

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP

ANGELINA MARIA FUZER

MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA AÇÃO
ANTIPROLIFERATIVA DO [10]-GINGEROL SOBRE CÉLULAS
DE TUMOR DE MAMA

São Carlos

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA EM INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP

ANGELINA MARIA FUZER

MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA AÇÃO
ANTIPROLIFERATIVA DO [10]-GINGEROL SOBRE CÉLULAS
DE TUMOR DE MAMA

Tese apresentada ao Programa
Interinstitucional de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas Associação Ampla
UFSCar/UNESP, para obtenção do título
de Doutora em Ciências Fisiológicas

Orientação: Profa. Dra. Márcia Regina
Cominetti

São Carlos

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F996m Fuzer, Angelina Maria
Mecanismos celulares envolvidos na ação
antiproliferativa do [10]-Gingerol sobre células de
tumor de mama / Angelina Maria Fuzer. -- São Carlos
: UFSCar, 2016.
109 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Câncer de mama. 2. Gengibre. 3. Cultura
celular. 4. Cultura celular tridimensional. 5.
Apoptose. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Angelina Maria Fuzer, realizada em 07/11/2016:

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar

Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso
USP

Prof. Dr. Andrei Leitão
IQSC/USP

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
UFSCar

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô, José Roberto Fuzer (in memoriam) que de onde estiver continua sentindo orgulho de nossas conquistas. Dedico também à minha avó, Julieta e meus pais Paulo e Mônica por todo carinho e dedicação que me permitiram chegar até aqui. E dedico, claro, ao meu companheiro de todas as horas, meu noivo Murilo, por seu apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela minha vida, por me dar sabedoria em todas as decisões e por sempre me acompanhar e iluminar.

Foram longos anos de dedicação a este trabalho durante os quais estive cercada de pessoas incríveis sem as quais não seria possível chegar até aqui.

Obrigada, em especial, à minha orientadora, Márcia Cominetti, pela oportunidade de realização deste trabalho. Agradeço por sua disponibilidade e abertura para discussão sempre que necessário, por todo apoio, compreensão e, sobretudo, por sua orientação humana. Obrigada por sua confiança e por acreditar no meu potencial muitas vezes mais do que eu mesma, sempre me incentivando a buscar novos desafios.

Realmente não poderia deixar de agradecer a todos os membros do LABEN por toda a colaboração e ajuda neste trabalho, mas também pela convivência que tornou a rotina no laboratório mais prazerosa, leve e alegre. Muito obrigada pela companhia nos inúmeros almoços (fossem eles no RU, Colombo's ou Mamãe Natureza), caronas, idas noturnas ao laboratório, pelos conselhos, conversas bem-humoradas, pelas receitas trocadas (e feitas!), pelos *happy hours* e aos (agora) tradicionais almoços de aniversário, idas a congressos e tudo mais! Meu obrigada especial à Amanda que me recebeu tão bem quando o laboratório ainda era pequeno, me ensinou tudo o que sabia sobre cultura celular e acabou se tornando uma grande amiga, assim como à Cecília. Também um agradecimento especial à Patrícia e à Carol, que, como alunas mais experientes, me ajudaram muito, principalmente no início. Obrigada aos membros atuais: Angélica, Ana, Carla, Izabela, Lia, Liany, Marina e Rebecka; e também aos que passaram pelo laboratório durante o meu doutorado: Damiana, Daniela, Francine, Gabriela, Lucas, Jéssica, Júlio, Juliana, Marcela e Mariana. Meu muito obrigada a todos.

Agradeço também à Mina Bissel, pela grande oportunidade concedida, aceitando meu estágio no exterior em seu laboratório em Berkeley, Califórnia. Esta experiência foi muito enriquecedora e de enorme valia para minha formação científica. Agradeço a honra de ter trabalhado com uma pesquisadora tão brilhante, generosa e apaixonada pela Ciência.

Também não poderia me esquecer de agradecer à equipe do Bissel Lab que me recepcionou e acolheu tão bem. Agradeço à Young, quem me orientou durante este período, sempre com muita simpatia, calma e paciência. Agradeço também a Joni e Irene, coordenadoras do laboratório, que me ajudaram desde toda a parte burocrática da preparação até o desenvolvimento do meu projeto, sempre muito compreensivas e bem-humoradas. Meu muito obrigada a toda equipe: Claire, Curt e Kate que me receberam; Amir, Liz, Jenny e Seema pela companhia e também Rosalyn, Rick, Jamie, Alvin, Saori, Hidetoshi, Sarah, Alex e Candace.

Em todos esses anos contei com o apoio e financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, a qual não poderia deixar de agradecer pela bolsa na modalidade doutorado direto (Proc. n° 2012/18908-6) e BEPE (Proc. n° 2015/08146-0).

Muito obrigada a todos que me acompanharam, em especial minha família, aos meus pais Paulo e Mônica, sem os quais eu não estaria aqui, ao meu irmão José Roberto e a minha avó Julieta. Agradeço também a todos os meus amigos, principalmente à Paulinha e ao Heitor, mesmo que distantes sempre presentes.

Especialmente, agradeço ao meu noivo Murilo, companheiro de todas as horas, por todo amor, carinho, apoio, compreensão, dedicação e incentivo. Obrigada por todas as inúmeras consultorias em química e informática, por rir junto comigo e sempre ter um ombro disponível quando eu precisei.

Repito que este trabalho não seria possível sem a participação e apoio de todos vocês!

Muito obrigada!

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less"

Marie Curie

Agradecimento à FAPESP

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, processos nº 2012/18908-6 e nº 2015/08146-0.

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

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, estando à frente de doenças como o diabetes e a tuberculose, de condições como a desnutrição e até mesmo da violência interpessoal. Diversos tipos de câncer estão ainda relacionados aos principais fatores de risco associados à mortalidade e morbidade no mundo, tais como a obesidade, o consumo excessivo de álcool e o tabagismo. Em 2012 foram 14,1 milhões de casos novos de câncer com 8,2 milhões de mortes no mundo. O rizoma do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é utilizado no mundo todo como especiaria culinária e como erva medicinal em diversas preparações. Existem muitas pesquisas descrevendo suas propriedades antieméticas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais. Os compostos farmacologicamente ativos do gengibre são os compostos fenólicos pungentes [6]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol, os principais componentes do seu extrato bruto. Tais compostos são os responsáveis pela bioatividade do gengibre e por seus efeitos sobre células tumorais, demonstrados em diversos modelos de câncer, em estudos *in vivo* e *in vitro*. Muitas pesquisas revelam vantagens das técnicas de cultura tridimensional (3D) sobre as culturas tradicionais em monocamada. Culturas em 3D mimetizam melhor o microambiente tumoral encontrado *in vivo*, bem como a interação das células com a matriz extracelular (MEC). Em culturas 3D já foram observadas respostas diferentes das encontradas em culturas bidimensionais (2D), como a maior resistência de células tumorais a diversas drogas, além de sensibilidade seletiva aumentada para células tumorais em relação às células normais. Neste trabalho, técnicas de cultura tridimensional foram aplicadas em testes utilizando a molécula de [10]-gingerol em células tumorais de mama. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do [10]-gingerol em diferentes marcadores de malignidade, importantes no processo metastático, como adesão, proliferação, migração, invasão, bem como seus efeitos sobre a apoptose, tanto em cultura 2D, quanto 3D. Os resultados mostraram que o [10]-gingerol altera a morfologia de células tumorais da linhagem MDA-MB-231 em concentrações e tempos menores que a de células não tumorais de mama da linhagem MCF-10A, o que sugere uma ação seletiva do [10]-gingerol dependente de concentração e tempo de tratamento. O [10]-gingerol também inibiu a migração e a invasão das células da linhagem MDA-MB-231 em baixas concentrações e induziu apoptose em concentrações mais altas. Observamos que o [10]-gingerol apresentou, em ensaios de proliferação com células não tumorais da linhagem MCF-10A, um IC₅₀ maior comparado com as células tumorais. O composto também inibiu a migração das células não tumorais em concentrações maiores comparado às células tumorais. Além disso, o [10]-gingerol diminuiu a capacidade de adesão das células MDA-MB-231 a diferentes componentes da MEC, como laminina, fibronectina e vitronectina mesmo em baixas concentrações. Ainda, confirmamos sua capacidade de causar danos ao DNA e induzir apoptose. Ensaios de *western blotting* e qPCR sugerem que o [10]-gingerol atua pela via intrínseca da apoptose, aumentando a razão Bax/Bcl-2 e ativando as caspases-9 e -3. Com relação aos ensaios em 3D, os resultados demonstraram que o composto [10]-gingerol age seletivamente sobre células tumorais, sendo capaz de reverter o fenótipo maligno e induzir apoptose nas células da linhagem T4-2. Estes resultados sugerem que o [10]-gingerol tem potencial para futuramente se tornar uma nova droga antitumoral.

Palavras-chave: Câncer de mama. Gengibre. Cultura celular. Cultura celular tridimensional. Apoptose.

ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death, according to World Health Organization, preceding diseases as diabetes and tuberculosis, conditions as malnutrition and even though interpersonal violence. Many types of cancer are also correlated to major risk factors associated to mortality and morbidity, such as obesity, alcohol abuse and smoking. In 2012 14.1 millions of new cases of cancer arisen with 8.2 million of deaths worldwide. Ginger rhizome (*Zingiber officinale* Roscoe) is word know use as spice on cooking and widely use as medicinal herb in preparations. Several studies describe its anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant and anti-emetic activities. Much of the ginger bioactivity is due to its phenolic compounds [6], [8], and [10]-gingerol, which have anti-proliferative and antiangiogenic action on tumor cells, as demonstrated by several *in vivo* and *in vitro* studies. Several studies have revealed advantages of three-dimensional culture techniques (3D) over traditional two-dimensional monolayer cultures (2D). 3D cultures better mimic the tumor microenvironment found *in vivo*, as well as the interaction of cells with the extracellular matrix (ECM). Three-dimensional culture has produced different responses compared to those found in 2D cultures, such as increased resistance of tumor cells to various drugs, and increased selective sensitivity to tumor cells in relation to normal cells. On this work, techniques for three-dimensional culture were used to test the effects of [10]-gingerol on breast tumor cells. The aim of this study was to evaluate the effects of [10]-gingerol in different hallmarks of malignancy correlated with metastatic process, such as adhesion, proliferation, migration, invasion and also its effects on apoptosis, both in 2D and 3D. Results demonstrated that [10]-gingerol changes the morphology of MDA-MB-231 malignant cells in lower concentrations and shorter times when compared to nonmalignant MCF-10A cells, suggesting an specific and concentration-dependent action for [10]-gingerol on malignant cells. [10]-gingerol was also able to inhibit migration and invasion of MDA-MB-231 cells at low concentrations and to induce apoptosis at higher concentrations. We observed that [10]-gingerol presented higher IC₅₀ in proliferation assays with MCF-10A non tumor cells compared to tumor cells. The compound also inhibited migration of non-tumor cell lines at higher concentrations compared to tumor cells. Moreover, [10]-gingerol inhibited MDA-MB-231 cell adhesion to different ECM components, such as laminin, fibronectin and vitronectin, even at low concentrations. Western blotting and real time quantitative PCR assays suggested that [10]-gingerol was able to act by the intrinsic pathway of apoptosis, increasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9 and caspase-3 mRNA and protein levels in MDA-MB-231 cells. On 3D assays the results showed selectivity of [10]-gingerol against the malignant T4-2 lineage. The compound was also able to revert the malignant phenotype and to induce apoptosis in this cell line. These results suggest that [10]-gingerol has potential to be a new anticancer drug in the future.

Keywords: Breast cancer. Ginger. Cell culture. Three dimensional cell culture. Apoptosis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Desenho esquemático das etapas da progressão tumoral.	25
FIGURA 2: Desenho esquemático das etapas da formação de metástase.).	26
FIGURA 3: Aspectos do Câncer. Principais habilidades celulares adquiridas durante a formação e desenvolvimento de tumores..	27
FIGURA 4: Representação esquemática de células da série de progressão tumoral HMT-3522 em cultura 3D IrECM.	38
FIGURA 5: Visualização das quatro classes para a classificação de cometas.....	49
FIGURA 6: Efeito de diferentes concentrações de [10]-gingerol em células de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231.	59
FIGURA 7: Efeito de diferentes concentrações de [10]-gingerol em células MCF-10A..	60
FIGURA 8: Efeito do [10]-gingerol sobre a viabilidade de células MCF-10A..	61
FIGURA 9: Efeito de diferentes concentrações de [10]-gingerol sobre a formação de colônias em células tumorais da linhagem MDA-MB-231.	62
FIGURA 10: Efeito das diferentes concentrações de [10]-gingerol sobre a migração <i>transwell</i> em células MDA-MB-231 e MCF-10A.....	64
FIGURA 11: (A) Efeito do [10]-gingerol sobre a migração de células da linhagem MDA-MB-231 em ensaio de <i>wound healing</i>	65
FIGURA 12: Efeito das diferentes concentrações de [10]-gingerol sobre a transmigração endotelial em células MDA-MB-231.	67
FIGURA 13: Efeito de diferentes concentrações de [10]-gingerol sobre a capacidade de invasão em células tumorais da linhagem MDA-MB-231.	68
FIGURA 14: Efeito do [10]-gingerol sobre a Pro-MMP-9 em gel de zimografia..	70
FIGURA 15: Efeito do [10]-gingerol sobre a fragmentação nuclear em MDA-MB-231	71
FIGURA 16: <i>Score</i> médio de cometas observados em células MDA-MB-231.....	73

FIGURA 17: Fragmentação do DNA de células MDA-MB-231 por ação do [10]-gingerol..	74
FIGURA 18: Ensaio de TUNEL em células MDA-MB-231.	75
FIGURA 19: Efeito do [10]-gingerol sobre a apoptose MDA-MB-231 ou MCF-10A.	77
FIGURA 20: Efeito do [10]-gingerol sobre a apoptose em MCF-10A e MDA-MB-231.....	78
FIGURA 21: Efeitos do [10]-gingerol na expressão de genes pró e anti-apoptóticos	79
FIGURA 22: (A) Efeitos do [10]-gingerol nos níveis proteicos de caspases em células MDA-MB-231.....	81
FIGURA 23: Efeitos do [10]-gingerol sobre a adesão de células MDA-MB-231 a proteínas da MEC	83
FIGURA 24: Efeitos do [10]-gingerol em células não malignas S1.....	86
FIGURA 25: Efeitos do [10]-gingerol em células malignas T4-2	87
FIGURA 26: Efeitos do [10]-gingerol em células malignas MDA-MB-231.....	88
FIGURA 27: Imunocitoquímica das células não-malignas S1..	90
FIGURA 28: Imunocitoquímica das células malignas T4-2.....	91
FIGURA 29: Imunocitoquímica das células MDA-MB-231.	92
FIGURA 30: Imunocitoquímica para caspase-3 clivada das células da série de progressão tumoral HMT-3522..	93
FIGURA 31: Imunocitoquímica para caspase-3 clivada das células MDA-MB-231.....	94
FIGURA 32: Razão caspase-3 clivada/DAPI mostrando a taxa de apoptose nas células S1, T4-2 e MDA-MB-231.	95
FIGURA 33: <i>Western blotting</i> mostrando os níveis moleculares de EGFR e integrina- β 1 em células S1 e T4-2 em cultura 3D.	97
FIGURA 34: Ensaio de viabilidade Calceina AM/DAPI em células S1.....	99
FIGURA 35: Ensaio de viabilidade Calceina AM/DAPI em células T4-2.....	100
FIGURA 36: Ensaio de viabilidade Calceina AM/DAPI em células MDA-MB-231.....	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Lista de oligonucleotídeos (*primers*) iniciadores utilizados para a reação de qPCR

.....53

TABELA 2: Frequência de células com DNA danificado observado pelo ensaio do cometa após 3 h de tratamento com diferentes concentrações de [10]-gingerol (média ± desvio padrão).

* $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,01$72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Akt – Proteína quinase B
BCA – Ácido bicinrônico (*BiCinchoninic Acid*)
BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)
cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar (*complimentary DeoxyriboNucleic Acid*)
CO₂ – Gás carbônico
Ct – Ciclo Limiar (*Cycle Threshold*)
DAB – Diaminobenzidina (*diaminobenzidine*)
DAPI – Dicloreto de diaminofenilindol (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride*)
DMEM - Meio Dulbecco modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
DMSO – Dimetil Sulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)
DNA – Ácido desoxirribonucleico (*DeoxyriboNucleic Acid*)
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
ER – Receptor de Estrógeno (*Estrogen Receptor*)
FBS – Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)
FITC – Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein IsoThiocyanate*)
HER2 – Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (*Human Epidermal Growth Factor 2 Receptor-2*)
HRP – Peroxidase de raiz forte (*Horseradish Peroxidase*)
HUVEC – Células endoteliais humanas da veia umbilical (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)
IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50% das células
IrECM – Matriz extracelular rica em laminina (*laminin rich Extracellular Matrix*)
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinases*)
MB – Membrana Basal
MEC – Matriz Extracelular
MMP – Metaloproteinases de Matriz (*Matrix Metalloproteinases*)
MTT – Brometo de dimetiazol-difeniltetrazólio (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*)
PBS – Tampão Salina-Fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
PCR – Reação em cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PI – Iodeto de propídio (*Propidium Iodide*)
PR – Receptor de Progesterona (*Progesteron Receptor*)
RNA – Ácido ribonucleico (*RiboNucleic Acid*)
RT-qPCR – Reação em cadeia da Polimerase quantitativa com transcriptase reversa (*Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*)
SERMs – Moduladores seletivos de receptores de estrógenos (*Selective Estrogen Receptor Modulators*)
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulphate*)
SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
TNBC – Câncer de mama triplo negativo (*Triple Negative Breast Cancer*)
TNF α – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)
TUNEL – Marcação terminal com deoxinucleotidil transferase (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 CÂNCER – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	24
1.2 PATOLOGIA DO CÂNCER.....	25
1.2 CÂNCER DE MAMA	28
1.3 DESAFIOS NA PESQUISA DE NOVAS DROGAS	29
1.4 O GENGIBRE E SEUS COMPOSTOS FENÓLICOS BIOATIVOS	31
1.5 ESTADO DA ARTE NA PESQUISA COM GINGEROIS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER	32
1.6 CULTURA TRIDIMENSIONAL <i>VERSUS</i> CULTURA EM MONOCAMADA	35
1.7 SÉRIE DE PROGRESSÃO TUMORAL HMT-3522.....	36
1.8 VIAS ENVOLVIDAS NA REVERSÃO DO FENÓTIPO MALIGNO	38
1.9 CULTURA TRIDIMENSIONAL NA PESQUISA DE DROGAS QUIMIOTERÁPICAS.....	39
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 MORFOLOGIA CELULAR	43
3.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR	43
3.3 FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.....	43
3.4 MIGRAÇÃO HAPTOTÁTICA	44
3.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO <i>WOUND HEALING</i>	45
3.6 TRANSMIGRAÇÃO ENDOTELIAL.....	45
3.7 INVASÃO	46
3.8 ZIMOGRÁFIA	47
3.9 ENSAIO DE FRAGMENTAÇÃO NUCLEAR COM DAPI	47

3.10	ENSAIO DO COMETA.....	48
3.11	ENSAIO DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA.....	49
3.12	ENSAIO DE TUNEL.....	50
3.13	ENSAIO DE APOPTOSE COM ANEXINA V POR CITOMETRIA DE FLUXO	51
3.14	PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA	51
3.15	<i>WESTERN BLOTTING</i>	53
3.16	ADESÃO CELULAR	54
3.20	ENSAIO DE VIABILIDADE COM CALCEINA-DAPI.....	57
3.21	EXTRAÇÃO PROTEICA	57
3.22	<i>WESTERN BLOTTING</i>	58
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1	MORFOLOGIA CELULAR.....	59
4.2	PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	60
4.3	FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.....	61
4.4	MIGRAÇÃO HAPTOTÁTICA	62
4.5	ENSAIO DE MIGRAÇÃO <i>WOUND HEALING</i>	64
4.6	TRANSMIGRAÇÃO ENDOTELIAL.....	66
4.6	INVASÃO	67
4.7	ZIMOGRAFIA	69
4.8	ENSAIO DE FRAGMENTAÇÃO NUCLEAR COM DAPI	70
4.9	ENSAIO DO COMETA.....	72
4.11	ENSAIO DE TUNEL.....	75
4.12	ENSAIO DE APOPTOSE COM ANEXINA V POR CITOMETRIA DE FLUXO	76
4.13	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	78
4.14	<i>WESTERN BLOTTING</i>	80
4.15	ADESÃO CELULAR.....	81
4.16	MORFOLOGIA EM CULTURA TRIDIMENSIONAL	84
4.17	IMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA	89

4.18	<i>WESTERN BLOTTING</i>	95
4.19	ENSAIO DE VIABILIDADE CALCEINA-DAPI APÓS A FORMAÇÃO DAS ESTRUTURAS.....	97
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS/ CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer – dados epidemiológicos

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2014), estando à frente de doenças como o diabetes e a tuberculose, de condições como a desnutrição e até mesmo da violência interpessoal. Diversos tipos de câncer estão ainda relacionados aos principais fatores de risco associados à mortalidade e morbidade no mundo, tais como a obesidade, o consumo excessivo de álcool e o tabagismo. Em 2012 foram 14,1 milhões de casos novos de câncer com 8,2 milhões de mortes no mundo, segundo dados da Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, vinculada à OMS. A previsão para os próximos 15 anos, com o aumento da expectativa de vida nos países em desenvolvimento, é de uma maior incidência e mortalidade por câncer chegando a 21,4 milhões de casos e 13,2 milhões de mortes em 2030.

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para os anos de 2016 e 2017, são previstos 600 mil casos novos de câncer no Brasil, sendo 420 mil casos de câncer não melanoma e dentre esses 58 mil novos casos de câncer de mama, o mais incidente entre as mulheres. A previsão é de que até 2030 surjam 21,4 milhões de novos casos de câncer no mundo e 13,4 milhões de mortes decorrentes dele, devido ao crescimento e ao envelhecimento da população, bem como à diminuição da mortalidade infantil e por doenças infecciosas nos países em desenvolvimento. Dentre as mulheres a previsão é de 57 mil novos casos de câncer de mama, que é o mais incidente entre elas. No total isto significa cerca de 35% mais casos do que o estimado para biênio 2012-2013 e 4% a mais que o estimado para o biênio 2014-2015 (Brasil, 2015).

1.2 Patologia do câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças com uma característica em comum: o crescimento desordenado de células aberrantes, que em algum momento sofreram transformação de células normais para malignas. Após o aparecimento de mutações em uma célula, há inicialmente a formação de uma hiperplasia (FIGURA 1: Desenho esquemático das etapas da progressão tumoral.), ou seja, um aumento no número de células com mutações que promovem proliferação e desregulam o processo mitótico. Com o acúmulo de mutações ao longo de mitoses aberrantes, pode ocorrer a formação de uma displasia, com o aparecimento de células transformadas, indiferenciadas, com características distintas das células típicas daquele tecido. Esta transformação, através do acúmulo de mutações, leva a uma expansão clonal desordenada, pois estas células são capazes de ignorar sinais de supressão de crescimento e de morte celular, se replicando de maneira ilimitada (Pedraza-Fariña, 2006).

FIGURA 1: Desenho esquemático das etapas da progressão tumoral.

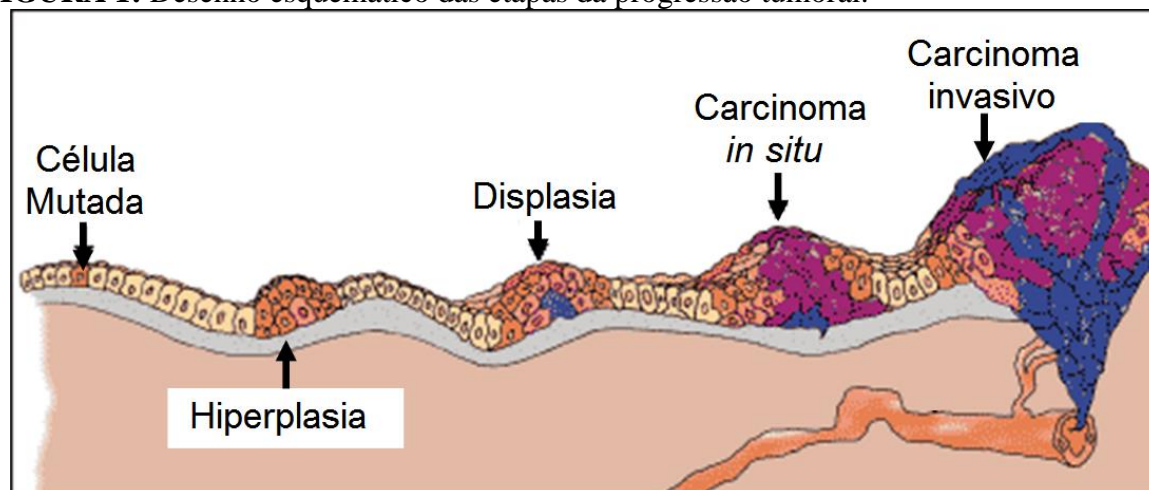


Figura adaptada de: http://www.ndhealthfacts.org/wiki/Oncology_%28cancer%29

Além das mutações acumuladas, mudanças genéticas ou epigenéticas capazes de ativar oncogenes, inativar genes supressores tumorais ou ainda diminuir de algum modo expressão dos mesmos podem levar a este crescimento desordenado, culminando na formação da chamada

neoplasia (no caso de células epiteliais chamado carcinoma *in situ*). Nestas condições, inúmeras vias de sinalização estão alteradas, tais como as ligadas à proliferação, ao ciclo celular, à migração celular, à angiogênese e àquelas que envolvem fatores de crescimento. Deste modo, durante o processo de progressão tumoral as células malignas são capazes de promover a formação de novos vasos sanguíneos, de migrar e invadir tecidos adjacentes através da membrana basal e vasos sanguíneos ou linfáticos (carcinoma invasivo). As células malignas também podem assim atingir locais distantes do tumor primário através da circulação e se reestabelecer, originando tumores secundários ou metástases (FIGURA 2) (Pedraza-Fariña, 2006).

FIGURA 2: Desenho esquemático das etapas da formação de metástase.

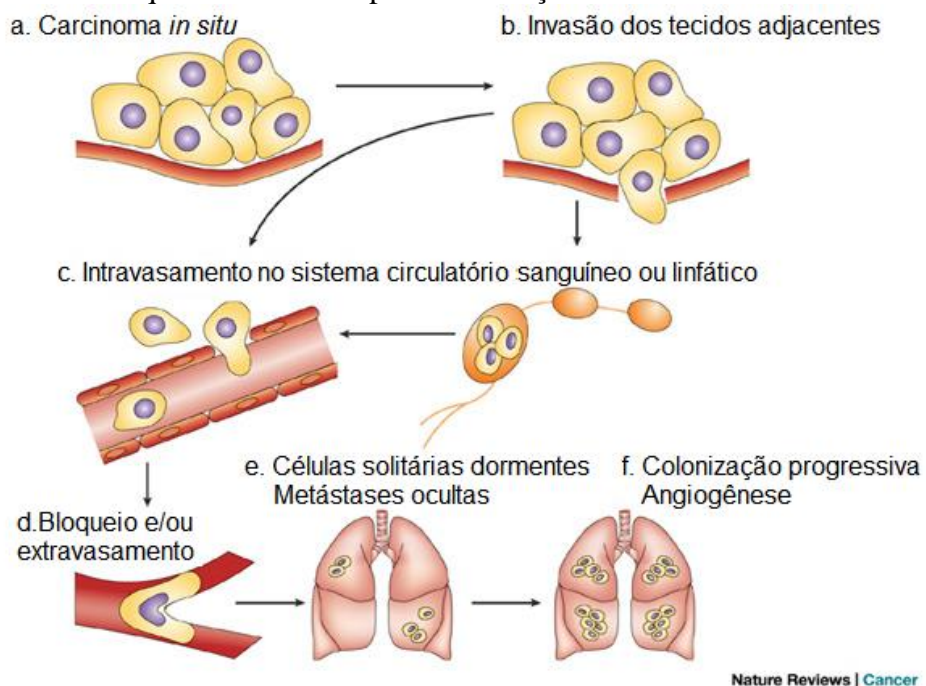


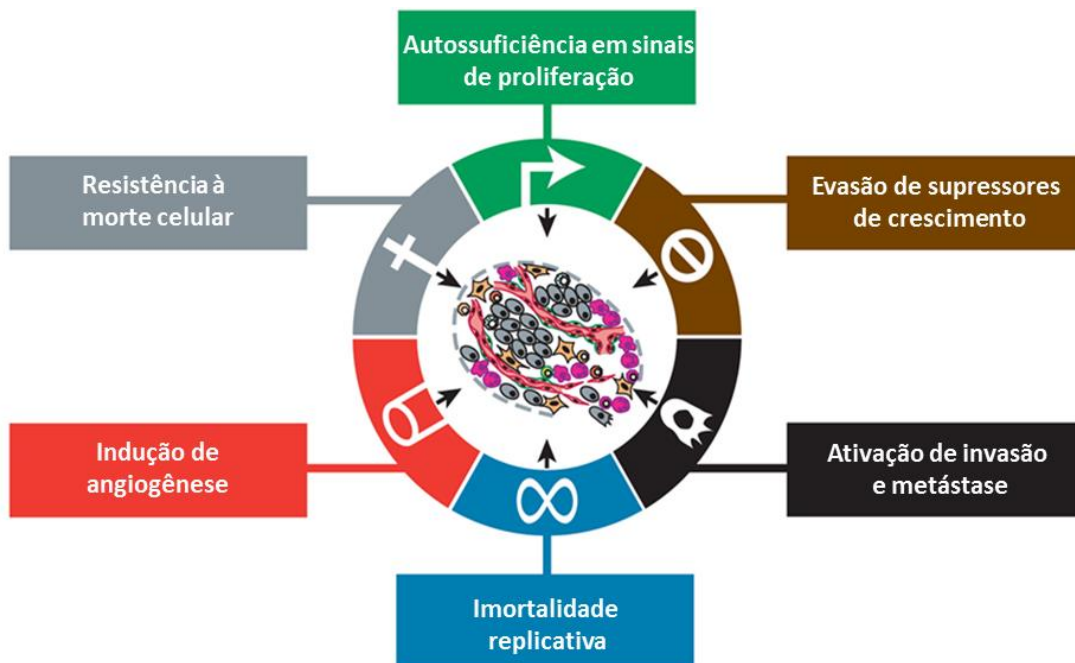
Figura adaptada de: Steeg, “*Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells*” Nature Reviews Cancer 3, 55-63 (2003).

Durante o processo metastático, as interações com o microambiente estromal que circunda as células tumorais, incluindo células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e matriz extracelular (MEC), contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos. Essas

interações facilitam a invasão dos tecidos adjacentes, o intravasamento através dos novos vasos formados e a disseminação por outros tecidos. Com a sobrevivência das células tumorais na circulação e posterior invasão de novos tecidos, estas poderão se tornar dormentes ou colonizar os novos locais com o auxílio do estabelecimento de um nicho pré-metastático (Quail e Joyce, 2013; Sceneay *et al.*, 2013).

Em suma, os principais aspectos do câncer são: a autossuficiência na produção de sinais proliferativos, a evasão de supressores de crescimento, a resistência a sinais de morte, a imortalidade replicativa, a indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase. Estes aspectos, são, portanto, os principais mecanismos-alvo para a pesquisa de novas drogas antitumorais (Hanahan e Weinberg, 2000; 2011).

FIGURA 3: Aspectos do Câncer.



Principais habilidades celulares adquiridas durante a formação e desenvolvimento de tumores. Adaptado de: Hanahan e Weinberg, “*Hallmarks of cancer: the next generation*” *Cell*, 144, 5, 646-74(2011).

1.2 Câncer de mama

A glândula mamária humana é formada principalmente por tecido glandular e tecido adiposo. As unidades glandulares exócrinas, que produzem leite sob determinados estímulos, são chamadas ácinos mamários e formados por células em arranjos tipicamente glandulares contendo células epiteliais arranjadas em formato arredondado com um lúmen central, circundadas por células mioepiteliais, membrana basal e estroma. Os ácinos se arranjam em estruturas maiores chamadas lóbulos, sendo que cada ácino termina em estruturas tubulares, que se juntam e são denominadas ductos mamários ou ductos galactóforos, os quais terminam no mamilo, circundado pela aréola (Vorherr, 1974).

Câncer de mama é o nome dado às neoplasias derivadas de células originárias da mama, sendo as mais comuns classificadas como carcinomas, por sua origem epitelial. Dois tipos de carcinomas podem se desenvolver no tecido mamário: o carcinoma ductal, o tipo mais comum, originado nos ductos mamários e o carcinoma luminal, que se origina nos ácinos mamários. Ambos os tipos podem ser classificados como *in situ* ou invasivo, dependendo do estágio no qual se encontram, se delimitado ou invadindo tecidos adjacentes. O tipo invasivo pode progredir para a formação de metástases (Pourteimoor *et al.*, 2016).

Além dessa classificação por origem, também é possível classificar os cânceres de mama de acordo com a presença ou ausência de receptores hormonais. Alguns tumores de mama têm o seu crescimento estimulado por determinados hormônios como estrógeno e progesterona, bem como fator de crescimento epidermal humano, o que os tornam sensíveis às terapias hormonais, cujos alvos são os receptores desses hormônios, capazes de parar ou reduzir o crescimento desses tumores. Algumas drogas tais como o tamoxifeno, o qual é utilizado há mais de 30 anos no tratamento de câncer de mama, o raloxifeno e o toremifeno, conhecidas como moduladores seletivos de receptores de estrógenos (SERMs) são utilizados quando há a

presença destes receptores de estrógeno. Os tumores que possuem estes receptores (ER) são chamados ER-positivos, ou estrógeno-sensíveis, e correspondem a cerca de 70% do total de cânceres de mama. Os tumores que contêm receptores de progesterona (PR) são chamados PR-positivos. Boa parte dos tumores ER-positivos também são PR-positivos. E, finalmente, os tumores que possuem alta expressão de receptores para fator de crescimento epidermal humano tipo 2 são chamados HER2-positivos. Uma terapia utilizada contra tumores HER2-positivos é a com o anticorpo monoclonal trastuzumabe ou herceptina, capaz de bloquear estes receptores inibindo o crescimento. Outro receptor importante é o receptor para fator de crescimento epidermal humano tipo 1, EGFR, que também está relacionado a um crescimento acelerado quando hiperexpresso, porém ainda não há nenhuma terapia que o utilize como alvo atualmente (Engebraaten *et al.*, 2013; O'leary *et al.*, 2016; Refae *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2016)

Contudo, 15% dos cânceres de mama não possuem receptores hormonais. Estes tumores não respondem aos tratamentos comumente utilizados em pacientes com cânceres que possuem receptores hormonais, pela falta dos alvos moleculares aos quais estas terapias se destinam. Este tipo de tumor, conhecido como câncer de mama triplo negativo (TNBC, na sigla em inglês), formam um grupo bastante heterogêneo, de natureza agressiva, com maiores taxas de recaída e com menor sobrevida quando comparados com os outros tipos de câncer de mama (Criscitiello *et al.*, 2012; Engebraaten *et al.*, 2013).

1.3 Desafios na pesquisa de novas drogas

A pesquisa para encontrar novas drogas antitumorais é um campo repleto de desafios. Os agentes quimioterápicos ideais devem agir seletivamente para matar ou inibir o crescimento das células neoplásicas, deixando as células normais intactas. Contudo, a maioria das drogas

usadas em quimioterapia atualmente provoca danos no DNA, tanto das células tumorais, como também das células normais, provocando a morte das células de rápida divisão e caracterizando os indesejáveis efeitos colaterais associados. Tais efeitos decorrem da alta toxicidade dos quimioterápicos atuais, o que afeta especialmente células normais com alta taxa de divisão, como as da linhagem hematopoiética, da medula óssea e ainda células do bulbo capilar e da mucosa do sistema digestório. Além disso, as técnicas quimioterápicas utilizadas atualmente não são capazes de erradicar todas as células neoplásicas do tumor, mas apenas destroem uma proporção das células que foram expostas ao tratamento, o que pode facilitar o aparecimento células resistentes. Outra característica das drogas quimioterápicas é que muitas agem somente em estágios específicos do ciclo celular da célula tumoral, fazendo com que, em outros estágios, as células não respondam ao tratamento. Estas peculiaridades impõem um grande desafio para a área de desenvolvimento de drogas antitumorais e, portanto, a triagem de compostos candidatos a novas drogas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, se torna uma tarefa extremamente complexa e desafiadora, porém indispensável (Chakraborty, 2007).

A Natureza é uma fonte importante de agentes que podem servir de base para o desenvolvimento de novos medicamentos. Especificamente, em relação ao desenvolvimento de novas drogas antitumorais, derivados de produtos naturais ou metabólitos bioativos de diferentes fontes, um grande esforço tem sido realizado por parte de diferentes laboratórios de centros de pesquisa mundiais. Cerca de 60% das drogas em fase de avaliação clínica para o tratamento de vários tipos de câncer são provenientes de produtos naturais ou seus derivados (Newman, 2007).

1.4 O gengibre e seus compostos fenólicos bioativos

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é o rizoma de uma planta da família Zingiberaceae, e é mundialmente conhecido. Originário do sudeste asiático, o gengibre é amplamente empregado como planta medicinal há milhares de anos, principalmente em sua região nativa. Diversos estudos descrevem suas propriedades (Haniadka *et al.*, 2012).

O rizoma do gengibre é utilizado no mundo todo como especiaria culinária e como erva medicinal em diversas preparações, sendo muito popular na medicina tradicional indiana, tailandesa e chinesa (Radhakrishnan *et al.*, 2014; Rattarom *et al.*, 2014). Existem muitas pesquisas descrevendo suas propriedades antieméticas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais (Wang *et al.*, 2012). Seu extrato é utilizado para o tratamento de náuseas e emese e possui muita eficácia especificamente contra esse tipo de efeito adverso causado por tratamento quimioterápico citotóxico contra o câncer (Ryan *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2014; Giacosa *et al.*, 2015; Ansari *et al.*, 2016; Bossi *et al.*, 2016). O extrato do gengibre também vem sendo estudado para a utilização no tratamento de doenças de origem inflamatória como a obesidade e o diabetes tipo 2 (Totsch *et al.*, 2015; Tzeng *et al.*, 2015).

Os compostos farmacologicamente ativos do gengibre são os compostos fenólicos pungentes [6]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol, paradois e shogaois, os principais componentes do seu extrato bruto. Tais compostos, principalmente os gingeróis, são os responsáveis pela bioatividade do gengibre e por seus efeitos antibacterianos (Kim *et al.*, 2015), anti-inflamatórios (Tzeng *et al.*, 2015), antieméticos (Jin *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), antiproliferativos, antiangiogênicos e antimetastáticos sobre células tumorais, demonstrada em diversos modelos câncer, em estudos *in vivo* e *in vitro* (Poltronieri *et al.*, 2014).

1.5 Estado da arte na pesquisa com gingeróis para o tratamento do câncer

Em uma consulta à base de dados ISI Web of KnowledgeSM realizada em outubro de 2016 procurando pelo termo “câncer de mama” em tópicos, foram encontrados 87.807 novos artigos publicados durante os anos de 2014 e 2016. Restringindo a busca, ao acrescentar o termo “produto natural”, esse número se reduz para 593 publicações. Refinando ainda mais a busca, utilizando o termo “gingerol” apenas um artigo foi publicado neste período. Ampliando o tema para “câncer”, sem especificar o tipo, e “gingerol” encontramos 10 artigos publicados no período, sendo apenas um sobre [10]-gingerol e os demais sobre o [6]-gingerol ou extrato bruto de gengibre.

Numa busca utilizando o termo geral “câncer” e “gingerol” na base de dados NLM-PubMed em outubro de 2016, encontram-se apenas 10 artigos recentes. Ao buscar pelo termo “[10]-gingerol” e “câncer” encontramos apenas dois artigos, sendo um deles sobre câncer de mama, e um sobre o efeito apoptótico do [10]-gingerol em células de carcinoma de cólon. Ao refinar a busca para “câncer de mama”, encontramos apenas um artigo publicado. Podemos notar assim, que o número de trabalhos nesta área ainda é muito reduzido, principalmente quando se trata da fração do gengibre [10]-gingerol. Este pequeno número de trabalhos pode estar relacionado à dificuldade de isolamento do [10]-gingerol, que está presente em pouca quantidade no extrato bruto de gengibre. Para elucidar o que existe até o momento na literatura sobre gingeróis e câncer, uma revisão foi realizada e os principais trabalhos estão listados a seguir, resumidamente.

Jin *et al.* (2014) observaram que o efeito antiemético do [6]-gingerol se dá através do bloqueio de receptores serotoninérgicos de neurônios presentes no trato gastrointestinal. Este efeito antiemético é mais significativo na emese provocada por drogas quimioterápicas. Tal efeito é bastante desejável e um estímulo para a pesquisa de novos fármacos antitumorais

derivados do gengibre, pois demonstra que estes possuem potencial para produzir menos efeitos adversos que os tratamentos atuais.

Grande parte da bioatividade do gengibre se deve a presença dos compostos fenólicos [4]-, [6]-, [8]- e [10]-gingerois, paradol e shogaol, os quais – principalmente os gingeróis – possuem ação antiproliferativa e antiangiogênica sobre células tumorais, demonstrado em diversos modelos de câncer, em estudos *in vivo* e *in vitro* (Liu *et al.*, 2012).

Chakraborty *et al.* (2012) demonstraram que o [6]-gingerol é capaz de induzir apoptose e autofagia em células HeLa através da ativação de caspase-3 pela via intrínseca, além de apresentar alta afinidade de ligação com o DNA. Outros estudos confirmaram capacidade do [6]-gingerol de induzir apoptose, também pela via lisossomal-mitochondrial, em outras linhagens, como nas células HepG2 de hepatoma humano, através da liberação de citocromo C para o citosol associada a estresse oxidativo (Yang *et al.*, 2012). Em outro trabalho, células de câncer colorretal da linhagem LoVo tiveram seu crescimento inibido por ação do [6]-gingerol, por bloqueio das fases G2 e M do ciclo celular, por aumento nos níveis de p27, p21, além do aumento de espécies reativas de oxigênio e p53 fosforilada (Lin *et al.*, 2012). Liu *et al.* (2012), utilizando o óleo essencial do gengibre obtido por destilação a vapor, observaram que o mesmo induzia apoptose em células de câncer endometrial das linhagens Ishikawa e ECC-1 pela ativação da p53. Neste mesmo estudo, o extrato mostrou-se mais eficaz em inibir a proliferação de tais células do que o [6]-gingerol isolado, o que pode significar que outros compostos presentes contribuem para a morte das células tumorais.

Estudos recentes também demonstram a permeabilidade e transporte dos gingeróis através da barreira epitelial gastrointestinal. No estudo de Mukkavilli *et al.* (2014), verificou-se que dentre [6]-, [8]- e [10]-gingerol e [6]-shogaol, o [10]-gingerol é o composto que possui maior permeabilidade à membrana de células Caco-2, cerca de 15 vezes maior que a dos demais.

O [10]-gingerol também foi o composto com maior acumulação intracelular. Estes estudos abrem caminhos para pesquisas sobre bioacumulação destes compostos em tumores e outros tecidos, um passo muito importante para o desenvolvimento de drogas antitumorais a partir destes compostos (Mukkavilli *et al.*, 2014).

Quanto à atividade antitumoral, estudos recentes demonstraram atividade apoptótica do [6]-gingerol contra células de leucemia mieloide primárias, obtidas de sangue periférico de pacientes. Foi observado que a apoptose era decorrente da produção de espécies reativas de oxigênio. Os pesquisadores encontraram expressão aumentada de miR-27b, observaram dano ao DNA e parada do ciclo celular (Rastogi *et al.*, 2014).

Outros estudos confirmaram a capacidade do [6]-gingerol de induzir apoptose por ativação de caspases -3, -9, -7 e -8 em células de carcinoma de cólon da linhagem SW-480, com ativação de MAPK. O efeito antiproliferativo do composto mostrou-se também seletivo para células tumorais em relação às células normais (Radhakrishnan *et al.*, 2014).

Rahman *et al.* (2014) também demonstraram atividade antiproliferativa do [6]-gingerol contra células de glioma das linhagens 321 n1, SW1783 e LN18. Foi observada a indução de apoptose por ativação de caspase-3 pelo [6]-gingerol, sendo este efeito potencializado quando foi feita associação sinérgica ao outro composto, galato de epigallocatequina. Fan *et al.* (2015) observaram a inibição da proliferação de células de osteossarcoma da linhagem 143B pelo [6]-gingerol, além da indução de apoptose, observando aumento nos níveis proteicos de caspase-3, caspase-8 e caspase-9, além de um aumento na razão de mRNA de Bax/Bcl-2 e ativação de AMPK.

Nosso grupo vem se dedicando ao estudo do composto [10]-gingerol, o qual se mostrou mais eficiente que [6]- e [8]- na inibição da proliferação de células de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231. O estudo também demonstrou que esta inibição é específica contra

estas células tumorais em relação a células não tumorais (Almada Da Silva *et al.*, 2012). Outro grupo demonstrou que o [10]-gingerol promove a indução de apoptose, verificada pela exposição de fosfatidilserina, aumento da razão Bax/Bcl-2 e ativação de caspases-3 e-9 e PARP em células de câncer de cólon da linhagem HCT116. Houve também a fosforilação de proteínas da família MAPK (Ryu e Chung, 2015). Estudos de Joo *et al.* (2016) demonstraram que a atividade antitumoral do [10]-gingerol em células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 são mediadas pela supressão de EGFR e inativação das atividades de Akt e MAPK.

1.6 Cultura tridimensional *versus* cultura em monocamada

O câncer de mama é uma doença complexa e multifatorial. O microambiente tumoral é um local heterogêneo com múltiplas interações entre as células tumorais e outros tipos de células não mutadas: células pertencentes ao sistema imune como macrófagos; células endoteliais e fibroblastos, bem como com a MEC e seus constituintes. Estas interações podem envolver sinais autócrinos, parácrinos e endócrinos. A MEC fornece sinais envolvidos na transcrição gênica, no crescimento, na diferenciação e sobrevivência ou morte celular, e se altera durante a progressão de tumores (Weaver *et al.*, 1996; Thoma *et al.*, 2014; Weigelt *et al.*, 2014).

Os métodos *in vitro* de triagem de compostos candidatos a novas drogas antitumorais em células cancerígenas humanas em cultivo representam uma metodologia simples, relativamente rápida, barata, reprodutível e fornecem importantes dados indicativos de atividade e interação com o alvo. Porém, as culturas em monocamada oferecem desvantagens quando comparadas à cultura tridimensional (3D), que mimetiza melhor o microambiente tumoral encontrado *in vivo*, ou mesmo o microambiente de uma mama normal, no que diz respeito à forma e função (Weigelt *et al.*, 2014).

Muitos estudos revelaram vantagens da cultura tridimensional sobre a tradicional em monocamada (2D). A cultura de células tridimensional não só mimetiza melhor o microambiente tumoral encontrado *in vivo* como também possibilita a importante interação das células com componentes da MEC. Em condições tridimensionais, células mamárias, sob estímulos específicos, respondem produzindo fatores teciduais específicos da mama, incluindo a síntese de proteínas do leite. Após inúmeros estudos, utilizando células de mama malignas e não-malignas, foi demonstrado que o material que melhor simulava a membrana basal, o qual induzia mais diferenciação morfológica e funcional nestas células, era a matriz extracelular rica em laminina (MECrl ou sigla em inglês lrECM) (Correia e Bissell, 2012; Mroue e Bissell, 2013; Weigelt *et al.*, 2014).

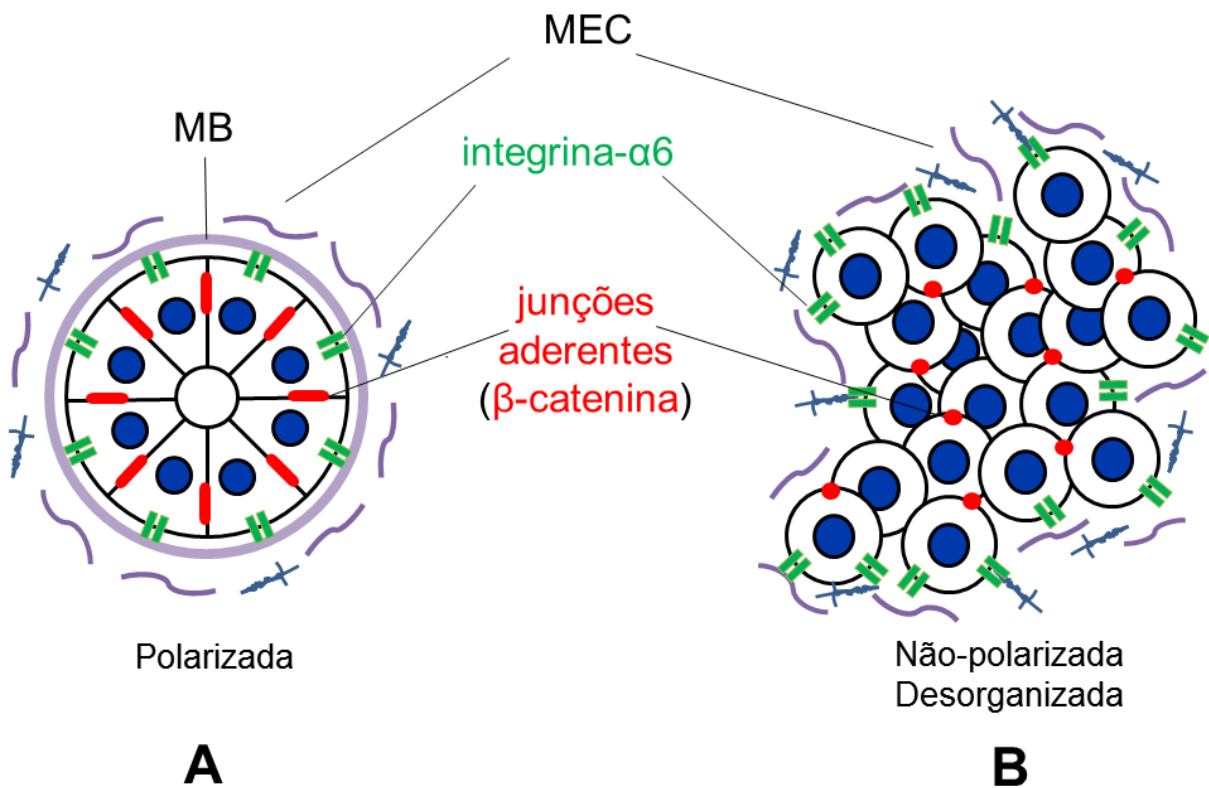
1.7 Série de progressão tumoral HMT-3522

Um das linhagens celulares utilizadas para a cultura 3D são as da série de progressão tumoral HMT-3522. Esta linhagem celular foi originalmente isolada de um nódulo fibrocístico mamário benigno, coletado a partir de tecido proveniente de uma mamoplastia redutora. Estas células se tornaram imortalizadas espontaneamente em cultura, dando origem à linhagem não maligna S1, a qual é dependente de EGF para seu crescimento. Depois de contínuas passagens sem EGF uma nova linhagem surgiu. Essa linhagem produziu tumores raros quando injetada em camundongos imunossuprimidos (*nude*). As células tumorais foram isoladas em cultura e injetadas novamente em camundongos, originando a linhagem maligna T4-2, uma linhagem triplo-negativa com fenótipo bastante invasivo (Schmeichel *et al.*, 1998; Rizki *et al.*, 2008; Vidi *et al.*, 2013).

Células da linhagem S1 crescem em cultura 3D lrECM formando estruturas organoides de crescimento limitado, similares aos ácinos da glândula mamária. A estrutura basoapical

polarizada nestes ácinos é garantida por hemidesmossomos, junções celulares com a membrana basal, no lado basal e junções célula-célula na porção apical. As junções basais contêm majoritariamente integrinas $\alpha 6/\beta 4$ ligadas à laminina-332 presente na membrana basal, secretada basalmente pelas células S1. As integrinas são proteínas de adesão presentes na membrana plasmática que se ligam a diferentes proteínas da MEC, de acordo com seu arranjo de subunidades, constituindo os hemidesmossomos e funcionando como receptores de adesão em diferentes vias celulares, como as envolvidas na proliferação e sobrevivência. Interações entre as células e a MEC são mediadas por integrinas. As junções célula-célula são caracterizadas por β -catenina e E-caderina em junções aderentes localizadas lateralmente e por ZO-1 e ZO-2 em *tight-junctions* lateroapicais. Um pequeno lúmen, de tamanho menor que o de uma célula, está geralmente presente. O complexo juncional é essencial para a organização do citoesqueleto, assegurando o funcionamento de vias de sinalização e funções nucleares (Weaver *et al.*, 2002; Vidi *et al.*, 2013). Células malignas T4-2 não apresentam polarização basoapical. Quando em cultura 3D IrECM, estas células formam massas multicelulares desorganizadas, similares a tumores, com proliferação ininterrupta. Este crescimento contínuo se deve a hiperexpressão de EGFR. As interações com a MEC são mediadas por integrinas $\beta 1$, altamente expressas nestas células, que se ligam à laminina-111 da matriz extracelular, essa interação é necessária para a sobrevivência das células malignas. Contudo, é possível reverter o fenótipo maligno interferindo em algumas vias de sinalização, como por exemplo, bloqueando a integrina $\beta 1$ ou inibindo EGFR ou MAPK, restabelecendo a polaridade basoapical e obtendo estruturas acinares similares às células não-malignas. (Wang *et al.*, 1998; Weaver *et al.*, 2002; Vidi *et al.*, 2013).

FIGURA 4: Representação esquemática de células da série de progressão tumoral HMT-3522 em cultura 3D IrECM.



Em verde integrina- $\alpha 6$. Em vermelho junções com β -catenina (A) Células não malignas S1 formam organóides de crescimento limitado (B) Células T4-2 formam massas desorganizadas similares a tumores. Adaptado de Vidi, “*Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why*”. *Methods Mol Biol*, 945, 193-219 (2013)

1.8 Vias envolvidas na reversão do fenótipo maligno

Os receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR) e receptores de adesão integrinas $\beta 1$ estão superexpressos em células malignas, levando a um crescimento ininterrupto (Weaver e Bissell, 1999b). Em sistemas 3D, ou *in vivo*, há um *crosstalk* entre essas duas vias de sinalização, o que não é observado em culturas em monocamada. Uma atenuação da ativação induzida por MAPK/EGF causa paralisação do crescimento celular (Wang *et al.*, 1998). A inibição da ativação de MAPK ou também a inibição de EGFR ou da integrina $\beta 1$ mediada por

anticorpos induz uma diminuição na expressão de ambos os receptores (Wang *et al.*, 1998; Weaver e Bissell, 1999b).

Já foi demonstrado que, através do bloqueio de integrinas $\beta 1$ utilizando anticorpos específicos, como o anticorpo AIIB2, é possível reverter o fenótipo maligno em células T4-2 da série de progressão tumoral HMT-3522, bem como em células das linhagens MCF-7 e Hs58T (Wang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002). Mostrou-se também que a polarização celular garantida pela integrina $\beta 4$ em cultura tridimensional estava relacionada à resistência à apoptose tanto em células de mama não malignas quanto em células malignas cujo fenótipo fora revertido. Esta conversão foi também observada quando a polarização de células normais foi destruída utilizando anticorpos bloqueadores anti-E-caderina (Weaver e Bissell, 1999a; Weaver *et al.*, 2002). Deste modo foi possível relacionar a organização e adesão celular à MEC com a resistência a drogas (Correia e Bissell, 2012)

1.9 Cultura tridimensional na pesquisa de drogas quimioterápicas

Pesquisas utilizando drogas quimioterápicas também encontraram diferenças da cultura tridimensional sobre a tradicional em monocamada. Células em cultura tridimensional demonstram maior resistência a tratamentos com drogas que as células em cultura tradicional em monocamada. Em estudos com tamoxifeno, contra células de câncer de mama da linhagem MCF-7, foram necessárias concentrações mais altas da droga para ter efeito citotóxico em cultura 3D que em cultura 2D, resultando em um IC_{50} mais elevado para as células em cultura tridimensional quando comparadas à cultura em 2D. (Dhiman *et al.*, 2005). De maneira similar, estudos com cetuximab em células de câncer colorretal das linhagens HT29 e HCT116, também demonstraram um efeito antiproliferativo muito menor (40%) em células HT29 em cultura tridimensional quando comparado com o efeito da droga em cultura convencional (60%)

(Magdeldin *et al.*, 2014). Contudo, outro grupo de pesquisa, utilizando *high-throughput screening* (HTS) para testes de citotoxicidade com 95 diferentes fármacos, observou sensibilidade seletiva a drogas aumentada em células tumorais (BT-474) em cultura 3D frente a células normais (MCF-10A) nas mesmas condições, diferente do observado em culturas em monocamada (Howes *et al.*, 2014). Esses estudos demonstram que sistemas de cultura tridimensionais, portanto, são mais eficientes do que a cultura em monocamada para estudos pré-clínicos de respostas a drogas. Em conjunto estes resultados demonstram que as culturas 3D podem ser muito promissoras em preencher o vazio existente entre as técnicas *in vitro* e *in vivo*, já que estudos *in vivo*, apesar de excelentes modelos para avaliar os efeitos de novas drogas antitumorais em potencial, envolvem custos elevados, manejo complexo, questões éticas e um baixo rendimento quando comparado a estudos *in vitro* (Charoen *et al.*, 2014; Howes *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do [10]-gingerol em diferentes marcadores tumorais, os quais são etapas da cascata metastática, como adesão, proliferação, migração e invasão, bem como seus efeitos sobre a apoptose utilizando modelos *in vitro* em cultura celular 2D e 3D.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar o efeito antitumoral de um produto natural derivados do gengibre, o [10]-gingerol, sobre adesão, proliferação, migração, invasão e apoptose na linhagem de tumor de mama MDA- MB-231.
- ❖ Avaliar os efeitos citotóxicos e/ou apoptóticos do [10]-gingerol em células da linhagem de mama não tumoral MCF-10A e comparar com os efeitos na linhagem MDA-MB-231, para elucidar se há seletividade deste composto para células tumorais.
- ❖ Testar os efeitos [10]-gingerol sobre células da linhagem de progressão tumoral HMT-3522: S1 (não maligna) e T4-2 (maligna) em cultura celular tridimensional, observando se há alteração na organização das estruturas tridimensionais e se há ação seletiva sobre células malignas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As células de câncer de mama da linhagem MDA–MB–231 e as células de mama da linhagem MCF-10A foram obtidas no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) e cultivadas, respectivamente, em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) e em meio de cultura DMEM F12 suplementado com 5% de soro de cavalo, 20 ng/mL de EGF, 10 µg/mL de insulina, 0,5 µg/mL de hidrocortisona, e 1% de penicilina/estreptomicina. As células epiteliais HUVEC foram obtidas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) do departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar e cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS).

As linhagens celulares foram mantidas em um incubador úmido com 5% de CO₂ a 37 °C para serem utilizadas nos experimentos ou cultivadas em garrafas de cultura. As passagens celulares foram realizadas por tripsinização das células com 2 mL de solução de tripsina (0,1% em PBS) em estufa úmida com 5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37 °C durante 5 min, interrompendo a reação com a adição de 2 mL de meio de cultura. O sobrenadante foi removido por centrifugação a 1200 rpm por 5 min e as células homogeneizadas em meio de cultura, contadas em câmara de Neubauer e utilizadas em quantidade adequada para cada experimento.

Os experimentos em cultura 3D foram realizados utilizando matriz extracelular rica em laminina (lrECM): Matrigel® (BD Biosciences). As linhagens celulares da série de progressão tumoral HMT-3522 S1 (não maligna) e T4-2 (maligna) foram fornecidas pelo Bissell Lab (Berkeley, CA) e mantidas em incubadora úmida 37 °C e 5% CO₂ em meio de cultura DMEM-F12 (Thermo Scientific) sem soro fetal bovino (FBS) contendo 250 ng/ml de insulina (Thermo Scientific), 10 mg/ml de transferrina (Sigma-Aldrich), 2,6 ng/ml de selenito de sódio (Collaborative Research), 10 nM de β-estradiol (Sigma-Aldrich), 1,4 µM de

hidrocortisona (Collaborative Research), e 5 mg/ml de prolactina (Sigma) para as células T4-2 e, para células S1, o mesmo meio porém contendo 10 ng/ml de EGF (fator de crescimento epitelial) (Collaborative Research).

3.1 Morfologia Celular

As células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foram tripsinizadas e contadas. Posteriormente $0,6 \times 10^6$ células foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas por 24 h em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37 °C e em seguida tratadas (exceto os controles) com diferentes concentrações de [10]-gingerol (1-100 µM) por 24 e 48 h. Com o auxílio de um microscópio invertido acoplado a uma câmera foram obtidas imagens para analisar a morfologia celular.

3.2 Proliferação Celular

As células da linhagem MCF-10A foram semeadas (1×10^4 /placa) em placas de 96 poços em 200 µL de meio DMEM 10% FBS. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de [10]-gingerol (1, 10, 50 100, 500 e 1000 µM) por 24 h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e o veículo (DMSO) como controle negativo. Em seguida o meio foi removido e adicionada solução contendo 0,5 mg/mL de MTT. As placas foram incubadas por mais 4 h e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO. Em seguida foi realizada a leitura das placas em leitora de ELISA a 595 nm.

3.3 Formação de Colônias

As células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foram tripsinizadas e contadas. Em seguida 3×10^2 células foram semeadas em cada placa de Petri de 6 cm de diâmetro e

incubadas por 24 h em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37 °C e em seguida tratadas (exceto os controles) com diferentes concentrações de [10]-gingerol (1-100 µM) por 24 h. Passado este tempo, o meio das placas foi trocado por um novo meio sem a adição de nenhum composto. As placas foram incubadas por 10 dias em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37 °C . Após esta incubação, o meio foi removido e as células cuidadosamente lavadas com solução salina fosfato (PBS), fixadas com uma solução de metanol e ácido acético em proporção de 3:1 por 5 min e em seguida coradas com cristal violeta 0,5% em metanol por 15 min.

3.4 Migração Haptotática

Células da linhagem MDA-MB-231 (5x10⁴/poço) ou MCF-10A foram semeadas em meio livre de FBS e em diferentes concentrações de [10]-gingerol (1-100 µM) na câmara superior de insertos de migração (para placas de 24 poços), cuja parte inferior foi previamente coberta com uma camada de colágeno tipo I (5 µg/mL) *overnight* em câmara úmida a 4 °C, utilizado como quimioatraente. A placa foi mantida em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37 °C por 4 h. Em seguida, as células remanescentes na câmara superior foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. As células que foram capazes de migrar para o outro lado da membrana do inserto foram fixadas com metanol por 5 min e coradas com solução de 1% de azul de toluidina. As membranas de cada inserto foram removidas, preparadas em lâminas de microscopia e fotografadas com o auxílio de um microscópio óptico acoplado a uma câmera. Foram escolhidos 5 campos por membrana, compreendendo cerca de 80% da superfície de cada uma. As células em cada um dos campos foram contadas através do software Image J.

3.5 Ensaio de Migração *Wound Healing*

Células da linhagem MDA-MB-231 (1×10^5 /poço) foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37 °C até a cultura atingir 100% de confluência. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta e ponteira de 100 µL, além de uma régua esterilizada, foi feita uma risca vertical no centro de cada poço. Cuidadosamente, cada poço foi lavado com PBS para remover fragmentos celulares e células desaderidas da área riscada. Imediatamente as células foram tratadas com diferentes concentrações de [10]-gingerol (1-100 µM), exceto os controles que receberam meio fresco somente. Imagens foram capturadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 h com o auxílio de um microscópio invertido acoplado a uma câmera fotográfica em dois campos diferentes por poço, um acima e um abaixo da linha indicativa do meio de cada poço. A área de fechamento da risca pela migração celular foi medida através do software Image J e a porcentagem de fechamento calculada de acordo com a fórmula descrita abaixo (Yue *et al.*, 2010):

$$\% \text{ fechamento da risca} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{(A_{t=0h})} \times (100)$$

3.6 Transmigração endotelial

Células da linhagem MDA-MB-231 (5×10^4 /poço) coradas com Cell Trace Green (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, foram semeadas em meio livre de FBS, contendo 0,5% de BSA, em diferentes concentrações de [10]-gingerol (1, 10 e 100 µM) na câmara superior de insertos de migração (para placas de 24 poços), previamente recobertos por uma monocamada de células HUVEC (1×10^5) cultivadas por 48 h e tratadas por 4 h com 20 ng/mL de TNF-α. Meio DMEM suplementado com 10% de FBS foi adicionado à câmara

inferior para agir como quimioatraente da transmigração. A placa foi mantida em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37 °C por 8 h. Em seguida, as células remanescentes na câmara superior foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. As células que foram capazes de migrar para o outro lado da membrana do inserto através das células epiteliais foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min, lavadas 3 vezes de 10 min com solução de PBS-glicina, montadas utilizando meio de montagem com DAPI ProLong Gold (Invitrogen) e fotografadas em um microscópio de fluorescência Axio Vision (Zeiss Microscopy). Foram escolhidos cinco campos por membrana, compreendendo cerca de 80% da superfície de cada uma. As células em cada um dos campos foram contadas através do software Image J.

3.7 Invasão

Insertos de invasão BioCoat Matrigel[®] Invasion Chambers kit (BD Biosciences) de 24 poços, cuja parte interna possui uma cobertura de Matrigel[®], material que mimetiza a matriz extracelular, foram previamente hidratados com meio DMEM livre de FBS por 2 h em ambiente úmido a 37 °C . Posteriormente células da linhagem MDA-MB-231 (5x10⁴) foram semeadas em cada câmara superior dos insertos em meio livre de FBS e em diferentes concentrações de [10]-gingerol (1-100 µM). Meio DMEM suplementado com 10% de FBS foi adicionado à câmara inferior como quimioatraente. O experimento foi deixado em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37 °C por 22 h. Em seguida, as células remanescentes na câmara superior foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. As células que foram capazes de invadir através da camada de Matrigel[®] atingindo o outro lado da membrana do inserto foram fixadas com metanol por 5 min e coradas com solução de 1% de azul de toluidina. As membranas de cada inserto foram removidas, preparadas em lâminas de microscopia e fotografadas com o auxílio de um microscópio óptico acoplado a uma câmera. Foram escolhidos 5 campos por

membrana, compreendendo cerca de 80% da superfície de cada uma. As células em cada um dos campos foram contadas através do *software* Image J.

3.8 Zimografia

Para verificar o efeito do [10]-gingerol sobre a atividade de metaloproteinases de matriz (MMP-2/-9), proteínas relacionadas aos processos de migração e invasão, 1×10^5 células por poço foram cultivadas por 24 h em placas de 12 poços até atingirem 100% de confluência na cultura. Em seguida o mesmo procedimento descrito anteriormente para a risca no Ensaio de migração *Wound Healing* foi realizado para estimular a migração celular. Logo após, as células foram tratadas ou não (controle) com diferentes concentrações do produto natural em meio livre de FBS e incubadas por 12 h. Decorrido o tempo de incubação o sobrenadante foi retirado, centrifugado e suas proteínas totais quantificadas para a utilização na zimografia. Cerca de 8 μ g de proteínas de cada amostra foram diluídas em tampão de amostra livre de β -mercaptoetanol, para evitar a desnaturação das mesmas, aplicadas em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina a 1% e a corrida de eletroforese realizada a 4 °C e 80V. O gel foi lavado em solução de Triton X-100 2,5% para remover totalmente SDS, incubado por 18 h a 37 °C em tampão Tris contendo 5 mM de CaCl_2 , 0,02% de NaN_3 e 10 mM de ZnCl_2 . Em seguida, o gel foi corado com azul de Comassie e descorado com solução de ácido acético, metanol e água para visualizar a atividade de MMP-2/-9. A visualização e quantificação das bandas foi realizada com o auxílio do software ImageLab e do equipamento Chemidoc (BioRad).

3.9 Ensaio de fragmentação nuclear com DAPI

Células MDA-MB-231 (1×10^5 /poço) foram semeadas em placas de 12 poços contendo lamínulas de 15 mm de diâmetro estéreis e incubadas em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37 °C

por 24 h. Em seguida as células foram tratadas com diferentes concentrações de [10]-gingerol (1-50 μM), exceto os controles e incubadas por mais 24 h. Após esse período as células foram lavadas cuidadosamente com PBS, fixadas com metanol e coradas com solução de 30 nM de DAPI em meio de cultura sem FBS por 10 min. Lâminas foram preparadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Olympus).

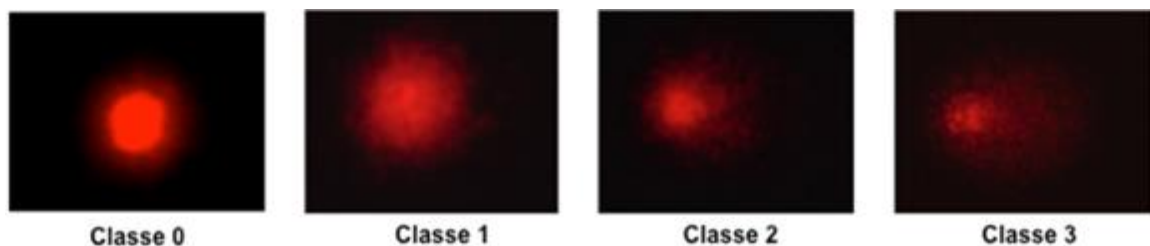
3.10 Ensaio do Cometa

Células da linhagem MDA-MB-231 ($1 \times 10^5/\text{mL}$) tratadas por 3 h com diferentes concentrações (1, 10 e 100 μM) de [10]-gingerol foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 min a 1000 rpm. Alíquotas das amostras de cada tratamento foram coradas com azul de Trypan e contadas, sendo encontrada viabilidade superior a 80% em todos os tratamentos. Foram adicionados 40 μL de solução contendo as células em 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 37 °C. A mistura foi transferida para lâminas previamente cobertas com agarose e as células lisadas em tampão de lise (NaCl 2,5 M, EDTA-titriplex 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1%, DMSO 10%, pH 10,0) por 1 h. Em seguida foi feita a desnaturação por 20 min para o relaxamento do DNA enovelado e as lâminas foram submetidas a eletroforese alcalina (300 mA, 25 V, 20 min) em tampão TBE (Tris-HCl 0,1 M; Ácido Bórico 0,09 M; EDTA 1 mM, pH 8,3). As lâminas foram coradas com brometo de etídio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e examinadas em microscópio de fluorescência. Os cometas foram analisados visualmente e classificados em quatro classes (FIGURA 5): classe 0, núcleos sem cauda; classe 1, núcleos com uma cauda menor que o diâmetro do núcleo; classe 2, núcleos com cauda de uma a duas vezes maior que o diâmetro do núcleo; e classe 3, núcleos com cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Foram analisadas 300 células por tratamento e os experimentos foram realizados em triplicata. Os *scores* foram calculados através da fórmula:

$$S = N1 + (2 \times N2) + (3 \times N3)$$

Onde, N1, N2 e N3 representam, respectivamente, o número de células com danos das classes 1, 2 e 3 encontradas nos experimentos.

FIGURA 5: Visualização das quatro classes para a classificação de cometas



Classe 0, núcleos sem cauda; classe 1, núcleos com uma cauda menor que o diâmetro do núcleo; classe 2, núcleos com cauda de uma a duas vezes maior que o diâmetro do núcleo; e classe 3, núcleos com cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo.

3.11 Ensaio de Fragmentação do DNA

Células da linhagem MDA-MB-231 (6×10^5 /placa), foram semeadas em placas de Petri de 6 cm de diâmetro. Após 24 h de incubação as células foram tratadas com diferentes concentrações (1,10 e 100 μM) de [10]-gingerol ou com o controle positivo de fragmentação, camptotecina a 6 μM por 3 h. O DNA total foi isolado através do método fenol-clorofórmio. As células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 10 min a 4 °C. O pellet obtido foi lavado em PBS e em seguida lisado e homeogeneizado com solução de 50 μL de proteinase K (5 mg/mL) e 20 μL de SDS 20% em cada tubo. A mistura foi incubada por 3 h em banho-maria a 37 °C. Em seguida, foi adicionada solução de fenol/clorofórmio (v/v) em volume igual ao total de cada tubo, realizada agitação por inversão e depois centrifugação novamente. A fase aquosa contendo o DNA foi isolada em novos microtubos e foram adicionados 100 μL de NaCl 6 M e 1 mL de isopropanol em cada tubo. A precipitação foi realizada *overnight* a -20 °C. Após

essa etapa, os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante descartado e o DNA seco à temperatura ambiente. Foram então adicionados 100 µL de tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e incubado com 2 µL de ribonuclease A (20 mg/mL) por 1 h a 37 °C para a eliminação de qualquer resíduo de RNA presente. Ao final da extração, 20 µL de cada amostra foi aplicada em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo e submetida à eletroforese.

3.12 Ensaio de TUNEL

O ensaio de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP-biotin nick end labeling) foi realizado utilizando o kit DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega), segundo as instruções do fabricante. Células da linhagem MDA-MB-231 (1x10⁶/placa) foram semeadas em placas de Petri de 6 cm e tratadas com 10 µM de [10]-gingerol por 18 h. As células foram tripsinizadas, lavadas, resuspendidas em PBS e espalhadas em lâminas de microscopia cobertas com poli-L-lisina. Depois de secas por 15 min, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 25 min em temperatura ambiente, lavadas novamente com PBS e permeabilizadas com solução de 0,2% de Triton-X-100 em PBS por 5 min. Em seguida foi realizada nova lavagem com PBS e as lâminas foram mergulhadas por 5 min em tampão de equilíbrio fornecido no kit. A reação de marcação das extremidades do DNA fragmentado foi feita utilizando uma solução contendo uma mistura de nucleotídeos biotinilados, tampão de equilíbrio e deoxinucleotidiltransferase terminal por 1 h a 37 °C. A reação foi terminada com a solução 2 x SSC contida no kit. Depois de uma lavagem com PBS para a remoção de nucleotídeos biotinilados não incorporados e do bloqueio das peroxidases endógenas com solução de peróxido de hidrogênio, foi feita a coloração utilizando uma solução de

estreptavidina-HRP e diaminobenzidina (DAB), de acordo com as instruções. As lâminas foram enxaguadas em PBS, montadas e fotografadas em microscópio de campo claro.

3.13 Ensaio de Apoptose com Anexina V por Citometria de Fluxo

A atividade apoptótica do [10]-gingerol sobre as células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foi analisada por citometria de fluxo utilizando o kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences). As células (1×10^5 /poço) foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas por 24 h. Em seguida foram tratadas com diferentes concentrações de [10]-gingerol (1-100 μ M), exceto os controles, por mais 18 h, a fim de conseguir visualizar a apoptose ainda em fase inicial. Logo após, as células foram lavadas com PBS, incubadas com 5 μ L de PE-Anexina V e 7-AAD em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 min em tampão de ligação. Em seguida as células foram lavadas com tampão de ligação fresco, recolhidas com um *cell scraper* e ressuspensas em 500 μ L de tampão de ligação 1x. As amostras foram analisadas num citômetro BD Accuri C6 e a fluorescência quantificada através do software CSampler.

3.14 PCR em tempo real quantitativa

Células da linhagem MDA-MB-231 (1×10^6 /placa) foram tratadas ou não por 8 h com diferentes concentrações (1,10 e 100 μ M) de [10]-gingerol em placas de Petri de 6 cm. O RNA total foi extraído utilizando TRIzol (Invitrogen-Life Technologies). Foi utilizado 1 mL de TRIzol em cada placa. Após 5 min foi feita a lise através de sucessivas pipetagens e a transferência para microtubos. O homogenato foi incubado por 5 min à temperatura ambiente. Foram adicionados 200 μ L de clorofórmio em cada tubo e foi realizada agitação e nova incubação por mais 3 min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 15 min

a 12.000 rpm a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novos tubos e em seguida foram adicionados 200 µL de isopropanol e cada tubo foi agitado por inversão. Após incubação por 10 min as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi então removido e foi adicionado 1 mL de etanol 75% em cada tubo, as amostras foram agitadas e centrifugadas a 7.500 rpm por 8 min a 4 °C. Este procedimento foi repetido por 3 vezes e então o sobrenadante foi removido e o precipitado seco e dissolvido em 20 µL de água ultrapura tratada com DEPC (Sigma-Aldrich). O RNA extraído de cada amostra foi verificado quanto a sua pureza e concentração no equipamento NanoDrop (Thermo Scientific). Apenas RNA nos quais a razão 260/280 e 260/230 encontradas estavam entre 1,8 e 2,1 foram utilizados nos experimentos.

Após a extração de RNA e armazenamento em freezer -80 °C, foi realizada a síntese de cDNA utilizando o kit Enhanced Avian RT First Strand Synthesis (Sigma-Aldrich). Foi calculada a concentração ideal de RNA de cada amostra a ser utilizada através da fórmula de concentração x volume, bem como o volume de água. Em cada tubo foi adicionada a quantidade de RNA calculada, 1 µL de *Deoxynucleotide mix*, 1 µL de *Oligo(dT)₂₃* e água ultra pura fornecidos no *kit*. A mistura foi centrifugada a 3.400 rpm por 30 s e incubada por 10 min a 70 °C. Em seguida, em cada tubo foram adicionados 2 µL de tampão 10 x para e-AMV-RT, 1 µL de transcriptase reversa, 1 µL de inibidor de RNase e 6 µL de água ultrapura, todos fornecidos no kit. Os tubos foram centrifugados 3.400 rpm por 30 s e incubados a 50 °C por 50 min.

Foi utilizado o equipamento CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System Analyzer (Bio-Rad) tanto para amplificar genes alvo, quanto genes endógenos (1 ciclo a 95 °C por 5 min e 40 ciclos de amplificação a 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 45 s). As reações foram montadas utilizando 5 µL de SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-

Aldrich), 1 μ L de cDNA e os pares específicos de *primers* em uma concentração final de 500 nM.

Os *primers* utilizados foram desenhados utilizando os *softwares* GeneRunner e Primer3, através da interface AutoPrime, e em seguida testados através da ferramenta Primer-BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os *primers* foram testados e padronizados para definir a curva de *melting* ótima para cada um. Os *primers* utilizados para os ensaios estão na Tabela 1.

TABELA 1: Lista de oligonucleotídeos (*primers*) iniciadores utilizados para a reação de qPCR

Gene	Ref. Seq. NCBI	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Caspase-3</i>	NM_004346	5'GTGCTACAATGCCCTGGAT	5'GCCCATTCATTTATTGCTTTCC3'
<i>Caspase-8</i>	NM_001080125	5'GGATGAGGCTGACTTTCTG3'	5'CTGGCAAAGTGACTGGATG3'
<i>Caspase-9</i>	NM_032996	5'GCCTCAATGCCAGTAACG3'	5'GTTGTCAGGCGAGGAAAG3'
<i>Bax</i>	NM_001291428	5'CATCCAGGATCGAGCAGG3'	5'CGATGCGCTTGAGACACTC3'
<i>Bcl-2</i>	NM_000633	5'GGTGGGAGGGAGGAAGAAT3'	5'GCAGAGGCATCACATCGAC3'
<i>β-actina</i>	NM_001101.3	5'GACGGCCAGGTCATCACCATTG3'	5'AGCACTGTGTTGGCGTACAGG3'

Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O nível comparativo de expressão de cada gene foi calculado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (método do $\Delta\Delta Ct$), onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostra - ΔCt controle. Os valores de Ct das amostras e dos controles foram normalizados pela quantidade do controle endógeno *β -actina* (ΔCt do controle ou amostra = Ct do controle ou amostra - Ct *β -actina* do controle ou amostra) (Livak e Schmittgen, 2001).

3.15 Western Blotting

Células da linhagem MDA-MB-231 (1×10^6 /placa) foram tratadas ou não por 18 h com diferentes concentrações (1,10 e 100 μ M) de [10]-gingerol em placas de Petri de 6 cm. Após o tratamento as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise CellLytic M (Sigma-Aldrich). A concentração de proteínas presente em cada amostra foi

determinada utilizando o *kit* de quantificação BCA (Thermo Scientific). Em seguida, um volume de cada amostra contendo 100 µg de proteína foi aplicado em gel SDS-PAGE entre 10% e 14% de acrilamida, de acordo com testes piloto. Após a corrida de eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) através de transferência semi-seca no equipamento TransBlot Turbo (Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas com tampão TBS (Tris 20 mM, NaCl 0,5 M pH 7,4) com 1% de caseína (Bio-Rad) e em seguida incubadas com anticorpos primários anti-caspase 3, (IgG de camundongo conjugado com HRP; diluição: 1:1000), anti-caspase 8 (IgG de camundongo; diluição 1:1000), anti-caspase-9 (IgG de camundongo; diluição 1:1000) e anticorpo anti-GAPDH (IgG de camundongo; diluição 1:5.000) como controle endógeno (Novus Biologicals). Após a incubação as membranas foram lavadas em TBS (Bio-Rad) e incubadas com os anticorpos secundários anti-camundongo produzidos em coelho e conjugados com HRP (Novus Biologicals). A reação quimioluminescente foi realizada utilizando o *kit* Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). As bandas resultantes foram observadas em fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad) e quantificadas através do software Image Lab (Bio-Rad).

3.16 Adesão Celular

Placas de 96 poços foram preparadas com solução de solução de 10 µg de colágeno tipo I ou 1 µg/poço de vitronectina ou 0,3 µg/poço de laminina ou fibronectina, imobilizadas em tampão de adesão (tampão HEPES 20 mM pH 7,35 com 1 mM de MnCl₂, 1 mM de MgSO₄, 5 mM de KCl e 150 mM de NaCl) overnight a 4 °C, em seguida bloqueadas por uma hora com tampão de adesão com 1% de BSA e depois lavadas com 100 µL de tampão de adesão por poço. Células da linhagem MDA-MB-231 (5x10⁶/mL) foram incubadas por 30 min com [10]-gingerol em diferentes concentrações (1, 10, 50, 100, 500 e 1000 µM) em estufa úmida com 5% de CO₂

a 37 °C e então plaqueadas e incubadas nas mesmas condições por mais 1 h. Em seguida as células não aderidas foram removidas cuidadosamente através de lavagem. As células aderidas foram fixadas com 100 µL de etanol 70% por 10 min e coradas com cristal violeta 0,5% por 20 min. O excesso de corante foi removido delicadamente por lavagem com PBS. As células coradas foram diluídas em 100 µL de solução de 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), por 30 min foi feita a leitura das placas em leitor de ELISA a 595 nm de comprimento de onda.

3.17 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 6 . Cada experimento foi realizado três vezes em triplicata. Foram calculados a média e o desvio padrão e em seguida foi realizada análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey para determinar se os resultados foram estatisticamente diferentes em relação aos controles.

3.18 Cultura celular tridimensional

A cultura tridimensional foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita por Lee *et al.* (2007) utilizando o método “*on top*”. Brevemente, placas de cultura de 24 ou 6 poços foram cobertas com 0,5 mL de Matrigel[®] gelada, espalhada com uma pipeta, evitando a formação de bolhas. As placas foram mantidas em uma incubadora úmida a 37 °C e 5% CO₂ por 30 min para que ocorra a polimerização.

As células foram tripsinizadas, contadas e semeadas sobre a matriz previamente formada e cobertas com meio gelado contendo 10% de Matrigel[®]. As células foram tratadas neste momento ou após o crescimento e formação de organoides tridimensionais com os diferentes compostos a serem testados, de acordo com cada experimento a ser realizado.

3.19 Imunocitoquímica de fluorescência

Este ensaio permitiu verificar se o mecanismo de ação dos compostos, caso sejam eficazes em inibir a proliferação celular, está relacionado à apoptose, ou morte celular programada, como é desejável para compostos antitumorais ou ainda se estes compostos são capazes de reverter o fenótipo maligno de tumores iniciais. As estruturas foram coletadas dos poços nos quais cresceram, depois de lavadas com PBS gelado, e espalhadas sobre lâminas de microscopia. Então, as células foram fixadas utilizando uma solução de paraformaldeído 4% por 20 min e lavadas três vezes com PBS-glicina 0,75% por 10 min. As lâminas foram bloqueadas em solução para imunofluorescência (IF) contendo 10% de soro de cabra e fragmentos de anticorpos goat anti-mouse IgG F(ab1)2 (Santa Cruz Biotechnologies) por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida foi feita a incubação overnight 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti- α 6-integrina (1:300), anti- β -catenina (1:50) (BD Biosciences), GM130 (D6B1) x P(R) (1:1000) e anti-caspase3 clivada (Cell Signaling Technologies). As lâminas foram lavadas com solução IF três vezes por 20 min. A incubação com os anticorpos secundários foi feita utilizando anticorpos Alexa Fluor-488 e -568 (1:500) apropriados para cada anticorpo primário utilizado na etapa anterior. Após uma nova lavagem com PBS, duas vezes por 10 min, foi feita a coloração com DAPI (diamidino-2-phenylindole) utilizando solução contendo 0,5 mg/mL de DAPI (Thermo Scientific) por 4 min a temperatura ambiente e então uma nova lavagem com PBS por mais 10 min antes de montar as lâminas com Fluoromount G (Eletron Microscopy Sciences). As lâminas foram fotografadas utilizando um microscópio de fluorescência AxioVision (Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando o software Image J.

3.20 Ensaio de viabilidade com Calceina-DAPI

Este ensaio foi realizado para verificar se os compostos de interesse são capazes de agir sobre tumores já formados em IrECM, ou seja, após a formação das estruturas tridimensionais, servindo como um modelo do cenário encontrado no tratamento de tumores in vivo. O ensaio foi realizado seis dias após o crescimento para linhagens não malignas e 4 dias para células malignas. A observação de que os compostos são capazes de desfazer os tumores formados em 3D é clinicamente relevante, pois sugere a eficácia dos compostos, mesmo após a massa tumoral já formada. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos de interesse por três dias. Após o tratamento, as estruturas foram coradas utilizando 0.001 mg/mL de calceina acetoximetil-diacetil éster (calceina AM) (Invitrogen) e 0.05 mg/mL de DAPI (Thermo Scientific) por uma hora em incubadora úmida (37 °C, 5% CO₂). As placas foram fotografadas utilizando um microscópio de fluorescência AxioVision (Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando o software Image J.

3.21 Extração proteica

O objetivo deste e do ensaio seguinte foi coletar amostras de proteínas celulares para avaliar através de *western blotting* a expressão de proteínas relacionadas ao fenótipo de reversão de maligno para não maligno. Para realizar os experimentos envolvendo extração de proteínas, os géis de matriz extracelular provenientes das culturas 3D foram previamente solubilizados utilizando PBS-EDTA (5 mM). A solução foi transferida para tubos de centrifugação e mantida sob agitação a 4°C por 20 min para dissolver a Matrigel[®] e então centrifugadas por 5 min a 80 rpm. Os pellets obtidos foram lisados com tampão RIPA (150 mM NaCl; 50 mM Tris HCl pH 7.4; 50 mM NaF; 2 mM EDTA; 1 % NP-40; 0,5 mM deoxicolato de sódio; 0,1% SDS, pH 8.0) e os lisados transferidos para um microtubo de 1,5 mL, congelados overnight a 20°C, em

seguida sonicadas por 20 s no gelo e centrifugadas por 20 min a 12.000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi armazenado a -80°C.

3.22 Western blotting

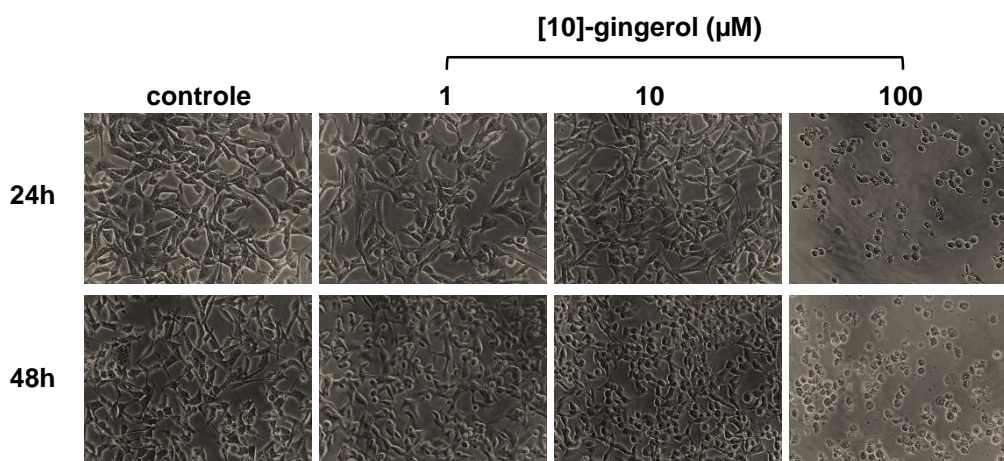
A concentração de proteínas de cada sobrenadante, obtido na extração de proteínas, foi determinada utilizando o Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Amostras de proteína (15 µg) foram aplicadas em um gel Tris-glicina 4-20% (Bio-Rad), separadas por eletroforese, transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad), incubadas com anticorpos anti-β1-integrina, anti-EGFR e anti-β-catenina (1:1000) (BD Biosciences) e em seguida incubadas com anticorpos secundários apropriados conjugados com HRP (1:5000) (Thermo Scientific). A β-catenina foi utilizada como controle endógeno. A revelação quimioluminescente de alta performance foi realizada utilizando o substrato Clarity™ Western ECL (Bio-Rad). As bandas específicas foram visualizadas e fotografadas utilizando o equipamento ChemiDoc™ MP Image System (Bio-Rad), quantificadas utilizando o software Image J e normalizadas pela β-catenina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfologia Celular

Inicialmente foram realizados ensaios de morfologia celular para avaliar qualitativamente o efeito do [10]-gingerol sobre as linhagens celulares em estudo. Através deste experimento foi possível notar diferenças sensíveis no formato das células tumorais da linhagem MDA-MB-231 tratadas com [10]-gingerol em relação ao controle a partir da concentração de 10 μM em 24 h e 1 μM em 48 h (FIGURA 6).

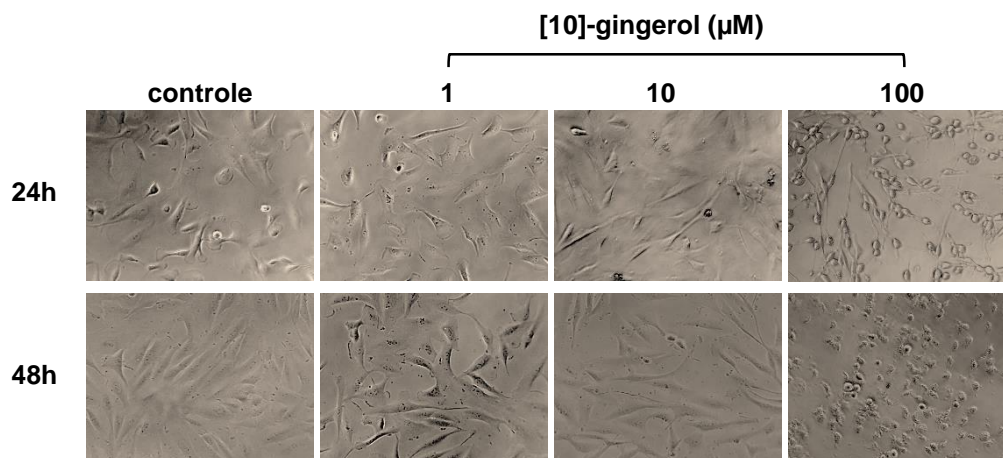
FIGURA 6: Efeito de diferentes concentrações de [10]-gingerol em células de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231.



As células foram tratadas com 0 μM as concentrações indicadas de [10]-gingerol e fotografadas 24 e 48 h após a adição do composto.

Entretanto, as células normais da linhagem MCF-10A só apresentam morfologia alterada quando tratadas com 100 μM de [10]-gingerol (FIGURA 7), corroborando com os resultados prévios realizados com fibroblastos humanos (Almada Da Silva *et al.*, 2012). Ainda, estes resultados são encorajadores, pois indicam uma ação citotóxica mais específica do [10]-gingerol para células tumorais, os quais são concentração e tempo dependentes.

FIGURA 7: Efeito de diferentes concentrações de [10]-gingerol em células normais de mama da linhagem MCF-10A.



As células foram tratadas com 0 μas concentrações indicadas de [10]-gingerol e fotografadas 24 e 48 h após a adição do produto.

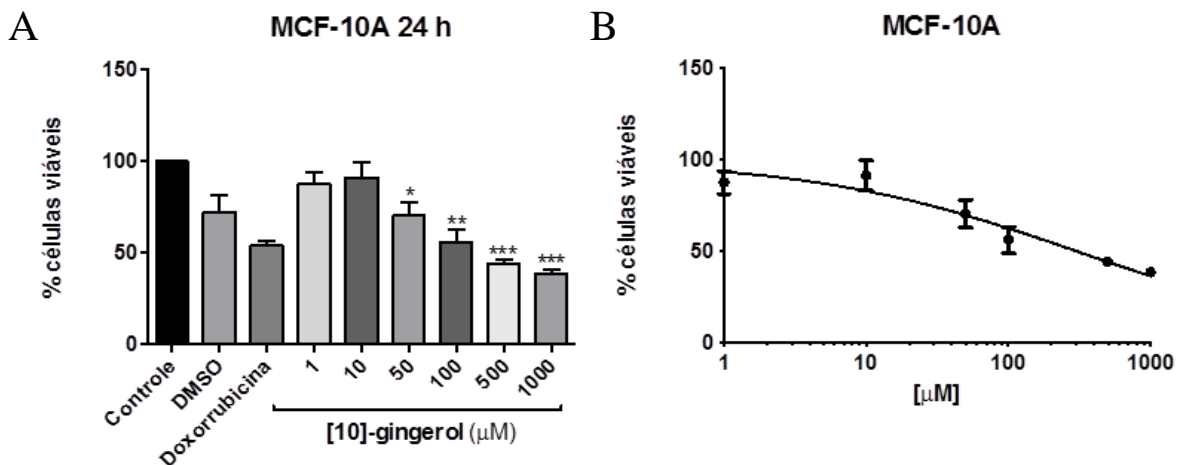
4.2 Proliferação celular

Conforme apresentado anteriormente, observamos que o [10]-gingerol provocou mais alterações na morfologia das células tumorais MDA-MB-231 do que nas células de mama não tumorais da linhagem MCF-10A, sendo que na primeira linhagem alterações aparecem em tratamentos com concentrações menores (10 μM) do que na segunda (100 μM). Deste modo, foram realizados ensaios de viabilidade celular com as células não tumorais de mama da linhagem MCF-10A para comparar os efeitos antiproliferativos do [10]-gingerol já publicados por nosso grupo de pesquisa para a linhagem tumoral MDA-MB-231 e fibroblastos humanos (FH) (Almada Da Silva *et al.*, 2012).

Os resultados demonstraram que o [10]-gingerol inibiu a proliferação das células MCF-10A de maneira significativa apenas em concentrações mais altas do que as que já causam efeito sobre as células tumorais MDA-MB-231. O IC₅₀ encontrado para a linhagem MCF-10A (FIGURA 8) foi de 295 μM, bem superior ao encontrado anteriormente para as células MDA-MB-231, de 12,1 μM, porém inferior ao IC₅₀ para FH, que não pôde ser calculado, já que a inibição ocorreu em concentrações superiores a 500 μM (Almada Da Silva *et al.*, 2012). Este

resultado nos parece promissor, pois podemos concluir que o [10]-gingerol apresenta citotoxicidade maior para inibir a proliferação de células tumorais de mama comparado a linhagens não tumorais.

FIGURA 8: Efeito do [10]-gingerol sobre a viabilidade de células não tumorais da linhagem MCF-10A.

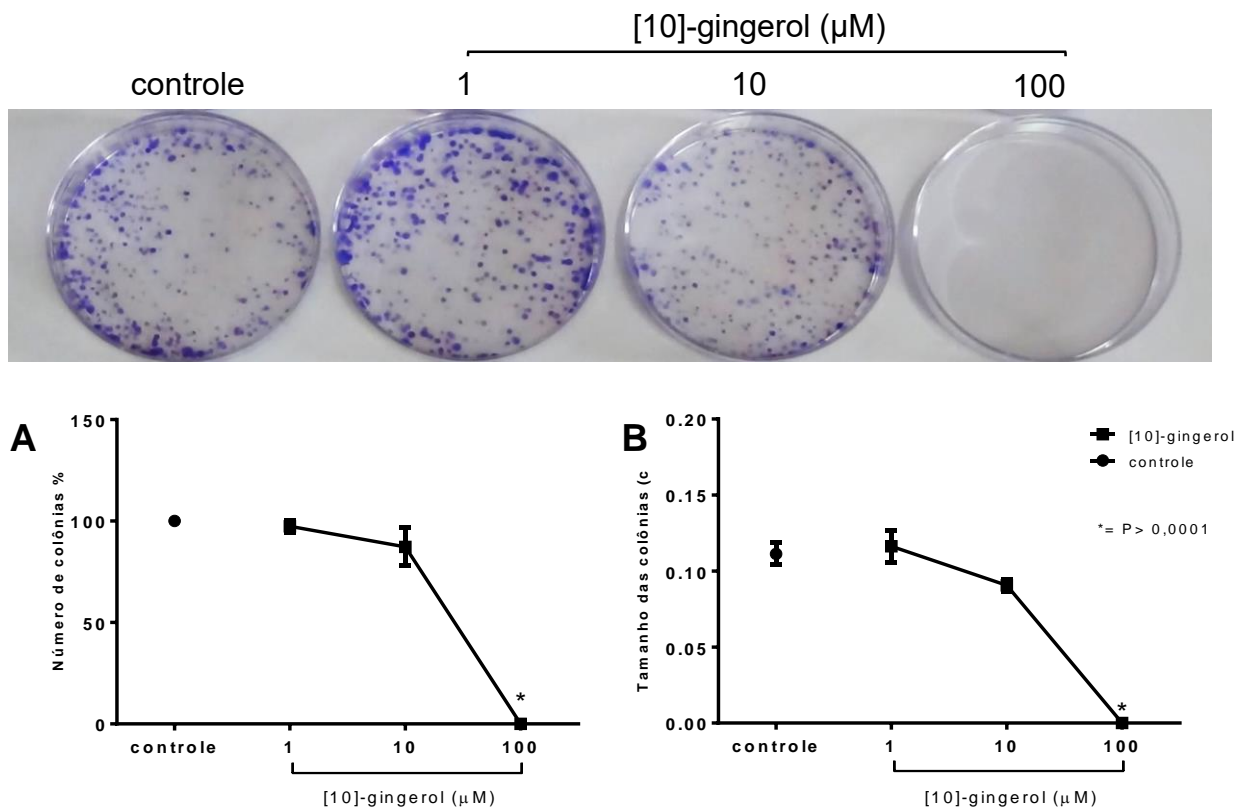


(A) Efeito do [10]-gingerol sobre a viabilidade de células não tumorais da linhagem MCF-10A. As células foram tratadas as concentrações indicadas de [10]-gingerol por 24 h. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo. (B). O IC₅₀ do [10]-gingerol para as células MCF-10A foi de 295 μM . * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.3 Formação de Colônias

O ensaio clonogênico demonstrou que o [10]-gingerol é capaz de inibir completamente a formação de colônias das células tumorais da linhagem MDA-MB-231 na concentração de 100 μM , como é possível verificar na Figura 9. Também há uma diminuição no tamanho e número de colônias na concentração de 10 μM , a qual, porém não é estatisticamente significativa. O ensaio foi igualmente realizado com as células da linhagem MCF-10A, porém as mesmas não são capazes de formar colônias (dados não apresentados). Não foram encontrados dados similares na literatura utilizando compostos derivados do gengibre.

FIGURA 9: Efeito de diferentes concentrações de [10]-gingerol sobre a formação de colônias em células tumorais da linhagem MDA-MB-231.



(A) Número de colônias normalizadas em relação ao controle. (B) Tamanho das colônias em relação ao controle. * $P < 0,0001$. A imagem corresponde a uma replicata representativa.

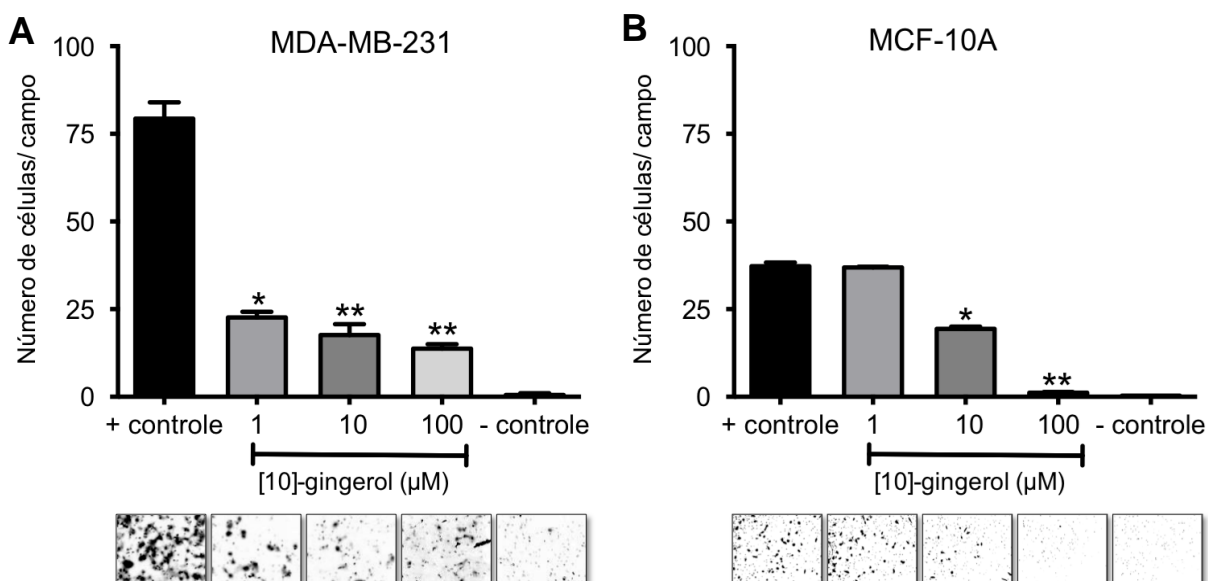
4.4 Migração Haptotática

A migração haptotática consiste em um ensaio utilizando insertos comerciais com membranas contendo poros de 8 μm revestidos em sua parte inferior com uma substância com a qual as células possuem alta afinidade de adesão, no caso, colágeno tipo I. Este ensaio apresenta vantagens sobre o ensaio de migração convencional por reduzir o tempo de incubação de 22 para 4 h, já que foi observada ação citotóxica do [10]-gingerol em concentrações mais

elevadas nos ensaios de migração tradicionais realizados previamente. Neste experimento, utilizando o [10]-gingerol para tratar as células, é possível verificar sua capacidade de inibir a migração celular em um tempo de incubação onde ainda não se nota efeito citotóxico sobre as células MDA-MB-231 (Moutasim *et al.*, 2011). Na Figura 10 são apresentados os dados obtidos através do ensaio de migração haptotática com as concentrações de 1, 10 e 100 μM de [10]-gingerol. Pode-se observar que o [10]-gingerol foi capaz de inibir significativamente a migração em todas as concentrações.

Para avaliar o efeito do [10]-gingerol sobre a capacidade de migração das células não tumorais da linhagem MCF-10A foi realizado também um ensaio de migração (FIGURA 10), por motivo de comparação com a linhagem tumoral MDA-MB-231. Os resultados obtidos indicam que o [10]-gingerol também pode inibir a migração em células normais da linhagem MCF-10A, assim como inibiu a migração das células tumorais, porém de maneira menos acentuada, já que na linhagem tumoral a concentração de 1 μM já foi suficiente para inibição da migração. Ainda, foi possível observar que a linhagem não tumoral possui um menor potencial migratório em relação à linhagem tumoral testada anteriormente, o que é um resultado esperado.

FIGURA 10: Efeito das diferentes concentrações de [10]-gingerol sobre a migração *transwell* em células MDA-MB-231 e MCF-10A.



(A) Efeito das diferentes concentrações de [10]-gingerol sobre a migração *transwell* em células MDA-MB-231 e (B) MCF-10A. As células em cada um dos campos foram contadas através do software Image J. As imagens abaixo dos gráficos correspondem a campos representativos de cada condição. * $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,001$

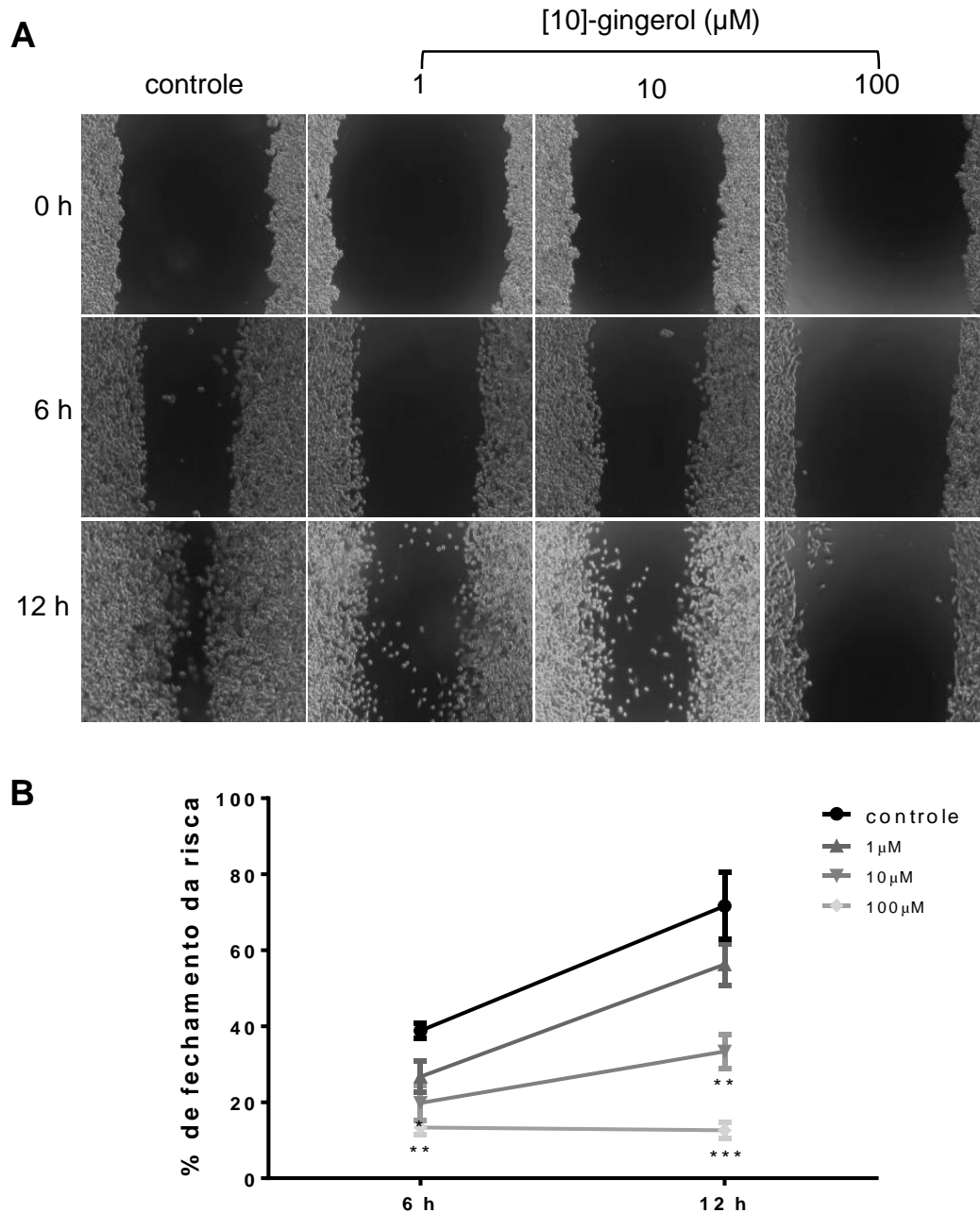
4.5 Ensaio de Migração *Wound Healing*

Para avaliar o efeito do [10]-gingerol sobre a capacidade de migração das células tumorais da linhagem MDA-MB-231 foi realizado o ensaio de *wound healing* que consiste na remoção, formando de uma risca longitudinal, de células confluentes cultivadas em placas de 12 poços, e observar o fechamento da mesma risca ao longo do tempo (Lampugnani, 1999).

Na Figura 11 é possível observar imagens representativas dos campos fotografados. Pode-se observar que o tratamento com [10]-gingerol diminuiu significativamente a área de fechamento nas concentrações de 1 μM em 24 h (dados não mostrados), 10 μM e 100 μM a partir de 6 h. Isso pode sugerir que o [10]-gingerol é capaz de diminuir a motilidade celular, mesmo em baixas concentrações, as quais não são citotóxicas para as células tumorais,

demonstrando um efeito específico sobre a migração celular. Os tempos de 24 e 48 h foram desconsiderados pelo possível efeito citotóxico do composto nestes tempos.

FIGURA 11: Efeito do [10]-gingerol sobre a migração de células da linhagem MDA-MB-231 em ensaio de *wound healing*



(A) Efeito do [10]-gingerol sobre a migração de células da linhagem MDA-MB-231 em ensaio de *wound healing*. A área de fechamento da risca pela migração celular foi medida através do software Image J. (B) Porcentagem de fechamento calculada de acordo com o descrito por Yue *et al.* (2010). * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ e *** $P < 0,0001$. O experimento foi realizado em triplicata e as imagens são representativas de cada condição.

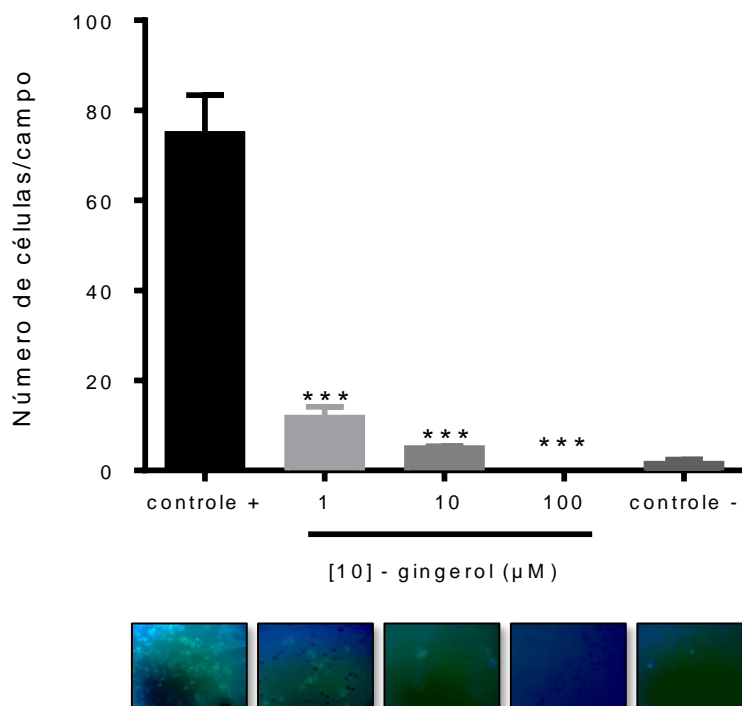
Não foram encontrados resultados similares que demonstram o papel do [10]-gingerol na migração de células tumorais na literatura. Lee *et al.* (2008), entretanto, já havia demonstrado que em concentrações de 2,5 a 10 μM o [6]-gingerol inibe de maneira dependente de concentração a migração de células da linhagem MDA-MB-231.

4.6 Transmigração endotelial

Uma característica importante durante a formação de metástases é a capacidade de as células originárias do tumor primário atravessarem a camada de células endoteliais que forma os capilares sanguíneos. Para avaliar o efeito do [10]-gingerol sobre a capacidade de transmigração das células tumorais da linhagem MDA-MB-231 através de uma monocamada de células endoteliais, foi realizado o ensaio de transmigração que consiste em semear células tumorais na câmara superior de insertos previamente recobertos com uma camada de células endoteliais (HUVEC), utilizando uma substância quimioatratante na câmara inferior para estimular a migração das células tumorais.

Na Figura 12 são apresentados os dados obtidos após a realização do ensaio de transmigração. Foi possível observar uma redução significativa na capacidade das células MDA-MB-231 migrarem através da monocamada de células endoteliais em todos os tratamentos. A redução foi expressiva (cerca de 75%) mesmo em concentrações menores como 1 μM , sendo quase total no tratamento com 100 μM . No tempo de incubação deste experimento, de 8 h ainda não é observada ação citotóxica do composto em outros ensaios. Não foram encontrados dados similares na literatura.

FIGURA 12: Efeito das diferentes concentrações de [10]-gingerol sobre a transmigração endotelial em células MDA-MB-231 através de uma monocamada de células da linhagem HUVEC.



Apenas as células capazes de migrar foram fixadas. As células em cada um dos campos foram contadas através do software Image J. As imagens correspondem a campos representativos de cada condição. *** $P \leq 0,001$.

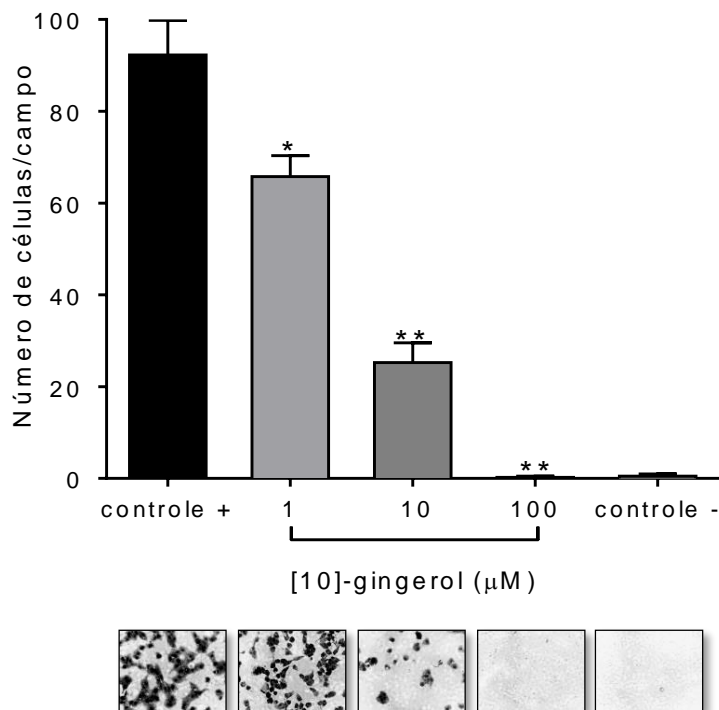
4.6 Invasão

O ensaio de invasão é bastante similar ao ensaio de migração, porém os insertos utilizados neste ensaio possuem em sua câmara superior uma camada de Matrigel[®] recobrindo a membrana porosa. Matrigel[®] é um material que mimetiza a matriz extracelular, sendo assim, através deste experimento é possível selecionar células tumorais com a capacidade de degradar a matriz extracelular e invadir outros tecidos, passo crucial na formação de metástases. Desta maneira, tratando as células com [10]-gingerol pode-se avaliar o seu potencial antimetastático (Moutasim *et al.*, 2011).

Na Figura 13 são apresentados os dados obtidos pelo ensaio de invasão. É possível notar que o [10]-gingerol inibe significativamente a invasão a partir da concentração de 1 µM,

tendo um incremento no efeito inibitório na concentração de 10 μM , ambas pouco citotóxicas em tempos abaixo de 24 h.

FIGURA 13: Efeito de diferentes concentrações de [10]-gingerol sobre a capacidade de invasão em células tumorais da linhagem MDA-MB-231.



As células em cada um dos campos foram contadas através do software Image J. O experimento foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a campos representativos de cada condição. * $P < 0,0001$ e ** $P < 0,00001$.

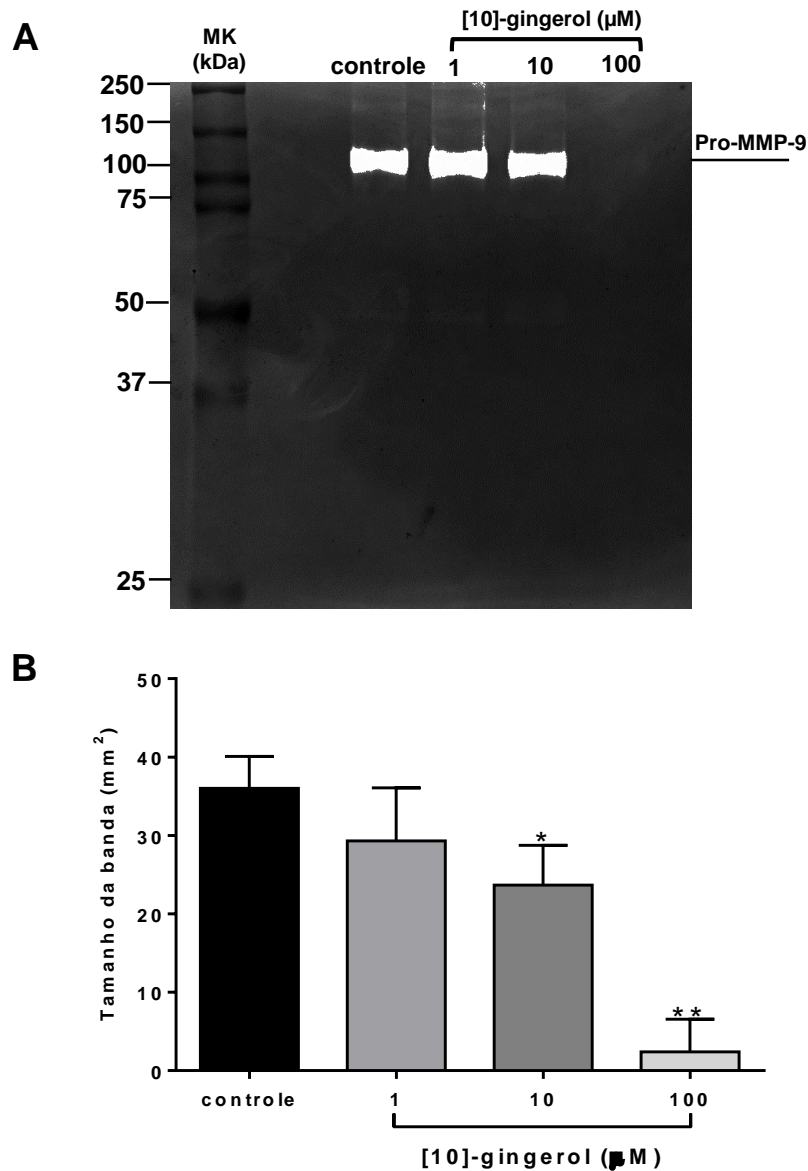
Resultados similares de inibição da invasão foram obtidos por Lee *et al.* (2008) com [6]-gingerol, porém as concentrações a partir das quais o [6]-gingerol reduziu significativamente a invasão foram maiores (2,5 a 10 μM). Recentemente, resultados de Joo *et al.* (2016) mostraram que o [10]-gingerol diminui a capacidade invasiva em células MDA-MB-231 em resposta a estimulação mitógena pela inibição de AKT e p38 mAPK, além da supressão da expressão de EGFR.

4.7 Zimografia

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são um grupo de proteases capazes de clivar as diversas proteínas que compõem a matriz extracelular, tais como colágeno, laminina, fibronectina na presença do zinco (Zn) como co-fator enzimático (Wang *et al.*, 2012).

Através da zimografia, apresentada na Figura 14, é possível visualizar as bandas correspondentes a MMP-9 em gel de acrilamida com adição de gelatina, pois ambas são potentes gelatinases. Uma coloração simples com azul Commassie cora a gelatina, porém, as bandas onde estavam presentes as MMPs aparecem em negativo, pois as mesmas a degradaram a gelatina durante incubação com tampão contendo íons zinco. Células tumorais da linhagem MDA-MB-231 parecem não expressar MMP-2 em cultura, o que pode ser notado neste experimento pela presença de degradação de gelatina apenas entre 100 e 75 kDa (Ramos-Desimone *et al.*, 1999). Nota-se que houve uma diminuição gradual na concentração de para o-MMP-9, sendo esta proporcional a concentração de [10]-gingerol com a qual as amostras foram tratadas. Essa diminuição é mais acentuada no sobrenadante da amostra tratada com 100 μ M de [10]-gingerol. Não foram encontrados dados similares na literatura.

FIGURA 14: Efeito do [10]-gingerol sobre a Pro-MMP-9 em gel de zimografia.



A visualização e quantificação das bandas foi realizada com o auxílio do software ImageLab e do equipamento Chemidoc (BioRad). * $P < 0,0001$. (A) Fotografia correspondente a uma replicata representativa. (B) Quantificação das bandas.

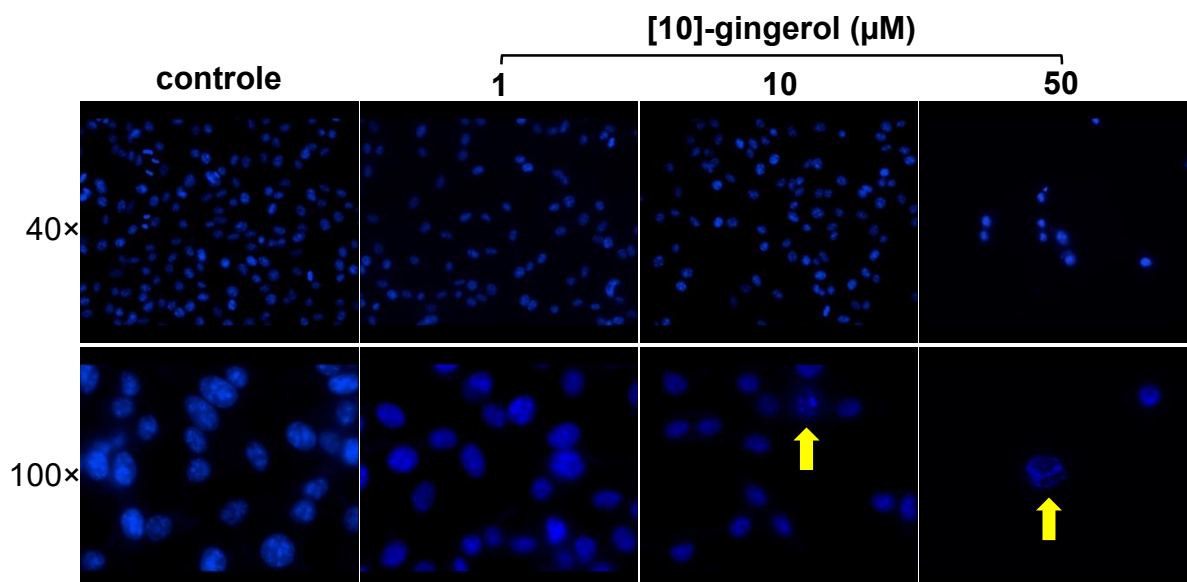
4.8 Ensaio de fragmentação nuclear com DAPI

Um dos sinais indicativos de apoptose numa célula é a fragmentação nuclear com condensação anormal do DNA em heterocromatina. Para verificar a morfologia nuclear das células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de [10]-gingerol, foi realizado

um ensaio qualitativo através de uma coloração com DAPI, fluoróforo com conhecida afinidade para o DNA (Hughes *et al.*, 1996).

Na Figura 15 observa-se a morfologia normal dos núcleos das células MDA-MB-231 no controle, a maioria com DNA descondensado, sendo que, na imagem obtida no aumento de 40×, é possível ver algumas células em diferentes fases da mitose, algumas se dividindo, com o DNA condensado organizadamente. As células tratadas com 1 µM de [10]-gingerol não apresentaram mudanças na morfologia nuclear em relação ao controle, mas já não se encontram células em divisão. No tratamento com 10 µM de [10]-gingerol é possível notar algumas células com fragmentação nuclear, caracterizada pela condensação do DNA em corpúsculos arredondados, muito diferentes do formato normal dos cromossomos. Nas células tratadas com 50 µM de [10]-gingerol observa-se uma diminuição no número de células da amostra, sendo que quase todas as restantes apresentam fragmentação nuclear notória. Não foram encontrados dados similares na literatura.

FIGURA 15: Efeito do [10]-gingerol sobre a fragmentação nuclear em células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de [10]-gingerol.



Após o tratamento as células foram fixadas e coradas com DAPI. As setas indicam núcleos apresentando fragmentação.

4.9 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa é uma técnica amplamente utilizada para a detecção de danos ao DNA, considerados iniciais e passíveis de reparo (Singh *et al.*, 1988; Fairbairn *et al.*, 1995). Este ensaio é ainda utilizado para verificar a genotoxicidade, que consiste na capacidade de induzir alterações no material genético, sendo este um efeito desejável contra células que possuem mecanismos de reparo alterados e inúmeras mutações, tais como as células tumorais. É sabido que agentes genotóxicos são conhecidos indutores de morte celular por apoptose nestas condições (Norbury e Zhivotovsky, 2004; Roos e Kaina, 2013). Através da análise dos dados obtidos no experimento, que estão detalhados na Tabela 2, é possível notar que o [10]-gingerol causou danos ao DNA das células MDA-MB-231.

TABELA 2: Frequência de células com DNA danificado observado pelo ensaio do cometa após 3 h de tratamento com diferentes concentrações de [10]-gingerol (média \pm desvio padrão).

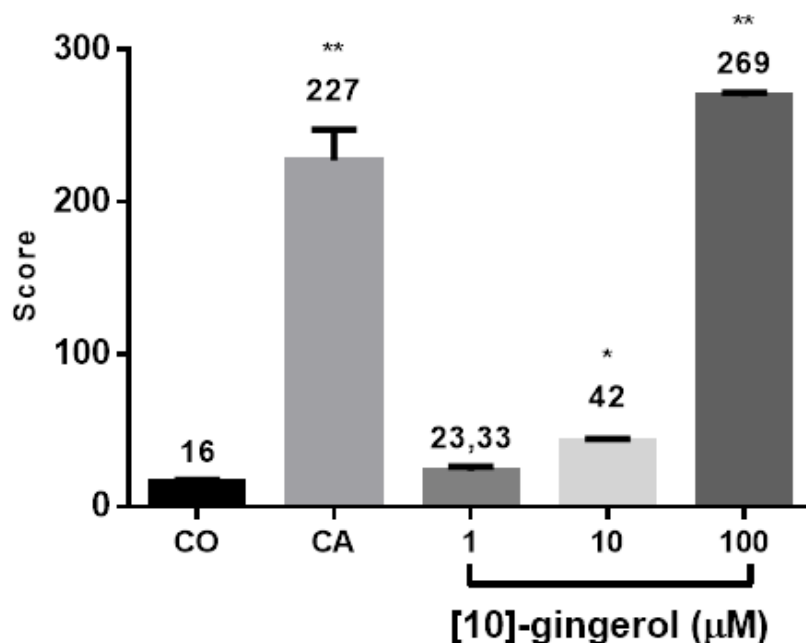
Tratamento	Total de células com dano no DNA	Classe de cometa				Score
		0	1	2	3	
Controle	15.33 \pm 2.51	84.66 \pm 2.51	14.66 \pm 3.51	0.66 \pm 1.15	0.00 \pm 0.00	16 \pm 1.73
Camptotecina 6 μ M	93.00 \pm 3.60	7.00 \pm 3.60	16.33 \pm 5.13	19.33 \pm 2.08	57.33 \pm 9.71	227 \pm 20.42***
[10]-gingerol 1 μ M	21.00 \pm 3.00	79.00 \pm 3.00	18.66 \pm 3.05	2.33 \pm 0.57	0.00 \pm 0.00	23.33 \pm 3.05
[10]-gingerol 10 μ M	40.33 \pm 3.21	59.66 \pm 3.21	38.66 \pm 5.50	1.66 \pm 2.88	0.00 \pm 0.00	42 \pm 2.64*
[10]-gingerol 100 μ M	95.33 \pm 1.52	4.66 \pm 1.52	5.33 \pm 2.88	6.33 \pm 5.50	83.66 \pm 3.51	269 \pm 2.64***

* $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,01$.

Na Figura 16 está representado por gráfico de barras o *score* obtido para cada tratamento, observa-se um efeito superior no tratamento de 100 μ M por 3 h, quando comparado ao dano causado pela camptotecina. Deste modo, é possível inferir que a indução de apoptose

causada pelo [10]-gingerol, verificada em outros experimentos, pode estar relacionada a danos ao DNA.

FIGURA 16: *Score* médio de cometas observados em células MDA-MB-231 após o tratamento com diferentes concentrações de [10]-gingerol.



* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. CO: controle não tratado; CA: tratamento com camptotecina.

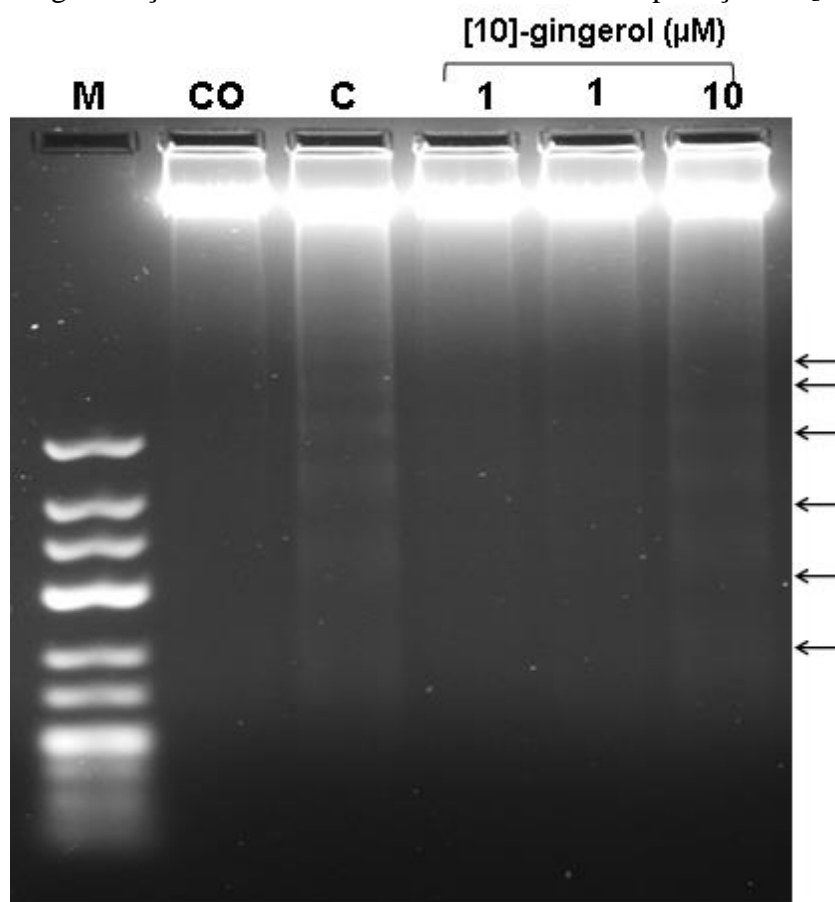
Estudos recentes de Rastogi e colaboradores (2014) utilizando o [6]-gingerol demonstraram que este composto causa dano ao DNA de células de leucemia mieloide primárias extraídas de pacientes, com envolvimento da produção de EROs. Não foram encontrados estudos na literatura com o [10]-gingerol envolvendo especificamente danos ao DNA.

4.10 Ensaio de Fragmentação do DNA

Uma das características indicativas de apoptose é a fragmentação do DNA, que pode ser observada em gel de agarose submetido à eletroforese (Iglesias-Guimaraes *et al.*, 2013). Na

Figura 17 é possível observar claramente a fragmentação do DNA de células MDA-MB-231 após tratamento com [10]-gingerol na concentração de 100 μM , formando padrão em escada similar ao do controle positivo para indução de apoptose, camptotecina. Estudos utilizando tratamento com 75 μM [6]-gingerol em células de tumor de próstata da linhagem LNCaP, demonstraram resultados similares de fragmentação em padrão escada (Shukla *et al.*, 2007). Chakraborty *et al.* (2012) também verificou fragmentação de DNA de células HeLa tratadas com 125 $\mu\text{g/mL}$ de [6]-gingerol. Outros pesquisadores realizaram tratamentos em células de carcinoma colorretal COLO 205 com 60 μM de [6]-gingerol e [6]-shogaol e observaram a fragmentação do DNA nesta linhagem (Pan *et al.*, 2008). Não há estudos na literatura envolvendo [10]-gingerol e fragmentação de DNA.

FIGURA 17: Fragmentação do DNA de células MDA-MB-231 por ação do [10]-gingerol.



Células da linhagem MDA-MB-231 foram tratadas com [10]-gingerol em diferentes concentrações. A fragmentação do DNA pode ser notada no tratamento com a concentração de

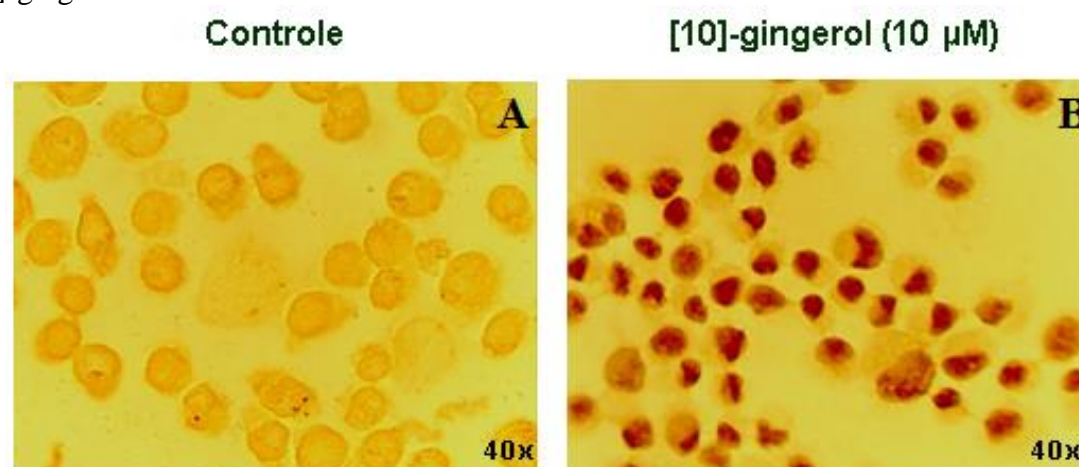
100 μ M, formando padrão em escada similar ao do controle positivo camptotecina (setas). M: marcador; CO: controle não tratado; CA: tratamento com camptotecina.

4.11 Ensaio de TUNEL

O ensaio de TUNEL consiste na marcação de nucleotídeos nas extremidades 3' de moléculas de DNA de dupla fita clivadas através de uma enzima transferase terminal. Pode-se deste modo detectar a presença de DNA fragmentado diretamente em células ou tecidos, o que é indicativo de apoptose (Hornsby e Didenko, 2011).

A Figura 18 apresenta as diferenças de coloração entre as células do controle e as células tratadas com [10]-gingerol, que apresentam núcleos marrom escuros devido à marcação com DAB. Deste modo, o ensaio de TUNEL confirmou os efeitos do [10]-gingerol em provocar fragmentação do DNA, confirmando, portanto, seu efeito apoptótico.

FIGURA 18: Ensaio de TUNEL mostrando células MDA-MB-231 tratadas com 10 μ M de [10]-gingerol.



Foi realizada a reação de marcação e coloração com DAB. As imagens correspondem a campos representativos do controle e do tratamento.

Estudos realizados em células HeLa tratadas com 75 μ g/mL de [6]-gingerol (Chakraborty *et al.*, 2012) e em células de hepatocarcinoma HepG2 (Yang *et al.*, 2012) tratadas com 50 μ M de [6]-gingerol também demonstraram que este composto provoca danos ao DNA.

Não há nenhum estudo que utilize a técnica de TUNEL com [10]-gingerol na literatura, entretanto, alguns autores demonstraram efeitos pró-apoptóticos desta molécula em células de carcinoma de cólon da linhagem HCT116 tratadas com 10 μ M de [10]-gingerol (Ryu e Chung, 2015).

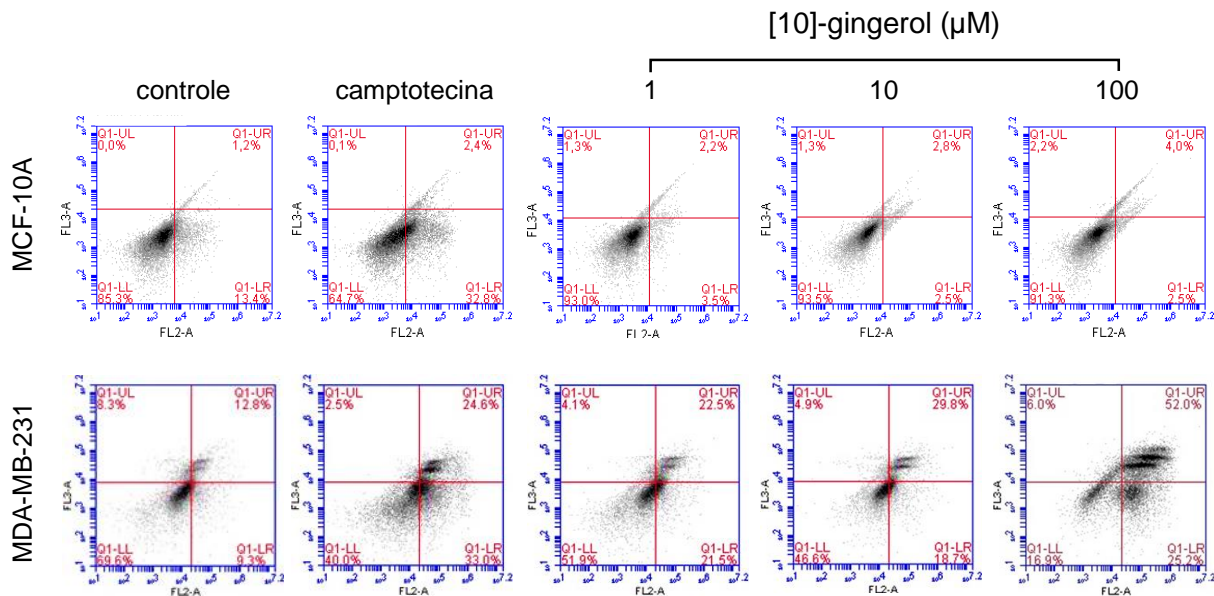
4.12 Ensaio de Apoptose com Anexina V por Citometria de Fluxo

Para verificar a capacidade do [10]-gingerol de induzir apoptose nas células tumorais da linhagem MDA-MB-231 e MCF-10A, foram realizados testes com o kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences). O kit consiste em um fluoróforo, a ficoeritrina (PE), ligado à anexina V, uma proteína capaz de se ligar à fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana, mantido normalmente na face citosólica, que é externalizado no início da apoptose e 7-aminoactinomicina D (7-AAD), corante fluorescente marcador de viabilidade celular que possui alta afinidade pelo DNA mas é excluído por células vivas que possuem membrana plasmática íntegra (Neves e Brindle, 2014). Os resultados pela citometria de fluxo estão apresentados na Figura 19.

Na Figura 19 é possível observar os gráficos de pontos obtidos através da citometria de fluxo. Os gráficos apresentam a fluorescência de 7-AAD no eixo x e de PE, ligado à anexina V, no eixo y. No quadrante superior esquerdo (UL) estão as células marcadas somente com 7-AAD, ou seja, mortas por necrose. No quadrante inferior direito (LR) aparecem as células marcadas somente com PE-Anexina V, externalizando fosfatidilserina, o que pode significar apoptose inicial. No quadrante superior direito (UR) estão as células duplo-positivo, portanto em apoptose tardia. As células duplo-negativo, vivas, aparecem no quadrante inferior esquerdo (LL). Nota-se que houve um aumento gradual no número de células apoptóticas proporcional ao aumento da concentração de [10]-gingerol utilizada no tratamento das amostras. Observa-se

um aumento tanto no número de células marcadas quanto na intensidade de fluorescência nas células tratadas com 1, 10 e 100 μM de [10]-gingerol

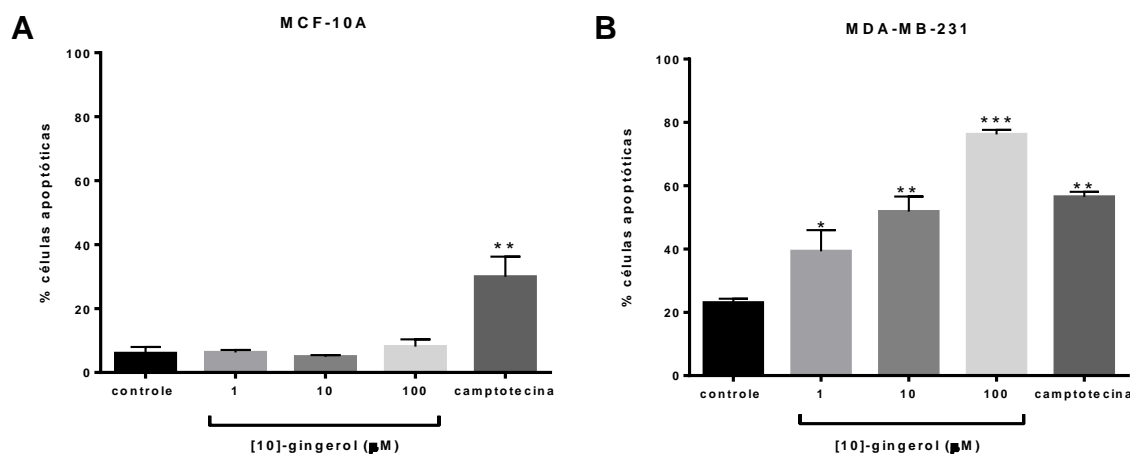
FIGURA 19: Efeito do [10]-gingerol sobre a apoptose.



Células MDA-MB-231 ou MCF-10A foram analisadas por citometria de fluxo após tratamento com 7-AAD e PE-Anexina V. As células foram tratadas com diferentes concentrações de [10]-gingerol. Cada ponto dos gráficos representa uma célula, no eixo x: fluorescência de 7-AAD e no eixo y: PE, ligado a anexina V. Quadrante UL: células marcadas somente com 7-AAD. Quadrante LR: células marcadas com PE-Anexina V. Quadrante UR: células duplo-positivo. Quadrante LL: células duplo-negativo. As imagens correspondem a uma replicata representativa de cada condição.

Um gráfico de barras (FIGURA 20) realizado a partir dos dados obtidos em triplicata, utilizando a soma das células dos quadrantes UR e LR de cada amostra, demonstra que esse aumento é significativo e gradual nas concentrações de 1, 10 e 100 μM , indicando que o [10]-gingerol é um possível indutor de apoptose em células MDA-MB-231. Não houve, porém, mudanças significativas entre as células MCF-10A tratadas com [10]-gingerol e o controle, o que sugere uma ação apoptótica seletiva do [10]-gingerol em células tumorais. Não foram encontrados dados similares na literatura. Contudo, estudos realizados por Chakraborty e colaboradores (2012) com FITC-anexina V, demonstraram que o [6]-gingerol foi capaz de induzir apoptose em células HeLa, via caspase 3.

FIGURA 20: Efeito do [10]-gingerol sobre a apoptose em MCF-10A e MDA-MB-231



(A) MCF-10A (B) MDA-MB-231. Gráfico de barras realizado a partir dos dados obtidos, utilizando a soma das células dos quadrantes UR e LR de cada amostra. * $P < 0,0001$

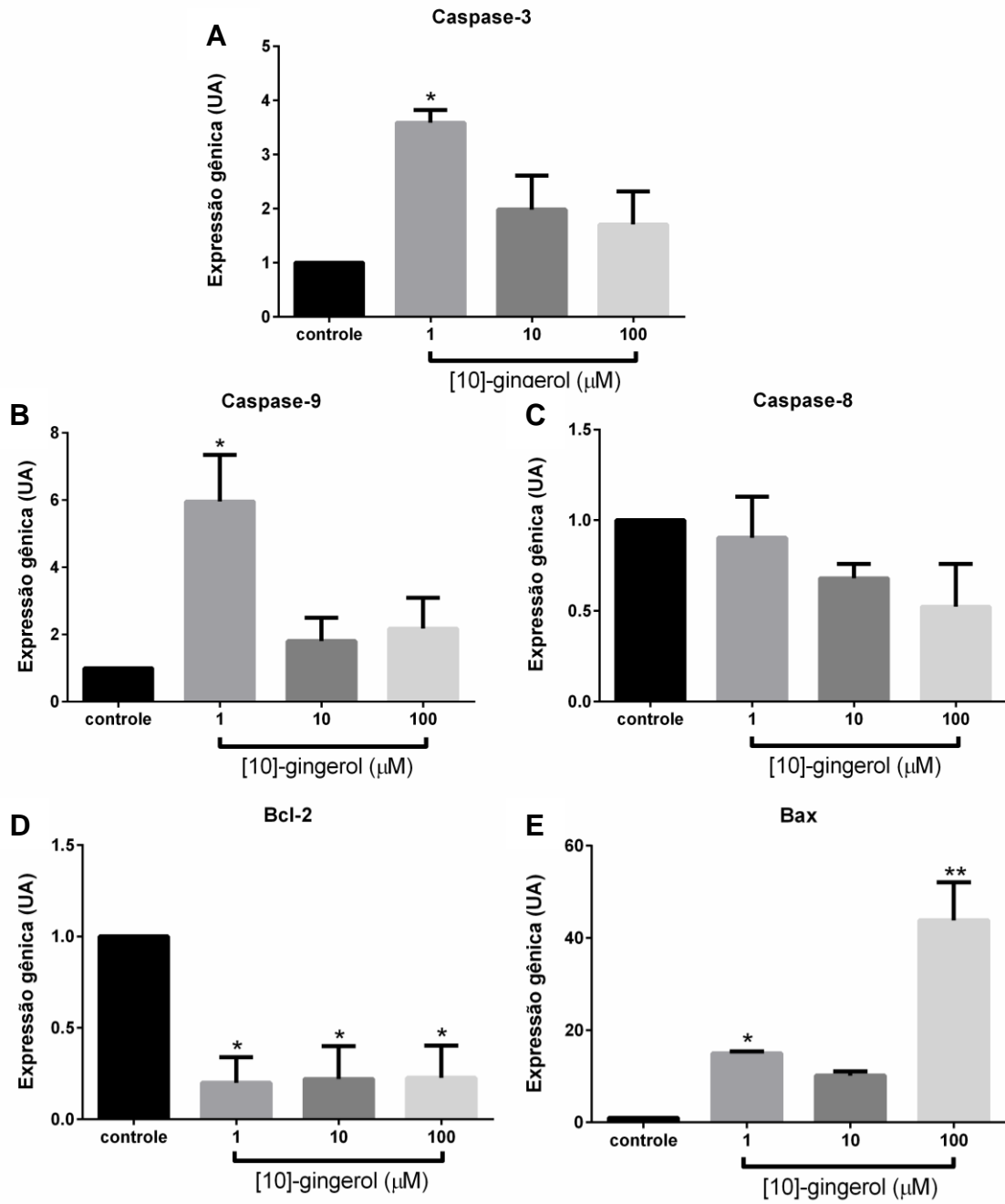
4.13 PCR quantitativa em tempo real

Tendo o [10]-gingerol mostrado possuir efeito pró-apoptótico, foram realizados experimentos de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para verificar a expressão de genes relacionados à apoptose, como das caspases iniciadoras, *caspase-8* e *caspase-9* e da caspase efetora, *caspase-3*, bem como os membros da família Bcl-2, que regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, como *Bcl-2*, anti-apoptótico e *Bax*, pró-apoptótico.

Os resultados estão apresentados na Figura 21 e demonstram que o [10]-gingerol, em baixas concentrações (1 μM), aumentou a expressão gênica de *caspase-3* e *-9*, sem efeito significativo sobre a expressão gênica de *caspase-8*. Nas concentrações maiores (10 e 100 μM) também é possível observar um aumento na expressão gênica destas duas caspases, porém não de maneira significativa em relação ao controle. Ainda, em todas as concentrações testadas, houve uma pronunciada redução na expressão de *Bcl-2*, gene que codifica a proteína anti-

apoptótica de mesmo nome, enquanto houve aumento na expressão de *Bax*, gene que codifica proteína pró-apoptótica, sendo este aumento significativo em relação ao controle nas concentrações de 1 e 100 μM .

FIGURA 21: Efeitos do [10]-gingerol na expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos em células da linhagem MDA-MB-231 tratadas com [10]-gingerol..



* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

Em trabalho recente de Ryu e Chang (2014) utilizando [10]-gingerol em células de carcinoma de cólon da linhagem HCT116, também foi observado aumento na razão *Bax/Bcl-2* e aumento na expressão de *caspase-3* e *caspase-9* de maneira dependente de concentração. Os resultados aqui apresentados estão de acordo com o observado por estes autores. Fan (2015) verificou aumento na razão de *Bax/Bcl-2* em células de osteossarcoma tratadas com [6]-gingerol.

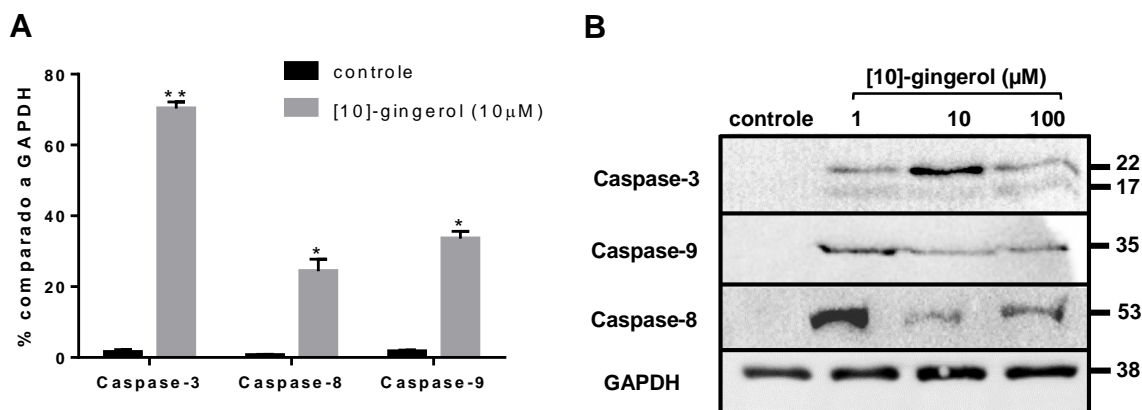
4.14 *Western Blotting*

Foi realizado, adicionalmente ao ensaio de RT-qPCR, o ensaio de *western blotting* para verificar os níveis proteicos de caspase-3, caspase-8 e caspase-9 nas células MDA-MB-231 tratadas com [10]-gingerol. Foram realizados também testes com as proteínas Bcl-2 e Bax, porém, não foi possível detectá-las em nenhum dos experimentos realizados. Os resultados (FIGURA 22) demonstraram que o tratamento das células MDA-MB-231 com [10]-gingerol induz um aumento dos níveis proteicos de todas caspases em comparação com os controles não tratados, porém, com algumas diferenças entre as concentrações utilizadas. Também é possível observar a presença de duas bandas distintas e de massas moleculares diferentes para caspase-3, indicando possível clivagem e ativação de caspase-3 e, portanto, apoptose dependente de caspases. Pode-se notar a caspase-8 aumentada em relação ao controle na concentração de 1 μM , e menos acentuada em 10 μM e 100 μM , de maneira similar ao que aconteceu na expressão gênica, embora não tenha sido significativa nesta outra técnica. A caspase-9 também apresentou padrão de aumento similar, também observado na RT-qPCR e significativo somente para 1 μM .

Fan e colaboradores (2015) observaram aumento nos níveis proteicos de caspase-3, caspase-8 e caspase-9 em células de osteossarcoma tratadas com [6]-gingerol. Chakraborty *et al.* (2012) também verificaram aumento nos níveis proteicos de caspase-3 em células HeLa

tratadas com 125 µg/mL de [6]-gingerol. Radhakrishnan *et al.* (2014) observaram em células de carcinoma de cólon SW-480, tratadas com [6]-gingerol apoptose dependente de caspases, com aumento nos níveis proteicos de caspase-3, -7, -8 e -9 além da ativação das mesmas. Ryu e Chung (2014) também observaram o aumento dos níveis de caspases-3 e -9 e da presença de suas formas clivadas ativas em células HTC116 de carcinoma de cólon tratadas com [10]-gingerol. Este é, até o momento, o único trabalho na literatura que verifica níveis de caspases após tratamento com [10]-gingerol.

FIGURA 22: Efeitos do [10]-gingerol nos níveis proteicos de caspases em células MDA-MB-231.



(A) Efeitos nos níveis proteicos de caspases em células MDA-MB-231 incubadas com diferentes concentrações de [10]-gingerol. Anti-GAPDH conjugado com HRP foi usado como controle endógeno. (B) A expressão proteica foi normalizada para o controle endógeno GAPDH, determinada em unidades arbitrárias (UA)* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

4.15 Adesão celular

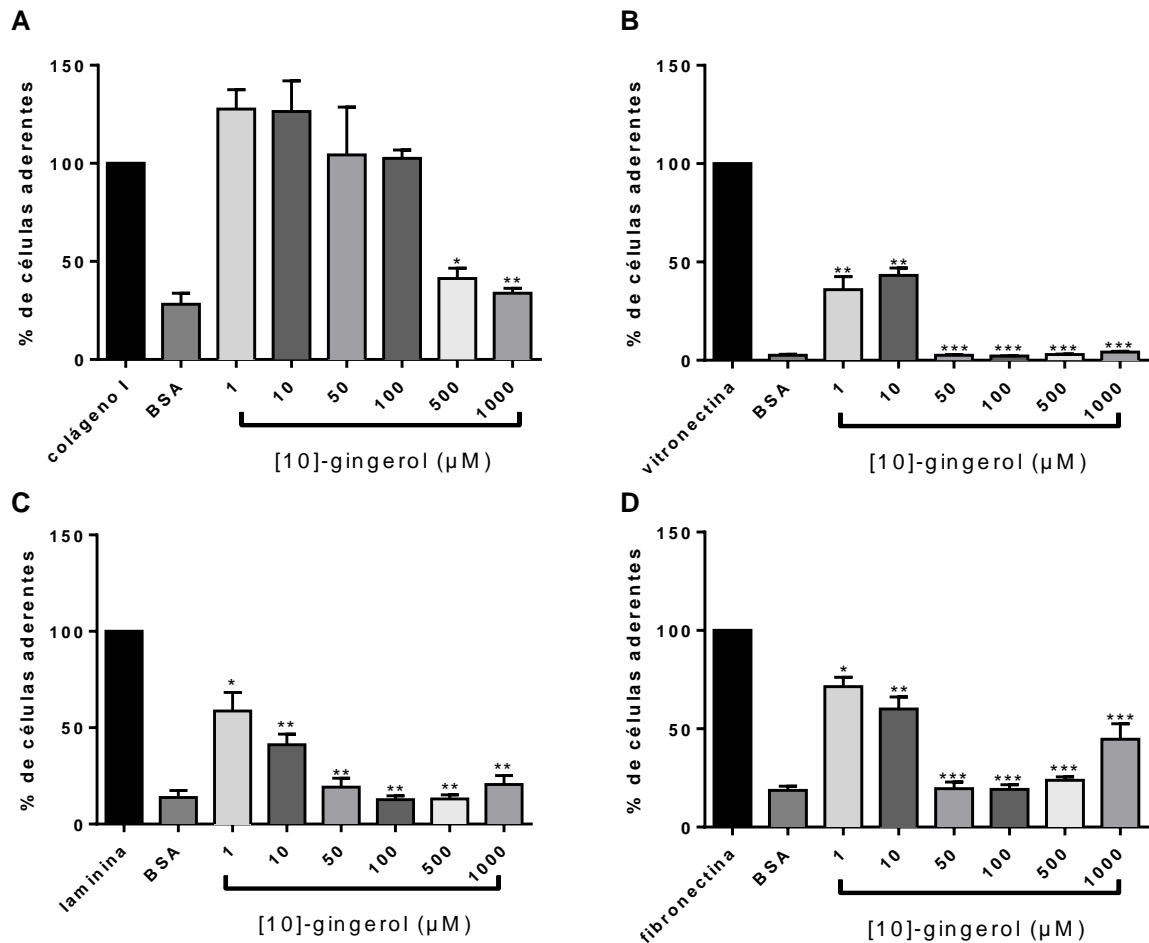
A capacidade de adesão das células tumorais, devido a expressão de oligossacarídeos aberrantes em sua superfície capazes de interagir fortemente com a matriz extracelular, é uma das responsáveis pelo potencial metastático dessas células (Goetz *et al.*, 2009). Para verificar o efeito do [10]-gingerol sobre a adesão celular foi realizado um ensaio com colágeno tipo I que mostrou redução significativa na adesão ao colágeno tipo I nos tratamentos com concentrações de 500 e 1000 µM. Entretanto, a MEC é bastante complexa, estando alguns de seus

componentes, tais como a laminina, a fibronectina e a vitronectina muito envolvidos na progressão tumoral participando de eventos como a proliferação e invasão (Arjonen *et al.*, 2011). É sabido que interações entre células e MEC mediadas por integrinas que se ligam à laminina, como as integrinas $\alpha6\beta1$ e $\alpha6\beta4$, são necessárias para a sobrevivência de células tumorais (Correia e Bissell, 2012). Sendo assim, foram realizados experimentos de adesão utilizando outras proteínas da MEC de modo a elucidar os efeitos do [10]-gingerol sobre as interações célula-MEC.

Na Figura 23 observa-se um gráfico representativo da porcentagem de células aderidas normalizado para o controle apenas com colágeno tipo I, com adição de DMSO, com albumina de soro bovino (BSA) como controle negativo de adesão, e os tratamentos com concentrações diversas de [10]-gingerol. É possível notar que só houve uma diminuição significativa nas concentrações de 500 e 1000 μM , capazes de reduzir a adesão celular em 50% em relação ao controle.

É possível notar que houve diminuição significativa na adesão das células MDA-MB-231 à vitronectina, laminina e fibronectina quando estas foram previamente incubadas com [10]-gingerol a partir de concentrações de 1 μM . O [10]-gingerol inibiu a adesão das células MDA-MB-231 à vitronectina, laminina e fibronectina em 60%, 40% e 20%, respectivamente, comparado ao controle. Não foram encontrados resultados similares na literatura. Em estudo realizado por Lee *et al.* (2008), contudo, uma concentração de 10 μM de [6]-gingerol inibiu em 16% a adesão de células MDA-MB-231 à fibronectina, o que é parcialmente condizente com os resultados aqui apresentados.

FIGURA 23: Efeitos do [10]-gingerol sobre a adesão de células MDA-MB-231 a proteínas da matriz extracelular.



(A) Colágeno tipo I, (B) Vitronectina; (C) Laminina e (D) Fibronectina 5 n* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P < 0,001$.

O resveratrol, composto fenólico encontrado na uva e no amendoim, é um produto natural capaz de interagir com a integrina $\alpha V\beta 3$, que se liga à vitronectina da MEC. A ligação do resveratrol com o seu sítio receptor na unidade $\beta 3$ da integrina impede a adesão à vitronectina e leva células tumorais de mama das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 à apoptose via fosforilação da p53 e ativação de ERK1/2 (Lin *et al.*, 2006). Os resultados obtidos sugerem que o [10]-gingerol pode ser capaz de interagir de alguma maneira com as integrinas presentes nas células MDA-MB-231, impedindo sua adesão e mesmo desencadeando eventos que levam à

apoptose. Porém outros estudos são necessários para confirmar e esclarecer como se dá esta interação.

4.16 Morfologia em cultura tridimensional

Após a análise dos efeitos do [10]-gingerol utilizando culturas tradicionais em monocamada, foram realizados testes para avaliar os efeitos deste composto em culturas tridimensionais, durante o período de estágio no exterior deste trabalho.

Para estabelecer a melhor concentração de [10]-gingerol para os experimentos 3D *on top*, um ensaio de morfologia foi realizado. Dois controles de reversão amplamente utilizados foram também testados para verificar qual deles seria o melhor para comparação com o [10]-gingerol: PD98059, um inibidor mecanístico de MAPK, e AIIB2, um anticorpo anti-integrina- β 1, inibidor da mesma. O primeiro teste 3D foi realizado com um amplo espectro de concentrações, 1 μ M a 100 μ M de [10]-gingerol, determinado previamente em um ensaio com Alamar Blue em cultura 2D em monocamada. Contudo, quando na cultura 3D, as células mostraram uma sensibilidade aumentada ao [10]-gingerol e as concentrações previamente definidas se mostraram muito altas, levando as células à morte de maneira muito rápida, o que inviabilizaria a realização dos experimentos subsequentes (resultados não apresentados).

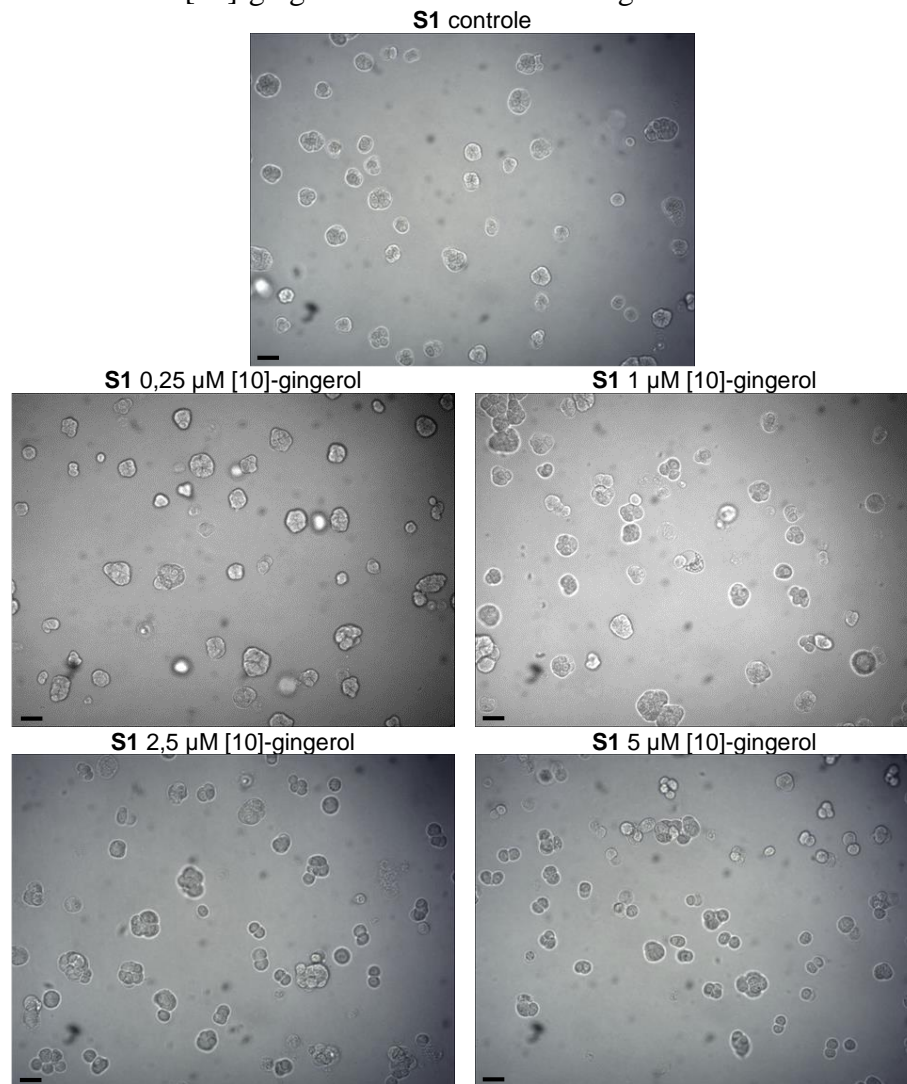
Um segundo experimento foi realizado e mostrou melhores resultados em concentrações abaixo de 5 μ M. A morfologia das células não-malignas não mostrou alterações após o tratamento com o [10]-gingerol, embora uma redução do tamanho das estruturas tridimensionais tenha sido observada nas concentrações maiores (FIGURA 24).

Por outro lado, células malignas T4-2 tratadas com [10]-gingerol apresentaram uma redução notável no tamanho das estruturas tridimensionais, similares às observadas nos tratamentos com PD98059 e anticorpo AIIB2, sugerindo pela primeira vez o [10]-gingerol provoca uma reversão do fenótipo maligno nesta linhagem. Quando tratadas com concentrações

acima de 2.5 μM foi observada desagregação das estruturas tridimensionais, além da formação de *blebs*, o que pode sugerir a ocorrência de apoptose (FIGURA 25).

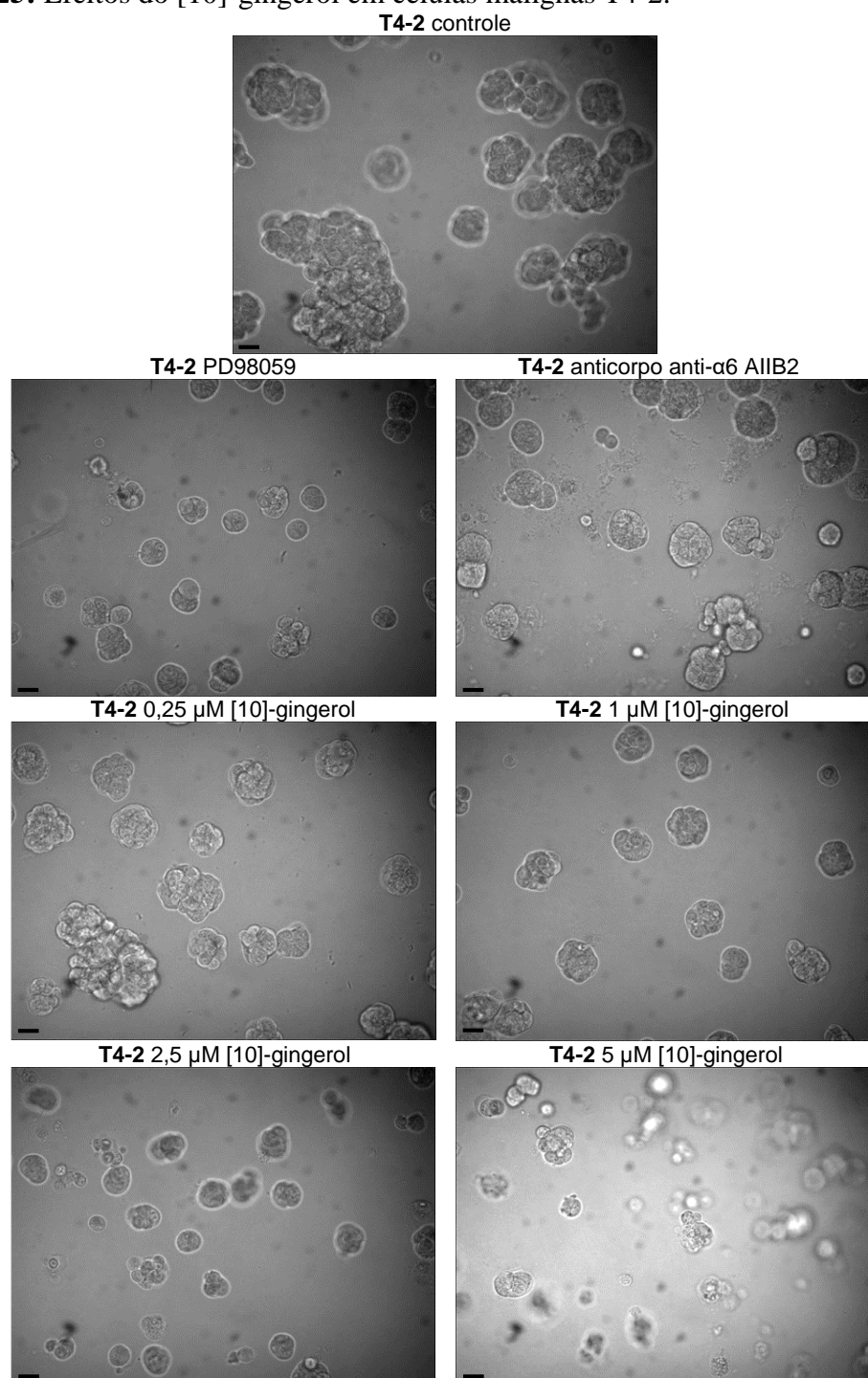
Para aproximar os estudos em 3D aos previamente realizados com [10]-gingerol em cultura bidimensional, células da linhagem MDA-MB-231 foram utilizadas como comparativo. Quando em cultura tridimensional *on top*, células MDA-MB-231 formam grandes estruturas similares a tumores. As células mostraram sensibilidade aumentada ao [10]-gingerol, com uma notável redução no tamanho das estruturas nos tratamentos superiores a 1 μM (FIGURA 26).

FIGURA 24: Efeitos do [10]-gingerol em células não malignas S1.



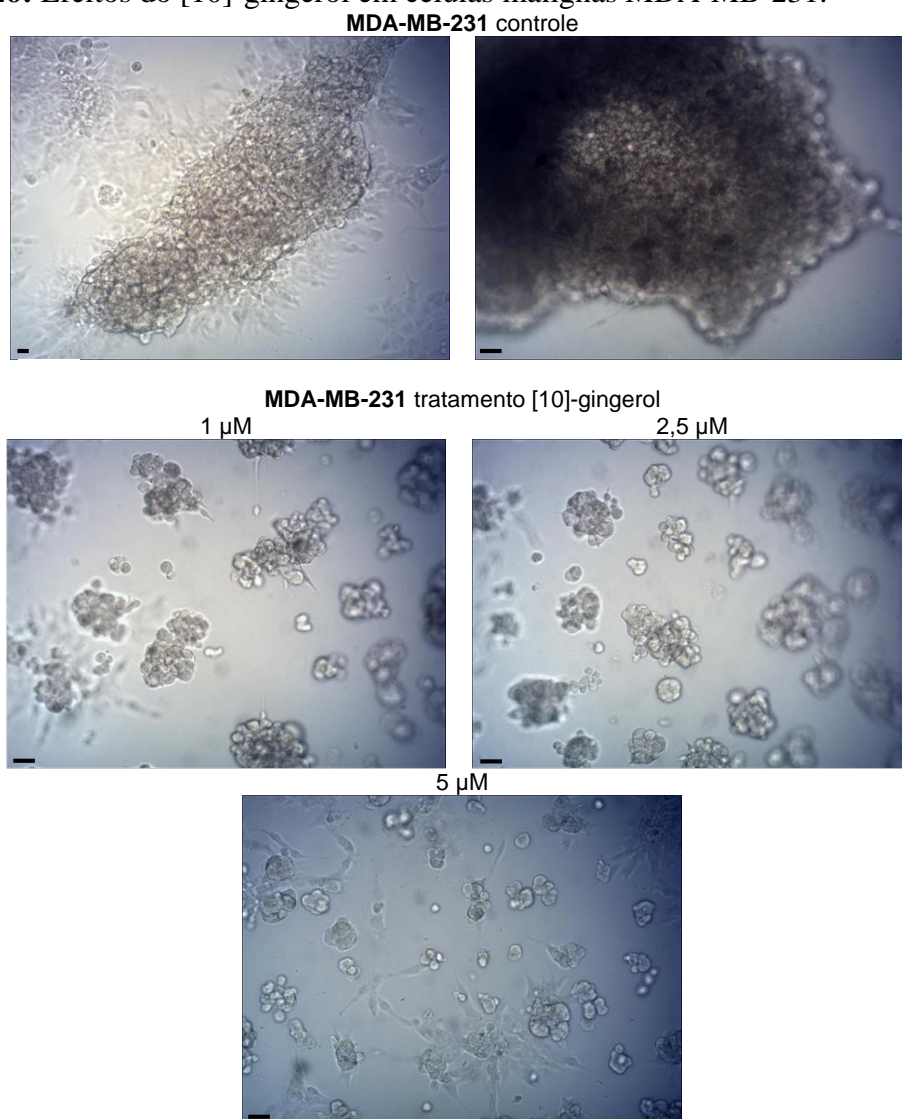
Placas de cultura foram cobertas com Matrigel[®] e mantidas em uma incubadora úmida 37 °C min para polimerização. As células foram tripsinizadas, contadas e semeadas sobre a matriz previamente formada e cobertas com meio gelado contendo de Matrigel[®] e concentrações indicadas de [10]-gingerol. Aumento 20 \times . Escala 40 μ m.

FIGURA 25: Efeitos do [10]-gingerol em células malignas T4-2.



Placas de cultura foram cobertas com Matrigel[®] e mantidas em uma incubadora úmida 37 °C min para polimerização. As células foram tripsinizadas, contadas e semeadas sobre a matriz previamente formada e cobertas com meio gelado contendo Matrigel[®] e concentrações indicadas 5 μde [10]-gingerol ou PD98059, inibidor de MAPK ou AIB2, um anticorpo anti-β1-integrina, inibidor da mesma, como controles de reversão. 1 μ. Aumento 20×. Escala 40 μm.

FIGURA 26: Efeitos do [10]-gingerol em células malignas MDA-MB-231.



Placas de cultura foram cobertas com Matrigel[®] e mantidas em uma incubadora 37 °C min para polimerização. As células foram tripsinizadas, contadas e semeadas sobre a matriz previamente formada e cobertas com meio contendo 10% de Matrigel[®] 5 μ e concentrações indicadas de [10]-gingerol 1 μ . Aumentos 10 \times (primeira imagem) e 20 \times (demais imagens). Escala 40 μ m.

4.17 Imunocitoquímica de fluorescência

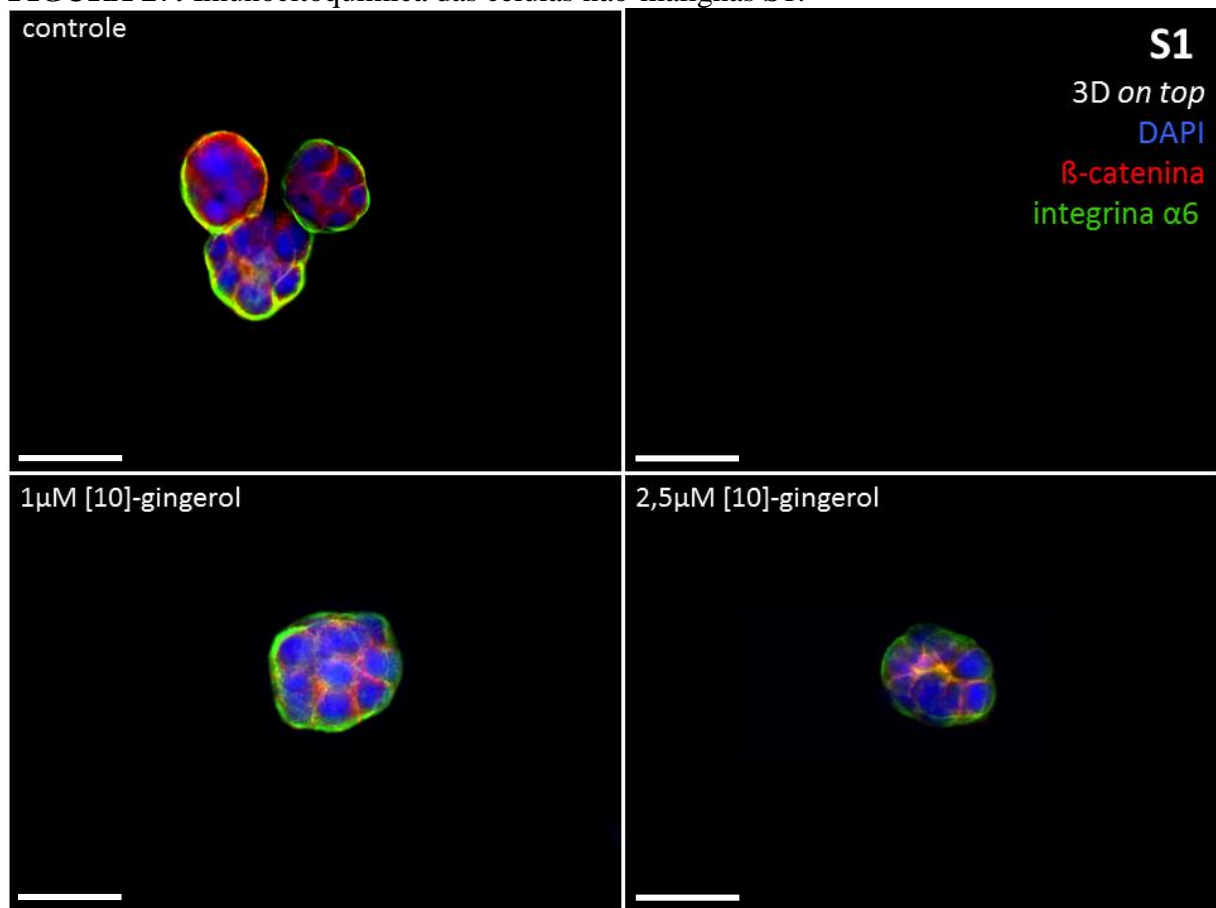
Células não malignas S1 crescem em cultura tridimensional formando estruturas acinares de crescimento limitado. A estrutura basoapical polarizada é garantida pelas junções célula-membrana basal. As junções basais contém integrinas $\alpha 6/\beta 4$ ligadas à laminina da membrana basal e as junções célula-célula contendo β -catenina e E-caderina estão localizadas lateralmente em junções aderentes (Weaver *et al.*, 2002; Vidi *et al.*, 2013). Já células malignas T4-2 não apresentam polaridade basoapical, mas formam estruturas multicelulares desorganizadas, similares a tumores, com intensa proliferação, assegurada pela hiperexpressão de EGFR. As interações com a MEC são mediadas por integrinas- $\beta 1$ altamente expressas. É possível reverter o fenótipo maligno bloqueando integrina- $\beta 1$ ou inibindo EGFR ou a via da MAPK, reestabelecendo a polaridade e obtendo estruturas acinares similares às células não malignas. (Wang *et al.*, 1998; Weaver *et al.*, 2002; Vidi *et al.*, 2013).

Para verificar se o tratamento com [10]-gingerol seria capaz de reverter o fenótipo maligno invasivo e desorganizado das células T4-2, foi realizada uma imunocitoquímica utilizando anticorpos anti-integrina- $\alpha 6$ e anti- β -catenina. Os resultados corroboraram com o ensaio de morfologia realizado anteriormente. As estruturas tridimensionais das células T4-2 estavam não só menores como também foram revertidas quando tratadas com [10]-gingerol. As estruturas exibiram organização similar a dos organoides acinares das células S1 (FIGURA 27) bem como a dos controles de reversão, tratados com PD98059 e AIIB2 (FIGURA 28). Por outro lado, as células MDA-MB-231 tratadas apresentaram redução no tamanho das estruturas, porém não foi observada reorganização (FIGURA 29).

Os resultados, como esperado, também mostraram a ausência de caspase-3 clivada nas células S1 tratadas com [10]-gingerol (FIGURA 29), com valores baixos, próximos aos do controle (2,5%) (FIGURA 32). Contudo, estruturas de células T4-2 revertidas revelaram uma

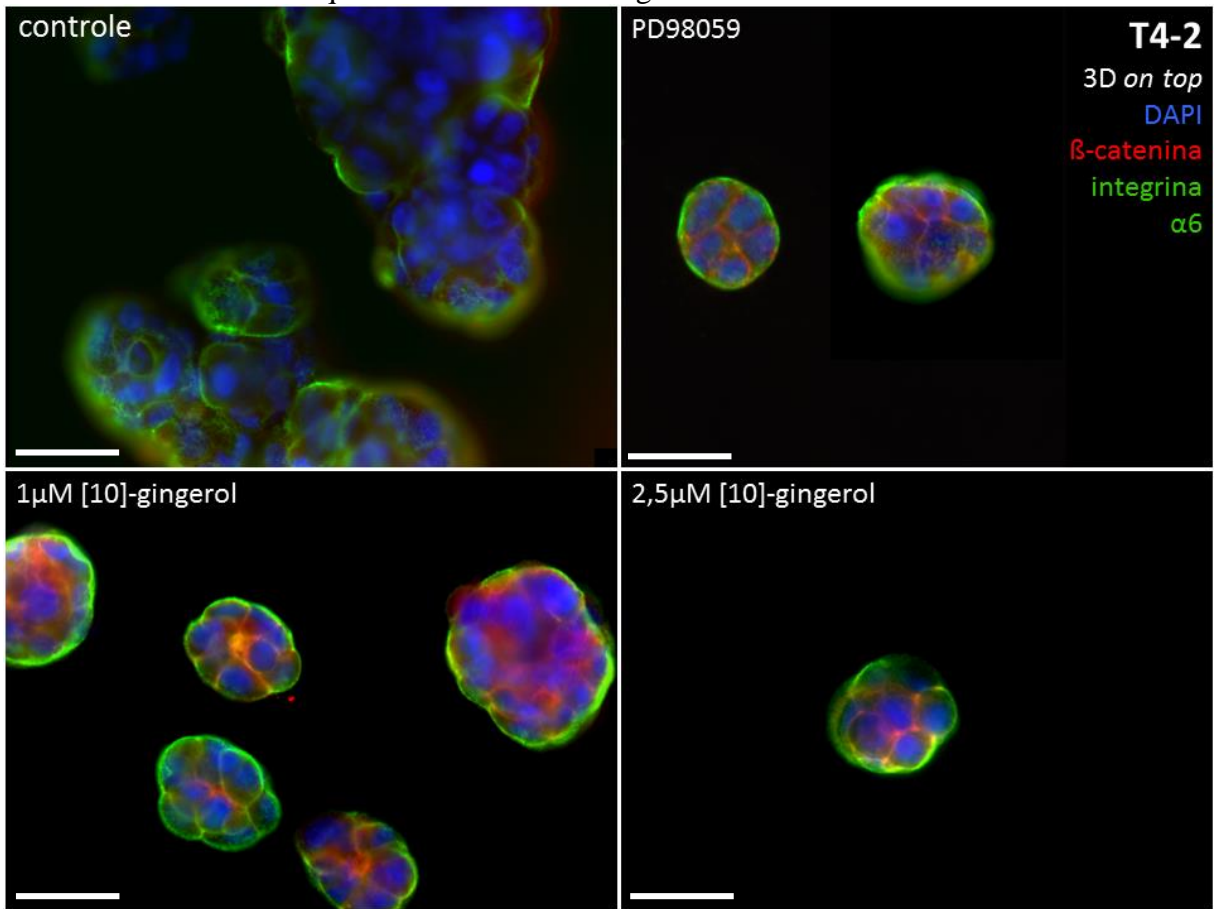
forma peculiar de apoptose, com a concentração de caspase-3 no centro, no compartimento luminal em cerca de 25% das células (FIGURA 32). Esse fenômeno pode ser explicado pelas interações das células localizadas basalmente com a MEC, as quais garantem proteção contra a apoptose (Weaver e Bissell, 1999b; Weaver *et al.*, 2002). Novamente, como esperado, as estruturas desorganizadas de células MDA-MB-231 mostraram marcação positiva massiva para caspase-3 clivada, conforme os resultados prévios em cultura de monocamada, com cerca de 85% de células apoptóticas (FIGURAS 31 e 32). Porém, as concentrações necessárias para induzir apoptose foram menores que nos ensaios prévios em cultura bidimensional.

FIGURA 27: Imunocitoquímica das células não-malignas S1.



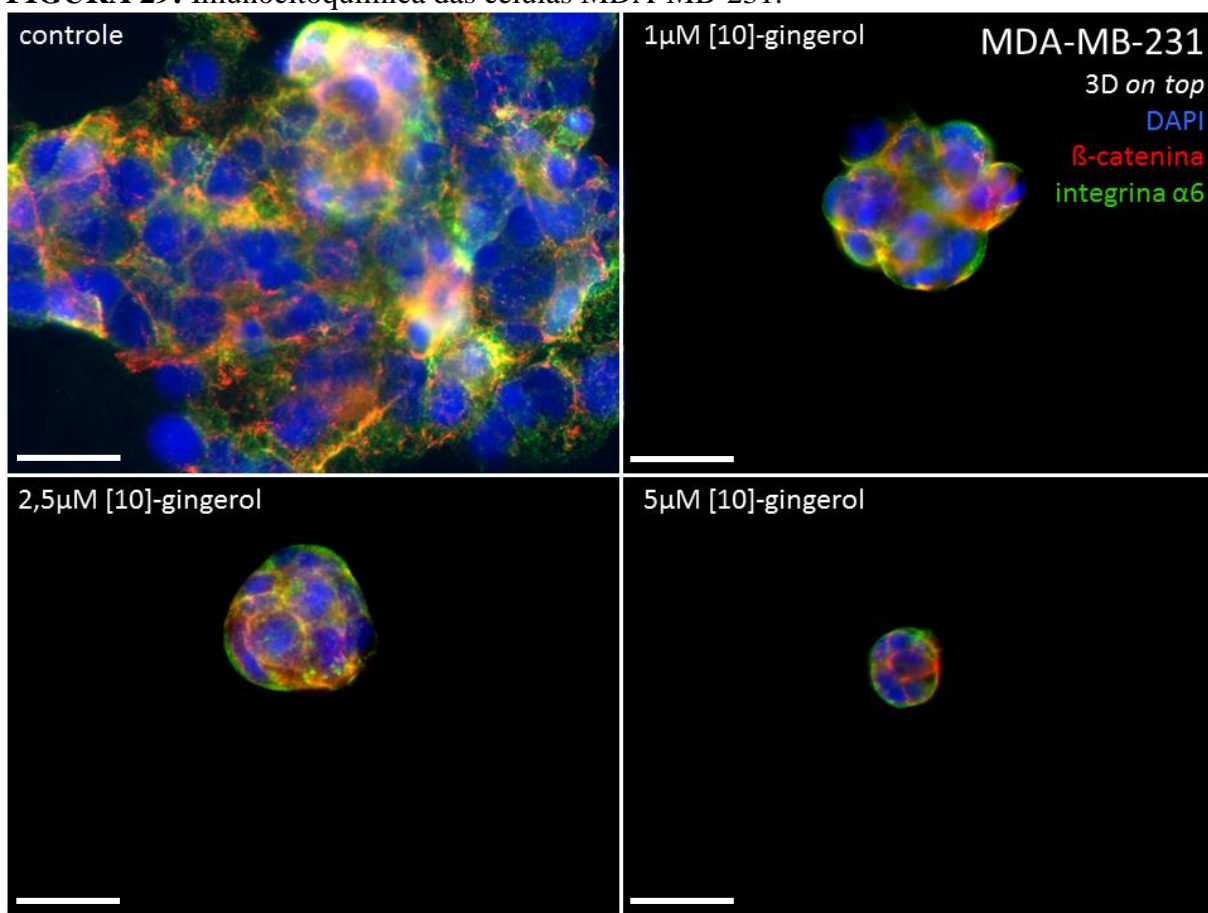
As estruturas tridimensionais foram coletadas dos poços onde cresceram, fixadas, incubadas com anticorpos primários anti-integrina α 6, anti- β -catenina e coradas com anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor. Os núcleos foram corados com DAPI. Aumento de 40 \times . Escala 40 μ m.

FIGURA 28: Imunocitoquímica das células malignas T4-2



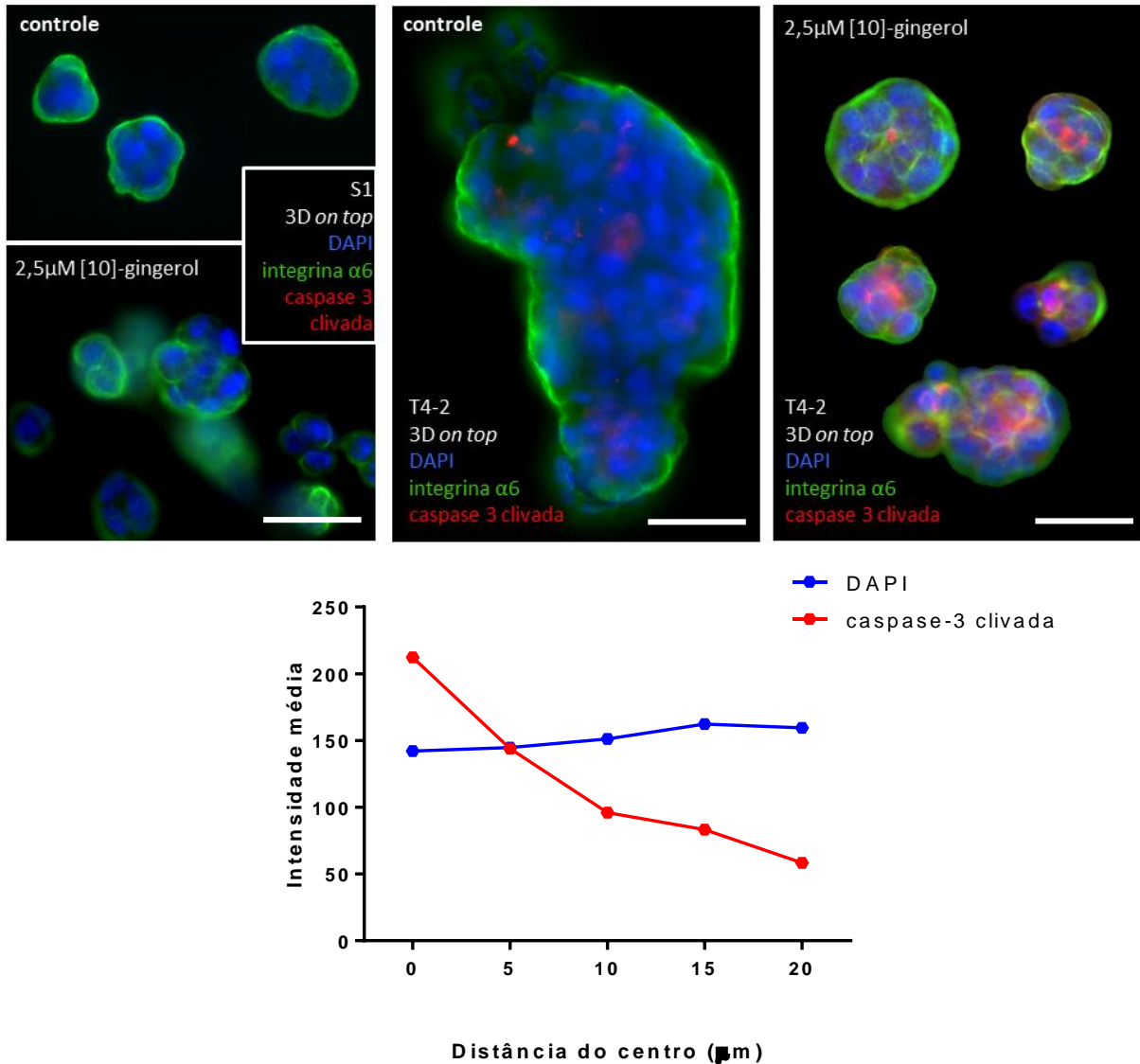
As estruturas tridimensionais foram coletadas dos poços onde cresceram, fixadas, incubadas com anticorpos primários anti-integrina $\alpha 6$, anti- β -catenina e coradas com anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor. Os núcleos foram corados com DAPI. Aumento 40 \times . Escala 40 μ m.

FIGURA 29: Imunocitoquímica das células MDA-MB-231.



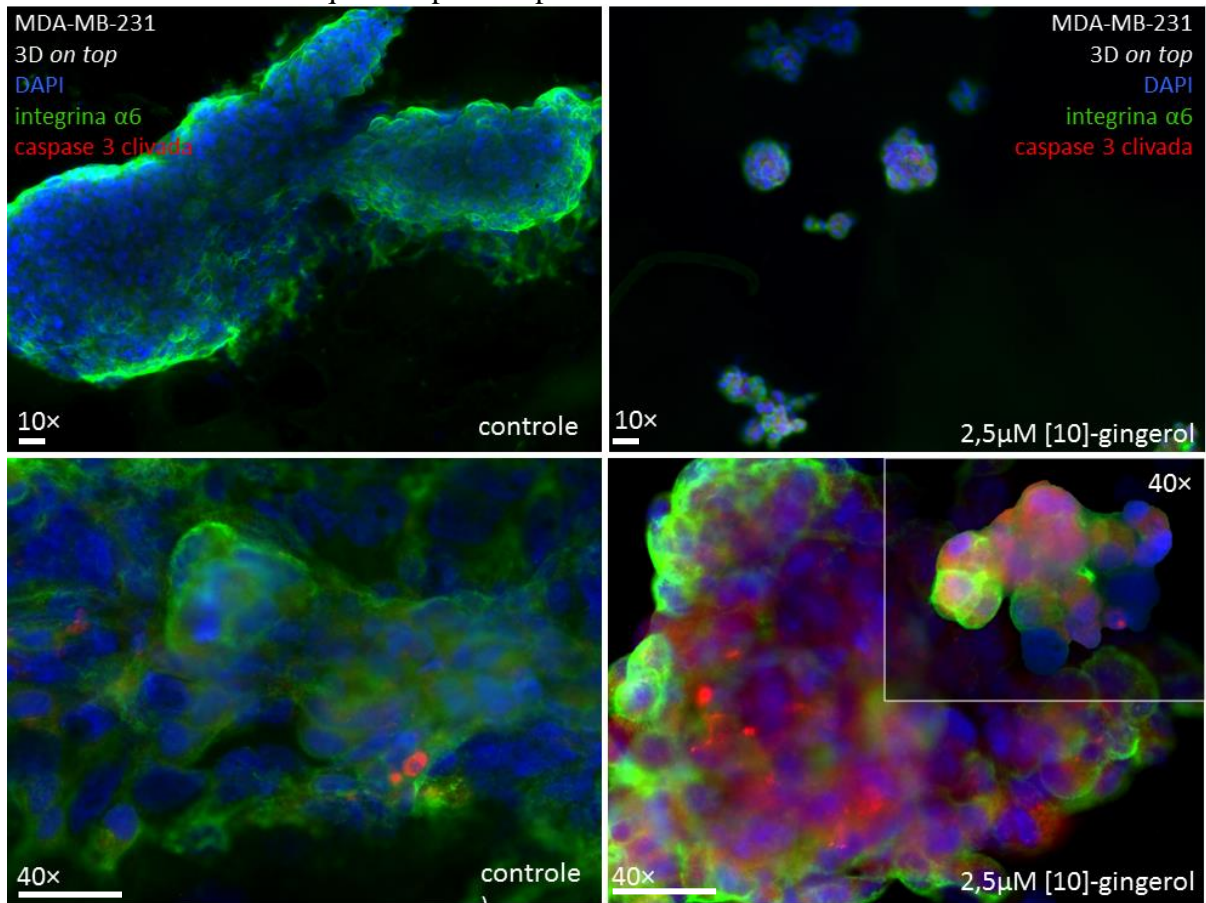
As estruturas tridimensionais foram coletadas dos poços onde cresceram, fixadas, incubadas com anticorpos primários anti-integrina $\alpha 6$, anti- β -catenina e coradas com anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor.5 μ Aumento 40 \times . Escala 40 μ m.

FIGURA 30: Imunocitoquímica para caspase-3 clivada das células da série de progressão tumoral HMT-3522.



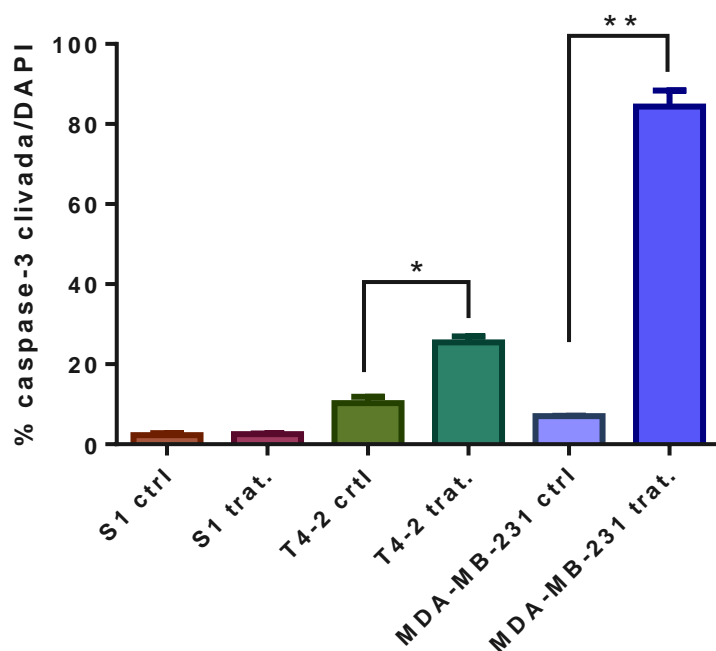
As estruturas tridimensionais foram coletadas dos poços onde cresceram, fixadas, incubadas com anticorpos primários anti-integrina $\alpha 6$ e anti-caspase-3 clivada e coradas com anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor. (A) Células S1 tratadas com veículo e 2.5 μM [10]-gingerol, negativas para caspase 3 clivada. (B) Células T4-2 tratadas com veículo. (C) Estruturas revertidas de células T4-2 tratadas, com apoptose localizada no lúmen. (D) Gráfico da intensidade de fluorescência média, mostrando um aumento na quantidade de caspase-3 clivada no centro das estruturas de T4-2 tratadas. Aumento de 40 \times . Escala 40 μm .

FIGURA 31: Imunocitoquímica para caspase-3 clivada das células MDA-MB-231.



As estruturas tridimensionais foram coletadas dos poços onde cresceram, fixadas, incubadas com anticorpos primários anti-integrina $\alpha 6$ e anti-caspase-3 clivada e coradas com anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor. As estruturas desorganizadas de células MDA-MB-231 são altamente positivas para caspase-3 clivada. Os painéis superiores mostram um aumento de 10 \times e os inferiores 40 \times . Escala 40 μ m.

FIGURA 32: Razão caspase-3 clivada/DAPI mostrando a taxa de apoptose nas células S1, T4-2 e MDA-MB-231.



* $P < 0,001$ e ** $P < 0,0001$.

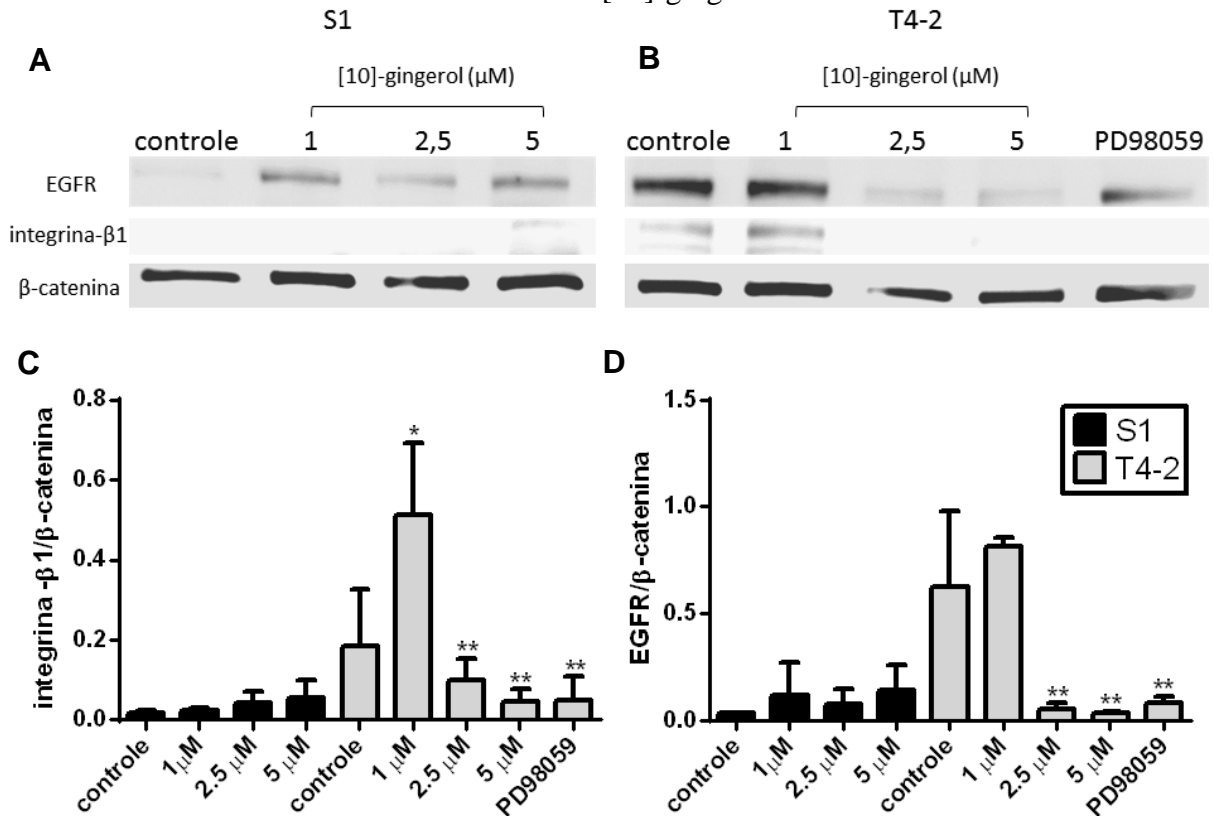
4.18 Western blotting

Dois importantes marcadores para progressão maligna são a hiperexpressão de receptores de crescimento epitelial (EGFR) e receptores de adesão integrina- β 1 (Weaver e Bissell, 1999b). Já foi demonstrado que, em estruturas tridimensionais, assim como *in vivo*, há uma modulação cruzada bidimensional entre estas duas vias de sinalização e que a supressão de crescimento observada em estruturas tridimensionais revertidas de células T4-2 está correlacionada com uma atenuação da ativação induzida de MAPK/EGF, o que poderia ser uma estratégia terapêutica alternativa contra o câncer de mama em estágios iniciais (Wang *et al.*, 1998). A inibição da ativação de MAPK ou a inibição de EGFR ou integrina- β 1 mediada por anticorpos induz uma diminuição na expressão de ambos os receptores (Wang *et al.*, 1998; Weaver e Bissell, 1999b).

Para verificar os níveis moleculares de EGFR e integrina- β 1, confirmando assim a ocorrência de reversão promovida pelo [10]-gingerol, um *western blotting* foi realizado. Os resultados mostraram que o [10]-gingerol é capaz de diminuir a expressão de ambos os receptores, EGFR e integrina- β 1, nas células T4-2, explicando assim a ocorrência de parada no crescimento e a recuperação da polaridade basoapical previamente observada nas estruturas tridimensionais. (FIGURA 33). A supressão é comparável ao do inibidor mecanístico de MAPK, PD98059 utilizado como controle. Células S1, que expressam níveis baixos de EGFR e integrina- β 1, não mostraram alterações significativas quando tratadas com [10]-gingerol, apenas variações sutis e não significativas foram observadas. Estes resultados vão de encontro com os resultados encontrados previamente nos ensaios de adesão, sugerindo que o [10]-gingerol possa modular a expressão de integrinas ou de proteínas em vias a elas relacionadas.

Estudos recentes demonstraram que a atividade antitumoral do [10]-gingerol em células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 são mediadas pela supressão de EGFR e inativação das atividades de Akt e MAPK (Joo *et al.*, 2016). Contudo, outros estudos em células HCT116 sugerem que a fosforilação de MAPK e proteínas como JNK, ERK, e p38 quinase acompanham a apoptose induzida por [10]-gingerol. Mesmo assim, estudos utilizando culturas em monocamada não são capazes de mimetizar um microambiente fisiologicamente relevante ao encontrado *in vivo*, o que sabidamente interfere de maneira massiva nas vias de sinalização. De fato, a capacidade do [10]-gingerol reduzir a expressão de EGFR e integrina- β 1, bem como sua atividade apoptótica, pode ser relacionada às vias MAPK, porém, mais estudos em modelos 3D e *in vivo* são necessários para revelar seu papel nestes eventos celulares.

FIGURA 33: Western blotting mostrando os níveis moleculares de EGFR e integrina- β 1 em células S1 e T4-2 em cultura 3D tratadas com [10]-gingerol.



Beta-catenina foi utilizada como controle endógeno. Imagem de uma replicata representativa para células (A) S1 e (B) T4-2. (C) Expressão de integrina- β 1 normalizada pela β -catenina. (D) Expressão de EGFR pela β -catenina. * $P < 0.001$.

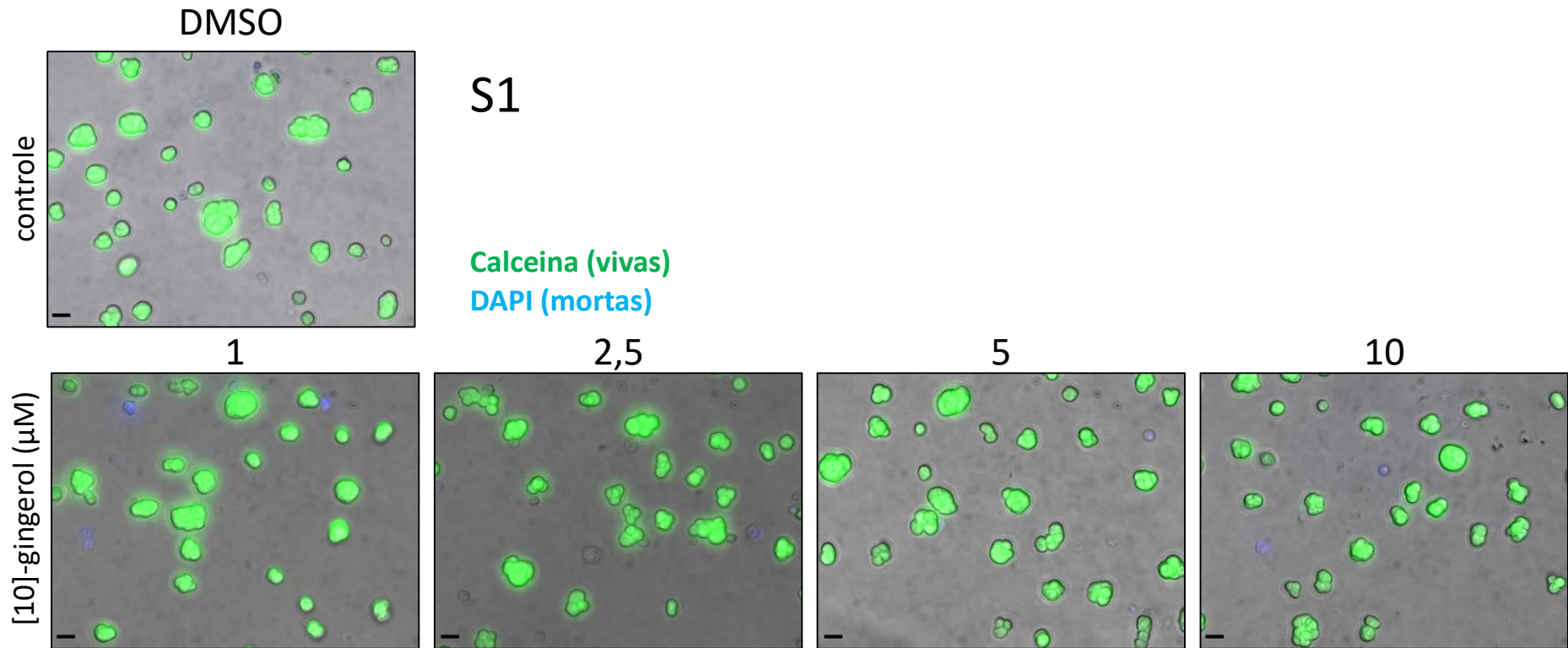
4.19 Ensaio de viabilidade Calceina-DAPI após a formação das estruturas

Está bem estabelecido que a polaridade basoapical confere resistência à apoptose em células normais, ou não malignas como as da linhagem S1 (Weaver *et al.*, 2002). Porém, nos resultados apresentados previamente (nos quais as células foram tratadas com [10]-gingerol no exato momento em que foram plaqueadas) foram observadas sutis diferenças entre a morfologia de células S1 tratadas e do controle (FIGURAS 24 e 27). Para melhor observar o efeito do [10]-gingerol sobre células normais em condições fisiológicas *in vivo*, nas quais as células normais são pré-existent no momento da formação de tumores e antes qualquer tratamento contra eles,

um modelo de ensaio de citotoxicidade que melhor mimetiza este ambiente foi realizado. Neste experimento o tratamento com [10]-gingerol se deu após o crescimento completo das estruturas das células não malignas e malignas em cultura tridimensional. Desta maneira foi possível observar o efeito do [10]-gingerol sobre as estruturas pré-formadas tanto malignas quanto não-malignas.

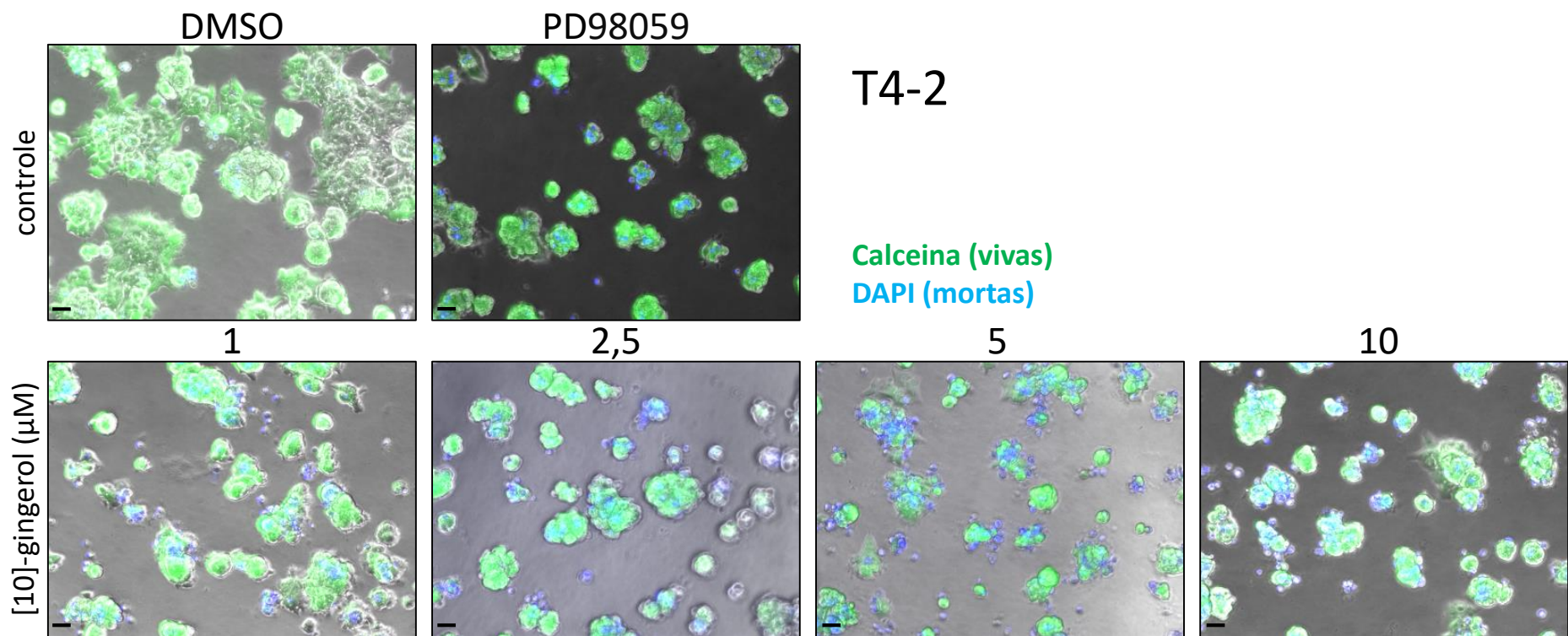
Para verificar o efeito do [10]-gingerol em estruturas tridimensionais pré-formadas, um ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando dupla coloração com calceína AM e DAPI. Após a formação das estruturas, 6 dias para células S1 e 4 dias para células T4-2 e MDA-MB-231 (que possuem crescimento mais rápido), as células foram tratadas com diferentes concentrações de [10]-gingerol por 3 dias. Células vivas são identificadas por uma coloração verde intenso e uniforme, devido a atividade de esterases intracelulares, que convertem enzimaticamente a calceína AM em calceína fluorescente, retida pelas células vivas. Por outro lado, células que perderam a integridade da membrana plasmática têm seu DNA nuclear corado com DAPI, que é excluído por células que possuem sua membrana intacta. Os resultados mostraram resistência aumentada das células S1 ao tratamento com [10]-gingerol. As células continuaram viáveis mesmo quando tratadas com concentrações até 10 μM de [10]-gingerol. Já nas estruturas pré-formadas das células T4-2 e MDA-MB-231, foi observada morte celular e conseqüente redução no tamanho das colônias (FIGURAS 34-36).

FIGURA 34: Ensaio de viabilidade Calceína AM/DAPI em células S1.



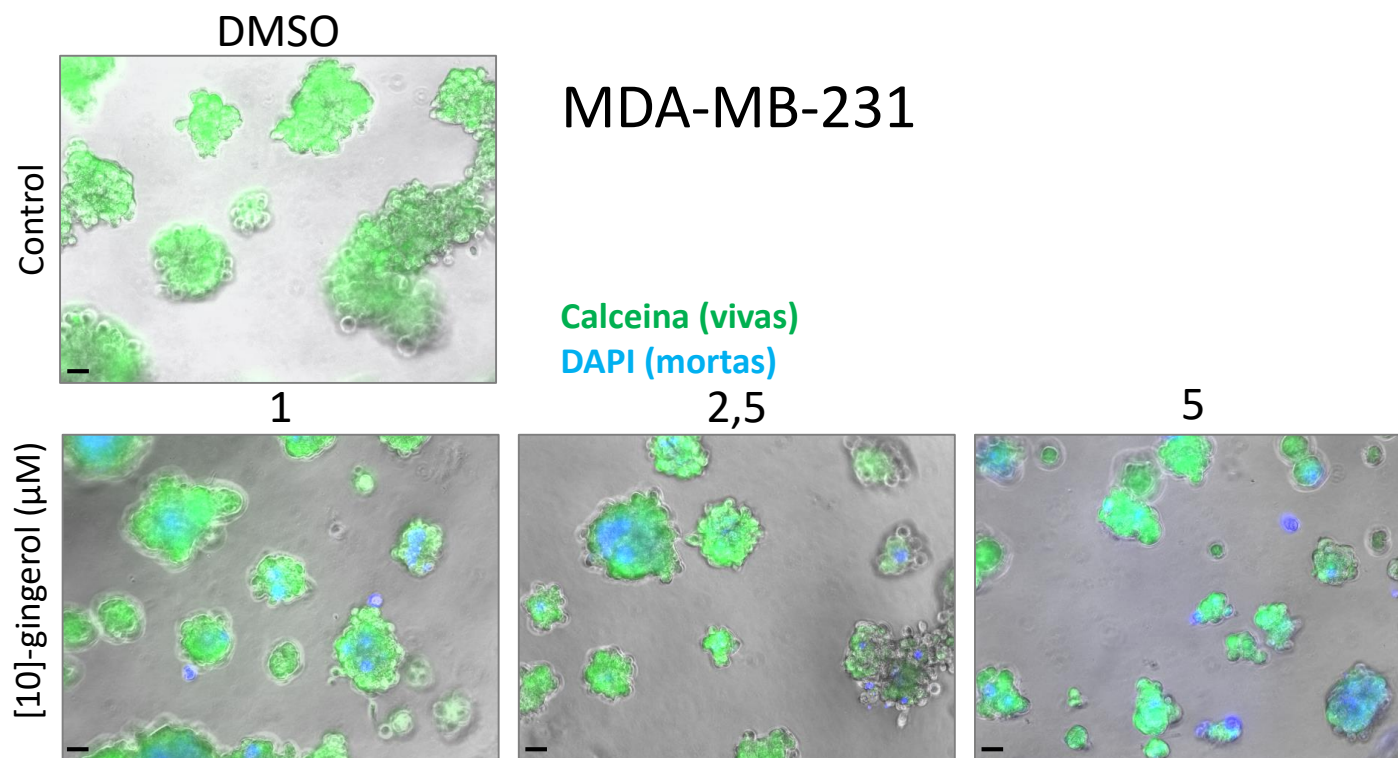
As células foram incubadas com Calceína AM e DAPI, após a formação das estruturas 3D e tratadas com as concentrações indicadas de [10]-gingerol por 3 dias. Células vivas são identificadas pela fluorescência verde e as células mortas são identificadas pela cor azul. Aumento 20×. Escala 40 μm.

FIGURA 35: Ensaio de viabilidade Calceína AM/DAPI em células T4-2.



Foi realizada a dupla marcação com Calceína AM e DAPI 4 dias após a formação das estruturas 3D e tratadas com as concentrações indicadas de [10]-gingerol por 3 dias. Células vivas são identificadas pela fluorescência verde e as células mortas são identificadas pela cor azul. Aumento 20×. Escala 40 μm.

FIGURA 36: Ensaio de viabilidade Calceína AM/DAPI em células MDA-MB-231.



Foi realizada a dupla marcação com Calceína AM e DAPI 4 dias após a formação das estruturas 3D e tratadas com as concentrações indicadas de [10]-gingerol por 3 dias. Células vivas são identificadas pela fluorescência verde e as células mortas são identificadas pela cor azul. Aumento 20×. Escala 40 μm.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS/ CONCLUSÕES

Foi possível constatar que o [10]-gingerol altera a morfologia de células tumorais da linhagem MDA-MB-231 em concentrações e tempos menores que a de células normais da linhagem MCF-10A, o que sugere uma ação específica dependente de concentração e tempo de tratamento do [10]-gingerol com células tumorais.

O [10]-gingerol também inibiu a adesão, migração e a invasão das células da linhagem MDA-MB-231 em concentrações baixas e induziu apoptose em concentrações maiores. Os efeitos apoptóticos do [10]-gingerol estão relacionados ao dano e fragmentação do DNA, aumento da razão *Bax/Bcl-2* e da expressão de *caspases-3* e *-9*, sugerindo atuação por ativação da via intrínseca da apoptose.

Além de sua atividade em cultura 2D, o [10]-gingerol também modifica a morfologia das estruturas formadas por células malignas em IrECM e uma seletividade do [10]-gingerol por células malignas foi observada. O composto foi também capaz de reverter o fenótipo maligno das células T4-2 por diminuição da expressão de EGFR e integrina $\beta 1$, além da indução de apoptose. Os resultados contribuíram para a elucidação do mecanismo de ação do [10]-gingerol, demonstrando que este composto possui potencial para estudos pré-clínicos e possivelmente, para estudos clínicos, especialmente na terapia combinatória com medicamentos já utilizados na quimioterapia.

REFERÊNCIAS

ALMADA DA SILVA, J. et al. Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 903, p. 157-62, Aug 15 2012. ISSN 1570-0232.

ANSARI, M. et al. Efficacy of Ginger in Control of Chemotherapy Induced Nausea and Vomiting in Breast Cancer Patients Receiving Doxorubicin-Based Chemotherapy. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 8, p. 3877-80, 2016. ISSN 1513-7368 (Print) 1513-7368.

ARJONEN, A.; KAUKONEN, R.; IVASKA, J. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. **Cell Adh Migr**, v. 5, n. 5, p. 421-30, Sep-Oct 2011. ISSN 1933-6918.

BOSSI, P. et al. Searching for Evidence to Support the Use of Ginger in the Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. **J Altern Complement Med**, v. 22, n. 6, p. 486-8, Jun 2016. ISSN 1075-5535.

BRASIL, M. D. S. Estimativa 2016. Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, 2015.

CHAKRABORTY, B. S. Cancer Drug Development - Key Regulatory Considerations. **Health Administrator**, v. 20, 1-2, p. 29-36, 2007.

CHAKRABORTY, D. et al. [6]-Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: drug-DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells. **Eur J Pharmacol**, v. 694, n. 1-3, p. 20-9, Nov 5 2012. ISSN 0014-2999.

CHAROEN, K. M. et al. Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2264-71, Feb 2014. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24360576> >.

CORREIA, A. L.; BISSELL, M. J. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. **Drug Resist Updat**, v. 15, n. 1-2, p. 39-49, Feb-Apr 2012. ISSN 1368-7646.

CRISCITIELLO, C. et al. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. **Ann Oncol**, v. 23 Suppl 6, p. vi13-8, Aug 2012. ISSN 0923-7534.

DHIMAN, H. K.; RAY, A. R.; PANDA, A. K. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, v. 26, n. 9, p. 979-86, Mar 2005. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15369686> >.

ENGBRAATEN, O.; VOLLAN, H. K. M.; BØRRESEN-DALE, A.-L. Triple-Negative Breast Cancer and the Need for New Therapeutic Targets. **The American Journal of**

Pathology, v. 183, n. 4, p. 1064-1074, 2013. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.05.033> >. Acesso em: 2016/10/03.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res**, v. 339, n. 1, p. 37-59, Feb 1995. ISSN 0027-5107 (Print) 0027-5107.

FAN, J.; YANG, X.; BI, Z. 6-Gingerol inhibits osteosarcoma cell proliferation through apoptosis and AMPK activation. **Tumour Biol**, v. 36, n. 2, p. 1135-41, Feb 2015. ISSN 1010-4283.

GIACOSA, A. et al. Can nausea and vomiting be treated with ginger extract? **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, n. 7, p. 1291-6, Apr 2015. ISSN 1128-3602.

GOETZ, J. A. et al. Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells. **Glycoconj J**, v. 26, n. 2, p. 117-31, Feb 2009. ISSN 0282-0080.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HANIADKA, R. et al. Zingiber officinale (ginger) as an anti-emetic in cancer chemotherapy: a review. **J Altern Complement Med**, v. 18, n. 5, p. 440-4, May 2012. ISSN 1075-5535.

HORNSBY, P. J.; DIDENKO, V. V. In situ ligation: a decade and a half of experience. **Methods Mol Biol**, v. 682, p. 49-63, 2011. ISSN 1064-3745.

HOWES, A. L. et al. 3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated cytotoxicity compared to monolayer culture systems. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108283, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25247711> >.

HUGHES, J. N.; LINDSAY, C. D.; GRIFFITHS, G. D. Morphology of ricin and abrin exposed endothelial cells is consistent with apoptotic cell death. **Hum Exp Toxicol**, v. 15, n. 5, p. 443-51, May 1996. ISSN 0960-3271 (Print) 0960-3271.

IGLESIAS-GUIMARAIS, V. et al. Chromatin collapse during caspase-dependent apoptotic cell death requires DNA fragmentation factor, 40-kDa subunit-/caspase-activated deoxyribonuclease-mediated 3'-OH single-strand DNA breaks. **J Biol Chem**, v. 288, n. 13, p. 9200-15, Mar 29 2013. ISSN 0021-9258.

JIN, Z. et al. Ginger and its pungent constituents non-competitively inhibit serotonin currents on visceral afferent neurons. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 2, p. 149-53, Apr 2014. ISSN 1226-4512 (Print) 1226-4512.

JOO, J. H. et al. 10-Gingerol inhibits proliferation and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells through suppression of Akt and p38MAPK activity. **Oncol Rep**, v. 35, n. 2, p. 779-84, Feb 2016. ISSN 1791-2431 (Electronic) 1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26554741> >.

KIM, H. S. et al. 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. **Sci Rep**, v. 5, p. 8656, 2015. ISSN 2045-2322.

LAMPUGNANI, M. G. Cell migration into a wounded area in vitro. **Methods Mol Biol**, v. 96, p. 177-82, 1999. ISSN 1064-3745 (Print) 1064-3745.

LEE, G. Y. et al. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. **Nat Methods**, v. 4, n. 4, p. 359-65, Apr 2007. ISSN 1548-7091 (Print) 1548-7091.

LEE, H. S. et al. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **J Nutr Biochem**, v. 19, n. 5, p. 313-9, May 2008. ISSN 0955-2863 (Print) 0955-2863.

LIN, C. B.; LIN, C. C.; TSAY, G. J. 6-Gingerol Inhibits Growth of Colon Cancer Cell LoVo via Induction of G2/M Arrest. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 326096, 2012. ISSN 1741-427x.

LIN, H. Y. et al. Integrin α V β 3 contains a receptor site for resveratrol. **Faseb j**, v. 20, n. 10, p. 1742-4, Aug 2006. ISSN 0892-6638.

LIU, Y. et al. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e53178, 2012. ISSN 1932-6203.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print) 1046-2023.

MAGDELDIN, T. et al. The efficacy of cetuximab in a tissue-engineered three-dimensional in vitro model of colorectal cancer. **J Tissue Eng**, v. 5, p. 2041731414544183, 2014. ISSN 2041-7314 (Electronic) 2041-7314 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383169> >.

MOUTASIM, K. A.; NYSTROM, M. L.; THOMAS, G. J. Cell migration and invasion assays. **Methods Mol Biol**, v. 731, p. 333-43, 2011. ISSN 1064-3745.

MROUE, R.; BISSELL, M. J. Three-dimensional cultures of mouse mammary epithelial cells. **Methods Mol Biol**, v. 945, p. 221-50, 2013. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097110> >.

MUKKAVILLI, R. et al. Modulation of cytochrome P450 metabolism and transport across intestinal epithelial barrier by ginger biophenolics. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108386, 2014. ISSN 1932-6203.

NEVES, A. A.; BRINDLE, K. M. Imaging cell death. **J Nucl Med**, v. 55, n. 1, p. 1-4, Jan 2014. ISSN 0161-5505.

NEWMAN, D. J. C., D. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NORBURY, C. J.; ZHIVOTOVSKY, B. DNA damage-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2797-808, Apr 12 2004. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

O'LEARY, C. G.; ELLIS, H.; HIGGINS, M. Extended adjuvant endocrine therapy in hormone-receptor-positive early breast cancer. **Curr Opin Oncol**, Sep 6 2016. ISSN 1040-8746.

PAN, M. H. et al. 6-Shogaol induces apoptosis in human colorectal carcinoma cells via ROS production, caspase activation, and GADD 153 expression. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. 5, p. 527-37, May 2008. ISSN 1613-4125.

PEDRAZA-FARIÑA, L. G. Mechanisms of Oncogenic Cooperation in Cancer Initiation and Metastasis. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 79, n. 3-4, p. 95-103, 10/ 2006. ISSN 0044-0086 1551-4056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1994802/> >.

POLTRONIERI, J. et al. [6]-gingerol as a cancer chemopreventive agent: a review of its activity on different steps of the metastatic process. **Mini Rev Med Chem**, v. 14, n. 4, p. 313-21, Apr 2014. ISSN 1389-5575.

POURTEIMOR, V.; MOHAMMADI-YEGANEH, S.; PARYAN, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. **Tumor Biology**, p. 1-21, 2016// 2016. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5349-7> >.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1423-37, Nov 2013. ISSN 1078-8956.

RADHAKRISHNAN, E. K. et al. [6]-Gingerol induces caspase-dependent apoptosis and prevents PMA-induced proliferation in colon cancer cells by inhibiting MAPK/AP-1 signaling. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104401, 2014. ISSN 1932-6203.

RAHMAN, A. A. et al. Tocotrienol-rich fraction, [6]-gingerol and epigallocatechin gallate inhibit proliferation and induce apoptosis of glioma cancer cells. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14528-41, 2014. ISSN 1420-3049.

RAMOS-DESIMONE, N. et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. **J Biol Chem**, v. 274, n. 19, p. 13066-76, May 7 1999. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

RASTOGI, N. et al. (6)-Gingerolinduced myeloid leukemia cell death is initiated by reactive oxygen species and activation of miR-27b expression. **Free Radic Biol Med**, v. 68, p. 288-301, Mar 2014. ISSN 0891-5849.

RATTAROM, R. et al. Cytotoxic activity against small cell lung cancer cell line and chromatographic fingerprinting of six isolated compounds from the ethanolic extract of Benjakul. **J Med Assoc Thai**, v. 97 Suppl 8, p. S70-5, Aug 2014. ISSN 0125-2208 (Print) 0125-2208.

REFAE, S.; PISTILLI, B.; DELALOGÉ, S. Extended anti-HER2 therapy in early breast cancer: longer beats shorter? **Curr Opin Oncol**, Sep 6 2016. ISSN 1040-8746.

RIZKI, A. et al. A human breast cell model of preinvasive to invasive transition. **Cancer Res**, v. 68, n. 5, p. 1378-87, Mar 1 2008. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316601> >.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer Lett**, v. 332, n. 2, p. 237-48, May 28 2013. ISSN 0304-3835.

RYAN, J. L. et al. Ginger (*Zingiber officinale*) reduces acute chemotherapy-induced nausea: A URCC CCOP study of 576 patients. **Support Care Cancer**, v. 20, n. 7, p. 1479-89, Jul 2012. ISSN 0941-4355 (Print).

RYU, M. J.; CHUNG, H. S. [10]-Gingerol induces mitochondrial apoptosis through activation of MAPK pathway in HCT116 human colon cancer cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 51, n. 1, p. 92-101, Jan 2015. ISSN 1071-2690.

SCENEAY, J.; SMYTH, M. J.; MOLLER, A. The pre-metastatic niche: finding common ground. **Cancer Metastasis Rev**, v. 32, n. 3-4, p. 449-64, Dec 2013. ISSN 0167-7659.

SCHMEICHEL, K. L.; WEAVER, V. M.; BISSELL, M. J. Structural cues from the tissue microenvironment are essential determinants of the human mammary epithelial cell phenotype. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 3, n. 2, p. 201-13, Apr 1998. ISSN 1083-3021 (Print) 1083-3021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10819528> >.

SHUKLA, Y. et al. In vitro and in vivo modulation of testosterone mediated alterations in apoptosis related proteins by [6]-gingerol. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, n. 12, p. 1492-502, Dec 2007. ISSN 1613-4125 (Print)

1613-4125.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-91, Mar 1988. ISSN 0014-4827 (Print) 0014-4827.

STEEG, P. S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 55-63, Jan 2003. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175x.

THOMA, C. R. et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 69-70, p. 29-41, Apr 2014. ISSN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24636868> >.

TOTSCH, S. K.; WAITE, M. E.; SORGE, R. E. Dietary influence on pain via the immune system. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 131, p. 435-69, 2015. ISSN 1877-1173.

TZENG, T. F. et al. 6-gingerol protects against nutritional steatohepatitis by regulating key genes related to inflammation and lipid metabolism. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 999-1020, 2015. ISSN 2072-6643.

VIDI, P. A.; BISSELL, M. J.; LELIEVRE, S. A. Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. **Methods Mol Biol**, v. 945, p. 193-219, 2013. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097109> >.

VORHERR, H. The breast; morphology, physiology, and lactation. p. 282 p, 1974. ISSN 97801272805090127280502.

WANG, F. et al. Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. **J Natl Cancer Inst**, v. 94, n. 19, p. 1494-503, Oct 2 2002. ISSN 0027-8874 (Print) 0027-8874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359858> >.

WANG, F. et al. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, p. 14821-6, Dec 8 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843973> >.

WANG, L. et al. Natural products as a gold mine for selective matrix metalloproteinases inhibitors. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 13, p. 4164-71, Jul 1 2012. ISSN 0968-0896.

WANG, S. et al. Biological properties of 6-gingerol: a brief review. **Nat Prod Commun**, v. 9, n. 7, p. 1027-30, Jul 2014. ISSN 1934-578X (Print) 1555-9475.

WEAVER, V. M.; BISSELL, M. J. Functional culture models to study mechanisms governing apoptosis in normal and malignant mammary epithelial cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 4(2), p. 193–201, 1999a.

_____. Functional culture models to study mechanisms governing apoptosis in normal and malignant mammary epithelial cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 4, n. 2, p. 193-201, Apr 1999b. ISSN 1083-3021 (Print) 1083-3021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426398> >.

WEAVER, V. M. et al. The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay. **Biochem Cell Biol.** **1**, v. 74(6), p. 833–851, 1996.

WEAVER, V. M. et al. β 4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. **Cancer Cell**, v. 2(3), p. 205–216, 2002.

WEIGELT, B.; GHAJAR, C. M.; BISSELL, M. J. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 69-70, p. 42-51, Apr 2014. ISSN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412474> >.

XU, Q. Q. et al. HER2 amplification level is not a prognostic factor for HER2-positive breast cancer with trastuzumab-based adjuvant treatment: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, Aug 23 2016. ISSN 1949-2553.

YANG, G. et al. 6-Gingerol induces apoptosis through lysosomal-mitochondrial axis in human hepatoma G2 cells. **Phytother Res**, v. 26, n. 11, p. 1667-73, Nov 2012. ISSN 0951-418x.

YUE, P. Y. et al. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen**, v. 15, n. 4, p. 427-33, Apr 2010. ISSN 1552-454X (Electronic) 1087-0571 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208035> >.

ZHENG, Q. et al. Prognostic value of endocrine treatment-related symptoms in patients with breast cancer: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, Sep 23 2016. ISSN 0167-6806.