1.6 Produtos naturais como fonte de novos fármacos antitumorais

As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos que vem ganhando muita importância devido a suas diversas aplicações terapêuticas e biotecnológicas. A produção desses metabólitos estão relacionados com a defesa contra patógenos (bactérias ou fungos). Tais metabólitos possuem grandes potencialidades como princípios ativos, podem ser utilizados diretamente na terapia, como precursores na semi-síntese quimiofarmacêutica ou em modelos para síntese de novos princípios de uso terapêutico.

A história dos medicamentos anticâncer está intimamente relacionada aos produtos naturais, sendo que mais de 60% dos medicamentos utilizados na quimioterapia atual possuem em alguma instância sua origem relacionada a uma fonte natural (COSTA-LOTUFO et al., 2010). A utilização por Sidney Farber em 1954 de um antibiótico extraído do cultivo de uma espécie de *Streptomyces*, a Actinomicina D, para tratar um paciente com tumor de Wilms metastático, introduziu no tratamento de câncer o primeiro fármaco antineoplásico derivado de um produto natural, despertando grande interesse no meio científico nessa área de pesquisa, o qual continua até hoje. Diferentes pesquisas resultaram na descoberta de alguns compostos antitumorais (vide Tabela 2) importantes como o paclitaxel (Taxol), vincristina (Oncovina), vinorelbina (Navelbina), daunorrubicina (daunomicina) e vários análogos da camptotecina (por exemplo, a Hicamtina) (NEWMAN; CRAGG, 2007; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Por este motivo, vem aumentando o número de estudos com novos compostos isolados de plantas medicinais, devido à rica fonte de substâncias antineoplásicas (LEE, 1999). Para avaliar a atividade antitumoral de novos produtos naturais, os programas de prospecção incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas utilizando técnicas automatizadas HTS (*High Throughput Screening*) o que tem resultado na análise de um grande número de amostras, permitindo descobrir um elevado número de moléculas promissoras (NEIDLE; THURSTON, 2005).

Tabela 2 – Principais fármacos antitumorais derivados de plantas medicinais.

Fármaco antitumoral	Estrutura química	Organismo	Distribuição geográfica	Referência
Paclitaxel		<i>Taxus brevifolia</i>	EUA, Europa	(CHANG et al., 1996)
Vincristina		<i>Catharanthus roseus</i>	Filipinas, Jamaica, Madagascar	(HUANG et al., 2004)
Daunorrubicina		<i>Streptomyces peucetius</i>	EUA	(STROHL et al., 1998)
Flavopiridol		<i>Dysoxylum binectariferum</i>	Índia	(WANG, 2001)

1.6.1 Gengibre e ações farmacológicas atuais

A fitoterapia tem sido amplamente utilizada pela população desde a antiguidade e nos últimos anos as pesquisas nesta área vêm aumentando progressivamente. Entre as diversas plantas medicinais existentes e utilizadas como terapia alternativa na medicina homeopática está o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (ALI et al., 2008). Popularmente, o gengibre é utilizado devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, hipotensoras, antioxidantes e antimicrobianas, além de ser utilizado na medicina oriental para tratar diferentes sintomas tais como náuseas, enxaqueca, inflamação, distúrbios reumáticos e diferentes condições gastrointestinais e respiratórias (COTT, 2003). Fitoquimicamente, a planta apresenta de 1-3% de óleo essencial

(sesquiterpenos), 2,5-5% de componentes picantes (gingerol e shogaol) e 60% de amido. Os gingeróis, principalmente o [6]-gingerol, são identificados como os maiores constituintes dos rizomas da planta, e a eles têm sido atribuídos vários efeitos farmacológicos, tais como analgésico, antipirético, atividade anti-hepatotóxica, antinauseante e anti-inflamatória (POLTRONIERI et al., 2014). O [6]-, [8]- e o [10]-gingerol formam parte dos principais componentes dos rizomas do gengibre, sendo o primeiro o mais abundante (SURH, 1999). Os gingeróis compreendem uma série homóloga de substâncias que se diferenciam principalmente pelo comprimento de suas cadeias alquílicas, apresentando assim 10, 12 e 14 carbonos, para o [6]-, [8]- e [10]-gingerol respectivamente (ALMADA DA SILVA et al., 2012).

Atualmente existem muitos estudos que relacionam as atividades antitumorais dos gingeróis. O [6]-, [8]- e o [10]-gingerol formam parte das principais moléculas dos rizomas do gengibre. Os efeitos do [6]-gingerol na adesão celular, invasão, migração e proliferação foram reportados em várias linhagens tumorais. Um estudo realizado por Lee e colaboradores (LEE, H. S. et al., 2008) mostrou que o [6]-gingerol (10 μ M) inibe a adesão celular à fibronectina na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, neste mesmo estudo, o [6]-gingerol foi capaz de inibir a capacidade de invasão e motilidade das MDA-MB-231, além de prejudicar a expressão de gelatinases (MMP2 e MMP9) que participam no processo de degradação da matriz extracelular (MEC). Outros autores mostraram as atividades *in vitro* e *in vivo* do [6]-gingerol em diversas linhagens celulares. *In vitro*, verificou-se que o [6]-gingerol inibiu o crescimento/proliferação celular através da parada do ciclo celular na fase G1 na linhagem de adenocarcinoma de pâncreas (HPAC). As análises por *western blotting* indicaram que [6]-gingerol diminuiu tanto a expressão de ciclina A como a de CKK (Ciclina-dependente de quinase). Estes eventos levaram à redução da fosforilação de Rb (Proteína do retinoblastoma) provocando o bloqueio da entrada de células na fase S do ciclo celular. Além disso, o [6]-gingerol induziu morte celular por apoptose nas células HPAC. Neste mesmo estudo, foram realizados ensaios *in vivo*, os quais mostraram que o [6]-gingerol reduziu o número de metástases pulmonares, em camundongos previamente injetados (intravenosa, i.v) com células de melanoma B16F10, sem ocasionar efeitos tóxicos (KIM et al., 2005).

1.6.2 Modificação de produtos naturais: qual é sua finalidade?

Os produtos naturais são uma rica fonte de compostos com potencial para se tornarem medicamentos antitumorais, e são caracterizados pela diversidade estrutural que possuem. Recentes estudos visam melhorar e aperfeiçoar esses fenótipos estruturais, a fim de obter moléculas com maior potencial terapêutico. Além disso, a modificação estrutural de produtos naturais tem por objetivo: (1) realizar síntese total pronta para industrialização, (2) proteger o ambiente e os recursos naturais, e (3) realizar a manipulação química para obter o tamanho molecular e complexidade desejado (GUO, 2012). A estratégia para a modificação estrutural dos produtos naturais é muito importante já que permite, em última instância aumentar a potência e a seletividade destes compostos, melhorar as propriedades físico-químicas, bioquímicas e farmacocinéticas, além de eliminar ou reduzir os efeitos secundários, podendo atingir o alvo com maior especificidade (MAIER, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por finalidade investigar os efeitos da substância SSi6 sintetizada a partir do [6]-gingerol, na autofagia e apoptose, além de investigar seus efeitos antitumorais em células de tumor de mama triplo negativo da linhagem MDA-MB-231.

2.2 Objetivos específicos

Especificamente, pretende-se:

1. Comparar e avaliar o efeito do SSi6 em modificar a morfologia de células de tumor de mama e não tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231 e MCF-10A, respectivamente.
2. Avaliar o efeito citotóxico e citostático do SSi6, na linhagem MDA-MB-231, por meio do ensaio de formação de colônias.
3. Determinar a capacidade do SSi6 em inibir a migração e invasão celular de células tumorais de mama triplo negativo (MDA-MB-231).
4. Analisar e determinar se o SSi6 ativa os processos de autofagia e apoptose em células de tumor de mama MDA-MB-231.

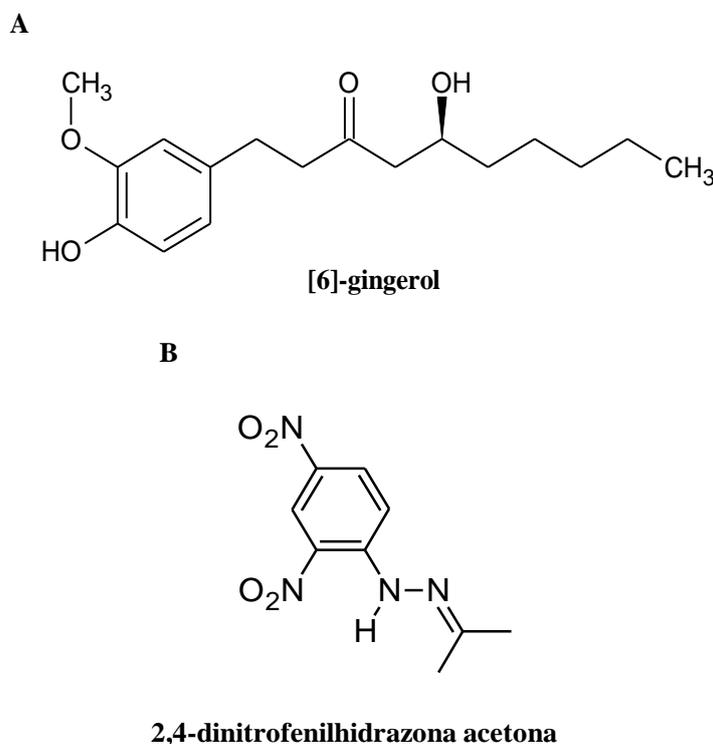
3. MATERIAIS E MÉTODOS

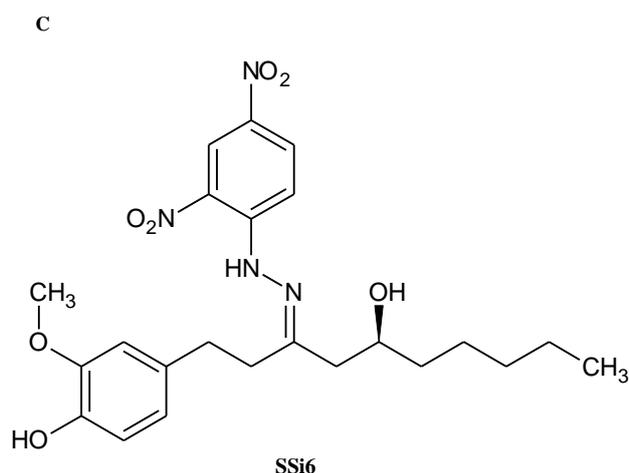
3.1 Materiais

3.1.1 [6]-gingerol, 2,4-DNFH e SSi6

Todas as substâncias foram sintetizadas e disponibilizadas pelo Prof. Dr. James Almada da Silva do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe (UFS), com quem temos colaboração neste projeto. O SSi6 é uma nova substância semissintética, gerada a partir da reação entre o [6]-gingerol (6G) e a 2,4-dinitrofenilhidrazona (2,4-DNFH), esta última é uma substância orgânica derivada das hidrazonas. A literatura tem reportado que alguns derivados das hidrazonas, têm se mostrados química e biologicamente ativos (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007). A obtenção, pureza e a elucidação estrutural desta molécula pode ser encontrada na informação suplementar do artigo publicado por (VILLALVILLA et al., 2014). Para realizar os testes, as substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfóxido 1% (DMSO). As estruturas das substâncias estão representadas na Figura 7.

Figura 7 - Estrutura molecular das substâncias: (A) [6]-gingerol (6G), (B) 2,4-dinitrofenilhidrazona (2,4-DNFH), (C) SSi6.





3.1.2 Linhagens e cultivos celulares

MDA-MB-231

A linhagem MDA-MB-231 são células epiteliais humanas derivadas do sítio metastático (efusão pleural) de tecido mamário (CAILLEAU et al., 1974). Esta linhagem tumoral foi obtida do banco de células de Rio de Janeiro (BCRJ), derivadas de uma mulher de 51 anos de idade, caucasiana. Estas células foram cultivadas e mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e L-glutamina (2 mM).

MCF-10A

A linhagem não tumoral de mama MCF-10A representa células epiteliais humanas derivadas de tecido mamário não tumoral (SOULE et al., 1990). Estas células foram cultivadas em meio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12*) suplementado com 5% de soro de cavalo (HS), Fator de Crescimento Epidermal (EGF) 20 ng/mL, hidrocortisona 0,5 µg/mL, insulina 10 µg/mL e 1% de penicilina/estreptomicina.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de cultura e mantidas em um incubador úmido com 5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37 °C. As passagens celulares foram realizadas por tripsinização das células e utilizadas com a finalidade desejada.

3.2 Métodos

É importante ressaltar que não há estudos que demonstrem os efeitos antitumorais do SSi6, neste sentido, a análise de seus efeitos foi realizada em relação a trabalhos anteriores que determinaram as atividades antitumorais do 6G.

3.2.1 Morfologia Celular

O ensaio de morfologia celular é importante para determinar o efeito das substâncias (SSi6 e 6G) na alteração da estrutura e crescimento das células MDA-MB-231 e MCF-10A. As células foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) em placas de 12 poços e mantidas a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas (até alcançarem a confluência de 80%) em estufa de cultura de células. Após as 24 horas, o meio de cultura foi retirado dos poços e as células foram expostas a diferentes concentrações do 6G e do SSi6 (6,25; 12,5; 25, 50 e 100 µM). Em seguida, foram capturadas imagens com o microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS 100) (objetivas de 10 e 40×) em intervalos de 2, 6, 24 e 48 horas para observar os efeitos das substâncias nas células. A efetividade do tratamento nesta análise foi comparada com o controle negativo (DMSO 1%).

3.2.2 Citotoxicidade

A análise do efeito do SSi6 e 6G sobre a proliferação e viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A, foi determinada pelo ensaio colorimétrico, através do uso do reagente MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] (MOSMANN, 1983). Este ensaio se fundamenta principalmente na utilização deste reagente pelas células vivas e sua redução no interior da mitocôndria, que resulta na formação de cristais de formazan de cor violeta (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005).

Para este ensaio, as células (1×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas em incubador úmido de cultura de células. Após este tempo, as células foram expostas a concentrações crescentes do SSi6 (3,12-100 µM), 6G (300-1000 µM), e monitoradas por 48 horas. Em seguida, o meio de cultura com tratamento foi retirado e as células foram tratadas com 100 µL de MTT (1 mg/mL) em cada poço. As placas foram incubadas durante 4 horas a 37 °C. Os precipitados de cristais de formazan foram diluídos com 100 µL de DMSO. A coloração obtida nos poços foi lida por espectrofotometria com um comprimento de onda máximo de 540 nm. O controle positivo utilizado neste ensaio foi a doxorrubicina, conhecida na literatura como um agente antitumoral que inibe a proliferação celular de várias linhagens

tumorais (PANG et al., 2015; TAN et al., 1967). Os resultados foram comparados com os poços do controle negativo contendo somente células tratadas com o veículo (DMSO 1%). Desta forma, foi possível avaliar o efeito da substância sobre a diminuição da proliferação celular. O cálculo do IC₅₀ (concentração que inibe 50% da viabilidade celular) do SSi6 e 6G foi realizada por meio do *software* GraphPad Prism®.

3.2.3 Ensaio clonogênico (formação de colônias)

Este ensaio permite a observação dos efeitos citotóxicos (diminuição do número de colônias) e citostáticos (diminuição do tamanho das colônias) do SSi6 sobre a habilidade proliferativa da linhagem MDA-MB-231. O ensaio consiste em semear 3×10^2 células em placas de Petri de 6 cm incubadas no meio adequado a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas para permitir o crescimento normal. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações específicas das substâncias (SSi6 e 6G) (6,25; 12,5 e 15 µM) por um período de 24 horas. Após o tempo de incubação, o meio de cultura com tratamento foi removido e substituído por meio sem tratamento. As células foram novamente incubadas nas mesmas condições por um período de 10 dias. Depois do tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com uma solução de metanol e ácido acético em proporção 3:1 durante 6 minutos e, em seguida, coradas com uma solução de metanol e cristal violeta 0,5% por 25 minutos. Ao final do experimento, as colônias foram contadas e seu tamanho foi medido com auxílio do *software* ImageJ.

3.2.4 Detecção das organelas vesiculares ácidas (AVOs)

Para detectar as AVOs formadas pelo tratamento com o SSi6 e 6G, as células MDA-MB-231 e MCF-10A foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em microplacas de poliestireno de 96 poços e incubadas em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com SSi6 (25, 50 e 100 µM) e 6G (100 µM) durante 6 horas. As células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e em seguida, fixadas com metanol durante 10 minutos. Após da fixação, as células foram coradas com uma solução de 1 µg/mL de laranja de acridina (AO) durante 15 minutos no escuro e imediatamente lavadas e coradas com uma solução de 1 µg/mL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) durante 5 minutos. As imagens foram capturadas por microscopia automática de epifluorescência de alta resolução (*ImageXpress, Molecular Devices*) na objetiva de 20×. A rapamicina (500 nM) foi utilizada como controle positivo de indução da autofagia (inibidor da via mTOR) por 24 horas (SARKAR et al., 2009).

3.2.5 Imunocitofluorescência

Para determinar a presença da proteína LC3 após o tratamento com o SSi6 e 6G em células tumorais e não tumorais de mama, foi utilizado o anticorpo Anti-LC3 (ab51520) específico para as proteínas LC3-I (proteína citoplasmática) e LC3-II (encontra-se ancorada a membrana do autofagossomo). As células foram plaqueadas (1×10^4 células/100 μ L) em microplacas de poliestireno de 96 poços e mantidas a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este tempo de incubação, as células foram tratadas com 50 μ M do SSi6 e 100 μ M de 6G durante 6 horas. Foi utilizado rapamicina (500 nM) como controle positivo durante 24 horas e para o controle negativo, as células foram tratadas com wortmanina 30 μ M e adicionando 50 μ M de SSi6 durante 6 horas de exposição. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS (100 μ L), fixadas com 4% de paraformaldeído durante 20 minutos e lavadas com PBS/Glicina 1/1 (200 μ L) por 10 minutos. Após esta etapa, foi realizado o bloqueio durante 1 hora com solução imunofluorescente IF+10% de albumina sérica bovina (BSA) em um tampão contendo as seguintes compostos e quantidades: NaCl (1,30 M), Na₂HPO₄ (0,13 M), NaH₂PO₄ (0,029 M), NaN₃ (0,077 M), Tween-20 (2% V/V) e Triton X-100 (0,5% V/V), este último tem como função permeabilizar as membranas das células. Depois do tempo de bloqueio, foi adicionado o anticorpo primário (*anti-LC3B antibody* ab51520) durante 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com solução IF sem BSA e incubadas novamente com o anticorpo secundário (*Alexa Fluor[®] 488-conjugated goat to rabbit IgG*) em PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas com PBS e coradas com DAPI (0,5 μ g/mL) durante 4 minutos para marcação nuclear. Finalmente os poços foram lavados com PBS, e adicionado Fluoromount-G[®] para capturar as imagens utilizando microscopia automática de epifluorescência de alta resolução (*ImageXpress*) na objetiva de 40 \times .

3.2.6 Ciclo celular

A análise das diferentes fases do ciclo celular foi realizada pelas variações no conteúdo de DNA, pela coloração com iodeto de propídio (PI) detectada através de citometria de fluxo. As células foram plaqueadas (5×10^5 células/poço) em placas de 6 poços e mantidas a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa úmida de cultura de células. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações do SSi6 (6,25; 12,5; 18,75 e 25 μ M) durante 24 horas e mantidas nas mesmas condições descritas acima. Em seguida, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS e

ressuspendidas em álcool etílico 70% gelado e mantidas por 24 horas a -20 °C. Após este período, as células foram incubadas em uma solução de RNase A (0,02 mg/mL) em PBS a 37 °C durante 30 minutos e, em seguida, incubadas com uma solução de HFS (*hypotonic fluorochrome solution*) que contém PI (1µg/mL) por 1 hora em gelo. A análise do conteúdo de DNA das células em cada fase foi determinado no citômetro de fluxo BDAccuri C6 (BD Biosciences).

3.2.7 Determinação de taxa apoptótica com Anexina V por citometria de fluxo

A atividade apoptótica das substâncias SSi6 e 6G sobre a linhagem tumoral MDA-MB-231, foi analisada através de citometria de fluxo utilizando *PE-Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Biosciences). As células foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) em placas de 12 poços e incubadas por um período de 24 horas (até atingir 100% de confluência). Em seguida, foram tratadas com diferentes concentrações (25, 50 e 100 µM) das substâncias por 6 por 24 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram centrifugadas (2000 rpm por 5 minutos a 4 °C) e lavadas com PBS para serem ressuspendidas em 100 µL de tampão de ligação proveniente do *kit*. As células foram incubadas com 5 µL de PE-Anexina V e 7-AAD à temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C) por 15 minutos ao abrigo da luz e em seguida as células foram desaderidas com auxílio do *cell scraper* e transferidas para tubos contendo tampão de ligação, totalizando 400 µL em cada tubo. Finalmente, as células foram analisadas no citômetro de fluxo BDAccuri C6 (BD Biosciences). A fluorescência emitida por cada corante foi quantificada através do *software* CSampler.

3.2.8 PCR em tempo real (qPCR)

Para avaliar os efeitos do SSi6 e 6G sobre a expressão de genes relacionados com a apoptose (caspase-3) e autofagia (LC3-II) as células da linhagem tumoral MDA-MB-231 foram semeadas (1×10^6 células/placa) em placas de 6 cm e incubadas por 24 horas em estufa úmida. Após o período de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações do SSi6 (25 e 50 µM) e 6G (50 µM) por 1 e 10 horas. Depois deste período, as células foram lisadas com Trizol[®] (Invitrogen) e transferidas para microtubos de 1,5 mL para isolamento do RNA total. Para isso foi adicionado 200 µL de clorofórmio e os microtubos foram homogeneizados por inversão e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm a 4 °C por 15 minutos para obter a fase aquosa onde encontra-

se o RNA. À fase aquosa foram adicionados 500 µL de isopropanol para precipitar o RNA e, em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 12000 rpm a 4 °C e lavadas com etanol 75%. Este procedimento foi repetido uma vez. Após a lavagem, o etanol foi evaporado para sua eliminação total dos microtubos. Finalmente o RNA foi dissolvido em 20 µL de água ultrapura e estocado a -80 °C. A quantificação e o grau de pureza (relação 260/280 - 260/230) foram realizadas em equipamento *Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific). O RNA total (1,5 µg) foi reversamente transcrito em cDNA pelo uso do *kit Enhanced Avian First Strand Synthesis* (Sigma Aldrich) e estocado a -20 °C. As condições da PCR foram ajustadas para cada par de primer, dependendo da sua temperatura de *melting* usando o equipamento *CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad). Após a amplificação, análises da curva de *melting* foram realizadas entre 72-95 °C por monitoramento da fluorescência associada ao aumento da temperatura. Produtos específicos foram determinados como picos únicos em suas curvas de *melting*. O nível comparativo de expressão de cada condição foi calculado como $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (método do $\Delta\Delta C_T$), onde $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ amostra - ΔC_T controle. Os valores de C_T das amostras e dos controles foram normalizados pela quantidade de Rpl37a (gene ribossomal utilizado como controle endógeno); ΔC_T do controle ou amostra = C_T do controle ou amostra - C_T Rpl37a do controle ou amostra).

Os *primers* utilizados para amplificação dos genes relacionados a apoptose e autofagia estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Primers da reação de PCR em tempo real

Genes	Acesso no NCBI	Primer Forward	Primer Reverse
MAP1LC3B*	NM_022818.4	5' GAG CAG CAT CCA ACC AAA A 3'	5' CCA TGC TGT GTC CGT TCA 3'
Casp3*	NM_004346.3	5' GTG CTA CAA TGC CCC TGG AT 3'	5' GCC CAT TCA TTT ATT GCT TTC C 3'
Rpl37a*	NC_000002.12	5' GCC AGC ACG CCA AGT ACAC 3'	5' CCC CAC AGC TCG TCT CTT CA 3'

*MAP1LC3B = Microtúbulos associados à proteína 1 da cadeia leve 3 beta.

*Casp3=Caspase-3

*Rpl37a= Proteína Ribossômica L37a

3.2.9 Análise do nível proteico por *western blotting*

Para verificar a quantidade de proteínas relacionadas com a apoptose (caspase-3) e autofagia (LC3-I e II), as células MDA-MB-231 (1×10^6 células/placa) foram semeadas em placas de 6 cm e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ em estufa de cultura de células. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com SSi6 (25, 50 e 100 µM) e 6G (50 e 100 µM) durante 3 e 6 horas. Neste ensaio foram realizados um controle positivo (rapamicina 500 nM) e um controle negativo utilizando um inibidor da autofagia (wortmanina 30 µM + 100 µM do SSi6). Em seguida, as amostras foram lisadas com CellLytic™. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (13000 rpm a 4 °C por 20 minutos) para obter o sobrenadante, utilizado para a mensuração da concentração proteica por meio do *Pierce® BCA Protein Assay Kit*. Em seguida, 30 µg de cada amostra foi diluída em tampão de amostra SDS-PAGE, composto por Tris-HCl 0,125 M, SDS 4% *m/V*, glicerol 20% *V/V*, β-mercaptoetanol 0,1 M, azul de bromofenol 0,02% *m/V* e pH 6.8. No primeiro poço do gel foi adicionado 5 µL de padrão de massa molecular *Kaleidoscope* (BioRad) e nos poços seguintes, as amostras totalizando um volume de 20 µL. A corrida da eletroforese foi realizada durante 90 minutos a 100 V e em seguida, as proteínas foram transferidas através do sistema de transferência semi-seca *Transblot turbo* (BioRad) por 3 minutos. A membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 0,5% *m/V* em ácido acético 0,1% *V/V*. Posteriormente as membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio contendo BSA, constituído por Tris-Base 0,20 M, NaCl 1,36 M e 3% *m/V* de BSA, durante 1 hora a temperatura ambiente e incubadas com os anticorpos primários conjugados com HRP anti-caspase-3 (Abcam, catálogo número ab179517-1:1.000) e anti-LC3B (Abcam, catálogo número ab51520-1:3.000). A quimiluminescência foi mensurada através do equipamento Chemidoc® (BioRad). O protocolo para detecção da β-actina (controle endógeno) foi idêntico ao descrito para LC3B e caspase-3. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria com auxílio do *software Quantity One* (BioRad).

3.2.10 Ensaio de migração celular *Wound Healing*

Para avaliar os efeitos do SSi6 sobre a migração celular, foi utilizado o método de *Wound Healing* (YARROW et al., 2004). Neste teste foram utilizadas monocamadas confluentes de células da linhagem MDA-MB-231 (1×10^5 células/poço) em placas de 12 poços e incubadas em estufa úmida a 37 °C e 5% CO₂ até que as células adquiram 100% de confluência. Em seguida, foi realizada um “risco” na porção central

de cada poço, com auxílio de uma ponteira de micropipeta e de uma régua estéril. As placas foram mantidas sob as mesmas condições relatadas acima. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações (6,25; 12,5 e 18,75 μM) do SSi6. As imagens foram capturadas nos períodos de 0, 12 e 24 horas, com o microscópio invertido acoplado a um sistema de captura de imagens (Moticam) em dois campos diferentes. A área de fechamento da risca pela migração celular foi medida através do *software ImageJ*. A porcentagem de fechamento da ferida foi calculada comparando os tempos de 0 e 24 horas, utilizando a seguinte fórmula (YUE et al., 2010):

$$\% \text{ Fechamento da ferida} = [(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}) / A_{t=0h}] \times 100\%$$

Onde, $A_{t=0h}$ é a medida da área da risca imediatamente após sua realização e $A_{t=\Delta h}$ é a área medida no tempo de 12 ou 24 horas após a abertura da ferida.

3.2.11 Invasão Celular em Matrigel

A substância SSi6 foi testada para avaliar sua capacidade de ativar ou inibir a invasão de células da linhagem tumoral MDA-MB-231. Foram utilizados insertos do *kit BioCoat Matrigel Invasion Chambers* (BD Biosciences) com poros de 8 μm contendo matrigel, uma mistura de proteínas que simula a matriz extracelular de muitos tecidos. Os experimentos foram realizados em placas de 24 poços. Os insertos foram previamente hidratados com meio DMEM livre de FBS durante 2 horas e incubadas em estufa úmida a 37 °C. Após o tempo de hidratação, foram semeadas 5×10^4 células/poço na câmara superior dos insertos em meio de cultura e tratadas imediatamente com as concentrações de 6,25; 12,5 e 18,75 μM da substância sob estudo. Nos poços inferiores foram adicionados 1,5 mL de meio adequado e adicionado 10% de FBS, o qual agiu como quimioatratante indutor da invasão. As placas foram incubadas por 22 horas nas condições específicas (37 °C, 5% CO_2). Em seguida, as células que não invadiram pelo matrigel, foram removidas da superfície da membrana com o auxílio de hastes de algodão. As células invasoras, que penetraram pelos poros e migraram para a superfície interna do matrigel foram fixadas com metanol puro e em seguida coradas com uma solução de azul de toluidina 1% diluída em borato de sódio 1%. A membrana foi recortada do inserto e montada em uma lâmina histológica com óleo de imersão. Assim, com auxílio do microscópio óptico (*Nikon Eclipse E100*) foram contados manualmente diferentes campos para determinar as células que invadiram a matrigel e atravessaram os poros da membrana.

3.2.12 Análise estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata e de forma independente, para garantir a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados. Os dados foram analisados com o programa *Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation)* e comparados por análise de variância *one-way* (ANOVA), seguida pelo pós teste de Tukey, e dependendo da análise utilizou-se *t-test (and nonparametric test)* com o auxílio do software *GraphPad Prism® (Inuitive Software for Science)* versão 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Morfologia celular

A morte celular pode ser detectada nas células pela morfologia que as mesmas adquirem durante este processo (KROEMER, G et al., 2009). Morfológicamente, a autofagia caracteriza-se pelo aumento de vesículas autofágicas (vacuolização) no citoplasma. Já na apoptose, as células sofrem mudanças morfológicas apresentando um tamanho menor, adquirem um formato circular, acompanhado de uma diminuição da densidade celular, mantendo a membrana plasmática intacta (OUYANG et al., 2012). O ensaio para verificação da morfologia celular foi realizado para observar as mudanças fenotípicas causadas pelas substâncias SSi6 e 6G na linhagem tumoral (MDA-MB-231) e não tumoral de mama (MCF-10A).

As Figuras 8 e 9, mostram as alterações morfológicas induzidas por diferentes concentrações do SSi6 nas células tumorais e não tumorais de mama. É possível observar na Figura 8, que as células tumorais MDA-MB-231, apresentam uma intensa vacuolização citoplasmática a partir de 2 horas de tratamento nas concentrações de 50 e 100 μM , este resultado é mais evidente em 6 horas de tratamento nas mesmas concentrações, com um aumento do número e do tamanho dos vacúolos em relação ao controle negativo (DMSO 1%). Durante 24 horas de tratamento nas mesmas concentrações do SSi6 (50 e 100 μM), as células começam a adquirir um formato circular com perda da densidade celular. Por outro lado, após 48 horas de exposição das células ao SSi6, em todas as concentrações (exceto em 6,25 μM) a substância gera grandes alterações morfológicas, o que provoca a desaderência total da placa e surgimento de detritos celulares. Todas as alterações anteriores indicam morte celular.

Para a linhagem não tumoral de mama MCF-10A (vide Figura 9), as alterações morfológicas, como perda da densidade celular, começam aparecer somente no período de 24 horas e na maior concentração utilizada do SSi6 (100 μM). No entanto, estas alterações são mais evidentes no tempo de 48 horas, inclusive também na concentração de 50 μM . Todas estas modificações na morfologia foram comparadas em relação ao controle negativo. Nesta linhagem, não foi observada a formação de vacúolos no interior das células, o que nos mostra uma indicativa preliminar da seletividade do SSi6 pelas células tumorais MDA-MB-231, já que como explicado acima, o SSi6 causa uma maior alteração em concentrações menores e em tempos mais curtos, nas células tumorais do que nas células não tumorais.

As Figuras 10A e 10B, apresentam imagens ampliadas das Figuras 8 e 9 para alguns tempos de tratamento específicos, estas imagens permitem observar com mais detalhe as alterações e modificações causadas nas linhagens de células utilizadas após a exposição às substâncias sob estudo. Nestas figuras também são mostrados os resultados dos controles utilizados, como o 6G, a 2,4-DNFH e um controle negativo para autofagia (wortmanina).

A Figura 10A permite evidenciar a presença dos vacúolos citoplasmáticos após o tratamento com SSi6 na linhagem MDA-MB-231. Também é possível evidenciar que as substâncias utilizadas como controles, o 6G e a 2,4-DNFH, não provocaram nenhuma alteração na morfologia das células, inclusive na máxima concentração utilizada e no maior tempo de tratamento. Estes resultados demonstram preliminarmente que a modificação sintética realizada no [6]-gingerol é a responsável por provocar todas as mudanças morfológicas nas células tumorais, ou seja, há uma contribuição resultante (reação do 6G com 2,4-DNFH) quando é utilizado o SSi6, em relação ao tratamento individual dos compostos constituintes. Devido ao fato de que a formação de vesículas autofágicas é um indicativo de autofagia, foi utilizado a wortmanina como controle negativo (inibidor da autofagia), um composto que inibe a PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) evitando a formação de autofagossomos (YANG, 2013). Este composto foi testado na concentração de 30 μM de forma concomitante com 50 μM do SSi6, a fim de inibir a formação de vacúolos induzida pelo SSi6 nas células da linhagem MDA-MB-231. Como pode ser observado na Figura 10A, houve uma inibição total da formação de vacúolos nas células tumorais, inclusive mostrando muita similaridade com o controle negativo sem tratamento (DMSO 1%). Tal fato evidencia que os vacúolos citoplasmáticos formados durante o tratamento com o SSi6, estão fortemente ligados à ocorrência de um processo autofágico nas células. Por fim, a Figura 10B mostra uma ampliação das alterações morfológicas nas células não tumorais de mama ocasionadas pelo tratamento com o SSi6 em 48 horas. Portanto, o SSi6 é capaz induzir autofagia de forma mais eficiente na linhagem MDA-MB-231, do que nas células não tumorais MCF-10A.

Figura 8 - Efeitos do SSi6 na morfologia celular das células MDA-MB-231. As células (1×10^5) foram tratadas com as concentrações indicadas e as imagens foram capturadas após de 2, 6, 24 e 48 horas após o tratamento, utilizando um microscópio invertido (amplificação 100 \times), escala da barra = 100 μm . As setas indicam alterações morfológicas realizadas pelo tratamento com o SSi6 nas células.

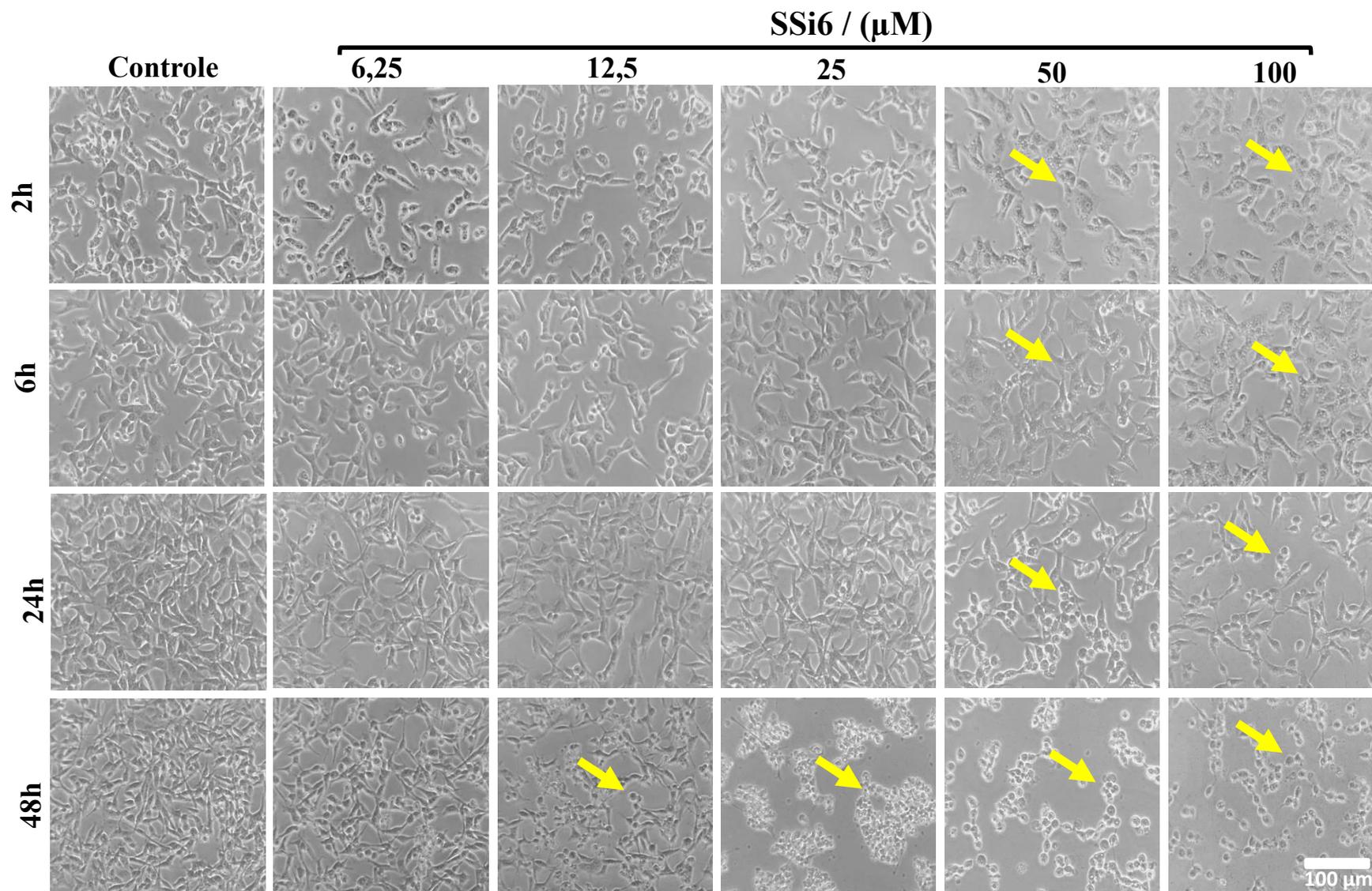


Figura 9 - Efeitos do SSi6 na morfologia das células não tumorais de mama MCF-10A. As células (1×10^5) foram tratadas com SSi6 (6,25; 12,5; 25; 50 e $100 \mu\text{M}$) por 2, 6, 24 e 48 horas, as imagens foram capturadas utilizando o microscópio invertido (amplificação $100\times$), escala da barra = $100 \mu\text{m}$. As setas mostram alterações provocadas pelo tratamento com o SSi6.

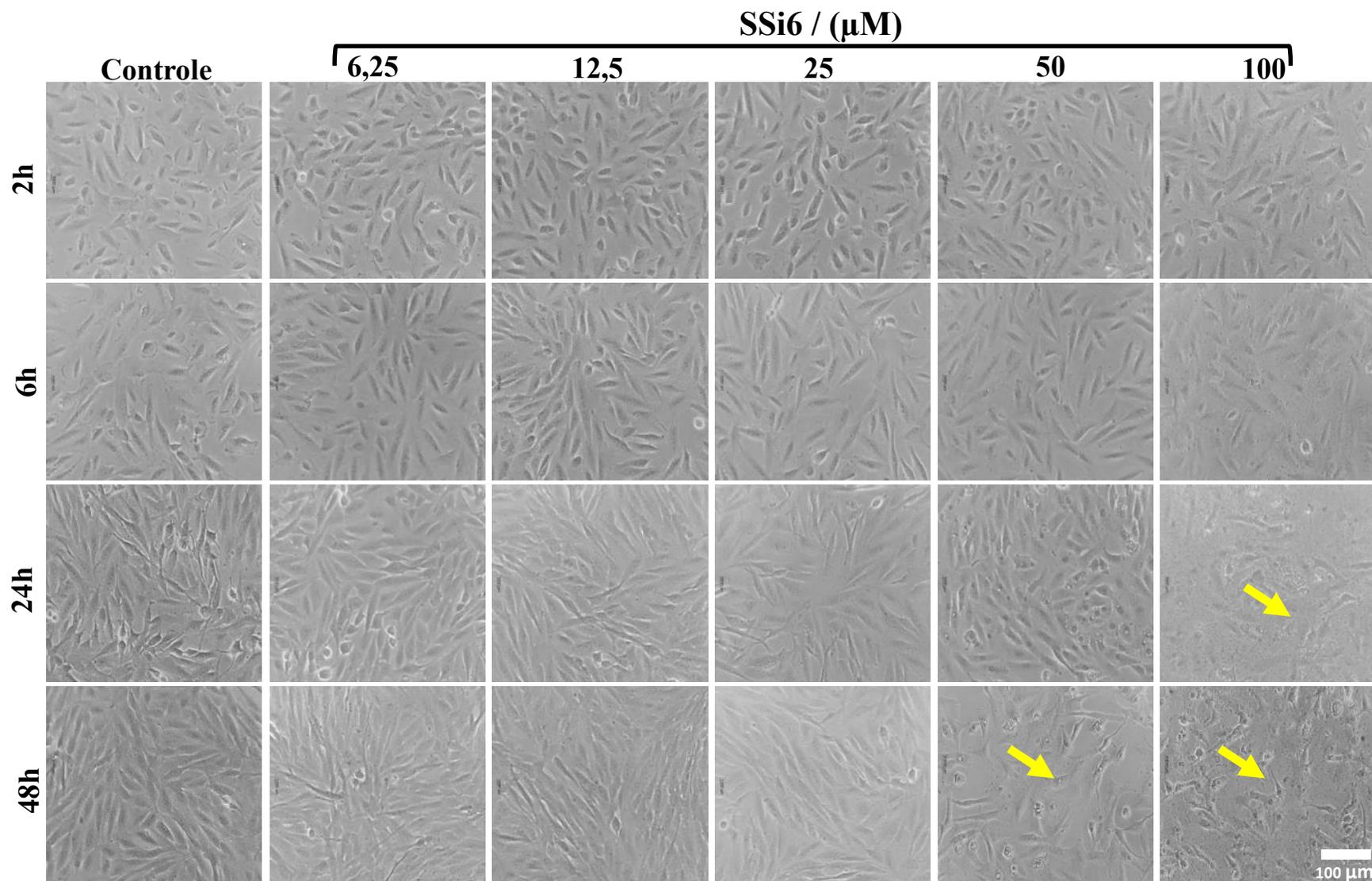
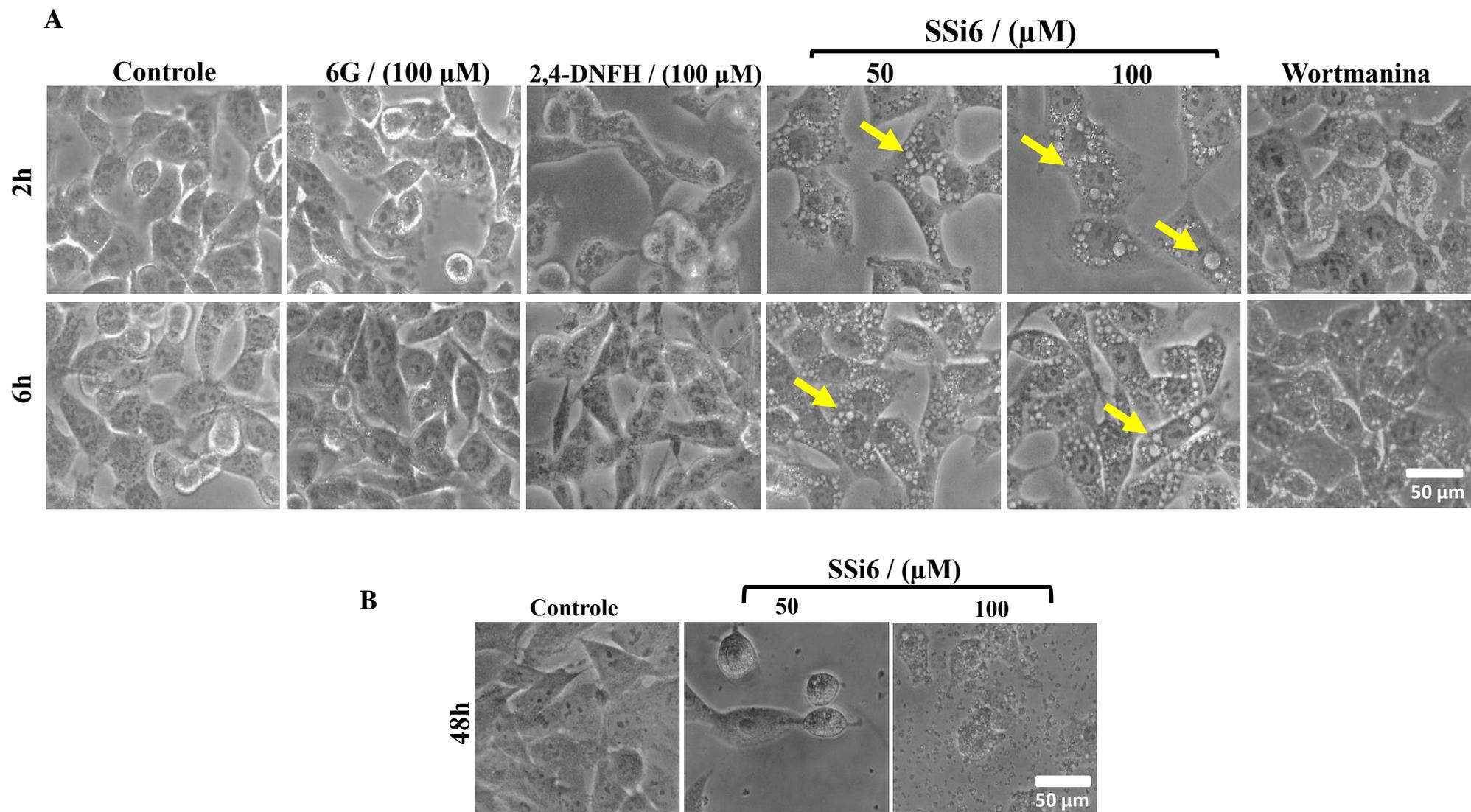


Figura 10 - Efeitos das substâncias na morfologia celular das células MDA-MB-231 e MCF-10A. (A) As células MDA-MB-231 (1×10^5) foram tratadas com as substâncias 6G; 2,4-DNFH, SSi6 e wortmanina ($30 \mu\text{M} + 50 \mu\text{M}$ de SSi6), nas concentrações indicadas. As imagens foram capturadas após de 2 e 6 horas de tratamento. (B) As células MCF-10A foram tratadas com SSi6 (50 e $100 \mu\text{M}$) durante 48 horas de tratamento, utilizando um microscópio invertido (amplificação $400\times$), escala bar = $50 \mu\text{m}$. As setas indicam vacúolos citoplasmáticos nas células MDA-MB-231 após incubação com SSi6 durante 2 e 6 horas.



4.2 Citotoxicidade

Com a finalidade de investigar os efeitos do 6G, 2,4-DNFH e SSi6 sobre a viabilidade das células MDA-MB-231 e MCF-10A, foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando o reagente MTT (Figuras 11A e B e a Tabela 4).

Figura 11 - Efeitos do SSi6 e 6G sobre a viabilidade celular. As células (MDA-MB-231 e MCF-10A) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações das substâncias, o veículo foi tratado com 1% de DMSO durante 48 horas. (A) Gráfico de IC₅₀ nas células MDA-MB-231 e MCF-10A tratadas com o SSi6. (B) Gráfico de IC₅₀ nas células MDA-MB-231 e MCF-10A tratadas com o 6G.

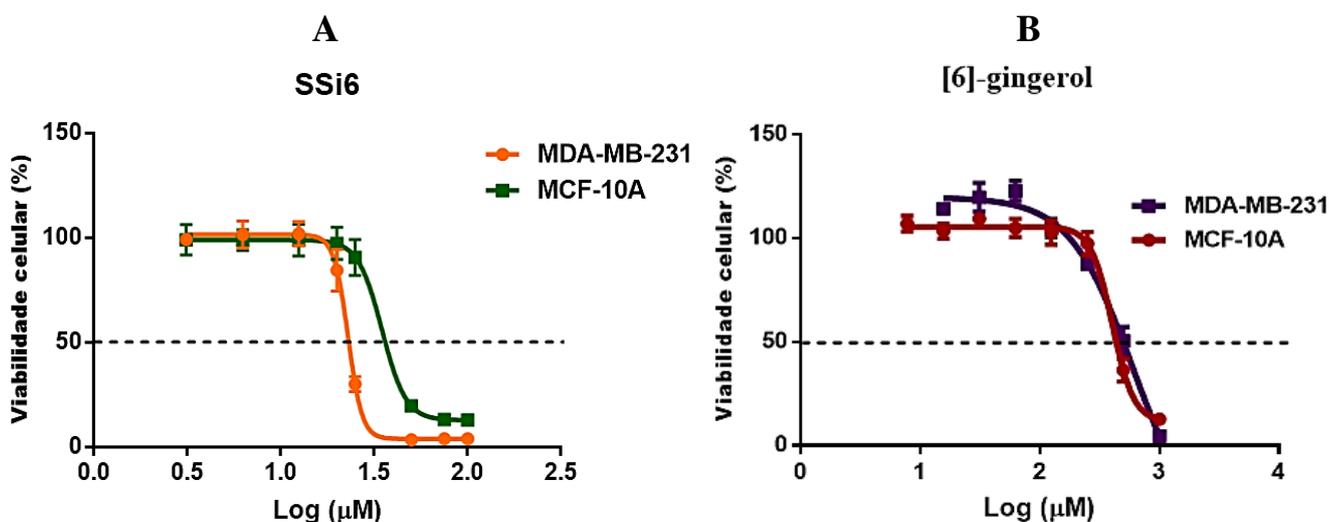


Tabela 4 – Valores de IC₅₀ do [6]-gingerol (6G), 2,4-DNFH e do SSi6 nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A

Substância	IC ₅₀ / (µM)		Índice de seletividade (IS)
	MDA-MB-231	MCF-10A	
6G	404,5 ± 17,6	599,4 ± 18,5	1,48
2,4-DNFH	>100	>100	-----
SSi6	22,90 ± 0,35	34,17 ± 2,49	1,49

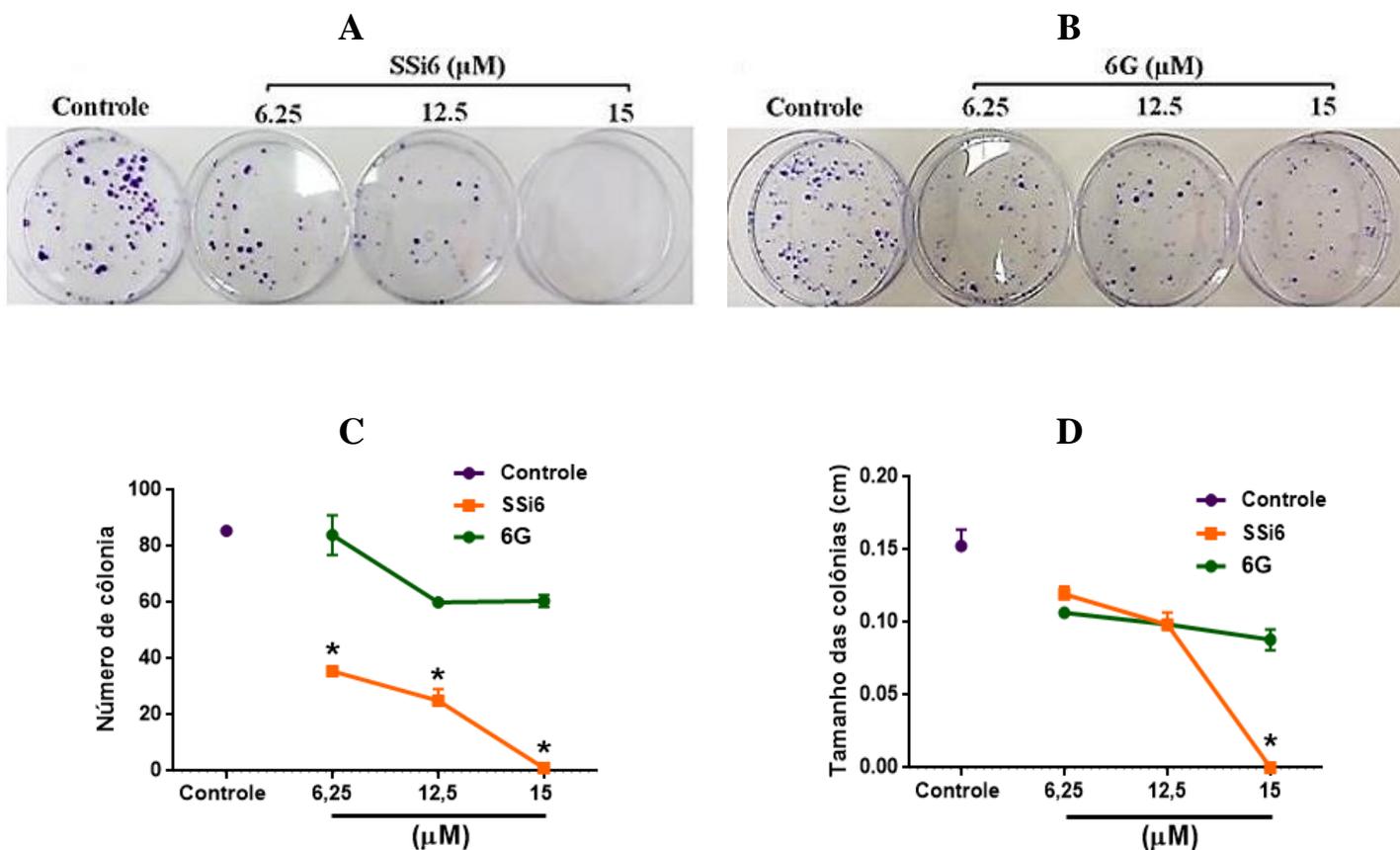
Como podemos observar na Tabela 4, o efeito sobre a citotoxicidade celular das substâncias foi bastante diverso sobre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A. Cabe ressaltar que o valor do IC₅₀ da 2,4-DNFH não foi refinado (não foi determinado um valor específico), já que para a máxima concentração do SSi6 utilizada (100 µM), mostrou-se inativo. Por outro lado, para o 6G foi feito um estudo mais rigoroso para determinar o valor do IC₅₀, devido a que é um parâmetro que pode ser comparado com a literatura.

O SSi6 (vide Figura 11A), provocou uma diminuição mais acentuada na viabilidade celular (de forma dependente da concentração) nas células MDA-MB-231, quando comparadas com a linhagem não tumoral de mama MCF-10A, esta última é utilizada como controle de seletividade. Os valores IC_{50} apresentados Tabela 4, são de 22,9 e 34,17 μM para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A respectivamente, estes resultados são desejados, quando se quer que o composto testado apresente maior seletividade pelas células tumorais. Um efeito citotóxico menor foi observado para o [6]-gingerol (Figura 11B), com valores de IC_{50} de 404,5 μM para MDA-MB-231 e de 599,4 μM para as células MCF-10A, o que significa que é bem menos ativo que seu homólogo semissintético o SSi6. O valor de IC_{50} para o 6G na MDA-MB-231 era esperado, já que diversos trabalhos reportados na literatura mostram resultados similares como os determinados neste trabalho (ALMADA DA SILVA et al., 2012; POLTRONIERI et al., 2014). Paralelamente, os efeitos citotóxicos da 2,4-DNFH nas linhagens celulares, apresentam valores de $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ em ambas as linhagens. Portanto, de acordo com os resultados apresentados, demonstramos que a modificação química realizada no [6]-gingerol, permitiu uma melhora de aproximadamente de 17 vezes no valor IC_{50} , passando de $404,5 \pm 17,6 \mu\text{M}$ para $22,90 \pm 0,35 \mu\text{M}$.

4.3 Ensaio clonogênico (formação de colônias)

O ensaio de formação de colônias é baseado na habilidade que tem uma única célula, em crescer e reproduzir-se em colônias, e é utilizado para avaliar a capacidade de reprodução das células após a exposição a agentes citotóxicos (FRANKEN et al., 2006).

Figura 12 - Efeitos do SSI6 e 6G na formação de colônias de células MDA-MB-231. (A, B) As células foram semeadas em placas de Petri e tratadas ou não com concentrações indicadas do SSI6 e 6G. (C) Número de colônias normalizado de acordo com o controle (* $p < 0,0001$ vs o controle negativo). (D) Tamanho das colônias (* $p < 0,05$ vs o controle negativo). Os dados representam a média \pm desvio padrão de três testes independentes em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando *one-way* ANOVA, seguido por uma análise post-hoc de Tukey.



Na Figura 12A, observa-se que o número e tamanho das colônias das células MDA-MB-231, diminui significativamente após o tratamento com o SSI6 em todas as concentrações testadas, quando comparado com o controle negativo. Destaque-se que para a concentração de 15 μM o SSI6 inibiu completamente a formação de colônias (vide também a Figura 12A e C). O anterior indica portanto, que o SSI6 possui um efeito citotóxico (inibe o número de colônias) mais efetivo do que um efeito citostático (inibe tamanho das colônias) nas células MDA-MB-231. Quando as células foram tratadas com o 6G (Figura 12B, C e D) não houve uma inibição significativa nem no número, nem no tamanho das colônias, indicando mais uma vez, que a modificação semissintética do 6G, quando usa-se a combinação, é o responsável pela seletividade e pelos efeitos nas células tumorais até aqui mostrados.

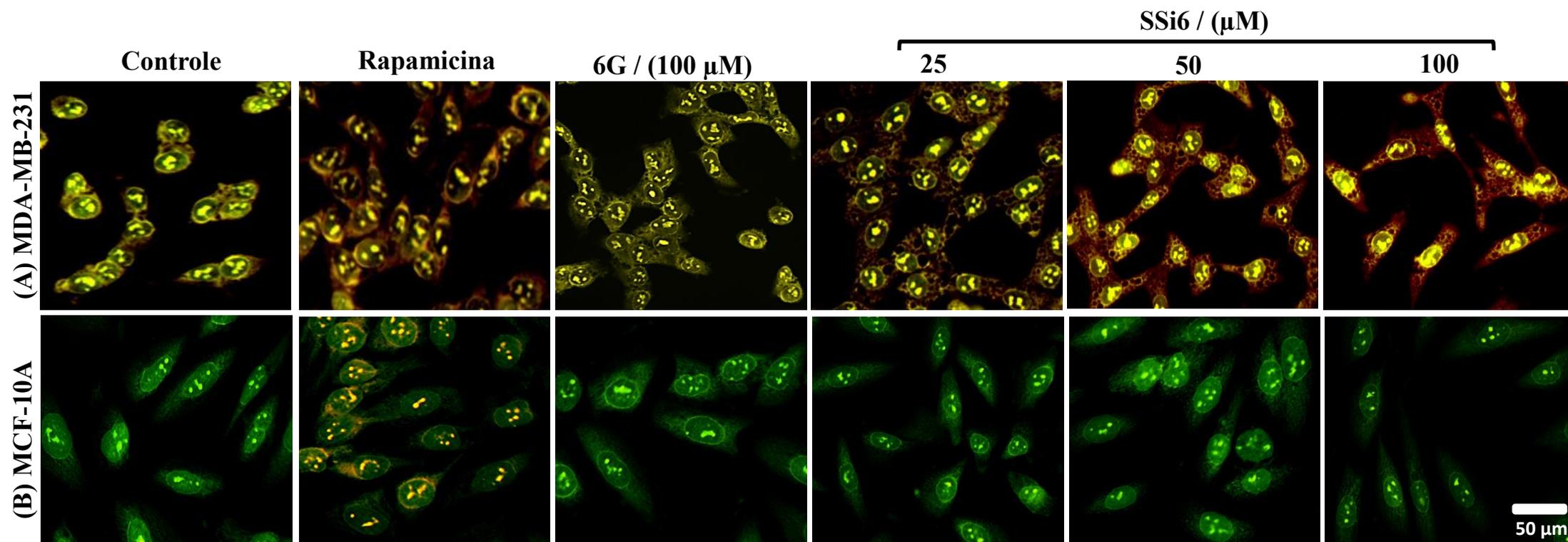
4.4 Determinação das Organelas Ácidas Vesiculares (AVOs)

A fim de esclarecer a natureza dos vacúolos citoplasmáticos induzidos pelo SSi6 observados nas células MDA-MB-231, foi realizado o ensaio de detecção de AVOs utilizando o laranja de acridina (AO), um corante acidotrópico que detecta facilmente a formação de AVOs nas células (CHEN; AZAD; GIBSON, 2010). Como explicado na metodologia (subseção 3.2.3), o AO mostra uma cor verde na ausência de compartimentos ácidos (monômero) e uma intensa cor laranja (dímero) na presença de AVOs.

Na Figura 13A, é possível observar uma forte fluorescência alaranja na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 após 6 horas de tratamento, a qual é diretamente proporcional à concentração do SSi6 utilizada (25, 50 e 100 μM). O resultado anterior poderia indicar, que esta substância induz aparecimento de AVOs nas células tumorais, porém, sendo rigorosos com a interpretação deste resultado, podemos simplesmente afirmar que o pH na região do citoplasma é ácido. Com este ensaio não podemos afirmar que o SSi6 leva à formação das AVOs, devido a que se analisamos a cor dos vacúolos (pequenos círculos pretos nas imagens), somente observamos a fluorescência laranja ao redor deles. Isto justamente pode ser correlacionado quando observamos os resultados da rapamicina, um indutor de autofagia utilizado como controle positivo, em que para a linhagem tumoral, se evidencia uma fluorescência laranja na região do citoplasma. Já no caso do 6G, é evidente que este composto não leva à formação de vacúolos e conseqüentemente não gera AVOs, resultando em uma imagem muito similar com a do controle negativo.

Por outro lado na análise da linhagem não tumoral MCF-10A (vide Figura 13B), a exceção do controle positivo, em todas as imagens se observa a predominância de uma fluorescência verde, indicando que não houve formação de AVOs em nenhum dos casos.

Figura 13 - Efeitos do SSi6 e 6G na formação de organelas ácidas vesiculares (AVOs). (A) As células MDA-MB-231 e (B) MCF-10A foram tratadas com concentrações indicadas de SSi6 e 6G (100 μ M) durante 6 horas ou com rapamicina 500 nM durante 24 horas (controle positivo da autofagia). As células foram então coradas com laranja de acridina (AO) e as imagens foram capturadas com o *ImageXpress micro*, detectando a formação de AVOs, escala da barra = 50 μ m.

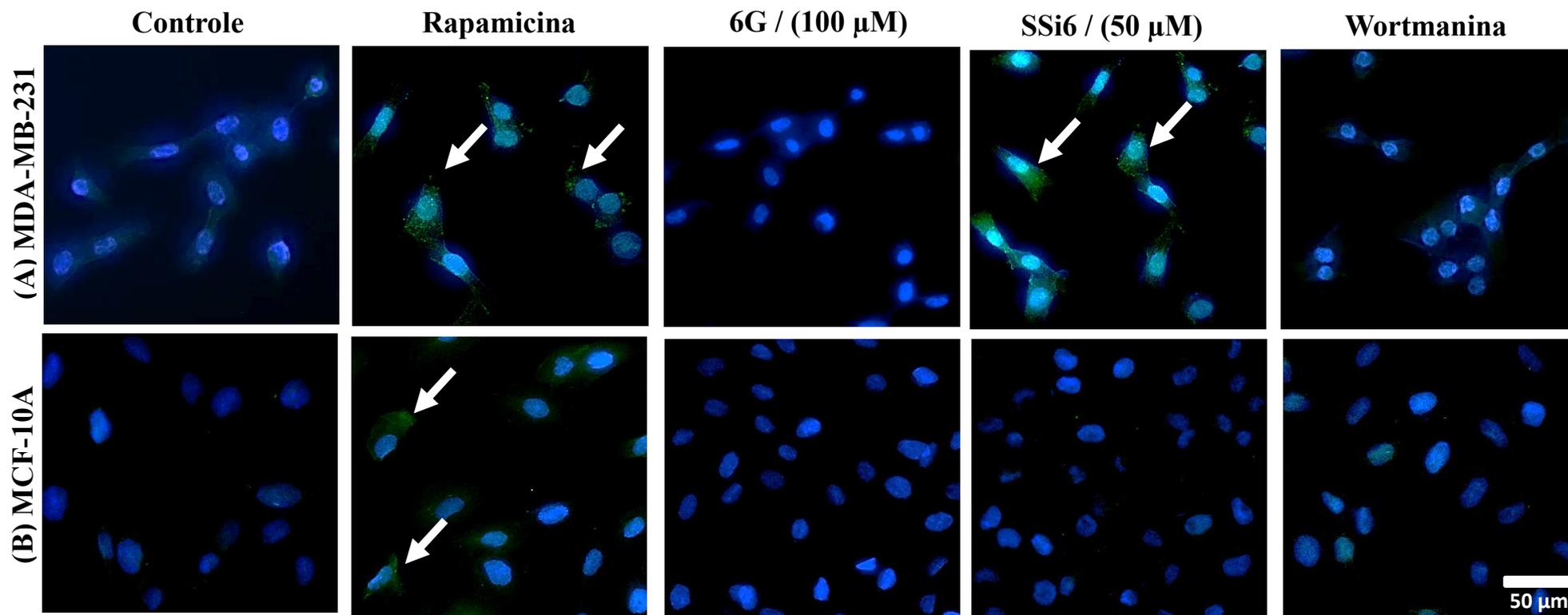


4.5 Imunocitofluorescência

Para determinar que o SSi6 leva a indução da autofagia nas células MDA-MB-231, foi realizado o ensaio de imunocitoquímica para detecção da proteína LC3 (em alguma de suas duas isoformas, LC3-I e II). Este ensaio também foi realizado com a linhagem não tumoral de mama, para demonstrar que esta substância não induz autofagia em células normais. Por motivos de comparação também foi utilizado o 6G em ambas as linhagens. A Figura 14A mostra claramente a indução de autofagia nas células MDA-MB-231 após 6 horas de tratamento com o SSi6 (50 μ M). Como é indicado pelas setas nesta Figura, tanto no tratamento com o SSi6 como no controle positivo (rapamicina- 500 nM), é observada uma intensa fluorescência verde, a qual é indicativa da marcação (presença) da proteína LC3 pelo anticorpo. Ao igual que o controle negativo (DMSO 1%), o tratamento com o 6G (100 μ M), não evidenciou a presença de LC3, indicando que este composto de forma individual não é capaz de induzir autofagia nas concentrações e tempos testados.

Já na linhagem não tumoral de mama MCF-10A exposta ao tratamento com o SSi6, não foi detectada a presença da proteína LC3, pois não houve marcação no citoplasma das células (Figura 14B). Neste ensaio também foi realizado o controle de inibição da autofagia (wortmanina 30 μ M + 50 μ M de SSi6), o qual revelou que a wortmanina inibe a síntese da proteína LC3, e conseqüentemente a marcação desta pelo anticorpo, isto demonstra definitivamente, que o SSi6 é um indutor do processo autofágico nas células MDA-MB-231.

Figura 14 - Efeitos do SSi6 e 6G na indução de autofagia através do ensaio de imunocitoquímica. (A) As células MDA-MB-231 e (B) MCF-10A foram tratadas com as concentrações indicadas do SSi6 e 6G (100 μ M), rapamicina 500 nM (controle positivo da autofagia) e com wortmanina (inibidor da autofagia) 30 μ M concomitante com 50 μ M do SSi6 durante 6 horas. As células foram incubadas com anti-LC3B e *Alexa fluor 488*. As imagens foram capturadas com o *ImageXpress micro*, escala da barra= 50 μ m. As setas indicam a marcação da proteína LC3 após incubação de rapamicina e SSi6 durante 24 e 6 horas, respectivamente.

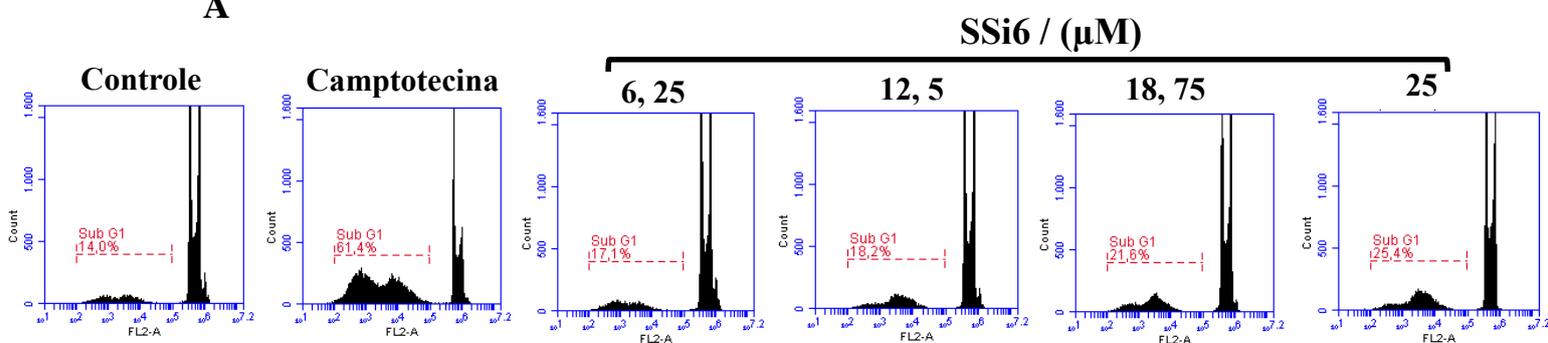


4.6 Ciclo celular

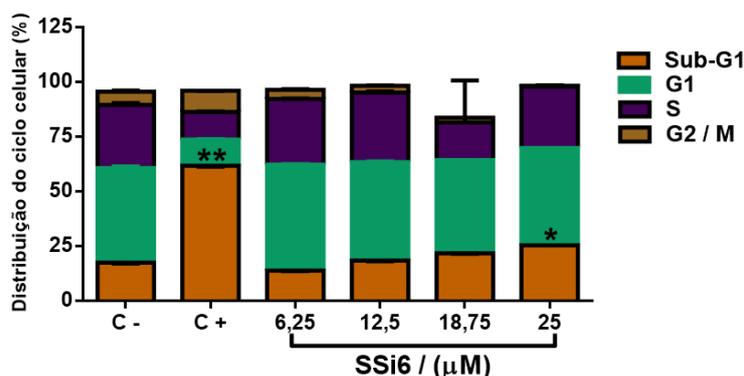
Agentes antitumorais podem induzir a parada do ciclo celular, fornecendo informações específicas sobre seu provável mecanismo de ação (VICENCIO et al., 2008). Existem certas características das células apoptóticas que podem ser utilizadas para distinguir uma população de células apoptóticas das saudáveis. Tecnicamente, a característica mais fácil de detectar é a perda de DNA, pois durante o processo da apoptose ocorre a fragmentação do DNA das células. Por este motivo, foi investigado os efeitos do SSi6 sobre a distribuição do ciclo celular em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. As células foram tratadas com SSi6 nas concentrações mostradas abaixo, durante um tempo de 24 horas e submetidas a análise por citometria de fluxo.

Figura 15 - Efeitos de SSi6 na distribuição do ciclo celular de células MDA-MB-231. As células foram tratadas durante 24 horas com as concentrações indicadas do SSi6 e a distribuição das fase do ciclo celular foi avaliada utilizando citometria de fluxo. (A) Gráficos de densidade mostrando a porcentagem de células na fase sub-G1 do ciclo celular. (B) Diagrama de barras representando a porcentagem de células em diferentes fases (sub G1, G1, S e G2) do ciclo celular. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando *one-way* ANOVA seguida por uma análise post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$ vs o controle negativo, ** $p < 0,0001$ vs o controle negativo.

A



B



Os resultados mostram que não houve diferenças significativas nas fases G1, S e G2/M na população e porcentagem das células tratadas com o SSi6 (concentrações abaixo do IC₅₀) durante 24 horas (Figuras 15A, B). Porém, a análise do ciclo celular revelou um aumento significativo da fluorescência das células na fase sub-G1 em relação ao controle, sendo maior na concentração de 25 µM. Este resultado é importante já que indica que as células estão sofrendo o processo de apoptose, impedindo que as células entrem no ciclo celular. Como descrito anteriormente nos ensaios de morfologia e AVOs na MDA-MB-231 durante as primeiras horas de tratamento (2 e 6 horas), as células mostram características fenotípicas e fluorescentes típicas, que provavelmente indiquem que o processo autofágico está sendo promovido após o tratamento com SSi6 (50 e 100 µM). Adicionalmente, no ensaio de morfologia durante 24 horas de incubação utilizando as mesmas concentrações, as células adquirem um formato circular com perda da densidade celular. Tais alterações morfológicas são características das células que estão sofrendo apoptose. Portanto, pode ser afirmado preliminarmente que as células tumorais de mama sofrem autofagia nas primeiras horas de exposição ao SSi6 e, apoptose em tempos maiores de tratamento.

4.7 Determinação de taxa apoptótica com Anexina V por citometria de Fluxo

Para analisar de forma mais específica, a indução do processo apoptótico pelo SSi6 na linhagem tumoral MDA-MB-231, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo, utilizando os corantes Anexina V e 7-AAD. Este ensaio também foi realizado para o 6G e utilizando os respectivos controles. A Anexina V, é um corante fluorescente que se liga à fosfatidilserina externalizada na membrana celular das células apoptóticas (indicativo de apoptose), enquanto que o 7-AAD, possui uma alta afinidade pelo DNA, este corante passa livremente ao interior das células que possuem a membrana danificada, marcando células em necrose. A interpretação e análise deste ensaio, é realizada observando os quadrantes das Figura 16A e B, os quais tem os seguintes significados:

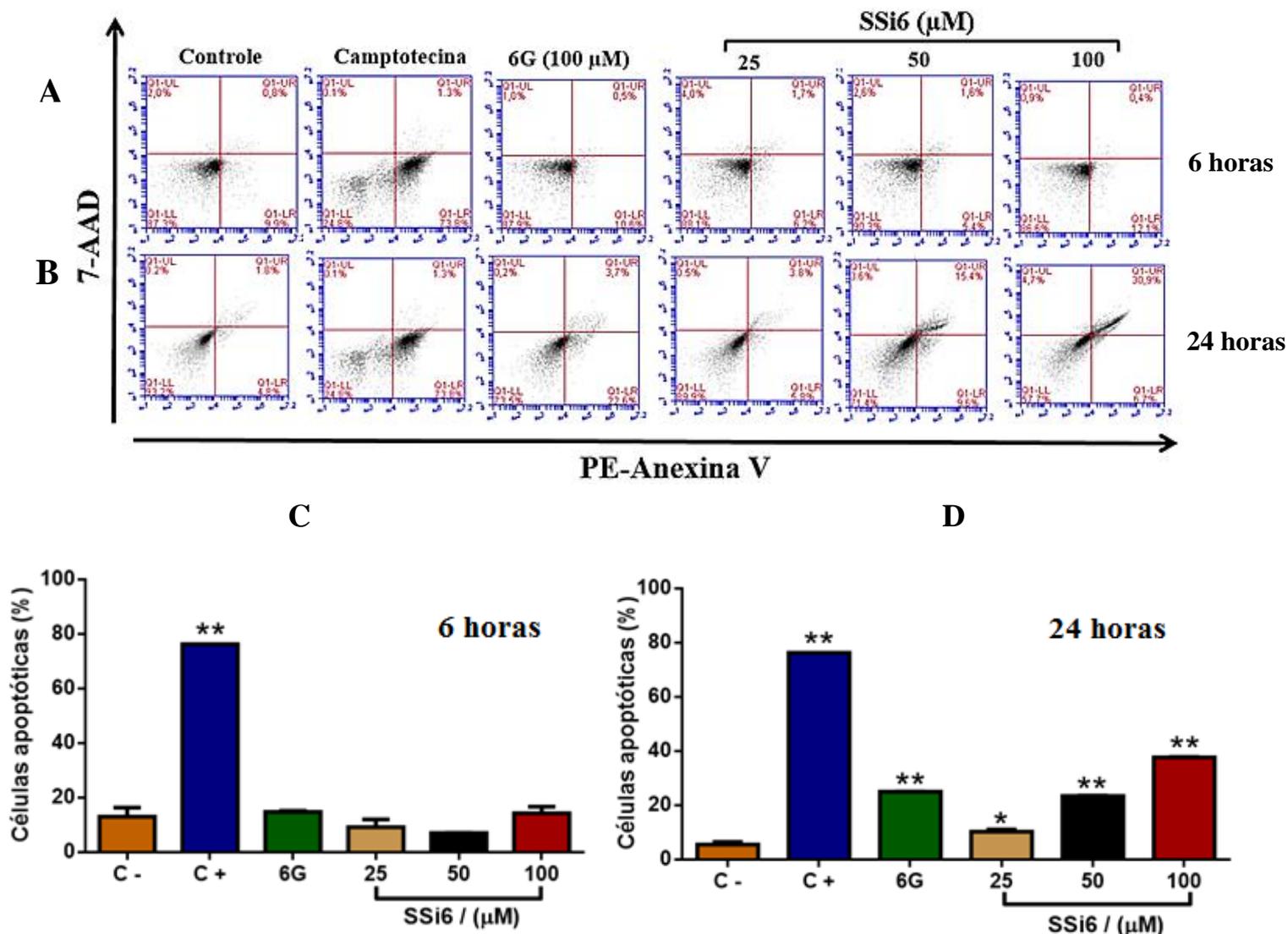
Quadrante inferior esquerdo (Q1-LL, *lower left quadrant*): representa as células viáveis (Anexina V(-) e 7-AAD(-));

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(+)).

Figura 16 - Efeitos do SSi6 e 6G na indução da apoptose em células MDA-MB-231. As células (1×10^5) foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com concentrações indicadas de SSi6 e 6G (100 μM) durante (A e C) 6 horas e (B e D) 24 horas. Como controle positivo da apoptose foi utilizada a camptotecina. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando *one-way* ANOVA, seguido por uma análise post-hoc de Tukey. * $p < 0,001$ vs o controle negativo, ** $p < 0,0001$ vs o controle negativo.



Os ensaios foram realizados nos tempos de 6 e 24 horas de forma independentes. Nestes tempos foi analisado o tipo de morte celular que prevalece em cada um destes períodos. Após 6 horas de tratamento com o SSi6, a percentagem de células em apoptose não foi significativa, tendo um comportamento igual ao controle negativo, já que quase toda a totalidade da população celular se encontra no quadrante Q1-LL, (vide Figura 16A). O anterior também pode ser observado na Figura 16C, em que nenhuma das concentrações do SSi6 leva a percentagens significativos de apoptose. Estes resultados confirmam que durante as primeiras 6 horas de tratamento, as células estão sob

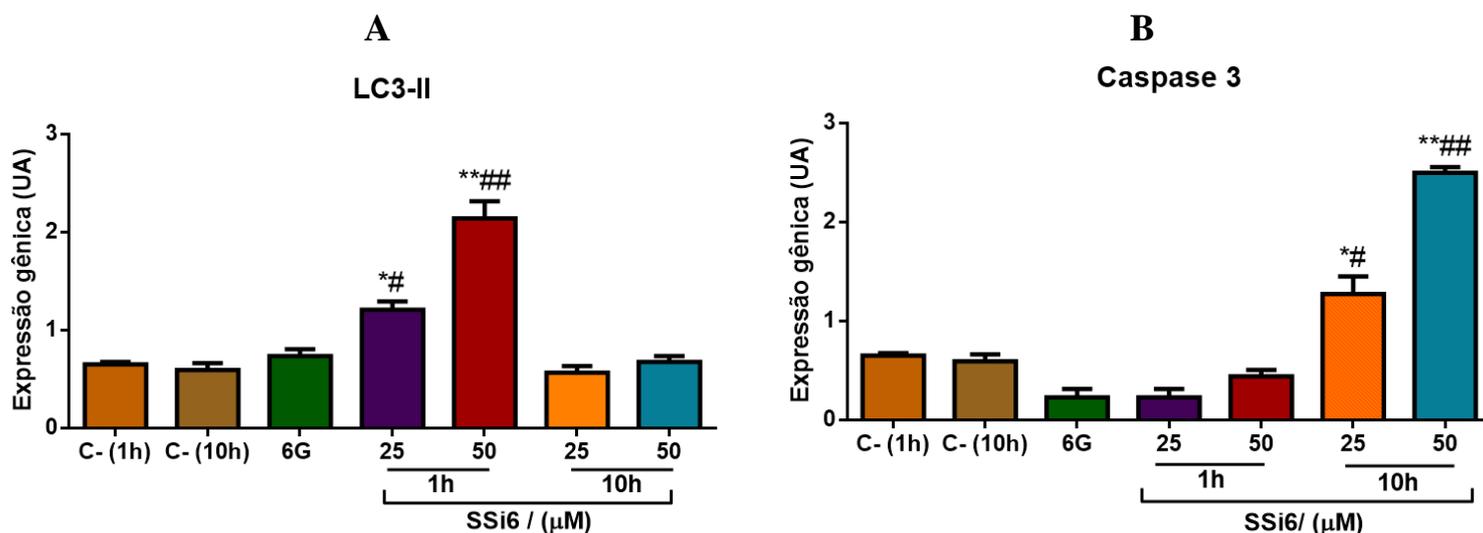
um processo autofágico, o que é novamente coerente com o relatado nos resultados dos ensaios anteriores. Por outro lado, após 24 horas de tratamento com o SSi6, as células apresentam um aumento significativo na porcentagem de apoptose em relação ao controle negativo, observado pelo aumento da população das células que se encontram nos quadrantes Q1-LR e Q1-UR (Figura 16B). Isto também pode ser corroborado na Figura 16D, indicando então, que as células se encontram em sua maioria em um processo de apoptose tardia. Portanto, o processo predominante no início é autofagia, e nas horas finais de tratamento há predominância apoptose.

A incubação com o 6G (100 μ M) por 6 horas não resultou em aumento significativo de apoptose (todas as células estão viáveis, vide quadrante Q1-LL), processo que só ocorreu após 24 horas de incubação, quando a porcentagem de células apoptóticas aumentou em relação ao controle negativo. O anterior indica que em tempos maiores, o 6G também é indutor de apoptose em células tumorais de mama. Finalmente, estes resultados sugerem que o SSi6, inicia nas células um processo autofágico e, que a maquinaria celular, não conseguindo se reestabelecer, entra em apoptose após 24 horas de incubação.

4.8 PCR em tempo real (qPCR)

Para determinar se o SSi6 induz os processos de autofagia e apoptose nas células tumorais MDA-MB-231, foi analisada a expressão de genes que participam nestes processos após a exposição com o SSi6. Este ensaio também foi realizado com o 6G. O gene que codifica para a proteína LC3B (LC3-II) é normalmente utilizado para estimar a abundância de autofagossomos e, portanto, confirma o processo autofágico nas células. Por outro lado, a proteína caspase-3, é uma proteína chave na indução da morte celular por apoptose.

Figura 17 - Efeitos do SSi6 e 6G sobre a expressão de genes relacionados à autofagia e apoptose em células MDA-MB-231. As células foram incubadas com SSi6 (25 e 50 μM) e 6G (50 μM) durante dois tempos diferentes e em ensaios independentes: (A) 1 hora-6G, 1 hora-SSi6 e 10 horas-SSi6 para determinar a expressão gênica da LC3-II e (B) 10 horas-6G, 1 hora-SSi6 e 10 horas-SSi6 para avaliar a expressão do gene da caspase-3. O RNA total foi extraído e os cDNAs foram sintetizados. A amplificação do controle endógeno (RPI37A) e de cada um dos genes alvo foi realizada utilizando o equipamento de PCR em tempo real. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando *one-way* (ANOVA) e *t test*. Significância estatística: * $p < 0,05$ vs o controle negativo, ** $p < 0,001$ vs o controle negativo, # $p < 0,01$ vs o controle negativo no respectivo tempo, ## $p < 0,001$ vs o controle negativo no respectivo tempo.



A expressão gênica de LC3-II após o tratamento com SSi6 (1 e 10 horas) e 6G (1 hora) é apresentada na Figura 17A. Observa-se que houve uma regulação gênica positiva da LC3-II 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 LC3-II.

A Figura 17B mostra os resultados da expressão gênica da caspase-3 após o tratamento com as substâncias. 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 este gene teve sua expressão regulada positivamente, em relação ao controle. O 6G não provocou alteração na expressão gênica de LC3-II e caspase-3 nas concentrações e tempos testados, o que está de acordo com o demonstrado em ensaios anteriores. Um aspecto importante nestas análises, é o fato de que o SSi6 induz a expressão destes dois genes, os quais são de vital importância nos processos de autofagia e apoptose, isto comprova mais uma vez, que o SSi6 tem efeitos em induzir ambos eventos (autofagia e apoptose) nas células tumorais de mama MDA-MB-231.

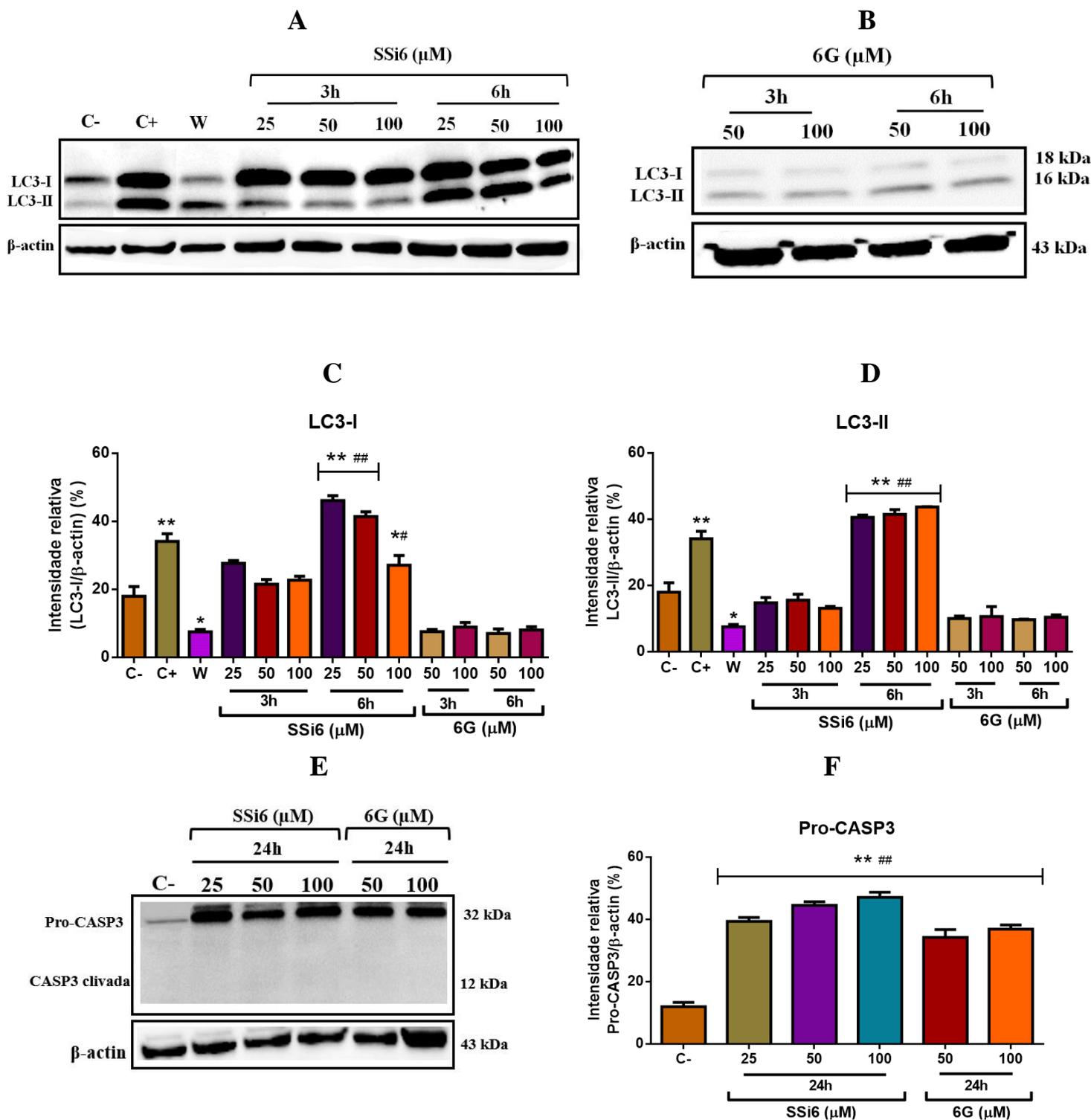
4.8 Análise do nível proteico por *western blotting*

No ensaio anterior foi determinada a expressão gênica para os processos de autofagia e apoptose, mostrando que o SSi6 induz ambos os processos. Neste ensaio, foram determinados os níveis proteicos, associados a esses genes, das isoformas da LC3 (LC3-I e II) e da caspase-3 (pro-casp3 e casp3 clivada). Este procedimento denominado *western blotting*, foi realizado com o intuito de complementar o mostrado nos ensaios anteriores, em que se evidencia que ação conjunta destes dois processos celulares, é induzida pelo SSi6.

Na Figura 18A, se mostram os níveis proteicos das proteínas LC3-I e II após a exposição ao tratamento. Em somente 3 horas de incubação com o SSi6 (25, 50 e 100 μM), são observados níveis significativos das isoformas LC3-I e LC3-II, esta última em níveis menores. Tais níveis são diretamente proporcionais às intensidades das bandas observadas na Figura. Estes resultados foram comparados com o controle endógeno (β -actina), que é uma proteína cujos níveis permanecem constantes sob as condições avaliadas e com os controles negativo (DMSO 1%), positivo de indução da autofagia (rapamicina 500 nM) e de inibição da autofagia (wortmanina 30 μM + 100 μM de SSi6). Após 6 horas de tratamento, os níveis proteicos para a LC3-I e II, ficaram com valores muito próximos. O anterior pode ser observado mais facilmente nas Figuras 18C e D, em que barras do gráfico, representam as intensidades dos níveis proteicos de ambas as isoformas. Este ensaio proporciona uma análise mais quantitativa, para poder afirmar que nas primeiras horas de tratamento com o SSi6, o processo predominante é o autofágico.

O tratamento das células com 6G (vide Figura 18B), como era de se esperar, mostrou uma diminuição dos níveis proteicos da LC3-I e II bastante marcante, em relação aos resultados obtidos com o SSi6. Esses resultados concordam com o que foi mostrado anteriormente, comprovando mais uma vez que o 6G, nos tempos e nas concentrações testadas neste estudo, não induz a expressão da LC3, e conseqüentemente, não induz um processo autofágico. Isto também pode ser observado nos gráficos de barra das Figuras C e D descritas acima (vide Figura 16).

Figura 18 - Efeitos do SSI6 e 6G sobre o nível proteico da LC3 e caspase-3 em células tumorais MDA-MB-231. As células foram tratadas por 3 e 6 horas com SSI6 e 6G com as concentrações indicadas para a análise por *western blotting*. (A) Intensidade das bandas da LC3-I e II tratadas com SSI6 e com (B) 6G por 3 e 6 horas. (C) e (D) Gráficos de barras que representam a medida da intensidade das bandas dos tratamentos anteriores. (E) Nível proteico da caspase-3 (pro-casp3 e casp3 clivada) tratadas com o SSI6 e o 6G durante 24 horas. (F) Gráfico de barra representando a medida da intensidade da banda da pro-caspase-3. Os controles realizados correspondem ao controle negativo (DMSO 1%), controle positivo de indução da autofagia (rapamicina 500 nM-24 horas), controle de inibição da autofagia (wortmanina 30 μM + 100 μM de SSI6-6 horas) e controle endógeno (β-actina). Os resultados foram comparados utilizando *one-way* (ANOVA) e *t test*. Significância estatística: * p<0,05 vs o controle negativo, ** p<0,001 vs o controle negativo, *** p<0,0001 vs o controle negativo, ## p<0,001 vs o controle negativo no respectivo tempo.



De forma paralela, analisou-se o efeito no nível proteico da caspase-3 após 24 horas de tratamento com o SSi6 e o 6G (Figuras 18E e F). Conforme pode ser observado, o aumento da proteína pro-caspase 3 (forma inativa) foi significativo com relação ao controle negativo, tanto para o SSi6 como para o 6G, porém, não foi observado o mesmo efeito para a caspase-3 clivada. O anterior pode ser explicado devido a que a caspase-3 só se torna funcionalmente ativa para iniciar o processo de apoptose, quando é clivada em moléculas de aproximadamente 12 KDa. Isto significa que este ensaio não é conclusivo em termos de confirmar o processo apoptótico nos tempos finais do tratamento.

4.9 Ensaio de Migração celular *Wound Healing*

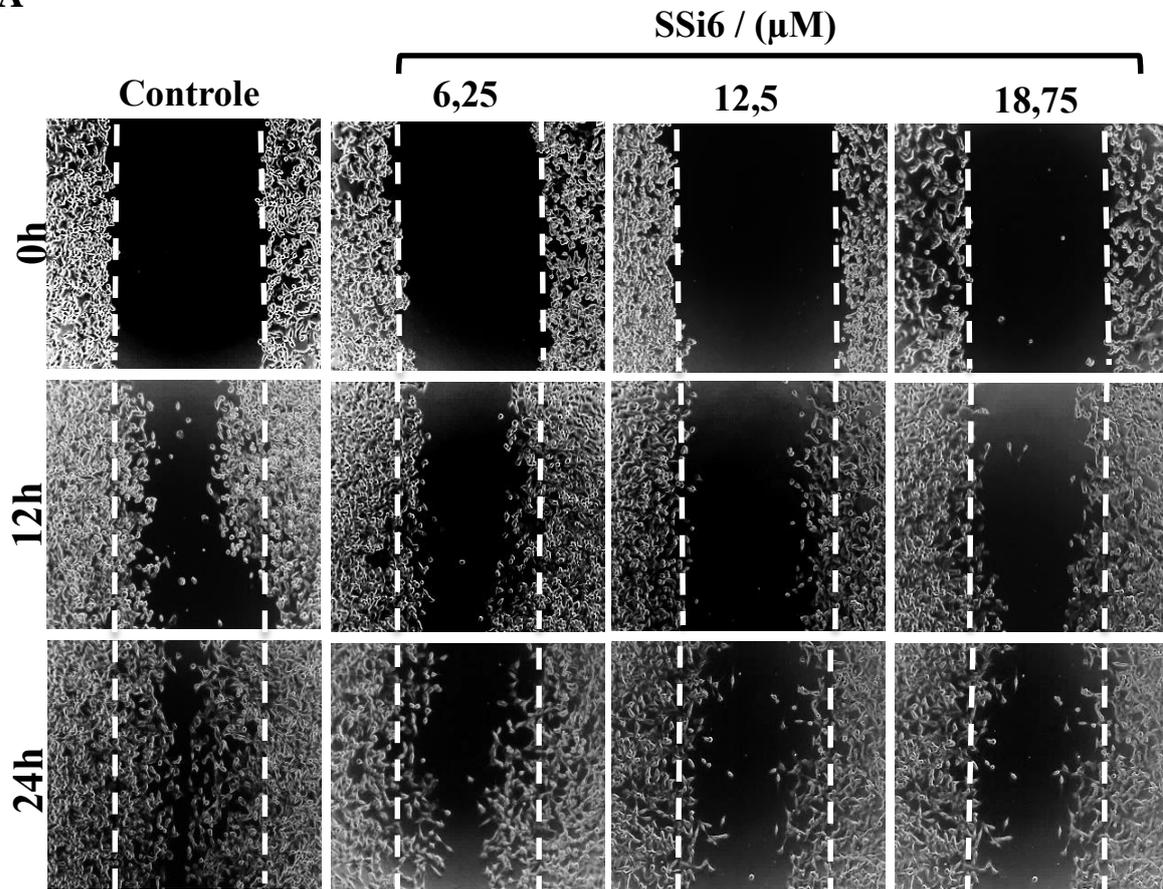
Os resultados preliminares de morfologia, citotoxicidade celular e ensaio de formação de colônias, mostraram que o SSi6 tem potencial anti-proliferativo em baixas concentrações e tempos curtos de tratamento nas células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. Além disso, como mostrado nos ensaios anteriores, o SSi6 mostrou ser um indutor dos processos de autofagia e apoptose nas células tumorais. Outro ponto importante que precisa ser estudado, é determinar se o SSi6 interfere nas etapas do processo metastático, pois estes ensaios, permitem entender o efeito do SSi6, na migração e invasão celular *in vitro*.

Dando continuidade a avaliação dos efeitos do SSi6 em algumas das etapas do processo metastático, decidimos investigar sua ação sobre a migração celular, tendo em conta que este é o primeiro passo da disseminação tumoral (metástase). Este processo envolve uma série de interações adesivas e não adesivas com a matriz extracelular (MEC), permitindo chegar até tecidos adjacentes (YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005). Para analisar a ação do SSi6 na migração celular, realizou-se o ensaio de *Wound Healing*.

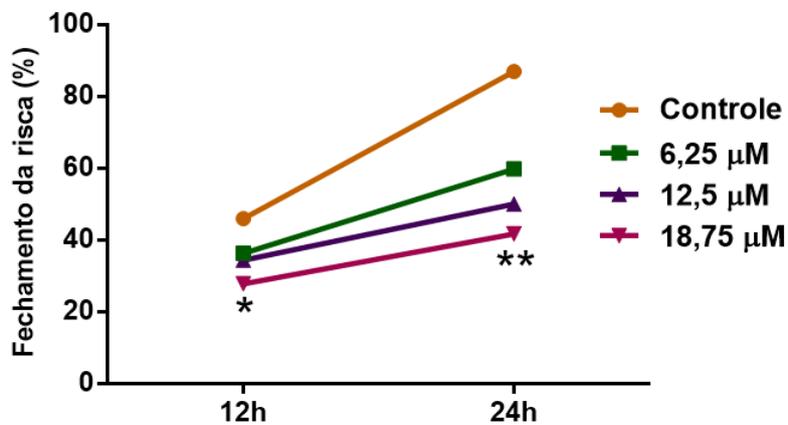
Os resultados das Figuras 19A e B, mostram que a partir de 12 horas de tratamento, o SSi6 inibe em todas as concentrações testadas o fechamento da risca, ou seja, inibe a migração celular. Isto é significativo na concentração de 18,75 μ M. Os resultados, como observado na Figura, são ainda mais marcantes após 24 horas de tratamento em relação ao controle negativo. Todas as concentrações testadas foram escolhidas em base aos resultados da morfologia celular (vide Figura 8), ou seja, estas concentrações não provocam alterações morfológicas citotóxicas nas células.

Figura 19 - Efeitos do SSi6 na migração de células MDA-MB-231 (ensaio de *Wound Healing*). (A) Após a confluência a risca foi realizada no centro do poço e as células foram tratadas com as concentrações indicadas do SSi6. Imagens foram capturadas nos intervalos de 0, 12 e 24 horas em microscópio invertido. (B) Os resultados são expressos em percentagem de fechamento da risca. A área de fechamento foi calculada com auxílio do software *ImageJ*. Os resultados foram comparados por *one-way* ANOVA, seguida de uma análise post-hoc de Tukey (* $p < 0,05$ vs controle negativo, ** $p < 0,01$ vs o controle negativo).

A



B

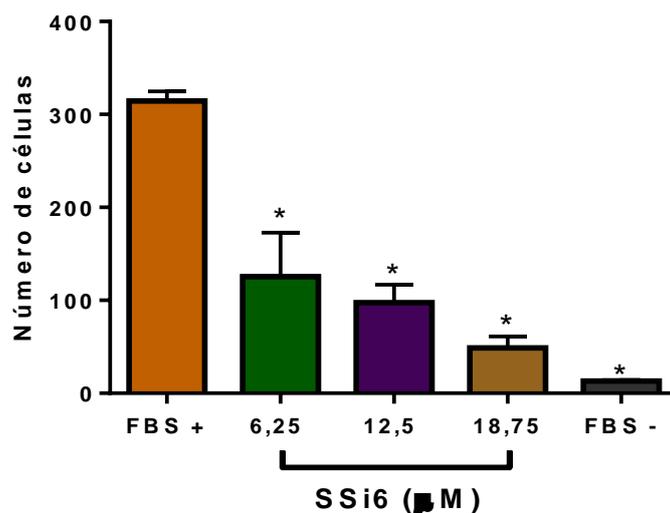


4.10 Invasão celular em Matrigel

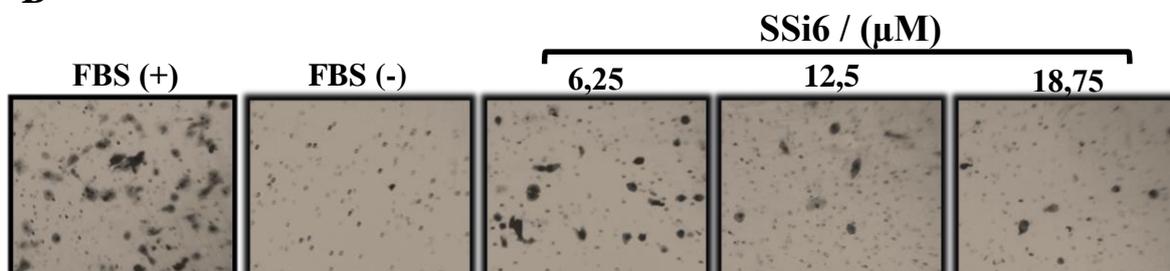
A degradação da MEC é uma etapa chave na invasão e a progressão da metástases. Durante a formação da metástase, há uma série de barreiras estruturais como a membrana basal e a MEC, que a célula tumoral deve invadir para alcançar os tecidos alvos (CLARK; VIGNJEVIC, 2015). Neste ensaio foi avaliado a capacidade do SSi6 em inibir a invasão de células MDA-MB-231.

Figura 20 – Efeitos do SSi6 na invasão de células da linhagem MDA-MB-231. (A) As células foram plaqueadas, tratadas com as concentrações indicadas do SSi6 com meio sem FBS em insertos de invasão com matrigel e incubadas por 22 horas. (B) Cada uma das membranas dos insertos foi removida e montada em lâminas de microscopia para fotografar cinco campos representativos de cada concentração. O controle (+) corresponde a meio sem tratamento com FBS, o controle (-) corresponde ao poço com meio sem tratamento e sem FBS. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes em triplicata. Os resultados foram comparados por *one-way* ANOVA, seguida de uma análise post-hoc de Tukey (* $p < 0,0001$ vs o controle negativo).

A



B



De acordo com as Figuras 20A e B, o SSi6 inibiu significativamente o número de células invasivas da linhagem MDA-MB-231 em todas as concentrações testadas. As percentagens de inibição das células invasivas foram de 61, 72 e 85% para

as concentrações de 6,25; 12,5 e 18,75 μM respectivamente. Estes resultados foram comparados com o controle positivo e negativo, os quais são constituídos de células sem tratamento (DMSO 1%). É importante ressaltar, que de forma análoga ao ensaio anterior, as concentrações utilizadas não alteram a morfologia celular.

Levando-se em consideração todos os resultados aqui analisados, os processos de autofagia e apoptose estão estreitamente relacionados em resposta ao tratamento com o SSi6, do mesmo modo, esta substância apresenta uma alta capacidade para inibir alguns passos da cascata metastática, principalmente na migração e invasão celular. Em todos esses ensaios, foi possível determinar que a modificação semissintética realizado sobre o 6G, e conseqüentemente o sinergismo resultante de tal modificação, foi o responsável da melhora significativa observada em todos os ensaios realizados, quando comparado à atuação de seus constituintes individuais.

Por estas razões, esta nova substância semissintética, apresenta-se como um candidato potencial a ser estudado, com o intuito de elucidar com maior profundidade os efeitos e os mecanismos de ação nas células da linhagem MDA-MB-231, em ensaios *in vitro* como *in vivo*.

5 DISCUSSÃO

As células de câncer de mama triplo negativas (TNBC) formam parte de um subtipo altamente agressivo de câncer de mama, com uma baixa taxa de sobrevivência para os pacientes (ZHANG et al., 2012). Atualmente o tratamento contra este subtipo de câncer de mama é realizado através de quimioterapia convencional, sendo eficaz apenas a longo prazo, porém, causando diversas reações adversas (GLUZ et al., 2009). Assim, o desenvolvimento e identificação de novos fármacos antitumorais contra as TNBC, continua sendo um importante desafio clínico (RAVI et al., 2015).

As propriedades biológicas e farmacológicas de alguns compostos derivados do gengibre já estão bem descritas na literatura. Os gingeróis (principalmente o [6]-gingerol-6G) são identificados como os maiores constituintes dos rizomas da planta. Neste trabalho, o 6G foi modificado quimicamente como a 2,4-DNFH, a fim de obter um novo composto semissintético, o SSi6 (VILLALVILLA et al., 2014). Cabe destacar que não há estudos que demonstrem os efeitos antitumorais desta nova substância, neste sentido, a análise de seus efeitos foi realizada tendo como base, trabalhos anteriores que determinaram as atividades antitumorais do 6G.

Um estudo anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, demonstrou que o 6G, inibiu a proliferação celular em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, tendo um valor de $IC_{50}=666,2\pm 134,6 \mu M$, quando comparado com células de fibroblastos humanos. No mesmo estudo, foram utilizadas outras substâncias como o [8]- e o [10]-gingerol, mostrando valores de IC_{50} de $135,6\pm 22,6 \mu M$ e $12,1\pm 0,3 \mu M$ (ALMADA DA SILVA et al., 2012). Outros estudos reportados na literatura, mostraram que o 6G inibiu a proliferação de células tumorais de carcinoma epidermóide humano A531 (NIGAM et al., 2009; PARK et al., 1998), colón HCT-116 (MANJU; NALINI, 2005), hepático HepG2 (YANG, G. et al., 2010) e células MDA-MB-231 TNBC (LEE, H. S. et al., 2008). Neste trabalho, demonstramos que a modificação sintética realizada no 6G, aumentou significativamente a inibição da viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231, mostrando um valor de IC_{50} de $22,9 \mu M$. A adição da 2,4-DNFH ao 6G permitiu uma melhora de aproximadamente 30 vezes no valor do IC_{50} , em relação aos valores mostrados por Almada da Silva e colaboradores ($666,2 \mu M$), para a mesma linhagem de células tumorais (ALMADA DA SILVA et al., 2012). Já em relação ao IC_{50} determinado para o 6G neste trabalho ($404,5 \mu M$), o valor IC_{50} do SSi6 teve uma melhora de aproximadamente 17 vezes. A discrepância no valor determinado do IC_{50} para o 6G neste estudo, em relação ao valor reportado na literatura, pode ser devido a diferenças na pureza

e procedência do 6G e a possíveis diferenças nas condições experimentais utilizadas (equipamentos utilizados e até mesmo a infraestrutura do laboratório de pesquisa etc.)

Numerosos estudos relatam que apoptose e autofagia podem ser induzidos juntamente por compostos antitumorais (HSU et al., 2009; LEMASTERS et al., 2002). Estes tipos de morte celular podem atuar em conjunto, e induzir a morte das células tumorais de uma forma coordenada ou cooperativa. Os resultados obtidos nos experimentos de avaliação do ciclo celular realizados neste trabalho, revelaram de forma preliminar, que o SSi6 é capaz de induzir a morte celular por apoptose de forma concentração dependente (24 horas de tratamento) em células de TNBC, pois aumentou significativamente a proporção de células na fase sub-G1 em comparação com as células sem tratamento. Como é bem descrito na literatura, uma população de células saudáveis possui um perfil de DNA na fase G1, porém, quando uma população de células possui um teor reduzido de DNA, devido à fragmentação do mesmo por um processo apoptótico, é observada uma diminuição do pico da fase G1, e o conseqüentemente aumento do pico da fase sub-G1, o que indica a ocorrência de morte celular por apoptose (KAJSTURA et al., 2007).

Um estudo recente realizado por Wong e colaboradores, mostrou que uma pequena molécula denominada C1, desencadeia a produção intracelular de ROS (espécies reativas do oxigênio), induzindo de forma simultânea autofagia e apoptose em vários tipos de células tumorais, inclusive em células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231 (WONG et al., 2010).

Outro estudo que utilizou células da linhagem MDA-MB-231, mostrou que o carnosol, um diterpeno fenólico com relatada atividade antioxidante, induz a coexistência de autofagia e apoptose, confirmada pelo aumento da proteína LC3 e a clivagem da PARP respectivamente. Os autores demonstraram que a indução de autofagia era um evento precoce, detectado dentro de as primeiras 3 horas do tratamento com o composto, e que subseqüentemente, este composto induz apoptose em tempos mais elevados de tratamento (AL DHAHERI et al., 2014).

Nossos dados mostraram que a incubação das células tumorais com concentrações de 50 e 100 μM do SSi6, por curtos períodos de tempo (2-6 horas de tratamento), provoca autofagia, identificada pelo aparecimento de vesículas citoplasmáticas características deste tipo de morte celular, bem como pela presença de AVOs (marcação citoplasmática) e das isoformas da proteína LC3 identificadas por imunocitoquímica. Além disso, após 1 hora de tratamento, a substância regulou positivamente a expressão dos genes MAP1LC3 (codificador para as proteínas LC3-I e

II). Já no tempo de 10 horas de tratamento, houve uma expressão gênica positiva para a proteína caspase-3 (efetora da apoptose), corroborando a literatura descrita acima e demonstrando que o SSi6 induz autofagia precoce, que culmina em apoptose. O processo de apoptose induzido pelo SSi6 pode ser explicado no sentido em que à medida que o tempo de incubação aumenta, o dano causado provoca a fragmentação do DNA, o que leva à progressão da morte celular para apoptose, como demonstrado nos ensaios de ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo.

O ensaio de *western blotting* foi realizado para confirmar o aumento no nível proteico nas células MDA-MB-231 das proteínas envolvidas nos processos de autofagia e apoptose quando expostas ao SSi6. Isto de fato foi comprovado, para as proteínas LC3-I e II, quando para as células que foram tratadas com o SSi6 (25, 50 e 100 μ M) durante 3 e 6 horas confirmando novamente que em tempos curtos de tratamento esta substância causa autofagia nas células tumorais. No entanto, em tempos maiores de exposição ao SSi6 (24 horas), não foi possível determinar o aumento no nível proteico da caspase-3 clivada (forma ativa), a principal caspase efetora envolvida no processo apoptótico (DUAN et al., 2003; JAKOB et al., 2008; RESENDES et al., 2004). O aumento no nível proteico da caspase-3 clivada era esperado neste ensaio, pois os resultados obtidos nos ensaios prévios apontavam para o desenvolvimento de um processo apoptótico nos tempos maiores de tratamento realizados neste estudo. Uma possível explicação para estes resultados, que em princípio demonstram certa discrepância, o que também foi descrito por outros pesquisadores, estaria relacionada com a caspase-7, a qual poderia substituir parcialmente a caspase-3 em células tumorais com deficiência desta proteína (causada por agentes quimioterápicos). Esta substituição parcial ocorreria, pois estas duas caspases compartilham uma sequência de reconhecimento de peptídeos, além de possuírem substratos de proteínas endógenas em comum (LAKHANI et al., 2006; LAMKANFI; KANNEGANTI, 2010; MOONEY et al., 2002). Por outro lado, outros pesquisadores relatam que a apoptose também pode ocorrer por meio da ativação de outras caspases executoras, como a caspase-7, que pode ser ativada por um mecanismo independente da via mitocondrial (DAVIDSON et al., 2005). Um dos substratos essenciais clivados pelas caspases-3 e -7 é a poli-ADP-ribose polimerase (PARP), uma enzima de ligação ao DNA que detecta e sinaliza rupturas (DECKER; MULLER, 2002). Portanto, um ensaio para a detecção dos níveis proteicos da PARP clivada e caspase-7 poderia complementar as metodologias empregadas neste trabalho, a fim de confirmar de forma definitiva a indução de apoptose pelo SSi6 nas células MDA-MB-231. Embora este ensaio apresente certas diferenças em relação à

natureza do processo apoptótico induzido pelo SSi6, todos os resultados obtidos nesta dissertação parecem indicar que a morte celular por autofagia é precedida por apoptose na linhagem MDA-MB-231.

A migração e invasão celular são etapas cruciais em muitos eventos fisiológicos. No entanto, eles também estão implicados na fisiopatologia de muitas doenças, como o câncer (BOZZUTO; RUGGIERI; MOLINARI, 2010). Para expandir-se pelos tecidos saudáveis, as células tumorais utilizam diversos mecanismos que envolvem vários atores moleculares. Dentre estes, têm destaque as famílias de receptores de adesão, proteínas do citoesqueleto e as metaloproteínases (MMPs), as quais interagem em um sistema bastante complexo (FRIEDL; WOLF, 2003). Alguns estudos afirmam que as MMPs são as responsáveis pela extensa degradação da matriz extracelular (MEC), além disso, estas têm sido relacionadas como as controladoras chaves da invasão e metástase em diferentes tipos de câncer triplo negativo (YOUSEF et al., 2014). Vários estudos sobre os modelos de câncer de mama investigaram o impacto do silenciamento gênico das MMPs, mostrando que a supressão deste grupo de proteases conduz a uma diminuição significativa da invasão das células tumorais MDA-MB-231, sugerindo portanto, que as MMPs são um fator importante no comportamento invasor das células (BALDWIN et al., 2015; DEY et al., 2013; MEHNER et al., 2014). Como relatado por Lee e colaboradores, o tratamento com concentrações crescentes do 6G, inibe a atividade das proteases MMP-2 e MMP-9, o que conseqüentemente bloqueia a migração e invasão celular de células da linhagem MDA-MB-231 (LEE, H. S. et al., 2008). Neste trabalho, demonstramos que o tratamento com o SSi6, inibe marcadamente a migração e invasão celular na linhagem tumoral MDA-MB-231, o qual como explicado acima, deve estar intimamente ligado com a supressão de algumas MMPs presentes nas células tumorais.

Por fim, este trabalho apresenta os efeitos de uma substância inédita, na indução de dois processos de morte celular, autofagia e apoptose, nas células MDA-MB-231. Este estudo mostra também, com base em todos os ensaios realizados, que o SSi6 apresenta leve toxicidade seletiva para células tumorais, assim como um elevado potencial antitumoral. No entanto, mais estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, são necessários para elucidar de forma completa cada um dos efeitos desta substância sobre as células de câncer de mama (MDA-MB-231). Tais estudos poderiam culminar na obtenção de um candidato a fármaco antitumoral com potencial de aprimorar a quimioterapia atual.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho investigou os efeitos do SSi6, uma nova substância obtida a partir da modificação do [6]-gingerol, nos processos de autofagia e apoptose, bem como seus efeitos antitumorais em células de tumor de mama triplo negativo da linhagem MDA-MB-231. Os resultados mostraram que o SSi6 modificou com mais eficácia e seletividade, a morfologia das células tumorais de mama, quando comparado com as células não tumorais. Ainda, este estudo demonstrou que o SSi6 inibe o número e tamanho das colônias das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, em todas as concentrações estudadas. Neste estudo foi confirmada a capacidade do SSi6 em inibir algumas etapas do processo metastático, como por exemplo a migração e invasão das células tumorais triplo negativas. Finalmente, foi evidenciado que o SSi6 induz autofagia em tempos curtos de incubação e em seguida, em tempos mais longos, a apoptose nas células tumorais de mama MDA-MB-231. Estes resultados apontam para a necessidade de estudos mais detalhados desta substância, visando sua futura aplicação na quimioterapia atual.

7 REFERÊNCIAS

AAS, T. et al. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. **Nature medicine**, v. 2, n. 7, p. 811-814, 1996.

AICR. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A Global perspective**: American Institute for Cancer Research, Washington DC, 2008.

AL DHAHERI, Y. et al. Carnosol induces ROS-mediated beclin1-independent autophagy and apoptosis in triple negative breast cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109630, 2014.

ALI, B. H. et al. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. **Food and chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 409-420, 2008.

ALMADA DA SILVA, J. et al. Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 903, p. 157-62, 2012.

BADADANI, M. Autophagy mechanism, regulation, functions, and disorders. **ISRN Cell Biology**, v. 2012, 2012.

BAEHRECKE, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 6, p. 505-510, 2005.

BALDWIN, R. M. et al. Protein arginine methyltransferase 7 promotes breast cancer cell invasion through the induction of MMP9 expression. **Oncotarget**, v. 6, n. 5, p. 3013-3032, 2015.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127-152, 2005.

BLACK, R. J. et al. Cancer incidence and mortality in the European Union: Cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 7, p. 1075-1107, 1997.

BOYD, M. R.; PAULL, K. D. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. **Drug Development Research**, v. 34, n. 2, p. 91-109, 1995.

BOZZUTO, G.; RUGGIERI, P.; MOLINARI, A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v. 46, n. 1, p. 66-80, 2010.

CAILLEAU, R. et al. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 3, p. 661-674, 1974.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85-95, 2011.

- CÂNCER, I. N. D. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**: Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro 2011.
- CARDOSO, S. M. et al. Mitochondrial control of autophagic lysosomal pathway in Alzheimer's disease. **Exp Neurol**, v. 223, n. 2, p. 294-8, 2010.
- CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **The oncologist**, v. 9, n. 6, p. 606-616, 2004.
- CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New molecular classifications of breast cancer. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 59, n. 5, p. 303-313, 2009.
- CLARK, A. G.; VIGNJEVIC, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. **Current opinion in cell biology**, v. 36, p. 13-22, 2015.
- COLEMAN, M. P. et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). **Lancet Oncol**, v. 9, n. 8, p. 730-56, 2008.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- COTT, J. Herbal Medicine: A Guide for Health Care Professionals. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 87-88, 2003.
- CHANG, Y. F. et al. Paclitaxel induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. **Cancer**, v. 77, n. 1, p. 14-18, 1996.
- CHEN, S. et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer**, v. 1806, n. 2, p. 220-229, 2010.
- CHEN, Y.; AZAD, M. B.; GIBSON, S. B. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death This review is one of a selection of papers published in a Special Issue on Oxidative Stress in Health and Disease. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 285-295, 2010.
- CHIPUK, J. E. et al. The BCL-2 family reunion. **Molecular cell**, v. 37, n. 3, p. 299-310, 2010.
- DAVIDSON, D. J. et al. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. **Cancer Res**, v. 65, n. 11, p. 4663-72, 2005.
- DECKER, P.; MULLER, S. Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 3, n. 3, p. 275-83, 2002.
- DEY, N. et al. Differential activation of Wnt- β -catenin pathway in triple negative breast cancer increases MMP7 in a PTEN dependent manner. **PLoS one**, v. 8, n. 10, p. e77425, 2013.
- DIKIC, I.; JOHANSEN, T.; KIRKIN, V. Selective autophagy in cancer development and therapy. **Cancer research**, v. 70, n. 9, p. 3431-3434, 2010.

- DJAVAHERI-MERGNY, M.; MAIURI, M.; KROEMER, G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. **Oncogene**, v. 29, n. 12, p. 1717-1719, 2010.
- DUAN, W. R. et al. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. **J Pathol**, v. 199, n. 2, p. 221-8, 2003.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- ERDOGAN, B.; WEBB, D. J. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. **Biochem Soc Trans**, v. 45, n. 1, p. 229-236, 2017.
- ESTEVEZ, V. et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 5, p. 453-457, 2009.
- FODA, H. D.; ZUCKER, S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. **Drug discovery today**, v. 6, n. 9, p. 478-482, 2001.
- FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362-374, 2003.
- FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-811, 2006.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107-120, 2012.
- GLUZ, O. et al. Triple-negative breast cancer current status and future directions. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 12, p. 1913-1927, 2009.
- GODLEWSKI, M.; KOBYLINSKA, A. Programmed cell death - strategy for maintenance cellular organisms homeostasis. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 70, n. 0, p. 1229-1244, 2016.
- GOMES, L. R.; VESSONI, A. T.; MENCK, C. F. Microenvironment and autophagy cross-talk: Implications in cancer therapy. **Pharmacological research**, v. 107, p. 300-307, 2016.
- GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626-9, 2004.
- GUMP, J. M.; THORBURN, A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? **Trends in cell biology**, v. 21, n. 7, p. 387-392, 2011.
- GUO, Z. R. [Modification of natural products for drug discovery]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 47, n. 2, p. 144-57, 2012.

- HAMAÏ, A.; BOTTI, J.; CODOGNO, P. Autophagy and Inflammation. **Compendium of Inflammatory Diseases**, p. 173-184, 2016.
- HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual review of genetics**, v. 43, p. 67-93, 2009.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, 2000.
- HOSOKAWA, N. et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 7, p. 1981-1991, 2009.
- HOU, W. et al. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 891-900, 2010.
- HSU, K.-F. et al. Cathepsin L mediates resveratrol-induced autophagy and apoptotic cell death in cervical cancer cells. **Autophagy**, v. 5, n. 4, p. 451-460, 2009.
- HUANG, Y. H. et al. [Asiaticoside inducing apoptosis of tumor cells and enhancing anti-tumor activity of vincristine]. **Ai Zheng**, v. 23, n. 12, p. 1599-604, 2004.
- HÜSEMANN, Y. et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. **Cancer cell**, v. 13, n. 1, p. 58-68, 2008.
- IARC. Personal habits and indoor combustions. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. v. 100, p. p. 319-331, 2012.
- INCA. Estimativa 2016. 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>.
- IRVIN, W. J.; CAREY, L. A. What is triple-negative breast cancer? **European journal of cancer**, v. 44, n. 18, p. 2799-2805, 2008.
- ITAKURA, E. et al. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 12, p. 5360-5372, 2008.
- JAKOB, S. et al. Detection of apoptosis in vivo using antibodies against caspase-induced neo-epitopes. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 255-61, 2008.
- JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239-252, 2009.
- JUNG, C. H. et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 7, p. 1992-2003, 2009.
- KAJSTURA, M. et al. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. **Cytometry A**, v. 71, n. 3, p. 125-31, 2007.
- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 5, p. 1786, 2010.
- KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, 2006.

- KIM, E.-C. et al. [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 335, n. 2, p. 300-308, 2005.
- KLIONSKY, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **Journal of cell science**, v. 118, n. 1, p. 7-18, 2005.
- KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1717-1721, 2000.
- KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.
- KROEMER, G.; LEVINE, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 12, p. 1004-1010, 2008.
- LACEY, J. V. et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. **BMC cancer**, v. 9, n. 1, p. 1, 2009.
- LAKHANI, S. A. et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 847-851, 2006.
- LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T.-D. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 1, p. 21-24, 2010.
- LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 3, p. 178-196, 2014.
- LEE. Novel antitumor agents from higher plants. **Medicinal research reviews**, v. Medicinal research reviews, n. n. 6, p. p. 569-596, 1999.
- LEE, H. S. et al. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 5, p. 313-319, 2008.
- LEI, Y. et al. Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy. **Cancer Lett**, v. 393, p. 33-39, 2017.
- LEIST, M.; JÄÄTTELÄ, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 2, n. 8, p. 589-598, 2001.
- LEMASTERS, J. J. et al. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 4, n. 5, p. 769-781, 2002.
- LINDMO, K.; STENMARK, H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. **Journal of cell science**, v. 119, n. 4, p. 605-614, 2006.
- LUO, S.; RUBINSZTEIN, D. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 2, p. 268-277, 2010.

- MAIER, M. E. Design and synthesis of analogues of natural products. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 19, p. 5302-5343, 2015.
- MANJU, V.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1, 2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, n. 1, p. 60-67, 2005.
- MARIÑO, G. et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 2, p. 81-94, 2014.
- MEHNER, C. et al. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2736-49, 2014.
- MEJIAS-PENA, Y. et al. Impact of resistance training on the autophagy-inflammation-apoptosis crosstalk in elderly subjects. **Aging**, v. 9, n. 2, p. 408-418, 2017.
- MOONEY, L. et al. Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. **British journal of cancer**, v. 87, n. 8, p. 909-917, 2002.
- MOSCAT, J.; DIAZ-MECO, M. T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1001-1004, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NARAYANAN, R.; DALTON, J. T. Androgen receptor: A complex therapeutic target for breast cancer. **Cancers**, v. 8, n. 12, p. 108, 2016.
- NAROD, S. A. et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 23, p. 1773-1779, 2002.
- NEIDLE, S.; THURSTON, D. E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 4, p. 285-296, 2005.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274-284, 2009.
- NIGAM, N. et al. [6]-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. **Chemico-biological interactions**, v. 181, n. 1, p. 77-84, 2009.
- OMS. Câncer. 2014. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>>.
- ONDROUSKOVA, E.; VOJTESEK, B. [Programmed cell death in cancer cells]. **Klin Onkol**, v. 27 Suppl 1, p. S7-14, 2014.
- OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.

- PANG, B. et al. Chemical profiling of the genome with anti-cancer drugs defines target specificities. **Nature chemical biology**, v. 11, n. 7, p. 472-480, 2015.
- PARK, K.-K. et al. Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice. **Cancer letters**, v. 129, n. 2, p. 139-144, 1998.
- PARKIN, D. M. Global cancer statistics in the year 2000. **The Lancet Oncology**, v. 2, n. 9, p. 533-543, 2001.
- PERRET, G.; CREPIN, M. New pharmacological strategies against metastatic spread. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 22, n. 5, p. 465-492, 2008.
- POLTRONIERI, J. et al. [6]-gingerol as a cancer chemopreventive agent: a review of its activity on different steps of the metastatic process. **Mini Rev Med Chem**, v. 14, n. 4, p. 313-21, 2014.
- PORTT, L. et al. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 1, p. 238-59, 2011.
- RADISKY, D. C. Epithelial-mesenchymal transition. **Journal of cell science**, v. 118, n. 19, p. 4325-4326, 2005.
- RAMALHO, I. et al. A Scary Onset of a Rare and Aggressive Type of Primary Breast Sarcoma: A Case Report. **Case Rep Oncol**, v. 9, n. 3, p. 796-801, 2016.
- RAVI, M. et al. Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 15, p. 768, 2015.
- RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 90, n. 4, p. 1383-1435, 2010.
- REBECCA, V.; AMARAVADI, R. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. **Oncogene**, v. 35, n. 1, p. 1-11, 2016.
- RELATION, T.; DOMINICI, M.; HORWITZ, E. M. Concise Review: An (Im)Penetrable Shield: How the Tumor Microenvironment Protects Cancer Stem Cells. **Stem Cells**, v. 35, n. 5, p. 1123-1130, 2017.
- RESENDES, A. R. et al. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 99, n. 3-4, p. 203-13, 2004.
- REYMOND, N.; D'AGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 12, p. 858-70, 2013.
- RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 11, p. 897-907, 2004.
- ROBLES ALMENTA, A.; ITARTE, E. Cáncer colorrectal: causas moleculares y posibles biomarcadores para el diagnóstico precoz, pronóstico y predicción en la terapia contra el cáncer, 2014.

- RODRIGUEZ-ROCHA, H. et al. DNA damage and autophagy. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1, p. 158-166, 2011.
- ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1910-1939, 2007.
- RUPNARAIN, C. et al. Colon cancer: genomics and apoptotic events. **Biol Chem**, v. 385, n. 6, p. 449-64, 2004.
- SARKAR, S. et al. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 46-56, 2009.
- SHAKERI, R.; KHEIROLLAHI, A.; DAVOODI, J. Apaf-1: regulation and function in cell death. **Biochimie**, 2017.
- SHRIHARI, T. G. Dual role of inflammatory mediators in cancer. **Ecancermedalscience**, v. 11, p. 721, 2017.
- SINHA, A. A. et al. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). **International journal of oncology**, v. 21, p. 165-170, 2002.
- SØRLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, 2003.
- SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, p. 10393-10398, 2003.
- SOULE, H. D. et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer research**, v. 50, n. 18, p. 6075-6086, 1990.
- STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 4, p. 201-218, 2016.
- STRICKER, T. P.; BROWN, C. D. Robust stratification of breast cancer subtypes using differential patterns of transcript isoform expression. v. 13, n. 3, p. e1006589, 2017.
- STROHL, W. et al. Biochemistry, molecular biology and protein-protein interactions in daunorubicin/doxorubicin biosynthesis. **Dev Ind Microbiol-BMP'97**, v. 97, p. 15-22, 1998.
- STRØMHAUG, P. E. et al. Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 8, p. 3553-3566, 2004.
- SURH, Y.-J. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 428, n. 1, p. 305-327, 1999.

- TAN, C. et al. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. **Cancer**, v. 20, n. 3, p. 333-353, 1967.
- TANABE, L. M.; LIST, K. The role of type II transmembrane serine protease-mediated signaling in cancer. **Febs j**, v. 284, n. 10, p. 1421-1436, 2017.
- TIWARI, N. et al. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. **Semin Cancer Biol**, v. 22, n. 3, p. 194-207, 2012.
- VICENCIO, J. M. et al. Senescence, apoptosis or autophagy? **Gerontology**, v. 54, n. 2, p. 92-99, 2008.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- 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, 2014.
- WANG, H. Flavopiridol. National Cancer Institute. **Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)**, v. 2, n. 8, p. 1149-1155, 2001.
- WEI, Y. et al. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. **Molecular cell**, v. 30, n. 6, p. 678-688, 2008.
- WEIGELT, B.; REIS-FILHO, J. S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? **Nature reviews Clinical oncology**, v. 6, n. 12, p. 718-730, 2009.
- WONG, C. H. et al. Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e9996, 2010.
- YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. **Current opinion in cell biology**, v. 17, n. 5, p. 559-564, 2005.
- YANG. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. **Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators**, v. v. 34, n. n. 5, p. p. 625-35, 2013.
- YANG, G. et al. Genotoxic effect of 6-gingerol on human hepatoma G2 cells. **Chemico-biological interactions**, v. 185, n. 1, p. 12-17, 2010.
- YANG, J. et al. Overexpressed genes associated with hormones in terminal ductal lobular units identified by global transcriptome analysis: An insight into the anatomic origin of breast cancer. **Oncol Rep**, v. 35, n. 3, p. 1689-95, 2016.
- YARROW, J. C. et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 21, 2004.
- YEO, M. K. et al. Clinical usefulness of the free web-based image analysis application ImmunoRatio for assessment of Ki-67 labelling index in breast cancer. **J Clin Pathol**, 2017.

YOUSEF, E. M. et al. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. **BMC Cancer**, v. 14, p. 609, 2014.

YU, L. et al. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 4952-4957, 2006.

YUE, P. Y. et al. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **Journal of biomolecular screening**, v. 15, n. 4, p. 427-433, 2010.

ZEPEDA-CASTILLA, E. J. et al. Clasificación molecular del cáncer de mama. **Cir Ciruj**, v. 76, n. 1, p. 87-93, 2008.

ZHANG, L. et al. Analysis of clinical features and outcome of 356 triple-negative breast cancer patients in China. **Breast Care**, v. 7, n. 1, p. 13-17, 2012.