

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**NANOFORMULAÇÃO DO [10]-GINGEROL EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA  
TRIPLO NEGATIVO**

**IDELI ZANESCO FONTES BAPTISTA**

**SÃO CARLOS  
2020**

**IDELI ZANESCO FONTES BAPTISTA**

**NANOFORMULAÇÃO DO [10]-GINGEROL EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA  
TRIPLO NEGATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto à Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti.

**Coorientadora:** Dra. Ana Carolina Baptista Moreno Martin.

**SÃO CARLOS  
2020**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à minha família. Ao meu pai, cujo incentivo fez com que eu chegasse tão longe, meu objetivo sempre foi te deixar orgulhoso. À minha mãe, pelo apoio durante esse período e por se orgulhar das minhas conquistas. E, principalmente, à minha irmã Uliara, que foi o grande pilar que me impediu de desmoronar todos esses anos, a pessoa que mais me incentivou a correr atrás dos meus sonhos, meu maior exemplo de vida, minha primeira melhor amiga e meu grande amor.

Às minhas primas, Thainá e Amanda, que sempre ouviram meus desabafos e sempre ajudaram a passar o tempo em reuniões de família tediosas, foram grandes irmãs pra mim a vida toda. Sou muito orgulhosa das mulheres incríveis que vocês são e de onde chegaram. Dizem que não podemos escolher família e eu agradeço muito por isso, eu não escolheria tão bem.

À minha madrinha por todo amor, e apoio financeiro que me deu nos últimos anos, que foram decisivos para que eu conseguisse completar essa graduação.

À minha amiga Sthefani, que me aguentou por todos esses anos, nem a maldade do tempo conseguiu afastar nós duas. Aos meus amigos de São Carlos, em especial Marlon, Katiane, Samuel e Belle que sempre estiveram presentes nos dias difíceis, e eles foram muitos. E à minha amiga Luani, pois sem ela eu não teria conhecido esse lugar maravilhoso que é o LABEN.

Agradeço às minhas colegas de casa Tainá, Izamara e Lara, que me ajudaram a criar um lar em São Carlos. E aos meus amores Adriele e Rachel, que não somente mantiveram esse lar aconchegante como se tornaram minha família.

Agradeço também às minhas colegas de laboratório, com as quais eu sempre pude contar, tanto para ajuda técnica, teórica e para relaxar comendo uns docinhos. Vocês são mulheres e pesquisadoras incríveis. À minha orientadora do TCC Márcia Cominetti, uma excelente profissional e de grande coração. E, em especial, à minha orientadora Carol, a melhor orientadora que já tive, e a pessoa em quem vou me espelhar nos passos futuros, eu devo muito a você.

Agradeço também a todos meus professores. Especialmente a professora Maria Cristina, a melhor coordenadora de curso que já existiu.

Agradeço às agências de fomento, em especial à FAPESP, pelo financiamento através do processo “2018/13979-9” e a toda a estrutura da UFSCar.

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

## RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres em todo o mundo e pode ser classificado em diferentes tipos. Entre eles, o câncer de mama triplo negativo (TN) é caracterizado por não possuir receptores hormonais ou receptores para HER2. Este tipo de câncer corresponde à aproximadamente 20% dos casos, apresenta grande potencial metastático principalmente para órgãos vitais como ossos, pulmão e cérebro, e conseqüentemente possui um pior prognóstico. Devido às suas características celulares o câncer de mama TN não possui terapias-alvo, e por isso a busca por novos tratamentos é de extrema importância. Dessa forma, os produtos naturais são ricas fontes para a busca de novas moléculas que podem ser aplicadas à terapia contra o câncer de mama TN, alguns deles já evidenciados com propriedades antitumorais e antimetastáticas. Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram a eficácia da molécula de [10]-gingerol (10G) em sua ação citotóxica e pró-apoptótica *in vitro* e antimetastática *in vivo* em modelos animais de câncer de mama TN. Porém, devido sua baixa solubilidade em tampões aquosos, sua eficácia pode estar reduzida, principalmente *in vivo*. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar uma formulação farmacêutica do 10G e verificar sua atividade *in vitro*. Os resultados obtidos apontam que o composto formulado não só mantém suas características antitumorais iniciais, como em alguns casos elas são potencializadas, indicando perspectivas otimistas para possíveis testes *in vivo*.

Palavras-chave: 10-gingerol, câncer de mama, câncer de mama triplo-negativo, formulação, nanoemulsão.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. O processo metastático consiste em diversas fases: formação do tumor primário, angiogênese, invasão dos vasos sanguíneos ou linfáticos, intravasamento, sobrevivência na circulação, chegada em um novo órgão, aderência e finalmente nova proliferação celular onde formará os novos sítios, conhecidos como metástases.....	12
Figura 2. Estrutura da molécula de [10]-gingerol .....	17
Figura 3. <i>Mudanças morfológicas em células de MDA-MB-231 HMTL.6 causadas pelo tratamento com 10GNE. Morfologia das células tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas de 10GNE. As concentrações mais altas de 10GNE levaram à morte celular, como evidenciada na foto ao lado de 100 µM. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm.</i> .....	25
Figura 4. Mudanças morfológicas em células de MDA-MB-231 HMTL.6 causadas pelo tratamento com NE. Morfologia das células tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Os volumes de NE equivalentes às concentrações mais altas de 10GNE levaram ao aparecimento de gotículas dentro do citoplasma, como evidenciada na foto ao lado de 100 µM. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm. ....	26
Figura 5. Mudanças morfológicas em células de 4T1Br4 causadas pelo tratamento com 10GNE. Morfologia das células tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas de 10GNE. As concentrações mais altas 10GNE levaram à morte celular, como evidenciada na foto ao lado de 100 µM. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm. ....	27
Figura 6. Mudanças morfológicas em células de 4T1Br4 causadas pelo tratamento com NE. Morfologia das células tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Os volumes de NE equivalentes às concentrações mais altas de 10GNE levaram ao aparecimento de gotículas dentro do citoplasma, como evidenciada na foto ao lado de 100 µM. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm. ....	28
Figura 7. Mudanças morfológicas em células de 4T1.13 causadas pelo tratamento com 10GNE. Morfologia das células tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas de 10GNE. As concentrações mais altas de 10GNE levaram à morte celular, como evidenciada na foto ao lado de 100 µM. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm.....	29
Figura 8. Mudanças morfológicas em células de 4T1.13 causadas pelo tratamento com NE. Morfologia das células tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Os volumes de NE equivalentes às concentrações mais altas de 10GNE levaram ao aparecimento de gotículas dentro do citoplasma, como evidenciada na foto ao lado de 100 µM. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm. ....	30
Figura 9. Mudanças morfológicas em células de MCF10A causadas pelo tratamento com 10GNE. As células foram tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm.....	31
Figura 10. Mudanças morfológicas em células de MCF10A causadas pelo tratamento com NE. As células foram tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm.....	32
Figura 11. Mudanças morfológicas em células de Balb/c 3T3 A3 causadas pelo tratamento com 10GNE. Morfologia das células tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas de 10GNE. As concentrações mais altas de 10GNE levaram à morte celular, como evidenciada na foto ao lado de 100 µM. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm.....	33
Figura 12. Mudanças morfológicas em células de Balb/c 3T3 A3 causadas pelo tratamento com NE. Morfologia das células tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Os volumes de NE equivalentes às concentrações mais altas de 10GNE levaram ao aparecimento de gotículas dentro do	

citoplasma, como evidenciada na foto ao lado de 100 $\mu$ M. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10 $\times$ . Barra: 50 $\mu$ m. ....	34
Figura 13. Efeito dos tratamentos com nanoemulsão na formação de colônias na linhagem 4T1.13. A linhagem 4T1.13 foi plaqueada a uma densidade de 100 células/poço em placas de 6 poços, tratadas com 10GNE ou nanoemulsão base por 24h. Colônias (> 50 células) formada após 8 dias e fixadas com cristal violeta em 0,5% de metanol. ....	35
Figura 14. Gráfico representativo do número de colônias formadas no ensaio clonogênico na linhagem 4T1.13. O gráfico evidencia o número de colônias formadas para cada um dos tratamentos e concentrações, tanto para 10GNE e para a nanoemulsão base. Do lado esquerdo o número de colônias dos poços tratados com 10GNE, do lado direito os tratados com nanoemulsão base. (*) Mostra diferença estatística comparando-se as diferentes concentrações dos tratamentos com seus devidos controles. Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste de Tukey $p < 0,05$ . ....	36
Figura 15. Gráfico representativo dos tamanhos das colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem 4T1.13. O gráfico mostra, em centímetros, o tamanho das colônias formadas para cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base. (*) Mostra diferença estatística comparando-se as diferentes concentrações dos tratamentos com seus devidos controles. Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste de Tukey $p < 0,05$ . ....	37
Figura 16. Efeito dos tratamentos do 10GNE e da NE na formação de colônias na linhagem celular de câncer de mama murino triplo negativo 4T1Br4. A linhagem 4T1Br4 foi plaqueada a uma densidade de 100 células/poço em placas de 12 poços, tratadas com 10GNE ou nanoemulsão base por 24h. Colônias (> 50 células) formadas após 8 dias foram fixadas e coradas com cristal violeta em 0,5% de metanol. ....	38
Figura 17. Gráfico representativo do número de colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem 4T1Br4. À esquerda do gráfico está representado o número de colônias dos poços tratados com 10GNE e do lado direito os tratados com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste Tukey $p < 0,01$ . ....	39
Figura 18. Gráfico representativo dos tamanhos das colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem 4T1Br4. O gráfico mostra, em centímetros, o tamanho das colônias formadas para cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste Tukey $p < 0,01$ . ....	40
Figura 19. Efeito dos tratamentos do 10GNE e da NE na formação de colônias na linhagem celular de câncer de mama murino triplo negativo MDA-MB-231 HMTL.6. A linhagem foi plaqueada a uma densidade de 300 células/poço em placas de 12 poços, tratadas com 10GNE ou nanoemulsão base por 24h. Colônias (> 50 células) formadas após 10 dias foram fixadas e coradas com cristal violeta em 0,5% de metanol. ....	41
Figura 20. Gráfico representativo do número de colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem MDA-MB-231 HMTL.6. À esquerda do gráfico está representado o número de colônias dos poços tratados com 10GNE e do lado direito os tratados com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste Tukey $p < 0,01$ . ....	41
Figura 21. Gráfico representativo dos tamanhos das colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem MDA-MB-231 HMTL.6. O gráfico mostra, em centímetros, o tamanho das colônias formadas para cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste Tukey $p < 0,01$ . ....	42
Figura 22. Efeitos do tratamento com 10GNE e NE no ciclo celular da linhagem 4T1.13. Gráfico da quantidade de células em cada fase do ciclo celular quando tratadas com cada uma das concentrações de	

ambos tratamentos por 24h, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, Two-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,001$  (\*\*). ... 43

Figura 23. Efeitos do tratamento com 10GNE e NE no ciclo celular da linhagem 4T1Br4. Gráfico da quantidade de células em cada fase do ciclo celular quando tratadas com cada uma das concentrações de ambos tratamentos por 24h, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, Two-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,001$  (\*\*). ... 44

Figura 24. Atividade apoptótica do 10GNE e NE na linhagem 4T1.13. (A) Dot plots representativos da análise por citometria de fluxo de Annexin-V nas células tratadas por 24h com 10GNE e NE nas concentrações indicadas (B) Gráficos da quantidade de células mortas (por necrose, apoptose inicial e apoptose tardia) quando tratadas com cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base. (C) Gráfico representativo da apoptose total das células tratadas nas concentrações indicadas de 10GNE (à direita) e NE (à esquerda). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,01$  (\*). ..... 44

Figura 25. Atividade apoptótica do 10GNE e NE na linhagem 4T1Br4. (A) Dot plots representativos da análise por citometria de fluxo de Annexin-V nas células tratadas por 24h com 10GNE e NE nas concentrações indicadas (B) Gráficos da quantidade de células mortas (por necrose, apoptose inicial e apoptose tardia) quando tratadas com cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base. (C) Gráfico representativo da apoptose total das células tratadas nas concentrações indicadas de 10GNE (à direita) e NE (à esquerda). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,01$  (\*). ..... 46

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de experimentos de caracterização das nanoemulsões. Caracterização das nanoemulsões realizadas, mostrando valores de tamanho, PDI (índice de polidispersão) e potencial zeta e seus respectivos desvios padrões. DP = Desvio Padrão.....	23
Tabela 2. Resultados dos ensaios de citotoxicidade com tratamento por 24h e 72h de incubação do 10GNE. Ensaio realizado pelo método colorimétrico de SRB, representado pelos IC <sub>50</sub> (μM, ±Desvio Padrão) de cada uma das linhagens celulares apresentaram para o tratamento composto formulado por 24h e 72h. Dados representam a média e desvio padrão (±DP) de 4 a 6 replicatas de cada experimento representativo (n=3). Resultados dos ensaios de citotoxicidade do 10G não formulado à direita, (*) Dados representando os IC <sub>50</sub> (em μM) das linhagens celulares publicados em Martin 2017 e Martin 2020. Dados refletem ±DP de 6 replicatas de cada experimento representativo (n=3).....	23

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 10G** [10]-gingerol  
**10GNE** formulação em nanoemulsão do [10]-gingerol  
**7AAD** 7-aminoactinomicina D  
**CMTN** Câncer de mama triplo negativo  
**DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DMSO** Dimetilsulfóxido  
**DP** Desvio padrão  
**FDA** Food and Drug Administration  
**SFB** Soro fetal bovino  
**GLOBOCAN** Global Cancer Observatory  
**HER2** Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humana  
**IC50** Concentração citotóxica para 50% das células  
**INCA** Instituto Nacional de Câncer  
**IS** Índice de Seletividade  
**LABEN** Laboratório de Biologia do Envelhecimento  
**RE** Receptor de estrógeno  
**RP** Receptor de progesterona  
**TN** Triplo Negativo  
**PDI** Índice de polidispersão  
**SRB** Sulforhodamine B

## SUMÁRIO

### Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. Câncer e o processo metastático .....	11
1.2. Câncer de mama.....	12
1.3. Tratamento e Produtos naturais.....	13
1.4. Gengibre.....	15
1.5. [10]-gingerol .....	16
1.6. Nanoemulsão.....	17
2. OBJETIVOS .....	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivo Específico.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1. Linhagens celulares.....	19
3.2. Formulação farmacêutica do [10]-gingerol (10G).....	20
3.3. Ensaio de Citotoxicidade .....	21
3.4. Ensaio de Colônia .....	21
3.5. Apoptose Celular .....	22
3.6. Ciclo Celular .....	22
3.7. Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Formulação e Caracterização .....	23
4.2. Ensaio de Toxicidade.....	23
4.3. Ensaio de Morfologia .....	24
4.4. Ensaio de colônia.....	34
4.5. Apoptose .....	42
4.6. Ciclo Celular .....	42
5. DISCUSSÃO .....	47
6. CONCLUSÃO .....	51
7. REFERÊNCIAS.....	52

## 1. INTRODUÇÃO

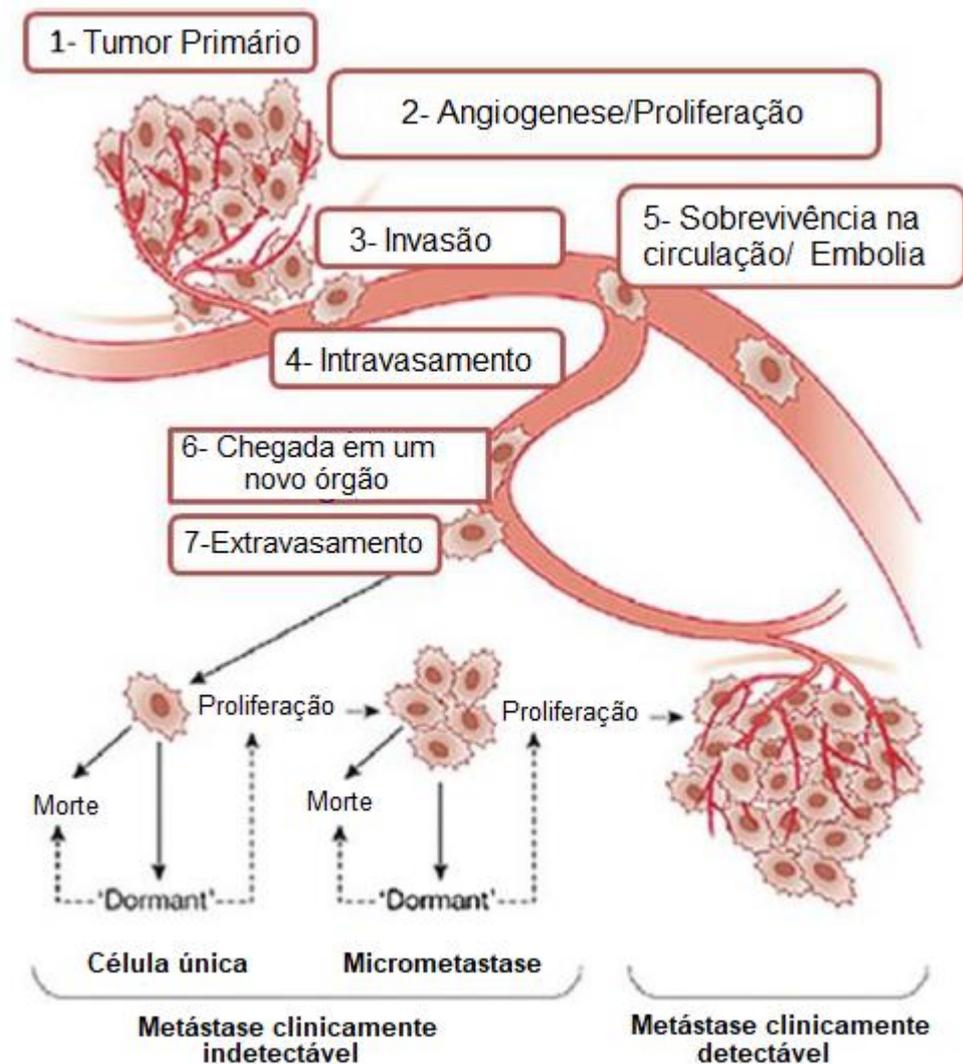
### 1.1. Câncer e o processo metastático

O câncer é uma das doenças mais graves observadas na clínica, além de ser um dos principais problema de saúde pública em todo o mundo, sendo responsável por um grande número de mortes prematuras em vários países (NUSSBAUM, 2016; INCA, 2020). Existem vários fatores genéticos e ambientais que levam ao desenvolvimento do câncer, um dos mais conhecidos é a idade. Já se sabe que a incidência de neoplasmas malignos comuns aumenta exponencialmente com a idade, portanto, o constante envelhecimento da população é um dos principais responsáveis pelo aumento da incidência e mortalidade de câncer mundialmente (BRAY et al., 2018; INCA, 2020; ZHANG et al., 2017). A estimativa mundial mais recente afirma que, em 2018, houve cerca de 17 milhões de novos casos e 9,5 milhões de mortes (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, as estimativas para os próximos anos (2020-2022) apontam que ocorrerão 625 mil novos casos de câncer (INCA 2020).

A denominação “câncer” é dada a neoplasias malignas caracterizadas principalmente pela proliferação celular descontrolada que levam ao aparecimento de uma massa tumoral e pela capacidade das células tumorais de evadir das ações do sistema imune e de morte celular (NUSSBAUM, 2016). O desenvolvimento de um câncer acontece a partir de um distúrbio na regulação do metabolismo celular em níveis como genético, epigenético, transcricional, entre outros. Dessa forma, células carcinogênicas possuem um alto número de vias essenciais desordenadas que, juntamente com fatores epigenéticos e transdução de sinais, promovem a sobrevivência celular e proliferação exacerbada do tumor (WANG & LEI, 2018). Esse crescimento descontrolado, juntamente com secreção de fatores específicos que modificam o microambiente tumoral, levam à uma vascularização do local (denominada como angiogênese), que será utilizada como fonte de novos nutrientes e como via condutora para que as células que se dissociarem do tumor primário consigam alcançar novos sítios. A partir dessa vascularização, essas células desagregadas conseguem penetrar no sistema circulatório e linfático, proliferando nestas regiões ou sendo transportadas para outros órgãos, onde poderão se instalar, levando à uma lesão secundária, conhecida como metástase (FILDER et al., 2015). Esse processo complexo pode ser visualizado na figura abaixo. Em resumo, algumas células tumorais são capazes de deixar o tumor primário e formar metástases em outros órgãos. Para isso, as células mutadas precisam passar por uma série de etapas complexas, tais como a invasão do tumor em tecidos adjacentes, a invasão na

corrente sanguínea (intravasamento), a sobrevivência na circulação, o extravasamento para um órgão distante seguido da formação de micrometástases e posteriormente da colonização metastática (Figura 1) (PATCHMAYR et al., 2017; MASSAGUÉ et al., 2016).

Figura 1. O processo metastático consiste em diversas fases: formação do tumor primário, angiogênese, invasão dos vasos sanguíneos ou linfáticos, intravasamento, sobrevivência na circulação, chegada em um novo órgão, aderência e finalmente nova proliferação celular onde formará os novos sítios, conhecidos como metástases.



Fonte: Adaptado de (AL-MAHMOOD et al., 2018).

## 1.2. Câncer de mama

O câncer de mama é atualmente o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo (com exceção do câncer de pele não melanoma), sendo o mais frequente em mulheres. No Brasil, a estimativa é de que este será responsável por um décimo de todos os casos de câncer entre 2020 e

2022 (INCA, 2020). O câncer de mama é conhecido por ser uma doença heterogênea, classificada em três subtipos de acordo com padrões de expressão gênica dos receptores nas células que o formam. Atualmente, um dos principais fatores considerados na predição de prognóstico do paciente (além de idade, histórico familiar e estágio em que o tumor se encontra) é o subtipo molecular do câncer diagnosticado (HON, 2016). Essa classificação é separada em três principais grupos: os tipos celulares positivos para receptores de estrógeno (ER – *Estrogen Receptor*) ou para receptores de progesterona (PR – *Progesterone Receptor*), os positivos para o receptor do fator de crescimento epidermal humano (HER2 – *Human Epidermal Growth Factor Receptor -2*) (tendo este a possibilidade de expressar ou não os outros receptores), e o tipo triplo negativo (TN), caracterizado pela ausência de todos receptores anteriormente mencionados (KUMAR et al., 2015).

O câncer de mama TN, devido as suas características celulares, não possui terapias alvo, pois a ausência dos receptores mencionados impede o sucesso de terapias já conhecidas como as hormonais e imunoterapias para HER2, como por exemplo trastuzumab (AL-MAHMOOD et al., 2018; NHS, 2020). Este tipo de câncer de mama corresponde a aproximadamente 10% - 20% de todos os casos de câncer de mama em todo o mundo, e é conhecido por ser bastante agressivo e metastático para órgãos vitais, tais como: pulmão, fígado e cérebro, diminuindo significativamente a expectativa de vida dos indivíduos acometidos quando comparado com outros subtipos de câncer de mama (KUMAR et al., 2015; SILVA et al., 2019).

### **1.3. Tratamento e Produtos naturais**

Devido à heterogeneidade e alta complexidade da cascata metastática, a compreensão e cura do câncer de mama tornam-se um desafio, uma vez que o tratamento adequado depende do estágio da doença, de suas características biológicas e das condições físicas do paciente (NHS, 2020). Na maioria dos casos a mastectomia, procedimento cirúrgico para a retirada do tumor, é a primeira etapa de tratamento, podendo ser total ou conservadora, na qual apenas a massa tumoral é removida (ECCLES et al, 2013; NHS, 2020).

Após a etapa cirúrgica muitas vezes se faz necessário realizar um tratamento de quimioterapia ou radioterapia na intenção de destruir qualquer célula cancerosa remanescente. A radioterapia consiste na emissão de pequenas doses de radiação responsáveis pela destruição do DNA nuclear das células do tecido mamário (ANDRABI et al., 2018; ECCLES et al., 2013, NHS, 2020). A quimioterapia, por sua vez, envolve a utilização de medicamentos citotóxicos para a

eliminação das células formadoras do tumor, podendo ser administrada também antes da cirurgia (chamada de terapia neoadjuvante), ou durante e após a mesma (denominada terapia adjuvante) (ANDRABI et al., 2018). Os principais agentes utilizados quimioterápicos para o câncer de mama atualmente são as antraciclinas (doxorubicina) e taxanos (docetaxel), que normalmente são associados com sais de platina (cisplatina e carboplatina por exemplo). Estes medicamentos mostram diminuição da formação de metástases, melhorando o quadro patológico e aumentando a sobrevida dos pacientes, porém sua alta toxicidade pode afetar o sistema nervoso, hepático, gastrointestinal, entre outros, gerando diversos efeitos colaterais indesejados para os pacientes (PARK et al., 2018; ANDRABI et al., 2018, SHARMA et al., 2018).

Além dos problemas mencionados, as terapias tradicionais citadas também se apresentam como principais responsáveis por induzir as células tumorais a adquirirem resistência multidrogas. Deste modo, uma forma de evitar tais complicações é a utilização de terapias combinadas com outras formas de tratamento não tradicionais, tais como terapias hormonais, terapias-alvo, e medicamentos provenientes de produtos naturais, sendo que cada uma dessas terapias complementares é aplicada dependendo do subtipo tumoral (ANDRABI et al., 2018).

As terapias hormonais mais comuns para o tratamento de câncer de mama agem diminuindo os níveis de progesterona e estrogênio do corpo do paciente impedindo o crescimento e a manutenção de células de câncer que dependem dos mesmos para crescer, tais como os subtipos ER e PR positivos (ECCLES et al., 2013; NHS, 2020). Já a terapia-alvo mais conhecida e utilizada para câncer de mama é realizada com o Trastuzumabe®. Trata-se de um anticorpo monoclonal que se liga com alta afinidade e especificidade ao domínio HER2 induzindo a ação do sistema imune contra as células que possuem tal receptor, não funcionando em outros subtipos da doença. Além disso, já foi comprovado que o uso deste medicamento está relacionado à cardiotoxicidade nos pacientes que são submetidos ao tratamento, além do desenvolvimento de resistência a este fármaco (NHS, 2020; NAKANO et al, 2019; NUNES et al., 2019). Desse modo, ainda é crucial a busca por estratégias de tratamentos que combinem medicamentos e utilizem componentes biologicamente ativos produzidos por qualquer organismo através do seu metabolismo primário ou secundário (também conhecidos como produtos naturais) como terapias complementares para a diminuição da agressividade da abordagem atual, juntamente com o aumento da eficácia na mesma (BRAMI et al., 2016).

Os principais agentes antitumorais derivados de plantas utilizados atualmente têm por mecanismo de ação interferir no transporte intracelular, divisão e motilidade das células levando à interrupção no crescimento do tumor, além de induzir a morte celular. Todos esses efeitos são

causados pelo ataque ao sistema de microtúbulos do citoesqueleto, inibição da topoisomerase II e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses compostos são conhecidos como vincristina, vimblastina e taxanos. Um dos principais taxanos é o taxol, composto isolado de casca e folhas do Teixo (*Taxus brevifolia*), que é utilizado amplamente na terapia contra câncer de mama (HABTEMARIAM et al., 2018). Além disso, os produtos naturais são capazes de prevenir danos em células saudáveis causados pela toxicidade da quimio ou radioterapia, enquanto promovem uma sensibilização de células tumorais, efeito denominado quimio ou radio-sensibilizador. Dessa forma, o uso destes produtos pode potencializar os tratamentos já rotineiramente realizados, além de contribuir para a diminuição dos efeitos colaterais dos mesmos (ASHRAFIZADEH et al., 2020; HABTEMARIAM et al., 2018).

#### 1.4. Gengibre

O *Zingiber officinale*, mais comumente conhecido como gengibre, é uma planta da família Zingiberaceae originária da Ásia tropical, porém amplamente cultivada e utilizada pelo mundo como especiaria e com propósitos medicinais há milhares de anos (MAHOMOODALLY et al., 2019; LI et al., 2017). As propriedades farmacêuticas desse rizoma são conhecidas há séculos, sendo muito comum sua aplicação em tratamentos gastrointestinais, contra enjoos, náuseas e vômitos, sintomas que são relatados com frequência em pacientes que passam por quimioterapia. Um exemplo é o medicamento Zindol®, utilizado contra as enfermidades citadas, além de ser um potente antitérmico. Esses efeitos farmacêuticos se devem à presença de elementos bioativos, substâncias classificadas em óleos voláteis e pungentes não voláteis, tais como: zingeronas, paradóis, gengerois e shogaóis, sendo esses dois últimos os mais constantemente associados com seus efeitos (BORGES et al., 2020; MAHOMOODALLY et al., 2019, LI et al., 2017).

Os gengerois representam aproximadamente 25% desses compostos ativos encontrados no gengibre, tratam-se de compostos fenólicos voláteis de diferentes tamanhos com a presença de cadeias alquílicas não ramificadas. Entre eles estão o [6], [8] e [10]-gingerol, respectivamente em ordem decrescente de abundância no rizoma. Além dos benefícios já expostos, esses compostos possuem atividade antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana, características que vêm sendo estudadas para futuras aplicações (MAHOMOODALLY et al., 2019). Um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que, entre esses compostos, o [10]-gingerol (10G) é o que possui menor IC<sub>50</sub> quando estudado na linhagem tumoral de câncer de mama TN MDA-MB-231 HMTL.6, mostrando assim uma maior citotoxicidade em comparação com os outros gengerois. Além disso,

foi demonstrado que o 10G apresentou maior citotoxicidade para células tumorais, quando comparado a uma linhagem não tumoral de fibroblastos humanos, demonstrando possuir uma maior seletividade por células tumorais (SILVA et al., 2012).

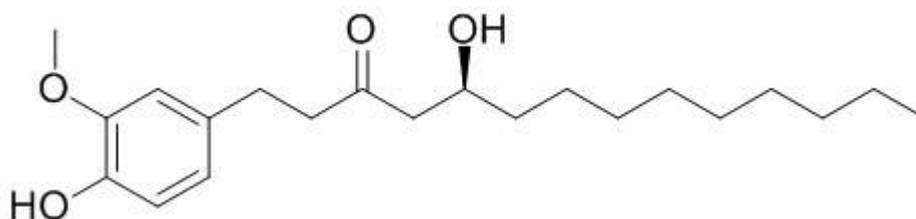
### **1.5. [10]-gingerol**

O 10G teve seus efeitos antitumorais comprovados em vários estudos, demonstrando a supressão do crescimento tumoral de diferentes tipos de câncer como de pele (PENG et al., 2012), pulmão (SANG et al., 2009), próstata (BRHAMBHATT et al., 2013), mama (FUZER et al., 2017), entre outros (ZHANG et al., 2017). Em estudos do nosso grupo de pesquisa foi mostrado que o 10G possui atividade apoptótica (FUZER et al., 2019; MARTIN et al., 2017; MARTIN et al., 2020), induz a parada do ciclo celular na fase sub-G0 (MARTIN et al., 2017), além da reversão do fenótipo tumoral em células de câncer de mama TN em experimentos de cultura 3D (FUZER et al., 2017). O 10G também foi utilizado em modelos animais, sendo capaz de inibir o crescimento do tumor primário em camundongos e de induzir uma melhora significativa na aparência dos animais, diminuiu os efeitos colaterais do tratamento com a doxorubicina, além de essa combinação ter sido a única capaz de diminuir a ocorrência de metástases para os órgãos analisados como pulmão, espinha e fêmur, indicando que o 10G pode ser efetivo se usado como adjuvante em terapias para o tratamento de câncer de mama TN (MARTIN et al., 2017; MARTIN et al., 2020).

Conforme a revisão descrita por Zhang et al. (2017) e os trabalhos de Brhambhatt et al., 2013; Peng et al., 2012 e Sang et al., 2009 há resultados similares para outras linhagens celulares de câncer para o 10G. Em células de câncer cervical (HeLa) o 10G apresentou baixo IC<sub>50</sub>, além de alterar a morfologia das células tratadas e induzir a parada do ciclo celular na fase sub-G0. Já em células de câncer de ovário o 10G inibiu o ciclo celular na fase G2 e diminuiu a expressão de ciclinas A, B1 e D, responsáveis pela transição de fases do ciclo (RASMUSSEN et al., 2019, ZHANG et al., 2017). Em células de cólon (HCT116) e próstata (PC-3) foi comprovada a capacidade do 10G de impedir o crescimento celular além de induzir a apoptose mitocondrial pela ativação da via da MAPK. Além disso os efeitos citotóxicos e apoptóticos do 10G foram observados em linhagens de câncer colorretal (SW480), adenocarcinoma de pulmão (A549), melanoma humano (SK-MEL-2) entre outros (ZHANG et al., 2017).

Trabalhos de nosso grupo também demonstraram que o 10G apresenta atividade antitumoral aumentando a expressão de Bax, e resultando na ativação da via das caspases (com o aumento de expressão da caspase 9), além de diminuição da Bcl-2, conseqüentemente induzindo a apoptose (FUZER et al., 2019). Outros estudos também confirmaram a maior eficácia do 10G comparado-se a outros gingeróis, além de demonstrarem a fosforilação de proteínas quinases como JNK, MAPKs e ERK, e parada do ciclo celular na fase sub-G0 e, conseqüentemente levando à morte celular (ZHANG et al., 2017). Apesar de tais resultados, a estrutura da molécula (Figura 2) lhe atribui baixa solubilidade da molécula em tampões aquosos, que observamos quando da realização de nossos próprios experimentos, dificulta sua administração *in vivo* e pode estar reduzindo sua eficácia.

Figura 2. Estrutura da molécula de [10]-gingerol



## 1.6. Nanoemulsão

Como já mencionado, produtos naturais apresentam grande potencial para se tornarem medicamentos inovadores no combate de diversos tipos de doenças, incluindo o câncer. Entretanto, seu uso torna-se um desafio para a administração farmacológica, uma vez que a maioria desses produtos naturais é insolúvel em soluções aquosas. As estratégias modernas para o desenvolvimento de fármacos baseiam-se no conhecimento da substância que será formulada, assim como da doença e suas vias bioquímicas, pois essas formulações precisam ser efetivas e não podem afetar a função da substância e nem suas propriedades farmacêuticas (SILVA et al., 2016; FREITAS et al., 2014). Uma estratégia que tem sido bastante pesquisada na última década são os sistemas de entrega de fármacos nanoestruturados, que na área da oncologia pode ser formulada de forma altamente seletiva para células tumorais, diminuindo a toxicidade e aumentando a

distribuição e circulação dos agentes antitumorais por todo o corpo (YINGCHONCHAROEN et al., 2016; CIRRI et al., 2018).

Nanopartículas preparadas a partir de polímeros naturais, tais como fosfolipídios, polissacarídeos, proteínas e peptídeos são consideradas as formulações mais promissoras, sendo mais facilmente absorvidas pelo organismo e menos tóxicas comparadas àquelas de origem sintética (YINGCHONCHAROEN et al., 2016). Nanoemulsões lipídicas foram os primeiros sistemas de entrega nanoestruturados a serem utilizados. Tais sistemas aumentam a estabilidade, solubilidade e a bioatividade de moléculas pouco solúveis e são facilmente absorvidas pelo organismo, podendo diminuir o número de doses necessárias ao paciente (YINGCHONCHAROEN et al., 2016; CIRRI et al., 2018; SILVA et al., 2016).

Nas terapias contra o câncer, emulsões lipídicas têm se mostrado particularmente úteis devido à sua capacidade de reduzir os efeitos tóxicos de agentes quimioterápicos. Ademais, a encapsulação lipossomal reduz a ação imunológica e renal contra o medicamento, permitindo maior quantidade do mesmo na circulação e, conseqüentemente, aumentando sua disponibilidade no sítio tumoral (YINGCHONCHAROEN et al., 2016).

Diante de todo o exposto, o presente trabalho se propôs a elaborar uma formulação lipídica nanoestruturada para a molécula de 10G, a qual chamaremos de 10GNE, tornando-a solúvel em tampões aquosos, e testar tal formulação em células de câncer de mama TN comparando-a com a nanoemulsão base, NE (que não possui o composto) e com os resultados já existentes do 10G não formulado.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de uma formulação para o 10G (10GNE) em células tumorais de câncer de mama TN e não tumorais de mama, a fim de verificar seus efeitos antitumorais em estudos *in vitro*.

### 2.2. Objetivo Específico

- Avaliar os efeitos citotóxicos e citostáticos do 10GNE sobre as linhagens tumorais de câncer de mama TN e nas não tumorais.
- Avaliar a capacidade do 10GNE em modificar a morfologia das células tumorais e não tumorais de mama mencionadas.

- Avaliar a atividade inibitória do ciclo celular e apoptótica do 10GNE nas linhagens de câncer de mama TN de camundongo, que são as células utilizadas nos modelos animais.

### 3. *MATERIAIS E MÉTODOS*

#### 3.1. **Linhagens celulares**

##### 3.1.1. **4T1Br4 e 4T1.13**

A linhagem 4T1 é originária de camundongos singênicos e utilizada mundialmente. As linhagens 4T1Br4 e 4T1.13 utilizadas neste trabalho são variantes da linhagem 4T1 e foram gentilmente doadas, respectivamente, pelo Dr. Normand Pouliot e pelo Dr. Richard Redvers, ambos do Olivia Newton-John Cancer Research Institute (ONJCRI), Melbourne - Austrália. Ambas linhagens são modelos clinicamente relevantes para estudos do mecanismo de ação de medicamentos para o câncer de mama TN e para pesquisas de desenvolvimento de novas terapias antimetastáticas. As células foram cultivadas em meio de cultura Alpha MEM contendo 5% de soro bovino fetal (FBS), 1% de penicilina e estreptomicina, suplementado com 26mM NaHCO<sub>3</sub> e 68mM NaCl, pH 7,2.

##### 3.1.2. **MDA-MB-231 HMTL.6**

A linhagem celular MDA-MB-231 HMTL.6 representa células de câncer de mama TN humanas, agressivas e invasivas, também conhecidas por sua resistência a agentes antitumorais, essa linhagem foi obtida também pela doação pelo Dr. Normand Pouliot e pelo Dr. Richard Redvers (ONJCRI), Melbourne - Austrália. As células foram cultivadas em DMEM contendo 10% FBS, 1% penicilina e estreptomicina, suplementado com 1mM de L-glutamina, 4,2mM de NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4.

##### 3.1.3. **MCF10A**

A linhagem MCF10A é constituída de células humanas de mama, originárias de uma massa proliferativa benigna de tecido mamário e representam um bom modelo para se estudar efeitos em tecido mamário não tumoral (ATCC, 2020). Essa linhagem foi também gentilmente doada pelo Dr. Normand Pouliot do ONJCRI, Melbourne - Austrália. As células foram cultivadas em meio de

cultura DMEM/Ham's F12 (1:1) contendo 5% de soro de cavalo, 1% de penicilina e estreptomicina, 4 mg/ml insulina, 2,75mM de hidrocortisona e 100µg/mL EGF.

#### **3.1.4. Balb/c 3T3 A3**

Balb/c 3T3 A3 representam uma linhagem não tumoral de fibroblastos originários de camundongos da espécie *Mus musculus* e imortalizados espontaneamente (ATCC, 2020). Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Andrei Leitão – Departamento de Química – USP São Carlos. As células foram cultivadas em DMEM contendo 10% FBS, 1% penicilina e estreptomicina, pH 7,4, suplementado com 1,9mM de glicose, 1mM L-glutamina, 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>.

### **3.2. Formulação farmacêutica do [10]-gingerol (10G)**

As nanoemulsões (NEs) foram preparadas pelo laboratório parceiro do professor Dr. Marlus Chorilli da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara. A formulação foi feita de acordo com Formariz et al. (2008; 2010) com modificações, com a seguinte composição: CHO (colesterol - 10%) como fase oleosa, PBS (pH 7,4) como fase aquosa (80%) e uma mistura surfactante SPC (fosfatidilcolina de soja)/SO (oleato de sódio)/UE [Eumulgin® HRE 40 (óleo de mamona polioxil-40 hidrogenado) (10%)]- na razão 3:6:8, respectivamente. A composição foi utilizada para obter o valor ótimo de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) para a estabilização do sistema da nanoemulsão (NE).

O valor de EHL descreve a atração simultânea da mistura de surfactante para as fases oleosa e aquosa; quando o EHL está próximo do EHL exigido da fase oleosa do NE, o sistema fornece as condições mínimas de energia para a formação de NE.

A mistura foi sonicada usando um sonicador de haste (Q700 da QSonica®, Newtown, CT, EUA) a 700 watts no modo descontínuo por 10 min e a cada dois minutos a mistura foi deixada por 30 segundos em banho de gelo. Após sonicação, as NEs foram centrifugadas a 11.180× g por 15 min para eliminar os resíduos liberados pelo sonicador de titânio. As NEs foram preparadas 24 h antes das experiências e mantidas a 25 ± 0,1 ° C para completar o equilíbrio do sistema. O 10G foi internalizado na NE pela dissolução do composto na formulação estudada em uma concentração de 10 mg/mL.

O tamanho e a distribuição das gotas da NE foram determinados por um analisador de partícula ótico (Zetasizer Nano-ZS ZEN3600, Malvern Instruments, San Diego, CA, USA), utilizando dispersão de luz dinâmica. Todas as amostras (NE com e sem 10G) foram diluídas em

água ultrapura (100 µL de amostra em 900 µL de água ultrapura) e colocadas no instrumento. As análises foram realizadas em triplicata.

### **3.3. Ensaio de Citotoxicidade**

Foram realizados ensaios de citotoxicidade utilizando o método do SRB [Sulforhodamine B], cuja ação quantifica o conteúdo protéico celular, o qual indiretamente reflete no número de células viáveis (VICHAI, 2006).

Neste ensaio, as diferentes linhagens foram plaqueadas a uma densidade de  $5 \times 10^3$  em placas de 96 poços e incubadas *overnight* em estufa a 37°C. No dia seguinte, as células foram tratadas com o 10GNE em diferentes concentrações por 24 e 72h. Para comparação entre o tratamento de 10GNE e sua base (NE), uma placa controle foi preparada usando-se o mesmo volume para as respectivas concentrações do 10GNE, da nanoemulsão (v/v). Para o cálculo dos valores de IC<sub>50</sub> as diferentes concentrações foram comparadas com os poços controles, sem tratamento, tanto do 10GNE quanto para a NE. Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado novamente 100µL/poço de meio, juntamente com 25µL/poço de uma solução de TCA puro [*trichloroacetic acid*] diluído 1:1 com água destilada, e a placa foi mantida a 5°C até ser corada. Em seguida, as placas foram lavadas e foi adicionado 60µL/poço de SRB (0,04%). As placas foram novamente incubadas por 30 min e decorrido o tempo os poços foram lavados com água corrente e enxaguados com ácido acético 1% para remover o excesso de corante.

No dia seguinte cada poço foi solubilizado com 100µL/poço Tris Base (10mM) e em seguida foi realizada a leitura em leitor de placas (SpectraMax i3) no comprimento de onda de 510nm. O ensaio de citotoxicidade serviu de base para determinar o IC<sub>50</sub> (concentração tóxica para 50% das células) do composto 10GNE. Este ensaio foi realizado com todas as linhagens citadas. A determinação do IC<sub>50</sub> foi realizada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 7.0 utilizando a equação de Hill.

### **3.4. Ensaio de Colônia**

O ensaio de formação de colônia serve para analisar a capacidade de formação de colônia a partir de uma única célula. É um método que visa determinar os efeitos citotóxicos e citostáticos de um tratamento (FRANKEN et al., 2006). As células das linhagens tumorais 4T1.13 e MDA-

MB-231 HMTL.6 foram plaqueadas em uma placa de 6 poços em uma densidade de 100 células por poço, incubadas *overnight* e tratadas com o 10GNE nas concentrações de 0, 1, 5, 15, 30 e 60  $\mu\text{M}$  ou com a NE utilizando-se o mesmo volume que corresponde as concentrações do 10GNE utilizadas (v/v) por 24h. Decorrido o tempo, o meio com os tratamentos foi retirado e repostado com meio de cultura fresco sem nenhum tratamento e as placas foram incubadas por 8 dias. Foram consideradas colônias grupos celulares que possuíam mais de 50 células (FRANKEN et al., 2006). As colônias formadas foram então fixadas com metanol (50%) e coradas com cristal violeta (0,5%), as mesmas foram analisadas com o auxílio do *software* Image J.

### 3.5. Ciclo Celular

Igualmente utilizando-se a citometria de fluxo, o efeito do 10GNE foi analisado sobre as diferentes fases do ciclo celular. Primeiramente, as células das linhagens tumorais 4T1.13 e 4T1Br4 foram plaqueadas ( $3 \times 10^5$  células por poço) por 24h a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, as células foram tratadas com o 10GNE nas concentrações de 15, 30 e 60  $\mu\text{M}$  por adicionais 24h. Decorrido o tempo de incubação, as células foram soltas, o meio de cultura foi retirado e o *pellet* celular foi lavado com PBS. As células foram então fixadas com etanol 70% por no mínimo 24h a -20 °C. Depois de fixadas, o etanol foi removido por centrifugação e as células foram coradas com uma solução contendo PI (Iodeto de propídio 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e RNase 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$  em PBS) por 30 min a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (BD Accuri C6) e o DNA presente nas células foi quantificado para determinação das diferentes fases do ciclo celular (MARTIN et al., 2017), utilizando o *software* FlowJo v x0.7.

### 3.6. Apoptose Celular

A atividade apoptótica do 10GNE foi testada sobre as células da linhagem 4T1.13 e 4T1Br4 por citometria de fluxo utilizando o kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences). As células foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células/poço) em placas de 24 poços e incubadas por 24h. Em seguida, foram tratadas por 24h nas concentrações de 15, 30 e 60  $\mu\text{M}$  do 10GNE ou com a NE. Nestes ensaios utilizou-se o mesmo volume da base (NE) para a respectiva concentração do 10GNE (v/v), exceto os controles do experimento (células mortas marcadas somente com PE, células mortas marcadas com 7-AAD e não marcadas). As células foram lavadas com PBS e incubadas com 100 $\mu\text{L}$  de tampão de ligação contendo os diferentes marcadores (PE-Anexina V e 7-AAD) por 15 min ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas

com PBS e mais 100µL de tampão de ligação foram adicionados. Em seguida, as células foram soltas das placas com o auxílio de um “*scraper*” e analisadas no citômetro BD Accuri C6 (NAVES, 2019).

### 3.7. Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata, independentemente, e repetidos três vezes. Os dados foram analisados no *software* GraphPad Prism 7.0 por análise de variância One-way (ANOVA) seguida pelo pós-teste de *Tukey*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Formulação e Caracterização

As nanopartículas da formulação foram caracterizadas em tamanho e distribuição. Os valores obtidos, encontrados na tabela 1, mostram o diâmetro (em nm), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta das nanoemulsões produzidas.

*Tabela 1. Resultados de experimentos de caracterização das nanoemulsões. Caracterização das nanoemulsões realizadas, mostrando valores de tamanho, PDI (índice de polidispersão) e potencial zeta e seus respectivos desvios padrões. DP = Desvio Padrão.*

	Tamanho (nm±DP)	PDI	Potencial Zeta (mV±DP)
NE	141,9±2,563	0,158±0,009	-42,7±2
10GNE	166,0±10,16	0,384±0,030	-53,9±1,86

### 4.2. Ensaio de Toxicidade

Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos no tratamento por 24h e 72h com 10GNE para cada linhagem celular estão apresentados na tabela 2, juntamente com o Índice de Seletividade (IS) do composto formulado.

*Tabela 2. Resultados dos ensaios de citotoxicidade com tratamento por 24h e 72h de incubação do 10GNE. Ensaio realizado pelo método colorimétrico de SRB, representado pelos IC50 (µM,*

$\pm$ Desvio Padrão) de cada uma das linhagens celulares apresentaram para o tratamento composto formulado por 24h e 72h. Dados representam a média e desvio padrão ( $\pm$ DP) de 4 a 6 replicatas de cada experimento representativo ( $n=3$ ). Resultados dos ensaios de citotoxicidade do 10G não formulado à direita, (\*) Dados representando os  $IC_{50}$  (em  $\mu M$ ) das linhagens celulares publicados em Martin et al. 2017 e Martin et al. 2020. Dados refletem  $\pm$ DP de 6 replicatas de cada experimento representativo ( $n=3$ ).

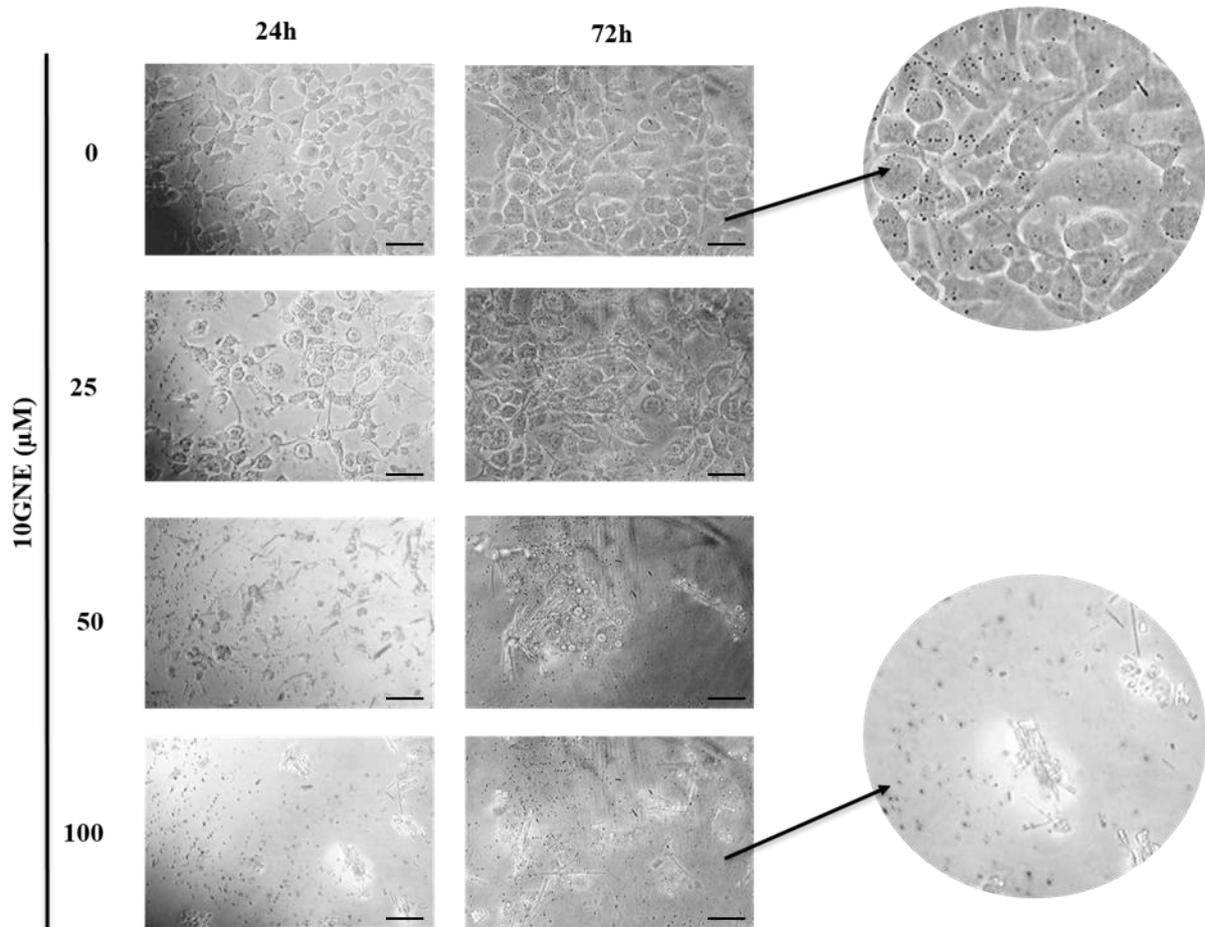
<b>Linhagem</b>	<b>10GNE (24h) (<math>\mu M \pm DP</math>)</b>	<b>IS 24h</b>	<b>10GNE (72h) (<math>\mu M \pm DP</math>)</b>	<b>IS 72h</b>	<b>10G (72h) (<math>\mu M \pm DP</math>)</b>	<b>IS 72h</b>
4T1Br4	28.37 $\pm$ 1.61	1.31	17.82 $\pm$ 0.41	1.83	32.17 $\pm$ 0.5*	1.87
4T1.13	21.65 $\pm$ 0.59	1.72	7.8 $\pm$ 0.61	4.19	7.4 $\pm$ 2.45	8.3
Balb/c 3T3 A3	37.27 $\pm$ 4.9	-	32.74 $\pm$ 1.38	-	61.42 $\pm$ 3.5*	-
MDA-MB-231 HMTL.6	28.16 $\pm$ 2.38	1.39	22.93 $\pm$ 0.33	1.85	60.57 $\pm$ 3.9*	1.58
MCF10A	39.2 $\pm$ 7.68	-	42.63 $\pm$ 4.64	-	96.16 $\pm$ 0.3*	-
NE	>100	-	>100	-	-	-

Com relação aos resultados de incubações mais longas, 72h, cujos respectivos valores de  $IC_{50}$  também estão apresentados na tabela 2, podemos notar uma redução nos valores de  $IC_{50}$  do 10GNE quando comparado ao tempo de 24h de incubação. Este resultado já era esperado pois as células permanecem mais tempo em contato com o composto, e além disso, a nanoformulação pode possuir um maior tempo de liberação quando comparado com o 10G.

### 4.3. Ensaios de Morfologia

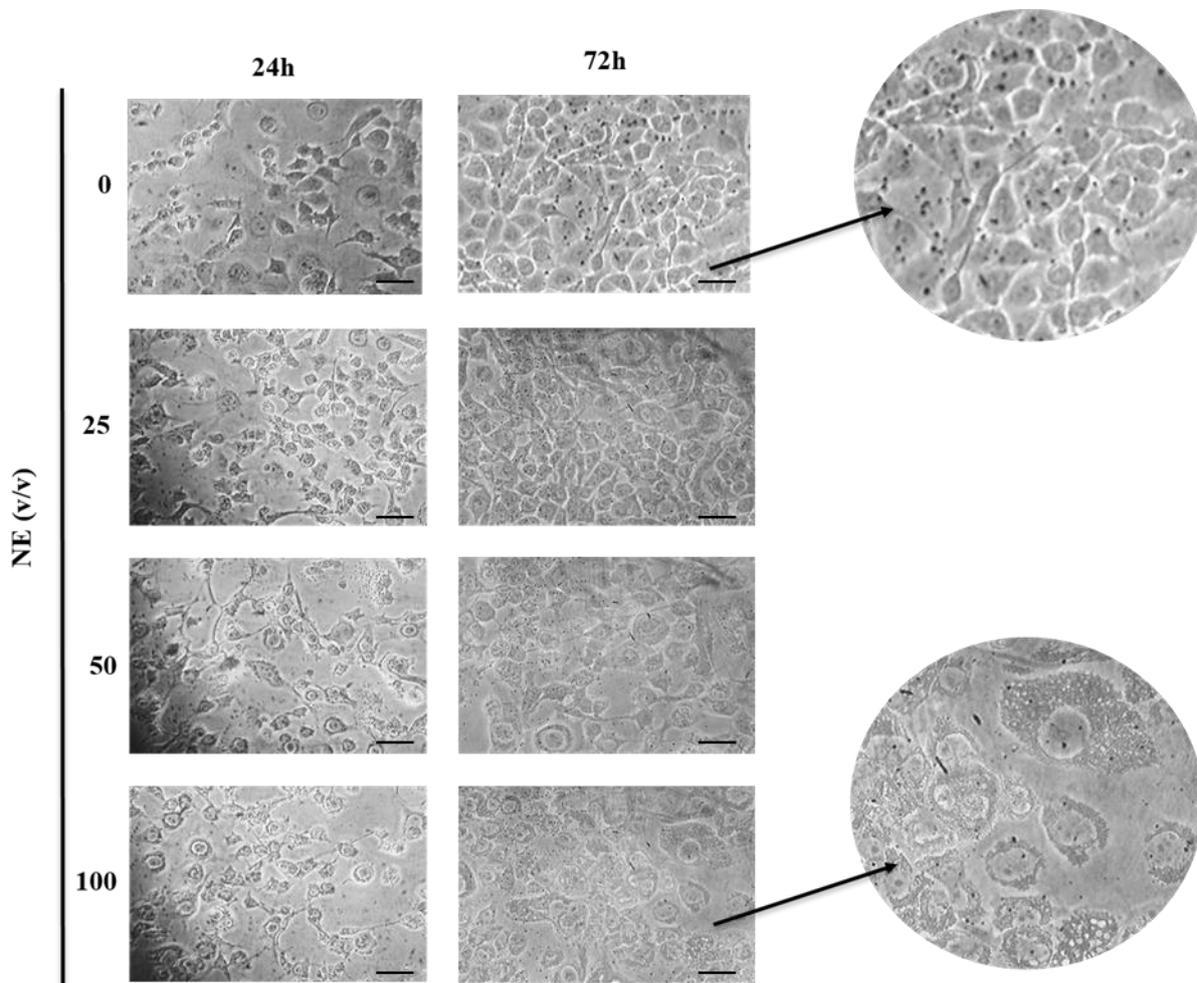
Para verificar as alterações morfológicas nas células após os tratamentos realizamos o ensaio de morfologia celular em diferentes concentrações (0, 25, 50 e 100 $\mu M$ ) tanto para o 10GNE quanto para a NE em 24 e 72 horas. A NE não foi tóxica em concentrações menores ou iguais a 100 $\mu M$  (tabela 2). Entretanto, a mesma provocou, nas concentrações mais altas, mudanças morfológicas em algumas das linhagens testadas (Figura 3 a Figura 12), descritas em maiores detalhes na sequência.

Figura 3. Mudanças morfológicas em células de MDA-MB-231 HMTL.6 causadas pelo tratamento com 10GNE. Morfologia das células tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas de 10GNE. As concentrações mais altas de 10GNE levaram à morte celular, como evidenciada na foto ao lado de 100  $\mu$ M. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10 $\times$ . Barra: 50 $\mu$ m.



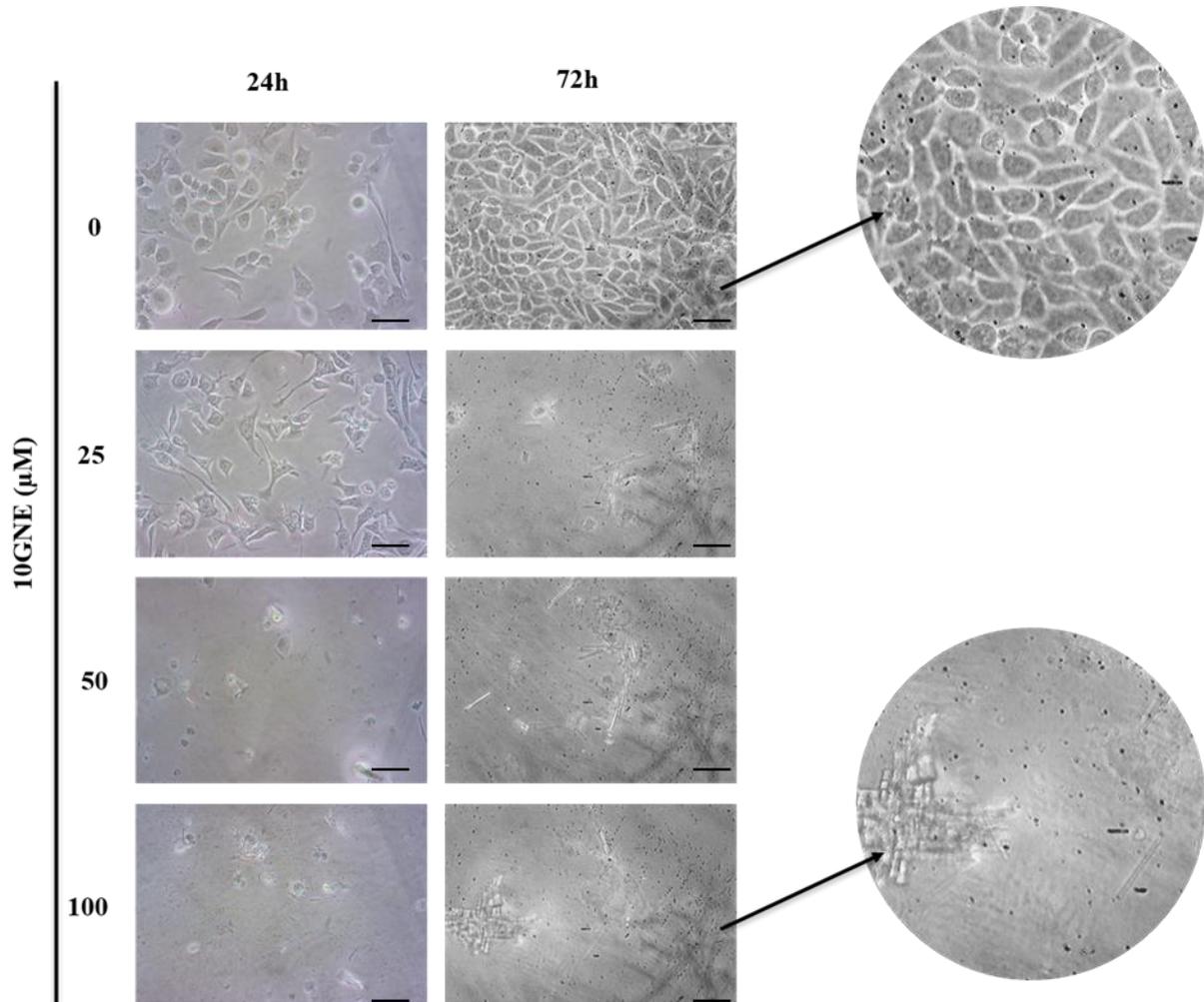
O ensaio de morfologia realizado com a linhagem celular MDA-MB-231 HMTL.6, representado na Figura 3, evidencia a citotoxicidade da 10GNE na concentração 50 $\mu$ M com a diminuição do número de células. Ademais, no tratamento com a NE (Figura 4) podemos observar que não há uma redução no número de células, mas sim o aparecimento de pontos brancos, os quais presumimos corresponder à nanoemulsão. Estes resultados demonstram a citotoxicidade e o efeito seletivo verificados no ensaio de SRB, pois o 10GNE é capaz de causar a morte celular, enquanto que a base NE não altera a confluência celular.

Figura 4. Mudanças morfológicas em células de MDA-MB-231 HMTL.6 causadas pelo tratamento com NE. Morfologia das células tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Os volumes de NE equivalentes às concentrações mais altas de 10GNE levaram ao aparecimento de gotículas dentro do citoplasma, como evidenciada na foto ao lado de 100  $\mu\text{M}$ . Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10 $\times$ . Barra: 50 $\mu\text{m}$ .



As linhagens tumorais de câncer de mama TN de camundongos 4T1Br4 (Figura 5) e 4T1.13 (Figura 7) apresentaram os valores mais baixos de  $\text{IC}_{50}$ , assim o 10GNE, nas concentrações de 25 $\mu\text{M}$ , já foi capaz de reduzir o número de células e alterar a morfologia celular, fazendo com que as células se apresentem mais alongadas do que as células controle. A morfologia das células de ambas as linhagens (4T1Br4 e 4T1.13) tratadas somente com a formulação (NE) mostraram o aparecimento de pequenas gotículas no citoplasma provavelmente provenientes da nanoemulsão (Figura 6 e Figura 8).

Figura 5. Mudanças morfológicas em células de 4T1Br4 causadas pelo tratamento com 10GNE. Morfologia das células tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas de 10GNE. As concentrações mais altas 10GNE levaram à morte celular, como evidenciada na foto ao lado de 100  $\mu\text{M}$ . Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10 $\times$ . Barra: 50 $\mu\text{m}$ .



Nestas duas linhagens tratadas por 72h com 10GNE, já se encontram poucas células na concentração de 25 $\mu\text{M}$ , e da mesma forma nas concentrações subsequentes (Figura 5 e Figura 7). Por outro lado, o tratamento com a NE não apresentou alterações no número de células de ambas as linhagens presentes, porém apresentou o aparecimento gradual de gotas dentro das células de acordo com o aumento de concentração, sendo que na maior delas (100 $\mu\text{M}$ ) as células têm seu citoplasma praticamente tomado por gotículas, as quais supomos ser as nanopartículas (Figura 6 e Figura 8).

Figura 6. Mudanças morfológicas em células de 4T1Br4 causadas pelo tratamento com NE. Morfologia das células tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Os volumes de NE equivalentes às concentrações mais altas de 10GNE levaram ao aparecimento de gotículas dentro do citoplasma, como evidenciada na foto ao lado de 100  $\mu$ M. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10 $\times$ . Barra: 50 $\mu$ m.

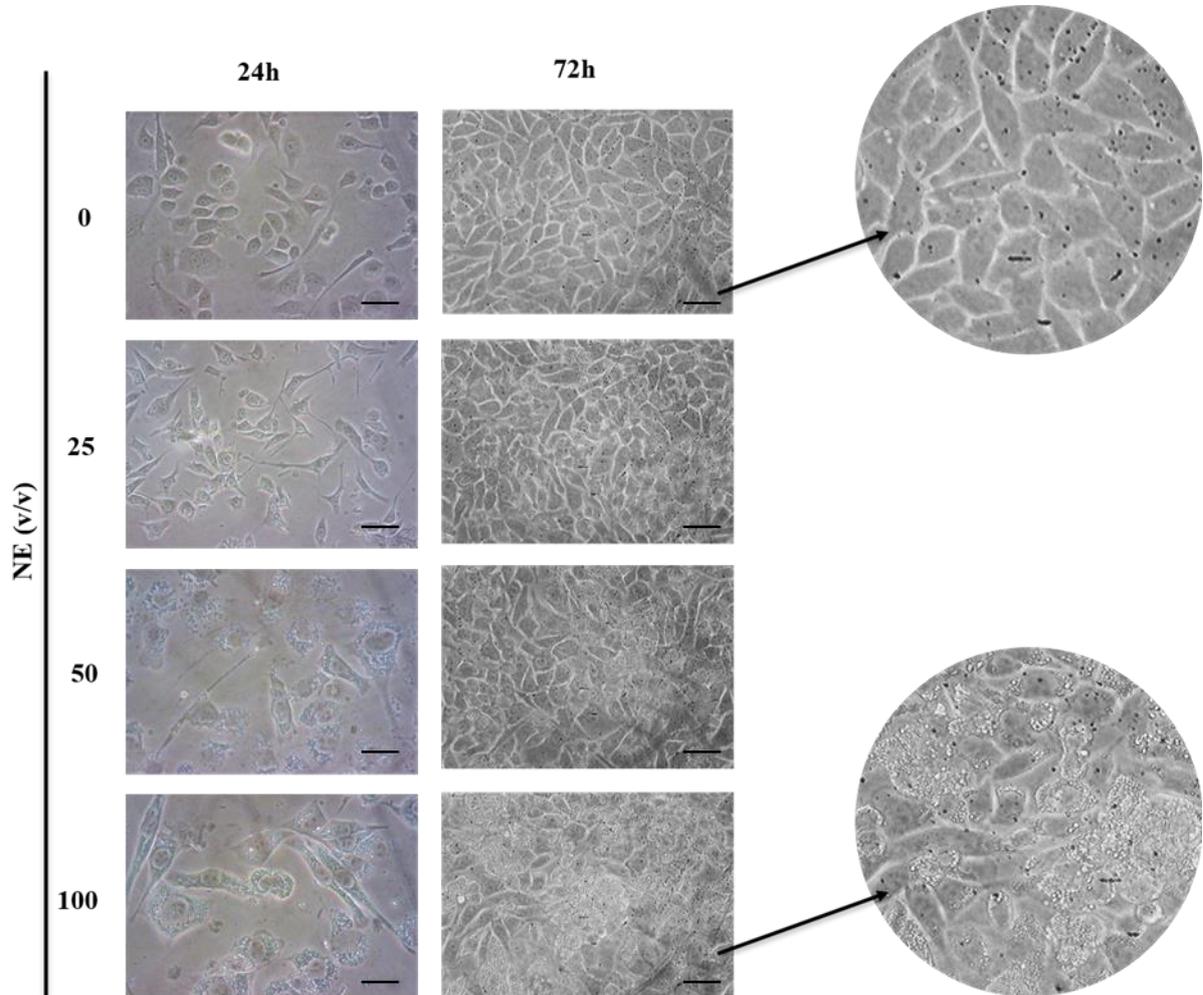


Figura 7. Mudanças morfológicas em células de 4T1.13 causadas pelo tratamento com 10GNE. Morfologia das células tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas de 10GNE. As concentrações mais altas de 10GNE levaram à morte celular, como evidenciada na foto ao lado de 100  $\mu$ M. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10 $\times$ . Barra: 50 $\mu$ m.

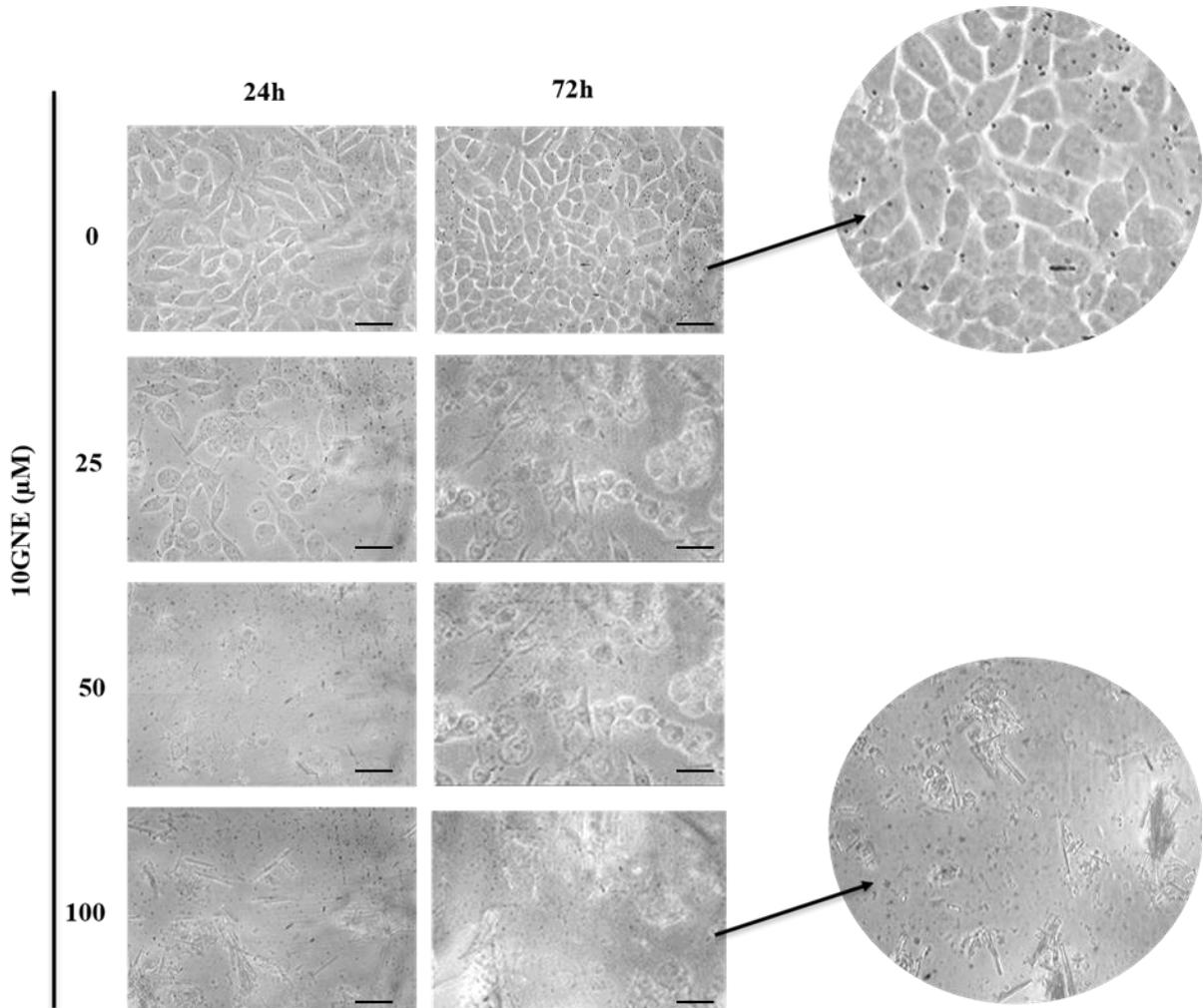
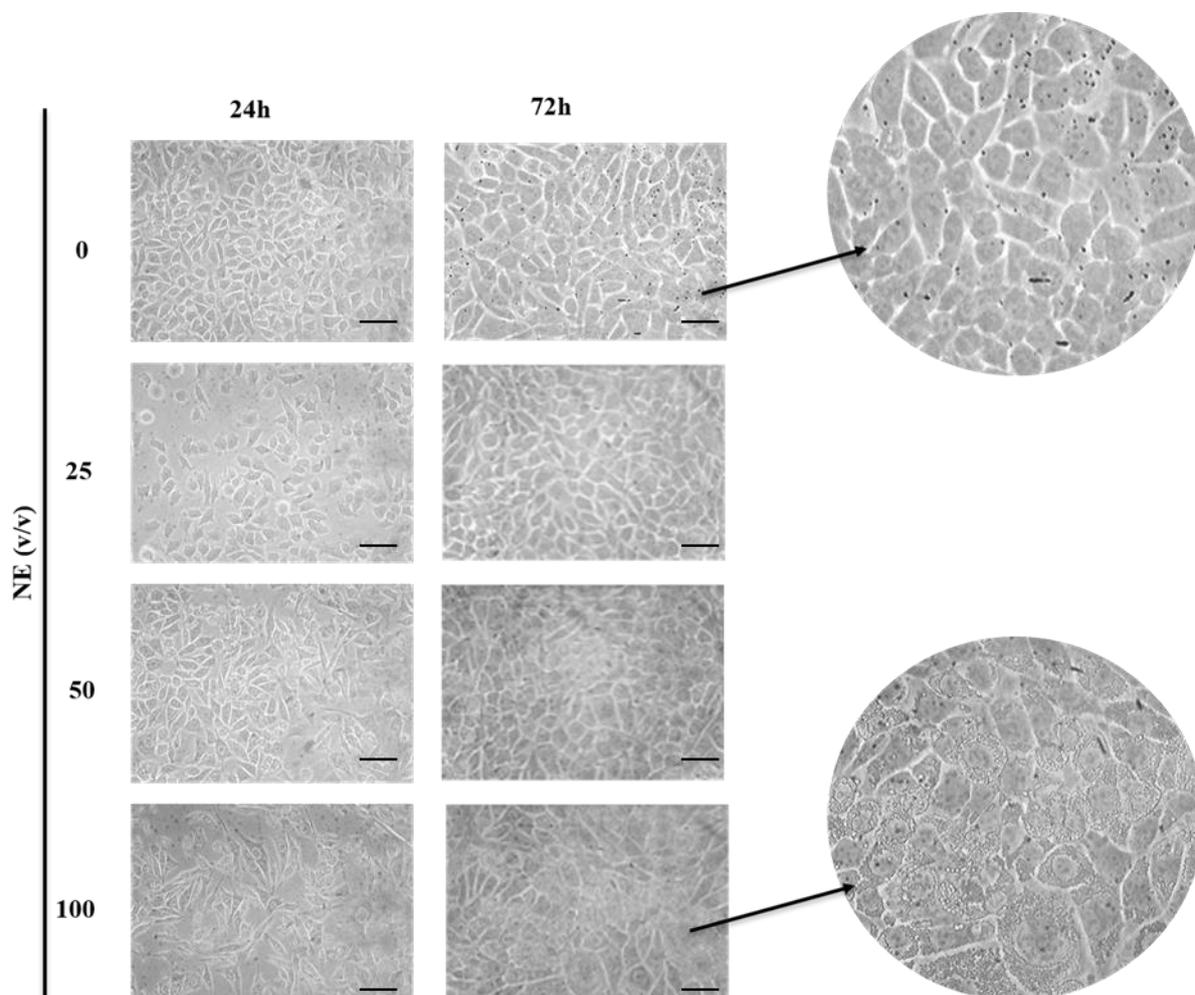


Figura 8. Mudanças morfológicas em células de 4T1.13 causadas pelo tratamento com NE. Morfologia das células tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Os volumes de NE equivalentes às concentrações mais altas de 10GNE levaram ao aparecimento de gotículas dentro do citoplasma, como evidenciada na foto ao lado de 100  $\mu\text{M}$ . Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10 $\times$ . Barra: 50 $\mu\text{m}$ .



O ensaio de morfologia com células humanas não tumorais da linhagem MCF10A (Figura 9), mostra que as concentrações mais altas de 10GNE levaram à morte celular, como evidenciado na foto ampliada. Os volumes de NE equivalentes às concentrações mais altas de 10GNE levaram ao aparecimento de gotículas citoplasmáticas, como demonstrado nas fotos ampliadas (Figura 10). Ainda, na concentração 50 $\mu\text{M}$  no tempo de 24h de incubação o 10GNE se mostrou citotóxico, com a nítida diminuição do número de células, além disso, em 25 $\mu\text{M}$  já é possível observar o aparecimento de gotículas no interior das células, que indicam a entrada da nanoemulsão.

Figura 9. Mudanças morfológicas em células de MCF10A causadas pelo tratamento com 10GNE. As células foram tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm.

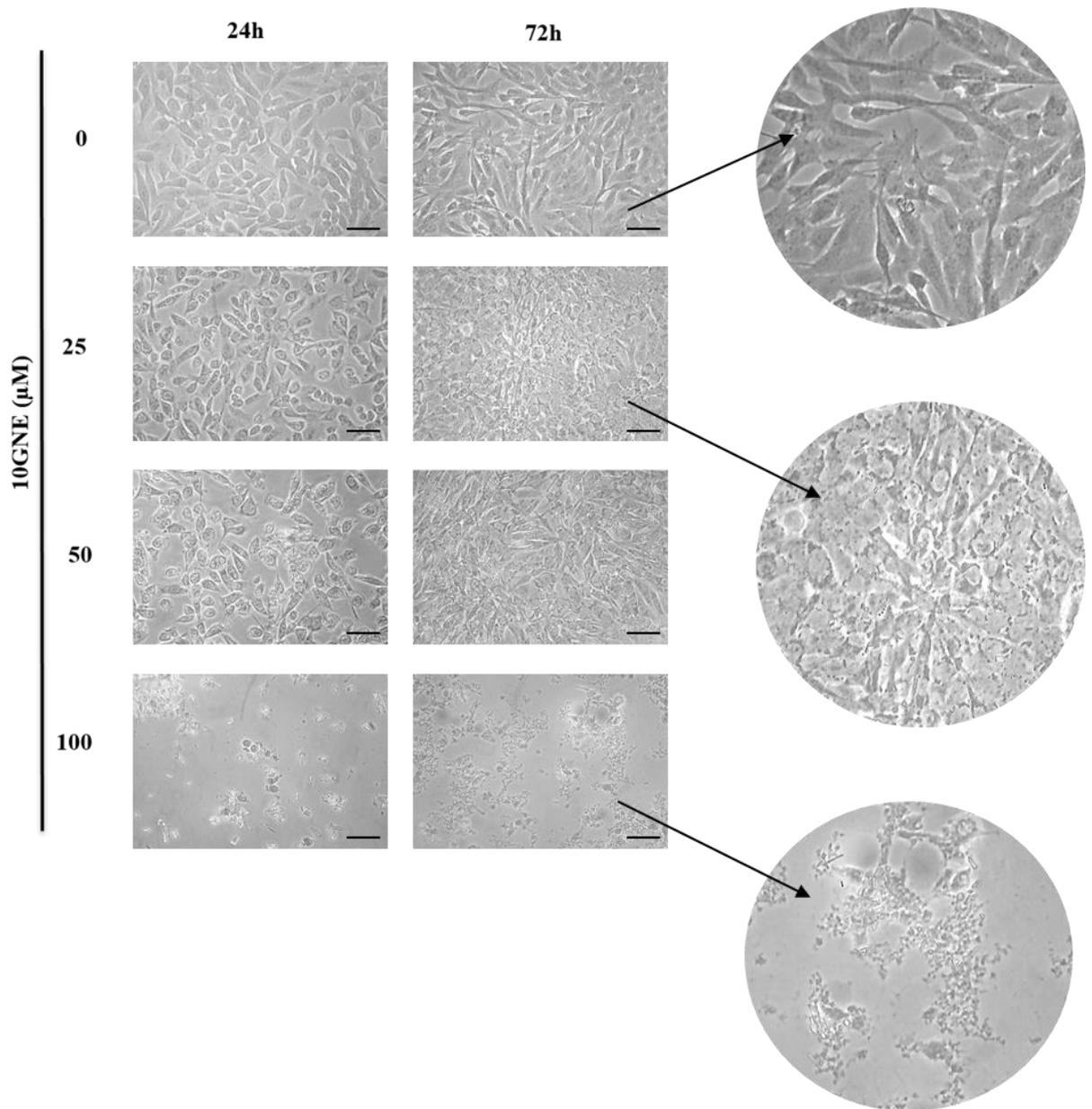
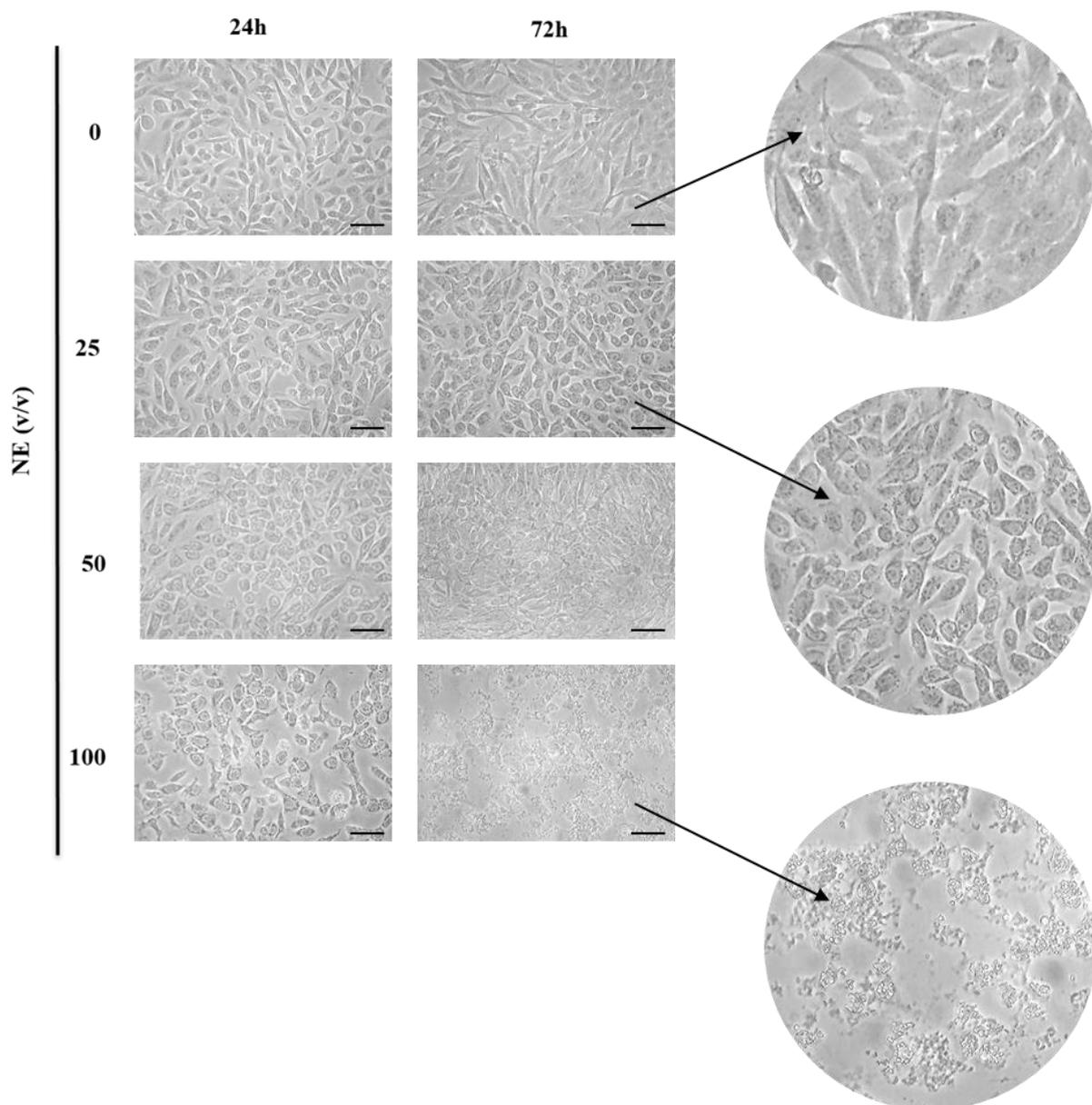


Figura 10. Mudanças morfológicas em células de MCF10A causadas pelo tratamento com NE. As células foram tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10×. Barra: 50µm.



Para complementar os estudos de morfologia em linhagens não tumorais, células da linhagem 3T3 A3 de Balb/c foram plaqueadas e tratadas da mesma forma. Nestes ensaios, podemos notar ainda algumas células vivas após tratamento com 10GNE na concentração de 50µM, porém quanto à morfologia, as células apresentam-se maiores e mais arredondadas quando comparadas com os poços sem tratamento, mudança não observada no tratamento com NE (Figura 11). Tais resultados mostram que os efeitos observados nessa linhagem são somente relativos ao 10GNE, e que a base controle NE não possui efeitos sobre a morfologia desta linhagem.

Figura 11. Mudanças morfológicas em células de Balb/c 3T3 A3 causadas pelo tratamento com 10GNE. Morfologia das células tratadas com 10GNE por 24h e 72h nas concentrações indicadas de 10GNE. As concentrações mais altas de 10GNE levaram à morte celular, como evidenciada na foto ao lado de 100  $\mu$ M. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10 $\times$ . Barra: 50 $\mu$ m.

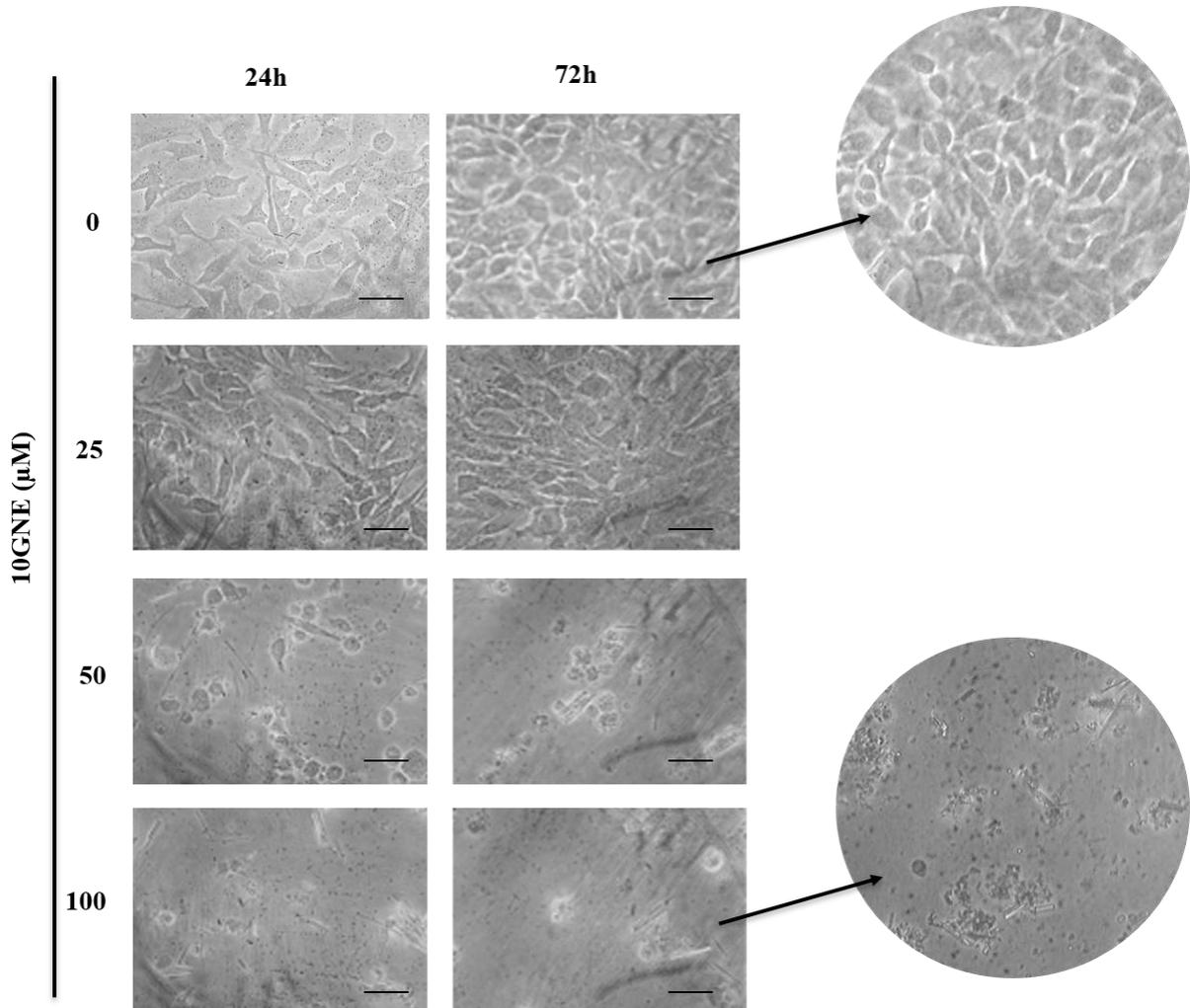
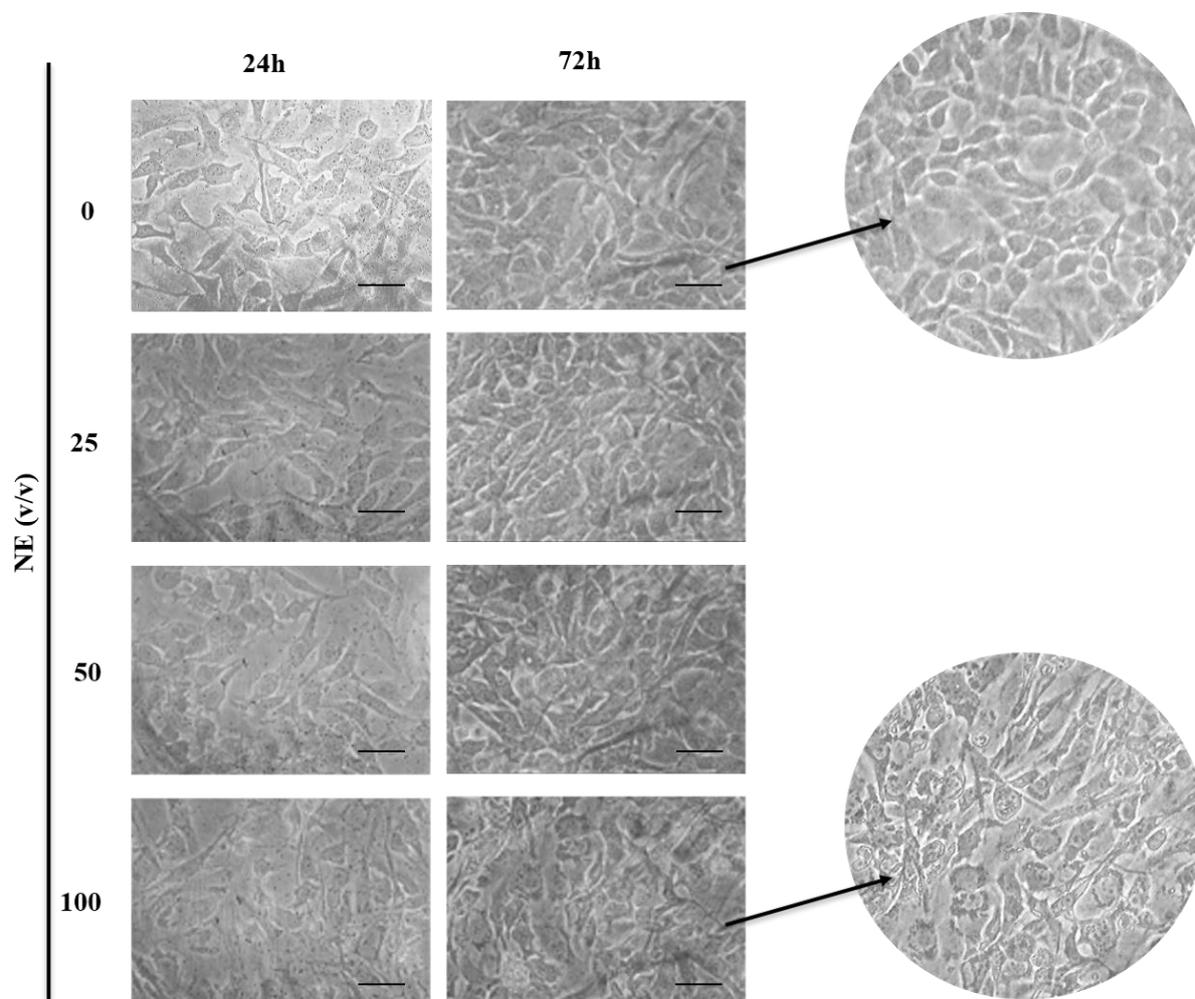


Figura 12. Mudanças morfológicas em células de Balb/c 3T3 A3 causadas pelo tratamento com NE. Morfologia das células tratadas com NE por 24h e 72h nas equivalências v/v de 10GNE. Os volumes de NE equivalentes às concentrações mais altas de 10GNE levaram ao aparecimento de gotículas dentro do citoplasma, como evidenciada na foto ao lado de 100  $\mu$ M. Todas as imagens foram fotografadas em aumento de 10 $\times$ . Barra: 50 $\mu$ m.



No tratamento com a NE podemos observar que há uma redução no número de células apenas na concentração de 100 $\mu$ M (Figura 12). Demonstrando mais uma vez a seletividade do 10GNE por células tumorais às células normais.

#### 4.4. Ensaios de Colônia

A partir dos resultados de IC<sub>50</sub> iniciamos os ensaios para analisar o efeito dos tratamentos na capacidade de formação de colônias nas linhagens tumorais, para avaliar os efeitos citotóxicos

e citostáticos do 10GNE e da NE. Inicialmente foi usada a linhagem de camundongo 4T1.13 para a realização deste experimento, e o tratamento foi realizado nas concentrações de 0, 5, 15 e 30  $\mu\text{M}$  do 10GNE e para a nanoemulsão base (v/v) durante um período de 24 horas.

Os resultados obtidos para a linhagem 4T1.13 mostraram que o 10GNE possui um efeito citotóxico na concentração de 30 $\mu\text{M}$  eliminando totalmente a formação de colônias nessa concentração, enquanto que a NE não foi citotóxica em nenhuma concentração testada (Figura 13, Figura 14 e Figura 15)

*Figura 13. Efeito dos tratamentos com nanoemulsão na formação de colônias na linhagem 4T1.13. A linhagem 4T1.13 foi plaqueada a uma densidade de 100 células/poço em placas de 6 poços, tratadas com 10GNE ou nanoemulsão base por 24h. Colônias (> 50 células) formada após 8 dias e fixadas com cristal violeta em 0,5% de metanol.*

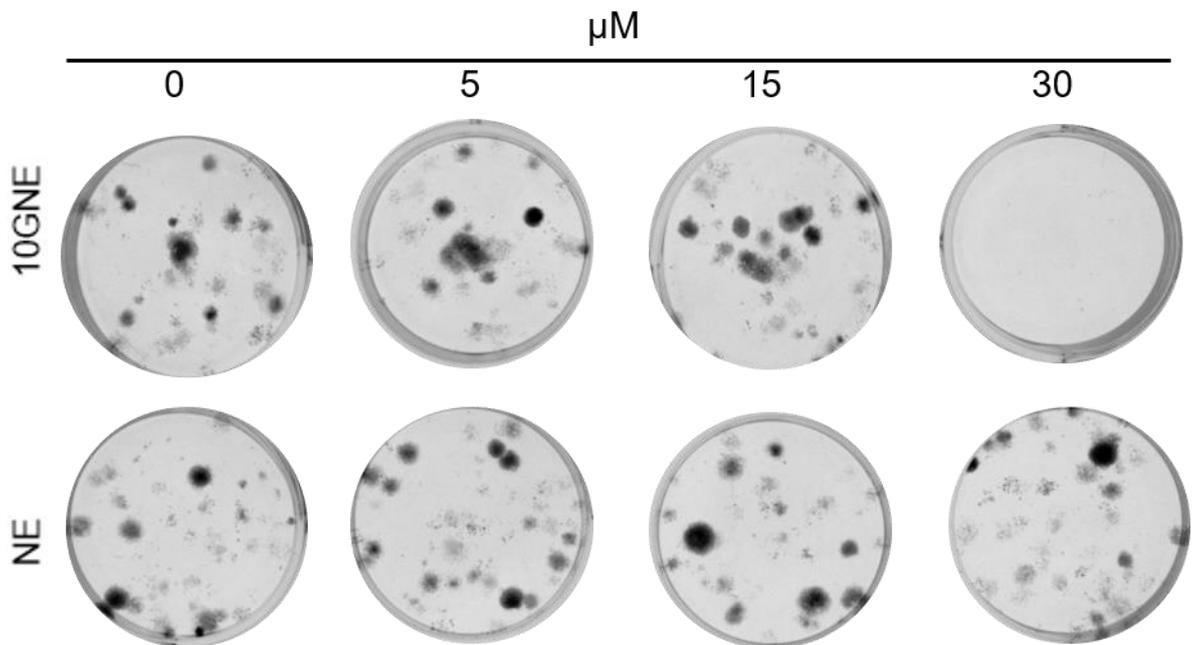
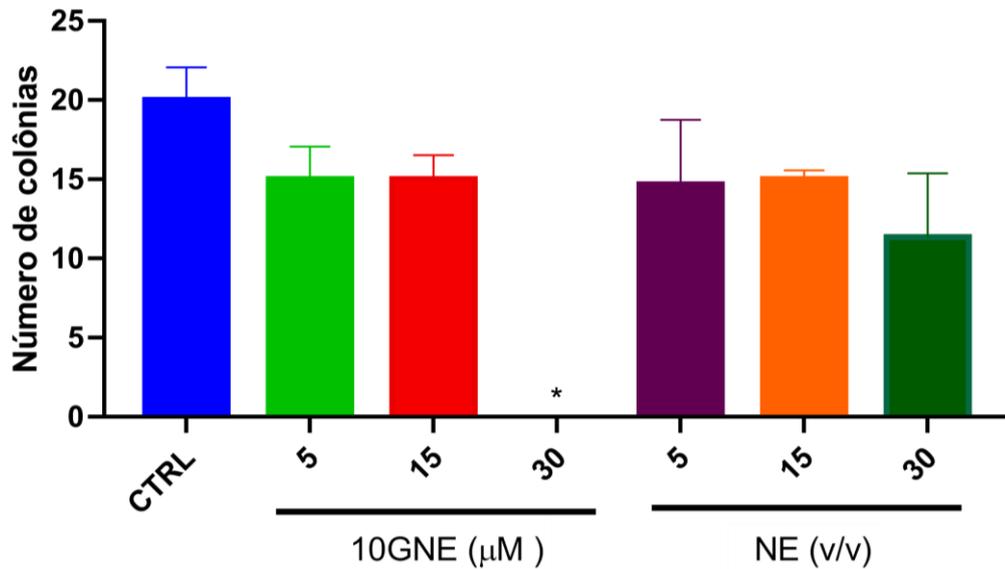
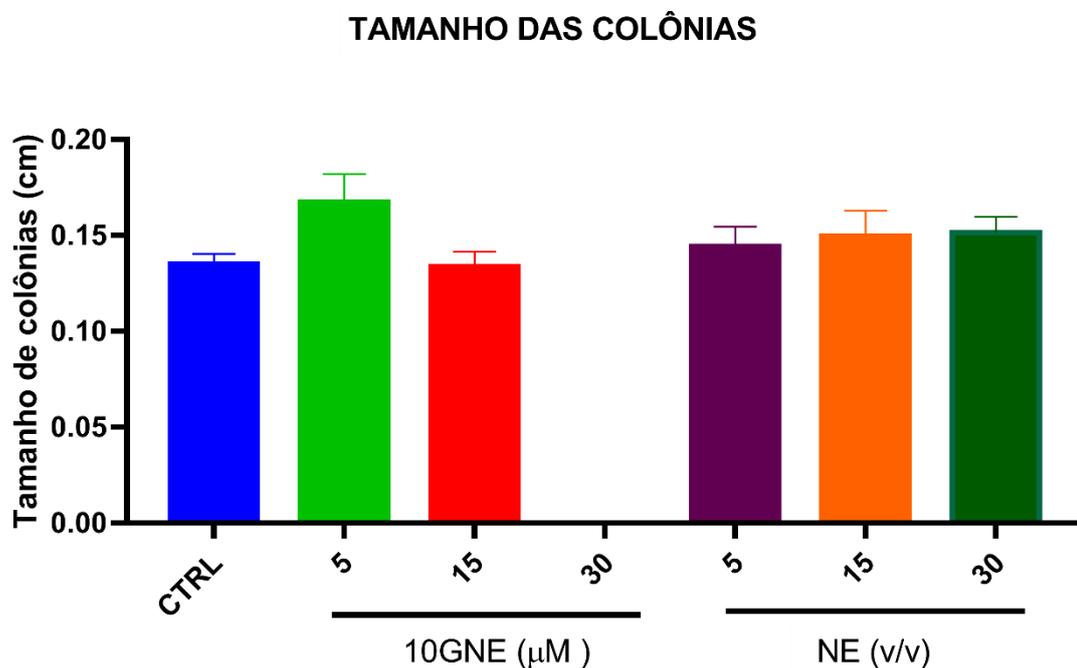


Figura 14. Gráfico representativo do número de colônias formadas no ensaio clonogênico na linhagem 4T1.13. O gráfico evidencia o número de colônias formadas para cada um dos tratamentos e concentrações, tanto para 10GNE e para a nanoemulsão base. Do lado esquerdo o número de colônias dos poços tratados com 10GNE, do lado direito os tratados com nanoemulsão base. (\*) Mostra diferença estatística comparando-se as diferentes concentrações dos tratamentos com seus devidos controles. Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,05$ .



Podemos notar que concentrações nas quais foi possível observar o crescimento de colônias não apresentaram alteração na média de seus tamanhos, como mostra a figura abaixo e, dessa forma podemos afirmar que o 10GNE não demonstrou efeito citostático na linhagem 4T1.13.

Figura 15. Gráfico representativo dos tamanhos das colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem 4T1.13. O gráfico mostra, em centímetros, o tamanho das colônias formadas para cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base. (\*) Mostra diferença estatística comparando-se as diferentes concentrações dos tratamentos com seus devidos controles. Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,05$ .



Para a linhagem 4T1Br4 (Figura 16, Figura 17 e Figura 18), podemos observar que o 10GNE apresenta um efeito citotóxico igualmente na concentração de  $30\mu\text{M}$  enquanto a NE não apresentou atividade nessa concentração, demonstrando que o composto ativo, o [10]-gingerol, possui efeito a partir dessa concentração eliminando a formação de todas as colônias.

Figura 16. Efeito dos tratamentos do 10GNE e da NE na formação de colônias na linhagem celular de câncer de mama murino triplo negativo 4T1Br4. A linhagem 4T1Br4 foi plaqueada a uma densidade de 100 células/poço em placas de 12 poços, tratadas com 10GNE ou nanoemulsão base por 24h. Colônias (> 50 células) formadas após 8 dias foram fixadas e coradas com cristal violeta em 0,5% de metanol.

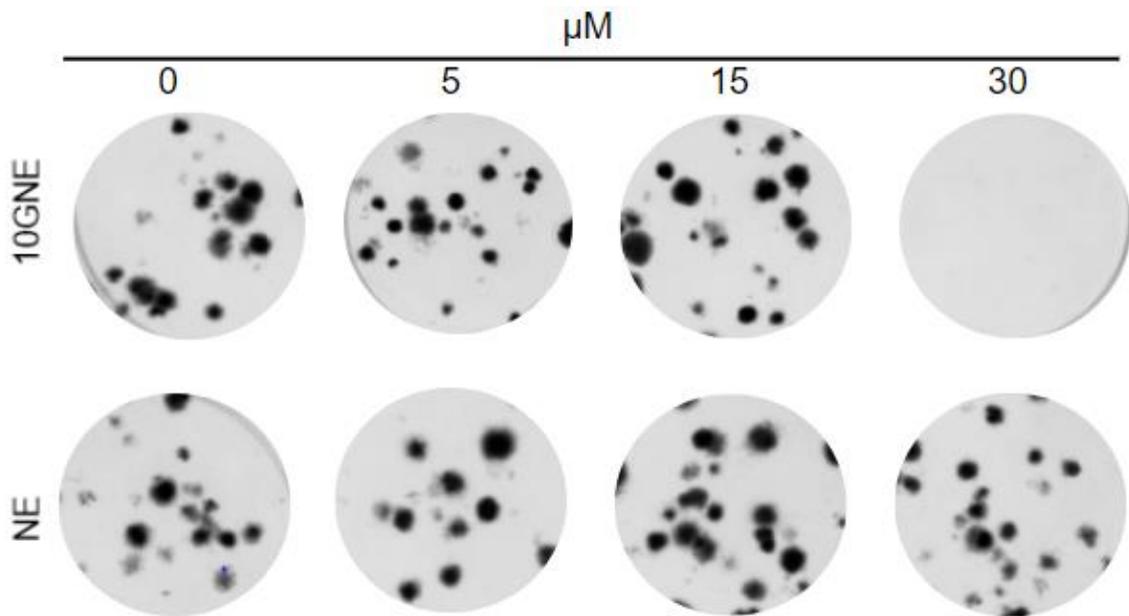
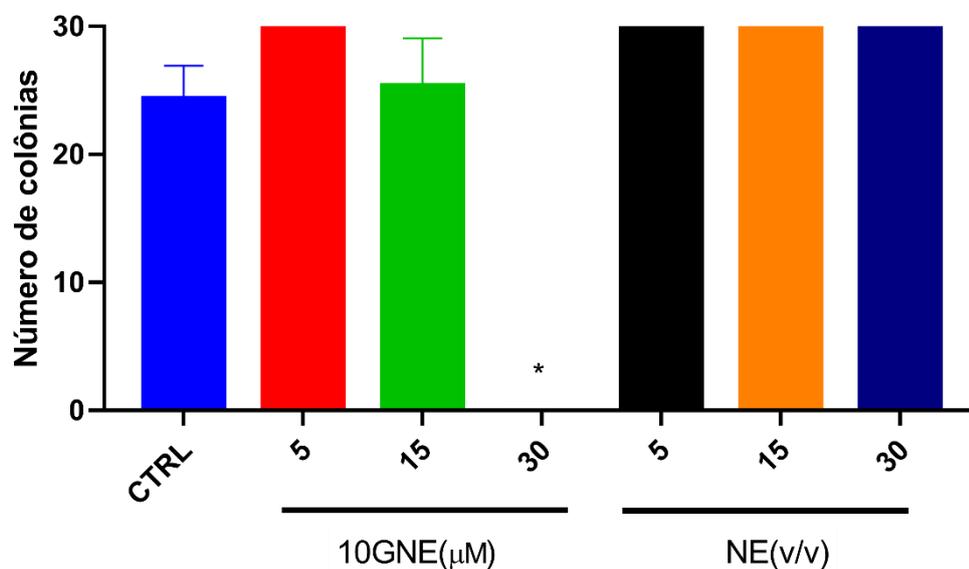
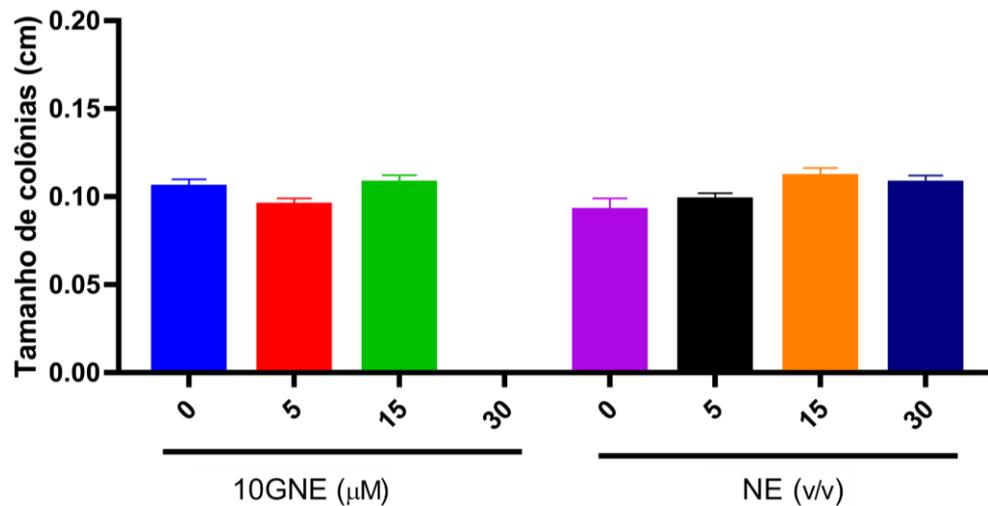


Figura 17. Gráfico representativo do número de colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem 4T1Br4. À esquerda do gráfico está representado o número de colônias dos poços tratados com 10GNE e do lado direito os tratados com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste Tukey  $p < 0,01$ .



Assim como mencionado para a linhagem anterior, não podemos afirmar que alguma das concentrações possuiu efeito citostático nas linhagens apresentada de 4T1Br4, pois não houve alteração nos tamanhos das colônias formadas em cada tratamento (Figura 18). Além disso, na concentração de 30 μM de 10GNE todas as colônias terem sido eliminadas completamente e, portanto, não foi possível mensurar seus tamanhos. Assim, o 10GNE apresentou somente um efeito citotóxico na concentração de 30 μM, sem efeitos citostáticos para nenhuma das linhagens 4T1 (Figura 14 e Figura 18).

Figura 18. Gráfico representativo dos tamanhos das colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem 4T1Br4. O gráfico mostra, em centímetros, o tamanho das colônias formadas para cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste Tukey  $p < 0,01$ .



Em relação à linhagem humana de câncer de mama TN MDA-MB-231 HMTL.6 obtivemos resultados distintos, nos quais a concentração de  $60\mu\text{M}$  apresentou efeito citotóxico e citostático estatisticamente relevante, porém sem eliminar por completo a formação de colônias (Figura 20 e Figura 21).

Figura 19. Efeito dos tratamentos do 10GNE e da NE na formação de colônias na linhagem celular de câncer de mama murino triplo negativo MDA-MB-231 HMTL.6. A linhagem foi plaqueada a uma densidade de 300 células/poço em placas de 12 poços, tratadas com 10GNE ou nanoemulsão base por 24h. Colônias (> 50 células) formadas após 10 dias foram fixadas e coradas com cristal violeta em 0,5% de metanol.

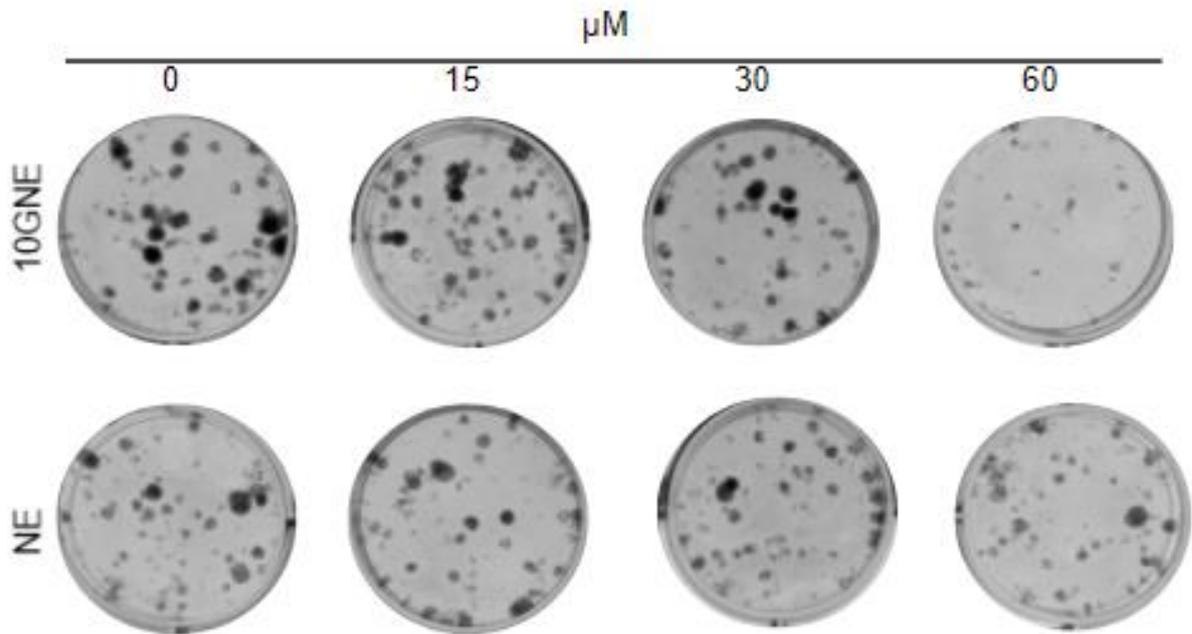
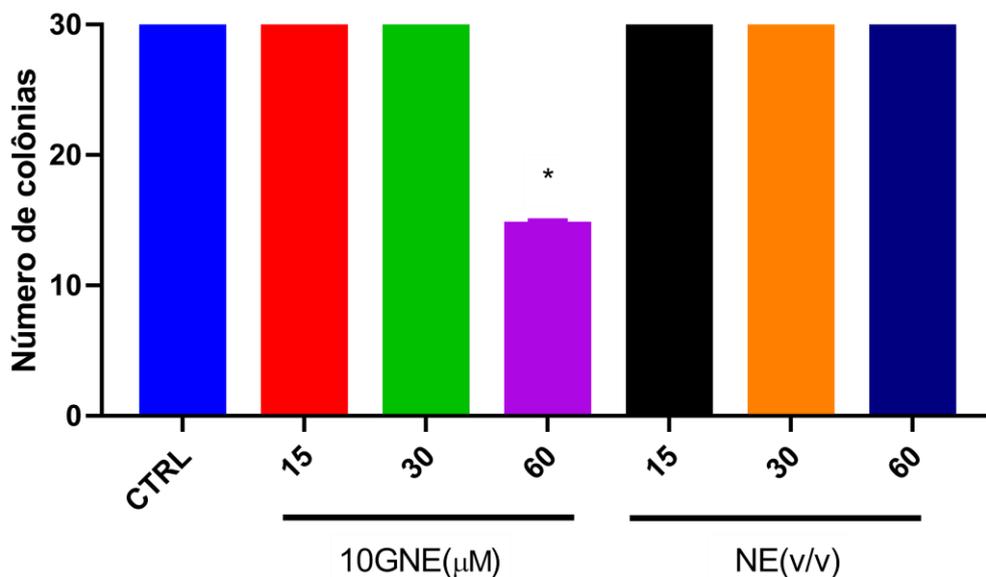
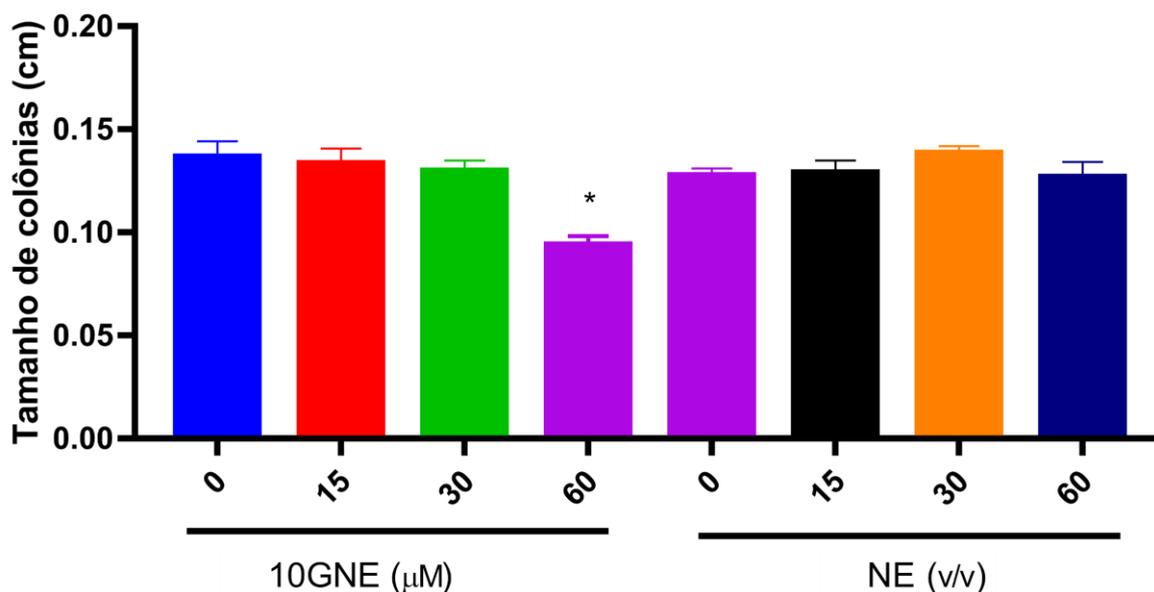


Figura 20. Gráfico representativo do número de colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem MDA-MB-231 HMTL.6. À esquerda do gráfico está representado o número de colônias dos poços tratados com 10GNE e do lado direito os tratados com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste Tukey  $p < 0,01$ .



Diferentemente das outras linhagens, o ensaio de colônia da linhagem MDA-MB-231 HMTL.6 apresentou colônias vivas ao final da incubação, as quais puderam ser mensuradas quanto ao tamanho. Na concentração de 60 $\mu$ M há uma diminuição no diâmetro das colônias formadas e dessa forma podemos afirmar que, para esta linhagem, o composto formulado 10GNE possuiu atividade citostática (Figura 24).

Figura 21. Gráfico representativo dos tamanhos das colônias formadas no ensaio clonogênico da linhagem MDA-MB-231 HMTL.6. O gráfico mostra, em centímetros, o tamanho das colônias formadas para cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste Tukey  $p < 0,01$ .



A Balb/c 3T3 A3 é uma linhagem não tumoral e, portanto, não é usada para este tipo de experimento, por esse motivo foram realizados ensaios visando a padronização da densidade celular para essas células. Infelizmente, depois de algumas tentativas verificamos que nesta linhagem, apesar de formar colônias em densidades mais altas, não houve uma reprodutibilidade entre os experimentos. Além disso, como suas melhores respostas foram em densidades maiores, em alguns experimentos não houve a formação de colônias, pois as células crescem ao longo da placa. Por esse motivo este ensaio não foi realizado com as linhagens não tumorais.

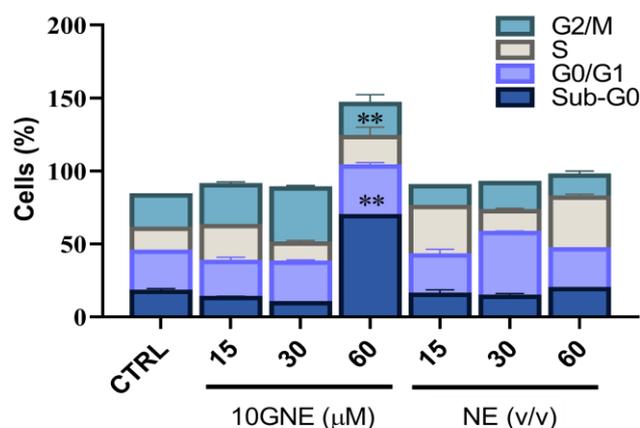
#### 4.5. Ciclo Celular

Para verificar os efeitos do 10GNE no ciclo celular quantificamos o número de células que passavam pelas diferentes fases do ciclo através da citometria de fluxo. Os resultados mostram que

a concentração mais alta do 10GNE (60  $\mu$ M) promoveu aumento de células na fase Sub-G0 após o período de tratamento, indicando uma parada nesta fase do ciclo celular o que é um indicativo de que as células poderão entrar em apoptose, demonstrado no ensaio descrito no item anterior (Figura 23).

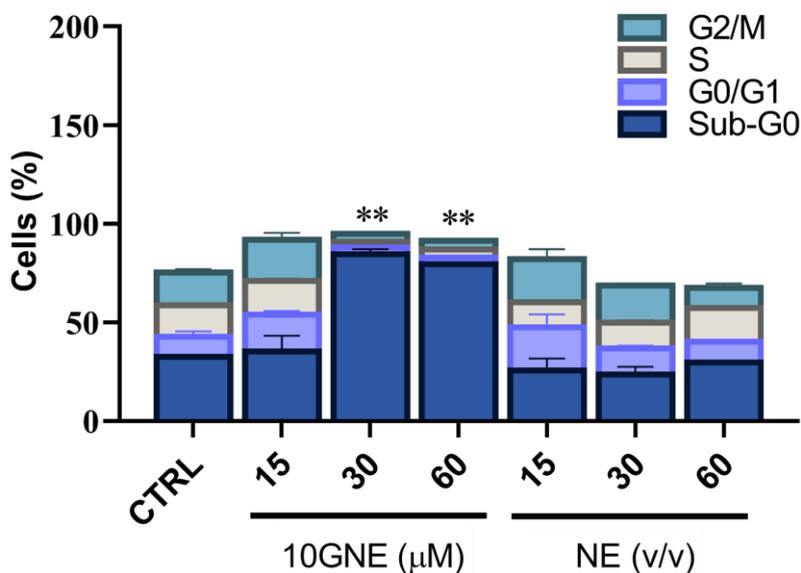
As células tratadas com NE não apresentaram diferença entre as diferentes fases do ciclo celular quando comparadas com o controle, mesmo nas concentrações mais altas, indicando, assim como verificado no ensaio de apoptose, que os efeitos observados para o 10GNE estão somente relacionados à atividade biológica do [10]-gingerol e não da nanoemulsão.

*Figura 22. Efeitos do tratamento com 10GNE e NE no ciclo celular da linhagem 4T1.13. Gráfico da quantidade de células em cada fase do ciclo celular quando tratadas com cada uma das concentrações de ambos tratamentos por 24h, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, Two-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,001$  (\*\*).*



O experimento realizado para a linhagem 4T1Br4, representado na Figura 23, mostrou que para essa linhagem o ciclo celular é afetado tanto na concentração de 30  $\mu$ M quanto na de 60 $\mu$ M, indicando que estas células parecem ser mais sensíveis do que as anteriormente citadas, reafirmando os resultados apresentados no ensaio de apoptose para essa linhagem. Da mesma forma que na linhagem anterior, não foi notado efeito da NE no ciclo celular, se mantendo com perfil bem próximo do controle.

Figura 23. Efeitos do tratamento com 10GNE e NE no ciclo celular da linhagem 4T1Br4. Gráfico da quantidade de células em cada fase do ciclo celular quando tratadas com cada uma das concentrações de ambos tratamentos por 24h, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base (NE). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, Two-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,001$  (\*\*).

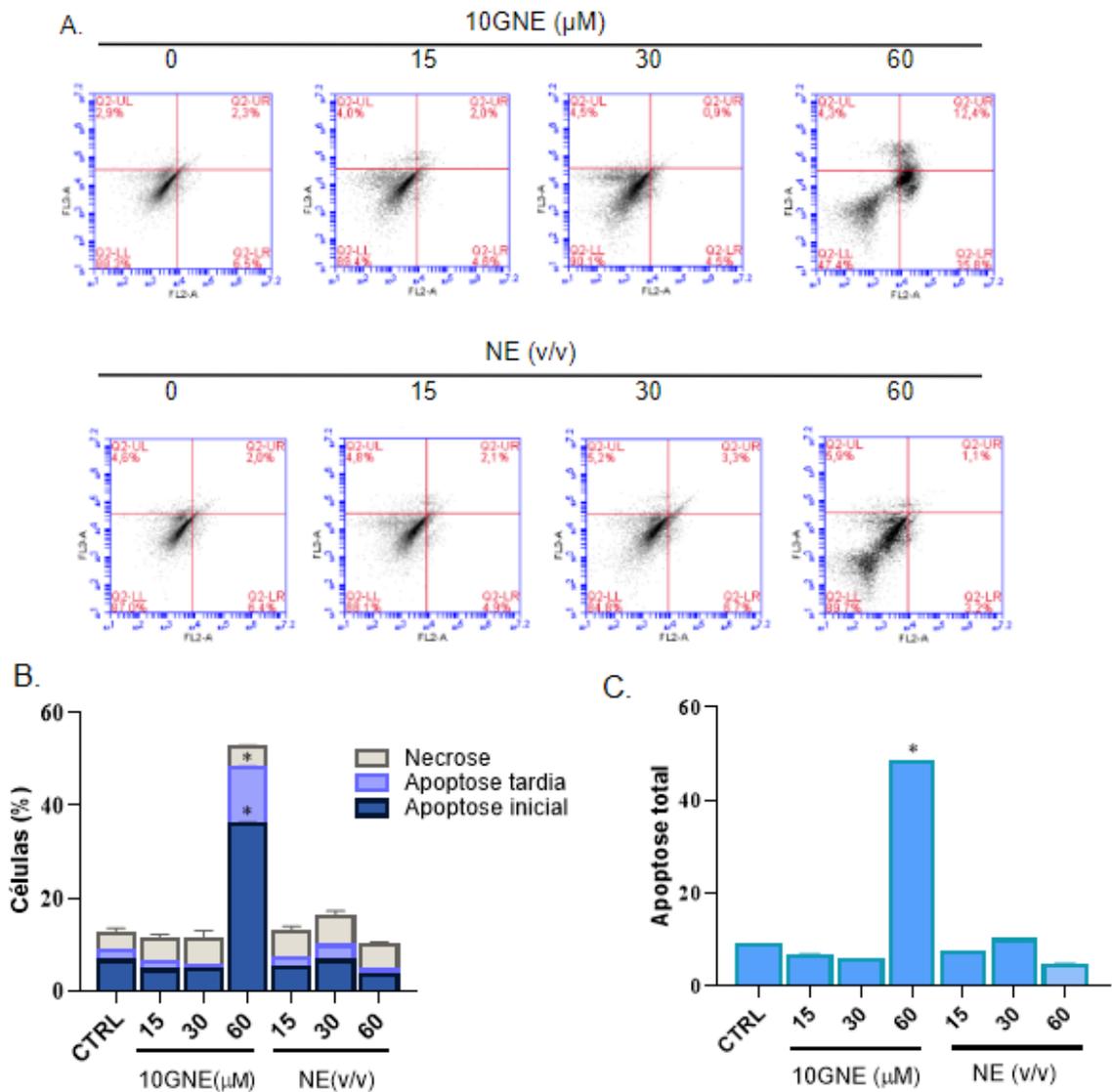


#### 4.6. Apoptose

A atividade apoptótica do [10]-gingerol nanoencapsulado foi analisada por citometria de fluxo. Observamos que o composto formulado (10GNE) aumentou a porcentagem de células em apoptose inicial e tardia na concentração mais alta (60 μM), apresentando aproximadamente 12% de apoptose tardia, 36% de apoptose inicial e 48% de morte celular total na linhagem 4T1.13.

Figura 24. Atividade apoptótica do 10GNE e NE na linhagem 4T1.13. (A) Dot plots representativos da análise por citometria de fluxo de Annexin-V nas células tratadas por 24h com 10GNE e NE nas concentrações indicadas (B) Gráficos da quantidade de células mortas (por necrose, apoptose inicial e apoptose tardia) quando tratadas com cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base. (C) Gráfico representativo da apoptose total das células tratadas nas concentrações indicadas de 10GNE (à

direita) e NE (à esquerda). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,01$  (\*).

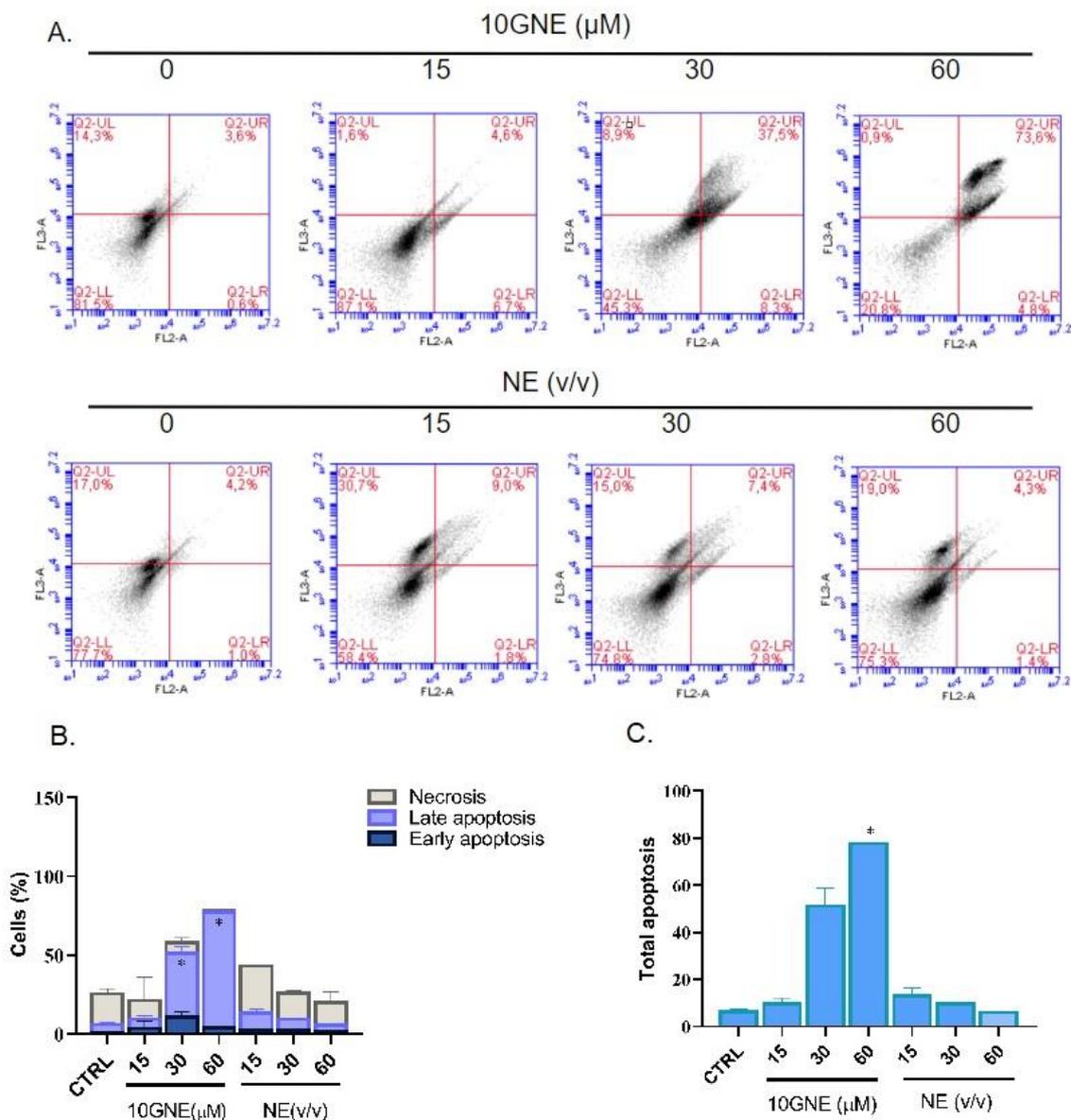


Quando observamos o tratamento com a nanoemulsão base (NE), podemos notar que não houve atividade apoptótica (Figura 25).

Para a linhagem 4T1Br4 o tratamento com 10GNE em sua maior concentração promoveu aproximadamente 78% de apoptose total, enquanto a formulação base apresentou a mesma quantidade de apoptose que o controle, aproximadamente 5%, evidenciando assim que toda atividade apoptótica verificada pelo 10GNE provém apenas do 10G em si e não da nanopartícula

na qual ele está encapsulado, fato observado também nas figuras 22C e 23C, onde são apresentadas as taxas de apoptose total.

**Figura 25.** Atividade apoptótica do 10GNE e NE na linhagem 4T1Br4. (A) Dot plots representativos da análise por citometria de fluxo de Annexin-V nas células tratadas por 24h com 10GNE e NE nas concentrações indicadas (B) Gráficos da quantidade de células mortas (por necrose, apoptose inicial e apoptose tardia) quando tratadas com cada uma das concentrações de ambos tratamentos, a esquerda 10GNE e à direita tratamento com nanoemulsão base. (C) Gráfico representativo da apoptose total das células tratadas nas concentrações indicadas de 10GNE (à direita) e NE (à esquerda). Análise realizada no software Graphpad Prism 7.0, One-way ANOVA com pós teste de Tukey  $p < 0,01$  (\*).



## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliado a otimização do composto original (10G) em uma formulação lipídica (10GNE) para futuras aplicações em quimioterapia. Formulações lipossomais de compostos antitumorais são bastante exploradas, sendo uma das primeiras desenvolvidas a formulação da doxorubicina, chamada Doxil®, e a qual foi desenvolvida nos anos 80. O processo de formulação desse composto acabou fornecendo uma maior tolerabilidade, menor toxicidade e melhor biodistribuição quando comparado com a molécula não formulada (YANG et al., 2014; YINGCHONCHAROEN et al., 2016).

Podemos citar também o DaunoXome®, uma formulação lipossomal da molécula de daunorrubicina, a qual permitiu que o composto se tornasse mais estável e obtivesse maior eficácia na ação contra tumores (LATAGLIATA et al., 2008). Atualmente esse medicamento é utilizado no tratamento de sarcomas e leucemias (YINGCHONCHAROEN et al., 2016). Outro exemplo é o medicamento DepoCyt®, formulado para atuar como injeção do antitumoral cytarabine, o principal medicamento para tratar meningite neoplásica nos dias atuais (DAGHER et al., 2004). Com esses exemplos podemos observar que a formulação lipídica tem sido amplamente usada como estratégia para melhorar a solubilidade, estabilidade e atividade de compostos no tratamento oncológico.

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura trabalhos que apresentem formulações farmacêuticas contendo a molécula de 10G, e dessa forma foram utilizados estudos correlatos para o desenvolvimento desta discussão. A ação citotóxica do 10G, por sua vez, já é bem descrita na literatura, tendo sido comprovada em células de câncer de mama, como demonstrado em trabalhos do nosso grupo de pesquisa (FUZER, et al. 2019; MARTIN et al., 2020). Já foi verificado também que em células de câncer de mama TN da linhagem MDA-MB-231 molécula em questão inibe a proliferação e invasão celular através da inibição de proteínas como AKT, p38/MAPK e Bax/Bcl-2 (JOO et al., 2016).

A presença de uma estendida cadeia carbônica na estrutura da molécula de 10G, acaba resultando em um caráter lipofílico do composto, tornando-o insolúvel em tampões aquosos e, assim, reduzindo seu potencial terapêutico para aplicações *in vivo*. Para superar tais desafios, utilizamos uma estratégia já bastante conhecida na literatura de preparar a molécula de 10G em uma formulação contendo nanopartículas de colesterol e outros lipídeos (CIRRI et al., 2018; FORMARIZ et al., 2008; 2010; YINGCHONCHAROEN et al., 2016). O colesterol tem grande participação na composição da membrana celular, e uma vez que as células tumorais são

caracterizadas por uma taxa de mitose acelerada, elas requerem altos níveis de colesterol para síntese da membrana quando comparadas as células não neoplásicas, sendo dessa forma a nanoemulsão favorável para a incorporação do composto nas células alvo (FAVERO et al., 2018).

As nanoemulsões foram analisadas em tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta, para que fossem caracterizadas em homogeneidade e estabilidade. É comum encontrar na literatura que nanopartículas são aquelas que possuem dimensões entre 1nm e 100nm, argumentos que não nos permitiriam classificar as emulsões utilizadas nesse trabalho como nanopartículas (ZARBIN, 2007). Porém, há na literatura trabalhos que defendem que nanopartículas não se caracterizam só pelas suas dimensões mas também pelas suas características. Phan e Haes (2019) defendem que podem ser denominadas nanopartículas aquelas cuja estabilidade é mantida em escala nanométrica, e conjuntamente com o trabalho publicado por Bozzutto e Molinari (2015), que defende que todos os lipossomos de uso medicinal mantém sua estabilidade apenas até 450nm, podemos concluir que todos os lipossomos de uso medicinal podem ser denominados nanopartículas (PHAN & HAES, 2019; BOZZUTTO & MOLINARI, 2015). Ademais, Auffan e colaboradores (2009) afirmam que qualquer partícula facilmente absorvida por células humanas pode ser considerada nanopartícula, uma vez que essas células só absorvem até 500nm. Diante do exposto, poderíamos classificar as partículas utilizadas nesse trabalho como nanopartículas (AUFFAN et al., 2009).

Na literatura também encontramos que o termo “nanoemulsão” descreve qualquer mistura de fase aquosa, fase oleosa e um surfactante que possua dimensões entre 20nm e 500nm (GUPTA et al. 2016). Entretanto, assim como para nanopartículas, é possível encontrar estudos que defendem não se tratar apenas do tamanho, mas sim de suas características, como estabilidade controlada pelo valor de equilíbrio lipofílico-hidrofílico e se o sistema é passível de administração intravenosa em pacientes (SILVA et al. 2015). Diante de todos os argumentos podemos classificar nosso sistema também como uma nanoemulsão.

O PDI é um parâmetro que mostra variação do tamanho das nanoemulsões em uma mistura, ele é calculado pela razão entre a média do tamanho das nanopartículas e a média do número das mesmas, quanto menor esse valor maior sua uniformidade (FORMARIZ, 2008). Tanto para a nanoemulsão base quanto para o 10GNE, foram obtidos valores de PDI entre 0.1 e 0.4 (tabela 1), mostrando uma distribuição homogênea (FORMARIZ et al., 2008; SMITH et al., 2017). Já o potencial zeta é definido como o limite de cisalhamento hidrodinâmico e proporciona um conhecimento maior sobre a estabilidade de uma nanopartícula. Esse parâmetro depende da temperatura, do pH, condutividade, dentre outras características da emulsão. Valores estáveis para

esse parâmetro estão acima de +10mV e abaixo de -10mV, como defendido por Smith e colaboradores (2008), ou como descrito por Gupta e colaboradores, eles devem estar acima de +30mV ou abaixo de -30mV (SMITH et al., 2017; GUPTA et al., 2016). Foram obtidos valores negativos e menores que -30mV (tabela 1) para ambos potenciais zeta, indicando a estabilidade das nanopartículas formuladas.

Comparando o 10GNE com a NE é possível observar uma diminuição do potencial zeta com a incorporação do composto, mostrando que o composto 10G ao ser inserido no sistema ele se mostra ainda mais estável do que a NE. Estes valores (tabela 1) ainda indicam uma boa distribuição de tamanho das gotas no sistema, o que reflete diretamente a homogeneidade de tamanho das gotículas na nanoemulsão total (FORMARIZ et al., 2008; 2010).

Comparando-se os resultados obtidos nesse trabalho com os resultados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa podemos ressaltar que além de tornar o composto solúvel em tampões aquosos, o sistema de nanocarregamento diminuiu os IC<sub>50</sub> obtidos com relação à citotoxicidade em algumas linhagens celulares quando comparados com os IC<sub>50</sub> obtidos para o 10G não formulado. Tanto das células tumorais quanto de células não neoplásicas, como por exemplo a linhagem 4T1Br4 cujo IC<sub>50</sub> em 72h diminuiu de 32,7 ( $\pm 0,5$ ) do 10G para 17,82 ( $\pm 0,41$ ) (MARTIN et al., 2017, MARTIN et al., 2020). Além disso, podemos notar que na tabela 2 cada linhagem tumoral apresenta um valor de IS, que consiste na razão entre o IC<sub>50</sub> das células normais e o IC<sub>50</sub> das células tumorais da respectiva espécie (tabela 2). Quanto mais alto esse índice mais eficaz e seguro o composto se apresenta, mostrando que linhagens tumorais possuem maior susceptibilidade ao tratamento do que células não tumorais (BÉZIVIN et al., 2003). Cada linhagem celular apresentou um valor distinto de IS, sendo todos maiores que 1, indicando uma seletividade do 10GNE por células tumorais (tabela 2), e se compararmos os dados obtidos neste trabalho com os dados publicados por Martin e colaboradores 2017 podemos observar que em houveram linhagens nas quais o índice de seletividade aumentou diante do sistema formulado, como por exemplo a MDA-MB-231 HMTL.6 que para o 10G era o valor de 1,58 e para o 10GNE o valor subiu para 1,85 (MARTIN et al., 2017). A única linhagem que não apresentou essa redução foi a 4T1.13 que manteve o IC<sub>50</sub>.

Para além dos resultados de citotoxicidade demonstrados, também foi mencionado o aparecimento de gotículas no interior das células. O colesterol, um dos principais componentes das nossas nanopartículas, devido à sua anteriormente mencionada importância em células neoplásicas, regula positivamente a produção de receptores de lipoproteína de baixa densidade (r-LDL) nessas células (FORMARIZ et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2008). No trabalho de Favero

e colaboradores (2018), que utilizam nanopartículas bastante semelhantes às nossas, foi descrito que as partículas penetram em células tumorais através do rLDL (receptor de LDL) e apenas conseguem liberar as moléculas que carregam quando internalizadas, preservando o composto até a hidrólise intracelular da nanopartícula (FAVERO et al., 2018). Há também estudos que comprovam endocitose mediada por receptor de LDL de nanopartículas similares no tratamento de endometriose e neoplasias ginecológicas além de câncer de mama. Esses estudos mostram que a entrada do fármaco a partir desse receptor melhora o perfil farmacocinético dos quimioterápicos testados (PIRES et al., 2008; BEDIN et al., 2019; MAZUMDA-MB-231 HMTL.6R et al., 2018). Diante de tais informações, e da semelhança das nanopartículas, teorizamos que o 10GNE pode estar sendo internalizado dessa mesma maneira, e que tais gotículas, as quais aparecem no citoplasma das células tratadas com 10GNE e NE, sejam as nanopartículas que foram internalizadas nas células (FAVERO et al, 2018; RODRIGUEZ et al, 2005). (MARTIN et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

O ensaio de formação de colônias avalia a capacidade de uma única célula crescer e formar uma colônia. Esse ensaio é importante pois leva em consideração a morte reprodutiva das células, que é um critério relevante para ser utilizado na definição de concentrações citotóxicas que podem ser utilizadas de parâmetros para outros ensaios. Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostram que 10G apresenta atividade citostática em seu  $IC_{50}$  das linhagens testadas e citotóxica já a partir de  $10 \mu\text{M}$  (MARTIN et al., 2017; MARTIN et al., 2020). Os resultados desse trabalho, porém, não podem afirmar a mesma característica, uma vez que em sua maior concentração testada não houve formação de colônia, portanto, houve um efeito citotóxico, e dessa forma os tamanhos não puderam ser mensurados em nenhuma linhagem.

Nas células da linhagem 4T1.13 o 10GNE levou a parada do ciclo celular nas fases Sub-G0 e S apenas na concentração de  $60 \mu\text{M}$ . Não há ainda na literatura resultados que descrevam a ação do 10G no ciclo celular dessa mesma linhagem. Já na linhagem 4T1Br4, observamos a parada do ciclo celular na fase Sub-G0 na concentração de  $30 \mu\text{M}$ , corroborando igualmente com os dados obtidos no experimento de apoptose e com os experimentos encontrados na literatura para a mesma linhagem com 10G não formulado (MARTIN et al, 2017). Estes resultados são similares aos obtidos para células de câncer de cólon descritos no trabalho de Ryu e colaboradores (JOO et al., 2015; RYU et al., 2014; ZHANG et al., 2017). Além disso, é encontrado na literatura que a parada do ciclo celular na fase sub-G0 indica uma fragmentação do DNA, e morte por apoptose, para avaliar tais achados foram realizados experimento de apoptose por citometria de fluxo (MURAD et al., 2016).

A apoptose ou morte celular programada é essencial para manutenção da homeostase e para a sobrevivência de organismos multicelulares. A desregulação desse processo é uma das principais causas de desenvolvimento de câncer, além de outras doenças. Apesar da atividade apoptótica do 10G ser bem descrita em diferentes linhagens celulares como cólon (RYU et al., 2014), próstata (BRHAMBHATT et al., 2013), pulmão (SANG et al., 2009), pele (PENG et al., 2012) e mama (FUZER et al. 2017; MARTIN et al., 2017; MARTIN et al., 2020), é necessário verificar se esta atividade é mantida quando em um sistema de nanocarregamento. A análise de apoptose por citometria de fluxo nos mostrou que há um aumento significativo na quantidade de células que sofreram apoptose quando tratadas com o 10GNE, comparado com as células controle. Os resultados mostram 42,8% de diferença no número de células apoptóticas no tratamento de 60µM na linhagem 4T1.13 e de 74,3% na linhagem 4T1Br4. Resultados similares aos encontrados na literatura e que demonstram que o 10G aumenta significativamente a quantidade de células mortas por apoptose (RYU et al., 2014; ZHANG et al., 2017). Quando comparados com os resultados anteriores, obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, do 10G na linhagem 4T1Br4, é possível observar que a taxa de apoptose do 10GNE é maior quando comparada ao 10G sem a formulação (18,3% em 50µM), indicando assim um aumento da eficácia da ação do composto quando formulado (MARTIN et al, 2017).

## 6. CONCLUSÃO

O sistema a formulação 10GNE foi desenvolvido de modo eficiente, se mostrando homogênea, estável e solúvel. O potencial citotóxico do composto 10G se apresentou ainda maior quando nanoformulado, evidenciado pela diminuição dos IC<sub>50</sub>. Além disso, o 10GNE apresentou alta seletividade para células tumorais quando comparado com células não-tumorais. Ademais, o composto formulado também apresentou atividade apoptótica e foi capaz de induzir a parada do ciclo celular nas linhagens testadas. A linhagem que se apresentou mais sensível para a ação do 10GNE nos ensaios realizados foi a 4T1Br4, tumoral de mama murino, resultado bastante vantajoso uma vez que é a linhagem utilizada também em ensaios *in vivo* em camundongos.

O composto formulado também alterou a morfologia das células tumorais em algumas linhagens específicas como a Balb/c 3T3 A3, e um sutilmente a 4T1.13. A ação da NE, não foi notada também diferenças morfológicas em nenhuma das linhagens, foi apenas notado o aparecimento de gotículas no interior das células.

Diante dos resultados apresentados, que a nanopartícula de colesterol funcione como um sistema de entrega para as células tumorais, possivelmente utilizando receptores de colesterol para

a entrada na célula e dessa forma se mostrando ainda mais eficaz do que o 10G não formulado. Assim, reafirmando a nossa hipótese inicial de que a nanoemulsão de [10]-gingerol aumentaria a solubilidade e a eficiência da molécula no tratamento de células de câncer de mama triplo negativo. Tais resultados enfatizam a vantagem de se utilizar um sistema de formulação para um composto que possui atividade antitumoral, demonstrando o potencial da molécula formulada como um possível fármaco antitumoral e encorajam futuros estudos *in vivo* para a confirmação de sua eficácia em mamíferos.

## 7. REFERÊNCIAS

AUFFAN, Mélanie; ROSE, Jérôme; BOTTERO, Jean-Yves; LOWRY, Gregory V.; JOLIVET, Jean-Pierre; WIESNER, Mark R.. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. **Nature Nanotechnology**, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 634-641, 13 set. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nano.2009.242>.

AL-MAHMOOD, Sumayah; SAPIEZYNSKI, Justin; GARBUZENKO, Olga B.; MINKO, Tamara. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. : challenges and treatment options. *Drug Delivery And Translational Research*, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 1483-1507, 5 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13346-018-0551-3>.

ANDRABI, Tayab; FRENCH, Katy E.; QAZILBASH, Muzaffar H.. New Cancer Therapies: implications for the perioperativeperiod. : Implications for the PerioperativePeriod. *Current Anesthesiology Reports*, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 362-367, dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40140-018-0303-4>.

ASHRAFIZADEH, Milad; JAVANMARDI, Sara; MORADI-OZARLOU, Masoumeh; MOHAMMADINEJAD, Reza; FARKHONDEH, Tahereh; SAMARGHANDIAN, Saeed; GARG, Manoj. Natural products and phytochemical nanoformulations targeting mitochondria in oncotherapy: an updated review on resveratrol. : an updated review on resveratrol. *Bioscience Reports*, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 1-21, abr. 2020. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20200257>.

ATCC.-.4T1 (ATCC® CRL-2539™). 2020. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/CRL-10317.aspx>>. Acesso em: 26/04/2020.

ATCC.-.BALB/3T3 clone A31 (ATCC® CCL-163™). 2020. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/CCL-163.aspx>>. Acesso em: 26/04/2020.

ATCC.-.MCF 10A (ATCC® CRL-10317™). 2020. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/CRL-2539.aspx>>. Acesso em: 26/04/2020.

ATCC.-.MDA-MB-231 HMTL.6 (ATCC® HTB-26™). 2020. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>>. Acesso em: 26/04/2020

BEDIN, Alessandra et al. Nanotechnology for the treatment of deep endometriosis: uptake of lipid core nanoparticles by LDL receptors in endometriotic foci. *Clinics*, v. 74, p.1-12, 2019. Fundacao Faculdade de Medicina. <http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2019/e989>.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; DÉVÉHAT, F. Lohézic-le; BOUSTIE, J.. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, [s.l.], v. 10, n. 6-7, p. 499-503, jan. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1078/094471103322331458>.

BORGES, Dayane Oliveira; FREITAS, Karina Alexandra Batista da Silva; MINICUCCI, Eliana Maria; POPIM, Regina Célia. Benefits of ginger in the control of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Revista Brasileira de Enfermagem*, [s.l.], v. 73, n. 2, p. 1-10, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0034-7167-2018-0903>.

BOZZUTO, Giuseppina; MOLINARI, Agnese. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal Of Nanomedicine*, [S.L.], p. 975-989, fev. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s68861>.

BRAHMBHATT, Meera; GUNDALA, Sushma R.; ASIF, Ghazia; A SHAMSI, Shahab; ANEJA, Ritu. Ginger Phytochemicals Exhibit Synergy to Inhibit Prostate Cancer Cell Proliferation. *Nutrition And Cancer*, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 263-272, fev. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2013.749925>.

BRAMI, Cloé; BAO, Ting; DENG, Gary. Natural products and complementary therapies for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a systematic review. : A systematic review. *Critical Reviews In Oncology/hematology*, [s.l.], v. 98, p. 325-334, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.014>.

BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394-424, 12 set. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21492>.

CIRRI, Marzia; MAESTRINI, Lavinia; MAESTRELLI, Francesca; MENNINI, Natascia; MURA, Paola; GHELARDINI, Carla; MANNELLI, Lorenzo di Cesare. Design, characterization and in vivo evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) as a new drug delivery system for hydrochlorothiazide oral administration in pediatric therapy. *Drug Delivery*, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 1910-1921, 1 jan. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10717544.2018.1529209>.

DAGHER R., JOHNSON J., WILLIAMS G., KEEGAN P., PAZDUR R. Accelerated approval of oncology products: a decade of experience. *J Natl Cancer Inst*. 2004. doi: 10.1093/jnci/djh279

ECCLES, Suzanne; ABOAGYE, Eric O; ALI, Simak; ANDERSON, Annie S; ARMES, Jo; BERDITCHEVSKI, Fedor; BLAYDES, Jeremy P; BRENNAN, Keith; BROWN, Nicola J; BRYANT, Helen e. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Research*, [s.l.], v. 15, n. 5, p. 15-52, out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3493>.

FAVERO, Giovanni M. et al. Cell internalization of 7-ketocholesterol-containing nanoemulsion through LDL receptor reduces melanoma growth in vitro and in vivo : a preliminary report.

Oncotarget , v. 9, p.1-19, 2018.

FIDLER, Isaiah J.; KRIPKE, Margaret L.. The challenge of targeting metastasis. *Cancer And Metastasis Reviews*, [s.l.], v. 34, n. 4, p. 635-641, 2 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-015-9586-9>.

FORMARIZ, T.p.; CHIAVACCI, L.a.; SARMENTO, V.h.v.; FRANZINI, C.m.; SILVA-, A.a.; SCARPA, M.v.; SANTILLI, C.v.; EGITO, E.s.t.; OLIVEIRA, A.g.. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, [s.l.], v. 63, n. 2, p. 287-295, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.12.021>.

FORMARIZ, T.p.; CHIAVACCI, L.a.; SCARPA, M.v.; SILVA-JÔNIO, A.a.; EGITO, E.s.t.; TERRUGI, C.h.b.; FRANZINI, C.m.; SARMENTO, V.h.v.; OLIVEIRA, A.g.. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 47-53, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.01.004>.

FRANKEN, Nicolaas A P; RODERMOND, Hans M; STAP, Jan; HAVEMAN, Jaap; VAN BREE, Chris. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, [s.l.], v. 1, n. 5, p. 2315-2319, dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.

FREITAS, Eduardo de; SILVA, Patricia da; CHORILLI, Marlus; BATISTA, Alzir; LOPES, Érica de Oliveira; SILVA, Monize; LEITE, Clarice; PAVAN, Fernando. Nanostructured Lipid Systems as a Strategy to Improve the in Vitro Cytotoxicity of Ruthenium(II) Compounds. *Molecules*, [s.l.], v. 19, n. 5, p. 5999-6008, 9 maio 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19055999>.

FUZER, Angelina M.; LEE, Sun-young; MOTT, Joni D.; COMINETTI, Marcia R.. [10]-Gingerol Reverts Malignant Phenotype of Breast Cancer Cells in 3D Culture. *Journal Of Cellular Biochemistry*, [s.l.], v. 118, n. 9, p. 2693-2699, 15 maio 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.25906>.

FUZER, Angelina M.; MARTIN, Ana C.b.m.; BECCENERI, Amanda B.; SILVA, James A. da; VIEIRA, Paulo C.; COMINETTI, Marcia R.. [10]-Gingerol Affects Multiple Metastatic Processes and Induces Apoptosis in MDA-MB-231 HMTL.6MB- 231 Breast Tumor Cells. *Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 19, n. 5, p. 645-654, 27 jun. 2019. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520618666181029125607>.

GUPTA, Ankur; ERAL, H. Burak; HATTON, T. Alan; DOYLE, Patrick S.. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, [S.L.], v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5sm02958a>.

GLOBOCAN. *Cancer Tomorrow*. International Agency for Research on Cancer, 2018.

HABTEMARIAM, Solomon; LENTINI, Giovanni. Plant-Derived Anticancer Agents: lessons from the pharmacology of geniposide and its aglycone, genipin. : Lessons from the Pharmacology of Geniposide and Its Aglycone, Genipin. *Biomedicines*, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 39-67, 26 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines6020039>.

HON, Jane Date. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. American Research Of Cancer, S. I., v. 9, n. 6, p. 1864-1873, dez. 2016.

INCA. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. [s.l.: s.n.].

JOO JH, Hong SS, Cho YR, Seo DW. 10-Gingerol inhibits proliferation and invasion of MDA-MB-231 HMTL.6 breast cancer cells through suppression of Akt and p38MAPK activity. *Oncol Rep* . v. 35, p779-84, 2016. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4405>.

KUMAR, Pankaj; AGGARWAL, Rupali. An overview of triple-negative breast cancer. *Archives Of Gynecology And Obstetrics*, [s.l.], v. 293, n. 2, p. 247-269, 4 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00404-015-3859-y>.

LI, Ya; LI, Sha; MENG, Xiao; GAN, Ren-you; ZHANG, Jiao-jiao; LI, Hua-bin. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Nutrients*, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 728-766, 8 jul. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu9070728>.

LATAGLIATA, R., BRECCIA, M., FAZI, P., IACOBELLI, S., MARTINELLI, G., Di RAIMONDO, F., SBORGIA, M. Liposomal daunorubicin *versus* standard daunorubicin: long term follow-up of the GIMEMA GSI 103 AMLE randomized trial in patients older than 60 years with acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology*, [s.l.], v. 89, n. 5 2008. doi:[10.1111/j.1365-2141.2008.07400.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07400.x)

MAHOMOODALLY, M.f.; AUMEERUDDY, M.z.; RENGASAMY, Kannan R.r.; ROSHAN, S.; HAMMAD, S.; PANDOHEE, J.; HU, Xuebo; ZENGIN, G.. Ginger and its active compounds in cancer therapy: from folk uses to nano-therapeutic applications. : From folk uses to nano-therapeutic applications. *Seminars In Cancer Biology*, [s.l.], p. 3-13, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.009>.

MARTIN, Ana Carolina B.m.; FUZER, Angelina M.; BECCENERI, Amanda B.; SILVA, James Almada da; TOMASIN, Rebeka; DENOYER, Delphine; KIM, Soo-hyun; MCINTYRE, Katherine A.; PEARSON, Helen B.; YEO, Belinda. [10]-gingerol induces apoptosis and inhibits metastatic dissemination of triple negative breast cancer in vivo. *Oncotarget*, [s.l.], v. 8, n. 42, p. 72260-72272, 10 ago. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.20139>.

MARTIN, Ana Carolina B. M., TOMASIN, R., LUNA-DULCEY, L. *et al.* [10]-Gingerol improves doxorubicin anticancer activity and decreases its side effects in triple negative breast cancer models. *Cell Oncol* [s.l.], 2020. <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00539-z>

MASSAGUÉ, Joan; OBENAUF, Anna C.. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, [s.l.], v. 529, n. 7586, p. 298-306, jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature17038>.

MAZUMDA-MB-231 HMTL.6R, Samrat et al. Effective cellular internalization, cell cycle arrest and improved pharmacokinetics of Tamoxifen by cholesterol based lipopolymeric nanoparticles. *International Journal Of Pharmaceutics* , v. 543, p.96-106, 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.022>.

NAKANO, Mari Hara; UDAGAWA, Chihiro; SHIMO, Arata; KOJIMA, Yasuyuki; YOSHIE, Reiko; ZAHA, Hisamitsu; ABE, Norie; MOTONARI, Tokiwa; UNESOKO, Mikiko; TAMURA, Kenji. A Genome-Wide Association Study Identifies Five Novel Genetic Markers for Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity in Japanese Population. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, [s.l.], v. 42, n. 12, p. 2045-2053, 1 dez. 2019. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b19-00527>.

NAVES, Marina A.; GRAMINHA, Angelica E.; VEGAS, Legna C.; LUNA-DULCEY, Liany; HONORATO, João; MENEZES, Antônio C. S.; BATISTA, Alzir A.; COMINETTI, Marcia R. Transport of the Ruthenium Complex [Ru(GA)(dppe)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> into Triple-Negative Breast Cancer Cells Is Facilitated by Transferrin Receptors. *Molecular Pharmaceutics*, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 1167-1183, 11 jan. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01154>.

NHS, N. H. S.-. Treatment -Breast cancer in women. 2020. Disponível em: <<https://www.nhs.uk/conditions/breast-cancer/treatment/>>. Acesso em: 16/04/2020.

NUNES, Toni; PONS, Thomas; HOU, Xue; VAN DO, Khanh; CARON, Benoît; RIGAL, Marthe; BENEDETTO, Mélanie di; PALPANT, Bruno; LEBOEUF, Christophe; JANIN, Anne. Pulsed-laser irradiation of multifunctional gold nanoshells to overcome trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*, [s.l.], v. 38, n. 1, p. 1-13, 12 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-019-1305-x>.

NUSSBAUM, Robert L. Genética e genômica do câncer. In: NUSSBAUM, Robert L.. *Genética Médica*. 8. ed. Elsevier, 2016. Cap. 15. p. 309-332.

PACHMAYR, Eva; TREESE, Christoph; STEIN, Ulrike. Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology. *Visceral Medicine*, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 11-20, 2017. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000454696>.

PARK, Ji Hyun; AHN, Jin-hee; KIM, Sung-bae. How shall we treat early triple-negative breast cancer (TNBC): from the current standard to upcoming immuno-molecular strategies. : from the current standard to upcoming immuno-molecular strategies. *Esmo Open*, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 3-17, maio 2018. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000357>.

PENG, Fang; TAO, Qiaofeng; WU, Xiumei; DOU, Hui; SPENCER, Shawn; MANG, Chaoyong; XU, Lu; SUN, Lianli; ZHAO, Yu; LI, Haibo. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. *Fitoterapia*, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 568-585, 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.028>.

PIRES, Luís A. et al. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, v. 63, p.281-287, 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-008-0738-2>.

RASMUSSEN, Andrea; MURPHY, Kaylee; HOSKIN, David W.. 10-Gingerol Inhibits Ovarian Cancer Cell Growth by Inducing G2Arrest. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, [s.l.], v. 9, n. 4, p.

685-689, 24 out. 2019. Maad Rayan Publishing Company.  
<http://dx.doi.org/10.15171/apb.2019.080>.

RODRIGUES, Debora G. et al. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, v. 55, p.565-576, 2005. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00280-004-0930-y>.

RYU, Min Ju; CHUNG, Ha Sook. [10]-Gingerol induces mitochondrial apoptosis through activation of MAPK pathway in HCT116 human colon cancer cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v. 51, p.92-101, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-014-9806-6>.

SANG, Shengmin; HONG, Jungil; WU, Hou; LIU, Jing; YANG, Chung S.; PAN, Min-Hsiung; BADMAEV, Vladimir; HO, Chi-Tang. Increased Growth Inhibitory Effects on Human Cancer Cells and Anti-inflammatory Potency of Shogaols from *Zingiber officinale* Relative to Gingerols. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, [S.L.], v. 57, n. 22, p. 10645-10650, 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf9027443>.

SHARMA, Priyanka. Update on the Treatment of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *Current Treatment Options In Oncology*, [s.l.], v. 19, n. 5, p. 1-22, 14 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11864-018-0539-8>.

SILVA, James Almada da; BECCENERI, Amanda Blanque; MUTTI, Hêmily Sanches; MARTIN, Ana Carolina Baptista Moreno; SILVA, Maria Fátima das Graças Fernandes; FERNANDES, João Batista; VIEIRA, Paulo Cezar; COMINETTI, Márcia Regina. Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. *Journal Of Chromatography B*, [s.l.], v. 903, p. 157-162, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.013>.

SILVA, Jesse Lopes da; NUNES, Natalia Cristina Cardoso; IZETTI, Patricia; MESQUITA, Guilherme Gomes de; MELO, Andreia Cristina de. Triple negative breast cancer: a thorough review of biomarkers. : A thorough review of biomarkers. *Critical Reviews In Oncology/hematology*, [s.l.], v. 145, p. 1483-1507, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.102855>.

SILVA, Patricia; SOUZA, Paula; CALIXTO, Giovana; LOPES, Erica; FREM, Regina; NETTO, Adelino; MAURO, Antonio; PAVAN, Fernando; CHORILLI, Marlus. In Vitro Activity of Copper(II) Complexes, Loaded or Unloaded into a Nanostructured Lipid System, against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 17, n. 5, p. 745-767, 17 maio 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17050745>.

SMITH, Mackensie C.; CRIST, Rachael M.; CLOGSTON, Jeffrey D.; MCNEIL, Scott E.. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. : a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, [s.l.], v. 409, n. 24, p. 5779-5787, 31 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z>.

VICHAI, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, [s.l.], v. 1, n. 3, p. 1112-1116, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.

WANG, Yi-ping; LEI, Qun-ying. Metabolic recoding of epigenetics in cancer. *Cancer Communications*, [s.l.], v. 38, n. 1, p. 25-32, 21 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1186/s40880-018-0302-3>.

YINGCHONCHAROEN, Phatsapong; KALINOWSKI, Danuta S.; RICHARDSON, Des R.. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: what is available and what is yet to come. : What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacological Reviews*, [s.l.], v. 68, n. 3, p. 701-787, 30 jun. 2016. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/pr.115.012070>.

ZHANG, Fang; THAKUR, Kiran; HU, Fei; ZHANG, Jian-guo; WEI, Zhao-jun. Cross-talk between 10-gingerol and its anti-cancerous potential: a recent update. : a recent update. *Food & Function*, [s.l.], v. 8, n. 8, p. 2635-2649, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7fo00844a>.

ZHANG, Xinwen; MENG, Xin; CHEN, Yiyin; LENG, Sean X.; ZHANG, Haiyan. The Biology of Aging and Cancer. *The Cancer Journal*, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 201-205, 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ppo.0000000000000270>.