



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas/MG.
CEP 37130-000



Renato de Oliveira Horvath

***Avaliação da atividade antitumoral de análogos de
curcumina sobre células derivadas de câncer de mama***

Alfenas/MG

2019

Renato de Oliveira Horvath

Avaliação da atividade antitumoral de análogos de curcumina sobre células derivadas de câncer de mama

Tese elaborada como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais (UNIFAL- MG). Área de concentração: Fisiopatologia. Orientador: Prof. Dra. Marisa Ionta; Co-orientador: Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Horvath, Renato de Oliveira.
H823a Avaliação da atividade antitumoral de análogos de *curcumina* sobre células derivadas de câncer de mama / Renato de Oliveira Horvath -- Alfenas/MG, 2019.
134 f. : il. --

Orientador: Marisa Ionta.
Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Neoplasias da Mama. 2. Curcumina. 3. Apoptose. I. Ionta, Marisa. II. Título.

CDD-571.6

Renato de Oliveira Horvath

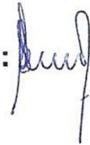
***Avaliação da atividade antitumoral de análogos de
curcumina sobre células derivadas de câncer de mama***

Aprovada em: ___/___/___

Prof. Dra. Marisa Ionta

Instituição:

Assinatura:



Prof. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira

Instituição:

Assinatura:

Jaqueline C. de Oliveira

Prof. Dra. Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat

Instituição:

Assinatura:



Prof. Dra. Luciana Azevedo

Instituição:

Assinatura:



Prof. Dra. Marta Miyazawa

Instituição:

Assinatura:





ATA DA DEFESA DE TESE

Às 14:00 horas do dia 30 de Setembro de 2019 foi realizada a sessão de defesa pública da tese do discente Renato de Oliveira Horvath.

A apresentação oral do trabalho “Avaliação da atividade antitumoral de análogos da curcumina sobre células derivadas de câncer de mama”, teve duração de 1 h, 00.

De acordo com os requisitos legais, a comissão examinadora designada para proceder o exame foi presidida pela orientadora Profa. Dra. Marisa Ionta UNIFAL- MG e composta pelos professores: Profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira UFPR, Profa. Dra. Ana Cláudia Chagas de Paula Advocat UFJF, Profa. Dra. Luciana Azevedo UNIFAL- MG e Profa. Dra. Marta Miyazawa - UNIFAL- MG. A arguição teve duração total de 4 h 00. Em reunião secreta a Comissão Examinadora fez a apreciação da tese e considerou o candidato:

Aprovado () Reprovado

Examinador 1: Profa. Dra. Marisa Ionta [assinatura]

Examinador 2: : Profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira Jaqueline C. de Oliveira

Examinador 3: Profa. Dra. Ana Cláudia Chagas de Paula Advocat [assinatura]

Examinador 4 Profa. Dra. Luciana Azevedo [assinatura]

Examinador 5: Profa. Dra. Marta Miyazawa [assinatura]

Parecer final dos examinadores: (opcional)

Defesa de tese nº. _____ homologada na _____ reunião do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, realizada em ____/____/____.
Coordenador do PPGB Assinatura e carimbo

Dedico este trabalho às quatro mulheres da minha vida: minha mãe, pelo amor, esforço e dedicação, minha madrinha, por todo exemplo que foi e por acreditar em mim sempre, minha amada esposa, forte, guerreira, carinhosa e dedicada e minha avó, pela doçura e alegria.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, pela justiça, por fazer de mim um instrumento da ciência e por manifestar-se em minha vida, mesmo de maneira sutil, nos momentos que mais precisei;

Agradeço à minha mãe, Maria Guiomar, que mesmo diante das dificuldades que a vida impôs, educou os filhos sozinha, com trabalho duro, sorriso no rosto e muito amor. Um verdadeiro exemplo de força, garra e luta. Nada seria sem seu carinho de mãe;

Agradeço à minha segunda mãe, Maria Sinira, por dedicar-se a mim como se eu fosse seu filho, por acreditar que um dia eu estaria aqui, por investir na minha educação e formação profissional, por ser exemplo de mulher, professora, educadora, mãe, tia, filha e irmã;

Agradeço à minha esposa, Camila, por me amar, cuidar de mim, por ser meu porto seguro, por fazer da minha vida um jardim florido com flores roxas e lilás, pela paciência, pelo carinho, pelo afeto e pela dedicação. Deus colocou em meu caminho uma linda mulher;

Agradeço à minha avó, Salomé, pela doçura, amor, carinho, alegria de viver e por tudo que me ensinou. Do céu a senhora olha por todos nós, tenho certeza;

Agradeço às minhas outras mães, Carminha, Fátima e aos meus verdadeiros pais, Édén, Claite e Antônio Carlos, ao meu irmão Carlos de Oliveira Netto, aos meus primos Carina, Claire e Ana Paula e ao meu padrinho Adriano, que sempre estiveram do meu lado. Aprendi algo com cada um de vocês. Fui acolhido por vocês em algum momento de minha vida. Conteí com o apoio de vocês sempre que precisei. Família é isso;

Agradeço à minha orientadora, Dra. Marisa Ionta, por ter sido muito mais que uma simples orientadora. Você é o modelo de profissional que eu gostaria de ser, digna, correta, competente, exemplar e, principalmente, ama o que faz. Sem o seu apoio, eu não teria trilhado metade do caminho que trilhei. Foi uma honra ser seu orientando;

Agradeço ao meu coorientador, amigo e exemplo, Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior e sua esposa, mãezona e profissional de excelência, Dra. Andrea Mollica do Amarante Paffaro, por tudo que fizeram por mim na Unifal. Vocês fizeram destes 7 anos de universidade anos felizes, de muito aprendizado e exemplos. Vocês torceram por mim o tempo todo. Acreditaram em mim o tempo todo. Serei eternamente grato!

Ao meu amigo e compadre, Guilherme, por tudo que me ensinou, pelo tempo que dedicou a me ensinar o que sabe, por ser um exemplo de dedicação. Esta tese de doutorado possui sua assinatura em cada experimento, resultado e linha escrita. Minha amiga Helloana, pelo companheirismo, amizade, pelos ótimos momentos que vivemos e por nos dar um enorme presente, o Bernardo! Somos honrados por fazerem, os três, parte indispensável de nossas vidas!

Aos meus amigos, Bruno Zavan e Évila, por todos os momentos que compartilhamos! 7 anos foram pouco tempo para conviver com pessoas tão maravilhosas! Vocês me apoiaram o tempo inteiro e sempre me incentivaram. Só posso agradecer a cada minuto compartilhado. Vocês farão muita falta em minha vida.

Aos meus amigos, Fernando, Juliana, Alexandre, Fabiana e Henrique, pela amizade, pelos ótimos momentos, por acreditarem em mim o tempo todo. Obrigado por fazerem parte da minha vida!

Aos meus amigos de laboratório, Simone, Rodrigo, Carolina Giroto, Su, Wellington, Amanda, Délcio, Joseana, Gabi, Valdeci, Lis, Aline, Antônio, Dani, Marta, Thaís, Rafa, Leilane, Mirella, Raíne e Davi, por fazerem dos meus dias de trabalho mais alegres;

Agradeço aos meus professores, Dr. Angel Roberto Barchuk, Dra. Márcia Cristina Bizinotto, Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira, Dra. Talita Sarah; Dra. Livia Rosatto Moda; Dr. Angel Maurício Castro Gamero; Dra. Josie Rezende; Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão e Dra. Luziana Azevedo, por dividirem comigo seus conhecimentos e por fazerem de mim, nesse momento, um doutor;

Agradeço nossa técnica de laboratório, Dra. Juliana Ramos Martins, pela excelência no exercício de suas funções e por compartilhar seus conhecimentos.

Agradeço às funcionárias Neuza e Izabel, por fazerem deste laboratório um ambiente mais agradável e feliz. Vocês foram verdadeiras amigas nesses 7 anos de trabalho;

Agradeço à secretária do PPGB e amiga, Adriana, por cuidar dos alunos deste programa com excelência, pela amizade e alegria;

Agradeço à FAPEMIG pela bolsa de doutorado. Sem ela, nada seria possível;

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas pelo suporte;

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biociências aplicada à Saúde pela qualidade e pelo zelo na formação de novos docentes e pesquisadores;

E por todos aqueles que, apesar de não mencionados, foram importantes nesta trajetória.

“O conhecimento nos faz responsáveis”

(Ernesto Che Guevara)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

O câncer de mama representa a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo. Aproximadamente 75% dos tumores mamários diagnosticados expressam receptores para estrogênio (RE+) e, nesse caso, as terapias hormonais representam o tratamento de primeira escolha. Contudo, alguns tumores são resistentes ou tornam-se resistentes aos fármacos convencionalmente disponíveis e, portanto, é necessária a identificação de novos compostos que possam melhorar as propostas terapêuticas no combate ao câncer de mama. Os compostos naturais representam fontes importantes para a identificação de novos compostos com atividade antitumoral, pois produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários. Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que 3 análogos de curcumina (PQM-162, PQM-163 e PQM-164) reduziram significativamente a viabilidade de células derivadas de câncer mama (MCF-7), as quais expressam receptores para estrogênio. No mesmo estudo, foi demonstrado que a substância PQM-162 inibe a progressão do ciclo por modular o perfil de expressão de proteínas que regulam a transição G2/M e progressão pelas fases iniciais da mitose. Contudo, os mecanismos relacionados à atividade citotóxica de PQM-162 sobre células MCF-7 não foram investigados. Além disso, os efeitos de PQM-163 e PQM-164 não foram explorados. Assim sendo, o presente estudo objetivou avaliar o perfil de atividade das substâncias PQM-163 e PQM-164 sobre o comportamento proliferativo de células MCF-7 e compará-los com os observados para a substância PQM-162. Além disso, foi avaliado o perfil de atividade das substâncias sobre linhagens derivadas de tumor mama, classificado como triplo negativo (MDA-MB-231 e Hs578t), o qual é de difícil tratamento devido à ausência de alvos terapêuticos. A atividade pró-apoptótica das substâncias estudadas também foi investigada nas linhagens MCF-7, Hs578t e MDA-MB-231. Os dados mostraram que PQM-163 e PQM-164 inibem a progressão do ciclo celular em células MCF-7, de modo semelhante ao observado para a PQM-162. Contudo a potência de PQM-163 e PQM-164 foi inferior a PQM-162. As linhagens triplo negativas mostraram-se mais resistentes aos tratamentos com as substâncias testadas em relação a linhagem MCF-7. Contudo foi possível observar eficiência na inibição do ciclo celular e indução de apoptose. Além disso, a molécula PQM-164 eficientemente sensibilizou a linhagem resistente à doxorrubicina MCF-7 (DXR-R) ao fármaco. Os dados obtidos no presente estudo são promissores e subsidiam novos estudos, usando modelo de roedores, para validar a atividade antitumoral observada *in vitro* e investigar os perfis farmacocinético e farmacodinâmico das substâncias PQM-162, PQM-163 e PQM-164.

Palavras chave: Câncer de mama, curcumina, inibição do ciclo celular, apoptose

ABSTRACT

Breast cancer represents the first cause of cancer death among women worldwide. Approximately 75% of diagnosed breast tumors express estrogen receptors (ER+) and, in this case, hormonal therapy is considered the first line treatment. However, some tumors are resistant or became resistant to the drugs conventionally used in the therapeutic proposals and, therefore, it is necessary to identify new compounds to improve therapeutic proposals for breast cancer. The natural compounds are important source for the identification of new compounds with antitumor activity, since they produce a wide variety of secondary metabolites. In a previous study performed by our research group was demonstrated that 3 curcumin analogues (PQM-162, PQM-163, and PQM-164) significantly reduced cell viability in MCF-7 cultures, which are derived from RE positive-breast cancer. In addition, it has been demonstrated that PQM-162 inhibits cell cycle progression due to its ability of gene expression profile of critical cell cycle regulator of G2/M transition and mitosis onset. However, the mechanism associated to cytotoxic activity of PQM-162 on MCF-7 is not investigated. Furthermore, the effects of PQM-163 and PQM-164 are not explored. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of the substances PQM-163 and PQM-164 on proliferative behavior of MCF-7 cells and to compare those observed for PQM-162. In addition, the activity profile of the studied substances was evaluated on Hs578t and MDA-MB-231 triple negative cells, which represent a breast tumor subtype with limited clinical proposal due to absence of therapeutic targets. The pro-apoptotic activity of studied substances was also evaluated on MCF-7, Hs578t, and MDA-MV-231. We found that PQM-163 and PQM-164 inhibit cell cycle similarly to PQM-162, however the potency of PQM-163 and PQM-164 was lower than PQM-162. Triple negative cell lines were more resistance to treatment compared to MCF-7 cell line. Apart from this, we observed that PM-163 and PQM-164 efficiently inhibited cell cycle progression in triple negative breast cancer cells. In addition, the PQM-164 molecule efficiently sensitized the doxorubicin resistant MCF-7 (^{DXR-R}) cells to the drug. These findings are very promising and support further *in vivo* studies to validate antitumor activity and to investigate the pharmacokinetic and pharmacodynamics profiles of the substances PQM-162, PQM-163, and PQM-164.

Keywords: Breast cancer, curcumin, cell cycle inhibition, apoptosis

LISTA DE ABREVIações

AF-1 -	Domínio de ligação ao DNA do receptor de estrogênio tipo alfa e beta
AF-2 -	Domínio de ligação ao ligante do receptor de estrogênio tipo alfa e beta
APC/C -	Complexo promotor da anáfase / ciclossomo
BCA -	Ensaio colorimétrico para quantificação de proteínas baseado no ácido biciconínico
cAMP-	AMP cíclico
c-fos -	Fator de transcrição c-fos
c-jun -	Fator de transcrição codificado pelo gene JUN
CDK -	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CKI -	<i>Cyclin-dependent kinases inhibitor</i>
CPC -	Complexo passageiro do cromossomo
DAPI -	4',6-diamidino-2-felinindol
DMEM -	Meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DNA -	Ácido Desoxirribonucleico
DP -	Desvio padrão
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetracético
EGFR -	Receptor para o fator de crescimento epidermal
ERBB2 -	Receptor tirosino-cinase ERBB2
ERK -	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FBS -	Soro fetal bovino
FITC -	Isotiocianato de fluoresceína
GATA1 -	Fator de transcrição eritróide, fator de ligação à GATA tipo 1
GPER1 -	Receptor de estrogênio acoplado à proteína G
HER-2 -	Receptor para o fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (ERBB2)
Hs578t -	Linhagem de carcinoma mamário triplo-negativo
IC ₅₀ -	Concentração inibitória de 50%
IgG -	Imunoglobulina G
INCA -	Instituto Nacional do Câncer

INCENP -	<i>Inner centrossome protein</i>
MAPK -	Proteínas cinases ativadoras de mitógenos
MCF-7 -	Linhagem de adenocarcinoma mamário RE+
MEK -	Proteína cinase cinase ativadora de mitógenos
mTOR -	Serina-treonina cinase alvo da rapamicina de mamíferos
MTS -	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
NF- κ β -	Fator nuclear kappa β
p21 -	Proteína supressora tumoral p21
p53 -	Proteína supressora tumoral p53
PI3K -	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-cinase; fosfatidilinositol-3-cinase
PLK1 -	<i>Polo-like kinase 1</i>
PVDF -	Difluoreto de polivinilideno
RAF -	Serina-treonina cinase <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RE -	Receptor de estrogênio
RE α -	Receptor de estrogênio tipo alfa
RE β -	Receptor de estrogênio tipo beta
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
STAT5 -	Transdutor de sinal e ativador da transcrição tipo 5
T-47D	Linhagem de carcinoma ductal mamário RE+
TE -	Terapia endócrina
TRITC -	Tetrametil-rodamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa de novos casos de câncer nos Estados Unidos da América em 2018	20
Figura 2 - Estimativa de mortes nos Estados Unidos da América em 2018	21
Figura 3 - Estimativa de incidência de câncer no Brasil em 2018	21
Figura 4 - Estimativa de mortes por câncer no Brasil em 2018	22
Figura 5 - Estrutura química da curcumina	36
Figura 6 - Estrutura molecular das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 ..	43
Figura 7 - Imagens ilustrativas de células em divisão mostrando as diferentes fases da mitose	47
Figura 8 - Imagens fluorescentes representativas do ensaio para detecção de morte celular	48
Figura 9 - Delineamento experimental dos ensaios de sensibilização	53
Figura 10 - Viabilidade celular determinada por MTS após 48 horas de tratamento	56
Figura 11 - Ensaio de exclusão por azul de <i>Trypan</i> na linhagem MCF-7	59
Figura 12 - Ensaio de exclusão por azul de <i>Trypan</i> na linhagem MDA-MB-231.....	60
Figura 13 - Ensaio de exclusão por azul de <i>Trypan</i> na linhagem Hs578t	61
Figura 14 - Ensaio de capacidade clonogênica na linhagem MCF-7	63
Figura 15 - Ensaio de capacidade clonogênica na linhagem MDA-MB-231.....	63
Figura 16 - Ensaio de capacidade clonogênica na linhagem Hs578t	64
Figura 17 - Análise de progressão do ciclo celular na linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento	65
Figura 18 - Análise de progressão do ciclo celular na linhagem MCF-7 após 48 horas de tratamento	67
Figura 19 - Análise de progressão do ciclo celular na linhagem MDA-MB-231 após 24 horas de tratamento	68
Figura 20 - Análise de progressão do ciclo celular na linhagem MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento	70
Figura 21 - Análise de progressão do ciclo celular na linhagem Hs578t após 24 horas de tratamento	71
Figura 22 - Análise de progressão do ciclo celular na linhagem Hs578t após 24 horas de tratamento	72

Figura 23 - Índice mitótico determinado em culturas de MCF-7 após 24 e 48 horas de tratamento	74
Figura 24 - Índice mitótico determinado em culturas de MDA-MB-231 após 24 e 48 horas de tratamento	75
Figura 25 - Índice mitótico determinado em culturas de Hs578t após 24 e 48 horas de tratamento	76
Figura 26 - Imagens fluorescentes mostrando o padrão de distribuição de elementos do citoesqueleto e análise do índice mitótico na linhagem MCF-7	78
Figura 27 - Análise de morte celular determinada por dupla coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio após 24 e 48 horas de tratamento na linhagem MCF-7	80
Figura 28 - Análise de morte celular determinada por dupla coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio após 24 e 48 horas de tratamento na linhagem MDA-MB-231	81
Figura 29 - Análise de morte celular determinada por dupla coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio após 24 e 48 horas de tratamento na linhagem Hs578t	82
Figura 30 - Ensaio de anexina V em culturas MCF-7 tratadas por 24 horas.....	84
Figura 31 - Ensaio de anexina V em culturas Hs578t tratadas por 48 horas.....	85
Figura 32 - Análise de expressão relativa de mRNA de genes envolvidos na regulação de apoptose na linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento	86
Figura 33 - Análise de expressão relativa de mRNA de genes envolvidos na regulação da fase M do ciclo celular na linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento	87
Figura 34 - Perfil de expressão proteica de ERK, fosfo-ERK (Tyr 204), Ciclina B1 e α -tubulina por <i>immunoblot</i> na linhagem MCF-7	89
Figura 35 - Perfil de expressão proteica de ERK, fosfo-ERK (Tyr 204), Ciclina B1 e α -tubulina por <i>immunoblot</i> na linhagem Hs578t	90
Figura 36 - Viabilidade celular determinada por MTS após 45, 90, 135 e 180 dias de tratamento	92

Figura 37 - Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem MCF-7 (180-DXR) após 48 horas de tratamento	92
Figura 38 - Ensaio de sensibilização de células MCF-7 resistentes à doxorrubicina com a molécula PQM-162	94
Figura 39 - Ensaio de sensibilização de células MCF-7 resistentes à doxorrubicina com a molécula PQM-163	95
Figura 40 - Ensaio de sensibilização de células MCF-7 resistentes à doxorrubicina com a molécula PQM-164	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de bases dos <i>primers</i> utilizados na PCR em tempo real ...	50
Tabela 2 - Análise do índice de combinação	53
Tabela 3 - Valores de IC ₅₀ ± DP (µM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTS)	57
Tabela 4 - Índice de seletividade	57
Tabela 5 - Frequência de células MCF-7 nas fases do ciclo celular, após 24 horas de tratamento	66
Tabela 6 - Frequência de células MCF-7 nas fases do ciclo celular, após 48 horas de tratamento	66
Tabela 7 - Frequência de células MDA-MB-231 nas fases do ciclo celular, após 24 horas de tratamento	68
Tabela 8 - Frequência de células MDA-MB-231 nas fases do ciclo celular, após 48 horas de tratamento	70
Tabela 9 - Frequência de células Hs578t nas fases do ciclo celular, após 24 horas de tratamento	71
Tabela 10 - Frequência de células Hs578t nas fases do ciclo celular, 48 horas na de tratamento	72
Tabela 11 - Valores de IC ₅₀ ± DP (µM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTS)	91
Tabela 12 - Valores de IC ₅₀ ± DP (µM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTS)	93

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Aspectos gerais sobre o câncer.....	20
2.2	Principais mecanismos de regulação do ciclo celular	24
2.3	Via de sinalização MAPK	29
2.4	Câncer de mama	31
2.5	Curcumina	36
3	JUSTIFICATIVA	39
4	OBJETIVOS	40
4.1	Objetivos Gerais	40
4.2	Objetivos Específicos	40
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
5.1	Linhagem celular e condições de cultivo	42
5.2	Origem das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164	42
5.3	Análise de viabilidade por ensaio colorimétrico (MTS)	43
5.4	Curva de crescimento e ensaio de exclusão com Azul de Tripano	44
5.5	Ensaio de Capacidade Clonogênica	44
5.6	Quantificação de DNA para análise da progressão no ciclo celular	45
5.7	Determinação da frequência de Mitoses	45
5.8	Preparações histológicas fluorescentes exibindo elementos do citoesqueleto	46
5.9	Ensaio de morte por dupla coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio	47
5.10	Ensaio de Anexina 5 / 7-AAD.....	49
5.11	RT-PCR	49
5.12	<i>Imunoblot</i>	50
5.13	Estabelecimento de uma linhagem resistente à doxorrubicina (MCF-7 ^{DXR^R})	52
5.14	Ensaio de sensibilização à DXR usando a linhagem (MCF-7 ^{DXR^R})	52
5.15	Análise Estatística	54
6	RESULTADOS	55
6.1	Análise da Viabilidade por ensaio colorimétrico (MTS)	55

6.2	Curva de crescimento e ensaio de exclusão com Azul de Tripano	58
6.3	Ensaio de Capacidade Clonogênica	62
6.4	Análise da progressão no ciclo celular	64
6.5	Análise da frequência de mitoses	73
6.6	Determinação da frequência de células nas sub-fases da mitose	77
6.7	Ensaio de morte por dupla coloração com Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio	79
6.8	Análise de apoptose por Ensaio de Anexina V / 7-AAD.....	83
6.9	RT-PCR	86
6.10	<i>Imunoblot</i>	88
6.11	Estabelecimento de uma linhagem resistente à doxorubicina (MCF-7 ^{DXR^R})	91
6.12	Ensaio de sensibilização à DXR usando a linhagem (MCF-7 ^{DXR^R})	93
7	DISCUSSÃO	97
8	CONCLUSÃO	106
	REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação celular descontrolada e capacidade de invadir e colonizar tecidos saudáveis (HANAHAN; WEINBERG, 2011; CEDOLINI et al., 2015; ASATI et al., 2016; GODONE et al., 2018). Trata-se da segunda maior causa de mortes no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Entre mulheres, com exceção dos cânceres de pele não-melanoma, o câncer de mama é o mais incidente e o que mais mata (BRAY et al., 2018). Trata-se de uma doença complexa e heterogênea que envolve uma variedade de tumores malignos com padrões histológicos e perfis genéticos distintos. Os tratamentos são indicados de acordo com as características histológica e molecular de cada subtipo tumoral (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003).

Embora avanços nas propostas terapêuticas tenham ocorrido nas últimas décadas, alguns pacientes não respondem aos fármacos disponíveis ou tornam-se resistentes a eles ao longo do tratamento, o que justifica a busca constante por novas substâncias que possam melhorar as abordagens terapêuticas no combate ao câncer de mama (RING; DOWSETT, 2004; DRAGANESCU; CARMOCAN, 2017). Dentro desse contexto, os compostos naturais representam fontes importantes para a identificação de substâncias com atividade antitumoral (NEWMAN; CRAGG, 2016; THOMFORD et al., 2018; LI et al., 2019).

A curcumina é um composto natural com reconhecida atividade antitumoral sobre diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (CARTER; D'ORAZIO; PEARSON, 2014; MANDAPALU et al., 2016; SINHA et al., 2016; WANG, X. et al., 2016; TAJBAKHSI et al., 2017). No entanto, a baixa solubilidade e biodisponibilidade dessa substância limita sua utilização na prática clínica (YALLAPU, JAGGI & CHAUHAN, 2012; PRASAD, TYAGI & AGGARWAL, 2014; TEITEN, DICATO e DIEDERICH, 2014). Para superar esses desafios, estudos têm sido conduzidos para obter novas substâncias que apresentem atividade igual ou superior à observada para a curcumina, mas que possam apresentar um melhor perfil de solubilidade e biodisponibilidade. Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, 8 substâncias sintéticas foram obtidas, as quais contém um domínio de analogia à curcumina (FREITAS-SILVA et al., 2018). Dentre elas, 3 substâncias (PQM-162,

PQM-163 e PQM-164) inibiram significativamente a proliferação de células derivadas de câncer de mama que expressam receptores para estrogênio (RE+) (MCF-7). No mesmo estudo, foi demonstrado que a molécula PQM-162 inibe a proliferação devido a sua capacidade de modular a expressão de genes críticos para a transição G2/M e início da mitose. Contudo, não foi explorado ainda qual seria a influência das substâncias PQM-163 e PQM-164 sobre o comportamento proliferativo de células MCF-7 e tampouco quais seriam os efeitos das substâncias PQM-162, PQM-163 e PQM-164 sobre outras linhagens celulares que não expressam receptores de estrogênio. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos dessas substâncias sobre linhagens celulares derivadas de câncer de mama com diferentes características genéticas.

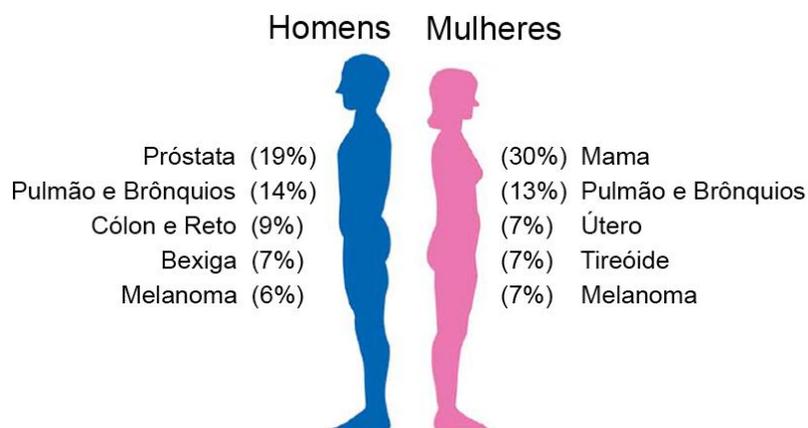
2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção serão descritas as características das células tumorais e do câncer de mama. Além disso, serão apresentadas informações relacionadas às propostas terapêuticas disponíveis para o câncer de mama.

2.1 Aspectos gerais sobre o câncer

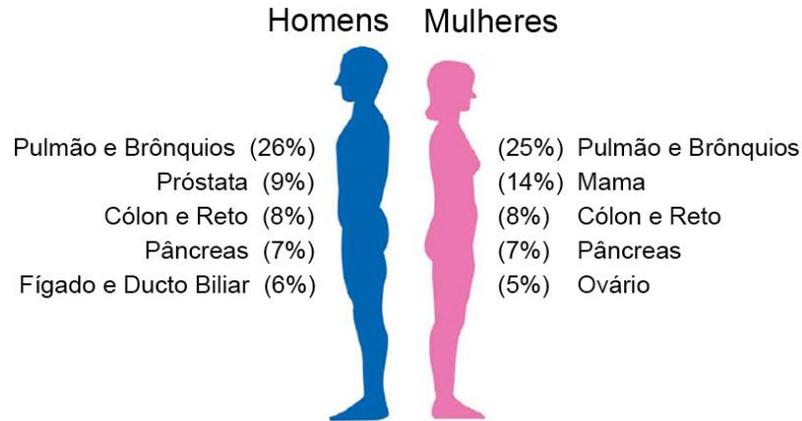
O câncer atualmente é a segunda maior causa de mortes por doenças crônicas em países desenvolvidos, ficando atrás apenas para mortes causadas por doenças cardiovasculares. Em 2018, estimou-se que dos 1.685.210 novos casos de câncer nos Estados Unidos, 226.120 eram de câncer de mama com aproximadamente 40.920 óbitos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018) (Figuras 1 e 2). Já no Brasil, a expectativa é de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer no biênio 2018-2019 sendo que deste total, aproximadamente 60.000 casos sejam de câncer de mama. No Brasil, em mulheres, com exceção dos cânceres de pele não-melanoma, o câncer de mama é o mais incidente e o que mais mata (Figuras 3 e 4) (INCA, 2018).

Figura 1 – Estimativa de novos casos de câncer nos Estados Unidos da América em 2018.



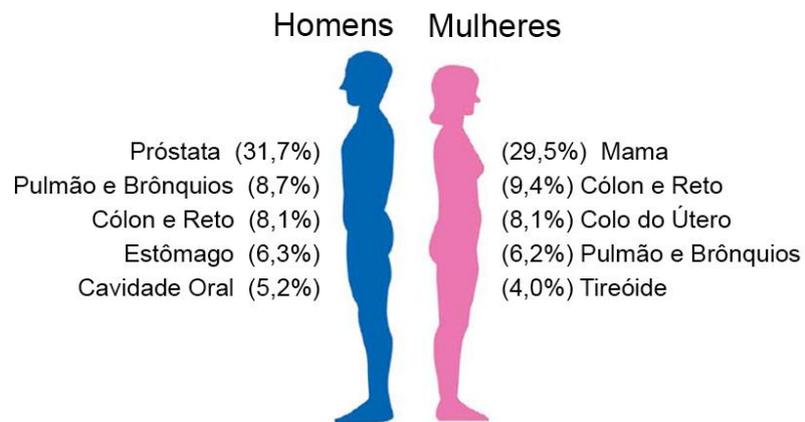
Fonte: adaptado de SIEGEL; MILLER; JEMAL; 2018.

Figura 2 – Estimativa de morte por câncer nos Estados Unidos da América em 2018.



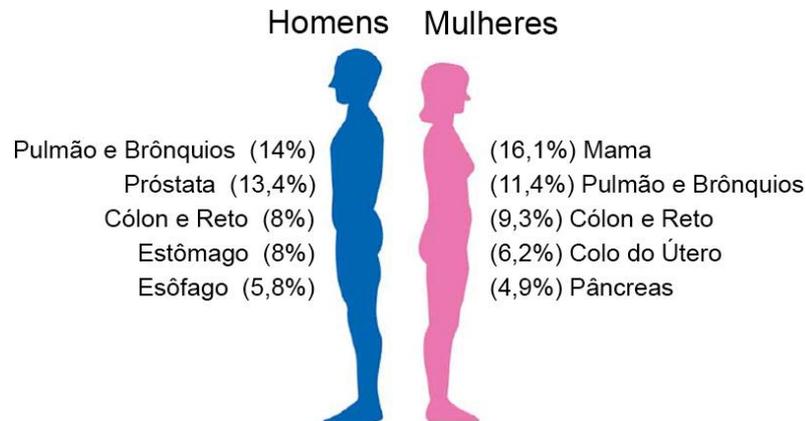
Fonte: adaptado de SIEGEL; MILLER; JEMAL; 2018

Figura 3 – Estimativa de incidência por câncer nos Brasil em 2018.



Fonte: adaptado de INCA, 2018

Figura 4 – Estimativa de morte por câncer nos Brasil em 2018.



Fonte: adaptado de INCA, 2018.

Nos Estados Unidos e Austrália, o pico de incidência ocorre em mulheres com faixa etária entre 60 a 75 anos, enquanto na República Popular da China esta faixa etária é de 40 a 49 anos, indicando que a localização geográfica influencia diretamente na incidência do câncer de mama. Este fenômeno pode estar associado às diferenças no perfil de alimentação, cultura, nível educacional e, principalmente, nas políticas públicas de rastreamento ao câncer de mama (BELEKOUZOU et al., 2016; TORRE et al., 2016; ROQUETTE; PAINHO; NUNES, 2017, CHEN, W. et al., 2018).

Enquanto a mortalidade relacionada ao câncer de mama reduziu em países desenvolvidos, como Austrália, Canadá, Estados Unidos e Nova Zelândia, as taxas de incidência e mortalidade são elevadas nos países da América Latina e este fenômeno pode estar relacionado com a ineficiência de políticas públicas de prevenção ao câncer (DESANTIS et al., 2016). Neste contexto, o *screening* mamográfico reduziu significativamente a mortalidade do câncer de mama nos Estados Unidos, uma vez que contribui para o diagnóstico precoce e, portanto, para a eficiência do tratamento (BONILLA; TABANERA; MENDOZA, 2017; SILVA et al., 2017). No Brasil, diferentemente de países emergentes como Índia, Malásia e África do Sul, o tempo de sobrevivência das mulheres diagnosticadas com câncer subiu significativamente desde 1995, sendo que 87% das mulheres diagnosticadas com câncer de mama sobrevivem por um período superior a 5 anos, apesar das taxas de mortalidade permanecerem altas (14 óbitos para cada 100.000 mulheres no Brasil) (INCA, 2018; SILVA et al., 2017). Embora as taxas de mortalidade sejam altas, a

letalidade deste tipo de câncer é baixa uma vez que a taxa de mortalidade é menor que um terço da taxa de incidência (INCA, 2018). No Brasil, 45% dos óbitos ocorrem entre mulheres com faixa etária de 45 a 64 anos, com um aumento significativo das taxas de mortalidade em mulheres com baixo grau de escolaridade (ZAPPONI; MELO, 2010; ALBRECHT et al., 2013; SILVA et al., 2017; INCA, 2018).

O câncer é um conjunto de doenças que compartilham características comuns como: proliferação celular descontrolada e capacidade de invadir e colonizar tecidos saudáveis (HANAHAN; WEINBERG, 2011; BRAY et al., 2018). Em geral o crescimento descontrolado de células se dá pela perda da capacidade de resposta à sinais que regulam processos críticos como proliferação, diferenciação e morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; GODONE et al., 2018). O processo de transformação maligna envolve complexos eventos, tanto genéticos quanto epigenéticos, que favorecem a aquisição do fenótipo tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Tais mudanças, como as que ocorrem na estrutura do DNA, envolvem mutações em oncogenes, que regulam positivamente processos relacionados com a proliferação celular e sobrevivência. Estas mutações favorecem a entrada no ciclo celular. Mutações também podem ocorrer em genes supressores tumorais, que regulam negativamente a proliferação celular frente a estímulos fisiológicos. Estas mutações podem inibir sua atividade, favorecendo a formação de tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011; GADONE et al., 2018).

De acordo com Hanahan e Weinberg (2011), algumas características são compartilhadas pelas células tumorais em resposta as alterações genéticas e epigenéticas, que acometem oncogenes e genes supressores de tumor. Tais características incluem a capacidade de produzir substâncias que estimulam proliferação, sobrevivência celular e angiogênese; resistência aos sinais de morte celular; capacidade de invadir tecidos e formar metástase; bem como de reprogramação metabólica e evasão do sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

2.2 Principais mecanismos de regulação do ciclo celular

O ciclo celular compreende uma série de eventos altamente regulados onde componentes celulares são duplicados e transmitidos para as células filhas. A replicação do DNA ocorre na fase S enquanto a segregação cromossômica ocorre na fase M. Entre as fases S e M, estão as fases G₁ e G₂, períodos marcados por intensa atividade biossintética relacionada como o metabolismo e aumento de volume celular. A organização e integração dos sinais de crescimento e proliferação ocorrem em G₁, ao passo que em G₂ os mecanismos relacionados a organização do genoma replicado e preparo para a entrada em mitose estão operando (BARUM; O'CONNEL, 2014).

A maioria das células de um organismo pluricelular, como o organismo humano, são mantidas num estado quiescente denominado G₀. Nesta fase, grande parte destas células ainda mantém toda a maquinaria necessária para o processo de divisão celular. Porém, somente após estímulo mitogênico, a célula é capaz de progredir no ciclo celular (MOLINARI, 2000). A passagem pelo ponto de restrição (R), no final da fase G₁, representa um evento crítico de comprometimento com o processo de divisão celular em resposta a fatores mitogênicos (PARDEE, 1974; MACHADO et al., 2012; MORALLI et al., 2013).

A ativação de proteínas serina-treonina cinases CDK (*cyclin-dependent kinases*) representa o principal mecanismo de regulação positiva do ciclo celular. Uma vez ativadas, as CDKs fosforilam uma variedade de substratos, os quais são críticos para os eventos relacionados à progressão do ciclo, incluindo síntese do DNA, duplicação do centrôssomo e segregação cromossômica. As CDKs são amplamente expressas durante todo o ciclo celular, mas sua atividade está condicionada à ligação às proteínas ciclinas, cuja expressão oscila ao longo do ciclo. A expressão diferencial de ciclinas se deve a dinâmica de biossíntese e degradação dessas proteínas. A destruição proteolítica é mediada por complexos ubiquina-ligases (SHERR, 1994; MOLINARI, 2000; VODEMAIER, 2004; LIM; KALDIS, 2015).

Os complexos ciclina-CDKs podem ser regulados por diferentes mecanismos. As proteínas inibidoras de CKDs das famílias Kip/Cip e INK4, denominadas de CKI's (do inglês, *cyclin-dependent kinases inhibitor*) desempenham importante papel na inibição do ciclo celular (MORGAN et al., 2007). As CKIs inibem os complexos ciclina-CDKs formados ou impedem a formação deles por se ligarem as ciclinas e bloquearem sua interação com as CDKs. Além disso, cinases e fosfatases estão envolvidas na

ativação e inativação dos complexos ciclina-CDKs (MORGAN, 1997; MACHADO et al., 2012). Os eventos de fosforilação e desfosforilação permitem o acúmulo de complexos ciclina-CDK, na sua forma inativa, possibilitando sua rápida ativação quando necessário (MOLINARI et al., 2000). Cada proteína CDK liga-se com alta afinidade com ciclinas específicas e a ativação de diferentes complexos governa a transição entre as diferentes fases do ciclo (NURSE, 2000).

Após um estímulo mitogênico, vias de sinalização são ativadas, dentre elas a via de MAPKs, cujo resultado é o aumento na expressão de ciclina D (MORALLI et al., 2013). Além disso, proteínas ubiquitina-ligases, como a APC/C (anaphase-promoting complex / ciclossome) e o complexo SCF (Skp1/cullin/F-box) são inativadas (KRAMER et al., 2000; PETERS, 2002). Estas proteínas são responsáveis pela ubiquitinação de ciclinas na transição entre a metáfase e a anáfase (encaminhando as ciclinas para destruição proteolítica), bem como garante um estado de inatividade de ciclinas durante o estado quiescente G_0 (VODERMAIER, 2004). O acúmulo de ciclina D favorece sua ligação com as proteínas CDK4 e CDK6, que controlam a entrada no ciclo celular e a progressão pela fase G_1 (MORALLI et al., 2013). Os complexos ciclina D-CDK4/6, quando ativados, fosforilam a proteína Rb (proteína retinoblastoma) que, por sua vez, na forma hipofosforilada sequestra fatores de transcrição da família E2F impedindo, dessa forma, que esses fatores migrem para o núcleo e ativem a transcrição de genes-alvos (HARBOUR; DEAN, 2000; MALUMBRES; BARBACID, 2009). Na sua forma fosforilada, Rb perde a afinidade pelos fatores de transcrição E2F que se translocam para o núcleo e estimulam a expressão de vários genes incluindo ciclina D, ciclina E, c-myc (ORTEGA et al., 2002). Os complexos ciclina-CDK que se formam ao longo do ciclo celular, fosforilam Rb e contribuem para sua inativação até a conclusão do processo de divisão.

A ativação de complexos ciclina E-CDK2 contribui para a modulação de expressão de genes requeridos na entrada da célula na fase S (SHERR; ROBERTS, 1999). Além disso, o complexo ciclina E-CDK2 fosforila proteínas que estão envolvidas em processos relacionados à modificação de histonas, replicação e reparo do DNA, duplicação e maturação do centrôssomo (SHERR; ROBERTS, 1999; MALUMBRES, BARBACID, 2005). Além disso, também atua na inibição, por fosforilação, da proteína p27, uma CKI da família Kip/Cip (SHAPIRO, 2006). Dessa

forma, a transição G1/S é positivamente regulada pelos complexos ciclina-E/CDK2 (VODERMAIER, 2004; ZHANG; KOEPP, 2006).

Simultaneamente aos eventos que ocorrem na fase S, a inativação total da proteína Rb e acúmulo de E2F no núcleo resultam na expressão das ciclinas A e B. Considerando que ciclina E é encaminhada para destruição proteolítica na fase S, a proteína CDK2 liga-se à ciclina A. O complexo ciclina A-CDK2 fosforila E2F, presente no núcleo, reduzindo sua afinidade pelas regiões promotoras de genes alvos. Dessa forma, ocorre a transição da fase S para a fase G₂ (KITAGAWA et al., 1995; MALUMBRES; BARBACID, 2005). A ciclina A também é capaz de se ligar na proteína CDK1 e este complexo também fosforila a proteína Rb, resultando na sua ligação com a proteína E2F, tornando-a completamente inativa (MALUMBRES, 2011). A ciclina A é então progressivamente degradada no final da fase G₂ permitindo que a ciclina B ligue-se à CDK1 (MALUMBRES, 2011). O complexo ciclina B-CDK1 é importante para o início da mitose, uma vez que regula eventos críticos nas fases de prófase, prometáfase e metáfase, como a desorganização do envelope nuclear, a condensação dos cromossomos, a fragmentação do aparelho de golgi, a formação do fuso mitótico e a ligação deste com os cromossomos (MALUMBRES, 2011; MORALLI et al., 2013). Após o pareamento dos cromossomos na placa metafásica, bem como a correta ligação do fuso mitótico aos cinetocoros, ocorre a inativação dos complexos ciclina B-CDK1, por destruição proteolítica de ciclina B, mediada pelo complexo APC/C (HARPER et al., 2002; PETERS, 2002).

Vários níveis de regulação existem com a finalidade de controlar a atividade dos complexos ciclina-CDK, a fim de que eles possam desempenhar suas funções da maneira correta e, principalmente, no tempo exato, para que a progressão entre as fases ocorra sem intercorrências (SHERR; ROBERTS, 1999). Uma importante classe de proteínas, denominadas CKI's (*cyclin-dependent kinases inhibitor*), inibem a atividade dos complexos de diferentes formas, seja por fosforilação ou interação proteína-proteína (SHERR; ROBERTS; 1999; VIALLARD et al., 2001; MASSAGUE, 2004; CAZALINI et al., 2010; LEE et al., 2012). A classe de proteínas CKI possui duas grandes famílias de proteínas inibitórias, a INK4, composta pelas proteínas p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}. Estas proteínas ligam-se às proteínas CDK4/6, impedindo a ligação da ciclina D. A segunda família, chamada Cip/Kip, é composta pelas proteínas p21, p27 e p57, e elas ligam-se aos complexos ciclina-CDK, formando um

complexo trimérico, resultando na inativação da sub-unidade catalítica CDK (SHERR; ROBERTS, 1999). No entanto, a expressão de CKIs é induzida por ativação de checkpoints quando o bloqueio no ciclo se faz necessário, a fim de permitir que um possível dano ao DNA possa ser reparado ou que as condições de oferta de nutrientes sejam permissivas para a continuidade do ciclo celular (MORALLI et al., 2013). Em condições normais, após a sinalização mitogênica, os complexos ciclina D-CDK4/6 formam-se, inativando através de fosforilação as proteínas p21 e p27, liberando os complexos ciclina E-CDK2 da ação destes inibidores (SHERR; ROBERTS, 1999; BLAIN, 2008). A proteína CDK2, quando ativada, também é capaz de inativar a proteína p27 por fosforilação, encaminhando-a para destruição via proteossomo (MASSAGUE, 2004).

O bloqueio no ciclo celular pode ocorrer frente a diferentes tipos de estresse celular. Danos ao DNA, por exemplo, ativam checkpoints e acionam vias de sinalização que, normalmente, envolve ativação de p53 e de seus alvos incluindo da proteína p21, uma CKI. O aumento na expressão de p21 induz bloqueio no ciclo celular tanto na fase G₁ quanto nas fases G₂ e M, devido a sua capacidade de inibir diferentes complexos ciclina-CDK (CAZALINI et al., 2010; LEE et al., 2012).

Enquanto as CKI's atuam inibindo a atividade dos complexos ciclina-CDK que pode resultar em bloqueio no ciclo celular, as serina-treonina cinases Aurora A, Aurora B e PLK1 (*polo-like kinase 1*) atuam, através de ciclos de fosforilação, regulando eventos críticos para o sucesso da mitose (GIET; PETRETTI; PRINGENT, 2005; WANG, Y. et al., 2014; LIU; SUN; WANG, 2017).

Embora aurora A e aurora B sejam estruturalmente similares, elas localizam-se em locais diferentes da célula consequentemente modulando eventos diferentes na mitose (GAVRIILIDIS; GIAKOUSTIDIS; GIAKOUSTIDIS, 2015). A expressão de aurora A aumenta no final da fase S do ciclo celular, após a duplicação do centrôssomo (PALLAZO et al., 2000; MAHEN; VENKITADAMAN, 2012). No centrôssomo, atua recrutando proteínas importantes para a nucleação dos microtúbulos do fuso mitótico como a γ -tubulina e a centrossomina (HANNAK et al., 2001; CONTE et al., 2003; TOJI et al., 2004; ARE et al., 2006; MORI et al., 2007). Além disso, aurora A atua ativando indiretamente complexos ciclina B1-CDK1 uma vez que, além de fosforilar e encaminhar para degradação Wee1, responsável por inibir o complexo ciclina B1-CDK1, ela fosforila dois importantes ativadores deste

complexo, CDC25b e CDC25c (ELIA; CANTLEY; YAFFE, 2003; DUTERTRE et al., 2004; VUGT; BRÁS; MEDEMA; 2004; SEKI et al., 2008).

A função de aurora A parece ser crítica para a formação do fuso mitótico bipolar uma vez que sua depleção induz alterações como formação do fuso mitótico monopolar ou multipolar, induzindo bloqueio no ciclo celular durante a mitose e apoptose (GLOVER et al., 1995; HANNAK et al., 2001; GIET et al., 2002; KUFER et al., 2002; EYERS et al., 2003; MARUMOTO et al., 2003; EYERS; MALLER, 2004; LIU; RUDERMAN, 2005; BIRD; HYMAN, 2008; KATAYAMA et al., 2008; YAN et al., 2016; FREITAS-SILVA et al., 2018). Além de atuar na quebra do envelope nuclear (PORTIER et al., 2007), aurora A fosforila Eg5 (motor tipo cinesina Eg5) que atua na separação dos centrossomos para os polos da célula (GIET et al., 1999).

Aurora A é superexpresso em muitos tipos de câncer inclusive no câncer de mama, onde a elevação da expressão de aurora A está relacionada com mau prognóstico inclusive em mulheres diagnosticadas com câncer de mama cujas células expressam o receptor de estrogênio (ZHOU et al., 1998; NADLER et al., 2008; LI et al., 2009; DAS et al., 2010; ALI et al., 2012; SIGGELKAN et al., 2012). A expressão de aurora A pode ser regulada pelo receptor de estrogênio (LEE et al., 2008; JIANG et al., 2010).

Já aurora B atua diretamente na regulação da orientação bipolar do fuso mitótico, na segregação cromossômica e na citocinese (DEWAR et al., 2004; BOLANOS-GARCIA, 2005). Esta atividade está relacionada com a formação do complexo passageiro do cromossomo (CPC) formado por INCENP (*inner centrossome protein*), survivina, borealina e por aurora B (GASSMAN et al., 2004; SAMPATH et al., 2004; BEVETSIAS; LINARDOPOULOS, 2015). O complexo atua como um sensor de tensão entre os microtúbulos do fuso mitótico e os cinetócoros dos cromossomos onde, caso a ligação não tenha ocorrido em orientação bipolar, aurora B, através de fosforilação, induz a ruptura da ligação entre o microtúbulo e o cinetócoro, favorecendo que outra ligação ocorra (BEVETSIAS; LINARDOPOULOS, 2015). Além disso, aurora B é uma das cinases responsáveis por fosforilar a proteína histona H3 (Ser10 e Ser28), crítica para a condensação dos cromossomos (HSU et al., 2000; ADAMS et al., 2001; GIET; GLOVER, 2001; PETERSEN et al., 2001; GOTO et al., 2002).

Na citocinese, aurora B desempenha um papel crítico modulando, dentre outras coisas, a remodelação do citoesqueleto (GOTO et al., 2003; MINOSHIMA et al., 2003). Durante esta etapa, aurora B fosforila MgcRacGAP (proteína ativadora de GTPase), localizada no corpo mediano da célula em mitose. Esta fosforilação ativa esta proteína que, por sua vez, ativa RhoA, cuja atividade é crítica para montagem do anel contrátil (MINOSHIMA et al., 2003). Além disso, aurora B fosforila vimentina (ser72), filamento intermediário importante na formação do sulco de clivagem. Na ausência de fosforilação, as células filhas mantem-se ligadas por grandes pontes de citoplasma, ocorrendo falhas graves na citocinese (GOTO et al., 2003).

Já a proteína PLK1, também altamente expressa em células de câncer (RAMANI et al., 2015; TUT et al., 2015; ZHANG et al., 2015) inclusive no câncer de mama (WEICHERT et al., 2005), atua principalmente favorecendo a entrada da célula na mitose, a montagem do fuso mitótico e a segregação cromossômica (WEERDT; MEDEMA, 2006). Sua atividade garante a integridade e estabilidade genômica (MUNDT et al., 1997).

PLK1, cujo pico de sua expressão ocorre na fase M (LIU, SUN, WANG, 2017), também regula a ativação do complexo ciclina B1-CDK1 (GAVET; PINES, 2010), reprime a atividade transcricional de p53 (ANDO et al., 2010) além de fosforilar e ativar as proteínas aurora A (ASTERI; MATTIA; GUARGUAGLINI, 2015; MACUREK et al., 2008) e aurora B (RAAB et al., 2015).

2.3 Via de sinalização MAPK

Em células normais, deve haver um controle entre a produção e liberação de sinais indutores da divisão celular para que o organismo possa manter o número de células bem como a arquitetura e função dos órgãos. Falhas nos sistemas que regulam proliferação, diferenciação e morte contribuem para o desenvolvimento do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O estímulo contínuo de proliferação nas células tumorais pode estar relacionado à vários eventos como: a produção excessiva de fatores de crescimento no microambiente tumoral e a ligação aos receptores de ativação da proliferação

celular na própria célula tumoral (sinalização autócrina) ou nas células vizinhas, tumorais ou não (sinalização parácrina), o aumento na expressão de receptores relacionados com a proliferação celular (ex: EGFR; RE) e a ativação constitutiva de vias de sinalização que, em geral, ocorre devido a mutações somáticas em genes que codificam para receptores ou proteínas envolvidas na via de sinalização (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004; CHENG et al., 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A via de sinalização das MAPKs está intimamente relacionada com proliferação, sobrevivência, migração e invasão bem como resistência aos quimioterápicos utilizados na rotina clínica (DE LUCA et al., 2012). Esta via pode ser ativada de várias maneiras incluindo a ativação de receptores de superfície, pelo estresse metabólico, por interações com a matriz extracelular, por comunicação célula-célula e até mesmo por danos ao DNA (YANG; SHARDOCKS; WHITMARSH; 2013). Existem quatro vias distintas MAPK que compartilham características comuns: possuem 2 proteínas que são serina-treonina cinases e 1 proteína treonina-tirosino cinase (DHANASEKARAN; REDDY, 1988; BUROTTO et al., 2015). A via mais compreendida é a via MAPK/ERK. As vias MAP Kinase 1 (BMK-1), a via c-jun n-terminal quinase (JNK) e a via p38 apesar de intimamente relacionadas com o câncer, são menos estudadas e compreendidas (BUROTTO et al., 2015).

As proteínas das vias MAPK são genericamente designadas, de acordo com sua ordem de ativação: MAPKKK (MAP kinase-kinase-kinase), MAPKK (MAP kinase-kinase) e MAPK (MAP kinase) (YANG; SHARDOCKS; WHITMARSH; 2013). Na via de sinalização MAPK/ERK, existem três isoformas da proteína MAPKKK: A-RAF, B-RAF e a C-RAF, também conhecida como Raf-1, sendo que são evidenciadas com maior frequência mutações no gene que codifica B-RAF, principalmente em tumores mamários. Já nas proteínas MAPKK, existem duas isoformas (MEK-1 e MEK-2), assim como nas proteínas MAPK (ERK-1 e ERK-2) (ROBBINSON; COBB, 1997).

A cascata de sinalização da via MAPK/ERK inicia-se quando a proteína RAS é ativada, o que pode acontecer frente a diferentes estímulos incluindo a ativação de receptores tirosina cinases e receptores acoplados à proteína G (BUROTTO et al., 2015). A proteína RAS é uma proteína ligante de nucleotídeos de guanina que, quando associada ao GDP, encontra-se no seu estado inativo e livre no citoplasma. Porém, quando RAS é ativada, modulada por Ras-GEF (*guanine nucleotide exchange factors*), a proteína desassocia-se do GDP, ligando-se ao GTP, ancorando-se na

membrana plasmática. Na membrana, por interação proteína-proteína, ativa proteínas efetoras não só da via MAPK (B-RAF, Raf-1) mas também proteínas efetoras de outras vias, como Akt (BOS; REHMANN; WITTINGHOFER, 2007; ASATI et al., 2016).

A proteína RAF, uma serina-treonina quinase, quando ativada, expõe seu sítio catalítico sendo então capaz de fosforilar MEK-1 e MEK-2. Estas, por sua vez, fosforilam as proteínas ERK-1 e ERK-2 que, uma vez ativadas, regulam diferentes processos biológicos (YANG; SHARDOCKS; WHITMARSH; 2013).

As funções de ERK estão relacionadas à eventos citoplasmáticos e nucleares (BUROTTTO et al., 2015). No citoplasma, ela é capaz de modular o movimento e adesão celular, uma vez que fosforila elementos do citoesqueleto, bem como reguladores do metabolismo celular (PULLIKUTH; CATLING. 2007). No núcleo, tem um importante papel na regulação transcricional, uma vez que é capaz de fosforilar fatores de transcrição críticos para a proliferação celular como c-fos e c-myc (SIGOILLOT; EVANS; GUY, 2002; ZASSADOWSKY et al., 2012). A atividade destes fatores de transcrição está intimamente relacionada com o grau de ativação das vias MAPK uma vez que, quando transientemente ativos, c-fos e c-myc são instáveis e são rapidamente degradados mas, quando a sinalização é forte e sustentada, c-fos é fosforilada e liga-se na região promotora de genes importantes para a proliferação celular, como ciclina D, e para a sobrevivência, como Bcl-2 (ZASSADOWSKY et al., 2012, BUROTTTO et al., 2015).

Mutações são a principal causa de desregulação e hiperativação da via MAPK. São conhecidas 21 mutações no receptor EGFR que, quando presentes, desencadeiam a ativação do receptor independente da presença de fatores de crescimento resultado na ativação da via MAPK. Também são conhecidas mutações nos genes que codificam as proteínas RAS e B-RAF e estas mutações são capazes de propagar a cascata de sinalização da via MAPK mesmo que receptores tirosino-quinases como o EGFR não tenham sido ativados (ROBERTS; DER, 2007; BUROTTTO et al., 2015).

2.4 O câncer de mama

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea, constituída por uma variedade de tumores malignos que apresentam padrões histológicos e perfis genéticos distintos, de forma que podem apresentar diferentes comportamentos clínicos (AL-AWADHI; MURRAY; IBRAHIM, 2018). As opções terapêuticas também variam considerando a classificação do tumor (LYONS; DICKLER; COMEN, 2018). Na rotina clínica, a expressão de quatro biomarcadores (ER – receptor de estrogênio; PR – receptor de progesterona; HER-2 – receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (*human epidermal factor growth type 2*) e Ki67, um marcador de proliferação celular) é utilizada afim de caracterizar o tipo tumoral e guiar as propostas terapêuticas (VUONG et al., 2014). Baseado na análise destes biomarcadores, 5 subtipos foram propostos: (1) subtipo luminal A/B, onde o subtipo A expressa os receptores de estrogênio e progesterona com baixa expressão de Ki67 e o subtipo B expressa apenas o receptor de estrogênio com elevada expressão de Ki67; (2) HER-2 *enriched* (enriquecido com HER-2), subtipo que apresenta superexpressão do receptor HER-2; (3) subtipo triplo-negativo, que não expressa nenhum dos três receptores (ER, PR, HER-2) mas que apresentam elevada expressão de marcadores da transição epitélio-mesenquimal. Este subtipo é também chamado de triplo-negativo; (4) *claudin-low*, sub-tipo que surgiu a partir do subtipo basal-like e expressa as proteínas claudinas 3, 4 e 7; (5) *normal breast like* (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003). No entanto, existem outros biomarcadores, pouco investigados na rotina clínica, que auxiliam os profissionais na escolha da melhor proposta terapêutica onde podemos destacar a análise da expressão dos receptores de androgênio (AR), de estrogênio do tipo β (ER β) bem como a análise de mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* (VUONG et al., 2014).

No tecido mamário, o estrogênio é importante para o desenvolvimento das glândulas mamárias, uma vez que as células possuem receptores para esse hormônio que, quando ativados, são capazes de induzir a divisão celular (HALDOSÉN; ZHAO; WRIGHT, 2014). Dois receptores são predominantemente expressos no tecido mamário (receptor de estrogênio tipo alfa (RE α) e o receptor de estrogênio tipo beta (RE β), enquanto o receptor de estrogênio acoplado à proteína G é menos expresso no tecido mamário saudável (SPEIRS et al., 2002). Os mecanismos de atuação dos receptores de estrogênio não estão completamente elucidados, mas sabe-se que quando ligados ao estrogênio, ocorre uma alteração conformacional no receptor

expondo um fator de ligação ao DNA (AF-1) que se liga à região promotora de genes responsivos ao estrogênio, modulando o perfil de expressão gênica (YIP; RHODES, 2018).

Aproximadamente 75% dos tumores mamários malignos expressam receptores para estrogênio (RE+). Normalmente estão relacionados ao câncer de mama que é diagnosticado em mulheres pós-menopausa que tiveram muitas gestações a termo; contudo, ocorre também em mulheres que tiveram sua primeira gestação após os 30 anos de idade e naquelas que apresentaram menarca tardia (após os 15 anos) (JIA et al., 2015, INCA, 2016; AUGUSTO et al., 2018; BRUFISKY; DICKLER, 2018; DEEKS, 2018). Pacientes diagnosticadas com câncer de mama RE+ possuem melhor prognóstico quando comparadas com aquelas cujos tumores não expressam o receptor de estrogênio (OSBORNE; SCHIFF, 2011; CHEN et al., 2018; AUGUSTO et al., 2018; BRUFISKY; DICKLER, 2018; DEEKS, 2018).

Em células tumorais, os receptores RE α e o GPRE1 estão preferencialmente associados com ativação da proliferação celular, ao passo que o RE β está relacionado à processos citostáticos e de diferenciação celular (VRTACNIK et al., 2014; AFRICANDER; STORBECK, 2017; BOONYARATANAKORNKIT et al., 2017; HILTON; CLARCKE. GRAHAM, 2018; MILLS; RUTKOVSKY; GIORDANO, 2018). Estudos mostram que o RE β , quando co-expresso com o RE α pode encaminhá-lo à destruição proteolítica e inibir a proliferação celular em linhagens tumorais (ZHAO et al., 2007; HANDOSÉN; ZHAO; WRIGHT, 2014). Células que expressam RE α (T47-D e MCF-7) proliferam mais rapidamente em resposta ao tratamento com estrogênio ou com o agonista do RE α propil-pirazol-triol (PPT). Porém, quando tratadas com um agonista do RE β (DNP), as taxas de proliferação decaem, evidenciando os distintos papéis dos receptores de estrogênio no processo de divisão celular (PARUTHIYIL et al., 2004; SOTOCA et al., 2008).

Estudo realizado com linhagem celular derivada de câncer de mama de murinos (HC11) mostrou que o estrogênio não altera o comportamento proliferativo de células que expressam ambos os receptores (RE α e RE β), contudo, o uso do agonista para RE α ativa a proliferação celular e o uso do agonista para RE β inibe a proliferação celular, com aumento significativo de células em apoptose (HELGUERO et al., 2005). A expressão do RE β em mulheres diagnosticadas com câncer de mama

RE+ está fortemente relacionada com melhores prognósticos quando comparada com a expressão do RE α (ROGER et al., 2001; MYERS et al., 2004). Tumores que apresentam elevada expressão de RE β , normalmente, são pequenos e menos invasivos (MAROTTI et al., 2010). Estudos mostram que, ao contrário do RE α , a ativação do RE β reduz a expressão do fator de transcrição c-myc, fortemente relacionado com a indução da proliferação celular (STROM et al., 2004; HARTMAN et al., 2009). Os receptores de estrogênio do tipo alfa e beta possuem sequências diferentes de aminoácidos em seu domínio de ligação ao DNA, que torna cada receptor específico para genes específicos, modulando comportamentos diferentes na célula (HALDOSÉN; ZHAO; WRIGHT, 2014). Diante do exposto, o RE α desempenha um papel importante na patologia de alguns subtipos de câncer de mama, quando comparado com os receptores RE β e o receptor de estrogênio acoplado à proteína G – GPER1, uma vez que é capaz de ativar a proliferação celular (NAGAPRASHANTHA et al., 2017).

O receptor RE α pertence à subfamília 3 do grupo A de receptores nucleares, sendo formada por duas subunidades: AF-2 (domínio de ligação ao ligante – ex: estrogênio) e AF-1 (domínio de ligação ao DNA) que, além de atuar como fator de transcrição de genes relacionados com a proliferação celular (via genômica direta), pode também se ligar com fatores de transcrição por interação proteína-proteína, como c-JUN, c-FOS, NF-kB, GATA1 e STAT5 (via genômica indireta). O referido receptor também pode atuar na sinalização não-genômica, ativando não só cascatas de proteínas cinases (via das MAPK quinases e via PI3K/Akt) como também aumentar a concentração de pequenos sinalizadores intracelulares, como o Ca²⁺ e o cAMP (AMP cíclico) (VRTACNIK et al., 2014; CRUZ; JARQUÍN, 2017).

Desde 1970, a terapia endócrina (TE) tem sido usada como terapia adjuvante em propostas terapêuticas para tumores de mama que expressam receptores de estrogênio. Atualmente, a TE consiste em: (1) suprimir as funções do ovário; (2) modular seletivamente a atividade dos receptores de estrogênio, diminuindo sua atividade ou acelerando sua degradação; e (3) inibir a atividade da aromatase, enzima-chave para a biossíntese de estrogênio. Em geral, as propostas terapêuticas envolvem o uso de 2 ou mais fármacos, sendo comumente direcionadas para o uso de bloqueadores dos receptores de estrogênio em combinação com inibidores de aromatase (LUMACHI; SANTEUFEMIA; BASSO, 2015). Além de reduzir a

probabilidade de recidivas de tumores RE+, a terapia endócrina também reduz o risco de metástase e invasão de linfonodos (DRAGANESCU; CARMOCAN, 2017).

Outro importante receptor é o receptor ERBB2 (também denominado de HER-2, do inglês *human epidermal receptor type 2*), onde a superexpressão é encontrada em aproximadamente 15% dos tumores (ROMANÍ et al., 2018). Trata-se de um receptor tirosina-cinase que pertence a família do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) que, quando ativado, desencadeia diferentes respostas celulares incluindo proliferação, migração e sobrevivência. Esses eventos, normalmente, são desencadeados pela ativação das vias de sinalização MAPKs e PI3K/Akt/mTOR (AL-AWADHI; MURRAY; IBRAHIM, 2018; ROMANÍ et al., 2018). Pacientes que apresentam superexpressão de HER2+ podem ser beneficiados por terapias alvo-dirigidas que empregam anticorpos monoclonais (Heceptin®, por exemplo) ou inibidores seletivos de receptores tirosina-cinase (Lapatinib) que, respectivamente, impedem a ativação do referido receptor e bloqueiam a ativação de vias oncogênicas (AL-AWADHI; MURRAY; IBRAHIM, 2018).

Já o subtipo de câncer de mama triplo-negativo é definido pela ausência da expressão tanto dos receptores de estrogênio e de progesterona, acompanhado pela ausência de superexpressão de HER2 (SHARMA et al., 2018). O prognóstico desse subtipo de câncer é ruim quando comparado com os demais tipos de câncer de mama, uma vez que esse subtipo de tumor não apresenta alvo terapêutico (BAGLIA et al., 2018). Apenas 30% dos pacientes diagnosticados como triplo-negativos sobrevivem, após o diagnóstico, por 5 anos ou mais (ESKILER et al., 2018). Além disso, estudos mostram que esses pacientes frequentemente apresentam recidivas e alta incidência de metástases (COSTA; HAN; GRADISHAR, 2018). A abordagem terapêutica utilizada nesse caso é a quimioterapia com emprego de fármacos de caráter citotóxico, como antraciclina (doxorrubicina) e taxanos (paclitaxel e o docetaxel) (SHARMA et al., 2018).

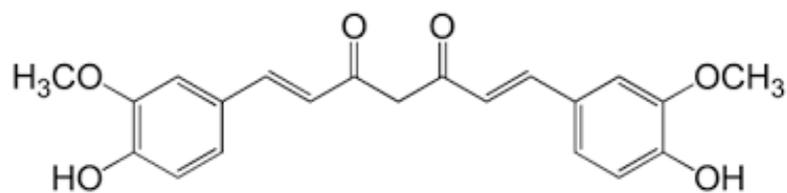
Infelizmente, alguns tumores são, ou tornam-se resistentes às terapias-alvo ou à quimioterapia padrão com antraciclina e taxanos e, além disso, podem induzir o aparecimento de tumores no ovário, sarcoma uterino, tromboembolia, leucemia, síndrome mielodisplásica, cardiotoxicidade e morte em decorrência dos efeitos adversos dos medicamentos (DRAGANESCU; CARMOCAN, 2017; KIM, 2017; LEUNG et al., 2017; MANSOURI et al., 2017; STIRES et al., 2017; BAGLIA et al.,

2018; COSTA; HAN; GRADISHAR, 2018; ESKILER et al., 2018; SHARMA et al., 2018;). Portanto, a identificação de novas substâncias é relevante para melhorar as propostas terapêuticas para pacientes que não respondem as terapias disponíveis ou para aqueles que apresentam resistência aos agentes antineoplásicos disponíveis (HARVEY, 2000; RING; DOWSETT, 2004; DRAGANESCU; CARMOCAN, 2017). Nesse contexto, os produtos naturais são uma importante fonte para a identificação de novas substâncias bioativas com atividade antitumoral, sendo que de 60% a 80% dos agentes antineoplásico são provenientes de produtos naturais ou baseados em compostos naturais (WANG, C.Z. et al, 2014; NEWMAN; CRAGG, 2016; THOMFORD et al., 2018; LI et al., 2019)

2.5 Curcumina

A curcumina (Figura 3), 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-diano-3,5-diona, é um polifenol hidrofóbico (BANIK et al., 2017), bioativo, extraído do rizoma da espécie *Curcuma longa*, também conhecida como turmeric ou açafrão-da-terra (BERRAK et al., 2016; ZHIPIN; YAGNANG, 2016).

Figura 5 – Estrutura química da curcumina



Fonte: adaptado de FREITAS-SILVA et al., 2018

Estudos mostram que a curcumina tem uma grande variedade de propriedades farmacológicas, incluindo as atividades anti-inflamatória, antireumática, antioxidante, antibacteriana, antiespasmódica e anticoagulante. Tem sido proposto também que a curcumina pode ser útil no tratamento de várias doenças como diabetes, síndrome metabólica, Alzheimer e câncer. O interesse na utilização da curcumina como agente terapêutico está relacionado a sua atividade multi-alvo e por ser uma substância

farmacologicamente segura (MANDALAPU et al., 2016; SOTO; CALAF, 2016; WANG, X. et al., 2016; WANG, K. et al., 2016; ZHIPIN; YAGNANG, 2016; BANIK et al., 2017; TAJBAKSHSH et al., 2017).

O potencial antitumoral da curcumina tem sido demonstrado em muitos estudos *in vitro* onde a curcumina inibe a proliferação de células derivadas câncer gástrico (HUANG et al., 2017), câncer do ovário (PISTOLLATO et al., 2017), bexiga (AFSHARMOGHADAM et al., 2017), pâncreas (KANAI, 2014), câncer de pulmão de células não-pequenas (IKEDA et al., 2010), carcinoma hepatocelular (CHENG; LIN; SU, 2010), câncer de cólon (KIM; LEE, 2010), osteosarcoma (LEOW et al., 2010), glioma (WEISSENBERGER et al., 2010) e de cabeça e pescoço (CLARK et al., 2010). Além disso, um número grande de pesquisas tem sido feitas afim de elucidar os efeitos da curcumina no câncer de mama que expressa o receptor de estrogênio (MCF-7) e células caracterizadas como triplo-negativo (MDA-MB-231) (MASUELLI et al., 2013; MANDAPALU et al., 2016; WANG, X. et al., 2016; BANIK et al., 2017; TAJBAKSHSH et al., 2017). De acordo com esses autores, o efeito está relacionado à capacidade da curcumina em inibir a progressão do ciclo celular na fase G₂/M (BANIK et al., 2017). Foram propostos vários mecanismos relacionados aos efeitos da curcumina sobre células tumorais, dentre eles a inibição das vias MAPK (MASUELLI et al., 2013; BANIK et al., 2017), PI3K/Akt/mTOR (MANDAPALU et al., 2016; WANG, X. et al., 2016; TAJBAKSHSH et al., 2017) e NF-κB (SOTO; CALAF, 2016; BANIK, et al., 2017; TAJBAKSHSH et al., 2017).

Estudo realizado por Masuelli et al. (2013) mostrou que na linhagem MCF-7, a curcumina foi capaz de induzir apoptose devido ao aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax com concomitante redução de Bcl-2, um fator anti-apoptótico. Os autores relacionaram tais eventos com a capacidade da curcumina em reduzir a fosforilação de ERK e de p38MAPK. A curcumina, também na linhagem MCF-7, é capaz de reduzir a expressão de ERK fosforilada em células resistentes ao quimioterápico cisplatina, sensibilizando às células a esse fármaco (ZOU et al., 2018). Outros modelos também evidenciaram a capacidade da curcumina em modular a atividade da via MAPK, através da redução de fosforilação de ERK, como em linhagens de câncer pancreático (BxPC3 e Panc-1) (CAO et al., 2016) e nasofaríngeo (CNE-2Z) (XIE; WU; TANG, 2014). Na linhagem MDA-MB-231, um modelo triplo-negativo de câncer de mama, a curcumina reduziu a capacidade de invasão, bem

como a expressão de MMP-9, efeitos também relacionados com a redução da fosforilação de ERK (MO et al., 2012).

Apesar da curcumina apresentar promissora atividade antitumoral, sua baixa solubilidade (0,4 µg/mL pH=7,3) e biodisponibilidade (50ng/12g) limita sua translação clínica (TEITEN, DICATO e DIEDERICH, 2014; YALLAPU, JAGGI & CHAUHAN, 2012; PRASAD, TYAGI & AGGARWAL, 2014). Para superar esses desafios, estudos têm sido conduzidos para obter novos análogos que apresentem atividade igual ou superior à observada para a curcumina, mas que possam apresentar um melhor perfil de solubilidade e biodisponibilidade.

Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, 8 substâncias sintéticas foram obtidas, as quais contém um domínio de analogia à curcumina. Dentre elas, 3 substâncias (PQM-162, PQM-163 e PQM-164) inibiram significativamente a proliferação de células derivadas de câncer de mama que expressam receptores para estrogênio (RE+) (MCF-7) (SILVA et al., 2018). No mesmo estudo, foi demonstrado que a molécula PQM-162 inibe a proliferação devido a sua capacidade de modular a expressão de genes críticos para a transição G2/M e para a progressão pelas fases iniciais da mitose. Contudo, não foi explorado ainda a influência das substâncias PQM-163 e PQM-164 sobre o comportamento proliferativo de células MCF-7 e tampouco sobre outras linhagens que não expressam receptores de estrogênio. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos dessas substâncias sobre linhagens celulares derivadas de câncer de mama com diferentes características genéticas.

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novas propostas terapêuticas para o câncer de mama é relevante considerando que a doença representa a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo e no Brasil. Aproximadamente 75% dos tumores mamários expressam receptores para estrogênio (RE+) e as terapias hormonais representam o tratamento adjuvante de escolha. Contudo, alguns tumores são resistentes ou tornam-se resistentes as drogas utilizadas convencionalmente nas propostas terapêuticas. Além disso, os tumores que apresentam perfil triplo-negativo, mesmo menos incidentes, são mais agressivos e possuem menos opções medicamentosas para o tratamento. Portanto, é necessária a identificação de novos compostos que sejam mais efetivos no tratamento do câncer de mama ou que possam atuar como adjuvantes nas terapias já existentes.

Essa proposta é subsidiada por estudos prévios do nosso laboratório que mostraram promissora atividade antitumoral de um derivado da curcumina, a molécula PQM-162, sobre células de câncer de mama MCF-7, que expressam o receptor de estrogênio (SILVA et al., 2018). Entretanto, não foram conduzidos estudos acerca da atividade antitumoral nesta linhagem com as moléculas PQM-163 e PQM-164 assim como não há estudos que relacionam os efeitos destas moléculas nas linhagens triplo-negativo Hs578t e MDA-MB-231. Novos estudos devem ser realizados afim de avaliar os mecanismos moleculares relacionados com atividade antitumoral previamente observada, buscando elucidar os efeitos das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 em células de câncer de mama MCF-7, Hs578t e MDA-MB-231.

4 OBJETIVOS

Nesta seção serão descritos os objetivos gerais e específicos deste trabalho.

4.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos biológicos relacionados à atividade antiproliferativa e/ou citotóxica das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 sobre células derivadas de diferentes subtipos de câncer de mama (MCF-7, Hs578t e MDA-MB-231).

4.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- a) Avaliar a influência das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 sobre o comportamento proliferativo e/ou citotóxico das linhagens celulares estudadas em curto e médio prazo;
- b) Investigar a possível influência das substâncias sobre a via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK, que normalmente encontra-se alterada em tumores de mama;
- c) Verificar se a atividade citotóxica das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 estão relacionadas à indução de apoptose ou a outro tipo de morte celular;
- d) Avaliar os efeitos das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 sobre células MCF-7 resistentes a doxorrubicina;
- e) Avaliar se o uso combinado de PQM-162, PQM-163 e PQM-164 com a doxorrubicina é capaz de sensibilizar à linhagem resistente ao tratamento com a doxorrubicina.

- f) Avaliar se as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 são capazes de modular a expressão de genes críticos para a mitose, como ciclina B1, p21, aurora A, aurora B e PLK1, bem como genes que regulam a apoptose, como Bax e Bcl-2.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

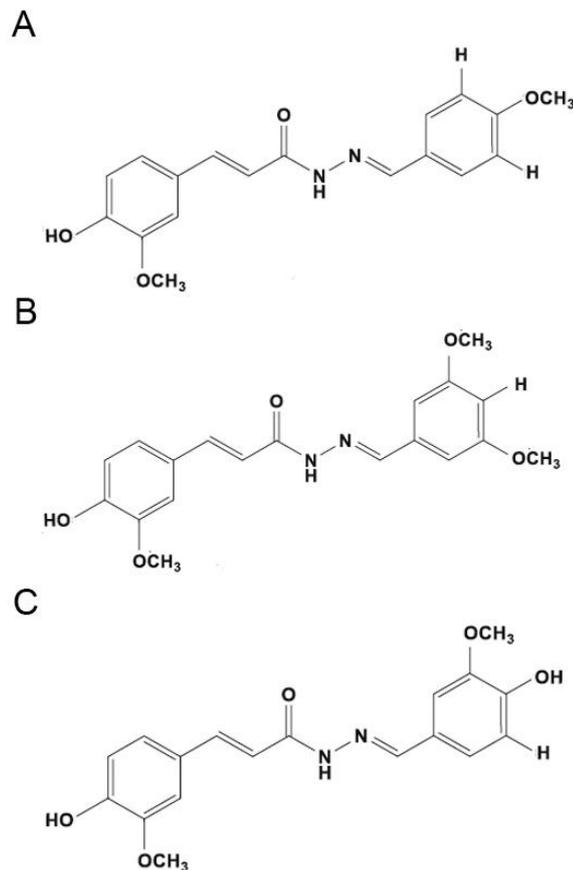
5.1 Linhagem celular e condições de cultivo

O presente estudo utilizou linhagens celulares derivadas de diferentes subtipos de câncer de mama (MCF-7 (RE⁺); Hs578t (RE⁻) e MDA-MB-231 (RE⁻) e a linhagem não-tumoral de queratinócito (HaCaT), derivadas de pele humana normal. As linhagens foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em DMEM (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil) e mantidas em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂. As subculturas foram feitas a cada dois dias e estoques foram armazenados em nitrogênio líquido.

5.2 Origem das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164

As moléculas PQM-162 ((E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N'-(4-methoxybenzylidene) acrylohydrazide; peso molecular: 326,12) (Figura 6A), PQM-163 ((E)-N'-(3,5-dimethoxybenzylidene)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylohydrazide; peso molecular: 356,14) (Figura 6B), e PQM-164 ((E)-N'-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylohydrazide; peso molecular: 342,14) (Figura 6C) foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Cláudio Viegas Júnior, docente da Universidade Federal de Alfenas e pesquisador na área de química medicinal no Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuim) da Universidade Federal de Alfenas. Os compostos sintéticos foram planejados e sintetizados utilizando estratégias de hibridação molecular. Foram utilizados espaçadores com característica polar objetivando melhorar a solubilidade das moléculas em meio aquoso (FREITAS-SILVA et al., 2018). As moléculas foram solubilizadas em DMSO (solução-estoque, concentração de 20mM). Além das moléculas de estudo, foi utilizado a molécula curcumina (SIGMA[®]) também diluída em DMSO (solução-estoque, concentração de 20mM) e a molécula doxorrubicina (SIGMA[®]) diluída em PBSA estéril (solução-estoque, concentração de 0,18mM).

Figura 6 – Estrutura molecular das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164



Fonte: adaptado de FREITAS-SILVA et al., 2018

Nota: estrutura das moléculas PQM-162 (A), PQM-163 (B) e PQM-164 (C).

5.3 Análise de viabilidade por ensaio colorimétrico (MTS)

A viabilidade celular foi avaliada por MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio); (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Este ensaio é baseado na conversão enzimática (desidrogenases) do sal tetrazólio em formazano, o qual absorve luz a 490 nanômetro (nm). A taxa de absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas. As células foram semeadas em placas de 96 poços, utilizando inóculo de 1×10^4 células por poço para as linhagens MCF-7, Hs578t e HaCaT e 5×10^3 para a linhagem MDA-MB-231. Para as linhagens tumorais, as substâncias foram utilizadas nas concentrações 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 μM . Já para a linhagem HaCaT, as substâncias foram usadas nas concentrações de 125, 250, 500, 1000 e 2000 μM . Os valores de absorbância obtidos nas amostras tratadas foram comparados com os valores de absorbância das

amostras controles. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Os dados apresentados representam a média \pm o desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. Os valores de IC₅₀ foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). O índice de seletividade foi calculado usando a seguinte fórmula: IC₅₀ encontrado em células normais / IC₅₀ em encontrado células tumorais.

5.4 Curva de crescimento e ensaio de exclusão com Azul de Tripano

As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro, com inóculo de 2×10^5 células nas linhagens MCF-7 e Hs578t e de 1×10^5 para a linhagem MDA-MB-231. Após adesão, as células foram tratadas com as moléculas nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (Tripsina/EDTA, Sigma). As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e o precipitado foi homogeneizado em 100 μ L de PBS pH7,4 0,01M. Após homogeneização das amostras, 100 μ L de azul de tripano (0,4%) foi adicionado à 100 μ L suspensão celular. Em seguida, células viáveis (não-coradas) e não-viáveis (azuis) foram contadas na câmara de Neubauer. Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes.

5.5 Ensaio de Capacidade Clonogênica

Células em baixa densidade (200 células por placa) foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro. Após aderência, as culturas foram tratadas por 24 horas com as moléculas nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M. As células foram mantidas em meio fresco sem as moléculas pelos 14 dias subsequentes em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂. Após o período de recuperação (14 dias), as células foram lavadas com PBSA, fixadas por 30 minutos com Metanol P.A (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e coradas com solução de Violeta Genciana 5% (Farmax®), por 5 minutos,

sendo lavadas em seguida com água destilada. A contagem do número de colônias foi realizada com auxílio de Estereomicroscópio (ZEISS Stemi 305) utilizando aumento de 4x. Foram consideradas somente as colônias que apresentam no mínimo de 50 células. Os dados são apresentados como média \pm DP de 3 experimentos independentes.

5.6 Quantificação de DNA para análise da progressão no ciclo celular

As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro, utilizando inóculo de 2×10^5 células por placa para as linhagens MCF-7 e Hs578t e de 1×10^5 para a linhagem MDA-MB-231. Após tratamento por 24 e 48 horas na concentração de 50 μ M, as células foram coletadas por digestão enzimática (Trypsin-EDTA solution/Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e transferidas para tubos Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1500 rpm) e na sequência as células foram fixadas com etanol gelado (75% em PBSA-Salina fosfato tamponada) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBSA, RNase (1,5 mg/mL) e Iodeto de Propídio (90 μ g/mL) (Guava Technologies, Merck Millipore). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7. onde 10000 eventos foram registrados em cada replicata. Os dados são apresentados como média \pm DP de 3 experimentos independentes.

5.7 Determinação da frequência de Mitoses

As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro sob lamínula estéril com inóculo de 2×10^5 células nas linhagens MCF-7 e Hs578t e de 1×10^5 para a linhagem MDA-MB-231. Após adesão, as células foram tratadas com as moléculas nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M por 24 e 48 horas. Ao término do tratamento, as culturas foram lavadas com PBSA e coradas com Alaranjado de Acridina (Sigma Aldrich LTDA Brasil) na concentração de 100 μ g/mL. Imagens foram obtidas ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada

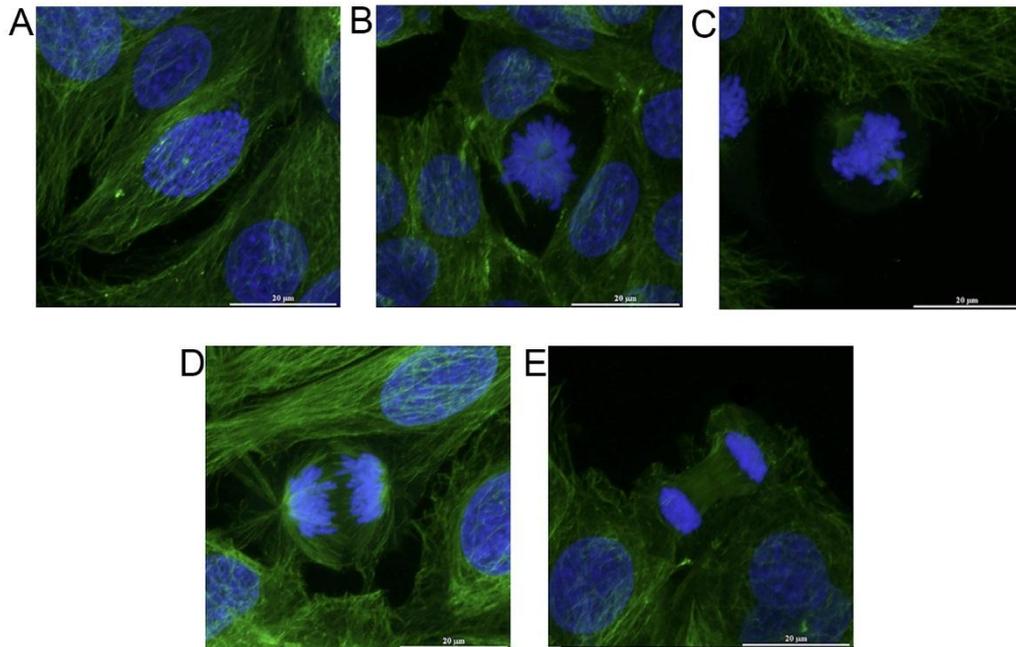
(Digital Sight-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-elements/Nikon/Japan). Foram registradas imagens de campos aleatórios da lâmina e foram contadas 300 células por amostra. Os dados foram apresentados com a média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

5.8 Preparações citológicas fluorescentes exibindo elementos do citoesqueleto

Foram obtidas preparações citológicas evidenciando elementos da citoesqueleto (microfilamentos e microtúbulos). As células da linhagem MCF-7 foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro (2×10^5 células/placa) sobre lamínula. As amostras foram tratadas com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 (50 μ M), por 24 horas. Ao término do tratamento, as células foram fixadas em solução na concentração de 3,7% de formaldeído por 30 minutos e incubadas com Triton X-100 (0,5%) por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas com anti-tubulina (1:50, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a 4° C pernoite. No dia seguinte, após lavagens em PBSA, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho, 1:100, Sigma) conjugado a fluoresceína por 2 horas. Para análise de F-Actina, as amostras foram coradas com faloidina conjugada a TRITC (Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). Os núcleos foram contracorados com DAPI (4',6-Diamidino-2'-Phenilindol diidroclorato, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). As lâminas foram montadas com Vecta Shield® e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sight-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-elements/Nikon/Japan), aumento 400x e microscopia confocal (Nikon) no aumento de 600x.

A determinação da frequência de células nas sub-fases da mitose (Figura 5) foi realizada a partir das preparações fluorescentes exibindo marcações para o DNA, microtúbulos e filamentos de actina.

Figura 7 – Imagens ilustrativas de células em divisão e as diferentes fases da mitose



Fonte: adaptado de AZEVEDO-BARBOSA et al., 2019

Nota: (A) prófase; (B) prometáfase; (C) metáfase; (D) anáfase; (E) telófase. Imagens obtidas em microscopia confocal (Niklon). Aumento de 60x.

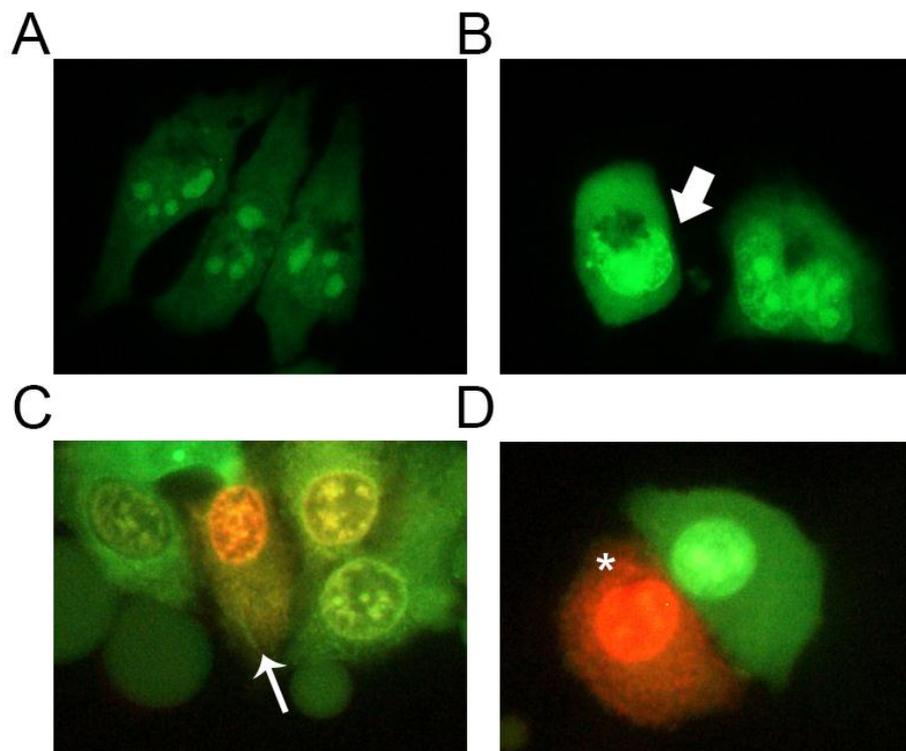
5.9 Ensaio de morte por dupla coloração com Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio

As linhagens foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro, sobre lamínula, cujo inóculo foi de 2×10^5 células por placa para as linhagens MCF-7 e Hs578t e de 1×10^5 para a linhagem MDA-MB-231. Após aderência, as células foram tratadas com as moléculas nas concentrações de $25 \mu\text{M}$ e $50 \mu\text{M}$ pelo período de 24 e 48 horas. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBSA a 37°C e coradas com solução contendo alaranjado de acridina (Sigma Aldrich LTDA Brasil) e brometo de etídio (Sigma Aldrich LTDA Brasil), ambos na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, por 10 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as células foram lavadas em PBSA a 37°C , as lamínulas montadas em lâminas histológicas e levadas ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sight-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-elements/Nikon/Japan) para análise em objetiva de 400x.

Foram contadas 300 células por amostra. A análise foi baseada na permeabilidade ao brometo de etídio e o alaranjado de acridina, bem como no aspecto

morfológico do núcleo (MOGHTADERI; SEPEHRI; ATTARI, 2017). Foram consideradas células viváveis (núcleo levemente corado em verde), células em apoptose inicial (núcleo intensamente corado em verde, cromatina altamente condensada), células em apoptose tardia (núcleo alaranjado com cromatina condensada) e células em necrose (núcleo uniformemente e intensamente corado em vermelho) (Figura 6). Os experimentos foram feitos em triplicada e os dados apresentados representam a média \pm DP de 3 experimentos independentes.

Figura 8 – Imagens fluorescentes representativas do ensaio para detecção de morte celular



Fonte: do autor.

Nota: (A) células viáveis; (B) células em apoptose inicial - seta cheial; (C) células em apoptose tardia - seta; (D) células em necrose - asterisco.

5.10 Ensaio de Anexina V / 7-AAD

O ensaio foi realizado utilizando o *Kit Guava Nexin Reagent* (Merck/millipore) de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com PQM-162, PQM-163 e PQM-164 (50 μ M), por 24 horas na linhagem MCF-7 e por 48 horas na linhagem Hs578T. Após o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (*Trypsin-EDTA solution*/Sigma Aldrich LTDA, Brasil), centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas em PBSA gelado e homogeneizadas em solução contendo anexina conjugada a FITC e 7-AAD. As amostras foram incubadas por 20 minutos, protegidas da luz em temperatura ambiente e a análise foi feita no citômetro fluxo (Guava Mini Easy Cyte, 8HT) através do *software* GuavaSoft 2.7. onde foram registrados 5000 eventos em cada replicata. Os dados apresentados referem-se à média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

5.11 RT-PCR

As células, da linhagem MCF-7, foram semeadas em placas de com 35 mm de diâmetro a uma densidade de 2×10^5 células por placa e tratadas com as moléculas na concentração de 40 μ M (PQM0162) e 50 μ M (PQM-163 e PQM-164). As células foram coletadas por digestão enzimática e após centrifugação (1000 rpm por 5 minutos a 4°C), o precipitado de células foi ressuscitado em 350 μ L de tampão de lise do *kit RNeasy Mini*[®] (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA).

As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA. O RNA total de cada grupo experimental (n=4) foi extraído utilizando o *kit RNeasy Mini*[®] (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante e, então, eluído em 30 μ L de água livre de RNase. A concentração de RNA total das amostras foi mensurada através do espectrofotômetro NanoDrop[®] ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Em seguida 1 μ g de RNA total foi incubado com DNase (1U; Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) para eliminação de possível contaminação com DNA genômico e então submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando *Randon primers* e *High Capacity cDNA Reverse*

Transcription Kit® (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Os reagentes foram incubados a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e então, 85°C por 5 min para a inativação da enzima.

A abundância de mRNA dos genes alvos (*BAX*, *BCL-2*, *AURKA*, *AURKB*, *CCNB1*, *CDNK1*, *PLK1* e *ACTB*) foi investigada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o termociclador ABI Prism7500® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o protocolo de amplificação do *kit Power Syber Green Master Mix*® (Applied Biosystems).

Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo *β-actina*. A abundância relativa de RNAm de cada gene foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência e utilizando uma amostra controle como calibradora (Pfaffl, 2001). Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados através do perfil de amplificação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003).

Tabela 1 - Sequência de bases dos *primers* utilizados na PCR em tempo real.

GENE	SEQUÊNCIA DE PRIMER
AURKA	F 5'- TCTTCACAGGAGGCAAATCCA-3' R 5'-AATAAGTTACACACTCACTCAGGTACTA-3'
AURKB	F 5'-AAAGAGCCTGTCACCCCATC-3' R 5'-CGCCCAATCTCAAAGTCATC-3'
CCNB1 (Cilnina B1)	F 5'- GTACCCTCCAGAAATTGGTGA-3' R 5'- GACTACATTCTTAGCCAGGTG-3'
CDKN1A (p21)	F: 5'-CCATAGCCTCTACTGCCACCATC-3' R 5'-GTCCAGCGACCTTCTCATCCA-3'
PLK1	F 5'-CCTGCACCGAAACCGAGTTAT-3' R 5'-CCGTCATATTCGACTTTGGTTGC-3'
BCL-2	F:5'-CAGAAGTCTGGGAATCGATCTG-3' R:5'-AATCTTCAGCACTCTCCAGTTATAG-3'
BAX	F:5'-TTCCTTACGTGTCTGATCAATCC-3' R:5'-GGGCAGAAGGCACTAATCAA-3'
ACTB (<i>β-actina</i>)	F:5'- AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3' R: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG – 3'

Fonte: FREITAS-SILVA et al., 2018; CALDAS et al., 2018.

5.12 *Imunoblot*

As células das linhagens MCF-7 e Hs578t foram semeadas em placas de 100mm de diâmetro e tratadas nas concentrações de 25 e 50 μ M por 24 horas (MCF-

7) e na concentração de 50 μ M por 24 e 48 horas (Hs578t). As células foram homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1,0 %, ácido deoxicolato de sódio 1% em Tris-HCL 50 mM, pH= 7,5) contendo inibidores de proteases na concentração final de 2% (mix da Sigma Aldrich LTDA, Brasil). Após centrifugação a 14.000 g por 10 minutos o sobrenadante foi coletado e alíquotas foram separadas para quantificação pelo método BCA (GE Healthcare). A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 562 nm.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH 6,8, 4 ml de glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1% e beta-mercaptoetanol 1% em água deionizada) e aquecidas (100°C) por 5 minutos. O fracionamento das proteínas foi realizado em minigel de poliacrilamida 12% com SDS (2,5 horas a 100V). Em cada poço foi colocado 50 μ g de proteína total. A transferência para membrana de PVDF (Amersham Pharmacia) foi realizada por 1,5 horas a 250mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol a 20% em água destilada). Após a transferência das proteínas, a membrana foi corada em solução de Ponceau 0,5% por 5 minutos para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes em TBS (solução salina tamponada com Tris) a 0,02 M (10 minutos cada lavagem). O bloqueio foi realizado com TBS a 0,02 M contendo leite desnatado (Molico – Nestlé) a 5% e tween 20 (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) a 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação.

Os anticorpos primários para detecção de Ciclina B1, ERK, p-ERK, e α -tubulina foram diluídos em solução de bloqueio na concentração de 1:200 e a membrana incubada com os diferentes anticorpos, por 12 h, a 4°C sob agitação. Após sucessivas lavagens com TBS e TTBS (Tampão tris-salina acrescido de 0,1% de tween 20), a membrana foi incubada com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou de coelho (1:1000) (Kit ECL®, Amersham Pharmacia), lavada novamente e revelada por quimioluminescência (ECL®, Amersham Pharmacia). Para a remarcação, foi realizado a remoção da marcação anterior utilizando solução de stripping (β -mercaptoetanol; SDS; Tris). Após sucessivas lavagens, foi feito a incubação com anticorpo primário, secundário e revelação. Os resultados foram registrados em filme Hyperfilm Amershan. A quantificação das bandas foi realizada usando ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

5.13 Estabelecimento de uma linhagem resistente à doxorrubicina (DXR) - MCF-7^{DXR-R}

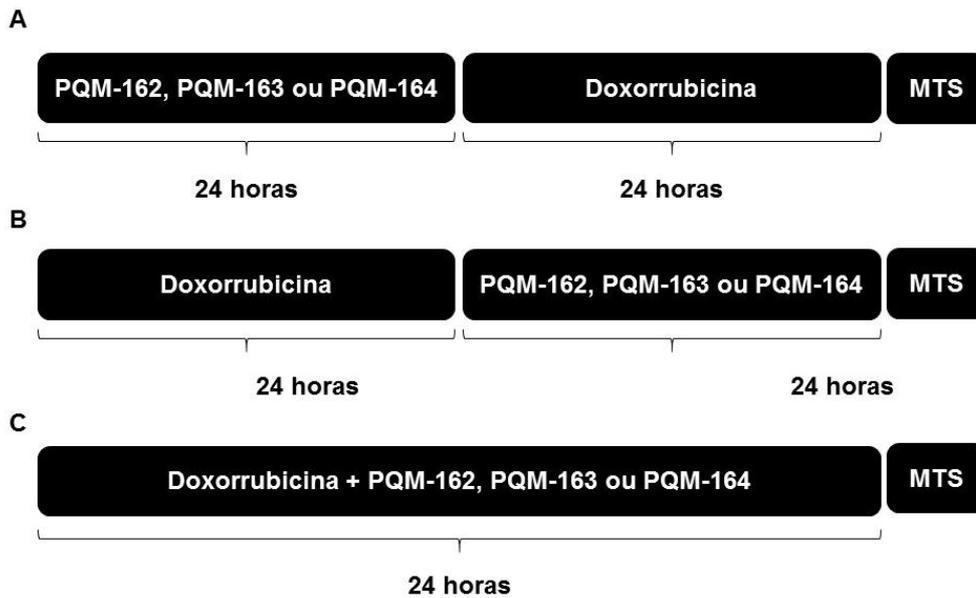
A fim de estabelecer uma linhagem de câncer de mama MCF-7 resistente à DXR, as células foram cultivadas em DMEM (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil), mantidas em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂ e expostas à concentrações crescentes de doxorrubicina (0,1 M a 2 µM) pelo período de 6 meses. O cálculo da concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (IC₅₀) foi realizado no início da exposição à DXR e foi obtido no final dos seis meses de exposição, para evidenciar que as células tornaram-se resistentes (Al et al., 2012).

5.14 Ensaios de sensibilização à DXR usando a linhagem MCF-7^{DXR-R}

Com o objetivo de avaliar a capacidade das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 em sensibilizar células MCF-7 resistentes à doxorrubicina (MCF-7^{DXR-R}), foram realizados ensaios sensibilização, os quais foram baseados no método de Chou-Talalay e envolvem ensaios de viabilidade celular em esquemas definidos de tratamento. O ensaio consiste em verificar se o efeito do tratamento de duas ou mais moléculas e/ou fármacos, em modelos experimentais *in vitro* ou *in vivo*, são sinérgicos, aditivos ou antagônicos.

Três delineamentos experimentais foram propostos: pré-tratamento por 24 horas com as moléculas PQM-162, PQM-163 ou PQM-164 seguido pelo tratamento com a DXR por 24 horas (Figura 9A); pré-tratamento com a DXR por 24 horas seguido pelo tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 ou PQM-164 por 24 horas (Figura 9B); ou o co-tratamento com a DXR e as moléculas PQM-162, PQM-163 ou PQM-164 por 24 horas (Figura 9C).

Figura 9 – Delineamento experimental dos ensaios de sensibilização à doxorubicina.



Fonte: do autor.

Primeiro determinou-se o IC_{50} das moléculas PQM-162, PQM-163, PQM-164 e da DXR na linhagem MCF-7^{DXR-R}. A partir dos dados de IC_{50} obtidos, foram determinadas as seguintes razões: IC_{50} (PQM-162, PQM-163 ou PQM-164)/ IC_{50} (DXR). Dessa forma, foram determinadas 5 concentrações de uso para cada molécula nos ensaios de sensibilização tendo como referência a DXR. Os dados foram analisados utilizando o software CalcuSyn 2.0. Após a análise, foi obtido o CI (*combination index* – índice de combinação) e, através deste dado, é possível determinar, para cada concentração utilizada, se o tratamento foi sinérgico, aditivo ou antagonístico (Tabela 2) (CHOU; 2006; CHOU, 2008; CHOU; 2010).

Tabela 2 – Análise do índice de combinação

Índice de Combinação	Descrição	Símbolo
< 0,1	sinergismo muito forte	+++++
0,1 - 0,3	forte sinergismo	++++
0,3 - 0,7	Sinergismo	+++
0,7 - 0,85	moderado sinergismo	++
0,85 - 0,9	leve sinergismo	+
0,9 - 1,1	Aditivismo	±
1,1 - 1,2	leve antagonismo	-
1,2 - 1,45	moderado antagonismo	--
1,45 - 3,3	Antagonismo	---
3,3 - 10	forte antagonismo	----
> 10	antagonismo muito forte	-----

Fonte: adaptado de CHOU, 2010

5.15 Análise estatística

Os dados quantitativos foram apresentados como a média \pm desvio padrão (DP). Diferenças significativas foram evidenciadas de acordo com a análise de variância one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. O software usado foi o GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

6 RESULTADOS

Na próxima seção será descrito os resultados obtidos durante o desenvolvimento do projeto.

6.1 Análise de viabilidade por ensaio colorimétrico (MTS)

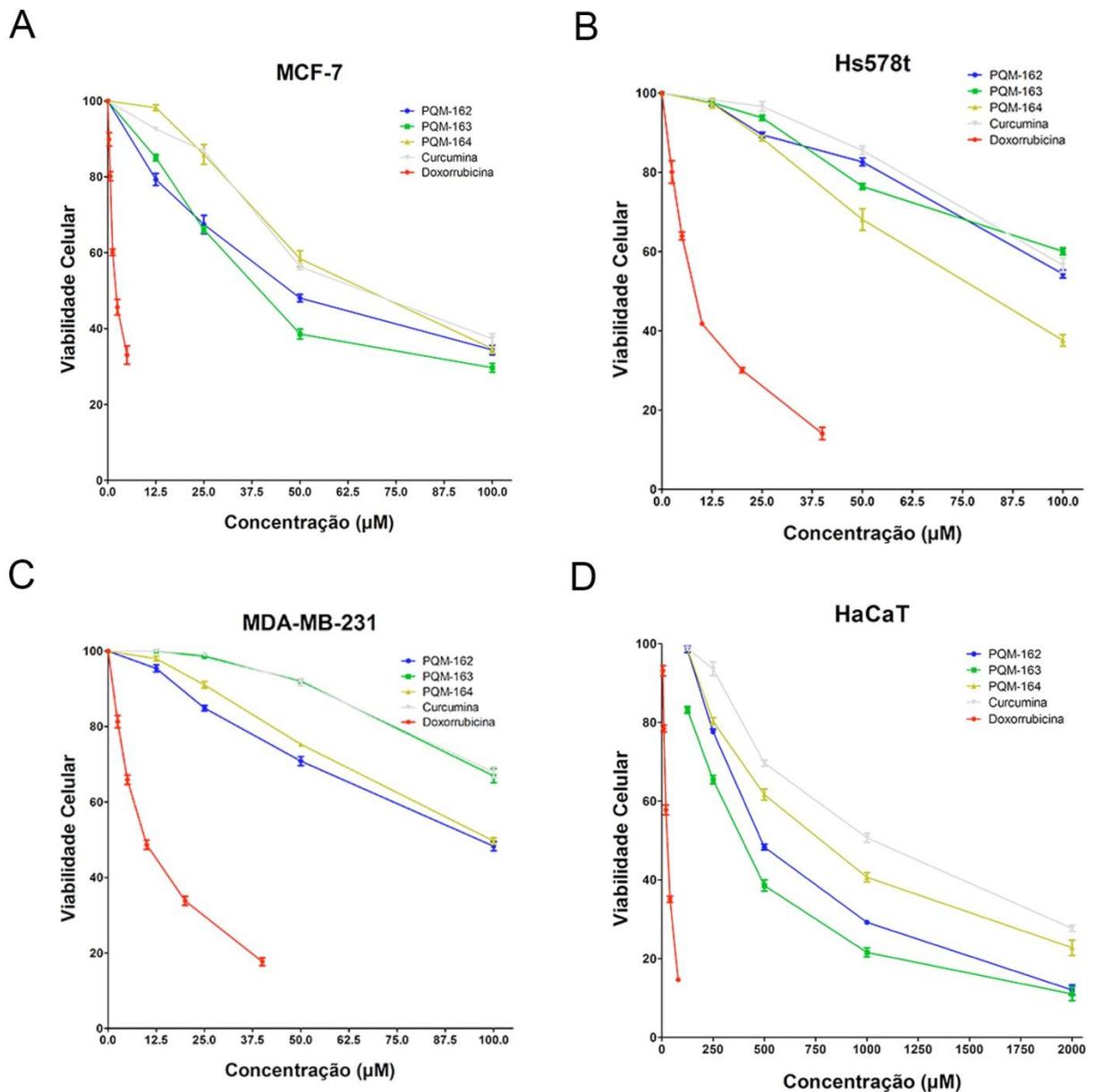
Os resultados obtidos por MTS mostraram que a viabilidade celular foi significativamente reduzida em culturas tratadas por 48 horas com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 (Figura 10). A capacidade das moléculas em reduzir a viabilidade varia em decorrência da linhagem celular utilizada, sendo que a linhagem MCF-7 foi a mais sensível aos tratamentos (Figura 10 e Tabela 3). Além disso, foi observado que a eficiência na redução da viabilidade celular dependente da concentração utilizada (Figura 10).

Na linhagem MCF-7, as moléculas PQM-162 e PQM-163 reduziram a viabilidade mais eficientemente que a curcumina. Esse efeito foi muito proeminente quando as concentrações de 25 e 50 μM foram usadas. A molécula PQM-164 teve efeito semelhante ao observado para a curcumina (Figura 10A).

Na linhagem MDA-MB-231, as moléculas PQM-162 e PQM-164 foram mais eficientes em reduzir a viabilidade quando comparado com a PQM-163. O efeito desta última foi semelhante ao observado para a curcumina (Figura 10C).

Na linhagem Hs578T, as moléculas PQM-162 e PQM-163 apresentaram um perfil de atividade parecido com o observado para a curcumina, embora a taxa relativa de viabilidade tenha sido menor em culturas tratadas com a substância PQM-162 (20 μM) e PQM-163 (50 μM) quando comparado com a curcumina. De forma interessante, a substância 164 foi muito mais eficiente que a curcumina em reduzir a viabilidade em culturas de células Hs578t quando concentrações superiores a 25 μM foram utilizadas (Figura 10B).

Figura 10 – Viabilidade celular determinada por MTS após 48 horas de tratamento.



Fonte: do autor

As substâncias estudadas foram testadas em queratinócitos derivados de pele humana normal, a linhagem HaCaT (Figura 10D). Os dados mostraram que, no geral, os perfis de citotoxicidade de PQM-162 e PQM-163 foram semelhantes aos observados para a curcumina, embora a viabilidade relativa tenha sido menor nas culturas tratadas com PQM-162 (25 µM) e PQM-163 (50 µM) em comparação à curcumina. A substância PQM-164, em concentrações superiores a 25 µM apresentou

maior eficiência em reduzir a viabilidade na linhagem HaCaT quando comparada com as substâncias PQM-162, PQM-163 e a curcumina. Contudo, o perfil citotóxico de todas das substâncias avaliadas foi menor em relação ao observado para a DXR, um fármaco comumente utilizado em protocolos quimioterápicos, especialmente em tumores de mama metastáticos.

Tabela 3 - Valores de $IC_{50} \pm DP$ (μM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTS)

	MCF-7	MDA-MB-231	Hs578t	HaCaT
PQM162	50,34 \pm 1,75	97,18 \pm 2,32	125,10 \pm 3,16	537,80 \pm 22,00
PQM163	42,28 \pm 1,49	161,50 \pm 4,89	173,70 \pm 8,97	384,10 \pm 9,81
PQM164	69,19 \pm 2,52	104,60 \pm 1,74	81,06 \pm 2,70	743,70 \pm 18,57
Curcumina	67,22 \pm 2,50	175,20 \pm 6,65	126,80 \pm 3,83	981,40 \pm 21,18
DXR	2,20 \pm 0,10	9,75 \pm 0,26	8,26 \pm 0,28	12,61 \pm 0,25

Fonte: do autor

Nota: C: curcumina; DXR: doxorubicina.

O índice de seletividade, cujo cálculo é obtido pela razão entre o IC_{50} obtido na linhagem normal e o IC_{50} obtido na linhagem tumoral é um bom indicativo do potencial uso das moléculas testadas em ensaios clínicos. Índices maiores que dois indicam boa seletividade (SUFFNESS; PEZZUTO; HOSTETTMANN, 1991). Os índices de seletividade obtidos das três moléculas nas linhagens testadas foram significativamente maiores em relação ao índice de seletividade encontrado para a DXR.

Tabela 4 – Índices de seletividade.

	MCF-7	MDA-MB-231	Hs578t
PQM162	10,68	5,53	4,30
PQM163	9,08	2,38	2,21
PQM164	10,75	7,11	9,17
DXR	5,73	1,29	1,53

Fonte: do autor.

Nota: DXR: doxorubicina; O índice de seletividade foi calculado usando a seguinte fórmula: IC_{50} encontrado em células normais/ IC_{50} encontrado em células tumorais.

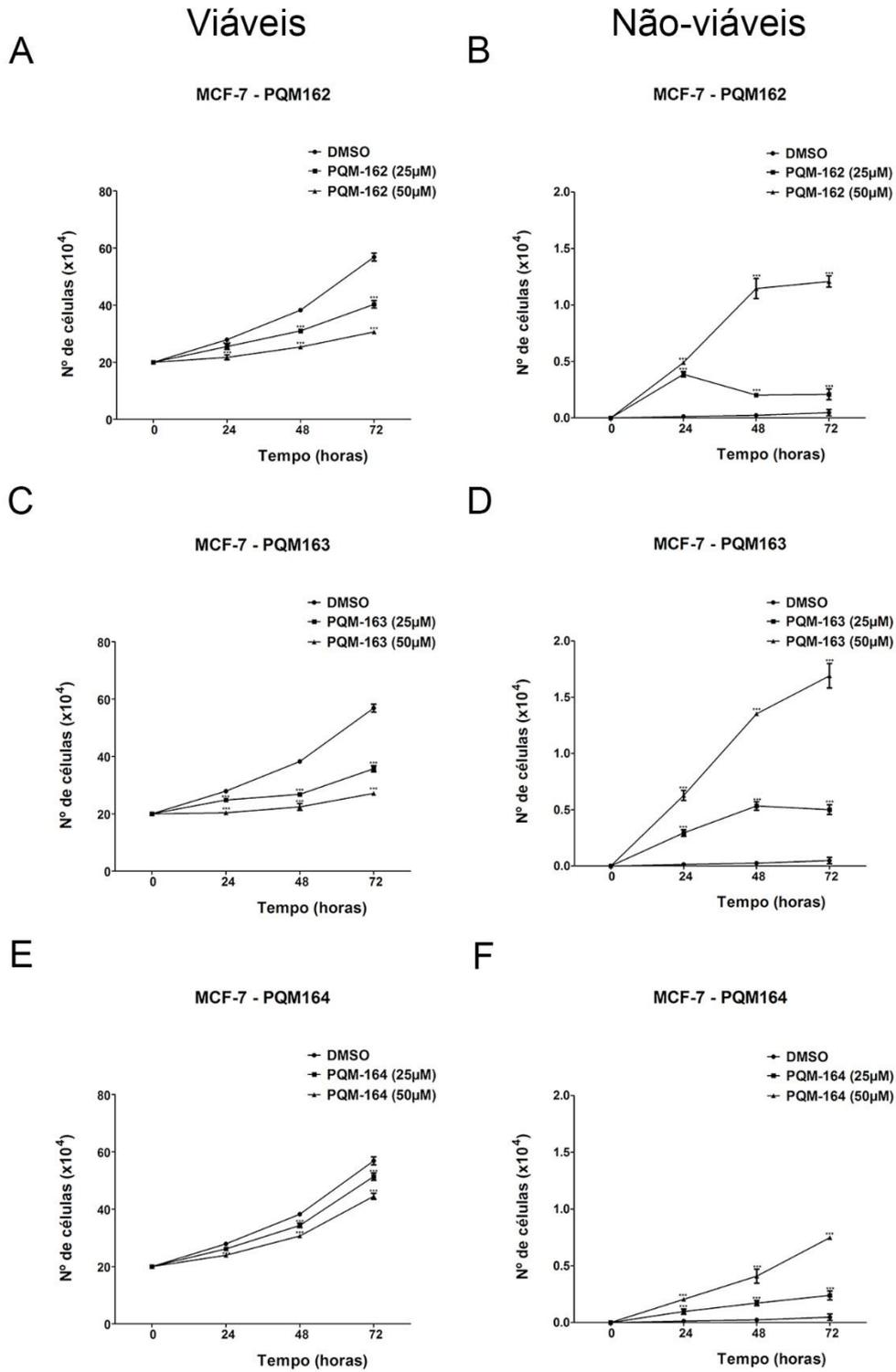
6.2 Curva de crescimento e ensaio de exclusão com azul de tripano

Células viáveis e não viáveis foram quantificadas após 24, 48 e 72 horas de tratamento com as substâncias estudadas. Os dados obtidos mostraram que as moléculas reduzem significativamente o número de células viáveis em todas as linhagens estudadas, contudo os efeitos foram dependentes da concentração usada e do tempo de tratamento (Figuras 11, 12 e 13).

Na linhagem MCF-7, as moléculas PQM-162 e PQM-163 tiveram um perfil semelhante de atividade. Houve significativa redução no número de células viáveis nas amostras tratadas em relação aos grupos controles a partir de 24 horas de tratamento (Figuras 11A e 11C). A molécula 164 reduziu significativamente o número de células viáveis na linhagem MCF-7 somente a partir de 48 horas de tratamento (Figura 11E). Ao quantificar o número de células não viáveis, foi observado que todas as culturas tratadas com as moléculas estudadas exibiam um número, significativamente, maior de células inviáveis quando comparadas aos grupos controles (tratados com DMSO). Entretanto, o evento foi mais pronunciado nas amostras tratadas com PQM-162 e PQM-163 em relação àquelas tratadas com 164 (Figuras 11B, 11D e 11F).

Na linhagem MDA-MB-231, houve redução significativa do número de células viáveis em culturas tratadas com PQM-162 e PQM-163 somente a partir de 48 horas de tratamento. Em amostras tratadas com a molécula PQM-164 (50 μ M), foi possível detectar redução do número de células viáveis a partir de 24 horas de tratamento (Figuras 12A, 12C e 12E). Aumento significativo de células inviáveis foi observado somente em culturas tratadas com PQM-162 (25 e 50 μ M) por 48 e 72 horas, e PQM-164 (50 μ M) por 72 horas (Figuras 12B, 12D e 12F).

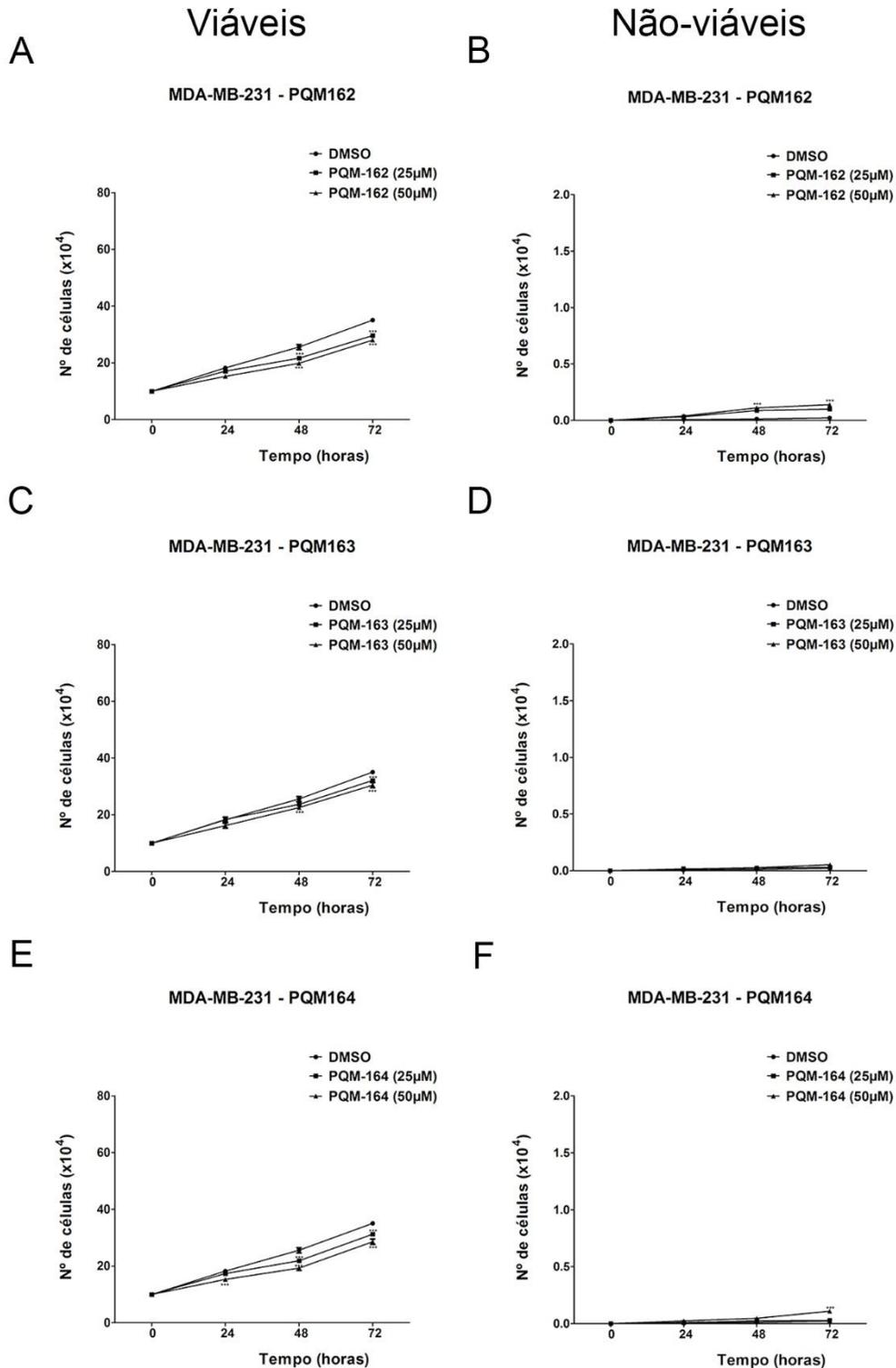
Figura 11 – Ensaio de exclusão por azul de tripano na linhagem MCF-7.



Fonte: do autor.

Nota: Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

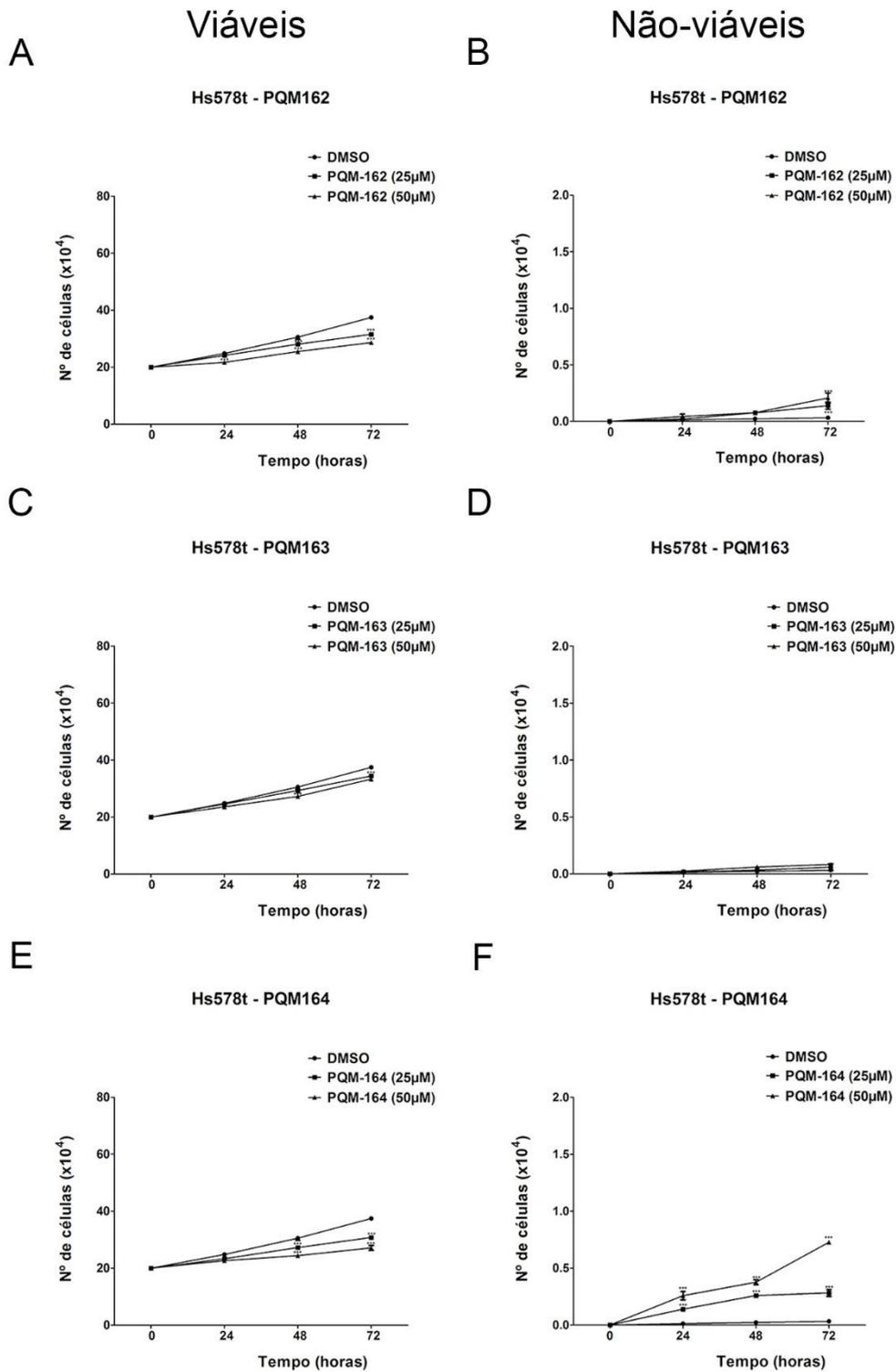
Figura 12 – Ensaio de exclusão por azul de tripano na linhagem MDA-MB-231.



Fonte: do autor.

Nota: Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 13 – Ensaio de exclusão por azul de tripano na linhagem Hs578t.



Fonte: do autor.

Nota: Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

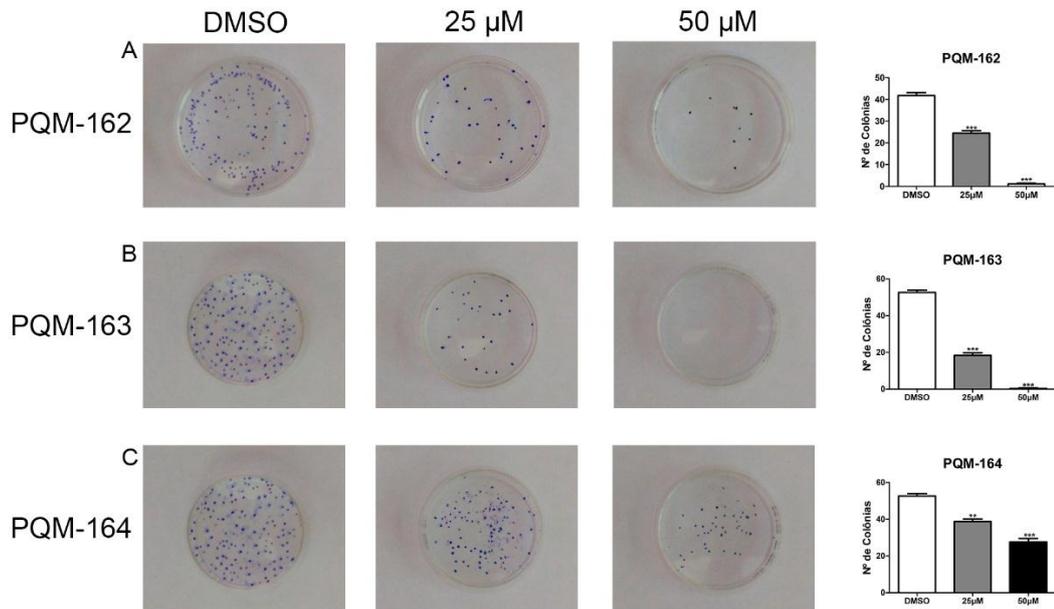
Na linhagem Hs578t, o perfil de atividade das moléculas foi parecido com o observado para MDA-MB-231. Houve redução no número de células viáveis, em relação ao grupo controle, em culturas tratadas com PQM-162 e PQM-164 (48 e 72 horas), e PQM-163 (72 horas) (Figuras 13A, 13C e 13E). Aumento no número de células inviáveis foi observado em culturas tratadas com PQM-162 por 72 horas e PQM164 a partir de 24 horas de tratamento, quando comparado ao grupo controle. A molécula PQM-163 não teve atividade citotóxica sobre a linhagem Hs578t nas condições experimentais testadas, uma vez que não houve diferença significativa entre o número de células inviáveis encontrado em amostras tratadas comparado ao grupo controle (Figuras 13B, 13D e 13F).

6.3 Ensaio de capacidade clonogênica

O ensaio de capacidade clonogênica permitiu avaliar a eficiência das moléculas estudadas em inibir a proliferação por períodos prolongados. De acordo com os dados obtidos, PQM-162, PQM-163 e PQM-164 foram eficientes em reduzir o número de colônias nas linhagens testadas, uma vez que menos colônias foram observadas nas amostras tratadas em relação aos grupos controles (Figuras 14, 15 e 16). O efeito das substâncias sobre a capacidade clonogênica foi dependente da concentração usada, a exemplo do que foi observado nos ensaios de exclusão por azul de tripano.

Na linhagem MCF-7 a molécula PQM-163 foi mais eficiente em reduzir o número de colônias, seguida pelas moléculas PQM-162 e PQM-164 (Figura 14). Na linhagem MDA-MB-231, as moléculas PQM-162 e PQM-164 foram mais efetivas em inibir a capacidade clonogênica relação a PQM-163 (Figura 15) e, na linhagem Hs578t, as moléculas PQM-162 e PQM-163 parecem ter sido mais eficientes em relação PQM-164 (Figura 16) em inibir a formação de colônias. Curiosamente, colônias com diâmetros menores foram observadas nas amostras tratadas com as substâncias na concentração de 50 μ M em relação aos grupos controles, especialmente nas linhagens triplo-negativas, contudo esse parâmetro não foi quantificado.

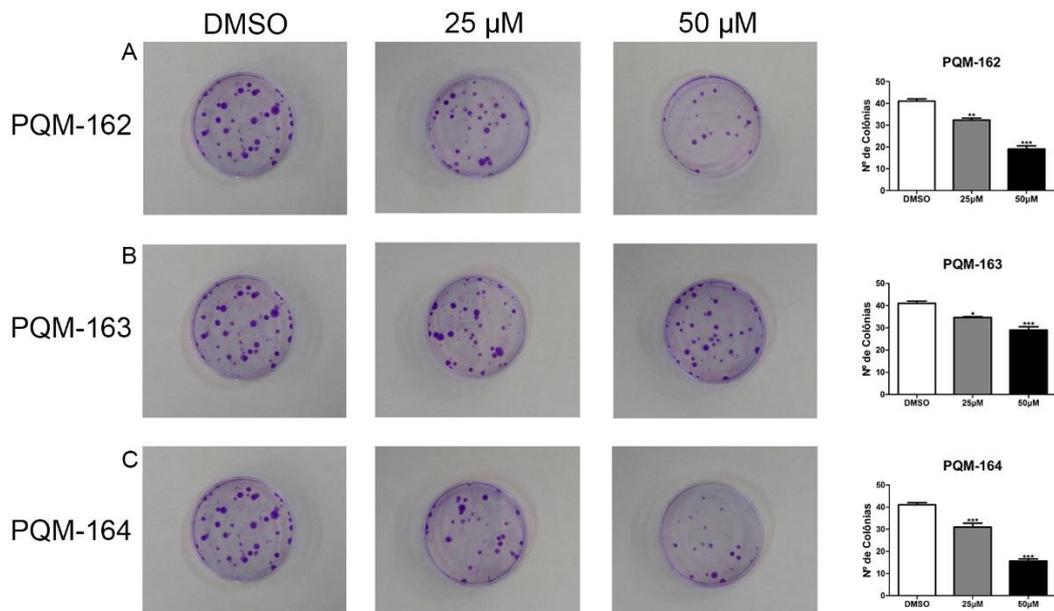
Figura 14 – Ensaio de capacidade clonogênica na linhagem MCF-7.



Fonte: do autor.

Nota: Análise da capacidade clonogênica de células MCF-7 após exposição de 24h. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

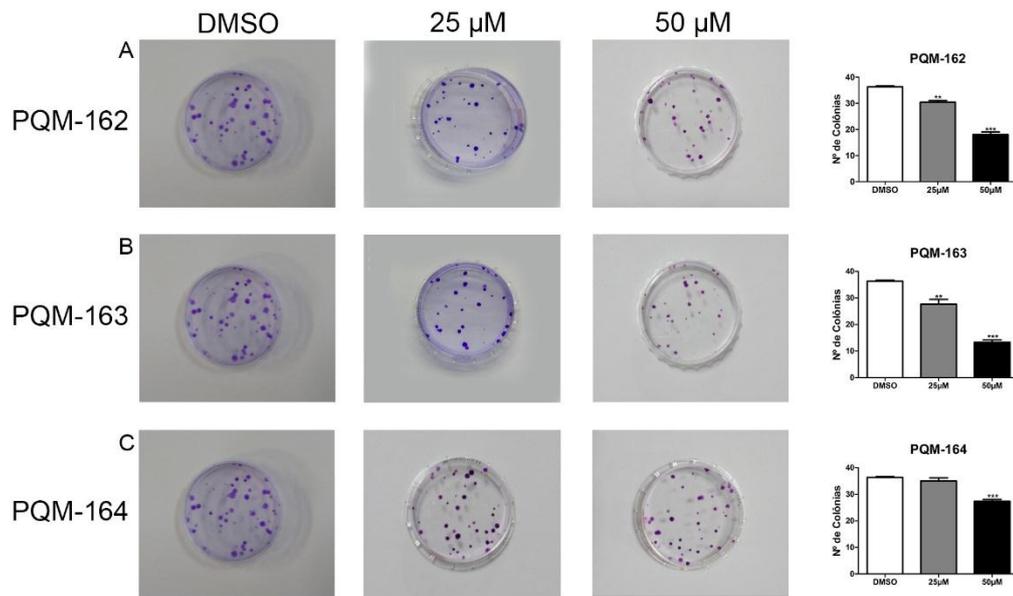
Figura 15 – Ensaio de capacidade clonogênica na linhagem MDA-MB-231.



Fonte: do autor.

Nota: Análise da capacidade clonogênica de células MCF-7 após exposição de 24h. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. Fonte: do autor.

Figura 16 – Ensaio de capacidade clonogênica na linhagem Hs578t.



Fonte: do autor.

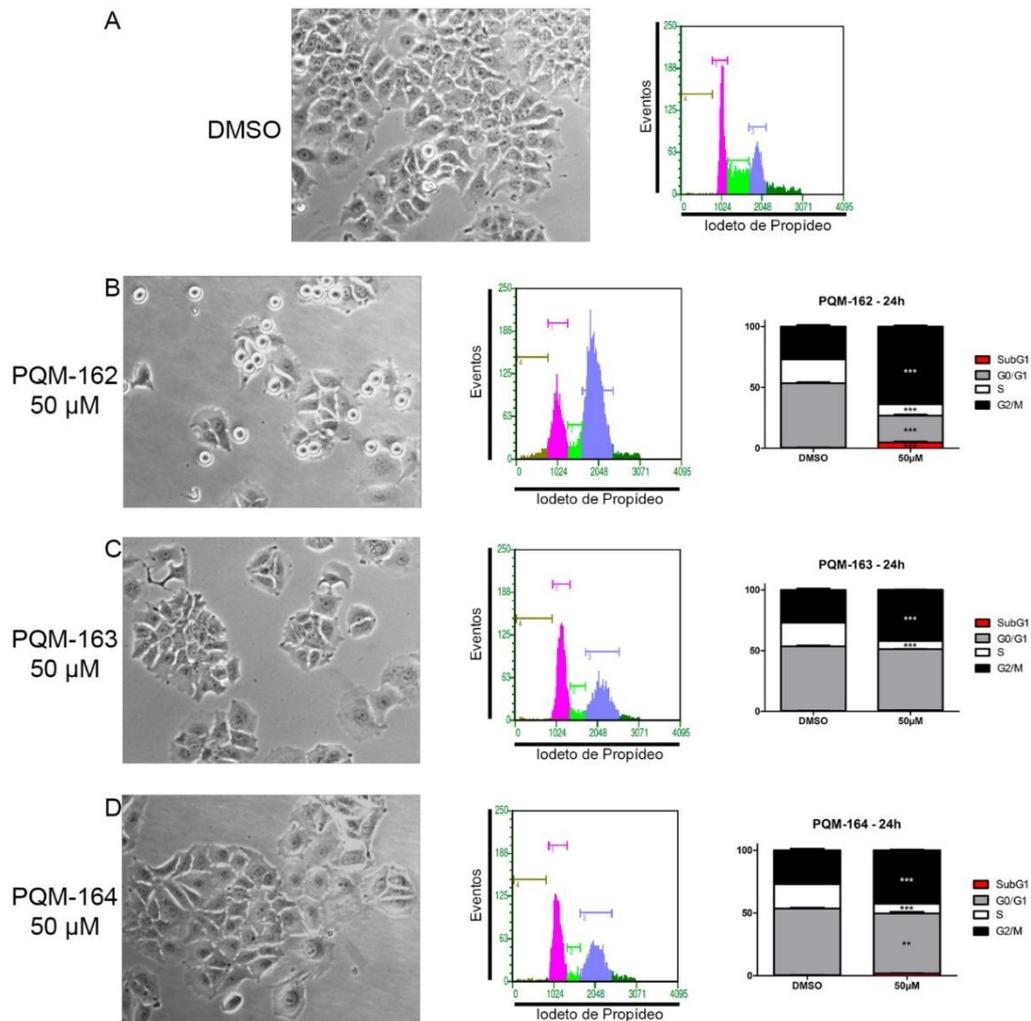
Nota: Análise da capacidade clonogênica de células MCF-7 após exposição de 24h. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

6.4 Análise de progressão do ciclo celular

A análise de progressão do ciclo celular foi realizada após 24 e 48 horas de tratamento com as substâncias PQM-162, PQM-163 e PQM-164 na concentração de 50 µM. A escolha desta concentração foi baseada nos resultados obtidos anteriormente objetivando comparar a potência entre as substâncias estudadas.

Nas culturas de MCF-7 tratadas com PQM-162 por 24 horas, houve um aumento significativo da população de células nas fases G_2/M e sub- G_1 , acompanhado pela redução das populações nas fases G_0/G_1 e S quando comparados com o grupo controle (Figura 17; Tabela 5). A observação das culturas tratadas com PQM-162 permitiu identificar muitas células arredondadas e refringentes, as quais pareciam estar em fase de divisão (Figura 17B). Nas culturas de MCF-7 tratadas com PQM-163 (Figura 17C) e PQM-164 (Figura 17D) também houve um aumento significativo nas populações G_2/M e sub- G_1 , contudo o aumento não foi tão acentuado como o observado nas culturas tratadas com PQM-162.

Figura 17 – Análise da progressão do ciclo celular de células MCF-7 após tratamento com as moléculas por 24 horas na concentração de 50 μM .



Fonte: do autor.

Nota: (painel à esquerda) Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico das culturas (aumento de 60X); (painel central) histogramas representativos mostrando o perfil de distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular. marrom = sub-G1; rosa = G0/G1; verde = S; azul = G2/M. (à direita) análise quantitativa do ciclo celular. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Tabela 5 – Frequência de células MCF-7 nas fases do ciclo celular, após tratamento com moléculas por 24 horas na concentração de 50 μ M.

	DMSO	PQM-162	PQM-163	PQM-164
Sub-G ₁	0,47 \pm 0,15	4,61 \pm 2,13 ^{***}	1,03 \pm 0,07 ^{***}	1,88 \pm 0,56 ^{***}
G ₀ /G ₁	53,07 \pm 2,18	21,92 \pm 3,15 ^{***}	50,30 \pm 0,22	47,79 \pm 2,70 ^{***}
S	19,47 \pm 3,15	9,41 \pm 3,26 ^{***}	6,39 \pm 0,50 ^{***}	7,8 \pm 2,88 ^{***}
G ₂ /M	26,98 \pm 3,40	63,79 \pm 2,60 ^{***}	42,28 \pm 0,40 ^{***}	42,53 \pm 0,93 ^{***}

Fonte: do autor.

Nota: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

As culturas de MCF-7 tratadas com PQM-164 por 48 horas exibiram um perfil de distribuição semelhante ao observado nas culturas tratadas com 24 horas (Tabela 6 e Figura 18). Houve redução da população G₀/G₁ e aumento nas populações G₂/M e sub-G₁. O aumento da população sub-G₁, induzido pela PQM-164 na linhagem MCF-7, após 48 horas de tratamento, foi menos pronunciado em relação ao observado para PQM-162 e PQM-163. Este resultado corrobora com os achados no ensaio de exclusão com azul de tripano, os quais mostraram menor eficiência de PQM-164 em induzir morte na linhagem MCF-7 em relação às moléculas PQM-162 e PQM-163.

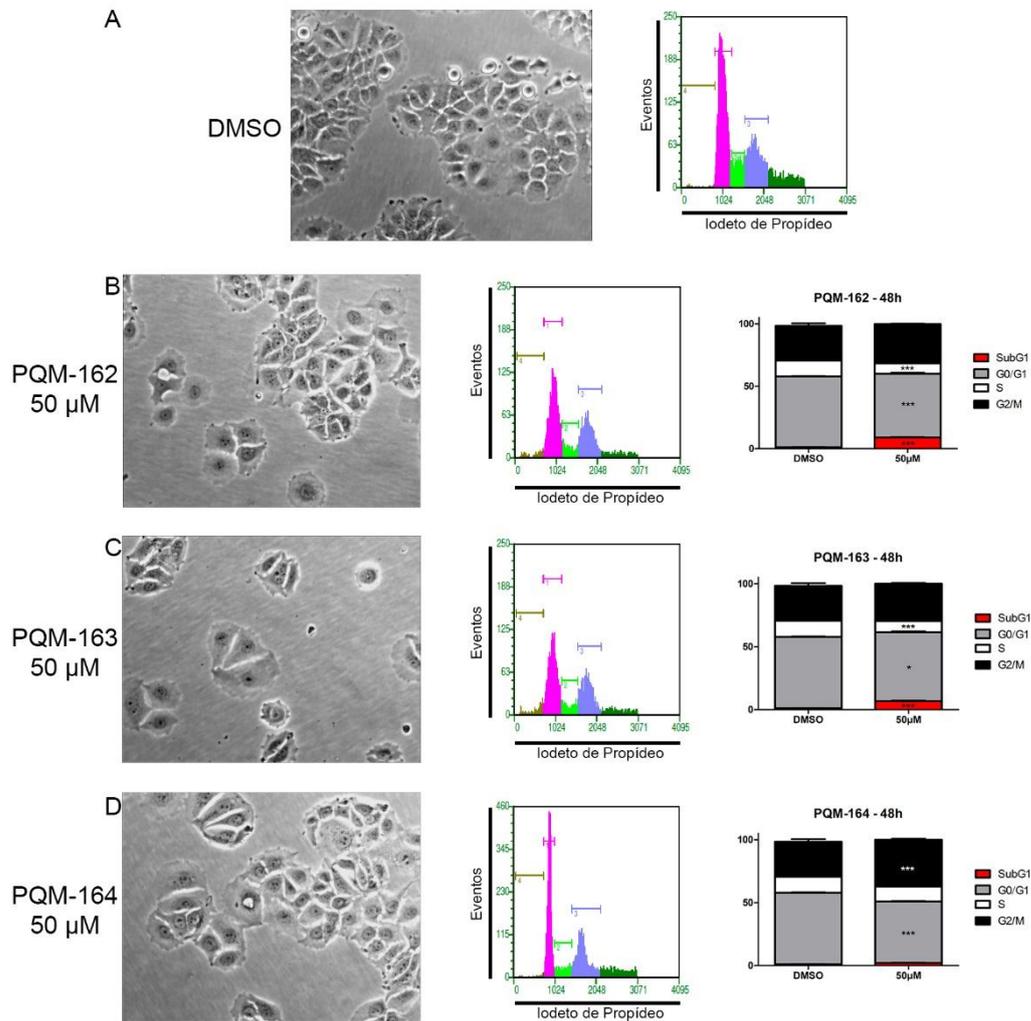
Tabela 6 – Frequência de células MCF-7 nas fases do ciclo celular, após tratamento com as moléculas por 48 horas na concentração de 50 μ M.

	DMSO	PQM-162	PQM-163	PQM-164
Sub-G ₁	1,09 \pm 0,11	9,02 \pm 0,69 ^{***}	6,80 \pm 0,73 ^{***}	2,14 \pm 0,12 ^{***}
G ₀ /G ₁	56,68 \pm 0,61	51,00 \pm 1,65 ^{***}	54,65 \pm 1,45 [*]	48,71 \pm 1,03 ^{***}
S	12,83 \pm 0,69	8,17 \pm 0,89 ^{***}	8,98 \pm 0,79 ^{***}	11,84 \pm 0,92
G ₂ /M	29,39 \pm 1,13	31,81 \pm 0,57	29,57 \pm 1,26	37,31 \pm 1,62 ^{***}

Fonte: do autor.

Nota: ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 18 – Análise da progressão do ciclo celular de células MCF-7 após tratamento com as moléculas por 48 horas na concentração de 50 μM .



Fonte: do autor.

Nota: (painel à esquerda) Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico das culturas (aumento de 60X); (painel central) histogramas representativos mostrando o perfil de distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular. marrom = sub-G1; rosa = G0/G1; verde = S; azul = G2/M. (à direita) análise quantitativa do ciclo celular. *p<0,05; ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

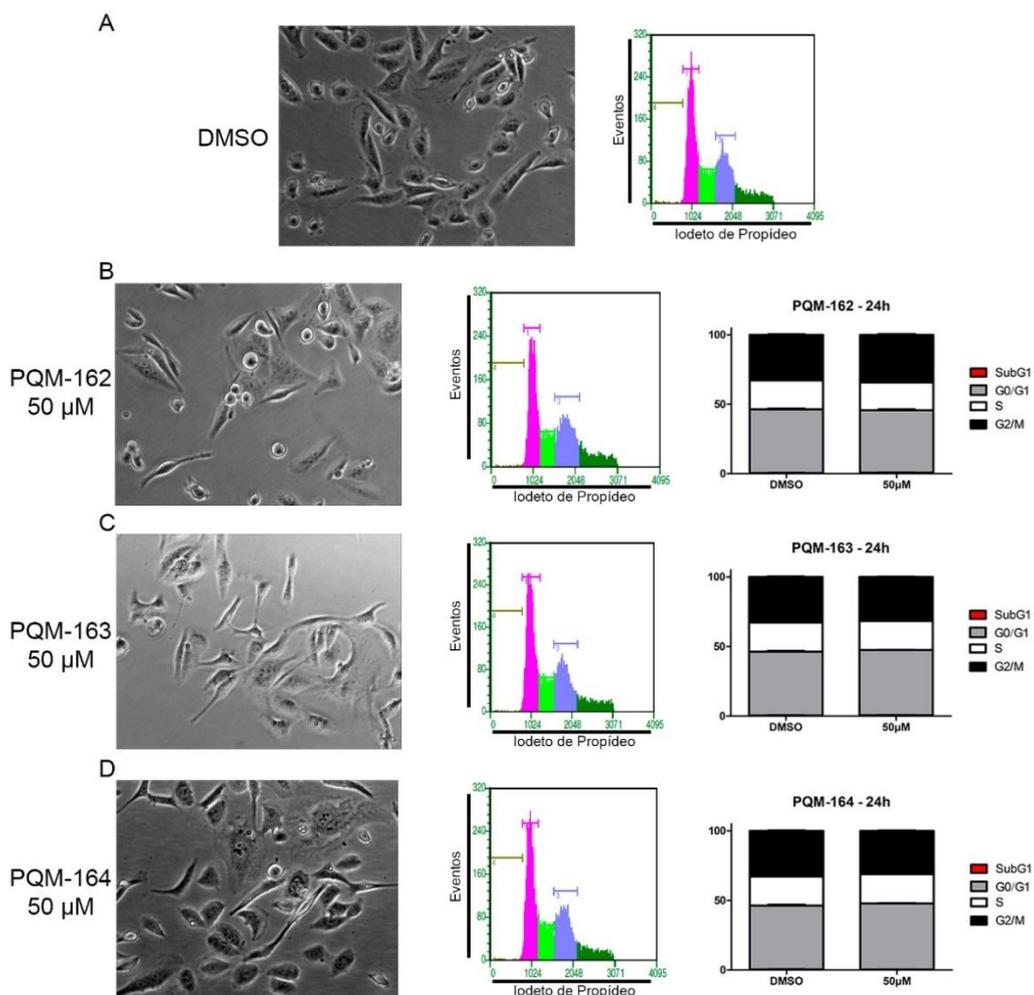
A dinâmica de progressão do ciclo celular não foi afetada após 24 horas de tratamento com nenhuma das substâncias estudadas na linhagem MDA-MB-231 (Figura 19; Tabela 7).

Tabela 7 – Frequência de células MDA-MB-231 nas fases do ciclo celular, após tratamento com as moléculas por 24 horas na concentração de 50 μM .

	DMSO	PQM-162	PQM-163	PQM-164
Sub-G ₁	0,44 \pm 0,22	0,68 \pm 25	0,56 \pm 0,43	0,43 \pm 0,15
G ₀ /G ₁	45,80 \pm 1,45	45,85 \pm 0,88	46,95 \pm 0,38	47,36 \pm 0,71
S	20,89 \pm 0,63	19,81 \pm 0,25	20,82 \pm 0,15	21,10 \pm 0,50
G ₂ /M	32,87 \pm 0,85	33,66 \pm 0,90	31,66 \pm 0,26	31,11 \pm 0,60

Fonte: do autor

Figura 19 – Análise da progressão do ciclo celular de células MDA-MB-231 após tratamento com as moléculas por 24 horas na concentração de 50 μM .



Fonte: do autor.

Nota: (painel à esquerda) Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico das culturas (aumento de 60X); (painel central) histogramas representativos mostrando o perfil de distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular. marrom = sub-G₁; rosa = G₀/G₁; verde = S; azul = G₂/M. (à direita) análise quantitativa do ciclo celular.

No entanto, após 48 horas de tratamento, as substâncias PQM-162 e PQM-163 induziram redução da população G₀/G₁ e aumento da população G₂/M, sendo que o aumento na população G₂/M foi mais pronunciado em culturas tratadas com PQM-162 quando comparada com a PQM-163. De modo similar ao observado na linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento, foram observadas células arredondadas e refringentes nas culturas de MDA-MB-231 tratadas por 48 horas com PQM-162 (Figura 20; Tabela 8).

A dinâmica de progressão do ciclo celular na linhagem Hs578t não foi alterada após 24 horas de tratamento com PQM-162 e PQM-163, as quais induziram alterações somente após 48 de tratamento (Figura 21 e 22; Tabelas 9 e 10). A PQM-162 reduziu a população G₀/G₁ e aumentou as populações S e G₂/M; ao passo que em culturas tratadas com PQM-163 houve redução das populações G₀/G₁ e S, e aumento na população G₂/M em relação aos grupos controles (Figura 21 e 22; Tabelas 9 e 10). A substância PQM-164 induziu alterações em ambos os tempos estudados, sendo que o efeito mais pronunciado foi observado após 48 horas de tratamento. Houve redução da população G₀/G₁ e aumento das populações S e G₂/M quando comparadas aos grupos controle (Figura 22; Tabela 10). De acordo com os dados apresentados, a substância PQM-164 foi mais efetiva em inibir a progressão do ciclo celular na linhagem Hs578t em relação às substâncias PQM-162 e PQM-163.

Aumento na população sub-G₁ foi observado em todas as culturas de Hs578t tratadas com PQM-162, PQM-163 e PQM-164 por 24 e 48 horas em relação aos grupos controles, sendo que a frequência de células com DNA fragmentado foi maior nas culturas tratadas por 48 horas comparadas às culturas tratadas por 24 horas (Figuras 21 e 22; Tabelas 9 e 10).

Células arredondadas e refringentes foram também observadas em culturas Hs578t após tratamento com PQM-162, a exemplo do que foi observado nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 (Figuras 17 e 20, painel à esquerda).

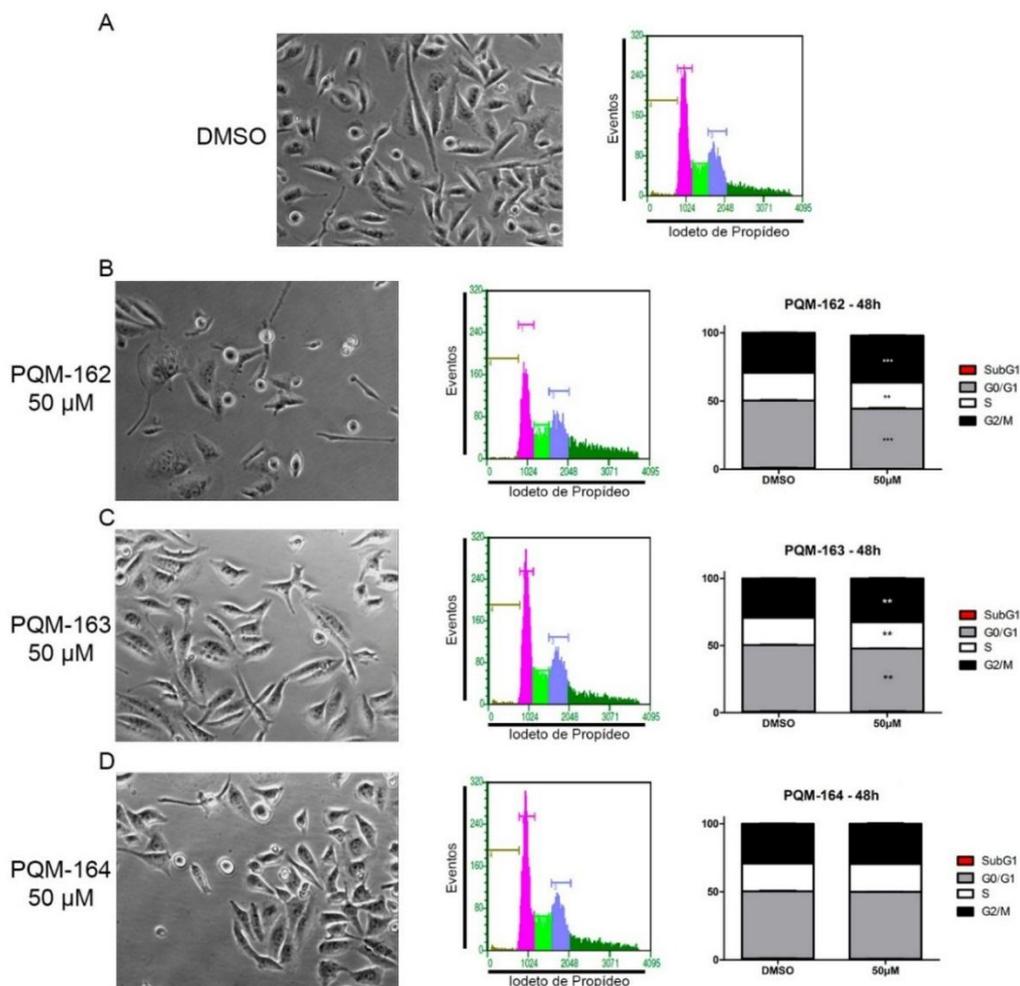
Tabela 8 – Frequência de células MDA-MB-231 nas fases do ciclo celular, após tratamento com as moléculas por 48 horas na concentração de 50 μ M.

	DMSO	PQM-162	PQM-163	PQM-164
Sub-G ₁	0,85 \pm 0,69	0,32 \pm 0,17	0,86 \pm 0,54	0,33 \pm 0,38
G ₀ /G ₁	49,55 \pm 0,83	46,98 \pm 0,24**	46,95 \pm 0,38**	49,36 \pm 0,27
S	20,38 \pm 0,21	19,10 \pm 0,85	19,48 \pm 0,41	20,45 \pm 0,26
G ₂ /M	29,22 \pm 0,20	34,52 \pm 0,38***	32,68 \pm 0,30**	29,56 \pm 0,56

Fonte: do autor.

Nota: **p<0,01; ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 20 – Análise da progressão do ciclo celular de células MDA-MB-231 após tratamento com as moléculas por 48 horas na concentração de 50 μ M.



Fonte: do autor.

Nota: (painel à esquerda) Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico das culturas (aumento de 60X); (painel central) histogramas representativos mostrando o perfil de distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular. marrom = sub-G₁; rosa = G₀/G₁; verde = S; azul = G₂/M. (à direita) análise quantitativa do ciclo celular. **p<0,01; ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

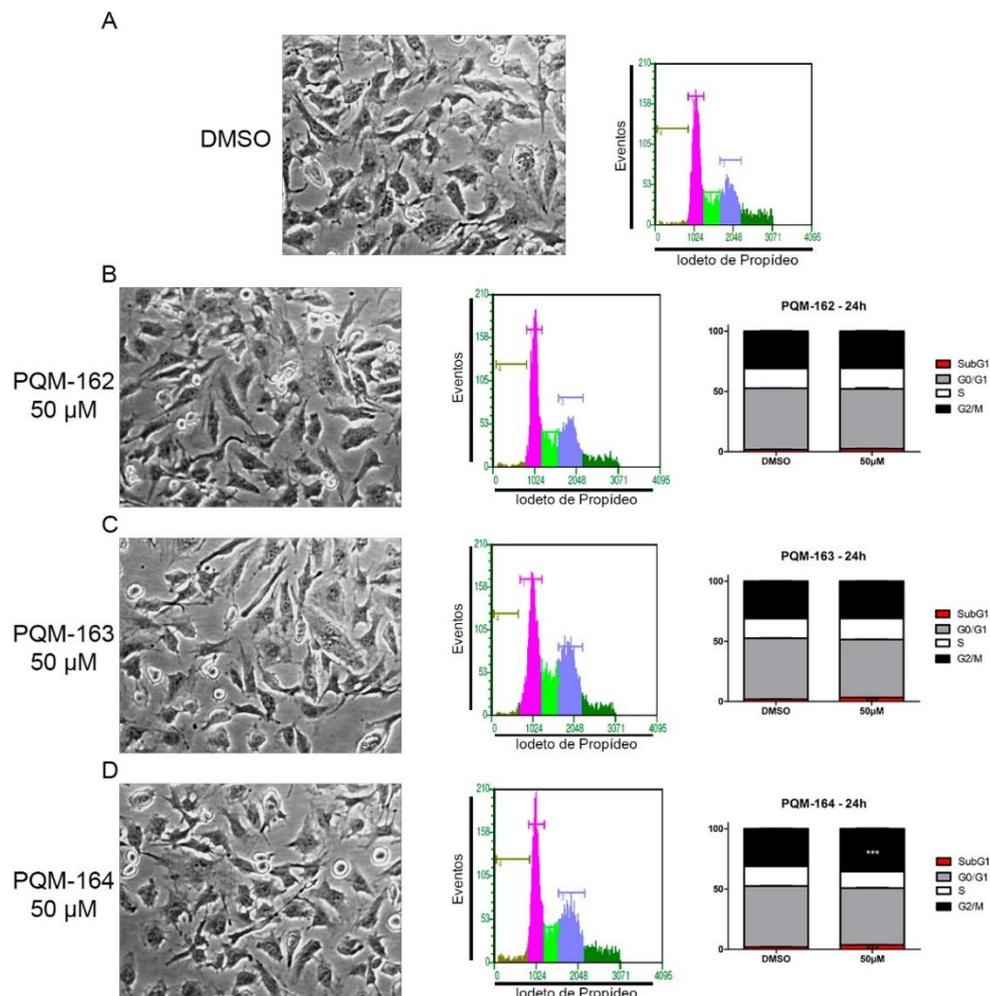
Tabela 9 – Frequência de células Hs578t nas fases do ciclo celular, após tratamento com as moléculas por 24 horas na concentração de 50 μ M.

	DMSO	PQM-162	PQM-163	PQM-164
Sub-G ₁	1,83 \pm 0,59	3,31 \pm 0,21***	3,31 \pm 0,54***	3,66 \pm 0,42***
G ₀ /G ₁	50,70 \pm 0,37	49,71 \pm 1,86	48,08 \pm 0,58	47,23 \pm 0,50
S	16,49 \pm 0,43	17,03 \pm 1,12	17,68 \pm 0,52	13,66 \pm 0,57
G ₂ /M	30,98 \pm 0,43	30,82 \pm 0,41	30,92 \pm 0,23	35,44 \pm 0,56***

Fonte: do autor.

Nota: ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 21 – Análise de progressão do ciclo celular de células Hs578T após tratamento com as moléculas por 24 horas na concentração de 50 μ M.



Fonte: do autor.

Nota: (painel à esquerda) Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico das culturas (aumento de 60X); (painel central) histogramas representativos mostrando o perfil de distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular. marrom = Sub-G₁; rosa = G₀/G₁; verde = S; azul = G₂/M. (à direita) análise quantitativa do ciclo celular. ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

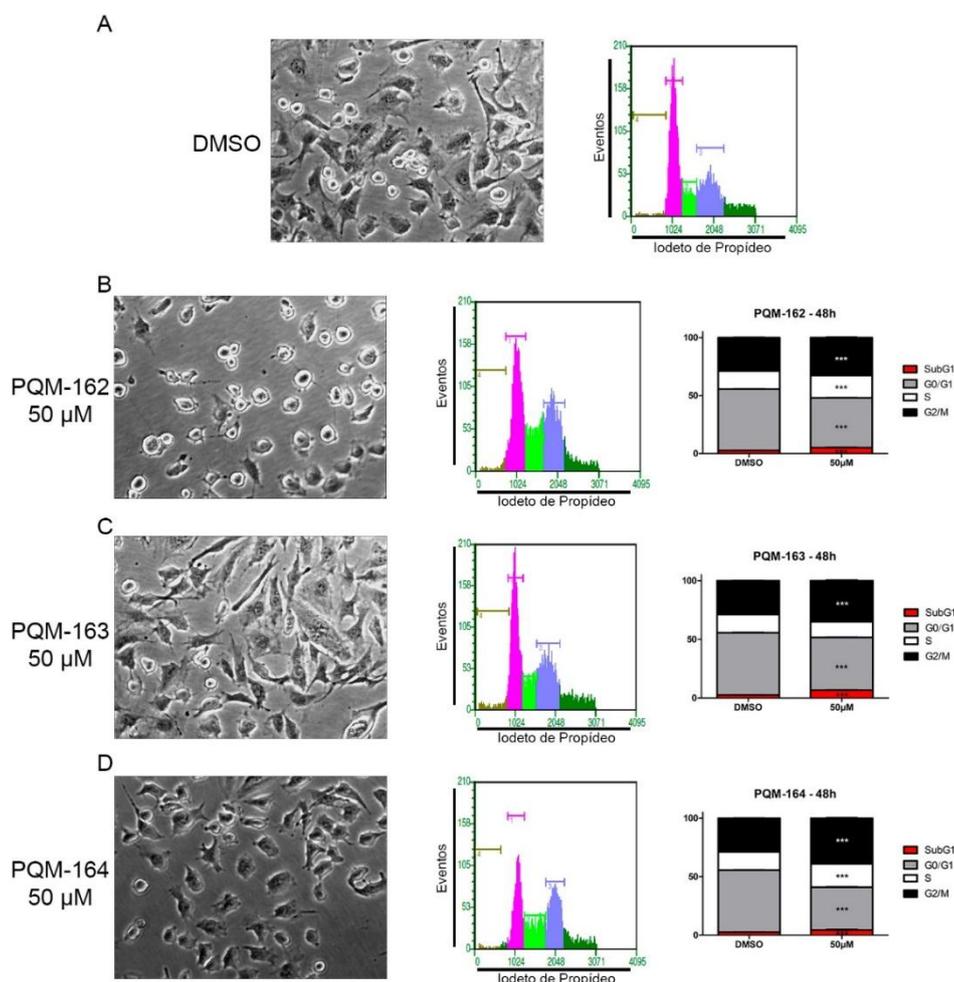
Tabela 10 – Frequência de células Hs578t nas fases do ciclo celular, após tratamento com as moléculas por 48 horas na concentração de 50 μ M.

	DMSO	PQM-162	PQM-163	PQM-164
Sub-G ₁	2,66 \pm 0,32	4,96 \pm 0,80***	6,59 \pm 0,68***	4,43 \pm 0,97***
G ₀ /G ₁	52,98 \pm 0,39	42,93 \pm 0,48***	44,99 \pm 0,44***	36,58 \pm 0,75***
S	15,52 \pm 0,29	19,32 \pm 0,36***	13,42 \pm 0,57	19,94 \pm 0,37***
G ₂ /M	28,84 \pm 0,21	32,78 \pm 0,45***	35,00 \pm 1,04***	39,06 \pm 0,57***

Fonte: do autor.

Nota: ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 22 – Análise de progressão do ciclo celular de células Hs578T após tratamento com as moléculas por 48 horas na concentração de 50 μ M.



Fonte: do autor.

Nota: (painel à esquerda) Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico das culturas (aumento de 60X); (painel central) histogramas representativos mostrando o perfil de distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular. marrom = Sub-G₁; rosa = G₀/G₁; verde = S; azul = G₂/M. (à direita) análise quantitativa do ciclo celular. ***p<0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

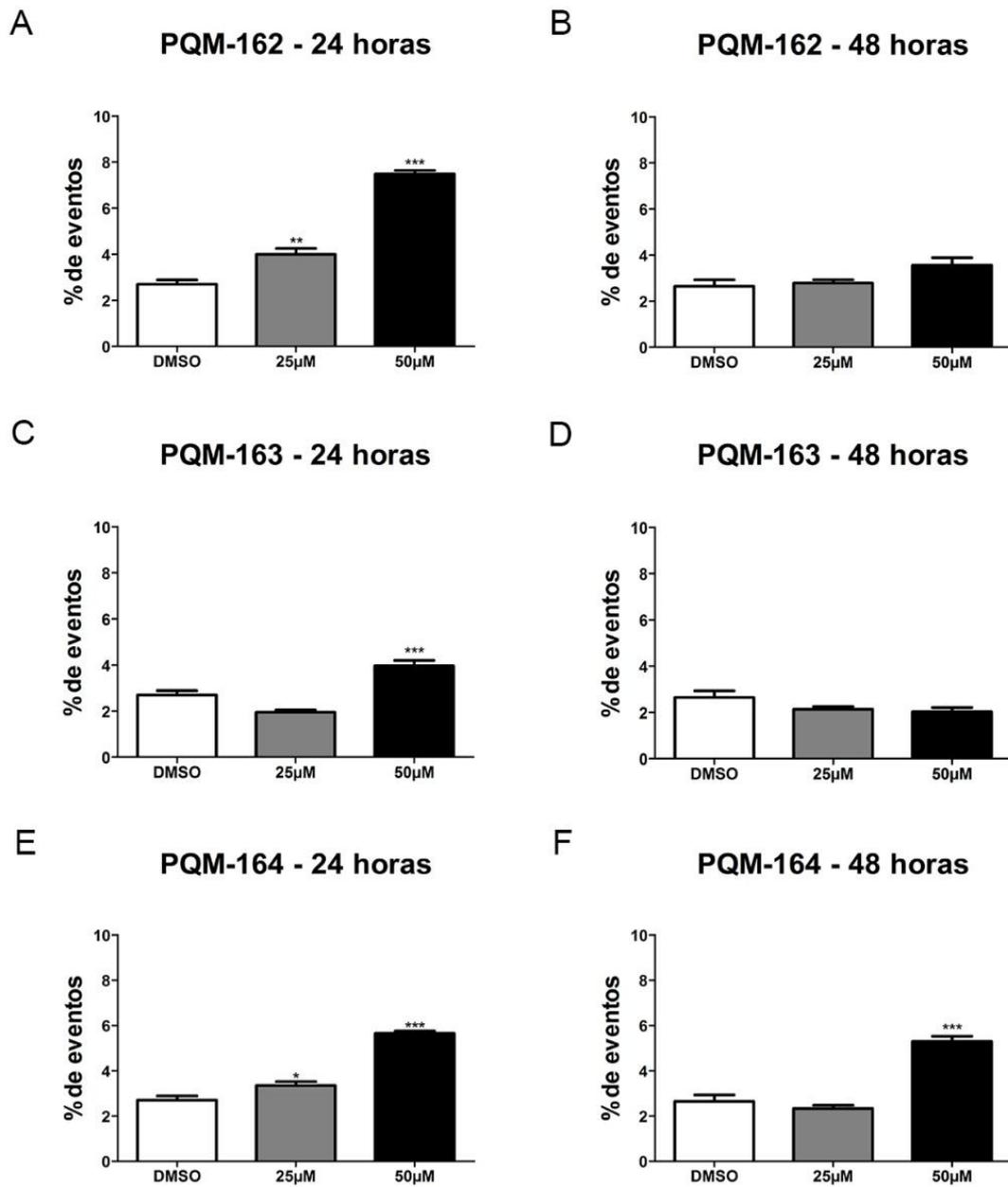
6.5 Análise da frequência de mitoses

Os ensaios de ciclo celular mostraram que as moléculas estudadas são capazes de influenciar a dinâmica de progressão do ciclo, e chama a atenção o acúmulo de células nas fases G₂/M. Porém, a análise de citometria de fluxo não permite diferenciar se o bloqueio ocorreu na transição G₂/M ou na fase M. Assim, esse aspecto foi elucidado com a determinação da frequência de mitoses. Os resultados mostraram que, na linhagem MCF-7, as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 causaram um aumento significativo na frequência de mitoses após 24 horas de tratamento (Figura 23). Nas culturas de MCF-7, tratadas por 48 horas, foi observado aumento significativo na frequência de mitose apenas em culturas tratadas com a molécula PQM-164 (Figura 23F). Os dados corroboram com a análise de progressão do ciclo celular, onde, após 24 horas de tratamento, todas as moléculas foram capazes de induzir bloqueio na fase G₂/M, mas após 48 horas apenas as culturas tratadas com a molécula PQM-164 apresentavam aumento significativo da população G₂/M.

O tratamento da linhagem MDA-MB-231 com PQM-162 (50 µM) por 24 horas induziu discreto aumento na frequência de mitose quando comparado ao grupo controle (Figura 24A). Porém, após 48 horas de tratamento, não foram observadas diferenças significativas (Figura 24B). Não foram observadas alterações significativas no percentual de mitoses em culturas tratadas com PQM-163 e PQM-164 quando comparado com o grupo controle (Figuras 24C, 24D, 24E e 24F).

Na linhagem Hs578t, as moléculas PQM-162 (Figuras 25A e 25B) e PQM-163 (Figuras 25C e 25D) não tiveram influência sobre a dinâmica de progressão na mitose. No entanto, a molécula PQM-164 (50 µM) induziu significativo aumento na frequência de mitose após 24 horas de tratamento (Figura 25E). Foi também observada redução significativa na frequência de mitoses em culturas de Hs578t tratadas com 25 µM por 48 horas.

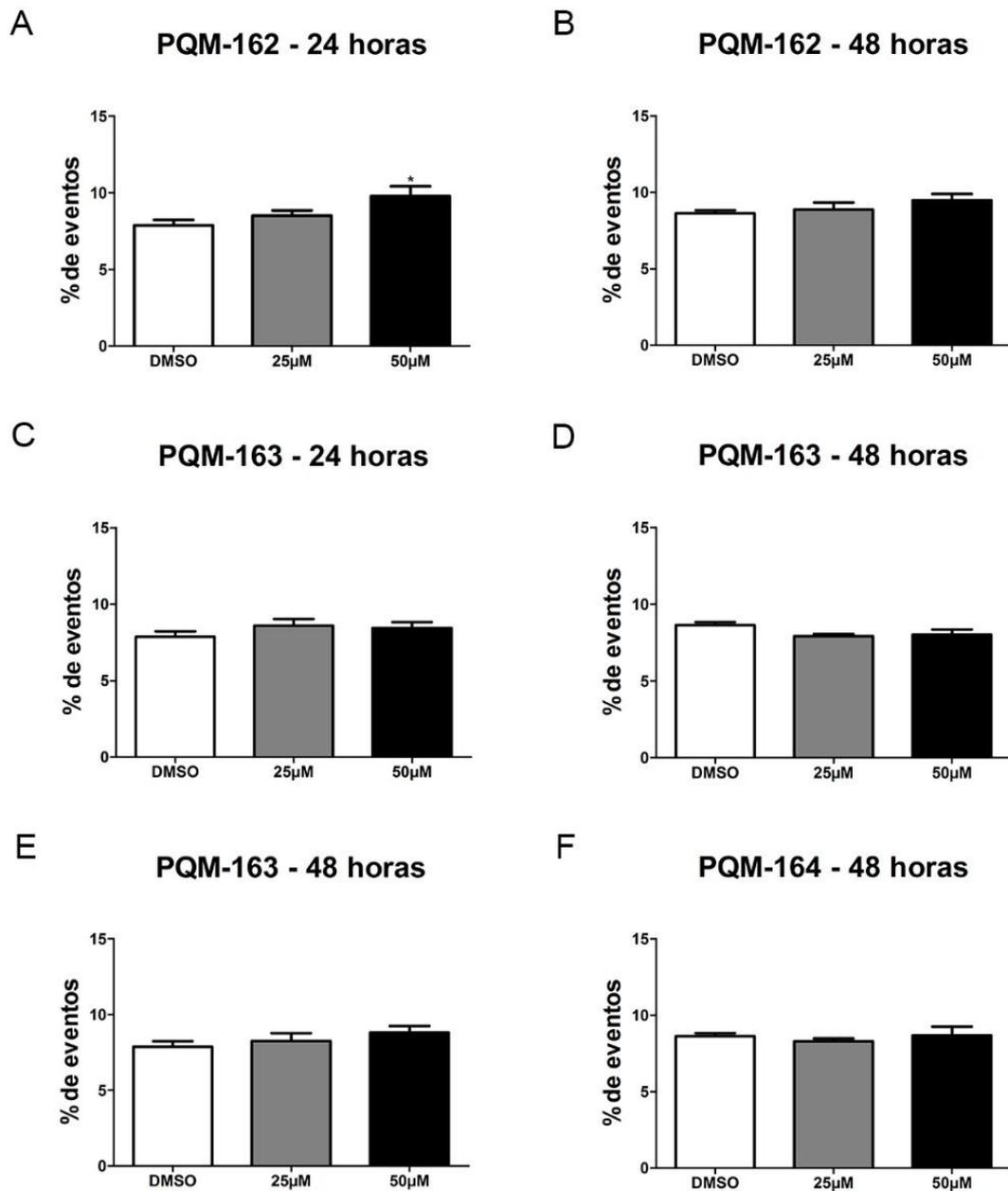
Figura 23 - Índice mitótico determinado em culturas de MCF-7 após tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 por 24 e 48 horas.



Fonte: do autor

Nota: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

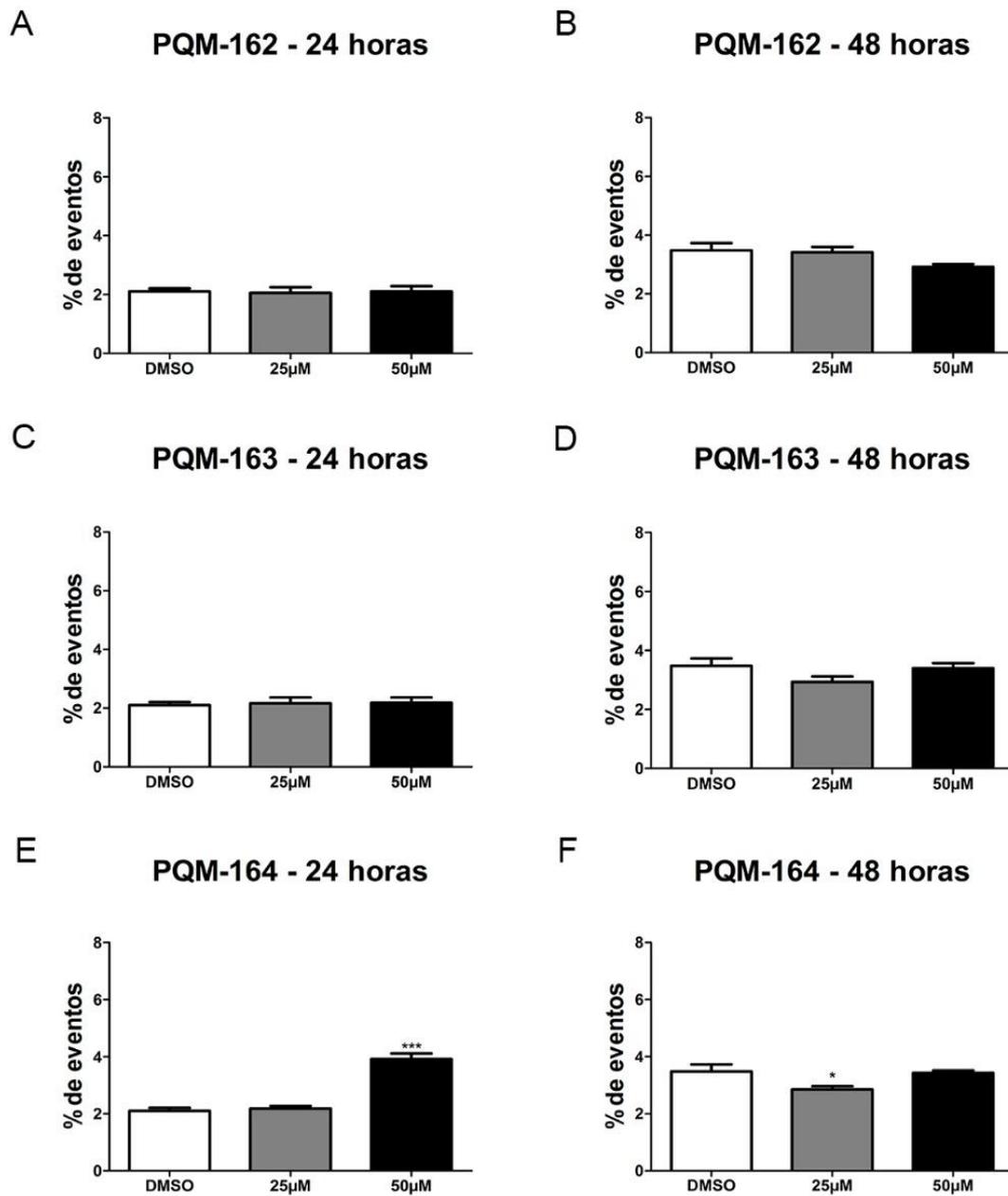
Figura 22 - Índice mitótico determinado em culturas de MDA-MB-231 após tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 por 24 e 48 horas.



Fonte: do autor

Nota: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 23 - Índice mitótico determinado em culturas de Hs578t após tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 por 24 e 48 horas.



Fonte: do autor.

Nota: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

6.6 Determinação da frequência de células nas sub-fases mitose

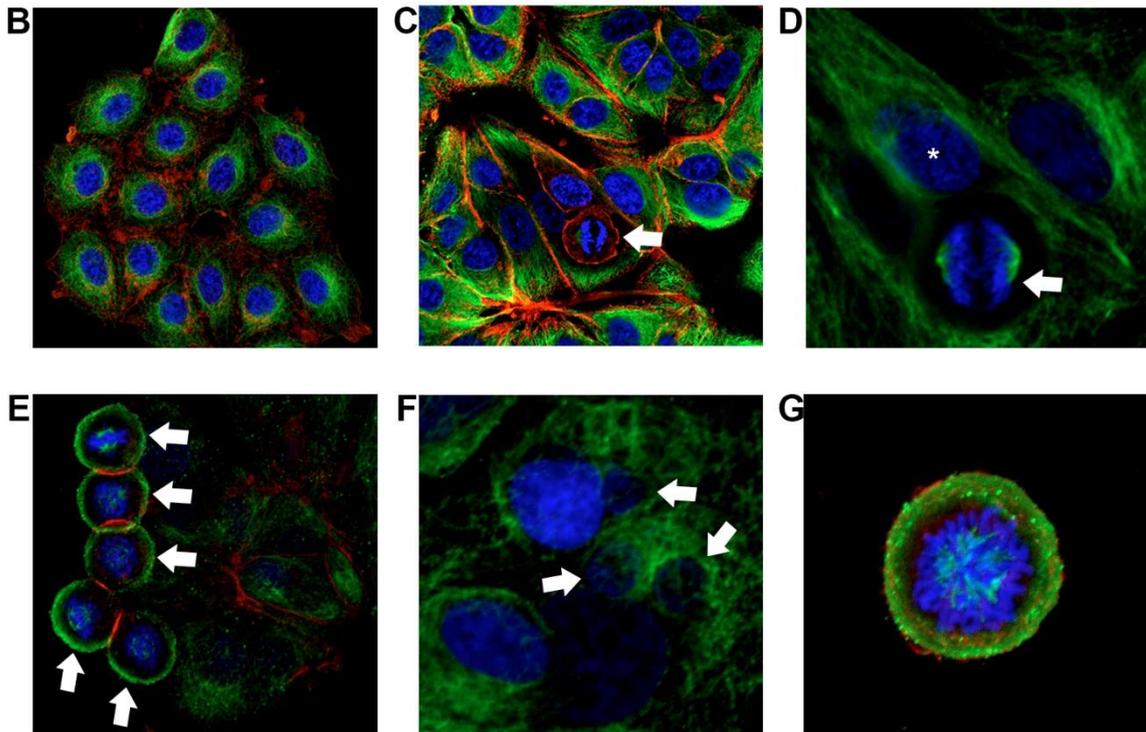
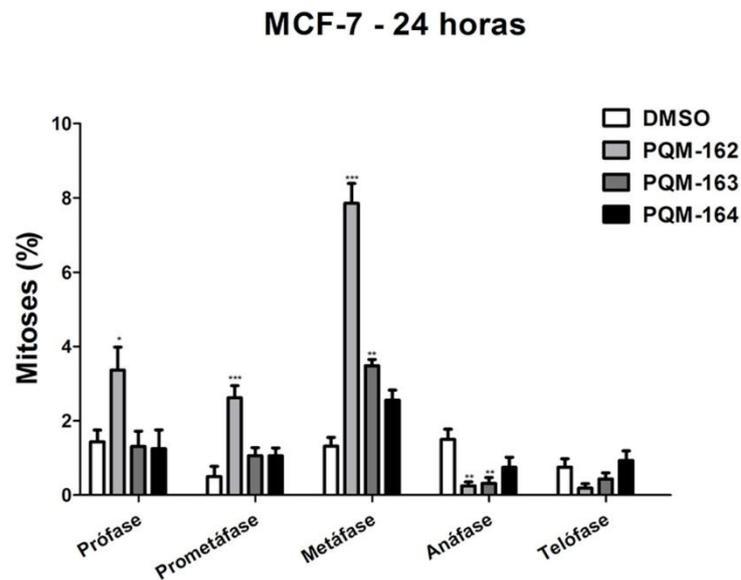
Uma vez que o ensaio de ciclo celular mostrou aumento na população de células na fase G₂/M após o tratamento por 24 horas com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 na linhagem MCF-7 e que o índice mitótico foi maior nas culturas tratadas em relação aos grupos controle, preparações citológicas evidenciando DNA, microtúbulos e microfilamentos foram obtidos para avaliar o padrão de distribuição dos elementos do ciclo e determinar a frequência de células nas diferentes fases da mitose.

Os dados mostram que, após 24 horas, a molécula PQM-162 foi capaz de induzir aumento significativo na frequência de células em prófase, prometáfase e na metáfase (Figura 26D), com concomitante redução de células na anáfase e telófase (Figura 26A). Já as moléculas PQM-163 e PQM-164 apenas induziram aumento da população de células na metáfase e de maneira mais discreta se comparado com a molécula PQM-162.

Mitoses anormais, com fusos mitóticos monopolares foram observadas após o tratamento com a molécula PQM-162 (Figura 26G). Além disso, foi possível observar um grande número de células com núcleo fragmentado, indicativos de morte celular (Figura 26F).

Figura 26 – Imagens fluorescentes mostrando o padrão de distribuição de elementos do citoesqueleto e análise do índice mitótico na linhagem MCF-7.

A



Fonte: do autor.

Nota: (A) índice mitótico determinado na linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. (B) células MCF-7 do grupo controle evidenciando células em interfase. (C) células MCF-7 do grupo controle – anáfase (seta) e prófase (asterisco). (D) células MCF-7 do grupo controle – anáfase em aumento maior. (E) células MCF-7 tratadas com PQM-162 mostrando células em mitoses. (F) núcleos fragmentados após tratamento com a molécula PQM-162. (G) Mitose anormal com fuso mitótico monopolar induzida pela molécula PQM-162. (B; C; C) aumento de 60x. (D; F; G).

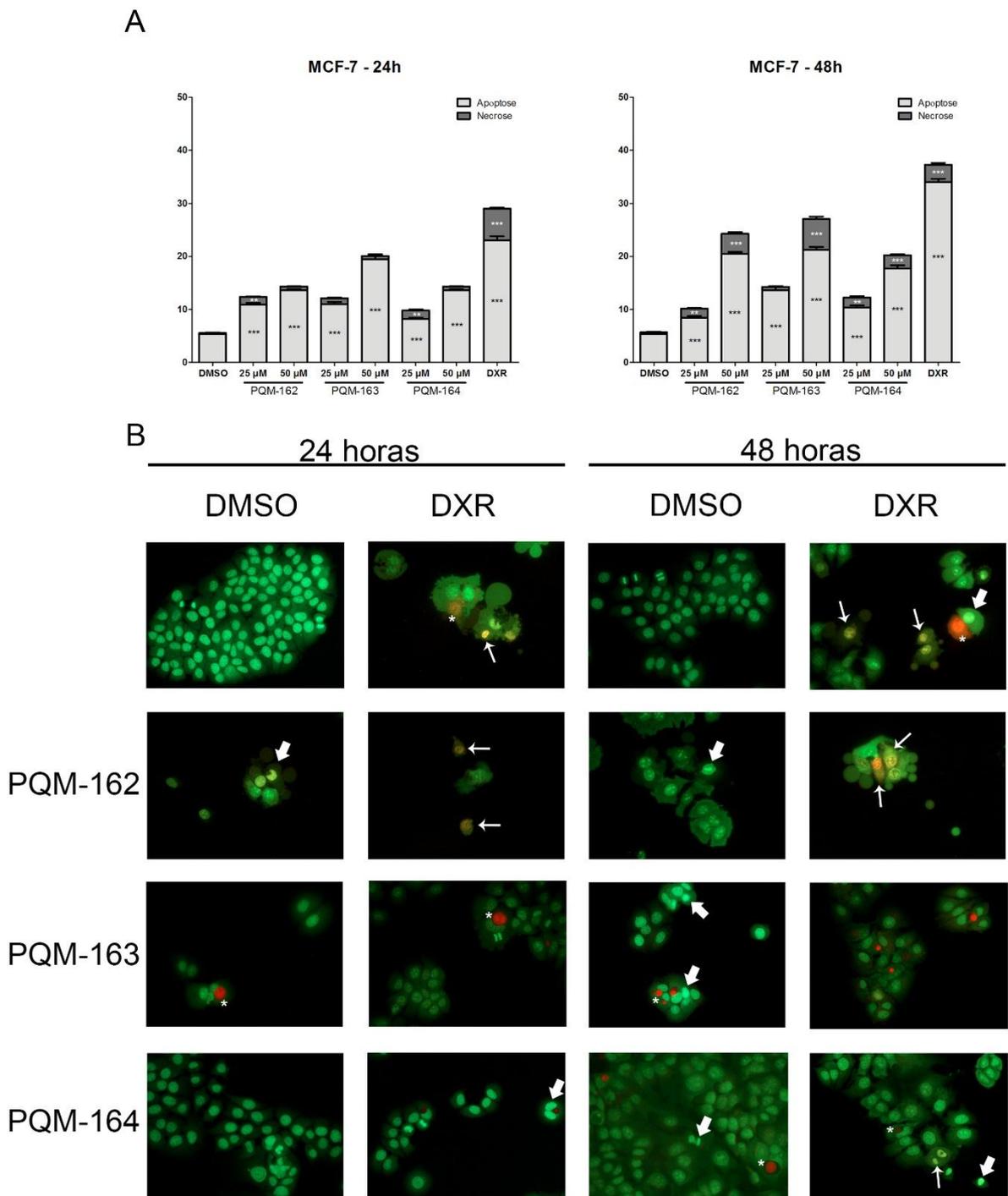
6.7 Análise de morte por dupla coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio

Aumento significativo na frequência de células em apoptose foi observado nas culturas de MCF-7 tratadas com PQM-162, PQM-163 e PQM-164 em ambos os tempos estudados (24 e 48 horas), indicando que a morte celular detectada pelo ensaio de exclusão com azul de tripano e por citometria de fluxo são decorrentes, preferencialmente, da atividade pro-apoptótica dessas moléculas (Figura 27). Significativo aumento na população de células em necrose também foi observada em culturas de MCF-7 tratadas por 48h com PQM-162 e PQM-163 (50 μ M), e PQM-164 (25 e 50 μ M), contudo o percentual de células necróticas foi muito menor em relação ao percentual de células apoptóticas.

Atividade pro-apoptótica das moléculas estudadas também foi evidenciada nas linhagens triplo-negativas (Figuras 28 e 29). Na linhagem MDA-MB-231, foi observado aumento significativo na frequência de células apoptóticas em culturas tratadas com PQM-162 por 24 e 48 horas, e culturas tratadas com PQM-163 e PQM-164 por 48 horas (Figura 28). Na linhagem Hs578t, as moléculas PQM-162 e PQM-163 foram capazes de induzir apoptose somente em culturas tratadas por 48 horas, enquanto PQM-164 induziu apoptose em culturas tratadas por 24 e 48 horas (Figura 29). Aumento significativo da população de células necróticas foi observado somente em culturas de Hs578t tratadas com 164 por 48 horas (Figura 29).

Em conjunto, a análise de morte celular evidenciou que as moléculas estudadas tem eficiente atividade pro-apoptótica sobre a linhagem MCF-7 e, mesmo em concentrações bem inferiores ao IC_{50} determinado após 48 horas de tratamento, também induzem apoptose em células triplo negativas quando usadas por 48 horas.

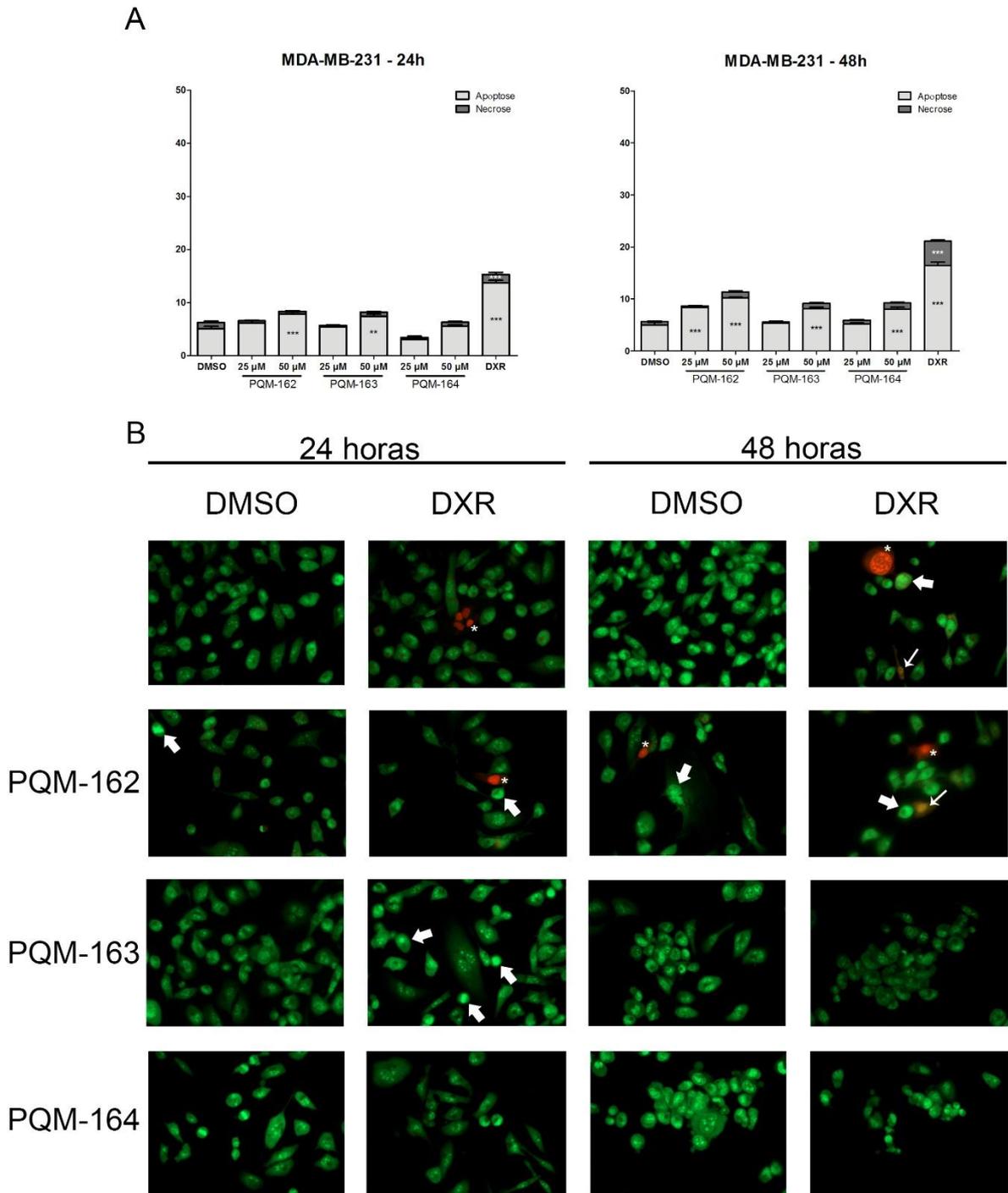
Figura 27 – Análise de morte celular determinada por dupla coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio após 24 e 48 horas de tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 na linhagem MCF-7.



Fonte: do autor.

Nota: (A) análise de morte celular. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. (B) Imagens fluorescentes representativas mostrando o perfil de marcação para alaranjado de acridina (verde) e para o brometo de etídio (vermelho). Seta larga: apoptose inicial; seta: apoptose tardia; asterisco: células em necrose. DXR: doxorubicina (1 μM) foi usada como controle positivo.

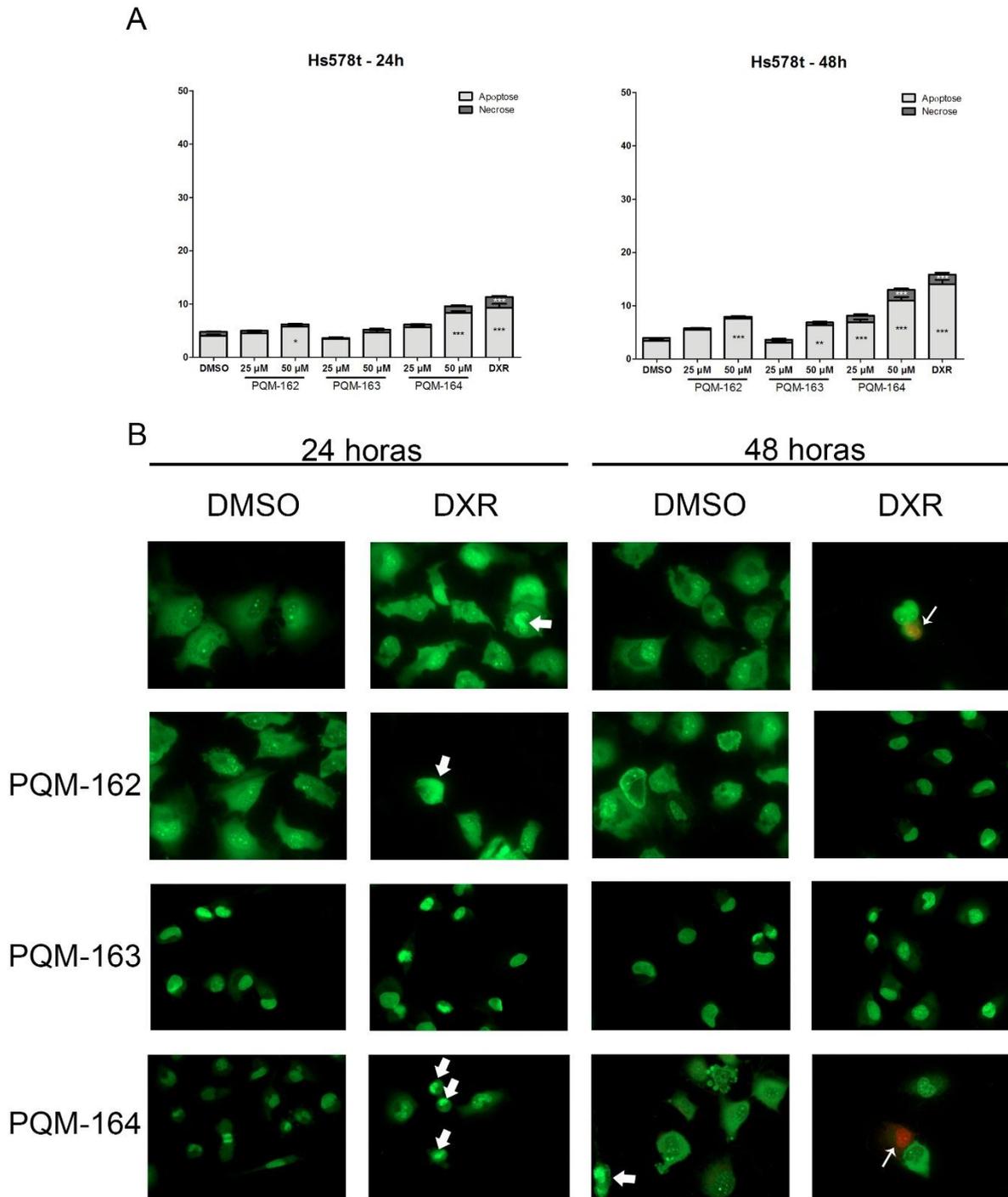
Figura 28 – Análise de morte celular determinada por dupla coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio após 24 e 48 horas de tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 na linhagem MDA-MB-231.



Fonte: do autor.

Nota: (A) análise de morte celular. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. (B) Imagens fluorescentes representativas mostrando o perfil de marcação para alaranjado de acridina (verde) e para o brometo de etídio (vermelho). Seta larga: apoptose inicial; seta: apoptose tardia; asterisco: células em necrose. DXR: doxorubicina (1 μM) foi usada como controle positivo.

Figura 29 – Análise de morte celular determinada por dupla coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio após 24 e 48 horas de tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 na linhagem Hs578t.



Fonte: do autor.

Nota: (A) análise de morte celular. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. (B) Imagens fluorescentes representativas mostrando o perfil de marcação para alaranjado de acridina (verde) e para o brometo de etídio (vermelho). Seta larga: apoptose inicial; seta: apoptose tardia; asterisco: células em necrose. DXR: doxorubicina (1 μM) foi usada como controle positivo.

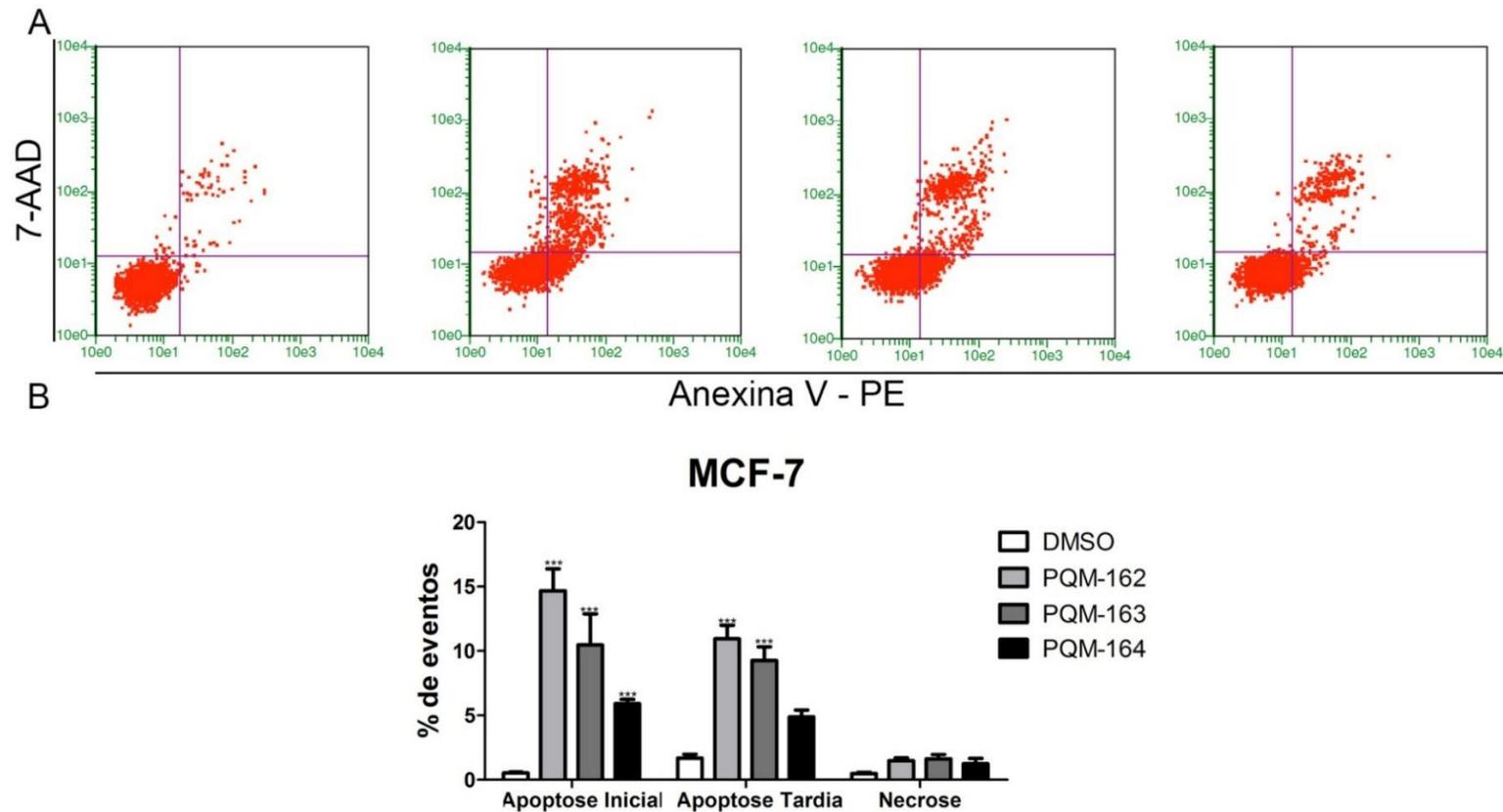
6.8 Análise de apoptose por ensaio de anexina V/7-AAD

Além do ensaio de exclusão por dupla coloração por alaranjado de acridina e brometo de etídio, a atividade pró-apoptótica das moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 foi investigada nas linhagens MCF-7 e Hs578t. A MCF-7 foi mais responsiva às substâncias PQM-162 e PQM-163; enquanto a Hs578t foi mais responsiva à PQM-164. A análise foi feita após 24 horas e 48 horas de tratamento, respectivamente, nas linhagens MCF-7 e Hs578t, considerando os dados obtidos anteriormente.

As moléculas testadas tem atividade pró-apoptótica sobre a linhagem MCF-7 (Figura 28). No entanto, a molécula PQM-162 foi mais eficiente (26 % de células em apoptose) em relação às moléculas PQM-163 (20%) e PQM-164 (11%). Aumento expressivo de necrose não foi observado em culturas tratadas quando comparadas aos grupos controles.

Corroborando com os resultados anteriores, na linhagem Hs578t somente a molécula PQM-164 teve proeminente atividade apoptótica. A frequência de células em apoptose no grupo controle foi aproximadamente 1%, enquanto nas amostras tratadas, respectivamente, com PQM-162, PQM-163 e PQM-164 os percentuais foram 2,5%, 2,0% e 12% (Figura 29). Nesta linhagem, não houve aumento significativo de necrose em nenhum tratamento proposto.

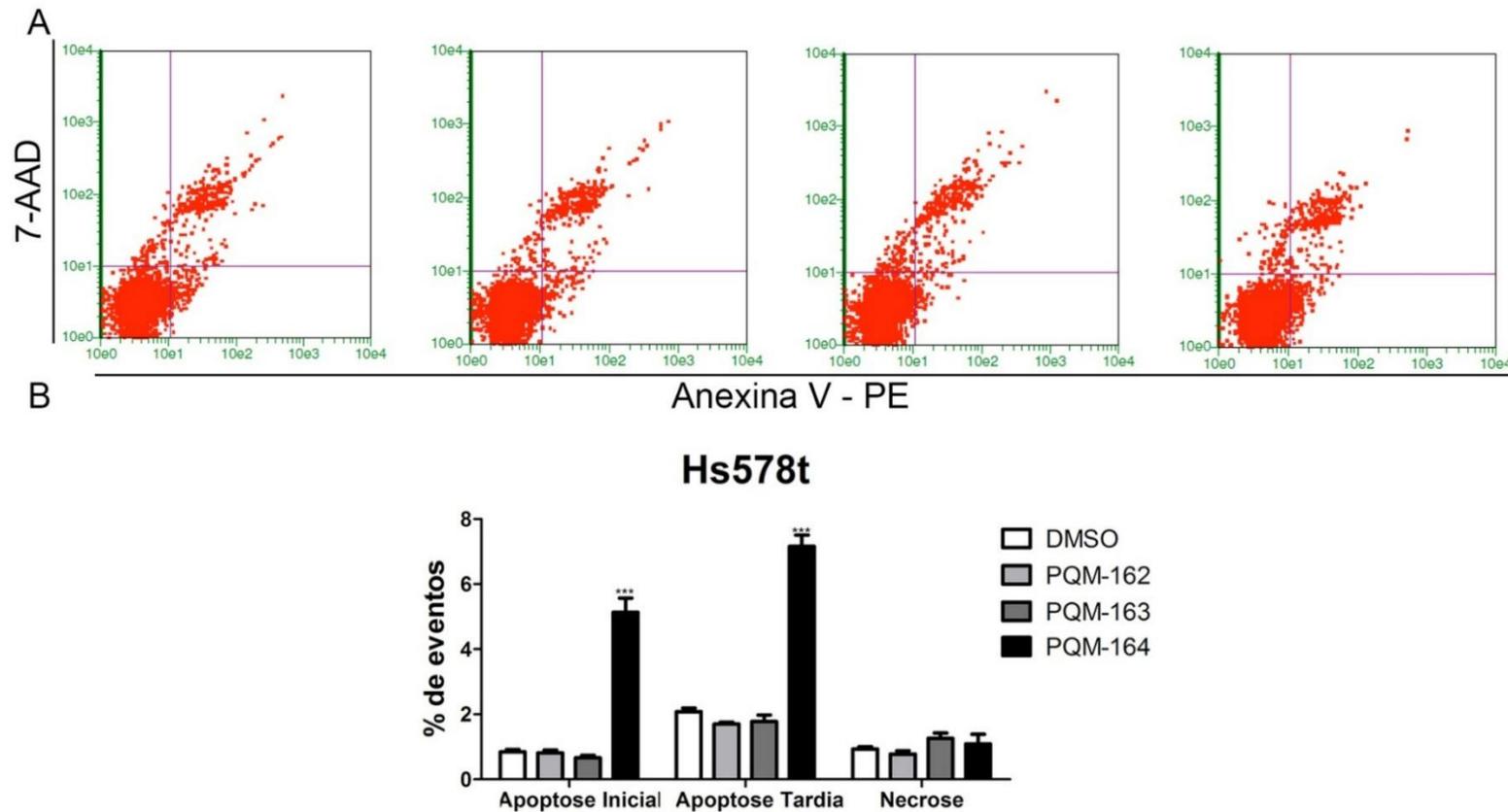
Figura 30 – Ensaio de anexina V em culturas MCF-7 tratadas por 24 horas com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164.



Fonte: do autor.

Nota: (a) Dot plot evidenciando as diferentes populações celulares após o ensaio de anexina V e 7-AAD. Quadrante inferior esquerdo: células negativas para a anexina V e 7-AAD (células viáveis). Quadrante inferior direito: células negativas para 7-AAD e positivas para anexina V (apoptose inicial). Quadrante superior direito: células positivas para 7-AAD e anexina V (apoptose tardia). Quadrante superior esquerdo: células positivas para 7-AAD e negativas para anexina V (necrose). (b) frequência de células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. análise de morte celular. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 31 – Ensaio de anexina V em culturas Hs578t tratadas por 48 horas com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164.



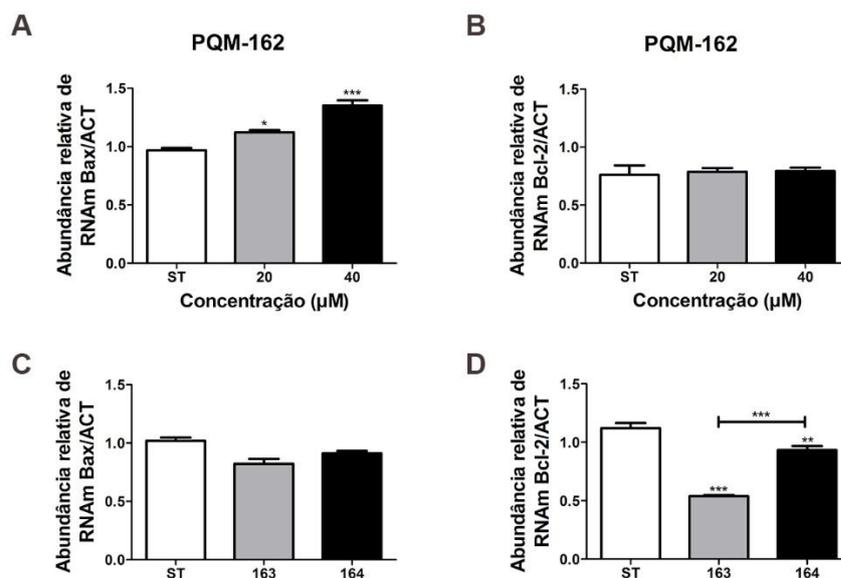
Fonte: do autor.

Nota: (a) Dot plot evidenciando as diferentes populações celulares após o ensaio de anexina V e 7-AAD. Quadrante inferior esquerdo: células negativas para a anexina V e 7-AAD (células viáveis). Quadrante inferior direito: células negativas para 7-AAD e positivas para anexina V (apoptose inicial). Quadrante superior direito: células positivas para 7-AAD e anexina V (apoptose tardia). Quadrante superior esquerdo: células positivas para 7-AAD e negativas para anexina V (necrose). (b) frequência de células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. análise de morte celular. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

6.9 RT-PCR

Uma vez que, na linhagem MCF-7, foi possível observar a ocorrência de morte celular após tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 no ensaio de azul de tripano (Figura 11), e que os ensaios realizados subsequentemente mostram aumento na frequência de células em apoptose (Figuras 27 e 30), foi realizado a quantificação de mRNA (RNA mensageiro) através da técnica de PCR em tempo real para avaliar possível modulação no perfil de expressão de Bcl-2 e Bax, os quais codificam, respectivamente, proteínas com atividade anti-apoptótica e pró-apoptótica. Após 24 horas de tratamento, a molécula PQM-162 induziu aumento significativo na expressão de Bax, nas concentrações de 20 μ M e 40 μ M e o aumento na expressão foi diretamente proporcional à concentração utilizada. (Figura 32A). No entanto, a molécula não foi capaz de induzir aumento na expressão do gene Bcl-2 em nenhuma concentração utilizada (Figura 32B). Em contrapartida, as moléculas PQM0163 e PQM-164 induziram redução na expressão de Bcl-2 (Figura 32C) enquanto não houve alterações na expressão de Bax (Figura 32D).

Figura 32 – Análise de expressão relativa de mRNA de genes envolvidos na regulação de apoptose na linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento com PQM-162, PQM-163 e PQM-164

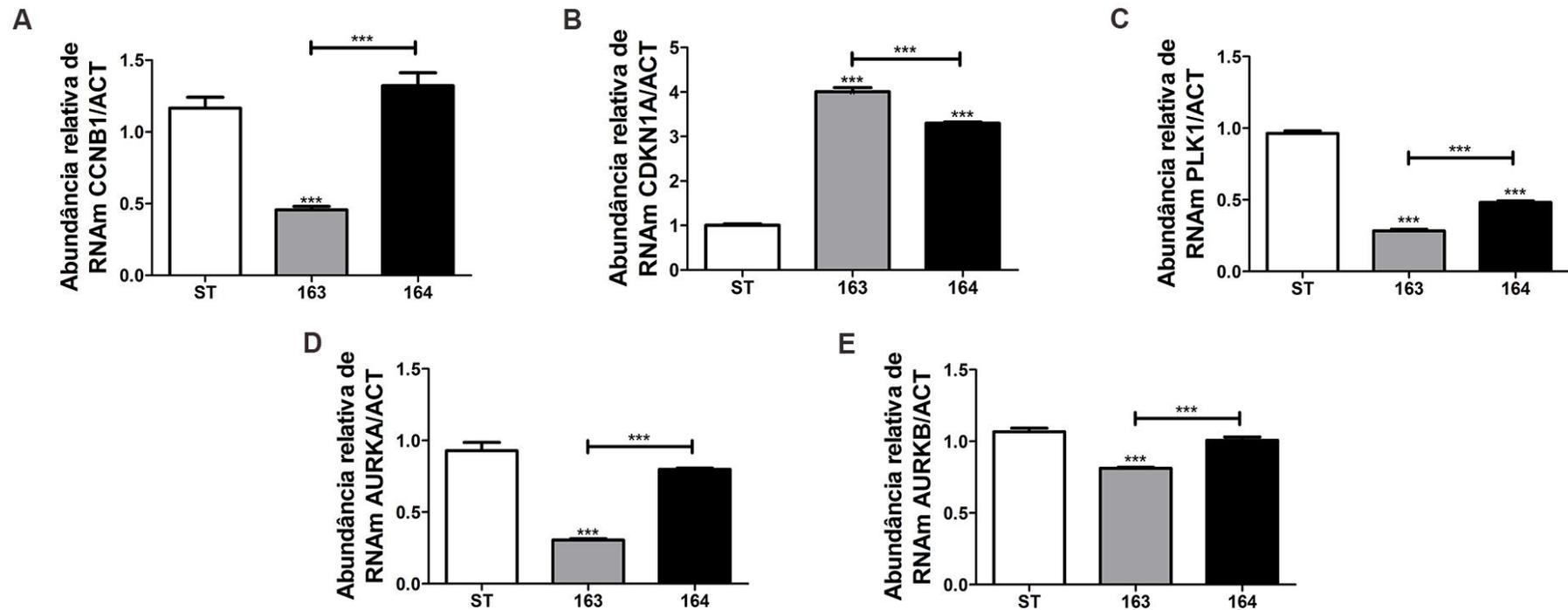


Fonte: do autor

Nota: os dados representam a média \pm DP de quatro experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Uma vez que, na linhagem MCF-7, as moléculas PQM-163 e PQM-164 aumentaram a população de células na fase G₂/M após 24 horas de tratamento (Figura 17), foi feita a análise da expressão de reguladores críticos desta fase, após tratamento por 24 horas com as moléculas na concentração de 50µM (Figura 33).

Figura 33 – Análise de expressão relativa de mRNA de genes envolvidos na regulação da fase M do ciclo celular na linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento com PQM-163 e PQM-164



Fonte: do autor.

Nota: os dados representam a média \pm DP de quatro experimentos independentes. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Os resultados mostraram que a molécula PQM-163 reduziu substancialmente a expressão de ciclina B1 (Figura 33A), PLK1 (Figura 33C), aurora A (Figura 33D) e aurora B (Figura 33) bem como elevou em 3 vezes a expressão de p21 (Figura 33B). Já a molécula PQM-164 apenas aumentou a expressão de p21 (Figura 33B) e reduziu a expressão de PLK1 (Figura 33C).

6.10 imunoblot

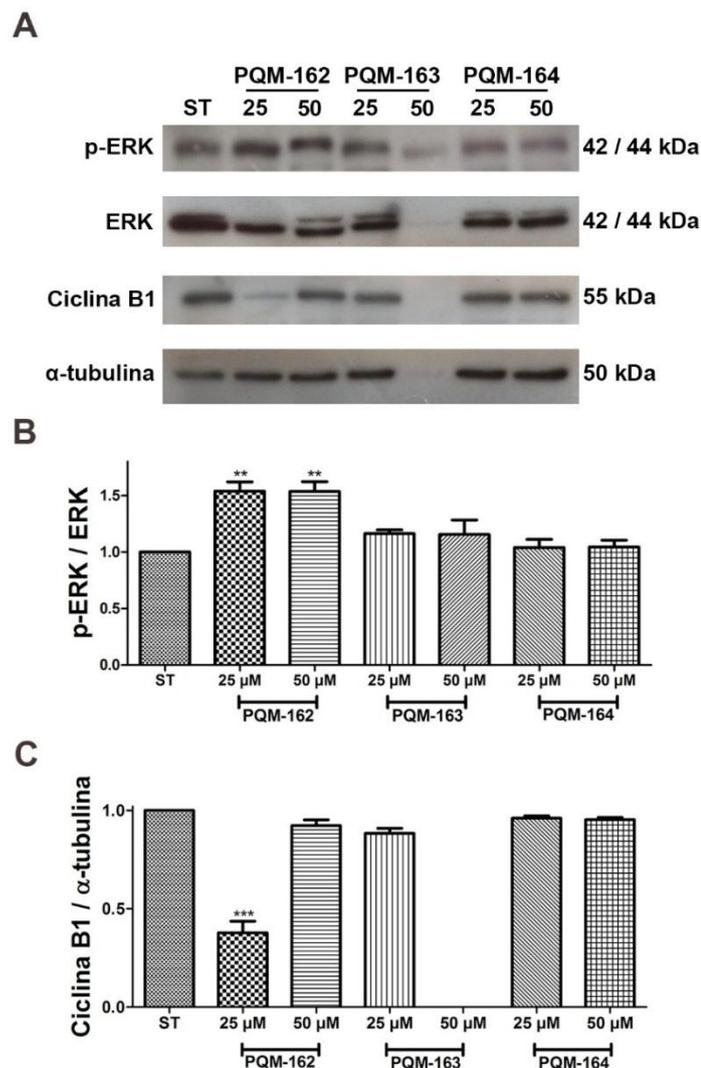
Na linhagem MCF-7, os efeitos decorrentes do tratamento foram observados a partir de 24 horas de exposição às substâncias estudadas, enquanto na linhagem Hs578t mudanças significativas foram preferencialmente observadas após 48 horas de tratamento. Dessa forma, a análise de expressão proteica foi realizada após 24 h (linhagens MCF-7 e Hs578t) e 48 horas (Hs578t) de tratamento.

A análise do perfil de expressão de ERK e fosfo-ERK (Tyr 204), após 24 horas de tratamento na linhagem MCF-7, mostrou que a molécula PQM-162 (25 μ M e 50 μ M) induziu aumento significativo na expressão de ERK fosforilada. Alterações significativas não foram observadas em amostras tratadas com PQM-163 na concentração de 25 μ M e PQM-164 (25 μ M e 50 μ M) quando comparadas aos grupos controles. Infelizmente não foi possível obter dados conclusivos em relação aos efeitos da substância PQM-163 (50 μ M), uma vez bandas imunorreativas não foram detectadas nos controles de carregamento (ERK total e α -tubulina) indicando que houve algum problema de ordem técnica/metodológica. (Figuras 34A e 34B). Houve redução na expressão de ciclina B1 após tratamento com a molécula PQM-162 na concentração de 25 μ M. No entanto, a concentração de 50 μ M não interferiu na expressão desta proteína. Não houve alteração no perfil de expressão de ciclina B1 em amostras tratadas com PQM-163 (25 μ M) e PQM-164 (25 e 50 μ M) (Figuras 34A e 34C). A molécula PQM-164, nas concentrações utilizadas, não induziram alterações significativas na expressão de ciclina B1.

Na linhagem Hs578t, a molécula PQM-164 reduziu a expressão da forma ativa de ERK após 24 horas de tratamento onde a expressão volta aos níveis normais após 48 horas de tratamento. Este dado sugere que, nesta linhagem, a inibição da ativação

de ERK precede os eventos mediados pela molécula PQM-164, que são observados apenas com 48 horas de tratamento (Figuras 35A e 35B). As demais moléculas não foram capazes de induzir alterações significativas na expressão de ERK em nenhum dos períodos estudados. Após 48 horas, as moléculas PQM-162 e PQM-164 reduziram eficientemente a expressão de ciclina B1 sendo que esta redução foi maior com a molécula PQM-164 (Figuras 35A e 35C). Com 24 horas de tratamento, nenhuma molécula induziu alterações na expressão de ERK e, com 48 horas, a molécula PQM-163, ao contrário das demais, não modula a expressão de ciclina B.

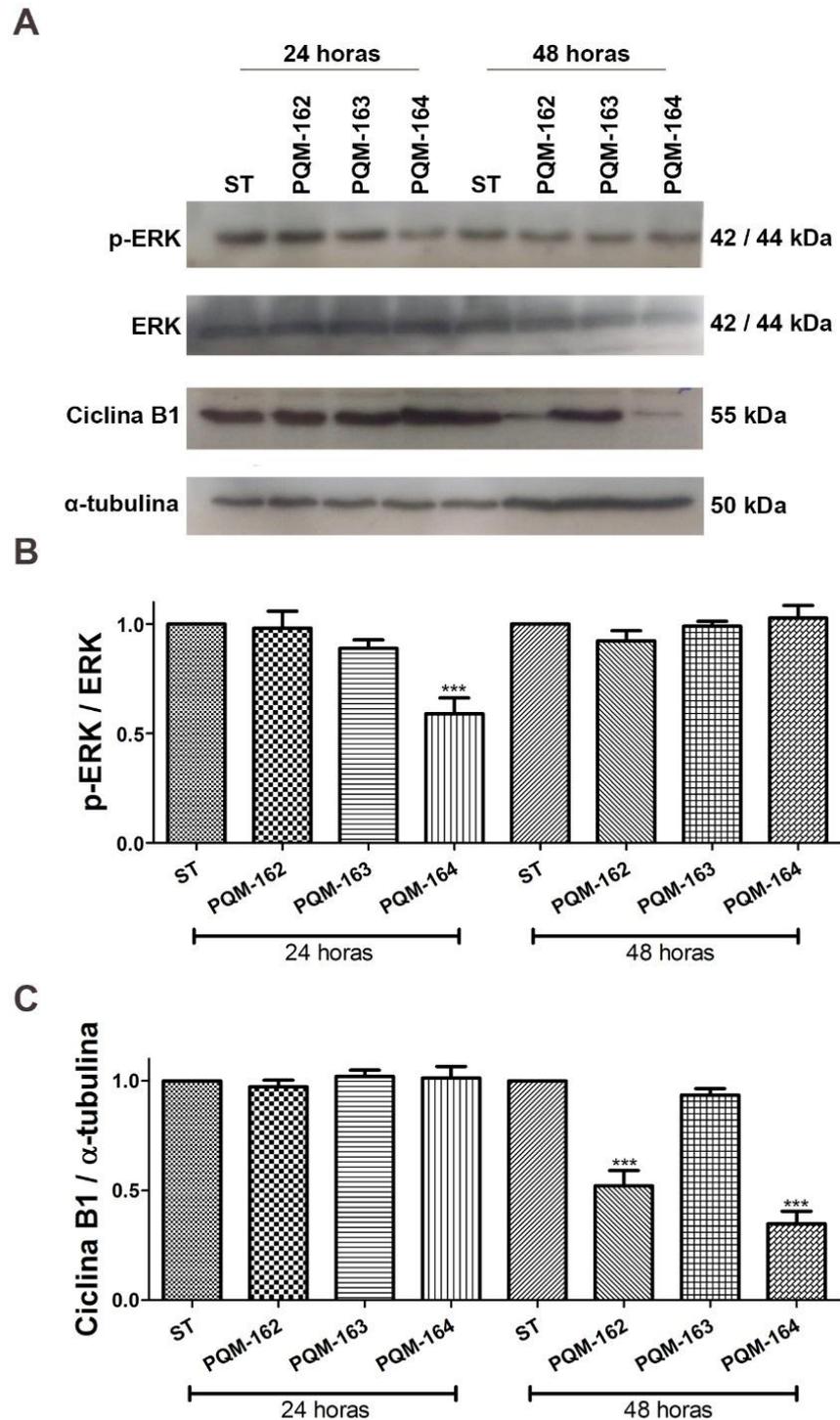
Figura 34 – Análise do perfil de expressão proteica de ERK, fosfo-ERK (Tyr 204) e ciclina B1 por *immunoblot* na linhagem MCF-7 após tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 nas concentrações de 25 e 50 μM .



Fonte: do autor.

Nota: As bandas imunorreativas foram quantificadas pelo software de domínio público, o ImageJ. DXR: doxorubicina foi usada como controle positivo.

Figura 35 – Análise do perfil de expressão proteica de ERK, fosfo-ERK (Tyr 204), Ciclina B1 e α -tubulina por *immunoblot* na linhagem Hs578t após tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 na concentração de 50 μ M por 24 e 48 horas.



Fonte: do autor.

Nota: As bandas imunorreativas foram quantificadas pelo software de domínio público, o ImageJ. DXR: doxorubicina (1 μ M) foi usada como controle positivo.

6.11 Estabelecimento de uma linhagem resistente à doxorubicina (MCF-7^{DXR-R})

Células MCF-7 foram expostas a concentrações baixas e crescentes de DXR por um período de 6 meses a fim de induzir resistência ao referido fármaco. A avaliação da viabilidade relativa foi realizada por MTS antes da exposição a DXR e a cada 45 dias após o início do tratamento. Dessa forma, foi possível determinar o IC₅₀ nos diferentes períodos e avaliar o perfil de resistência adquirido.

Os resultados mostraram que o esquema de tratamento utilizado foi eficiente e induziu resistência ao fármaco, de modo que o IC₅₀ após 45 dias de tratamento foi quase o dobro do observado antes da exposição a DRX, e cerca de 5x maior ao final de 180 dias (Tabela 11; Figura 36). A linhagem resistente obtida após 180 dias de tratamento foi denominada MCF-7^{DRX-R}.

Tabela 11 - valores de IC₅₀ ± DP (µM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTS)

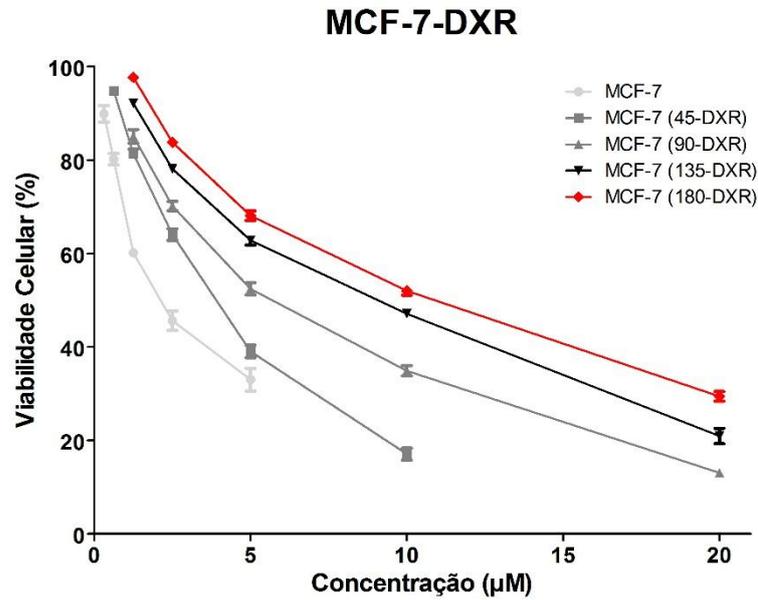
	IC ₅₀
MCF-7	2,20 ± 0,09
MCF-7 (45-DXR)	3,63 ± 0,07
MCF-7 (90-DXR)	5,33 ± 0,14
MCF-7 (135-DXR)	7,91 ± 0,23
MCF-7 (180-DXR)	10,05 ± 0,27

Fonte: do autor.

Nota: DXR: doxorubicina.

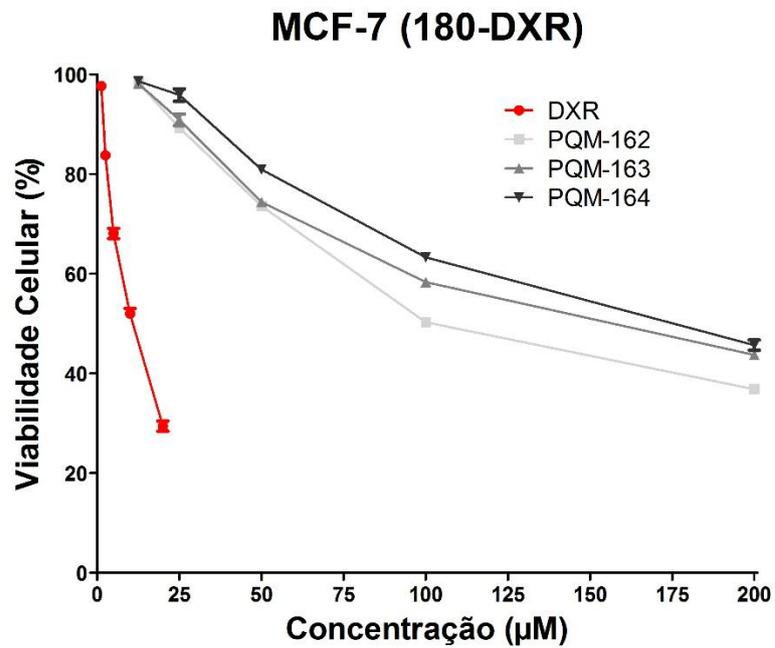
As substâncias PQM-162, PQM-163 e PQM-164 foram testadas na linhagem MCF-7^{DRX-R}, cujos valores de IC₅₀ foram determinados após 48 horas (Tabela 12; Figura 37). Os dados obtidos subsidiaram os experimentos subsequentes relacionados à capacidade de sensibilização das substâncias estudadas à DRX na linhagem MCF-7^{DRX-R}.

Figura 36 - Viabilidade celular determinada por MTS após 45, 90, 135 e 180 dias de tratamento.



Fonte: do autor.

Figura 37 - Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem MCF-8 (180-DXR) após 48 horas de tratamento com as moléculas PQM-162, PQM-163, PQM-164 e DXR.



Fonte: do autor

Tabela 12 - valores de $IC_{50} \pm DP$ (μM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade (MTS)

	MCF-7	MCF-7 (180DXR)	RAZÃO
DXR	2,20 \pm 0,09	10,05 \pm 0,27	
PQM-162	50,34 \pm 1,75	115,40 \pm 3,50	1 : 10
PQM-163	42,28 \pm 1,49	146,30 \pm 5,43	1 : 14
PQM-164	69,19 \pm 2,52	165,10 \pm 5,39	1 : 16

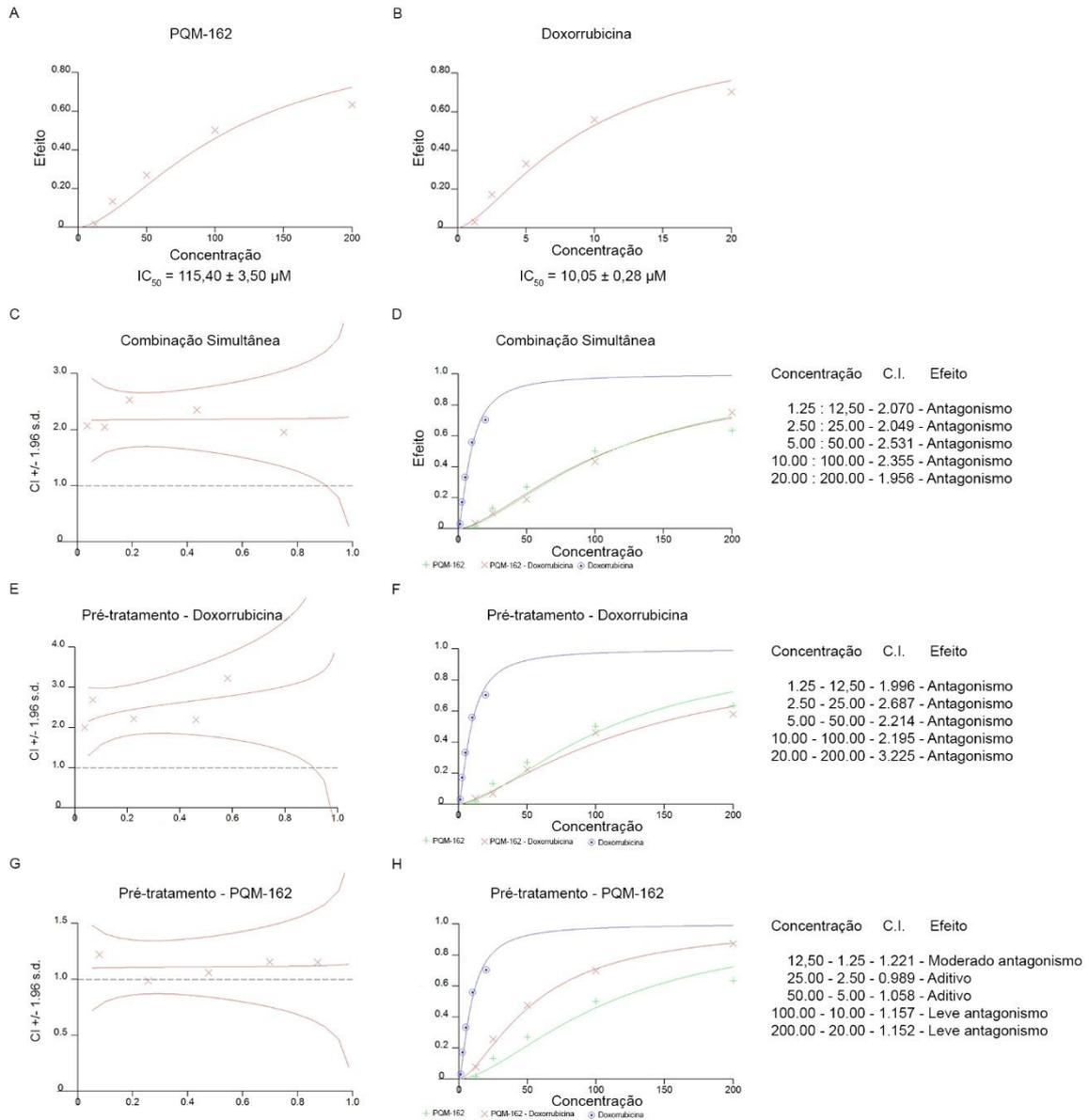
Nota: DXR: doxorubicina. A razão será a proporção, em cada concentração, de doxorubicina e a molécula de estudo nos ensaios de sensibilização baseado nos dados de IC_{50} obtidos. **Fonte:** do autor.

6.12 Ensaio de sensibilização realizadas na linhagem MCF-7^{DRX-R}

Com o objetivo de avaliar se as substâncias estudadas poderiam sensibilizar a linhagem MCF-7^{DRX-R} ao tratamento com DXR, diferentes esquemas de tratamento foram utilizados e incluíram tratamentos simultâneos e sequenciais. Quando a linhagem MCF-7^{DRX-R} foi submetida aos tratamentos simultâneos, com a molécula PQM-162, todas as concentrações usadas foram antagônicas (Figuras 38C e 38D). A molécula PQM-163, além de induzir antagonismo (Figura 39D), mostrou uma tendência de que, quanto maior a concentração usada, maior o índice de combinação e, portanto, maior o antagonismo à DRX (Figura 39C). Esse mesmo evento foi observado quando as culturas foram tratadas com PQM-164 (Figura 40C). No entanto, quando concentrações mais baixas foram usadas, observou-se um leve sinergismo entre PQM-164 e a DXR (Figura 40D).

Já os resultados do pré-tratamento com a DXR e posterior exposição as moléculas estudadas mostram que houve antagonismo (Figuras 38E, 38F, 39E, 39F, 40E e 40F). Os índices de combinação foram maiores em culturas tratadas sequencialmente com DXR e PQM-163, de modo que houve um forte antagonismo na concentração máxima utilizada (20 μM de DRX e 280 μM de PQM-163) (Figuras 39E e 39F). Quanto aos pré-tratamentos realizados com as moléculas PQM162, PQM-163 e PQM-164, seguido pelo tratamento com a DRX, houve uma tendência ao sinergismo quando baixas concentrações de PQM-164 foram utilizadas (Figuras 40G e 40H), enquanto os pré-tratamentos com as moléculas PQM-162 (Figuras 38H e 38H) e PQM-163 (Figuras 39G e 39H) mostraram-se antagonismo com a DRX.

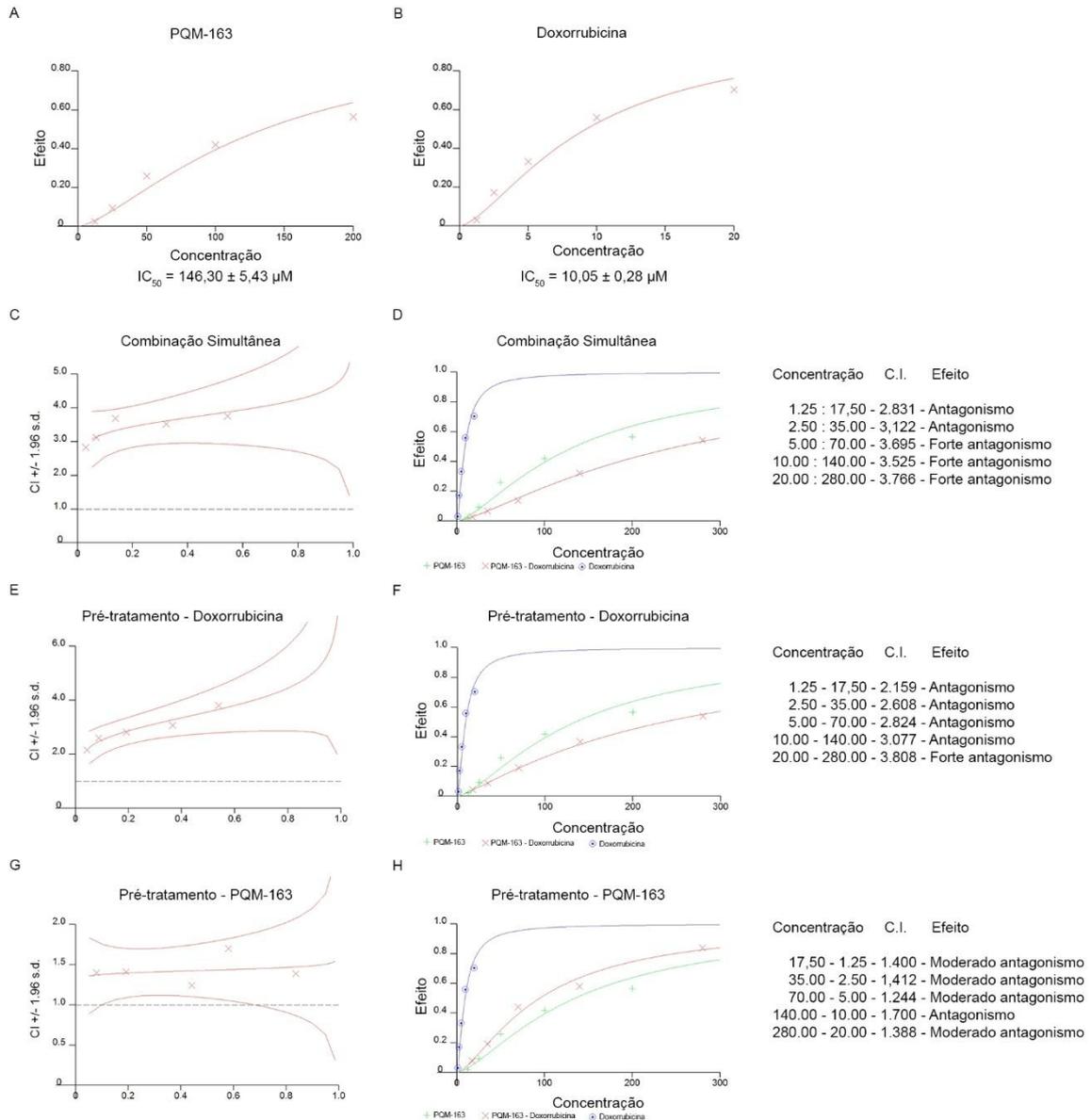
Figura 38 – Ensaios de sensibilização realizados com PQM-162 e DXR em células MCF-7^{DXR-R}.



Fonte: do autor.

Nota: Curvas dose-resposta após 48 horas de tratamento. (A) PQM-162. (B) DXR. (C, E e G) linha de tendência da combinação simultânea (C), pré-tratamento com DXR (E) e (G) pré-tratamento com a molécula PQM-162. (d, f, h) curvas dose-resposta – PQM-162 (verde); DXR (azul) e PQM-162-DXR (vermelho) (D), pré-tratamento com a doxorubicina (F) e pré-tratamento com a molécula PQM-162 (H). Os dados mostram dados obtidos de quatro experimentos independentes. CI: índice de combinação.

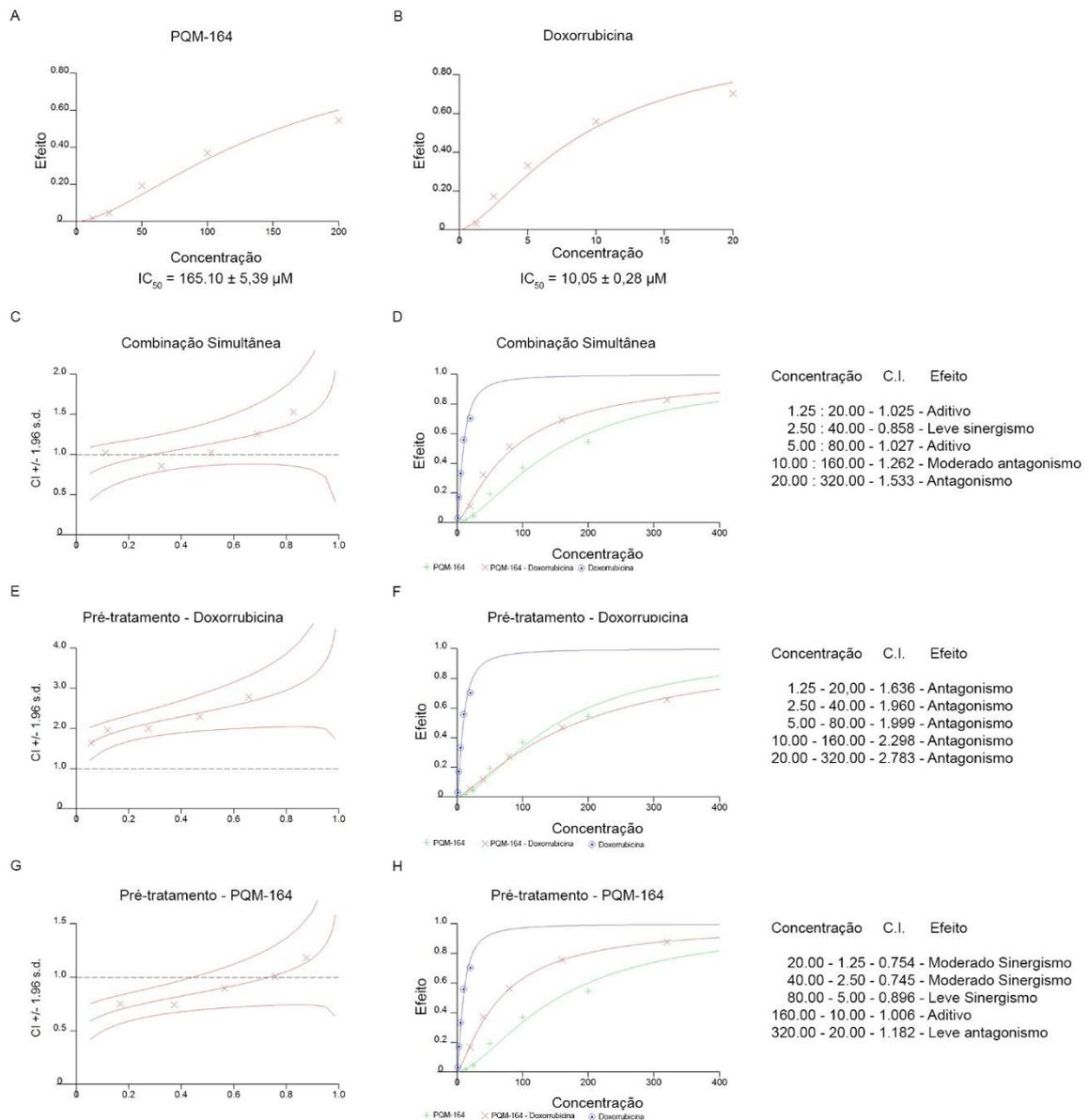
Figura 39 – Ensaios de sensibilização realizados com PQM-163 e DXR em células MCF-7^{DXR-R}.



Fonte: do autor.

Nota: Curvas dose-resposta após 48 horas de tratamento. (A) PQM-163. (B) DXR. (C, E e G) linha de tendência da combinação simultânea (C), pré-tratamento com DXR (E) e (G) pré-tratamento com a molécula PQM-163. (d, f, h) curvas dose-resposta – PQM-163 (verde); DXR (azul) e PQM-163-DXR (vermelho) (D), pré-tratamento com a doxorubicina (F) e pré-tratamento com a molécula PQM-163 (H). Os dados mostram dados obtidos de quatro experimentos independentes. CI: índice de combinação.

Figura 40 – Ensaio de sensibilização realizados com PQM-164 e DXR em células MCF-7^{DXR-R}.



Fonte: do autor.

Nota: Curvas dose-resposta após 48 horas de tratamento. (A) PQM-163. (B) DXR. (C, E e G) linha de tendência da combinação simultânea (C), pré-tratamento com DXR (E) e (G) pré-tratamento com a molécula PQM-163. (d, f, h) curvas dose-resposta – PQM-163 (verde); DXR (azul) e PQM-163-DXR (vermelho) (D), pré-tratamento com a doxorubicina (F) e pré-tratamento com a molécula PQM-163 (H). Os dados mostram dados obtidos de quatro experimentos independentes. CI: índice de combinação.

7 DISCUSSÃO

Estudos prévios do nosso laboratório avaliaram os efeitos de uma série de moléculas obtidas sinteticamente, cujas estruturas foram planejadas considerando os grupos farmacofóricos da curcumina e do resveratrol, produtos naturais com conhecida atividade quimiopreventiva e quimioterapêutica (SILVA et al., 2018). No estudo, o planejamento químico-estrutural das substâncias objetivou obter compostos com atividade antitumoral igual ou superior à observada para os protótipos de partida, mas que tivessem bons coeficientes de solubilidade e biodisponibilidade, o que suportaria o uso clínico dessas substâncias futuramente.

Da série de substâncias avaliadas por Silva e colabores (2018), 3 derivados de curcumina (PQM-162, PQM-163 e PQM-164) reduziram seletivamente a viabilidade de células derivadas de tumor de mama que expressam receptores de estrogênio (MCF-7). Os resultados obtidos foram muito promissores, uma vez que as substâncias apresentam padrão químico inédito. Além disso, o espaçador n-acilhidrazônico, utilizado para conectar o grupo farmacofórico da curcumina aos diferentes grupamentos químicos testados, pode contribuir para o aumento do coeficiente de solubilidade e biodisponibilidade dessas moléculas (ROLLAS; KUCUKGUZEL, 2007).

O presente trabalho representa, portanto, uma continuidade dos estudos realizados por de Freitas-Silva et al. (2018) e teve por objetivo investigar os mecanismos envolvidos com a atividade de PQM-163 e PQM-164 sobre a linhagem MCF-7, uma vez que no estudo anterior somente a PQM-162 foi explorada em relação aos seus mecanismos de ação. Os efeitos das três moléculas estudadas (PQM-162, PQM-163 e PQM-164) foram também avaliados sobre linhagens celulares derivadas de câncer de mama, as quais são caracterizadas como triplo-negativas (MDA-MB-231 e Hs578t). Devido a ausência de alvos terapêuticos, os tumores triplo negativos são de difícil tratamento e possuem um limitado arsenal farmacêutico (BAGLIA et al., 2018).

Apesar das diferenças apresentadas em relação ao perfil de expressão de receptores hormonais e na taxa de mutações, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram estabelecidas a partir de sítios metastáticos de pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo e de adenocarcinoma mamário, respectivamente, e tem

sido amplamente utilizadas como modelos de câncer de mama metastático. Já a linhagem Hs578t origina-se de carcinoma extraído da própria glândula mamária, não representando um modelo de câncer de mama metastático como as demais.

Os resultados mostraram que PQM-162, PQM-163 e PQM-164 são promissores agentes antitumorais contra células derivadas de câncer de mama. Embora o perfil citotóxico dessas substâncias sobre células não-tumorais (HaCaT) tenha sido maior que o observado para a curcumina, elas apresentaram grande seletividade para as células tumorais. Além disso, essas moléculas mostraram-se muito menos citotóxicas em relação à doxorrubicina, um fármaco comumente usado no tratamento de câncer de mama metastático e em pacientes portadores de tumores triplo-negativos (SHARMA et al., 2018).

As três moléculas estudadas (PQM-162, PQM-163 e PQM-164) inibiram a proliferação das linhagens celulares testadas e induziram apoptose, contudo o efeito foi dependente da concentração utilizada e o perfil de atividade variou em decorrência da linhagem celular considerada.

A linhagem MCF-7 foi mais responsiva aos tratamentos em comparação com as linhagens triplo-negativas (MDA-MB-231 e Hs578t). Contudo, os resultados obtidos a partir de diferentes abordagens metodológicas mostraram que o comportamento proliferativo das linhagens triplo-negativas foi significativamente afetado em decorrência dos tratamentos realizados, mesmo usando concentrações inferiores ao IC_{50} , dado interessante diante da resistência das linhagens às moléculas utilizadas. A breve exposição (24 horas) das culturas às substâncias PQM-162, PQM-163 e PQM-14 foi suficiente para inibir a capacidade clonogênica das linhagens celulares testadas. Esses dados são muito importantes e reforçam o potencial antitumoral das substâncias estudadas, uma vez que a intensa atividade proliferativa está intimamente associada aos processos de progressão tumoral e estabelecimento de metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A análise de progressão do ciclo celular mostrou que as substâncias PQM-162, PQM-163 e PQM-164 induziram aumento na população G2/M nas linhagens triplo-negativas, similar ao que foi relatado por Silva e colaboradores (2018) em relação a substância PQM-162 na linhagem MCF-7. Entretanto, acúmulo de células em mitose

foi observado somente na linhagem MDA-MB-231 tratadas com PQM-162 e na linhagem Hs578t tratada com PQM-164.

A progressão do ciclo celular na transição G2/M é complexa e envolve a participação de diferentes proteínas cinases incluindo a CDK1, a qual é ativada preferencialmente pela ciclina B (MORALLI et al., 2013). Contudo, uma vez formado, o complexo ciclinaB-CDK pode ser inibido pelas cinases Wee1 e Myt1 que são responsáveis por fosforilar a CDK1 em sítios que reprimem sua atividade. A fosforilação inibitória da CDK1 é removida pelas fosfatases CDC25b e CDC25c formados (HAMER et al., 2011; DUTERTRE et al., 2004; VUGT; BRÁS; MEDEMA et al., 2004) que, por sua vez estão envolvidas na ativação desses complexos.

Foi possível demonstrar que as substâncias PQM-162 e PQM-164 reduziram significativamente os níveis de expressão de ciclina B na linhagem Hs578t. Além disso, a PQM-164 reduziu os níveis de expressão de ERK fosforilada na linhagem Hs578t. A via de sinalização Raf/Mek/Erk, em geral, apresenta-se hiperativa em muitos tipos de câncer incluindo os tumores triplo-negativos e representa um importante alvo terapêutico. Dessa forma, o efeito das substâncias PQM-162 e PQM-164 sobre a linhagem Hs578t foi associado, pelo menos em parte, à capacidade dessas substâncias em modular a expressão de ciclina B e ERK ativada. Entretanto, sabe-se que outros eventos podem estar associados com o bloqueio do ciclo na transição G2/M e progressão em M (SILVA et al., 2018) e investigações futuras devem ser realizadas para melhor entender os alvos moleculares dos derivados de curcumina avaliados sobre as linhagens triplo-negativas.

Ao avaliar os mecanismos relacionados com a atividade de PQM-163 e PQM-164 sobre a linhagem MCF-7 foi possível verificar que, de modo similar ao observado para PQM-162, houve acúmulo da população G2/M que, em parte, foi devido ao aumento na frequência de mitoses. Curiosamente, a frequência de células nas fases iniciais da mitose (prófase, prometáfase e metáfase) foi maior nas culturas tratadas em relação aos grupos controles. Com o objetivo de avaliar se os alvos moleculares de PQM-163 e PQM-164 sobre a linhagem MCF-7 foram similares aos observados por SILVA e colaboradores (2018), o perfil de expressão, em nível de RNA mensageiro, de reguladores críticos da transição G2/M e M foram investigados.

Os dados mostraram que PQM-163 inibiu (2.5x) a expressão de mRNA de ciclina B1 na linhagem MCF-7, de modo similar ao observado por Freitas-Silva et al. (2018) com a PQM-162 (redução de 5,8x). PQM-164 não alterou o perfil de expressão de ciclina B1, indicando que o bloqueio no ciclo induzido por essa substância na linhagem MCF-7 pode estar associado a outros mecanismos, incluindo a modulação das cinases Wee1/Myt1 e das fosfatases CDC25b e CDC25c, cuja atividade define o perfil de ativação do complexo ciclina B-CDK formados (HAMER et al., 2011; DUTERTRE et al., 2004; VUGT; BRÁS; MEDEMA et al., 2004).

O ciclo celular pode ser inibido pelo aumento no perfil de expressão de CDKIs. A proteína p21, codificada pelo gene *CDKN1A*, tem um papel crítico na inibição do ciclo celular, cujos níveis de expressão são baixos em células tumorais (CAZALINI et al., 2010; LEE et al., 2012). Embora a p21 tenha baixa afinidade pelo complexo CDK1-ciclina B, ela inibe a atividade de proteína cinase de CAK, que é responsável por fosforilar a CDK1 em resíduos específicos que deflagram sua ativação (SMITS et al., 2000). Já havia sido demonstrado por Silva et al. (2018) que a substância PQM-162 inibe a abundância de RNAm de *CDKN1A* na linhagem MCF-7. Dessa forma, o perfil de expressão desse gene foi investigado em resposta aos tratamentos com PQM-163 e PQM-164.

Os resultados mostraram que as substâncias PQM-163 e PQM-164 induziram expressivo aumento nos níveis RNAm de *CDKN1A* indicando que o aumento na expressão de p21 pode representar ser crítico para o bloqueio do ciclo induzido por essas substâncias. O principal regulador transcricional de p21 é a proteína p53, embora proteínas homólogas à p53 (p63 e p73) possam modular sua expressão (JUNG; QIAN; CHEN, 2010). BRCA1 pode modular de forma indireta a expressão de p21, uma vez se liga no domínio c-terminal de p53 aumentando sua atividade transcricional (MULLAN; QUINN; HARKIN, 2006). A linhagem MCF-7 é selvagem para *TP53* e, portanto, o bloqueio do ciclo celular pode ter envolvido a participação de p53/p21, contudo estudos adicionais são necessários para elucidar esse aspecto.

Vale ressaltar que as substâncias estudadas também induziram bloqueio no ciclo celular nas linhagens triplo-negativas, as quais apresentam p53 inativa. É fato que a eficiência das substâncias em inibir a progressão do ciclo nas linhagens triplo negativas foi menor em relação à linhagem MCF-7. De qualquer forma, é possível que o bloqueio do ciclo celular, induzido pelas substâncias estudadas, tenha sido

independente de p53 e, portanto, novos estudos são necessários para avaliar quais foram os mecanismos envolvidos na inibição da proliferação em células triplo-negativas.

Tem sido descrito que a hiperativação da via RAF/MEK/ERK está relacionada com aumento na expressão de p21 (ABBAS; DUTTA, 2009; HAWKES et al., 2009). Neste estudo foi observado aumento nos níveis de expressão de ERK fosforilada na linhagem MCF-7 tratada com PQM-162 e Silva et al. (2018) havia mostrado que PQM-162 induz aumento expressivo na abundância relativa de RNAm para p21.

A transição G2/M e progressão por M envolve a atividade das proteínas cinases aurora A, aurora B e PLK-1 (*polo-like kinase 1*) que contribuem para a manutenção da estabilidade genômica ((LIU; SUN; WANG, 2017; MUNDT et al., 1997WEERDT; MEREMA, 2006), PLK-1 regula positivamente o complexo ciclina B1/CDK1 devido a sua capacidade de inibir a Wee1 e ativar CDC25b e CDC25c (GAVET; PINES, 2010; CDC25c (ELIA; CANTLEY; YAPPE, 2003; VUGT; BRÁS; MEDEMA, 2004; DUTERTRE et al., 2004). Além disso, está envolvida com a ativação das auroras A e B (MACUREK et al., 2008; ASTERITI; MATTIA; GUARGUAGLINI, 2013; GOTO et al., 2005; CHU et al., 2010; COLNAGHI; WHEAKEY, 2010; MUSACCHIO, 2015; RAAB et al., 2015; ETEMAD; KOPS, 2016; COMBES et al., 2017), as quais são responsáveis por maturação centrossômica, formação do fuso mitótico bipolar e citocinese. A desregulação no perfil de expressão dessas cinases é observada em muitos tipos de câncer incluindo o câncer de mama (MCCARROL et al., 2015; RAMANI et al., 2015; TUT et al., 2015; ZHANG et al., 2015; WEICHERT et al., 2015), sendo que essas cinases são consideradas importantes alvos terapêuticos.

Estudos mostram que muitos agentes antitumorais reduzem efetivamente os níveis de expressão de PLK-1, aurora A e/ou aurora B. Foi demonstrado que a caleína C, um sesquiterpeno, inibe a progressão de células MCF-7 na fase M devido a sua capacidade de reduzir os níveis de expressão de PLK-1 e aurora B (CALDAS et al., 2018). Modulação no perfil de expressão de auroras e PLK1 foi observada em células de carcinoma hepatocelular em resposta ao tratamento com um análogo de curcumina [(E)-2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-5-((E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl)cyclopentanone] (BHULLAR; JHA; RUPASINGHE, 2015). De modo similar, em estudo prévio, foi observado que PQM-162 reduz a expressão de PLK1 e das auroras A e B na linhagem MCF-7 (FREITAS-SILVA et al., 2018).

Assim sendo, no presente estudo, foi investigado se as substâncias PQM-163 e PQM-164 são capazes de modular o perfil de expressão dessas proteínas cinases na linhagem MCF-7. Os resultados mostraram que os níveis de RNAm de PLK-1, aurora A e aurora B foram significativamente reduzidos em consequência ao tratamento com PQM-163, contudo PQM-164 reduziu apenas os níveis de RNAm de PLK1. Nas condições experimentais testadas, a substância PQM-164 não alterou os níveis de RNAm das auroras A e B. No entanto, é possível que a atividade dessas cinases tenham sido moduladas, uma vez que houve redução na expressão de PLK1 e esta, por sua vez, ativa diretamente as auroras A e B (ASTERITI; MATTIA; GUARGUAGLINI, 2013; COMBES et al., 2017).

De acordo com alguns estudos, há uma relação inversamente proporcional entre os níveis de expressão de aurora A e p21. A aurora A reprime a expressão de p21, de modo que quando aurora A é inibida ocorre aumento substancial na expressão de reguladores negativos do ciclo celular incluindo as proteínas p21 e p27, com consequente acúmulo de células nas fases G₂/M (HUCK et al., 2010; TOMITA; MORI et al., 2010; YANG et al., 2010; WANG et al., 2010). Assim sendo, o expressivo aumento nos níveis de *CDKN1A* evidenciado no presente estudo pode estar associado à redução dos níveis de expressão ou a ativação de aurora A. Aurora A pode também fosforilar p53 em diferentes resíduos, inibindo-a. A fosforilação no resíduo de Ser315 contribui para a rápida degradação de p53 via proteossomo (KATAYAMA et al., 2004), enquanto que a fosforilação no resíduo de Ser215 inibe a ligação de p53 ao DNA, reduzindo a expressão de seus alvos, como por exemplo, p21 e PTEN (LIV et al., 2004). A inibição de aurora A resulta em aumento de p-p53 (Ser15) com bloqueio no ciclo celular (NAIR; HO; SCHWATZ, 2012). Portanto, os dados obtidos neste estudo associados aqueles reportados por FREITAS-SILVA e colaboradores (2018) indicam que PQM-162 e PQM-163 inibem a expressão de PLK1 e aurora A e esse evento pode estar fortemente associado ao aumento de nos níveis de expressão de p21, um alvo conhecido de p53. No entanto, mais experimentos devem ser realizados para comprovar essa hipótese.

Embora já tenha sido demonstrado que a molécula PQM-162 é capaz de induzir morte celular por apoptose na linhagem MCF-7 (FREITAS-SILVA et al., 2018), os mecanismos envolvidos neste processo ainda não foram explorados. Assim, o perfil de expressão de Bax e Bcl-2 em nível de RNAm foi avaliado. Foi demonstrado que

PQM-162, PQM-163 e PQM-164 são capazes de aumentar a razão *Bax/Bcl-2*. A molécula PQM-162 induziu aumento na expressão de *Bax*, ao passo que as moléculas PQM-163 e PQM-164 inibiram a expressão de *Bcl-2*. O aumento no raio *Bax/Bcl-2* é um indicativo de que as substâncias tem atividade pró-apoptótica e que, pelo menos em parte, está relacionada à modulação no perfil de expressão de genes que codificam membros da família *Bcl-2* incluindo fatores pró- e anti-apoptóticos.

A indução de morte celular em células de câncer pode estar diretamente envolvida com a indução da expressão de p21, cujos níveis de expressão foram modulados positivamente frente as substâncias estudadas. O aumento na expressão de p21 está relacionado com a inibição da via JAK/STAT, principalmente com a inibição de STAT1 e STAT3, já que capazes de induzir a expressão de *Bcl-2* (KARIMIAN; AHMAD; YOUSEFI, 2010; SORIA; GOTTIFRIED, 2010). Portanto, a redução na expressão de *Bcl-2*, induzido pelas moléculas PQM-163 e PQM-164, pode estar relacionado com a inibição de STAT1 e STAT3, mediada por p21.

Além de modular a via de sinalização JAK/STAT, p21 também modula negativamente a via de sinalização NF- κ B, resultando na diminuição da expressão de *Bcl-2* e *Bcl-xL* (SORIA; GOTTIFRIED, 2010). Embora haja na literatura relatos onde não só a curcumina (COKER-GURKAN et al., 2018) como o análogo da curcumina BDMC-A (MOHANKUMAR et al., 2015) são capazes de inibir diretamente a via NF- κ B na linhagem MCF-7, nenhum dos estudos avaliaram se esta inibição se dá através do aumento na expressão de p21. Portanto, mais estudos devem ser conduzidos a fim de determinar se as moléculas inibem a expressão de *Bcl-2* por vias dependentes ou independentes de p21.

Além disso, c-myc que é um conhecido fator de transcrição para o gene *Bcl-2* cuja expressão está ligada à ativação da via NF- κ B em células de câncer de mama (AGGARWAL et al., 2005; KUO et al., 2007), e p21 reprime c-myc (WU et al., 2003). Portanto, o aumento de p21 pode, nestas circunstâncias, resultar em diminuição da expressão de *Bcl-2*, como foi observado após o tratamento com PQM-163 e PQM-164.

A expressão aumentada de p21 tem sido correlacionada com aumento na expressão de *Bax* (GARTEL, 2005). Embora as três moléculas estudadas tenham aumentado o perfil de expressão de p21 na linhagem MCF-7, apenas PQM-162 foi

efetiva em aumentar os níveis de RNA de Bax, de modo que o aumento na expressão de Bax induzido por PQM-162 podem ter sido independente de p21.

Redução nos níveis de expressão de aurora A tem sido associada à indução de apoptose em células MCF-7. Foi demonstrado que a inibição de aurora por RNA de interferência e pelo emprego de inibidores sintéticos foi efetiva em induzir apoptose em células MCF-7 com regulação positiva nos níveis de expressão de Bax (ZHANG et al., 2012; LI et al., 2015). Da mesma forma, em células de leucemia, a redução na expressão de aurora A induziu apoptose devido ao aumento de expressão de Bax e, conseqüentemente, na razão Bax/Bcl-2 (HUANG et al., 2008).

Um grande obstáculo para a eficácia terapêutica dos fármacos antitumorais e terapias-alvo é a aquisição de resistência aos fármacos utilizados (DRAGANESCU; CARMOCAN, 2017; SHARMA et al., 2018). Um grande número de trabalhos tem mostrado que a curcumina é capaz de sensibilizar células de câncer de mama resistentes à quimioterapia padrão (LU et al., 2013; XIAO-AI et al., 2017; WEN et al., 2019). Uma vez que a linhagem MCF-7 representa um modelo de estudo de adenocarcinoma ductal invasivo metastático, cujo tratamento clínico envolve o uso da doxorrubicina, desenvolvemos uma linhagem MCF-7 resistente à doxorrubicina (MCF-7^{DXR-R}) para avaliar se as moléculas de estudo são capazes de sensibilizar a linhagem ao fármaco. Na linhagem parental, as moléculas PQM-162 e PQM-163 foram mais ativas. Surpreendentemente, na linhagem MCF-7^{DXR-R}, apenas a molécula PQM-164 foi capaz de sensibilizar as células à doxorrubicina. De modo interessante, na linhagem Hs578t que é naturalmente resistente à doxorrubicina, a molécula PQM-164 foi a mais promissora, indicando que a molécula PQM-164 é promissora e deve ser considerada para ensaios subseqüentes para conhecer os mecanismos de ação relacionados com a sua atividade sobre células resistentes.

Sabe-se que a aquisição de resistência à doxorrubicina ocorre por complexos mecanismos moleculares como a hiperativação da via PI3K/Akt/mTOR (SHAFEI et al., 2017). Xiao-ai et al. (2017) mostraram que a curcumina sensibiliza células da linhagem MCF-7 resistentes à doxorrubicina inativando esta via de sinalização induzindo apoptose. Outra característica marcante de células de câncer de mama resistentes à doxorrubicina é o aumento na expressão da bomba de efluxo ABCB4, que atua removendo a doxorrubicina intracelular, o que reduz a atividade antitumoral do fármaco (PRADOS et al., 2012). Foi demonstrado que a curcumina inibe a

expressão de ABCB4 em linhagens MCF-7 resistentes à doxorrubicina e, dessa forma, contribui para aumentar as concentrações intracelulares desse fármaco (WEN et al., 2019). Este efeito também foi observado em linhagens de cólon resistentes a doxorrubicina (LU et al., 2013). Estudos conduzidos por Meiyanto et al. (2014) mostraram que a curcumina é capaz de reverter a resistência à doxorrubicina em linhagens MCF-7 através da inibição da via de sinalização NF- κ B, além de reduzir a expressão do receptor HER-2, geralmente superexpresso em células resistentes à doxorrubicina.

8 CONCLUSÃO

São conclusões deste trabalho:

- a) As moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 apresentam atividade antiproliferativa sobre as linhagens de câncer de mama, contudo a linhagem MCF-7, positiva para receptor de estrogênio, mostrou-se mais sensível em relação às linhagens triplo-negativas MDA-MB-231.
- b) A atividade antiproliferativa frente as linhagens MCF-7, HS578t e MDA-MB-231 foi associada à capacidade das moléculas em inibir a progressão do ciclo celular na transição G2/M e progressão pela mitose.
- c) Na linhagem MCF-7 o bloqueio no ciclo celular foi associado à modulação no perfil de expressão de reguladores do ciclo celular (p21, PLK-1, aurora A e aurora B);
- d) O aumento expressivo no perfil de expressão de p21 e a redução de PLK1, induzido pelas substâncias PQM-162, PQM-163 e PQM-164 na linhagem MCF-7, parece representar importante mecanismo de ação dessas substâncias; embora PQM-162 e PQM-163 também sejam capazes de modular as auroras cinases.
- e) As moléculas PQM-162, PQM-163 e PQM-164 tem atividade pró-apoptótica frente as linhagens celulares estudadas e, na linhagem MCF-7, está associada a modulação de genes de regulam a apoptose e aumento no raio *Bax/Bcl-2*.
- f) A substância PQM-164 foi capaz de sensibilizar a linhagem MCF-7 resistente a doxorrubina.

REFERÊNCIAS

- ABE, Y. et al. LATS2-Ajuba complex regulates γ -tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. **Febs Letters**, Toquio, v. 580, n. 3, p.782-788, 2006.
- ABBAS, T.; DUTTA, A.. P21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, Charlottesville, v. 9, n. 6, p.400-414, 2009.
- ADAMS, R. R. et al. Essential Roles of drosophilainner centromere protein (Incenp) and Aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. **The Journal Of Cell Biology**, Edinburgo, v. 153, n. 4, p.865-880, 2001.
- AFRICANDER; D.; STORBECK, K.H. Steroid metabolism in breast cancer: where are we and what are we missing? **Molecular and Cellular Endocrinology**. Stellenbosch, v. 466, p. 86-97, 2017.
- AGGARWAL, B.B. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**. Houston, v. 24, p. 2783-2840, 2004.
- AGGARWAL, B. B. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor- B Pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. **Clinical Cancer Research**, Houston, v. 11, n. 20, p.7490-7498, 2005.
- ALI, H R et al. Aurora kinase A outperforms Ki67 as a prognostic marker in ER-positive breast cancer. **British Journal Of Cancer**, Cambridge, v. 106, n. 11, p.1798-1806, 2012.
- ALKHALAF, M. Resveratrol-induced growth inhibition in MDA-MB-231 breast cancer cells is associated with mitogen-activated protein kinase signaling and protein translation. **European Journal of Cancer Prevention**. Safat, v. 16, p. 334-341, 2007.
- ALBRECHT, C.A.M. et al. Mortalidade por câncer de mama em hospital de referência em oncologia, Vitória, ES. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. Vitória, v. 16, n. 3, p. 582-591, 2013.
- ANDO, K. et al. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. **Journal Of Biological Chemistry**, Chiba, v. 279, n. 24, p.25549-25561, 2004.
- ARALDI, I.C.C. et al. The *in vitro* radiosensitizer potential of resveratrol on MCF-7 breast cancer cells. **Chemico-biological interactions**, Santa Maria, v. 282, p. 85-92, 2018.

ASATI, V. et al. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Chhattisgarh, v. 109, p. 314-341, 2016.

ASTERITI, I.A.; MATTIA, F.; GUARGUAGLINI, G. Cross-talk between AURKA and Plk1 in mitotic entry and spindle assembly, **Frontiers In Oncology**, Rennes, v. 5, p.283(1)-283(9), 2015.

AUGUSTO, T.V. et al. Acquired resistance to aromatase inhibitors: where we stand! **Endocrine-related Cancer**, Lisboa, v. 25, n. 5, p. R283-R301, 2018.

AWADHI, A.A.; MURRAY, J.L.; IBRAHIM, N.K. Developing anti-HER2 vaccines: breast cancer experience. **International Journal of Cancer**, Houston, doi: 10.1002/ijc.31551, 2018.

AZIZ, M.T.A. et al. The effect of a novel curcumin derivative on pancreatic islet regeneration in experimental type-1 diabetes in rats (long term study). **Diabetology and Metabolic Syndrome**, Cairo, v. 5, p. 75, 2013.

BAGLIA, M.L. et al. Alcohol, smoking, and risk of her2-overexpressing and triple-negative breast cancer relative to estrogen receptor-positive breast cancer. **International Journal of Cancer**, Seattle, doi: 10.1002/ijc.31575, 2018.

BAVETSIAS, V.; LINARDOPOULOS, S. aurora kinase inhibitors: current status and outlook. **Frontiers In Oncology**, Londres, v. 5, p.278-288, 2015.

BELEKOUZOU, A. et al. Epidemiology of breast cancer: retrospective study in the central african republic. **BMC Public Health**, Cidade de Huan, v. 16, p. 1230, 2016.

BERDNIK, D.; KNOBLICH, J.A. Drosophila aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. **Current Biology**, Viena, v. 12, n. 8, p.640-647, 2002.

BERRAK, O. et al. The inhibition of PI3K and NFkB promoted curcumin-induced cell cycle arrest at G2/M via altering polyamine metabolism in Bcl-2 overexpressing MCF-7 breast cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Istambul, v. 77, p1 150-160, 2016.

BIRD, A.W.; HYMAN, A.A. Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. **The Journal Of Cell Biology**, Dresden, v. 182, n. 2, p.289-300, 2008.

BISCHOFF, J. R. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. **The Embo Journal**, Redwood City, v. 17, n. 11, p.3052-3065, 1998.

BOLANOS-GARCIA, V.M. Aurora kinases. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, Cambridge, v. 37, n. 8, p.1572-1577, 2005.

BONILLA, J.A.M.; TABANERA, M.T.; MENDOZA, M.H.R. El cáncer de mama en el siglo xxi: de la detección precoz a los nuevos tratamientos. **Radiología**, Burgos, v. 59, n. 5, p. 368-379, 2017.

BOONYARATANAKORNKIT, V. et al. Extranuclear signaling by sex steroid receptors and clinical implications in breast cancer. **Molecular and Celular Endocrinology**, Bangkok, v. 466, p. 51-72, 2018.

BHOWMICK, N.A.; NEILSON, E.G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, Nashville, v. 432, n. 7015, p. 332-337, 2004.

BRASSESCO, M.S. et al. PLK1 Inhibition Radiosensitizes Breast Cancer Cells, but Shows Low Efficacy as Monotherapy or in Combination with other Cytotoxic Drugs. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 9, p.1252-1257, 2019.

BRIASSOULI, P. et al. Aurora-A regulation of nuclear factor- B signaling by phosphorylation of i.b. **Cancer Research**, Londres, v. 67, n. 4, p.1689-1695, 2007.

BRUFISKY, A.M.; DICKLER, M.N. Estrogen receptor-positive breast cancer: exploiting signalin pathways implicated in endocrine resistance. **The oncologist**, Nova lorque, v. 23, n. 5, p. 528-539, 2018.

BUROTTO, M. et al. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. **Cancer**, Bethesda, v. 120, n. 22, p. 3446-3456, 2014.

BURUM-AUENSEN, E. et al. Subcellular localization of the spindle proteins aurora A, Mad2, and BUBR1 assessed by immunohistochemistry. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, Oslo, v. 55, n. 5, p.477-486, 2007.

CAO, L. et al. Curcumin inhibits H2O2-induced invasion and migration of human pancreatic cancer via suppression of the ERK/NF-κB pathway. **Oncology Reports**, Xian Jiaotong, v. 36, p. 2245-2251, 2016.

CARMENA, M.; EARNSHAW, W.C. The cellular geography of aurora kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Edinburgo, v. 4, n. 11, p.842-854, 2003.

CARMENA, M. et al. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Carmena, v. 13, n. 12, p.789-803, 2012.

CARTER, L.G.; D'ORAZIO, J.A.; PEARSON, K.J. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. **Endocrine-related Cancer**, Lexington, v. 21; p. R209-R225, 2014.

CASTRO, A. et al. APC/fizzy-related targets aurora-A kinase for proteolysis. **Embo Reports**, Montpellier, v. 3, n. 5, p.457-462, 2002.

CAZALES, M. et al. CDC25B phosphorylation by aurora A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. **Cell Cycle**, Toulouse, v. 4, n. 9, p.1233-1238, 23 jun. 2005.

CAZZALINI, O. et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, Pavia, v. 704, n. 1-3, p.12-20, 2010.

CHARRIER-SAVOURNIN, F.B. et al. P21-mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. **Molecular Biology Of The Cell**, Montpellier, v. 15, n. 9, p.3965-3976, 2004

CHEFETZ, Ilana et al. Inhibition of Aurora-A kinase induces cell cycle arrest in epithelial ovarian cancer stem cells by affecting NFκB pathway. **Cell Cycle**, New Haven, v. 10, n. 13, p.2206-2214, 2011.

CHEN, S. Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. **The Embo Journal**, Taipei, v. 21, n. 17, p.4491-4499, 2002.

CHEN, H. et al. MEK/ERK signaling pathway in apoptosis of SW620 cell line and inhibition effect of resveratrol. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Provincia de Hubei, v. 9, n. 1, p. 49–53, 2016.

CHEN, J.M.; BAI, J.Y.; YANG, K.X. Effect of resveratrol on doxorubicin resistance in breast neoplasm cells by modulating PI3K/Akt signaling pathway. **IUBMB Life**, Yunnan, 2018.

CHEN, W. et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014. **Chinese Journal of Cancer Research**, Pequim, v. 30, n. 1, p. 1-12, 2018.

CHEN, X. et al. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. **Oncogene**. Maryland, v. 20, p. 6073-6083, 2001;

CHENG, N. et al. TGF-β signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Molecular Cancer Research**, Nashville, v. 6, n. 10, p. 1521-1533, 2008.

CHIN, Y.T. et al. Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells *in vitro*. **Oncotarget**, Taipei, v. 5, n. 24, p. 12891-12907; 2014.

COKER-GURKAN, A. et al. Curcumin inhibits autocrine growth hormone-mediated invasion and metastasis by targeting NF-κB signaling and polyamine metabolism in breast cancer cells. **Amino Acids**, Istanbul, v. 50, n. 8, p.1045-1069, 2018.

COSTA, R.L.B.; HAN, H.S.; GRADISHAR, W.J. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. **Breast Cancer Research and Treatment**, Tampa, v. 169, n. 3, p. 397-406, 2018.

CHOI, W. et al. Role of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) in cell proliferation and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21WAF/CDKN1A) gene repression. **Journal Of Biological Chemistry**, Seoul, v. 289, n. 27, p.18625-18640, 2014.

CHOU, T.C. theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, Nova lorque, v. 58, n. 3, p.621-681, 2006.

CHOU, T.C. Preclinical versus clinical drug combination studies. **Leukemia & Lymphoma**, Nova lorque, v. 49, n. 11, p.2059-2080, 2008.

CHOU, T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. **Cancer Research**, Nova lorque, v. 70, n. 2, p.440-446, 2010.

CHU, Y. et al. Aurora B kinase activation requires survivin priming phosphorylation by PLK1. **Journal Of Molecular Cell Biology**, Hefei, v. 3, n. 4, p.260-267, 2010.

COLNAGHI, R.; WHEATLEY, S.P. Liaisons between survivin and Plk1 during cell division and cell death. **Journal Of Biological Chemistry**, Brighton, v. 285, n. 29, p.22592-22604, 2010.

COMBES, G et al. Playing polo during mitosis: PLK1 takes the lead. **Oncogene**, Quebec, v. 36, n. 34, p.4819-4827, 2017.

CONTE, N. et al. TACC1–chTOG–Aurora A protein complex in breast cancer. **Oncogene**, Marselha, v. 22, n. 50, p.8102-8116, 2003.

CRUZ, A.C.T.; JARQUÍN, J.O.R. Mechanisms that increase stability of estrogen receptor alpha in breast cancer. **Clinical Breast Cancer**. Cidade do México, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2017.

DAS, K. et al. Aurora-A expression, hormone receptor status and clinical outcome in hormone related cancers. **Pathology**, Singapura, v. 42, n. 6, p.540-546, 2010.

DASH, B. C.; EL-DEIRY, W. S.. Phosphorylation of p21 in G2/M promotes Cyclin B-Cdc2 kinase activity. **Molecular And Cellular Biology**, Nova lorque, v. 25, n. 8, p.3364-3387, 2005.

DE AMICIS, F. et al. Resveratrol, through NF- κ B/p53/Sin3/HDAC1 complex phosphorylation, inhibits estrogen receptor-gene expression *via* p38 MAPK/CK2 signaling in human breast cancer cells. **The FASEB Journal**, Arcavacata di Rende, v. 25, p. 3695-3707, 2011.

DE LUCA, A. et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, Naples, v. 16, suplemento 2, p. S17-S27, 2012.

DEEKS, E.M. Fulvestrant: A review in advanced breast cancer not previously treated with endocrine therapy. **Drugs**, Auckland, v. 78, p. 131-137, 2018.

DESANTIS, C.E. et al. Cancer statistics for african americans, 2016: progress and opportunities in reducing racial disparities. **A Cancer Journal for clinicians**, Atlanta, v. 66, n. 4, p. 290-308, 2016.

DEWAR, H. et al. Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. **Nature**, Dundee, v. 428, n. 6978, p.93-97, 2004.

DHANASEKARAN, N.; REDDY, E.P. Signaling by dual specificity kinases. **Oncogene**, Filadélfia, v. 17, p. 1447-1455, 1998.

DRAGANESCU, M.; CARMOCAN, C. Hormone therapy and breast cancer. **Chirurgia**, Bucureste, v. 112, n. 4, p. 413-417, 2017.

DOCK, A.E.; GERLICH, D.W. Kinetic framework of spindle assembly checkpoint signalling. **Nature Cell Biology**, Zurique, v. 15, n. 11, p.1370-1377, 2013.

DU, J.; HANNON, G.J. Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, Nova lorque, v. 101, n. 24, p.8975-8980, 2004.

DUTERTRE, S.; DESCAMPS, S.; PRIGENT, C. On the role of aurora-A in centrosome function. **Oncogene**, Rennes, v. 21, n. 40, p.6175-6183, 2002.

DUTERTRE, S. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. **Journal Of Cell Science**, Rennes, v. 117, n. 12, p.2523-2531, 2004.

DUTTO, I. et al. Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. **Archives Of Toxicology**, Pavia, v. 89, n. 2, p.155-178, 2014.

ELIA, A. E. H. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. **Science**, Boston, v. 299, n. 5610, p.1228-1231, 2003.

ESKILER, G.G. et al. Triple negative breast cancer: new therapeutic approaches and BRCA status. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, Sakarya, v. 126, p. 371-379, 2018.

ESMATABADI, M.J.D. et al. Up-regulation of miR-21 decreases chemotherapeutic effect of dendrosomal curcumin in breast cancer cells. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Teerã, v. 20, p. 350-359, 2017.

ETEMAD, B.; KOPS, G. J. Attachment issues: kinetochore transformations and spindle checkpoint silencing. **Current Opinion In Cell Biology**, Utrecht, v. 39, p.101-108, 2016.

EYERS, P. A. et al. A novel mechanism for activation of the protein kinase aurora A. **Current Biology**, Denver, v. 13, n. 8, p.691-697, 2003.

EYERS, P.A.; MALLER, J.L. Regulation of xenopus aurora A activation by TPX2. **Journal Of Biological Chemistry**, Denver, v. 279, n. 10, p.9008-9015, 2003.

FENG, T. et al. Liposomal curcumin and its application in cancer. **International Journal of Nanomedicine**, Sichuan, v. 12, p. 6028-6044, 2017.

FLOYD, S.; PINES, J.; LINDON, C. APC/CCdh1 targets aurora kinase to control reorganization of the mitotic spindle at anaphase. **Current Biology**, Cambridge, v. 18, n. 21, p.1649-1658, 2008.

FRANKEN, N.A.P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, Amsterdã, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

FRUMAN, D. A.; MEYERS, R. E.; CANTLEY, L. C. Phosphoinositide kinases. **Annual Review Of Biochemistry**, Boston, v. 67, n. 1, p. 481-507, 1998.

GARTEL, A.L. The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. **Leukemia Research**, Chicago, v. 29, n. 11, p.1237-1238, 2005.

GASSMANN, R. et al. Borealin. **The Journal Of Cell Biology**, Edinburgo, v. 166, n. 2, p.179-191, 2004.

GAVET, O.; PINES, J. Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. **The Journal Of Cell Biology**, Cambridge, v. 189, n. 2, p.247-259, 2010.

GAVRIILIDIS, P.; GIAKOUSTIDIS, A.; GIAKOUSTIDIS, D. aurora kinases and potential medical applications of aurora kinase inhibitors: a review. **Journal Of Clinical Medicine Research**, Thessaloniki, v. 7, n. 10, p.742-751, 2015.

GIET, R. et al. The xenopus laevis aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XI Eg5. **Journal Of Biological Chemistry**, Rennes, v. 274, n. 21, p.15005-15013, 1999.

GIET, R.; GLOVER, D.M. Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. **The Journal Of Cell Biology**, Cambridge, v. 152, n. 4, p.669-682, 2001.

GIET, R.; PETRETTI, C.; PRIGENT, C.. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? **Trends In Cell Biology**, Rennes, v. 15, n. 5, p.241-250, 2005.

GIET, R. et al. Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. **The Journal Of Cell Biology**, Cambridge, v. 156, n. 3, p.437-451, 2002.

GILLIS, L.D. et al. P21Cip1/WAF1 mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage. **Cell Cycle**, Nova Escócia, v. 8, n. 2, p.253-256, 2009.

GLOVER, D. M et al. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. **Cell**, Dundee, v. 81, n. 1, p.95-105, 1995.

GOLDBERG, D.M; YAN, J.; SOLEAS, G.J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v.36, p. 79-87, 2003.

GORGUN, G. et al. A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. **Blood**, Boston, v. 115, n. 25, p.5202-5213, 2010.

GOTO, H. et al. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. **Genes To Cells**, Kawaguchi, v. 7, n. 1, p.11-17, 2002.

GOTO, H. et al. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. **Journal Of Biological Chemistry**, Nagoia, v. 278, n. 10, p.8526-8530, 2002.

GOTO, H. et al. Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase–anaphase transition. **Nature Cell Biology**, Nagoia, v. 8, n. 2, p.180-187, 2005.

GRAY, P.J. et al. Identification of human polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, Tucson, v. 3, n. 5, p. 641-646, 2004.

GREWE, M. et al. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. **Cancer Research**, Ulm, v. 59, p. 3581-3587, 1999.

GUAN, Z. et al. Aurora-A, a negative prognostic marker, increases migration and decreases radiosensitivity in cancer cells. **Cancer Research**, Guangzhou, v. 67, n. 21, p.10436-10444, 2007.

GUAM, F. et al. Curcumin suppresses proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through autophagy-dependent Akt degradation. **Plos One**, Wuham, v. 11, n. 1, artigo e0146553, 2016.

GUISADO, E.P. et al. Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor α -dependent mechanism: Relevance in cell proliferation. **International Journal Of Cancer**, Badajoz, v. 109, n. 2, p. 167-173, 2003.

HALDOSÉN, L.A.; ZHAO, C.; WRIGHT, K.D. Estrogen receptor beta in breast cancer. **Molecular and Celular Endocrinology**, Huddinge, v.382, p. 665-672, 2014.

HAMER, P. C. et al. WEE1 Kinase Targeting Combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe. **Clinical Cancer Research**, Amsterdam, v. 17, n. 13, p.4200-4207, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Lausanne, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANNAK, E. et al. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. **The Journal Of Cell Biology**, Dresden, v. 155, n. 7, p.1109-1116, 2001.

HARTMAN, J. et al. tumor repressive functions of estrogen receptor β in SW480 colon cancer cells. **Cancer Research**, Huddinge, v. 69, n. 15, p. 6000-6106, 2009.

HARPER, J.W. et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. **Molecular Biology Of The Cell**, Houston, v. 6, n. 4, p.387-400, 1995.

HARPER, J. W. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. **Genes & Development**, New Haven, v. 16, n. 17, p.2179-2206, 2002.

HATFIELD, D.L. et al. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. **Trends In Biochemical Sciences**, Bethesda, v. 39, n. 3, p.112-120, 2014.

HAWKES, W.C. et al. Selenoprotein modulates control of cell cycle entry. **Biological Trace Element Research**, Davis, v. 131, n. 3, p.229-244, 2009.

HAWKES, Wayne Chris; ALKAN, Zeynep. Delayed cell cycle progression from SEPW1 depletion is p53- and p21-dependent in MCF-7 breast cancer cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Davis, v. 413, n. 1, p.36-40, 2011.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes & Development**, Chicago, v. 18, n. 16, p. 1926-1945, 2004.

HELGUERO, L.A. et al Estrogen receptors alfa (ER α) and beta (ER β) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. **Oncogene**, Huddinge, v. 24, p. 6605-6616, 2005.

HILTON, H.N.; CLARCKE, C.L.; GRAHAM, J.D. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Westmead, v. 466, p. 2-14, 2018.

HONMA, N. et al. Clinical importance of estrogen receptor- β evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. **Journal of Clinical Oncology**, Tokyo, v. 26, n. 22, p. 3727-3734, 2008.

HUSSAIN, A.R. et al. Cross-talk between NF- κ B and the PI3-Kinase/AKT pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for efficient apoptosis. **Plos One**, Riyadh, v. 7, n. 6, p. e39945, 2012.

HYDBRING, P.; MALUMBRES, M.; SICINSKI, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Boston, v. 17, n. 5, p.280-292, 2016.

HSU, J. et al. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. **Cell**, Dallas, v. 102, n. 3, p.279-291, 2000.

HU, S. et al. Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. **Experimental And Therapeutic Medicine**, Shaoxing, p.1266-1272, 2018.

HUCK, J. J. et al. MLN8054, an Inhibitor of Aurora A Kinase, induces senescence in human tumor cells both in vitro and in vivo. **Molecular Cancer Research**, Cambridge, v. 8, n. 3, p.373-384, 2010.

HUANG, X. et al. Aurora kinase inhibitory VX-680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in aurora-A-high acute myeloid leukemia. **Blood**, Guangzhou, v. 111, n. 5, p.2854-2865, 2007.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa, 2018. Rio de Janeiro, 126p, 2018.

IRANNEJAD, V.S. et al. Metformin enhances doxorubicin sensitivity via inhibition of doxorubicin efflux in P-gp- overexpressing MCF-7 cells. **Chemical Biology and Drug Design**, Tabriz, v. 91, p. 269-276, 2017.

JIA, T. et al. The differential susceptibilities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to the cytotoxic effects of curcumin are associated with the PI3K/Akt-SKP2-Cip/Kips pathway. **Cancer Cell International**, Shanghai, v. 14, n. 1, p. 2-14, 2014.

JIA, X. et al. Reproductive factors and hormone receptor status among very young (<35 years) breast cancer patients. **Oncotarget**, Shanghai, 10 pages, 2015.

JIANG, M. et al. curcumin induces cell death and restores tamoxifen sensitivity in the antiestrogen-resistant breast cancer cell lines MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9. **Molecules**, Shanghai, v. 18, n. 1, p.701-720, 2013.

JIANG, Shoulei et al. Estrogen-induced aurora kinase-A (AURKA) Gene Expression is Activated by GATA-3 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. **Hormones And Cancer**, Houston, v. 1, n. 1, p.11-20, 2010.

JUNG, Y.; QIAN, Y.; CHEN, X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. **Cellular Signalling**, California, v. 22, n. 7, p.1003-1012, 2010.

KANG, N. et al. Tetrahydrocurcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis involving p38 MAPK activation in human breast cancer cells. **Food And Chemical Toxicology**, Tianjin, v. 67, p.193-200, 2014.

KANG, S.S. et a. Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF-kB. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, West Lafayette, v. 17, p. 1044-1054, 2009.

KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **Dna Repair**, Tabriz, v. 42, p.63-71, 2016.

KATAYAMA, H. et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. **Nature Genetics**, Houston, v. 36, n. 1, p.55-62, 2003.

KATAYAMA, H. et al. Aurora kinase-A regulates kinetochore/chromatin associated microtubule assembly in human cells. **Cell Cycle**, Houston, v. 7, n. 17, p.2691-2704, 2008.

KATSHA, A. et al. Aurora kinase A promotes inflammation and tumorigenesis in mice and human gastric neoplasia. **Gastroenterology**, Nashville, v. 145, n. 6, p.1312-1322, 2013.

KE, C. et al. Curcumin-induced Aurora-A suppression not only causes mitotic defect and cell cycle arrest but also alters chemosensitivity to anticancer drugs. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, Taipei, v. 25, n. 5, p.526-539, 2014.

KEMP, C. et al. Centrosome maturation and duplication in *C. elegans* require the coiled-coil protein SPD-2. **Developmental Cell**, Bethesda, v. 6, n. 4, p.511-523, 2004.

KIM, T.H. et al. Resveratrol enhances chemosensitivity of doxorubicin in multidrug-resistant human breast cancer cells via increased cellular influx of doxorubicin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Busan, v. 1840, p. 615-625, 2014.

KIM, Y.N et al. Resveratrol suppresses breast cancer cell invasion by inactivating a RhoA/YAP signaling axis. **Experimental and Molecular Medicine**, Daejeon, v. 49, p. e296-e302, 2017.

KIM, Y.D. et al. Fibronectin expression is up-regulated by PI-3K/Akt activation in tamoxifen-resistant breast cancer cells. **BMB reports**, Seoul, BMB-17-096, 2017.

KISKOVA, T. et al. Nocturnal resveratrol administration inhibits chemically induced breast cancer formation in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Viena, v. 68, n. 6, p. 867-875, 2017.

KRYSTYNIAK, et al. Inhibition of aurora A in response to DNA damage. **Oncogene**, Zurich, v. 25, n. 3, p.338-348, 2005.

KUO, P. et al. Rugosin E, an ellagitannin, inhibits MDA-MB-231 human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis by inhibiting nuclear factor- κ B signaling pathway. **Cancer Letters**, Tainan, v. 248, n. 2, p.280-291, 2007.

KUFER, T.A. et al. Human TPX2 is required for targeting aurora-A kinase to the spindle. **The Journal Of Cell Biology**, Martinsried, v. 158, n. 4, p.617-623, 2002.

KUMAR, P. et al. Curcumin as a adjuvant to breast cancer treatment. **Anticancer Agents**, Rajasthan, v. 15, n. 5, p. 647-656, 2015.

KUMAR, C.C.; MADISON, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. **Oncogene**, Kenilworth, v. 24, p. 7493-7501, 2005.

LEE, Y.K. et al. Anthocyanins are novel AMPK-1 stimulators that suppress tumor growth by inhibiting mTOR phosphorylation. **Oncology Reports**, Daejeon, v. 24, p. 1471–1477, 2010.

LEE, H. H. et al. Downregulation of Aurora-A overrides estrogen-mediated growth and chemoresistance in breast cancer cells. **Endocrine Related Cancer**, Singapore, v. 15, n. 3, p.765-775, 2008.

LEE, J. et al. DNA Damage Triggers p21WAF1-dependent Emi1 down-regulation that maintains G2 arrest. **Molecular Biology Of The Cell**, Grenoble, v. 20, n. 7, p.1891-1902, 2009.

LENS, S.M.A.; VOEST, E.E.; MEDEMA, R.H. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. **Nature Reviews Cancer**, Stratum, v. 10, n. 12, p.825-841, 2010.

LENA, R.F. et al. Decoding polo-like kinase 1 signaling along the kinetochore–centromere axis. **Nature Chemical Biology**, Madison, v. 12, n. 6, p.411-418, 2016.

LEUNG, E.Y. et al. Endocrine therapy of estrogen receptor-positive breast cancer cells: early differential effects on stem cell markers. **Frontiers in Oncology**, Lyon, v. 7, n. 184, 10p., 2017.

LI, C. et al. Aurora-A overexpression in mouse liver causes p53-dependent premitotic arrest during liver regeneration. **Molecular Cancer Research**, Yang Ming, v. 7, n. 5, p.678-688, 2009.

LI, F. et al. Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery? **Expert Opinion On Drug Discovery**, Detroit, v. 14, n. 5, p.417-420, 2019.

LI, J.P. et al. The investigational aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells. **Drug Design, Development And Therapy**, Ningxia, p.1627-1652, 2015.

LIANG, J.; SLINGERLAND, J.M. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. **Cell Cycle**, Ontario, v. 2, n. 4, p. 339-345, 2003.

LIEN, E.C.; DIBBLE, C.C.; TOKER, A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. **Current Opinion In Cell Biology**, Boston, v. 45, p. 62-71, 2017.

- LITTLEPAGE, L. E. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. **Genes & Development**, Boston, v. 16, n. 17, p.2274-2285, 2002.
- LIN, Y. et al. Specific drug delivery efficiently induced human breast tumor regression using a lipoplex by non-covalent association with anti-tumor antibodies. **Journal Of Nanobiotechnology**, Taipei, v. 17, n. 1, p.1-11, 2019.
- LIU, D.; DAVYDENKO, O.; LAMPSON, M.A. Polo-like kinase-1 regulates kinetochore–microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing. **The Journal Of Cell Biology**, Filadélfia, v. 198, n. 4, p.491-499, 2012.
- LIU, X. Molecular interactions of Polo-like-kinase 1 with the mitotic kinesin-like protein CHO1/MKLP-1. **Journal Of Cell Science**, Cambridge, v. 117, n. 15, p.3233-3246, 2004.
- LIU, Q. et al. Aurora-A Abrogation of p53 DNA Binding and Transactivation Activity by Phosphorylation of Serine 215. **Journal Of Biological Chemistry**, Tampa, v. 279, n. 50, p.52175-52182, 2004.
- LIU, Q.; RUDERMAN, J. V. Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, Guangzhou, v. 103, n. 15, p.5811-5816, 2006.
- LIU, Z.; SUN, Q.; WANG, X.. PLK1, A Potential target for cancer therapy. **Translational Oncology**, Nanjing, v. 10, n. 1, p.22-32, 2017.
- LIU, Q. et al. Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation of NFκB, cyclin D and MMP-1 transcription. **Phytomedicine**, Pokfulam, v. 16, n. 10, p. 916-922, 2009.
- LU, W. et al. Effect of curcumin on human colon cancer multidrug resistance in vitro and in vivo. **Clinics**, Chongqing, v. 68, n. 5, p.694-701, 2013.
- LUMACHI, F; SANTEUFEMIA, D.A.; BASSO, S.M.M. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. **World J Biol Chem**, Pandova, p. 26; v. 6, n. 3, p. 231-239, 2015.
- LYONS, T.G.; DICKLER, M.N.; COMEN, E.E. Checkpoint inhibitors in the treatment of breast cancer. **Current Oncology Reports**, Nova lorque, v. 20, n. 51, 2018.
- MACŃREK, L. et al. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. **Nature**, Utrecht, v. 455, n. 7209, p.119-123, 2008.
- MAHEN, R.; VENKITARAMAN, A.R. Pattern formation in centrosome assembly. **Current Opinion In Cell Biology**, Cambridge, v. 24, n. 1, p.14-23, 2012.
- MANDALAPU, D. et al. Synthesis and biological evaluation of some novel triazole hybrids of curcumin mimics and their selective anticancer activity against breast and

prostate cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Uttar Pradesh, v. 26, p. 4223–4232, 2016.

MANSOURI, S. et al. Estrogen can restore Tamoxifen sensitivity in breast cancer cells amidst the complex network of resistance. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, V.93, p. 1320-1325; 2017.

MAPOUNG, S. et al. Chemosensitizing effects of synthetic curcumin analogs on human multi-drug resistance leukemic cells. **Chemico-Biological Interactions**, Chiang Mei, v. 244, p. 140-148, 2016.

MAROTTI, J. et al. Estrogen receptor- β expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the nurses health study. **Modern Pathology**, Boston, v. 23, n. 2, p. 197-204, 2010.

MARUMOTO, T. et al. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. **Genes To Cells**, Kumamoto, v. 7, n. 11, p.1173-1182, 2002.

MARUMOTO, T et al. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in hela cells. **Journal Of Biological Chemistry**, Kumamoto, v. 278, n. 51, p.51786-51795, 2003.

MASUELLI, L. et al. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cell lines and delays the growth of mammary tumors in neu transgenic mice. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, Roma, v. 27, n. 1, p. 105-119, 2013.

MAZZERA, L. et al. Aurora and IKK kinases cooperatively interact to protect multiple myeloma cells from Apo2L/TRAIL. **Blood**, Parma, v. 122, n. 15, p.2641-2653, 2013.

MCCARROLL, J.A. et al. Therapeutic targeting of polo-like kinase 1 using RNA-interfering nanoparticles (iNOPs) for the treatment of non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, Randwick, v. 6, n. 14, p.12020-12034, 2014.

MCKENZIE, L. et al. P53-dependent repression of polo-like kinase-1 (PLK1). **Cell Cycle**, Dundee, v. 9, n. 20, p.4200-4212, 2010.

MEDINA-AGUILAR, R. et al. Resveratrol inhibits cell cycle progression by targeting aurora kinase A and polo-like kinase 1 in breast cancer cells. **Oncology Reports**, Cidade do México, v. 35, n. 6, p.3696-3704, 2016.

MEENA, R. et al. PLGA-CTAB curcumin nanoparticles: fabrication, characterization and molecular basis of anticancer activity in triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231 cells). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Nova Déli, v. 94, p. 944–954, 2017.

MEHTA, K. et al. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast cancer cell lines. **Anti-cancer drugs**, Texas, v. 8, p. 470-481, 1997.

MEMMOTT, R.M.; DENNIS, P.A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. **Cellular Signalling**, Bethesda, v. 21, n. 5, p. 656-664, 2009.

MEYANTO, E. et al. Curcumin and its analogues (PGV-0 and PGV-1) enhance sensitivity of resistant MCF-7 cells to doxorubicin through inhibition of HER2 and NF- κ B activation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Nara, v. 15, n. 1, p. 179-184, 2014.

MEYERS, E. et al. Inverse relationship between ER- β and SRC-1 predicts outcome in endocrine-resistant breast cancer. **British Journal of Cancer**, Dublin, v. 91, p. 1687-1693, 2004.

MILLER; K.D. et al. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2016. **A Cancer Journal For Clinicians**, Atlanta, v. 66, p. 271-289, 2016.

MILLS, J.N.; RUTKOVSKY, A.C.; GIORDANO, A. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. **Current Opinion in Pharmacology**, Charleston, v. 41, p. 59-65, 2018.

MINOSHIMA, Y. et al. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. **Developmental Cell**, Toquio, v. 4, n. 4, p.549-560, 2003.

MO, N. et al. Curcumin inhibits TGF- β 1-induced MMP-9 and invasion through ERK and Smad signaling in breast cancer MDA-MB-231 cells. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, Pequim, v. 13, n. 11, p. 5709-5714, 2012.

MOCK, C.D.; JORDAN, B.C.; SELVAM, C. Recent advances of curcumin and its analogues in breast cancer prevention and treatment. **Rsc Advances**, Houston, v. 5, n. 92, p. 75575-75588, 2015.

MOGHTADERI, H.; SEPEHRI, H.; ATTARI, F. Combination of arabinogalactan and curcumin induces apoptosis in breast cancer cells in vitro and inhibits tumor growth via overexpression of p53 level in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Teerã, v. 88, p. 582–594, 2017.

MOHANKUMAR, K. et al. Mechanism of apoptotic induction in human breast cancer cell, MCF-7, by an analog of curcumin in comparison with curcumin – An in vitro and in silico approach. **Chemico-Biological Interactions**, Puducherry, v. 210, p. 51–63, 2014.

MOHANKUMAR, K. et al. BDMC-A, an analog of curcumin, inhibits markers of invasion, angiogenesis, and metastasis in breast cancer cells via NF- κ B pathway—A comparative study with curcumin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Puducherry, v. 74, p.178-186, 2015.

MORI, D. et al. NDEL1 Phosphorylation by Aurora-A Kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. **Molecular And Cellular Biology**, Osaka, v. 27, n. 1, p.352-367, 2006.

MUNDT, K. et al. On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Epalinges, v. 239, n. 2, p.377-385, 1997.

MUSACCHIO, A. The molecular biology of spindle assembly checkpoint signaling dynamics. **Current Biology**, Essen, v. 25, n. 20, p.1002-1018, 2015.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R.E. Clonogenic Cell Survival Assay. **Methods in Molecular Medicine**, Totowa, vol. 110: Chemosensitivity: Vol. 1: In Vitro Assays, p. 21-28, 2005.

MURIAS, M. et al. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure–activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Viena, v. 12, p. 5571–5578, 2004.

NAGAPRASHANTHA, L.D. et al. Translational opportunities for broad-spectrum natural phytochemicals and targeted agent combinations in breast cancer. **International Journal of Cancer**, Duarte, v. 142, p. 658-670, 2017.

NAIR, J.S.; HO, A.L.; SCHWARTZ, G.K. The induction of polyploidy or apoptosis by the Aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. **Cell Cycle**, Nova Iorque, v. 11, n. 4, p.807-817, 2012.

NAITO, M. et al. Promyelocytic leukemia zinc finger mediates glucocorticoid-induced cell cycle arrest in the chondroprogenitor cell line ATDC5. **Molecular And Cellular Endocrinology**, Toquio, v. 417, p.114-123, 2015.

NADLER, Y. et al. Expression of aurora A (but Not aurora B) is predictive of survival in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, New Haven, v. 14, n. 14, p.4455-4462, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**, Wayne, v. 79, n. 3, p.629-661, 2016.

NGUYEN, T.H. et al. ERK1/2 activation is required for resveratrol-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells. **International Journal Of Oncology**, Singapura, v. 33, p.81-92, 2008.

NIKONOVA, Anna S. et al. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. **Cellular And Molecular Life Sciences**, Filadélfia, v. 70, n. 4, p.661-687, 2012.

PALAZZO, R.E. et al. Centrosome maturation. **Current Topics In Developmental Biology**, Lawrence, p.449-470, 2000.

PARUTIYIL, S. et al. Estrogen receptor β inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. **Cancer Research**, California, v. 64, p. 423-428, 2004.

PETERS, J.M. The Anaphase-promoting complex. **Molecular Cell**, Viena, v. 9, n. 5, p.931-943, 2002.

PORTIER, N. et al. A Microtubule-independent role for centrosomes and aurora a in nuclear envelope breakdown. **Developmental Cell**, La Jolla, v. 12, n. 4, p.515-529, 2007.

PRADOS, J. et al. Doxorubicin-loaded nanoparticles: new advances in breast cancer therapy. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, Granada, v. 12, n. 9, p.1058-1070, 2012.

OSBORNE, C.K., SCHIFF, R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. **Annual Review of Medicine**, Houston, v. 62, p. 233-247, 2011.

OSMAN, A.M.M. et al. Chemosensitizing and cardioprotective effects of resveratrol in doxorubicin- treated animals. **Cancer Cell International**, Jeddah, v. 13, n. 52, 2013.

PANDOLFI, L. et al. H-ferritin enriches the curcumin uptake and improves the therapeutic efficacy in triple negative breast cancer cells. **Biomacromolecules**, Milão, v. 18, n. 10, p. 3318-3330, 2017.

PANGENI, R. et al. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, Nova Déli, v. 10, p. 18, p. 1285-1298, 2014.

PEREIRA, M.C. et al. Evaluation of the effects of aminonaphthoquinone derivatives in combination with curcumin against ER-positive breast cancer and related tumours. **Anticancer Research**, Porto Elizabeth, v. 37, p. 6749-6759, 2017.

PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. **Frontiers In Oncology**, Pavia, v. 4, p. 1-11, 2014.

PRASAD, S.; TYAGI, A.K., AGGARWAL, B.B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. **Cancer Research Treatment**, Houston, v. 46, n. 1, p. 2-18, 2014.

PULLIKUTH, A.K.; CATLING, A.D. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: A perspective. **Cellular Signalling**, Nova Orleans, v. 19, n. 8, p. 1621-1632, 2007.

PUTRI, H. et al. Combination of potassium pentagamavunon-0 and doxorubicin induces apoptosis and cell cycle arrest and inhibits metastasis in breast cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Gadjah Mada, v. 17, n. 5, p. 2683-2688, 2016.

QIN, L. et al. Aurora-A interacts with Cyclin B1 and enhances its stability. **Cancer Letters**, Pequim, v. 275, n. 1, p.77-85, 2009.

RAAB, M. et al. Mitotic arrest and slippage induced by pharmacological inhibition of polo-like kinase 1. **Molecular Oncology**, Frankfurt, v. 9, n. 1, p.140-154, 2014.

RAMANI, P. et al. High levels of polo-like kinase 1 and phosphorylated translationally controlled tumor protein indicate poor prognosis in neuroblastomas. **Journal Of Neuro-oncology**, Bristo, v. 125, n. 1, p.103-111, 2015.

RAMASWAMY, B. et al. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. **Cancer Research**, Columbus, v. 72, n. 19, 2012.

RATH, K.S. et al. Safe and targeted anticancer therapy for ovarian cancer using a novel class of curcumin analogs. **Journal of Ovarian Research**, Columbus, v. 6, n. 35, 2013.

RAUF, A. et al. Resveratrol as an anticancer agent: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Khyber Pakhtunkhwa, v. 58, n. 9, p. 1428-1447, 2018.

RING, A.; DOWSETT, M. Mechanisms of tamoxifen resistance. **Endocrine-related Cancer**, Londres, v. 11, p. 643-658, 2004.

ROBERTS, P.J.; DER, C.J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, Chapel Hill, v. 26, n. 22, p. 3291-3310, 2007.

ROBINSON, M.J.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Current Opinion In Cell Biology**, Dall, v. 9, n. 2, p. 180-186, 1997.

ROGER, P. et al. Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors. **Cancer Research**, Montpellier, v. 61, p. 2537-2541, 2001.

ROMANÍ, S.E. et al. HER2-positive breast cancer: current and new therapeutic strategies. **The Breast**, Vall D'Hebronn, v. 39, p. 80-88, 2018.

ROQUETE, R.; PAINHO, M.; NUNES, B. Spatial epidemiology of cancer: a review of data sources, methods and risk factors. **Geospatial Health**, Lisboa, v. 12, n. 504, p. 23-35, 2017.

RUIVO, J. et al. The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Porto, v. 51, n. 3, p. 499-513, 2015.

SAKAMOTO, T. et al. Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. **Journal of Nutrition Biochemistry**, Tochigi, v. 21, p. 856-864, 2010.

SAIPRASAD, G. et al. Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of Aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental colon carcinogenesis. **European Journal Of Cancer**, Tamil Nadu, v. 50, n. 14, p.2489-2507, 2014.

SALES, J.M.; RESSUREICIÓN, A.V.A. Resveratrol in peanuts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Griffin, v. 54, n. 6, p. 734-770, 2014.

SAMPATH, S.C. et al. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. **Cell**, Nova lorque, v. 118, n. 2, p.187-202, 2004.

SCHULTZE, E. et al. Drug-loaded nanoemulsion as positive control is an alternative to DMSO solutions for in vitro evaluation of curcumin delivery to MCF-7 cells. **Pharmacological Reports**, Pelotas, v. 69, p. 1408–1412, 2017.

SCHMUCKER, S.; SUMARA, I. Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. **Molecular & Cellular Oncology**, Illkirch, v. 1, n. 2, p.e954507-e954507-8, 2014.

SCHUMACHER, J.M.; GOLDEN, A.; DONOVAN, P.J. AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. **The Journal Of Cell Biology**, Maryland, v. 143, n. 6, p.1635-1646, 1998.

SEKI, A. et al. Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry. **Science**, Standford, v. 320, n. 5883, p.1655-1658, 2008.

SEN, G.S. et al. Curcumin enhances the efficacy of chemotherapy by tailoring p65-NF-KB-p300 Cross-talk in favor of p53-p300 in breast cancer. **The Journal Of Biological Chemistry**, Maharashtra, v. 286, n. 49, p. 42232–42247, 2011.

SHARMA, P. Update on the treatment of early-stage triple-negative breast cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, Westwooh, v. 19, n. 22, 2018.

SHAFEI, A. et al. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Cairo, v. 95, p.1209-1218, 2017.

SHEU, M.T. et al efficacy of antioxidants as a complementary and alternative medicine (CAM) in combination with the chemotherapeutic agent doxorubicin. **Integrative Cancer Therapies**, Taichung City, v. 14, n. 2, p. 184–195, 2014.

SIGOILLOT, F.D.; EVANS, D.R.; GUY, H.I. Growth-dependent Regulation of Mammalian Pyrimidine Biosynthesis by the Protein Kinase A and MAPK Signaling Cascades. **Journal Of Biological Chemistry**, Michigan, v. 277, n. 18, p. 15745-15751, 2002.

SIMARD, D.X. et al. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. **Genes & Development**, Montreal, v. 27, n. 8, p. 900-915, 2013.

SINGH, N. et al. Polyphenols Sensitization Potentiates Susceptibility of MCF-7 and MDA MB-231 Cells to Centchroman. **Plos One**, Lucknow, v. 7, n. 6, p. 37736-37736, 2012.

SHUKLA, Y.; SINGH, R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Lucknow, v. 1215, p. 1-8, 2011.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **A Cancer Journal for Clinicians**, Atlanta, v. 66, p. 7-30, 2016.

_____. Cancer statistics, 2018. **A Cancer Journal for Clinicians**, Atlanta, v. 68, p. 7-30, 2018.

SILVA, G.A. et al. Early detection of breast cancer in Brazil: data from the National Health Survey, 2013. **Revista de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 51, p. 1-14, 2017.

SILVA, M.F. et al. Synthetic resveratrol-curcumin hybrid derivative inhibits mitosis progression in estrogen positive mcf-7 breast cancer cells. **Toxicology in vitro**, Alfenas, v. 50, p. 75-85, 2018.

SINHA, D. et al. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. **Seminars in Cancer Biology**, Calcutá, v. 41-41, p. 209-232, 2016.

SMITS, V.A.J. et al. P21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2DNA damage checkpoint. **Journal Of Biological Chemistry**, Utrecht, v. 275, n. 39, p.30638-30643, 2000.

SOTO, E.T.Q.; CALAF, G.M. et al. Effect of curcumin and paclitaxel on breast carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, Arica, v. 49, p. 2569-2577, 2016.

SOTOCA, A.M. et al. Influence of cellular ER α /ER β ratio on the ER α -agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. **Toxicological Sciences**, Wageningen, v. 105, n. 2, p. 303-311, 2008.

SORIA, G.; GOTTIFREDI, V. PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule? **Dna Repair**, Buenos Aires, v. 9, n. 4, p.358-364, 2010.

SPEIRS, V. et al. Distinct expression patterns of ER α and ER β in normal human mammary gland. **Journal of Clinical Pathology**, Leeds, v. 55, p. 371-374; 2002.

STARK, G.R.; TAYLOR, W.R. Control of the G2/M transition. **Molecular Biotechnology**, Cleaveland, v. 32, n. 3, p.227-248, 2006.

STIRES, H. et al. Integrated molecular analysis of Tamoxifen-resistant invasive lobular breast cancer cells identifies MAPK and GRM/mGluR signaling as therapeutic vulnerabilities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Washington, v. 471, p. 105-117, 2018.

STROM, A. et al. Estrogen receptor β inhibits 17- β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. **PNAS**, Huddinge, v. 101, n. 6, p. 1566-1571, 2004.

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J. M.; HOSTETTMANN, K. Assays for bioactivity in methods in plant biochemistry. **Academic Press**, San Diego, v. 6, p. 71-134, 1991.

SUGIURA, H. et al. Expression of estrogen receptor β wild-type and its variant ER β cx/ β 2 is correlated with better prognosis in breast cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, Nagoya, v. 37, n. 11, p. 820-828, 2007.

SUH, J.; KIM, D.H.; SURH, Y.J. Resveratrol suppresses migration, invasion and stemness of human breast cancer cells by interfering with tumor-stromal cross-talk. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Seoul, v. 643, p. 62-71, 2018.

TAJBAKSHI, A. et al. Therapeutic potential of novel formulated forms of curcumin in the treatment of breast cancer by the targeting of cellular and physiological dysregulated pathways. **Journal of Cellular Physiology**, Mashhad, v. 233, p. 2183-2192, 2018.

TAGUCHI, S. et al. Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1. **Febs Letters**, Nagoia, v. 519, n. 1-3, p.59-65, 2002.

TAO, Y. et al. Enhancement of radiation response by inhibition of Aurora-A kinase using siRNA or a selective Aurora kinase inhibitor PHA680632 in p53-deficient cancer cells. **British Journal Of Cancer**, Villejuif, v. 97, n. 12, p.1664-1672, 2007.

TERADA, Y. AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. **The Embo Journal**, Kyoto, v. 17, n. 3, p.667-676, 1998.

TERADA, Y.; UETAKE, Y.; KURIYAMA, R. Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells. **The Journal Of Cell Biology**, Mineapolis, v. 162, n. 5, p.757-764, 2003.

THOMFORD, N. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. **International Journal Of Molecular Sciences**, Cape Town, v. 19, n. 6, p.1578-1610, 2018.

TOJI, S. et al. The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. **Genes To Cells**, Nagano, v. 9, n. 5, p.383-397, 2004.

TOMITA, M.; MORI, N. Aurora A selective inhibitor MLN8237 suppresses the growth and survival of HTLV-1-infected T-cells in vitro. **Cancer Science**, Okinawa, v. 101, n. 5, p.1204-1211, 2010

- TRAKALA, M. et al. Regulation of macrophage activation and septic shock susceptibility via p21 (WAF1/CIP1). **European Journal Of Immunology**, Madrid, v. 39, n. 3, p.810-819, 2009.
- TRAKALA, M. et al. Aurora B prevents delayed DNA replication and premature mitotic exit by repressing p21Cip1. **Cell Cycle**, Madrid, v. 12, n. 7, p.1030-1041, 2013.
- TUT, T. G. et al. Upregulated polo-like kinase 1 expression correlates with inferior survival outcomes in rectal cancer. **Plos One**, Liverpool, v. 10, n. 6, p.0129313-0129324, 2015.
- TEITEN, M.H.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. hybrid curcumin compounds: a new strategy for cancer treatment. **Molecules**, Luxemburgo, v. 19, p. 20839-20863, 2014.
- TORRE, L.A. et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Atlanta, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.
- UEDA, Ai et al. Therapeutic potential of PLK1 inhibition in triple-negative breast cancer. **Laboratory Investigation**, Toquio, v. 99, n. 9, p.1275-1286, 2019.
- VARA, J.A.F. et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treatment Reviews**, Madrid, v. 30, n. 2, p. 193-204, 2004.
- VAN VUGT, Marcel A.T.M.; BRÁŠ, A.; MEDEMA, R.H. Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. **Molecular Cell**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p.799-811, 2004.
- VENKATADRI, R. et al. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol induced breast cancer cell death. **Cell Death and Disease**, Hampton, v. 7, n. e2104, 2016.
- VILGELM, A.E. et al. Mdm2 and aurora kinase a inhibitors synergize to block melanoma growth by driving apoptosis and immune clearance of tumor cells. **Cancer Research**, Nashville, v. 75, n. 1, p.181-193, 2014.
- VRTACNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. **Biochemia Medica**, Ljubljana, v. 24, n. 3, p. 329-342, 2014.
- WAN, X. et al. Inhibition of aurora-A suppresses epithelial–mesenchymal transition and invasion by downregulating MAPK in nasopharyngeal carcinoma cells. **Carcinogenesis**, Guangzhou, v. 29, n. 10, p.1930-1937, 2008.
- WANG, C.Z. et al. Natural products and chemotherapeutic agents on cancer: prevention vs. Treatment. **The American Journal of Chinese Medicine**, Chicago, v.42, n. 6, p. 1555-1558, 2014.
- WANG, K. et al. Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death. **Scientific Reports**, Macau, v. 6, n. 26064, 2016.

WANG, W. et al. Anticancer effects of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles on human breast cancer cells. **Molecules**, Bengbu, v. 22, n. 1814, 2017.

WANG, W. et al. Inhibition of proliferation, viability, migration and invasion of gastric cancer cells by aurora-a deletion. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Liaoning, v. 12, n. 27, p. 2717-2720, 2011.

WANG, X. et al. Overexpression of aurora-a enhances invasion and matrix metalloproteinase-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. **Molecular Cancer Research**, Talyuan, v. 10, n. 5, p.588-596, 2012.

WANG, X. et al. Anticancer effect of curcumin inhibits cell growth through miR-21/PTEN/Akt pathway in breast cancer cell. **Oncology Letters**, Henan, v. 13, p. 4825-4831, 2017.

WANG, Y. et al. Aurora-A: a potential DNA repair modulator. **Tumor Biology**, Shanghai, v. 35, n. 4, p.2831-2836, 2014.

WEERDT, B.C.M.; MEDEMA, R.H. Polo-like kinases: a team in control of the division. **Cell Cycle**, Utrecht, v. 5, n. 8, p.853-864, 2006.

WEICHERT, W. et al. Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. **Virchows Archiv**, Berlin, v. 446, n. 4, p.442-450, 2005.

WEN, C. et al. Curcumin reverses doxorubicin resistance via inhibition the efflux function of ABCB4 in doxorubicin-resistant breast cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, Chongqing, p.5162-5168, 2019.

WU, S. et al. Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. **Oncogene**, Upsalla, v. 22, n. 3, p.351-360, 2003.

WU, Z.; ZHENG, S.; YU, Q. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, Biopolis, v. 41, n. 12, p.2389-2397, 2009.

WU, C.C. et al. Aurora-A promotes gefitinib resistance via a NF- κ B signaling pathway in p53 knockdown lung cancer cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Taichung, v. 405, n. 2, p.168-172, 2011.

WU, C.C. et al. P53 negatively regulates Aurora A via both transcriptional and posttranslational regulation. **Cell Cycle**, Taichung, v. 11, n. 18, p.3433-3442, 2012.

XIAO-A. et al. Curcumin re-sensitizes multidrug resistant (MDR) breast cancer to cisplatin through inducing autophagy by decreasing CCAT1 expression. **Rsc Advances**, Zhejiang, v. 7, n. 53, p.33572-33579, 2017.

XIE, Y.Q.; WU, X.B.; TANG, S.Q. Curcumin treatment alters ERK-1/2 signaling *in vitro* and inhibits nasopharyngeal carcinoma proliferation in mouse xenografts.

International Journal of Clinical and Experimental Medicine, Província de Hainan, v. 7, n. 1, p. 108-114; 2014.

YALLAPU, M.M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S.C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. **Drug Discovery Today**, Sioux Falls, v.17, n. 1-2, p. 71-80, 2012.

YAN, M. et al. Aurora-A kinase: a potent oncogene and target for cancer therapy. **Medicinal Research Reviews**, Guangzhou, v. 36, n. 6, p.1036-1079, 2016.

YANG, G. et al. Aurora Kinase A Promotes Ovarian Tumorigenesis through Dysregulation of the Cell Cycle and Suppression of BRCA2. **Clinical Cancer Research**, Houston, v. 16, n. 12, p.3171-3181, 2010.

YANG, S.H.; SHARROCKS, A.D.; WHITMARSH, A.J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. **Gene**, Manchester, v. 513, n. 1, p. 1-13, 2013.

YAO, J. et al. Aurora-A down-regulates I κ B α via Akt activation and interacts with insulin-like growth factor-1 induced phosphatidylinositol 3-kinase pathway for cancer cell survival. **Molecular Cancer**, Guangzhou, v. 8, n. 1, p.95-107, 2009.

YIP, C.H.; RHODES, A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Future Oncology**, Kuala Lumpur, v. 10, n. 14, p. 2293-2301, 2014.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Porto Alegre, v. 23, p. 591-601; 2012.

ZAPONNI, A.L.B.; MELO, E.C.P. Distribuição da mortalidade por câncer de mama e de colo de útero segundo regiões brasileiras. **Revista de Enfermagem da UERJ**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 14, p. 628-631, 2010.

ZASSADOWSKI, F. et al. Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. **Cellular Signalling**, Paris, v. 24, n. 12, p. 2369-2377, 2012.

ZEITLIN, S.G.; SHELBY, R.D.; SULLIVAN, K.F. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. **The Journal Of Cell Biology**, La Jolla, v. 155, n. 7, p.1147-1158, 2001.

ZHAO, C. et al. Estrogen receptor β 2 Negatively regulates the transactivation of estrogen receptor α in human breast cancer cells. **Cancer Research**, Huddinge, v. 67, n. 8, p. 3955-3962, 2007.

ZHANG; Y. et al. Mecanismo molecular do inibidor de aurora A PHA739358 que inibe a proliferação e induz de apoptose em células de câncer de mama. **Chinese Journal of Medicine**, Pequim, v.92, n.1, p. 45-49, 2012.

ZHANG, R. et al. Misregulation of polo-like protein kinase 1, P53 and P21WAF1 in epithelial ovarian cancer suggests poor prognosis. **Oncology Reports**, Henan, v. 33, n. 3, p.1235-1242, 2015.

ZHOU, H. et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. **Nature Genetics**, Houston, v. 20, n. 2, p.189-193, 1998.

ZHOU, Q.M. et al. Curcumin reduces mitomycin C resistance in breast cancer stem cells by regulating Bcl-2 family-mediated apoptosis. **Cancer Cell International**, Shanghai, v. 17, n. 1, p.1-13, 2017.

ZHU, H. et al. Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase α genes by p21WAF1/CIP1/SDI1. **Cell Cycle**, Chicago, v. 1, n. 1, p.55-62, 2002.

ZHIPIN, L.; YAGUANG, X. MicroRNAs mediate therapeutic and preventive effects of natural agents in breast cancer. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Nova Orleans, v. 14, n. 12, p. 881-887, 2016.

ZOU, J. et al. Curcumin increases breast cancer cell sensitivity to cisplatin by decreasing FEN1 expression. **Oncotarget**, Chongqing, v. 9, n. 13, p. 11268-11278, 2018.

ZHANG; Y. et al. Mecanismo molecular do inibidor de aurora A PHA739358 que inibe a proliferação e induz de apoptose em células de câncer de mama. **Chinese Journal of Medicine**, Pequim, v.92, n.1, p. 45-49, 2012.