

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SIMONE DA SILVA LAMARTINE HANEMANN

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE 7-
EPICLUSIANONA SOBRE LINHAGENS CELULARES DE
CARCINOMA DE MAMA HUMANA**

Alfenas/MG

2015

SIMONE DA SILVA LAMARTINE HANEMANN

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE 7-
EPICLUSIANONA SOBRE LINHAGENS CELULARES DE
CARCINOMA DE MAMA HUMANA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marisa Ionta
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Jaqueline Carvalho de Oliveira

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Hanemann, Simone da Silva Lamartine.

Estudo *in vitro* da atividade antiproliferativa de 7-epiclusianona sobre linhagens celulares de mama humana / Simone da Silva Lamartine Hanemann. -- Alfenas/MG, 2015.
92 f.

Orientador: Marisa Ionta.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.
Bibliografia.

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

CDD 616.99449

SIMONE DA SILVA LAMARTINE HANEMANN

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE 7-
EPICLUSIANONA SOBRE LINHAGENS CELULARES DE
CARCINOMA DE MAMA HUMANA**

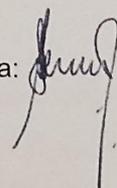
A Banca examinadora, abaixo-assinada,
aprova a Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde
pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em: 04/09/2015

Prof.^a Dr.^a Marisa Ionta

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.
(UNIFAL-MG)

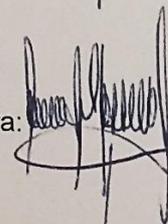
Assinatura:



Prof.^a Dr.^a Maria Sol Brassesco Annichini

Instituição: Universidade de São Paulo. (USP-RP)

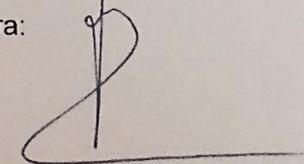
Assinatura:



Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Júnior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.
(UNIFAL-MG)

Assinatura:



DEDICATÓRIA

Ao meu marido, João Adolfo, por sempre acreditar em mim, sua disponibilidade constante em ajudar e seu incentivo incondicional. Pelo exemplo de perseverança na busca de seus objetivos e por todo amor que cultivamos ao longo desses anos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Profa. Dra. Marisa Ionta, por quem tenho profunda admiração, respeito e grande carinho. Obrigada pela oportunidade de realizar meu mestrado sob sua orientação, explorando novos caminhos, possibilitando meu crescimento profissional e principalmente pela confiança, disponibilidade, atenção e incentivo, os quais nunca faltaram no desenvolvimento deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por permitir a realização deste trabalho, ter me sustentado até aqui e por todas as bênçãos derramadas em minha vida. Dele, por meio d'Ele e para Ele são todas as coisas.

À minha co-orientadora, **Prof.^a Dr.^a Jaqueline Carvalho de Oliveira**, exemplo de profissionalismo. Obrigada pelos ensinamentos e colaboração, essenciais ao desenvolvimento deste estudo.

À minha **mãe e irmãos** por todo apoio e incentivo.

Ao **Guilherme Álvaro Ferreira da Silva**, presente em todos os momentos da realização deste trabalho. Obrigada por me ajudar desde o momento em que cheguei ao laboratório e pelo imprescindível auxílio no desenvolvimento dos experimentos.

Ao **Rodrigo Pereira**, pela parceria sempre constante, pelas discussões científicas e incentivos durante as prévias para seminários e aulas. Obrigada por compartilhar comigo tantos momentos bons.

À **Leilane Sales** e **Évila Salles**, pela amizade e desprendimento com que sempre me ajudaram.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Animal Integrativa, **Rafael Fernandes, Wesley Fernandes, Pablo Chagas, Glícia Zambroti, Renato Oliveira, Carla Lages, Délcio Junior, Graziella Sousa, Márcio Hideki, Marco Aurélio Banionis, Márcio Tadeu e Fernando Felicioni**, pelo apoio, amizade, discussões, pelas risadas que compartilhamos e pelos momentos agradáveis que vivemos juntos.

Aos alunos de iniciação científica **André Caliari, Marcos Coronado e Graciana Yokota**, pelo apoio constante e pelos momentos que se envolveram no projeto.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Animal Integrativa, **Andrea Mendonça**, **Fernando Ponciano**, **Paulo Alvarenga**, **Isabel Passos** e **Neuza Marques**, pela amizade, disponibilidade em ajudar e pelo carinho com que sempre me trataram.

À **Prof.^a Dr.^a Roseli Soncini**, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse aprender a técnica de *Immunoblot*, junto às suas alunas **Vanessa Pereira** e **Daniela Brito**, as quais agradeço pelo apoio e pelos momentos agradáveis que passamos juntas.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas a Saúde, **Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior**, pelo profissionalismo e atenção.

Aos **docentes do Programa de Pós-graduação em Biociências aplicadas à saúde** e do **Laboratório de Biologia Animal Integrativa**, pelos ensinamentos transmitidos e pelas experiências compartilhadas.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Biociências aplicadas à saúde, **Maria Antonieta Nogueira**, pela eficiência e atenção.

À Direção da E.E. Judith Vianna, na pessoa da Diretora **Prof.^a Maria Aparecida Barbosa Lopes**, por todo apoio e disponibilidade em ajudar no que fosse possível para minha dedicação integral a realização deste trabalho.

À secretária da E.E. Judith Vianna, **Wérica Fernanda Silva**, por toda atenção despendida ao providenciar a documentação necessária para que pudesse ter o afastamento concedido pela Secretaria de Educação do Estado de Minas Gerais.

Aos amigos da **E.E. Judith Vianna**, por toda amizade, incentivo e apoio.

À minha amiga, **Bianca Andrade de Carvalho**, pelo incentivo na busca da realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Secretaria de Educação do Estado de Minas Gerais**, pelo afastamento concedido para a realização deste projeto e pelo incentivo ao meu crescimento profissional.

À **Universidade Federal de Alfenas**, pela oportunidade de realizar este curso de pós-graduação nesta instituição.

“Se uma pessoa fizesse apenas o que entende, jamais avançaria um passo”.

Clarice Lispector

RESUMO

O câncer de mama é o tipo mais frequente de neoplasia entre mulheres em todo o mundo e a taxa de mortalidade no Brasil ainda é alta. Os fármacos utilizados nos tratamentos convencionais, em geral, são tóxicos e, muitas vezes, induzem resistência nas células tumorais. Dessa forma, é extremamente importante identificar compostos com atividade antitumoral que possam melhorar as propostas terapêuticas contra o câncer de mama. A 7-epiclusianona é uma benzofenona tetraprenilada isolada a partir da fração hexânica do extrato bruto de *Garcinia brasiliensis*. Estudos mostraram que 7-epiclusianona apresenta diferentes propriedades biológicas, as quais incluem atividade antimicrobiana, anti-espasmódica, leishmanicida, anti-inflamatória e analgésica. Além disso, estudo prévio mostrou que o referido composto inibe a taxa de proliferação de linhagens celulares derivadas de cânceres humanos. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos citotóxicos e/ou antiproliferativo da 7-epiclusianona sobre linhagens celulares derivadas de carcinomas de mama humana. Os resultados mostraram que a 7-epiclusianona reduz a viabilidade celular nas linhagens MCF-7 e Hs 578T, sendo esse efeito dependente da concentração usada e do tempo de tratamento. A atividade antiproliferativa do composto sobre as linhagens estudadas está relacionada à sua capacidade de bloquear o ciclo celular na transição G1/S, enquanto a atividade citotóxica está relacionada ao seu potencial pró-apoptótico. 7-epiclusianona reduziu os níveis de RNA mensageiro para as ciclinas D1 e E na linhagem MCF-7, enquanto que, na Hs 578T, houve redução apenas nos níveis de expressão de ciclina E. Em conjunto, os dados obtidos consistentemente mostraram que 7-epiclusianona apresenta importante atividade antitumoral *in vitro* contra células derivadas de mama e abrem perspectivas para o uso desse composto em estudos *in vivo* que possam comprovar sua atividade antineoplásica para o câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. 7-epiclusianona. Atividade antiproliferativa. Apoptose.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide and its mortality rate is still high in Brazil. The drugs used in conventional treatments are generally toxic and often induce to tumor cells resistance. Thus, it is extremely important to identify compounds with antitumor activity that can improve the therapeutic approaches against breast cancer. 7-epiclusianone is a tetraprenylated benzophenone isolated from the hexane extract of *Garcinia brasiliensis*. Studies have shown that 7-epiclusianone has different biological properties, which include antimicrobial, anti-spasmodic, leishmanicide, anti-inflammatory and analgesic activities. Furthermore, a previous study showed that this compound inhibits the proliferation rate of cell lines derived from human cancers. Therefore, the aim of this study was to analyze the cytotoxic and/or antiproliferative effects of 7-epiclusianone on human breast carcinoma cell lines. Results showed that 7-epiclusianone reduces the cell viability of MCF-7 and Hs 578T lines in a time and concentration dependent manner. Antiproliferative activity of this compound on studied cell lines are relates to its ability to inducing cell cycle arrest in G1/S transition, while the cytotoxic activity was attributed, at least in part, to its pro-apoptotic potential. 7-epiclusianone reduced the mRNA levels of both cyclins D1 and E in MCF-7, but only cyclin E expression was downregulated in Hs 578T. Taken together, the data consistently showed that 7-epiclusianone has an important antitumor activity against human breast carcinoma cell lines and open up the prospect of using this compound in further anticancer *in vivo* studies to confirm its antineoplastic activity against breast cancer.

Key words: Breast cancer. 7-epiclusianone. Antiproliferative activity. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aspectos anatômico e histológico da mama humana feminina normal.....	24
Figura 2 - Fases do ciclo celular.....	32
Figura 3 - Pontos de checagem de danos ao DNA.....	34
Figura 4 - Estrutura química da 7- epiclusianona.....	39
Figura 5 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTS na linhagem MCF-7.....	51
Figura 6 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTS na linhagem Hs 578T.....	52
Figura 7 - Aspecto morfológico das linhagens MCF-7 e Hs 578T após tratamento por 48h.....	53
Figura 8 - Histogramas da distribuição de populações celulares da linhagem MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular.....	55
Figura 9 - Histogramas da distribuição de populações celulares da linhagem Hs 578T nas diferentes fases do ciclo celular.....	57
Figura 10 - Imagens fluorescentes de marcação para BrdU em células MCF-7.....	59
Figura 11 - Representação gráfica da frequência de células MCF-7 na fase S.....	59
Figura 12 - Representação gráfica da frequência de células MCF-7 em mitose.....	60
Figura 13 - Expressão de Histona H3 fosforilada (Ser10) em células MCF-7.....	61
Figura 14 - Dot Plots, obtidos por citometria de fluxo, evidenciando a frequência de células MCF-7 e Hs 578T marcadas por Histona H3 fosforilada.....	62
Figura 15 - Capacidade clonogênica de células da linhagem MCF-7.....	63

Figura 16 - Dot Plots do perfil de externalização de fosfatidilserina por marcação com Anexina V.....	64
Figura 17 - Representação gráfica da frequência de morte celular por citometria de fluxo.....	64
Figura 18 - Representação gráfica da ativação de Caspase-3 por citometria de fluxo.....	65
Figura 19 - Histogramas da distribuição de células não apoptóticas e apoptóticas obtidos por citometria de fluxo.....	66
Figura 20 - Imagens fluorescentes do cometa observadas em preparações citológicas.....	67
Figura 21 - Representação gráfica da quantificação do índice de dano genético	68
Figura 22 - Dot Plots, obtidos por citometria de fluxo, evidenciando células marcadas com ATM fosforilada.....	69
Figura 23 - Representação gráfica da frequência de células MCF-7e Hs 578T marcadas com anti-ATM fosforilada obtidas pela análise de citometria de fluxo.....	70
Figura 24 - Expressão de ERK fosforilada (Tyr 204) e ERK1 em células MCF-7 e Hs 578T obtidas por <i>immunoblot</i>	71
Figura 25 - Representação gráfica do perfil de expressão (RNAm) de genes relacionados a regulação de proliferação e morte celular na linhagem MCF-7.....	73
Figura 26 - Representação gráfica do perfil de expressão (RNAm) de genes relacionados a regulação de proliferação e morte celular na linhagem Hs 578T.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Subtipos específicos de tumores.....	28
Tabela 2 - Sequências de <i>primers</i> utilizados para o ensaio de <i>real time</i> RT-PCR.....	50
Tabela 3 - Frequência de células MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular determinada por citometria de fluxo, após 24 e 48h de tratamento com 7-epiclusianona em diferentes concentrações.....	56
Tabela 4 - Frequência de células Hs 578T nas diferentes fases do ciclo celular determinada por citometria de fluxo, após 24 e 48h de tratamento com 7-epiclusianona em diferentes concentrações.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAD -	<i>Amino-Actinomycin D</i>
ACTB -	<i>Actin, Beta</i>
AKT -	<i>Serine/Threonine-Specific Protein Kinase</i>
APC -	<i>Anaphase-Promoting Complex</i>
ATCC -	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM -	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated serine-protein kinase</i>
ATR -	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related protein</i>
ATRIP -	<i>ATR-Interacting Protein</i>
A1 -	<i>Bcl-2 related gene A1</i>
Bad -	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak -	<i>Bcl-2 homologous antagonist/Killer</i>
Bax -	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA -	<i>Bicinchoninic Acid</i>
Bcl-xL -	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bcl-W -	<i>Antiapoptotic bcl-2 family membe</i>
Bcl-2 -	<i>B- cell lymphoma 2</i>
Bid -	<i>BH3-interacting domain agonist</i>
Bik -	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
BMF -	<i>Bcl-2 Modyfying Factor</i>
BRCA1 -	<i>Breast cancer 1</i>
BRCA2 -	<i>Breast cancer 2</i>
BrdU -	<i>5-Bromo-2'-deoxyuridine</i>
CASPASE -	<i>Cysteine-aspartic acid protease</i>
CASP3 -	<i>Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CASP8 -	<i>Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CCND1 -	<i>Cyclin D1</i>
CCNE -	<i>Cyclin E</i>
Cdc25 -	<i>Cell division cycle 25</i>
CDI -	<i>Carcinoma ductal invasivo</i>
CDIS -	<i>Carcinoma Ductal In Situ</i>
CDK -	<i>Cyclin-Dependent quinase</i>

Cdk1 -	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
Cdk2 -	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
Chk1 -	<i>Checkpoint kinase 1</i>
Chk2 -	<i>Checkpoint kinase 2</i>
Cip/kip -	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>
CKI -	<i>Cyclin-dependent kinases inhibitor</i>
CLI -	Carcinoma Lobular Invasivo
CLIS -	Carcinoma Lobular <i>In Situ</i>
CO ₂ -	<i>Carbon dioxide</i>
DAPI -	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DEPC -	<i>Di-etil pirocarbonate</i>
DDR -	<i>DNA Damage Response</i>
DEMEM -	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DNA -	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP -	<i>Deoxynucleoside 5' triphosphato</i>
DP -	Desvio padrão
DP1 -	<i>D prostanoid receptor 1</i>
DXR -	Doxorrubicina
DSBs -	<i>Double-strand breaks</i>
ECL -	<i>Enhanced chemiluminescent</i>
EDTA -	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ERK1/2 -	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
E2F-1 -	Membro da família E2F de fatores de transcrição
FAS -	Receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose
FBS -	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC -	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GDI -	<i>Genetic damage index</i>
GUS -	<i>β-glucuronidase</i>
HCL -	<i>Hydrochloric acid</i>
HDAC -	<i>Histone Deacetylases</i>
HER2/NEU -	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HRK -	<i>Harakiri BCL2 interacting protein</i>

HS 578T -	Linhagem celular de carcinoma ductal mamário
H2AX -	<i>H2A histone family, member X</i>
IC ₅₀ -	Concentração inibitória média
IGF-1 -	<i>Insulin growth factor type 1</i>
IgG -	<i>Immunoglobulin G</i>
INK4 -	<i>Inhibitor of Kinase 4</i>
M -	Molar
mA -	miliampère
MAPK -	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCF-7 -	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
Mcl-1 -	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MDA-MD-231 -	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MEK -	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MgCl ₂ -	<i>Magnesium chloride</i>
m-TOR -	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTS -	<i>(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)</i>
NOXA -	<i>Proapoptotic BH3-only member of Bcl-2</i>
PBSA -	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA -	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR -	<i>Polimerase chain reaction</i>
PI -	<i>Propidium iodide</i>
PI3K -	<i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase</i>
PIK3CA -	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
PTEN -	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PUMA -	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF -	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
pRb -	<i>Retinoblastoma Protein</i>
p15 -	<i>15 KDa protein</i>
p16 -	<i>16 KDa protein</i>
p18 -	<i>18 KDa protein</i>
p19 -	<i>19 KDa protein</i>

p21 -	<i>21 KDa protein</i>
p27 -	<i>27 KDa protein</i>
p53 -	<i>53 KDa protein</i>
Raf -	<i>serine/threonine-protein kinase</i>
RE -	Receptor de Estrógeno
RIPA -	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RNA -	<i>Acid ribonucleic</i>
RNase -	Ribonuclease
RP -	Receptor de Progesterona
rpm -	Rotações por minuto
RT-PCR -	<i>Reverse Transcription PCR</i>
SDS -	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Ser10 -	Serina 10
TBS -	<i>Tris-buffered saline</i>
TGF-β -	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF -	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP53 -	<i>Tumor protein p53</i>
TRAIL -	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAIL-R1/R2 -	<i>TRAIL receptor1/receptor2</i>
TTBS -	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
Tyr 204 -	Tirosina 204
UTDL -	Unidades terminais ducto lobular
UV -	Ultra Violeta
V/cm ² -	Volts por centímetro quadrado
μl -	Microlitros
μM -	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	ANATOMIA DA MAMA.....	23
2.2	CÂNCER DE MAMA.....	24
2.3	CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA.....	26
2.4	MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	30
2.5	APOPTOSE.....	35
2.6	VIAS DE SINALIZAÇÃO.....	37
2.7	PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE PARA A IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA.....	38
3	OBJETIVOS.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	41
4.2	ESQUEMA DE TRATAMENTO.....	41
4.3	VIABILIDADE CELULAR.....	42
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE DNA PARA ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.....	42

4.5	INCORPORAÇÃO DE BrdU PARA A DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO CELULAR NA FASE S DO CICLO CELULAR.....	43
4.6	DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MITOSES.....	43
4.7	ANÁLISE FASE G2/M USANDO MARCADOR MOLECULAR ESPECÍFICO (HISTONA H3 FOSFORILADA).....	44
4.8	<i>IMMUNOBLOT</i>	44
4.9	ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA.....	45
4.10	AVALIAÇÃO DE APOPTOSE POR COLORAÇÃO COM ANEXINA V/PI.....	46
4.11	ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DA CASPASE-3.....	46
4.12	ENSAIO TUNEL.....	47
4.13	ENSAIO COMETA.....	47
4.14	ANÁLISE DE DANO NO DNA (DUPLA FITA) USANDO MARCADOR ESPECÍFICO ATAXIA TELANGECTASIA MUTADA (ATM).....	48
4.15	ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM NÍVEL DE RNA MENSAGEIRO.....	48
4.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5	RESULTADOS	51
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama apresenta elevada incidência e mortalidade em todo o mundo, representando um grave problema de saúde pública (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005). A incidência dessa neoplasia vem aumentando nas últimas décadas, em grande parte devido às mudanças nos hábitos de vida e no perfil epidemiológico da população. Vários países desenvolvidos têm conseguido, apesar desse aumento na incidência, reduzir a sua mortalidade, através de um diagnóstico precoce e um tratamento mais efetivo (PAULINELLI et al., 2003).

Sabe-se que o câncer de mama representa uma doença complexa e heterogênea, que compreende distintas características histológicas e de evolução clínica. Além disso, os tumores são classificados em diferentes subtipos moleculares com base no perfil de expressão gênica (HIRATA et al., 2014). Segundo Sotiriou e Pusztai (2009), os estudos no perfil de expressão gênica proporcionaram uma melhor compreensão sobre o perfil comportamental do tumor e representam uma ferramenta importante para o diagnóstico e prognóstico da doença.

Compostos com atividade antiproliferativa tem contribuído para o desenvolvimento de novos fármacos utilizados na prevenção e tratamento de neoplasias. Produtos naturais, especialmente plantas, são fontes de grande importância na descoberta de novos compostos com propriedades farmacológicas. Estima-se que compostos naturais e seus derivados tenham contribuído para produção de cerca de um terço dos medicamentos presentes atualmente no mercado (ZHOU; LI; CHEN, 2010).

Estudos fitoquímicos de *Garcinia brasiliensis*, uma espécie nativa da Amazônia, resultou no isolamento e identificação de benzofenonas potencialmente ativas, incluindo a 7-epiclusianona, uma benzofenona tetraprenilada que tem mostrado várias propriedades biológicas, as quais incluem atividade antiproliferativa contra células tumorais em ensaios *in vitro* (MURATA et al., 2010). Todavia, os mecanismos envolvidos com a atividade antiproliferativa desse composto sobre células derivadas de mama ainda não foram investigados. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os mecanismos biológicos envolvidos com a atividade

antiproliferativa de 7-epiclusianona em linhagens celulares derivadas de câncer de mama com diferentes perfis genéticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Apresentaremos o panorama do câncer de mama, seus aspectos epidemiológicos, manifestações clínicas, fisiopatologia e prognóstico. Será abordado também os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da proliferação celular, assim como considerações sobre produtos naturais como fonte para a identificação de novos compostos com atividade antineoplásica.

2.1 ANATOMIA DA MAMA

A glândula mamária humana é constituída por um sistema ducto-lobular ramificado, altamente organizado. Os ductos surgem a partir do mamilo, em um arranjo radial, atravessam o tecido adiposo e terminam em aglomerados de alvéolos que são as unidades terminais ducto-lobular (UTDL) (NELSON; BISSEL, 2005). Cada ducto serve um lóbulo específico da mama, que são separados por espessos septos do tecido conjuntivo que contém nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Os lóbulos são constituídos por ácinos que formam a unidade secretora da glândula mamária. Histologicamente, os lóbulos e ductos possuem um lúmen central revestido por duas camadas celulares, uma camada de células epitélio luminal polarizada e outra camada externa de células mioepiteliais. Envolvendo esta estrutura está a membrana basal, rica em laminina e colágeno tipo IV que faz interface com um denso estroma (Figura 1) (WEIGELT; BISSEL, 2008). A organização morfológica e funcional das glândulas envolve uma série de fatores, os quais incluem as interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Além disso, as condições ambientais relacionadas ao suprimento sanguíneo e disponibilidade de fatores de crescimento e de hormônios são importantes na regulação da atividade da glândula mamária (SMALLEY; ASHWORTH, 2003).

A mama passa por grandes mudanças em relação ao tamanho, forma e atividade funcional considerando os períodos pré-puberdade, puberdade, gravidez, lactação e pós-menopausa (RUSSO; RUSSO, 2004). A total diferenciação funcional

da glândula mamária ocorre durante os períodos de gravidez e lactação, momento em que os ductos sofrem uma intensa ramificação para otimizar a drenagem do leite produzido pelas células presentes nos alvéolos. Após o desmame, toda a glândula involui, as células epiteliais mamárias morrem e são substituídas por grandes quantidades de tecido adiposo e conjuntivo que suportam os lóbulos em mulheres adultas não-grávidas (NELSON; BISSEL, 2005).

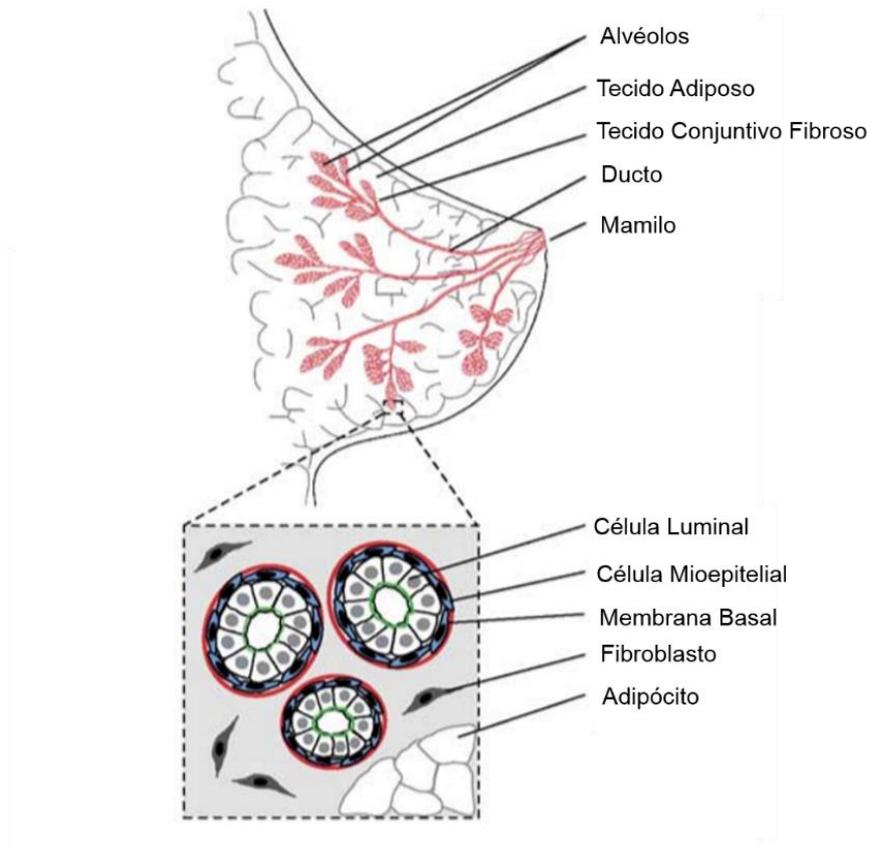


Figura 1 - Aspectos anatômico e histológico da mama humana feminina normal.
Fonte: Adaptado de NELSON; BISSEL (2005).

2.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete as mulheres em todo o mundo, sendo a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2014). Segundo estimativas do GLOBOCAN (2012), esta neoplasia maligna é responsável por 25% dos novos casos de câncer no mundo. Considerando alguns aspectos como alta incidência, morbidade, mortalidade e custo elevado para o tratamento, o

câncer de mama representa um grave problema de saúde pública. (SIEGEL et al., 2015).

Vários fatores têm sido envolvidos na etiopatogenia do câncer de mama (WEINBERG; MARQUEZ-GARBAN; PIETRAS, 2005). Estes incluem idade, predisposição genética, história familiar, hábitos alimentares, consumo de álcool, obesidade, sedentarismo, menarca precoce, idade da primeira gestação (acima dos 30 anos), nuliparidade, uso de contraceptivos orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal (ABDULKAREEM; ZURMI, 2012; BRASIL, 2014). Destacam-se ainda fatores endócrinos e histórico de neoplasia benigna (DUMITRESCU; COTARLA, 2005).

O envelhecimento é o principal fator de risco para o câncer de mama. Aproximadamente metade de todos os casos ocorrem em mulheres com idade maior ou igual a 65 anos e mais de 30% ocorrem em mulheres com mais de 70 anos, sendo que a mortalidade relacionada ao câncer de mama aumenta com a idade (INAL et al., 2013). O prognóstico do câncer de mama tem melhorado substancialmente durante as últimas décadas e os níveis de sobrevida têm aumentado significativamente (ELME et al., 2013). O avanço dos métodos de diagnóstico e a melhoria na educação têm aumentado o número de mulheres que estão sendo diagnosticadas com a doença em estágio inicial, um aspecto relevante e definitivo para o bom prognóstico (THAM et al., 2007). No Brasil, infelizmente, o câncer de mama ainda é diagnosticado tardiamente, fato que contribui para as altas taxas de mortalidade registradas para o câncer de mama no país (BRASIL, 2014).

O processo de transformação maligna envolve alterações genéticas e epigenéticas, de modo que a célula transformada exibe um comportamento atípico não respondendo aos sinais que mantêm a homeostasia tecidual (SILVA; SILVA 2005). Mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumores são frequentemente observadas em células tumorais. Os proto-oncogenes são genes que regulam positivamente o ciclo celular de forma direta ou indireta; ao passo que os genes supressores de tumores inibem os ciclos de divisão celular. Dessa forma, alterações nessas classes de genes são críticas para o desenvolvimento e progressão do tumor (SIMÃO et al., 2002).

Mutações nos genes supressores de tumores *BRCA1* e *BRCA2* conferem alto risco para o câncer de mama (MAVADDAT et al., 2013), sendo um dos principais fatores hereditários relacionados ao desenvolvimento dos cânceres de mama e de ovário (MIKI et al., 1994; WOOSTER et al., 1995).

Outro gene frequentemente mutado no câncer de mama é o *TP53*, um gene supressor de tumor que codifica a proteína p53 responsável pelo bloqueio do ciclo celular em resposta a danos na molécula de DNA. A ativação de p53 induz a expressão de p21, que por sua vez, inibe a atividade de complexos enzimáticos responsáveis pela progressão do ciclo celular. Dessa forma, o ciclo é bloqueado e a maquinaria de reparo é ativada. Adicionalmente, p53 pode atuar na indução de apoptose, caso as lesões no DNA não sejam reparadas (TAKAHASHI et al., 2000). Portanto, a inativação de p53 é crítica no processo de tumorigênese (SUZUKI; MATSUBARA, 2011).

Segundo Abreu e Koifman (2002), o conhecimento dos fatores prognósticos é de fundamental importância na determinação dos programas terapêuticos. O progresso no tratamento do câncer de mama depende, em grande parte, do crescente conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença (HAN et al., 2012).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA

Alterações dos mecanismos que regem a manutenção da diferenciação celular estão intimamente ligadas ao câncer. Na glândula mamária isso é muito evidente, pois esta passa por repetidos ciclos através de alterações morfológicas características: na puberdade, há morfogênese ramificada; durante a gravidez, a expansão ductal está associada à proliferação celular; na lactação, a diferenciação leva a produção do leite; e o retorno ao estado pré-gravidez é acompanhado por intensos eventos de apoptose que levam à involução da mama. Essas mudanças também ocorrem, embora de forma menos acentuada, durante cada ciclo hormonal, de modo que as células são constantemente estimuladas a proliferar. Falhas no

mecanismo de controle de proliferação podem contribuir para o processo de transformação neoplásica (BISSELL et al., 2002).

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea, constituída por uma variedade de tumores, associados com padrões histológicos distintos, que não só apresentam diferentes características biológicas, mas também diferentes comportamentos clínicos. Evidências mostram que o câncer de mama é, na verdade, um conjunto de diferentes doenças que se originam da mesma estrutura anatômica (a unidade ducto-lobular). As variações estão relacionadas aos fatores de risco, apresentação clínica, características patológicas e responsividade ao tratamento (WEIGELT; REIS-FILHO, 2009).

O tumor de mama é constituído por uma população pleomórfica que pode apresentar variações nos padrões de crescimento, assim como nas características citológicas e estruturais. Os patologistas procuram desenvolver sistemas de classificação para explicar essa heterogeneidade que é observada tanto entre pacientes, como também em tumores de um mesmo indivíduo. O sistema de graduação histológica atualmente utilizado baseia-se na determinação de três componentes, incluindo a proporção de formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico (REIS-FILHO; LAKHANI, 2008). A determinação do grau histológico é extremamente importante como fator prognóstico e está associado com o tipo, complexidade e padrão de aberrações genéticas encontrados no câncer de mama (ELLIS et al., 1992).

A patologia clássica segrega os tumores de mama em várias categorias, com base na sua morfologia geral e organização estrutural. O tipo mais comum observado e relatado é o carcinoma ductal invasivo (CDI), com cerca de 75% dos casos, enquanto o carcinoma lobular invasivo (CLI) representa o próximo tipo histológico mais comum de tumor de mama, com cerca de 10% dos casos (LI; URIBE; DALING, 2005). A atividade proliferativa do epitélio glandular combinado com características celulares de malignidade, mas sem invasão, caracteriza o carcinoma *in situ*, que se distingue por microscopia como ductal (CDIS) ou a forma lobular (CLIS) (BECKMANN et al., 1997).

Enquanto vários estudos têm avaliado as diferenças epidemiológicas, patológicas e clínicas entre carcinomas ductal e lobular, pouco se sabe sobre tipos

histológicos mais raros de câncer de mama, incluindo mucinoso, tubular, comedo, inflamatório, medular e carcinomas papilíferos, que juntos respondem por cerca de 10% de todos os casos (LI; URIBE; DALING, 2005).

O uso de marcadores específicos no câncer de mama tem um papel crítico na definição do subtipo de tumor e, conseqüentemente, na escolha da melhor proposta terapêutica. Os principais marcadores avaliados são: receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), e os receptores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (BERTOS; PARK, 2011). Tumores positivos para RE respondem à terapia anti-estrógeno. A expressão de RP geralmente está relacionada à expressão de RE e apresenta menor relevância clínica (BARDOU et al., 2003). Os tumores que expressam HER2 são tratados com terapias dirigidas, que inclui o uso de anticorpos monoclonais (JUNTTILA et al., 2009). O uso conjunto desses marcadores permite a definição de subtipos específicos de tumores (Tabela 1).

Tabela 1 – Subtipos específicos de tumores.

Subtipo	Expressão de receptores
RE positivo	RE+ / HER2-
HER2 positivo	RE- / HER2+
Triplo positivo	RE+ / RP+ / HER2+
Triplo negativo	RE- / RP- / HER2-

Fonte: Adaptado de BERTOS; PARK (2011); JUNTTILA et al. (2009)

Do ponto de vista do comportamento clínico, tumores RE positivos apresentam o melhor prognóstico e após o advento de terapias-alvo para HER2, tumores HER2 positivos previamente associados com o pior comportamento, agora exibem um melhor prognóstico. Tumores triplo negativos, por outro lado, estão ligados a um pior prognóstico entre todos os subtipos, enquanto os casos triplo-positivos parecem ter um prognóstico intermediário entre os casos de RE positivo e HER2 positivo (PARISE et al., 2009).

Considerando as diferenças observadas no perfil de expressão gênica dos tumores de mama, estudos têm sido feitos para caracterizar o perfil molecular de diferentes tipos de tumores e para estabelecer, dessa forma, correlações com parâmetros clínicos relevantes, como a sobrevida global e a sobrevida livre de doença (SORLIE et al., 2001). Perou et al. (2000) propõem uma classificação para

os tumores de mama, a partir da análise de cerca de 8 mil genes, em 4 grupos: Luminal A e B, “*normal-like*”, HER2-positivos e basal; considerando os diferentes perfis de expressão gênica.

O subtipo luminal A apresenta fenótipo RE positivo e HER2 negativo, sendo caracterizado pela elevada expressão de genes comumente expressos em células epiteliais luminais; por outro lado, baixos níveis de expressão desses genes são observados em amostras de tumores do subtipo luminal B, que apresenta fenótipo RE positivo e HER2 positivo. Este último, por sua vez, está particularmente relacionado à recidiva tumoral (SORLIE et al., 2001).

O subtipo HER2-positivo, cujo fenótipo é RE negativo e HER2 positivo, foi caracterizado pela superexpressão de HER2. A amplificação do oncogene HER2 é um importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de mama. Fenótipo RE negativo e HER2 negativo está relacionado ao subtipo basal, caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células progenitoras ou em células basais/mioepiteliais (SORLIE, 2004). Este perfil está associado com mutações no gene *BRCA* e não possui alvo terapêutico definido, como os outros subtipos. Dessa forma, o subtipo basal apresenta pior prognóstico (TURNER; FILHO, 2006).

Segundo Perou et al. (2000), o subtipo “*normal-like*” apresenta prognóstico intermediário, com elevada expressão de genes comuns às células epiteliais basais e às células adiposas bem como baixa expressão de genes característicos de células epiteliais luminais. Esse subgrupo habitualmente apresenta negatividade para os marcadores tumorais usuais e, até o momento, seu comportamento clínico ainda não é bem compreendido (PARKER et al., 2009; WEIGELT et al., 2010).

Tratamentos específicos têm sido desenvolvidos considerando os diferentes subtipos de câncer de mama. Tamoxifeno e inibidores de aromatase são empregados em tumores RE+; enquanto a terapia com anticorpos monoclonais (Trastuzumab) tem sido empregada para os tumores HER+. Em relação aos tumores classificados como triplo negativos tem-se usado drogas citotóxicas como, por exemplo, as antraciclinas, as quais levam a uma significativa morbidade do paciente (JUNTILLA et al., 2009).

2.4 MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A progressão do ciclo celular é altamente regulada por complexos proteicos que são ciclicamente ativados e, posteriormente, desativados (Figura 2). A ativação de cinases dependentes de ciclina (CDK) representa um evento crítico para a progressão do ciclo celular e ocorre principalmente devido a sua interação com ciclinas específicas (PINES, 1995). Assim sendo, nos complexos CDK-ciclinas, as CDKs representam as subunidades catalíticas, cuja atividade enzimática é regulada pelas ciclinas. Os níveis de expressão das CDKs são estáveis ao longo do ciclo, contudo há variação no perfil de expressão das ciclinas considerando as diferentes fases do ciclo (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

A formação de complexos CDK4/CDK6-ciclina D é essencial para a progressão em G1. Um de seus substratos é o produto do gene supressor de tumor retinoblastoma, pRb, um regulador negativo da transição G1/S. A fosforilação da pRb a torna inativa, permitindo que as células entrem na fase S (ZHANG, 1999). A fosforilação da pRb, no ponto de restrição ou próximo a ele, leva a uma ruptura do complexo pRb-proteína Histona deacetilase (HDAC) e a liberação dos fatores de transcrição E2F-1 e DP1, o qual regula positivamente a transcrição de genes, cujos produtos são necessários para a transição G1/S e progressão ao longo da fase S, incluindo as ciclinas E e A bem como a fosfatase Cdc25. O complexo CDK2-ciclina E participa da manutenção do estado hiperfosforilado da pRb (BREHM et al., 1998). Ciclina E se associa à CDK2 para transição da fase G1-S e atinge um nível máximo na transição G1/S, sendo degradada em S (KOFF et al., 1992; LEES, 1995).

A transição G1/S é um período crítico, pois representa um evento de não retorno, ou seja, com a progressão de G1 para S inevitavelmente haverá a conclusão do ciclo celular. Assim sendo, os mecanismos moleculares que regulam a transição G1/S devem operar adequadamente para manter a homeostasia tecidual. Em cânceres humanos, os mecanismos que regulam a transição G1/S estão frequentemente alterados e, portanto, compostos capazes de inibir essa transição podem ser úteis no combate ao câncer (DURONIO; XIONG, 2013).

A ciclina A acumula-se na transição G1/S e persiste ao longo da fase S. Nesse período, a ciclina A regula a atividade da CDK2 (SCHULZE, 1995). A progressão pela fase G2 é regulada pelos complexos ciclina A-CDK1, enquanto a transição G2/M e os eventos iniciais da mitose são eventos regulados pelos complexos ciclina B-CDK1 (ARELLANO; MORENO, 1997). A inativação dos complexos CDK-ciclinas ocorre em pontos específicos do ciclo devido à proteólise das ciclinas via proteossomos (RECHSTEINER; ROGERS, 1996).

A atividade das CDKs pode ser inibida por proteínas denominadas genericamente de inibidores de CDKs, as CKIs (do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitors*), as quais se ligam as CDKs ou aos complexos CDK-ciclina regulando negativamente sua atividade. Duas famílias distintas de CKIs foram descritas, a família INK4 e família Cip/Kip (MALUMBRES; BARBACID, 2009). A família INK4 inclui p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d), que inativam especificamente as CDK4 e CDK6 na fase G1. A formação de complexos estáveis evita a associação dessas CDKs com a ciclina D (ROUSSEL, 1999). A família Cip/Kip, inclui a p21 (WAF1, CIP1), p27 (CIP2), p57 (Kip2), que inibem os complexos CDK2-ciclina A na fase S e CDK1- ciclina B na fase M (CHIM et al., 2006; CÁNEPA et al., 2007). A família p21 inibe todas as Cdk's envolvidas na transição G1/S; CDK4/6-ciclina D e CDK2-ciclina E. Também inibe a síntese do DNA ligando-se a ele e inibindo o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). A expressão da p21 está sob o controle da transcrição do gene supressor de tumor *TP53*. O promotor do gene da p21 apresenta um local de ligação para a p53, de modo que a interação molecular favorece o processo de transcrição do gene *p21*. Defeitos na função da p53, como fator de transcrição, estão associados a muitos tipos de câncer em humanos incluindo o câncer de mama (DURONIO; XIONG, 2013; HOLSTEGE et al., 2010; KOBOLDT et al., 2012; SHAH et al., 2012).

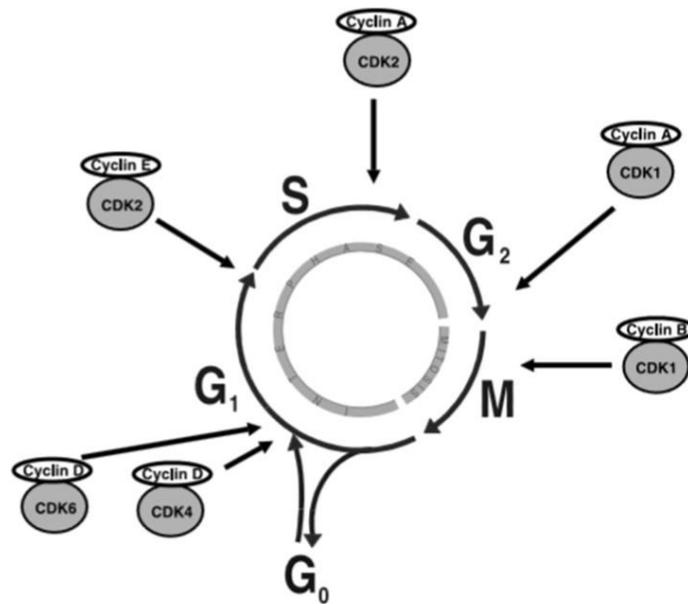


Figura 2 - Fases do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN (2003).

A expressão e ativação da p15 e p27 aumentam em resposta ao fator de crescimento transformante β (TGF- β), contribuindo para a parada do ciclo na fase G1/S (NAKAYAMA; NAKAYAMA, 1998). A redução de p27 nuclear e o seu acúmulo no citoplasma tem sido observado em vários tipos de tumores e estão associados com um prognóstico ruim para o câncer de mama (DURONIO; XIONG, 2013).

A integridade do genoma e a segregação equacional dos cromossomos para as células filhas são eventos altamente regulados ao longo do ciclo celular. Vias importantes de sinalização são ativadas para evitar a propagação de genomas anormais. Assim sendo, existem pontos críticos, denominados pontos de checagem (do inglês – *checkpoints*) que operam nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular para prevenir a propagação de cariótipos anormais (PIETENPOL; STEWART, 2002; KASTAN; BARTEK, 2004).

Os pontos de checagem relacionados ao monitoramento de danos ao DNA operam nas fases G1, S e G2 (Figura 3) e, na fase M, existe um complexo mecanismo de verificação relacionado à montagem do fuso mitótico e sua ligação às regiões cinetocóricas dos cromossomos. Este último é denominado de ponto de checagem do fuso mitótico (LAPENNA; GIORDANO, 2009). A detecção de cromossomos desalinhados no fuso mitótico interrompe o ciclo celular na metáfase

pela inibição da subunidade Cdc20 do complexo promotor da anáfase (APC), o que impede a transição metáfase-anáfase (VERMEULEN; BOCKTAELE; BERNEMANN, 2003). Defeitos nos pontos de checagem são normalmente observados em células tumorais (KASTAN; BARTEK, 2004).

As serina-treonina cinases ATR (do inglês, *ataxia telangiectasia and RAD3-related*) e ATM (do inglês, *ataxia telangiectasia mutated*) são sensores de danos ao DNA, as quais iniciam uma cascata de sinalização em resposta a diferentes tipos de danos ao DNA. ATR e ATM, quando ativadas, fosforilam vários substratos, incluindo proteínas envolvidas na ativação de *checkpoints*, na replicação do DNA e na maquinaria de reparo (MATSUOCA et al., 2007).

ATM está presente na célula como um homodímero inativo e primariamente responde a danos causados por quebras que envolvem as duas fitas de DNA (*double-strand breaks*, DSBs), incluindo os danos causados por radiação ionizante e agentes externos como, por exemplo, drogas radiomiméticas. Sua ativação ocorre por auto-fosforilação, de modo que formam monômeros ativos nos pontos de DSBs. ATM ativada inicia uma cascata de sinalização que resulta em bloqueio do ciclo, ativação da maquinaria de reparo e, alternativamente, apoptose. Dentre os vários substratos de ATM estão a Histona H2AX e Chk2 (do inglês, *checkpoint kinase 2*) (SMITH et al., 2010). Segundo Antoni e colaboradores (2007), indivíduos que apresentam mutação no gene que codifica Chk2 são mais susceptíveis ao desenvolvimento de câncer de mama. A fosforilação de Histona H2AX é crítica para a transdução de sinal que recruta proteínas associadas ao reparo de DNA. A Chk2 fosforilada, por sua vez, ativa o *checkpoint* na transição G1/S através da inibição da CDK2, a qual é mediada por p53 (SMITH et al., 2010). ATM pode também fosforilar e ativar diretamente a p53 que, por sua vez, induz a expressão de vários genes incluindo a p21, cuja atividade inibe a progressão do ciclo celular na transição G1/S (Figura 3).

ATR é considerada principal efetora do *checkpoint* G2/M, ativada em resposta a danos no DNA causados por bloqueio na forquilha de replicação, por agentes exógenos que danificam o DNA, tais como luz UV, agentes alquilantes e compostos de platina, podendo também ser ativada pela ATM em resposta a DSBs. É encontrada formando um complexo com a proteína ATRIP (proteína que interage

com ATR), sendo que o seu principal substrato é a Chk1 (do inglês, *checkpoint kinase 1*) (MATSUOCA et al., 2007).

Células com DNA danificado que já passaram pela transição G1/S, ou ainda células que apresentam alterações na via de sinalização mediada por p53, podem ter seu ciclo bloqueado pela ativação da Chk1, cuja atividade é sequestrar no citoplasma a fosfatase Cdc25 impedindo a remoção do fosfato inibitório presente nos complexos CDK-ciclinas. Embora a ativação dos complexos CDK-ciclinas seja mediada principalmente pela interação molecular entre CDKs e ciclinas específicas, a atividade desses complexos pode ser inibida pela presença de grupamentos fosfatos em sítios críticos que impedem sua ativação. Dessa forma, a atividade da fosfatase Cdc25 é essencial para que os complexos CDK-ciclinas sejam totalmente ativados pela remoção do fosfato inibitório (Figura 3). A ativação das Cdc25A e Cdc25C é essencial para ativação do complexo CDK2-ciclina A e CDK1-ciclina B, respectivamente (SMITH et al., 2010).

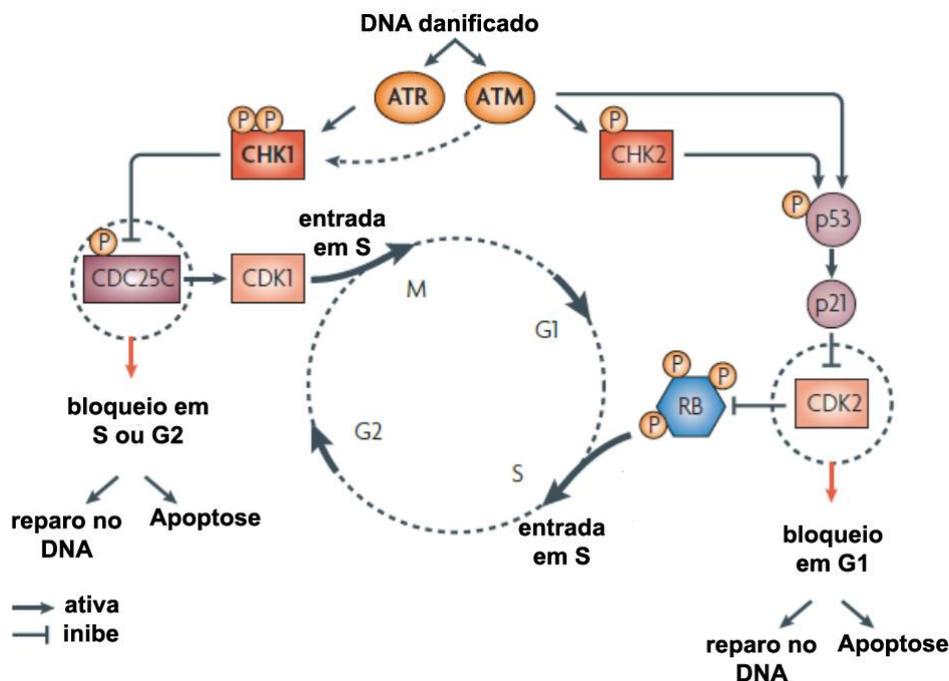


Figura 3 - Pontos de checagem de danos ao DNA.
Fonte: Adaptado de Lapenna; Giordano (2009).

Considerando que diariamente o organismo humano é exposto a uma série de agentes potencialmente genotóxicos, a ativação de *checkpoints* que resultam no bloqueio do ciclo celular, ativação da maquinaria de reparo e, eventualmente, na indução de apoptose é essencial para preservar a integridade do genoma,

especialmente em células que estão constantemente proliferando. Defeitos na via de sinalização relacionada ao checkpoint G1/S frequentemente ocorrem em células tumorais e pode estar relacionado a alterações nas funções de p53 (VOLGELSTEIN et al. 2010).

No câncer de mama, comumente são observadas alterações em genes que regulam o ciclo celular, fato que contribui para a proliferação descontrolada. Inativação de genes supressores de tumor, como pRb e p53 resulta na disfunção de proteínas que normalmente inibem a progressão do ciclo celular (MCDONALD; EL DEIRY, 2000). A perda de pRB em tumores classificados como triplo negativos contribui para o fenótipo agressivo desse tipo de tumor. Nesse mesmo tipo tumoral, o gene *Tp53* encontra-se deletado ou mutado (Holstege et al., 2010; Koboldt et al., 2012; Shah et al., 2012).

O uso de drogas genotóxicas ainda representa uma estratégia importante no combate ao câncer, no entanto, os fármacos dessa classe disponíveis no mercado atualmente tem severos efeitos colaterais. Assim sendo, é necessário entender os mecanismos moleculares envolvidos com a indução de apoptose em resposta a danos ao DNA para que compostos menos tóxicos e mais seletivos sejam identificados (SMITH et al., 2010).

2.5 APOPTOSE

Apoptose trata-se de um processo altamente regulado e constitui um evento de fundamental importância para os organismos multicelulares, considerando que permite a eliminação de células desnecessárias, envelhecidas ou alteradas. Alterações nos mecanismos que regulam a apoptose estão relacionadas a algumas doenças incluindo o câncer. Células tumorais são resistentes aos sinais de morte e esse aspecto representa um fator crítico na progressão do tumor (FESIK, 2005).

Duas principais vias estão relacionadas à indução de apoptose, a via extrínseca e a intrínseca, as quais podem estar interrelacionadas. A via extrínseca envolve a participação dos receptores de morte incluindo os receptores para FAS e TRAIL, membros da superfamília de receptores TNF (Fator de Necrose Tumoral). A

via intrínseca ou via mitocondrial é desencadeada pela liberação de citocromo-c pela mitocôndria em resposta a estímulos pró-apoptóticos. Ambas as vias levam à ativação de uma cascata proteolítica que envolve as caspases. Estas por sua vez, quando ativadas, clivam moléculas reguladoras e estruturais e contribuem para a fragmentação celular em corpos apoptóticos (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005). SHIN e colaboradores (2001) demonstraram que TRAIL-R1/R2 apresenta-se mutado em cânceres de mama metastáticos, sendo assim, essas mutações levam a supressão da apoptose mediada pelo receptor de morte.

As clivagens proteolíticas que ocorrem durante a apoptose envolvem membros da família de proteases dependentes de cisteína, as caspases. Foram identificadas 12 caspases em humanos, sendo que seis isoformas estão envolvidas no processo. As caspases 8, 9 e 10 são iniciadoras e, quando ativadas, atuam na clivagem proteolítica das caspases executoras (3, 6 e 7), as quais orquestram os eventos-chave para a formação dos corpos apoptóticos (WANG et al., 2013).

A família Bcl-2 é constituída por diferentes membros que apresentam atividade anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w e A-1) e pró-apoptótica (Bax, Bak, Bik, Bad, Bid, HRK, BMF, NOXA e PUMA). Esta família de proteínas mantém o balanço entre sobrevivência e morte celular por regular a integridade mitocondrial e ativação de caspase. Alterações no perfil de expressão e ativação de membros da família Bcl-2 são determinantes no desenvolvimento do câncer (THOMAS et al., 2013; BORNER, 2003; ELKHOLI et al., 2014).

Super-expressão de genes anti-apoptóticos tem sido comumente observada em células tumorais que estão sob estímulo de sinais oncogênicos, incluindo as derivadas de tumor de mama (SÉVENO et al., 2012). Segundo Del Bufalo e colaboradores (1997) linhagens de câncer de mama, como de carcinoma de mama ductal invasivo, apresentam super-expressão de Bcl-2 aumentando seu potencial metastático. Bax, uma proteína com atividade pró-apoptótica, também tem sido associada com o câncer de mama, pois apresenta-se quase ausente em algumas linhagens tumorais (BARGOU et al., 1995). Assim sendo, drogas com atividade pró-apoptótica são de grande interesse no combate ao câncer (CHOUDHURI et al., 2002).

2.6 VIAS DE SINALIZAÇÃO

Alterações nas vias de sinalização celular que conduzem à proliferação descontrolada, sobrevivência, invasão e metástases são características cada vez mais evidentes no processo de tumorigênese e progressão do câncer de mama, assim como na resistência as terapias (GONZALEZ-ANGULO; BLUMENSCHNEIN, 2013).

O receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2/neu), um membro da família de receptores tirosina-cinase, responde a vários estímulos endógenos ou exógenos, ativando diferentes cascatas de vias de sinalização intracelular, as quais incluem PI3K/Akt/mTOR, e Raf/Mek/Erk, que regulam diversas respostas, incluindo a proliferação, diferenciação, migração celular e sobrevivência (ARIAS-ROMERO; CHERNOFF, 2010).

A amplificação de HER2 no câncer de mama é observada em 25% a 30% dos casos e está associada a sobrevida livre de doença e sobrevida global reduzidas. Essa superexpressão ocorre tanto no tumor primário como nas metástases, sugerindo a sinalização por receptores de fatores de crescimento, alvos potenciais no tratamento dos tumores de mama (RHO et al., 2011).

Alterações na via PI3K/Akt/mTOR e Raf/Mek/Erk são frequentemente observadas em tumores de mama e são relevantes para os três principais subtipos, Luminal A/ HER-positivo/ Basal-*like*. A via PI3K/Akt/mTOR desempenha um papel fundamental no metabolismo, crescimento e sobrevivência de células tumorais. Comumente observa-se hiperativação dessa via de sinalização no câncer de mama, predominantemente do tipo basal-*like*, como consequência da superexpressão dos receptores HER2 e IGF-1 ou perda de PTEN, principal regulador negativo dessa via. Mutações com ganho de função no gene *PIK3CA*, que codifica a subunidade catalítica de PI3K, são comumente observadas em tumores luminal e HER2-positivo. Assim sendo, os diferentes subtipos de câncer de mama apresentam diferenças em relação as alterações moleculares na via PI3K/Akt/mTOR (SAINI et al., 2013).

A ativação da via MAPK/MEK/ERK também é frequentemente observada no câncer de mama e está associada ao aumento do risco de metástase (MIRZOEVA

et al., 2009). Mutações oncogênicas em *Ras* e *Raf* são eventos frequentes em uma variedade de carcinomas mas, em contraste, mutações ativadoras no oncogene *Ras*/MAPK são eventos altamente raros do câncer de mama, sendo mais frequentes no subtipo basal-*like* (GILTNANE; BALKO, 2014).

A dupla inibição das vias PI3K/Akt/mTOR e Raf/Mek/Erk são identificadas como alvos potenciais para o tratamento do câncer de mama, podendo apresentar significativo benefício clínico (SAINI et al., 2013).

2.7 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE PARA A IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

O Brasil apresenta uma rica biodiversidade, a qual pode ser explorada como fonte de pesquisas para a identificação de novas moléculas com potencial terapêutico (FUNARI; FERRO, 2005). Grande parte dos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento de câncer é de origem natural, sendo seus protótipos iniciais derivados de vegetais, micro-organismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres. Os vegetais representam uma fonte importante para a identificação de novas substâncias com potencial anticâncer devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos (BRANDÃO et al., 2010).

A família Guttiferae, planta nativa brasileira, possui aproximadamente 50 gêneros e 1200 espécies, sendo que muitas espécies são conhecidas por suas propriedades medicinais (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). A análise dos constituintes químicos de membros do gênero *Garcinia* evidenciou a presença de substâncias com propriedades farmacológicas importantes, as quais incluem flavonoides, xantonas e benzofenonas (SANTOS et al., 1999).

A 7-epiclusianona é uma benzofenona tetraprenilada (Figura 4) que foi isolada por Santos et al. (1999) a partir do extrato hexânico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* (também conhecida como *Rheedia brasiliensis*), uma planta nativa brasileira.

Esse composto apresenta diferentes propriedades biológicas que inclui ação vasodilatadora, antianafilática (MURATA et al., 2010), antimicrobiana (ALMEIDA et al., 2011), antiespasmódica (COELHO et al., 2008), anti-inflamatória e antinociceptiva (SANTA-CECÍLIA et al., 2011). A atividade citotóxica de 7-epiclusianona foi observada em linhagens celulares derivadas de leucemias (NEDIALKOV et al., 2011). Estudo prévio mostrou que essa molécula apresenta atividade antiproliferativa sobre linhagens celulares derivadas de tumores humanos (MURATA et al., 2010), os quais incluem o câncer de mama. Do ponto de vista estrutural, a 7-epiclusianona apresenta um grupo prenil ligado ao átomo de carbono 5 do núcleo bicíclico responsável pelo aumento do caráter lipofílico dessa molécula (DEROGIS et al., 2008). Assim, verifica-se um aumento da capacidade da 7-epiclusianona de se ligar e penetrar nas células, o que pode explicar seu potencial antiproliferativo frente às linhagens tumorais (MURATA et al., 2010).

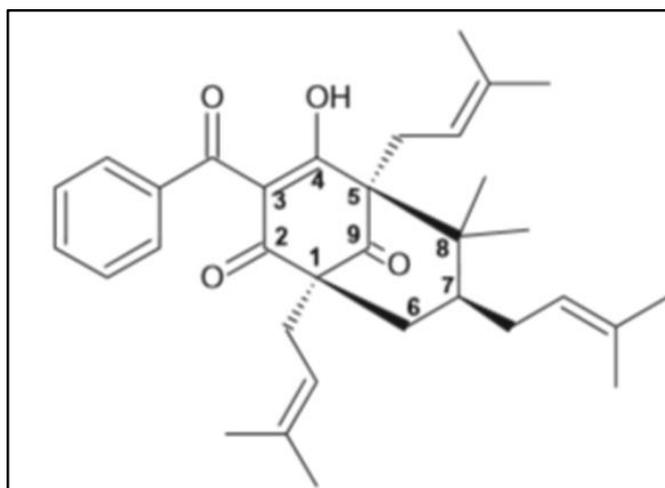


Figura 4 – Estrutura química da 7-epiclusianona [3-benzoil-4-hidroxi-6,6-dimetil-1,5,7-tris (3-metil-2-butenil) biciclo [3.3.1] non-3-eno-2,9-diona].
Fonte: Adaptado de MURATA et al. (2010).

Os estudos realizados até o momento demonstraram o potencial antiproliferativo de 7-epiclusianona sobre células derivadas de cânceres humanos. Contudo, os mecanismos biológicos relacionados com essa atividade ainda não foram investigados, especialmente em tumores sólidos. Dessa forma novos estudos devem ser conduzidos para investigar os mecanismos relacionados à propriedade antitumoral sobre células derivadas de Carcinoma de mama humana.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram organizados em objetivos geral e específico, os quais seguem detalhados abaixo.

3.1 Objetivo geral

- Analisar os efeitos citotóxicos e/ou antiproliferativo da 7-epiclusianona sobre as linhagens celulares, MCF-7 e Hs 578T, derivadas de câncer de mama humana.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência de 7-epiclusianona sobre o comportamento e a dinâmica de progressão do ciclo celular;
- verificar o potencial pró-apoptótico da 7-epiclusianona por meio de diferentes abordagens metodológicas;
- investigar o potencial do composto estudado na regulação do perfil de expressão de genes relacionados à regulação do ciclo celular e apoptose;
- avaliar a influência de 7-epiclusianona no perfil de ativação de ERK, um modulador importante de proliferação e morte celular;
- avaliar o efeito genotóxico do composto estudado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os delineamentos experimentais utilizados no presente trabalho seguem detalhados abaixo.

4.1 Condições de cultivo

As linhagens celulares utilizadas no presente estudo foram a MCF-7 e a Hs 578T, adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro e “American type culture collection cell lines and hybridomas” (ATCC), respectivamente.

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). As células foram mantidas em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂ e subcultivadas regularmente a cada dois dias.

4.2 Esquema de tratamento

De acordo com a abordagem experimental, as células foram semeadas em placas de 6 poços (inóculo 2x10⁵ células/poço), 24 poços (inóculo 1x10⁵ células/poço) e 96 poços (inóculo de 1x10⁴ células/poço); ou ainda em placas de Petri com 100mm de diâmetro (inóculo de 2x10⁶ células/placa). Após a adesão celular (24h), as amostras foram tratadas com 7-epiclusianona por 24 e 48 horas em diferentes concentrações.

A 7-epiclusianona foi isolada a partir do extrato hexânico do epicarpo da *Garcinia brasiliensis*, por Santos et al. (1999), planta da família Guttiferae coletada no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa. O composto foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Marcelo Henrique Santos do Instituto de Química da mesma Universidade.

4.3 Viabilidade Celular

O método utilizado para avaliar a viabilidade celular foi o 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 nanômetros (nm). A taxa de absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas. Os valores de absorbância obtidos nas amostras tratadas foram comparados com os valores de absorbância das amostras que não foram expostas ao composto estudado. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os resultados obtidos na 1ª série experimental foram confirmados em duas novas séries subsequentes. O valor de IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) foi calculado usando GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

4.4 Quantificação de DNA para análise da progressão do ciclo celular

Após tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (Tripsina 0,05%/EDTA 0,02%, Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e transferidas para tubos Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1000 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 (10 mg/mL) e Iodeto de Propídio (30 mg/mL) (Guava Technologies-Merck Millipore). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7.

4.5 Incorporação de BrdU para a determinação da população celular na fase S do ciclo celular

Uma hora antes do término do tratamento com 7-epiclusianona, o meio de cultura foi substituído por meio fresco suplementado com BrdU (EMD Biociences) 97 μ M. Após esse período, as amostras foram lavadas em PBSA e fixadas em etanol 70% por 5 minutos. Triton X-100 (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) (0.5%) foi usado durante 10 minutos para permeabilização das membranas e tratamento com HCl (1.5 M) por 30 minutos foi realizado para permitir a hidrólise de DNA. Após várias lavagens em PBSA, *anti-BrdU* (1:100 Bu20a Mouse mAb/ Cell Signaling Technology) foi adicionado às amostras. No dia seguinte, as amostras foram incubadas com *anti-IgG* de camundongo (1:100 Sigma Aldrich LTDA, Brasil) por 2 horas a temperatura ambiente. Os núcleos foram corados com DAPI (Molecular Probes-LifeTechnologies) por 30 minutos e as preparações citológicas foram montadas com *anti-fading* (Vecta-Shield, Vector-Lab).

As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Scope.A1, NY, USA). Foram contadas 1000 células por lâmina, em aumento 400x e o experimento foi conduzido em triplicata.

4.6 Determinação da frequência de mitoses

As preparações citológicas marcadas com DAPI (Molecular Probes-LifeTechnologies) foram utilizadas para a determinação do índice mitótico. Foram analisadas 1000 células por amostra, em aumento 400x e o experimento conduzido em triplicata.

4.7 Análise fase G2/M usando marcador molecular específico (Histona H3 fosforilada)

As amostras foram processadas usando o *Kit FlowCellcollect™ Bivariate Cell Cycle* (Merk Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. Dessa forma, as células foram coletadas por digestão enzimática (Tripsina/EDTA, Sigma) e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O precipitado de células foi homogeneizado em *Washing Buffer* e as células fixadas a 4°C por 20 minutos (*Fixation Buffer*). As amostras foram centrifugadas e expostas a solução de permeabilização (*Permeabilization buffer*) por 5 minutos. Após lavagens, as amostras foram incubadas com anti-p-Histone H3 por 1 hora a 4°C em câmara escura. Na sequência, as amostras foram tratadas por 30 minutos com uma solução contendo Iodeto de Propídeo e RNase (temperatura ambiente e câmara escura). A Vincristina (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) foi utilizada como controle positivo na concentração de 10nM. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7.

4.8 Immunoblot

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 4000 rpm 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 ELISA utilizando filtro 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 betamercaptoetanol 1% em água deionizada) e mantidas a 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 30 µg de proteínas totais.

A transferência para membrana de PVDF (Amersham Pharmacia) foi realizada por 2 horas a 200mA 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 3 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 em pó (Molico – Nestlé) a 5% e tween 20 (Pharmacia) a 0,05% por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação.

Os anticorpos primários, Histona H3 fosforilada (Ser10)-R (1:200 Santa-Cruz Biotechnologies sc-8656-R), ERK1 (K-23) (1:200 Santa-Cruz Biotechnologies sc-94), ERK fosforilada (E-4) (1:200 Santa-Cruz Biotechnologies sc-7383), α -Tubulin (1:1000 Sigma Aldrich LTDA, Brasil), β -actina (1:1000 Sigma Aldrich LTDA, Brasil) foram diluídos em solução de bloqueio e a membrana foi 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) conforme especificações do fabricante. Os resultados foram registrados em filme *Hyperfilm Amersham*. A quantificação das bandas foi realizada usando o *software* de domínio público “ImageJ” (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). A Doxorubicina (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) foi utilizada como controle positivo na concentração de 3 μ M.

4.9 Ensaio de capacidade clonogênica

As células foram semeadas em placas de Petri com 35mm de diâmetro (1x10³ células/placa). Após a aderência (24h), as células foram tratadas por 24 horas com 7-epiclusianona nas concentrações de 10 e 20 μ M. Ao término do tratamento, o meio de cultura foi substituído por meio fresco e as culturas foram mantidas por 15 dias em estufa a 37°C. Após a fixação em metanol (Sigma) por 30 minutos, as culturas

foram coradas com solução de Giemsa (1:4 em PBSA) (Sigma) por 5 minutos e lavadas em água destilada. A contagem do número de colônias foi realizada com auxílio de lupa (Lupa Binocular 40x Euromex NOVEX AR Bino).

4.10 Avaliação de apoptose por coloração com Anexina V/PI

As amostras foram processadas usando o *Kit Guava Nexin®* (Merk Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. Dessa forma, as células foram coletadas por digestão enzimática (Tripsina/*EDTA*, Sigma), centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C, lavadas em PBSA gelado e homogeneizadas em uma solução contendo Anexina/FITC e Iodeto de Propídio. Após 40 minutos, as amostras foram analisadas por citometria fluxo (Guava Mini Easy Cyte, 8HT) GuavaSoft 2.7. A Doxorubicina (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) foi utilizada como controle positivo na concentração de 1µM.

4.11 Análise da ativação da caspase-3

As amostras foram processadas usando o *Kit Guava® Caspase 3* de acordo com as instruções do fabricante. Dessa forma, as células foram coletadas por digestão enzimática (Tripsina/*EDTA*, Sigma), centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e lavadas com PBSA. Foram adicionados 10 µl de *Caspase Reagent Working Solution* a cada 100 µl de amostra, as quais foram mantidas a 37°C por 1 hora. Após esse período, 100 µl de 1x *Apoptosis Wash Buffer* foi adicionado às amostras e, após centrifugação (1000 rpm por 5 minutos), o precipitado de células foi homogeneizado em 200 µl de *Caspase 7-AAD Working Solution* (1:40 em 1x *Apoptosis Wash Buffer*). Após incubação de 10 minutos em temperatura ambiente e câmara escura, as amostras foram analisadas por citometria fluxo (Guava Mini Easy Cyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7.

4.12 Ensaio TUNEL

As amostras foram processadas usando o *Kit Guava® Tunel* de acordo com as instruções do fabricante. Assim, as células foram coletadas por digestão enzimática (Tripsina/*EDTA*, Sigma) e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O precipitado de células foi homogeneizado em PBSA e as células foram fixadas com Paraformaldeído 4% por 30 minutos. Após centrifugação, as células foram fixadas em Etanol 70% gelado e mantidas a -20°C por, no mínimo, duas horas. As amostras foram lavadas com *Washing Buffer*, centrifugadas e o precipitado de células foi homogeneizado em *DNA Labeling Mix*. As amostras foram mantidas a 37°C por 1 hora. Na sequência, as amostras foram lavadas (*Rising Buffer*) e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado celular foi homogeneizado em uma solução contendo anti-BrdU (*Anti-BrdU Staining Mix*, Guava® Tunel Kit). Após 30 minutos, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7. A Doxorubicina (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) foi utilizada como controle positivo na concentração de 1µM.

4.13 Ensaio Cometa

A suspensão celular foi obtida por digestão enzimática (Tripsina/*EDTA*, Sigma). As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e o precipitado foi solubilizado em 100 µL de meio de cultura. A partir da suspensão celular obtida, o volume correspondente a 5×10^5 células foi adicionado a 100 µL de agarose (baixo ponto de fusão) (Sigma) e as amostras foram aplicadas sobre lâminas histológicas previamente revestidas com agarose (ponto de fusão padrão) (Sigma). Na sequência, as lâminas foram mantidas a 4°C em solução de lise.

A eletroforese foi realizada em cuba horizontal em condições alcalinas por 25 minutos (25 volts e 300 mA). Deste modo, foi aplicado 1v/cm². Decorrido este processo, as amostras foram transferidas para o tampão de neutralização (15 minutos). Após secas, as amostras foram coradas com *Sybr Green®* (diluição 2x em

PBSA) (Molecular Probes) para observação em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Scope.A1, NY, USA) em aumento de 400x. A quantificação dos danos no DNA foi realizada de acordo com Cavas e Konen (2007). Foram contadas 150 nucleoides por amostra, os quais foram classificados segundo o comprimento da cauda do cometa nas seguintes classes: 0, I, II, III.e IV. O índice de dano genético (GDI) foi calculado usando a fórmula $GDI = [(I) + 2(II) + 3(III) + 4(IV)]/N(I-IV)$, onde I-IV representa o tipo de dano e N(I-IV) o número de nucleoides contados (PITARQUE et al., 1999). A doxorrubicina (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) foi usada como controle positivo na concentração de 1 μ M para MCF-7 e de 3 μ M para Hs 578T.

4.14 Análise de dano no DNA (dupla fita) usando marcador específico Ataxia Telangectasia mutada (ATM)

As amostras foram processadas usando o *Kit ATM DNA Damage* (Merck Millipore). Assim, as células foram coletadas por digestão enzimática (Tripsina/EDTA, Sigma) e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O precipitado de células foi homogeneizado em *Washing Buffer* e as células fixadas com *Fixation Buffer* (20 minutos a 4°C). Após permeabilização (5 minutos em *Permeabilization Buffer*), as células foram incubadas com anti-p-ATM por 1 hora (4° C e câmara escura). As amostras foram lavadas, centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente, e homogeneizadas em uma solução contendo Iodeto de Propídeo e RNase (30 minutos). A doxorrubicina (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) foi usada como controle positivo na concentração de 0,5 μ M para MCF-7 e de 1 μ M para Hs 578T. A análise foi realizada no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7.

4.15 Análise de expressão em nível de RNA mensageiro

As amostras foram coletadas por digestão enzimática (Tripsina/EDTA), as células foram homogeneizadas em 500 μ L de trizol (*TRIzol LS Reagent*, Invitrogen,

EUA) e mantidas a -20°C . Após degelo, foram adicionados $200\ \mu\text{L}$ de clorofórmio às amostras que foram centrifugadas a $13000\ \text{rpm}$ por 15 minutos. A fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com $500\ \mu\text{L}$ de álcool isopropílico 100% gelado. Após centrifugação, o *pellet* foi lavado com $1\ \text{mL}$ de etanol (75%). Após nova centrifugação e retirada do etanol, o RNA foi solubilizado em água DEPC (dietilpirocarbonato), que previne a ação de RNAses. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, NC, USA).

O cDNA foi sintetizado a partir de $1\ \mu\text{g}$ de RNA usando o Kit *Superscript III*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em meio contendo *random primers*, segundo recomendação do fabricante.

O nível de expressão gênica em nível de RNAm foi quantificado através da técnica de PCR em tempo real por detecção contínua de fluorescência através do corante sybr green durante a amplificação das sequências alvo específicas.

Todas as reações foram realizadas no aparelho *ABI PRISMTM 7500*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A amplificação ocorreu em meio contendo $4,5\ \mu\text{L}$ de cDNA diluído 20 vezes, $5\ \mu\text{L}$ de *master mix* (contendo Sybr Green, tampão, dNTPs, Amplitaq Gold, MgCl_2 e ROX como referência passiva) e $0,5\ \mu\text{L}$ de primers ($10\ \mu\text{M}$). Cada amostra foi amplificada em triplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não exceda meio ciclo ($d < 0,5$).

Foi utilizado o método de quantificação relativa, o qual sinaliza a mudança de expressão do gene alvo em relação a uma amostra de calibrador, que nesse caso foram as linhagens tratadas apenas com o solvente DMSO. Como controle endógeno (genes normalizadores), foi utilizado a média de expressão dos genes: *beta-actina* e *gus* e a quantificação relativa foi obtida pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, sendo Ct o ciclo em que o nível de fluorescência alcançou o limiar pré-estabelecido (*threshold*).

Tabela 2 - Sequências de *primers* utilizados para o ensaio de *real time* RT-PCR.

Gene	Sequência do primer
Gus	F5'GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT3' R5'CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA3'
ACTB (β-actina)	F5'GGCACCCAGCACAAATGAAG3' R5'CCGATCCACACGGAGTACTTG3'
CCND1 (Ciclina D1)	F5'CCTCCTCCTCGCACTTCTGT3' R5'CCGTCCATGCGGAAGATC3'
CCNE (Ciclina E)	F5'GGCCAAAATCGACAGGAC3' R5'GGGTCTGCACAGACTGCAT3'
Bcl-xL	F5'TGCATTGTTCCCATAGAGTTCCA3' R5'CCTGAATGACCACCTAGAGCCTT3'
Bax	F5'GGACGAACTGGACAGTAACATGG3' R5'GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC 3'
CASP3 (caspase 3)	F5'GGTATCCATGGAGAACACTGAA3' R5'GAGTCCATTGATTCGCTTCC3'
CASP8 (caspase 8)	F5'TTGCAAGAGGAAATCTCCAAA3' R5'TCCAGCAGGTCCATGTCATCATC3'

4.16 Análise estatística

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

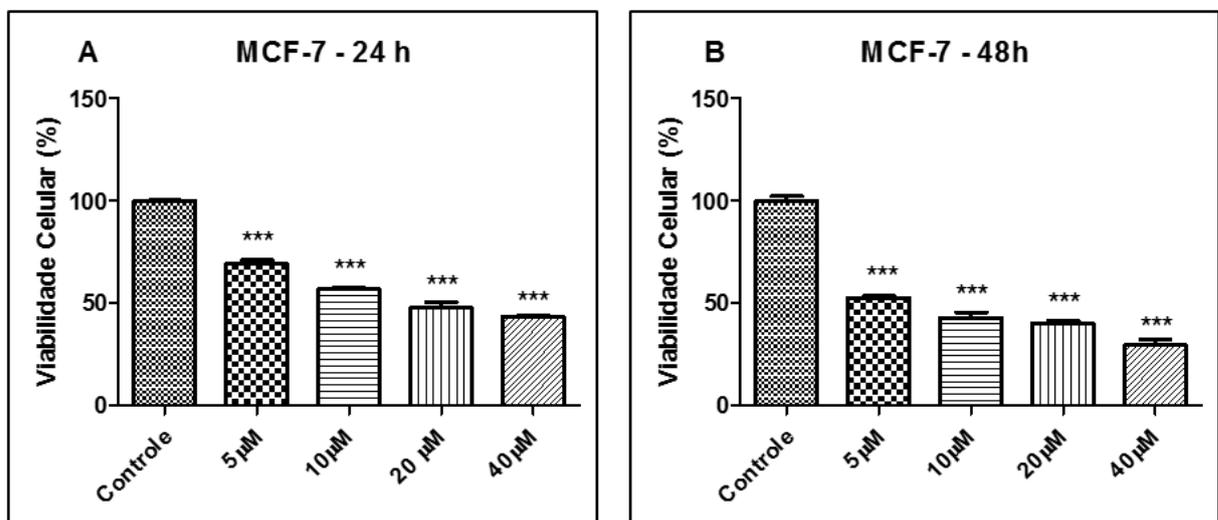
5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nas diferentes abordagens experimentais estão agrupados nos subtópicos abaixo.

5.1 Viabilidade Celular

Os dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, realizados por MTS, são apresentados nas figuras 5 e 6. Foi possível observar que o tratamento com 7-epiclusianona por 24 horas e 48 horas reduziu significativamente a viabilidade celular de ambas as linhagens, MCF-7 e Hs 578T. Os valores de IC_{50} para a MCF-7 foram de 20,14 μ M, após 24 horas de tratamento, e de 6,26 μ M após 48 horas; para a Hs 578T, os valores encontrados foram de 37,11 μ M (24h) e 16,42 μ M (48h).

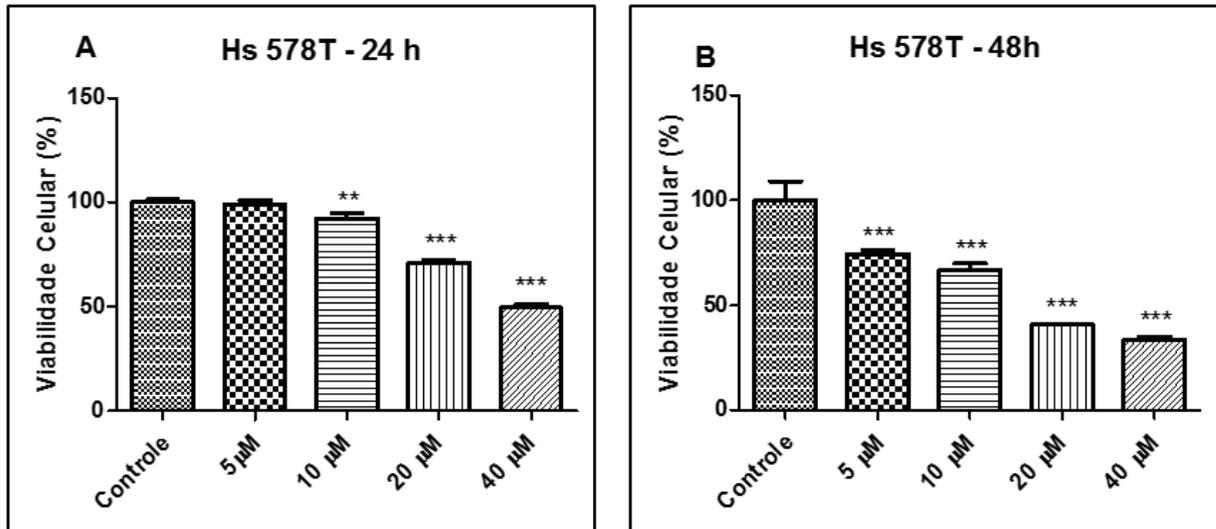
Figura 5 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTS na linhagem MCF-7.



Nota: As células foram tratadas com 7-epiclusianona em diferentes concentrações por 24h (A) e 48h (B). ***p < 0,001 de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

Figura 6 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTS na linhagem Hs 578T.



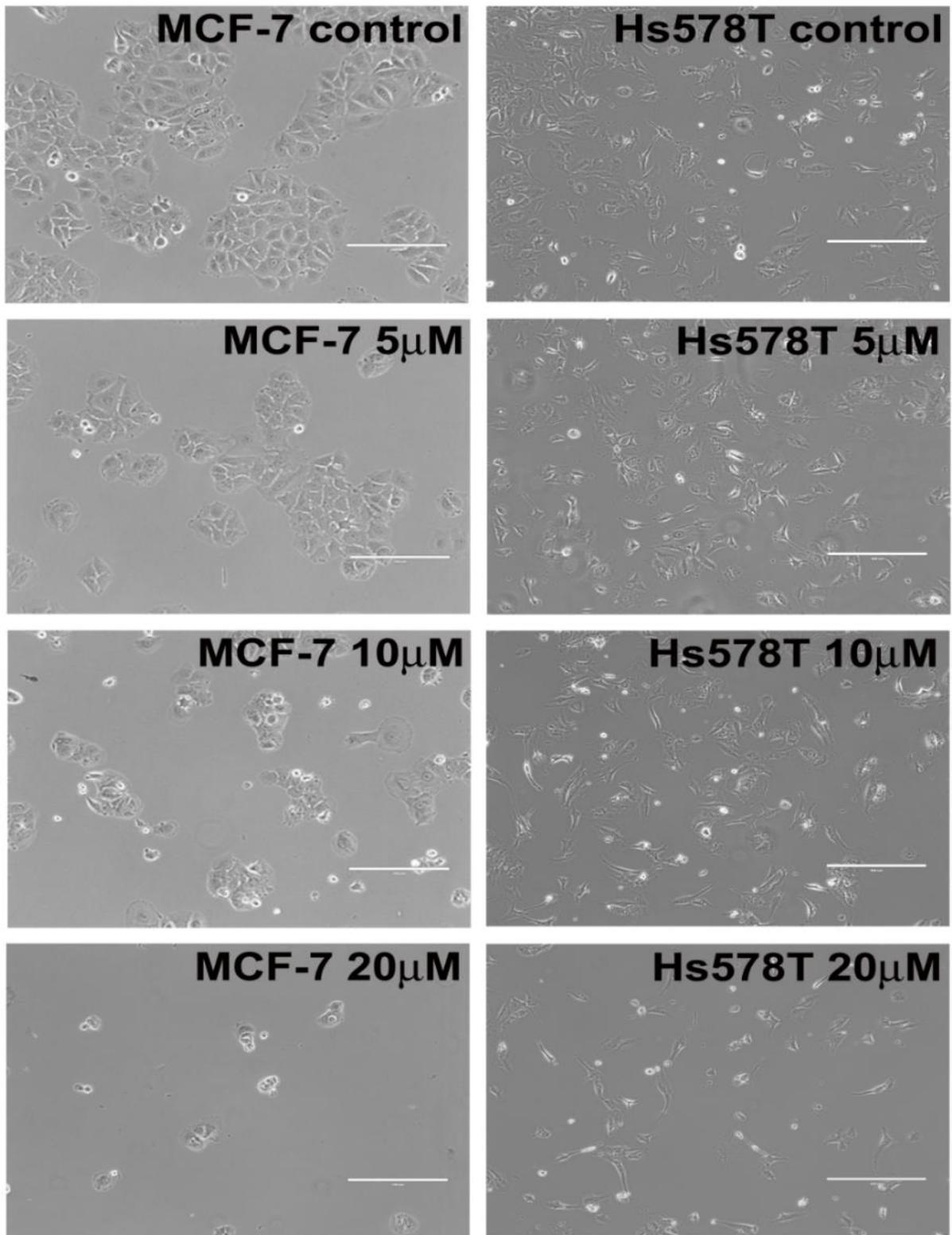
Nota: As células foram tratadas com 7-epiclusianona em diferentes concentrações por 24h (A) e 48h (B). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

5.2 Morfologia

O aspecto morfológico das células foi acompanhado ao longo do tratamento. As imagens obtidas por microscopia de contraste de fase mostraram que o tratamento por 48 horas com 7-epiclusianona alterou o padrão morfológico característico das células MCF-7 e Hs 578T (Figura 7). Foi possível observar uma população de células arredondadas e menos aderidas ao substrato. Além disso, as imagens evidenciam redução na densidade celular em culturas de MCF-7 e Hs 578T tratadas com 7-epiclusianona em concentrações superiores a 5 μM e 20 μM , respectivamente (Figura 7).

Figura 7- Aspecto morfológico das linhagens MCF-7 e Hs 578T após tratamento por 48h.



Nota: Imagens obtidas por microscopia invertida de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico das linhagens MCF-7 e Hs 578T após tratamento com 7-epiclusianona por 48h (Barra = 400 μm).

Fonte: Da autora.

5.3 Análise da progressão do ciclo celular

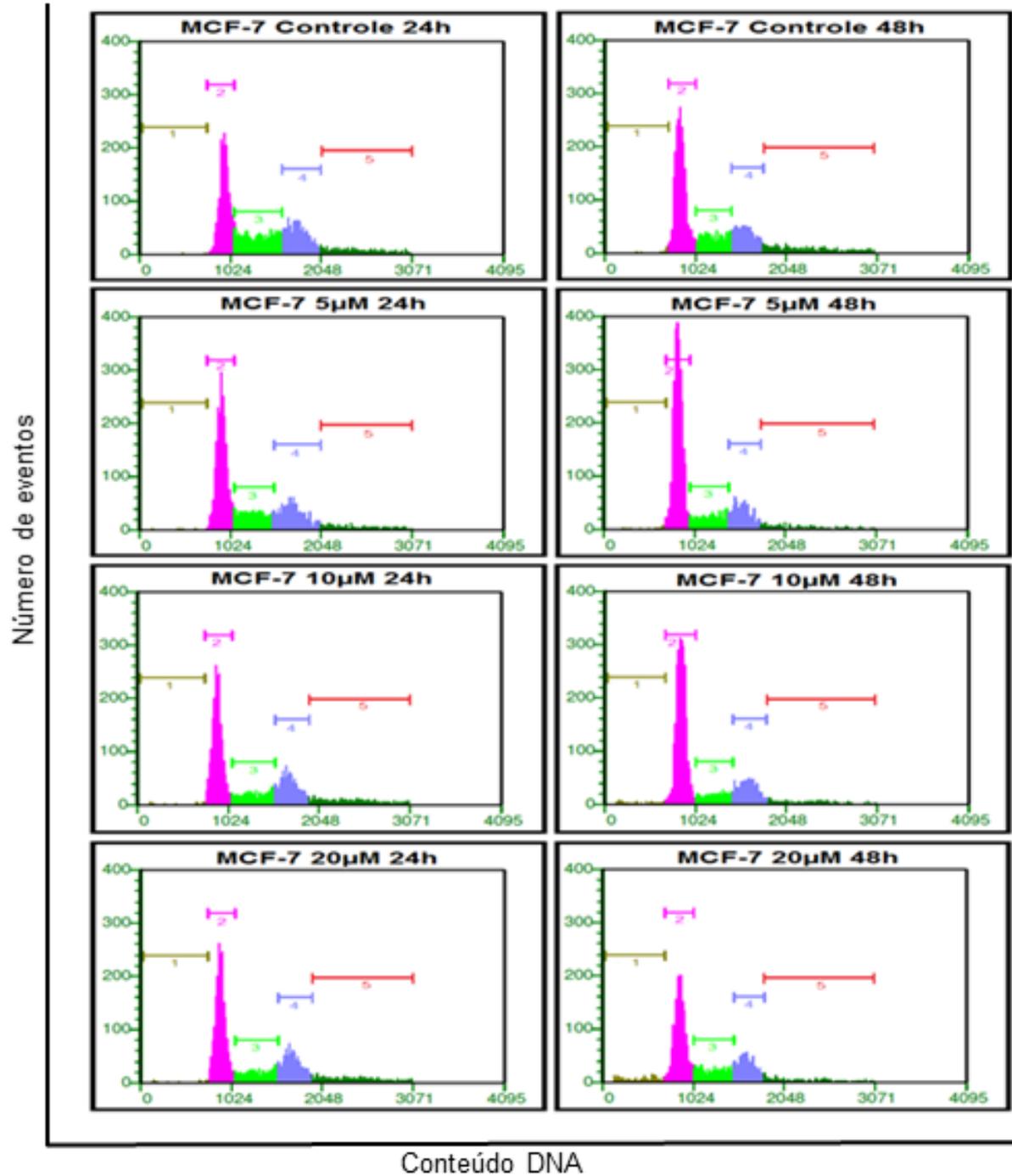
A frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo. De acordo com os resultados, o composto estudado interfere na progressão do ciclo celular e tem atividade citotóxica sobre as células de ambas as linhagens, MCF-7 e Hs 578T, contudo os efeitos são dependentes da concentração utilizada (Figura 8 e Figura 9).

Em culturas de MCF-7 tratadas por 24 e 48 horas com 7-epiclusianona a 5 μM ou 10 μM , foi observado aumento na população G₀/G₁ com concomitante diminuição na frequência de células na fase S. Os dados indicam, portanto, que a 7-epiclusianona induz bloqueio do ciclo celular na transição G₁/S. Entretanto, 7-epiclusianona passa a exercer significativa atividade citotóxica quando utilizada em concentrações igual ou superior a 10 μM (Tabela 3). Foi evidenciado aumento na população sub-G₁ em culturas tratadas com 10 e 20 μM quando comparado às culturas controles (Tabela 3), sendo que a população sub-G₁ é constituída por células mortas que apresentam DNA fragmentado.

Os efeitos da 7-epiclusianona sobre a linhagem Hs 578T, em relação à progressão do ciclo celular, foram similares aos observados na linhagem MCF-7, considerando que houve aumento da população G₀/G₁ com concomitante diminuição da população celular na fase S do ciclo celular em culturas tratadas com 7-epiclusianona a 10 e 20 μM , por 24 e 48 horas. Foi observado também aumento na população sub-G₁, em culturas tratadas com 10 e 20 μM de 7-epiclusianona quando comparado ao grupo controle (Tabela 4).

Os resultados de viabilidade com determinação do IC₅₀ e a análise de progressão do ciclo celular forneceram dados importantes para o delineamento de novas abordagens experimentais que foram realizadas para melhor entender os efeitos antiproliferativo e citotóxico de 7-epiclusianona, previamente observados, sobre as linhagens MCF-7 e Hs 578T.

Figura 8 – Histogramas da distribuição de populações celulares da linhagem MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular.



Nota: Distribuição de populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com 7-epiclusianona por 24 e 48h, na linhagem MCF7. 1=Sub-G1; 2=G0/G1; 3=S; 4=G2/M; 5=hipertetraploide.

Fonte: Da autora

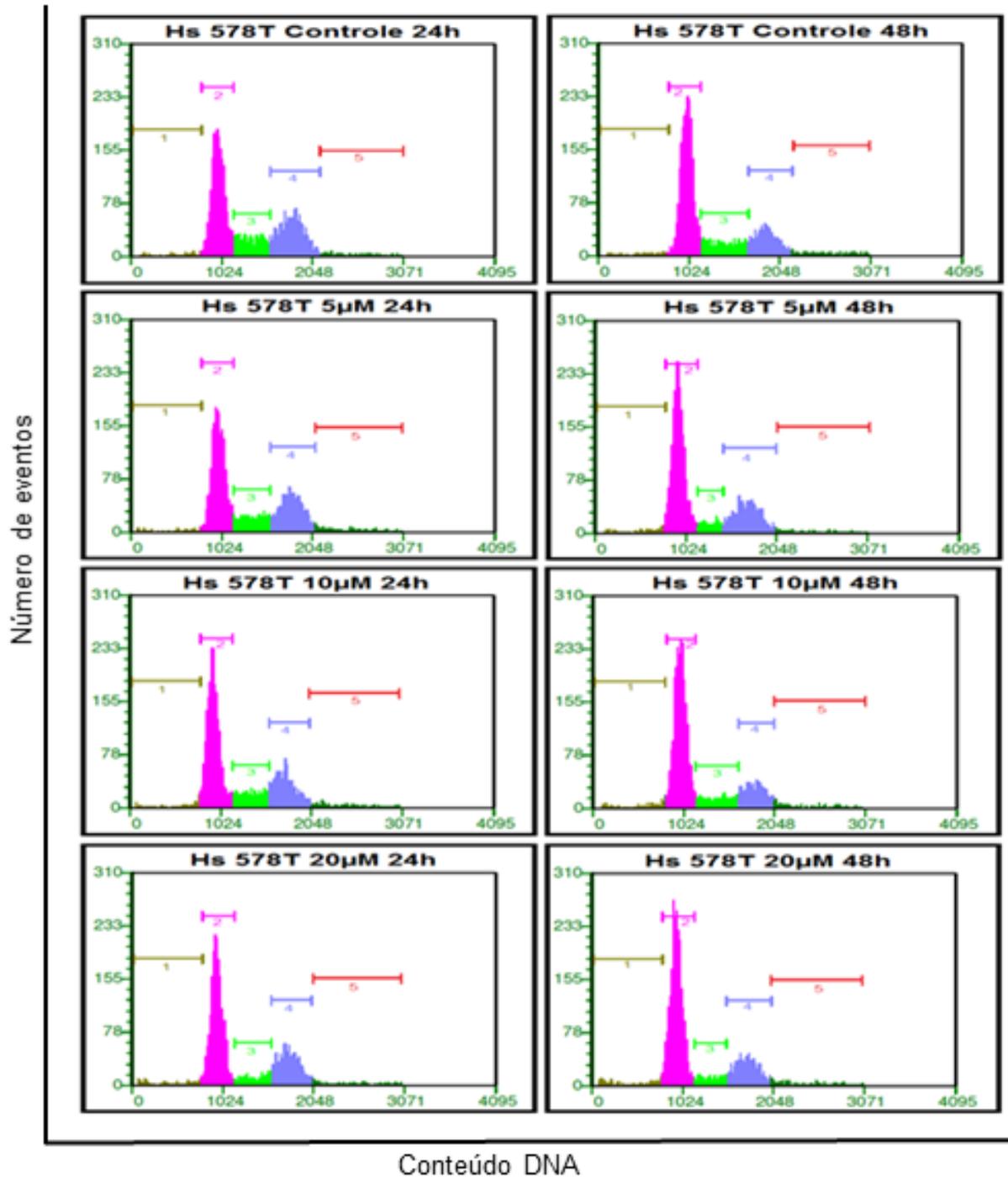
Tabela 3 - Frequência de células MCF-7 nas diferentes fases do ciclo celular determinada por citometria de fluxo, após 24 e 48h de tratamento com 7-epiclusianona em diferentes concentrações.

		SubG1	G0/G1	S	G2/M	>4C
MCF-7 24h	Controle	0,26 ± 0,05	41,26 ± 1,48	26,36 ± 0,77	23,34 ± 1,15	8,75 ± 0,66
	5 µM	0,56 ± 0,05 *	51,48 ± 0,19 ***	19,71 ± 0,69 ***	22,22 ± 0,50	5,99 ± 0,25 ***
	10 µM	0,74 ± 0,15 **	50,63 ± 0,65 ***	17,04 ± 1,71 ***	21,80 ± 1,07	9,76 ± 0,42
	20 µM	1,13 ± 0,11 ***	42,25 ± 0,62	20,05 ± 0,70 ***	29,82 ± 0,56 ***	6,72 ± 0,50 **
MCF-7 48h	Controle	0,90 ± 0,11	52,76 ± 0,86	18,37 ± 0,57	19,90 ± 0,77	8,04 ± 1,28
	5 µM	0,88 ± 0,11	65,70 ± 2,96 ***	14,07 ± 0,98 ***	16,39 ± 1,17 **	2,93 ± 0,80 ***
	10 µM	2,07 ± 0,05 **	62,85 ± 0,54 ***	11,91 ± 0,47 ***	19,18 ± 0,09	3,97 ± 0,21 **
	20 µM	5,56 ± 0,42 ***	50,46 ± 0,95	19,20 ± 0,17	20,49 ± 0,64	4,27 ± 0,42 **

*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 de acordo com a análise de variância e pós teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

Figura 9 – Histogramas da distribuição de populações celulares da linhagem Hs 578T nas diferentes fases do ciclo celular.



Nota: Distribuição de populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com 7-epiclusianona por 24 e 48h, na linhagem Hs 578T. 1=Sub-G1; 2=G0/G1; 3=S; 4=G2/M; 5=hipertetraploide.

Fonte: Da autora.

Tabela 4: Frequência de células Hs 578T nas diferentes fases do ciclo celular determinada por citometria de fluxo, após 24 e 48h de tratamento com 7-epiclusianona em diferentes concentrações.

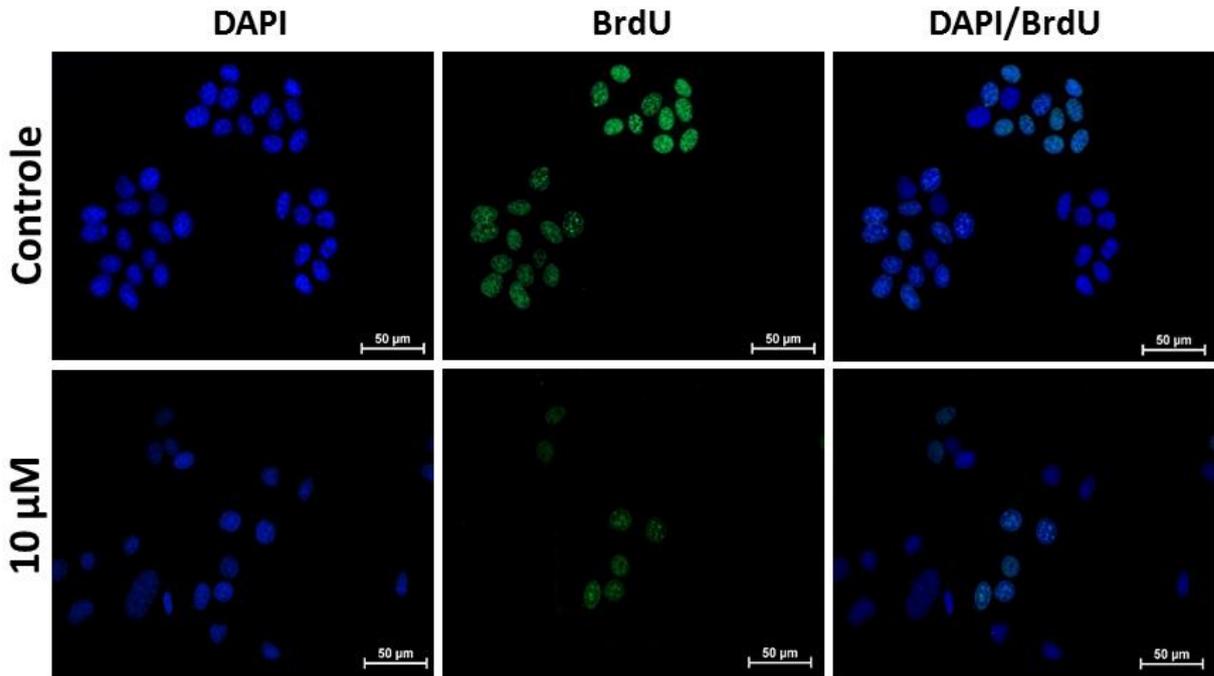
		SubG1	G0/G1	S	G2/M	>4C
Hs 578T 24h	Controle	2,06 ± 0,15	48,64 ± 1,78	16,56 ± 0,16	29,69 ± 1,46	3,03 ± 0,15
	5 µM	2,44 ± 0,41	50,04 ± 1,67	14,45 ± 0,80 *	28,94 ± 0,54	4,11 ± 0,66
	10 µM	3,06 ± 0,28 *	56,53 ± 1,34 ***	13,55 ± 0,41 **	23,08 ± 1,09 ***	3,76 ± 0,39
	20 µM	3,60 ± 0,35 **	56,94 ± 0,90 ***	8,35 ± 0,74 ***	27,02 ± 0,48 *	4,07 ± 0,28
Hs 578T 48h	Controle	2,56 ± 0,35	58,79 ± 1,30	15,58 ± 0,32	18,65 ± 0,85	4,40 ± 0,82
	5 µM	3,15 ± 0,21	61,55 ± 0,90	7,19 ± 0,49 ***	25,90 ± 0,90 ***	2,18 ± 0,05 **
	10 µM	3,36 ± 0,17 *	62,21 ± 1,36 *	12,79 ± 0,78 ***	18,58 ± 0,74	3,02 ± 0,61
	20 µM	4,27 ± 0,14 ***	64,31 ± 0,85 **	6,42 ± 0,27 ***	20,80 ± 0,40*	4,19 ± 0,36

*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 de acordo com a análise de variância e pós teste de Tukey.
Fonte: Da autora.

5.4 Determinação da frequência de células na fase S do ciclo celular por incorporação de BrdU

A determinação da frequência de células na fase S foi realizada utilizando um marcador específico da fase S, a bromodeoxiuridina, uma molécula análoga a timidina que pode ser incorporada ao DNA durante o processo de replicação. O padrão de marcação para BrdU em células MCF-7 pode ser observado na Figura 10. Os dados obtidos confirmaram aqueles previamente observados por citometria de fluxo, considerando que houve redução significativa na frequência de células na fase S do ciclo celular em culturas MCF-7 tratadas com 7-epiclusianona a 5 µM e 10 µM quando comparado ao grupo controle (Figura 11). Os dados sugerem, portanto, bloqueio do ciclo na transição G1/S em consequência do tratamento. Por uma questão técnica, não foi possível realizar essa abordagem metodológica na linhagem Hs 578T, considerando a irregularidade da superfície nuclear.

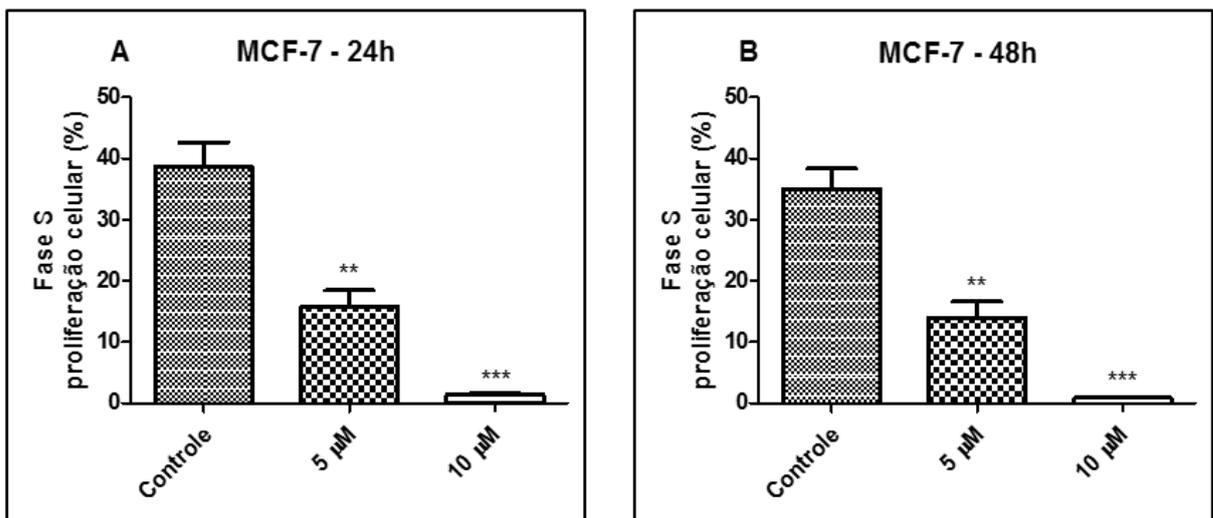
Figura 10 – Imagens fluorescentes de marcação para BrdU em células MCF-7.



Nota: Imagens fluorescentes mostrando o padrão de marcação para BrdU em células MCF-7 tratadas com o veículo (A-C) e com 7-epiclusianona por 48h. Células positivas para BrdU (verde) e núcleos (azul).

Fonte: Da autora.

Figura 11 - Representação gráfica da frequência de células MCF-7 na fase S.



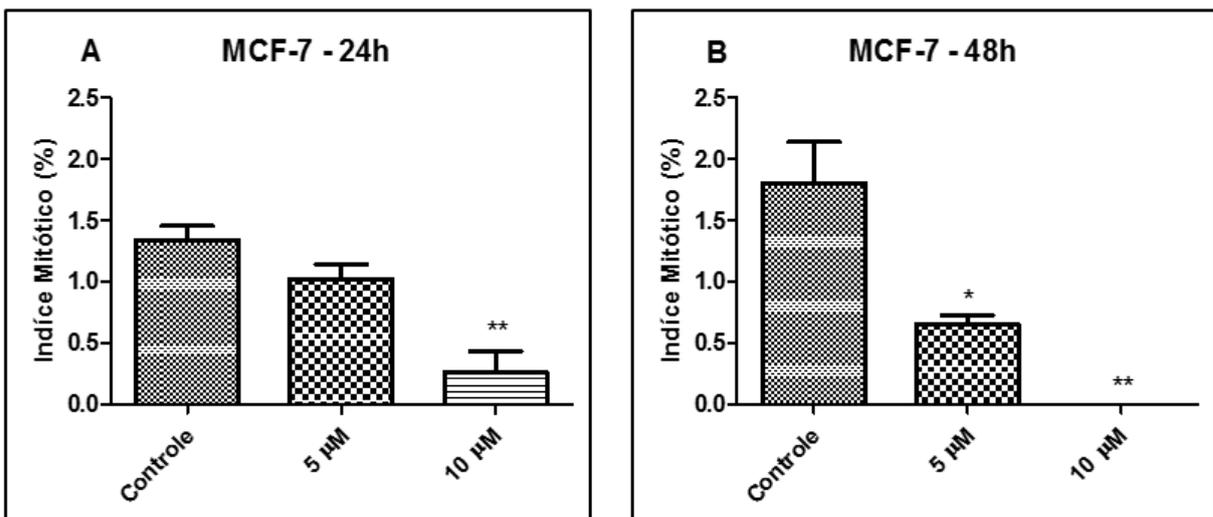
Nota: Frequência de células MCF-7 na fase S determinada a partir de preparações citológicas marcadas para BrdU. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

5.5 Determinação na frequência de mitose e do perfil de expressão de Histona H3 fosforilada

A frequência de células em mitose foi determinada inicialmente em culturas de MCF-7 tratadas com 7-epiclusianona nas concentrações de 5 μM e 10 μM . Considerando a contagem de células mitóticas em preparações citológicas fluorescentes marcadas com DAPI, foi possível observar redução significativa na frequência de mitoses em culturas tratadas quando comparadas ao grupo controle (Figura 12). Não foi possível determinar a frequência de mitose em preparações citológicas da Hs 578T e, portanto, esse parâmetro foi avaliado por *immunoblot* considerando o perfil de expressão de Histona H3 fosforilada. Da mesma forma, foi observada significativa redução no perfil de expressão de Histona H3 fosforilada em culturas de MCF-7 tratadas com 7-epiclusianona a 5 μM e 10 μM , por 24 horas e 48 horas, em relação às amostras não tratadas (Figura 13). Contudo, não foram detectadas bandas imunoreativas em amostras de Hs 578T. A doxorrubicina (DXR) foi usada como controle positivo a uma concentração de 3 μM , de modo que as amostras tratadas com DXR também apresentaram expressão reduzida de Histona H3 fosforilada (Figura 13).

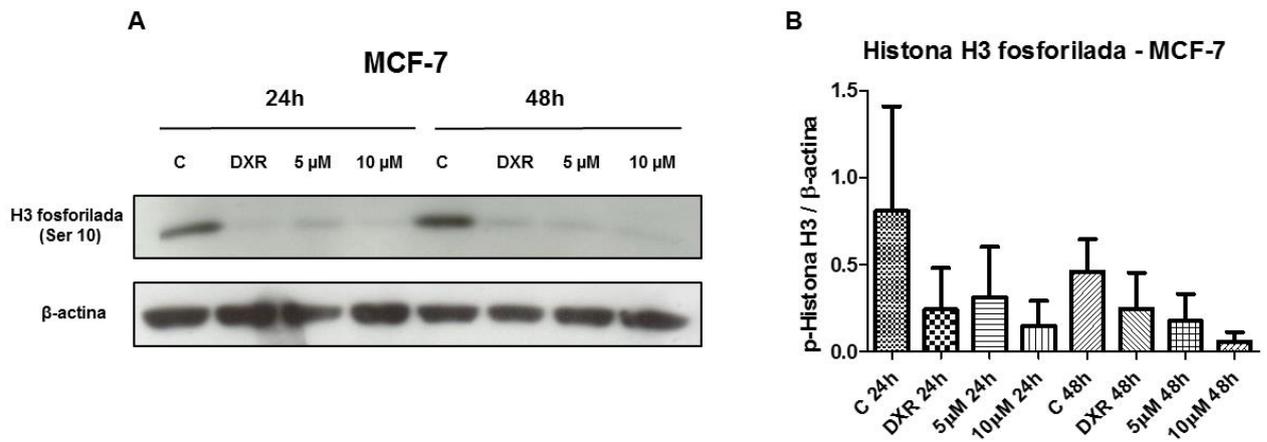
Figura 12 – Representação gráfica da frequência de células MCF-7 em mitose.



Nota: Frequência de células em mitose determinada a partir de preparações citológicas marcadas com DAPI. As células da linhagem MCF-7 foram tratadas por 24 e 48 horas (A e B, respectivamente) com 7-epiclusianona a 5 e 10 μM . * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

Figura 13 – Expressão de Histona H3 fosforilada (Ser10) em células MCF-7.

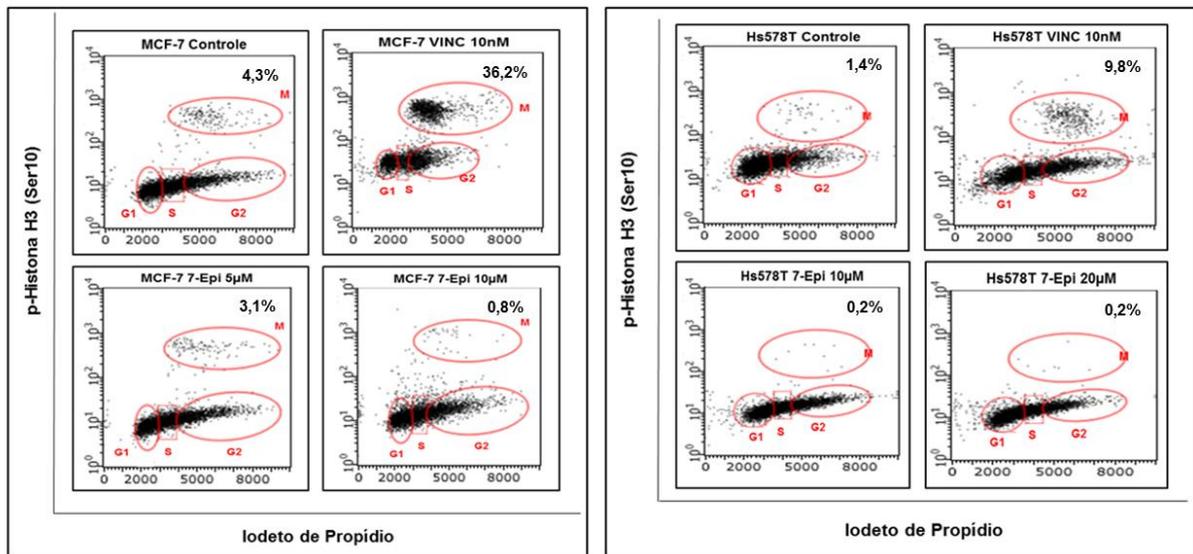


Nota: (A) Expressão de Histona H3 fosforilada (Ser10) (p-H3) obtida por *immunoblot*, após tratamento por 24 e 48 h em células MCF-7. (B) Representação gráfica da quantificação de Histona H3 fosforilada. A Doxorubicina (DXR) foi usada como controle positivo na concentração de 3 μ M. A β -actina foi utilizada como controle de carregamento (30 μ g de proteína/linha).

Fonte: Da autora.

Na sequência, o perfil de expressão de Histona H3 fosforilada foi determinado por citometria de fluxo. Os resultados mostraram redução significativa na frequência de mitoses em culturas MCF-7 tratadas por 24 horas com 7-epiclusianona nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M em relação ao grupo controle (Figuras 14); esse mesmo evento foi observado em culturas de Hs 578T tratadas por 24 horas com 7-epiclusianona nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M (Figuras 14). A Vincristina (Vinc) foi utilizada a 10nM como controle positivo.

Figura 14 – Dot Plots, obtidos por citometria de fluxo, evidenciando a frequência de células MCF-7 e hs 578T marcadas por Histona H3 fosforilada.



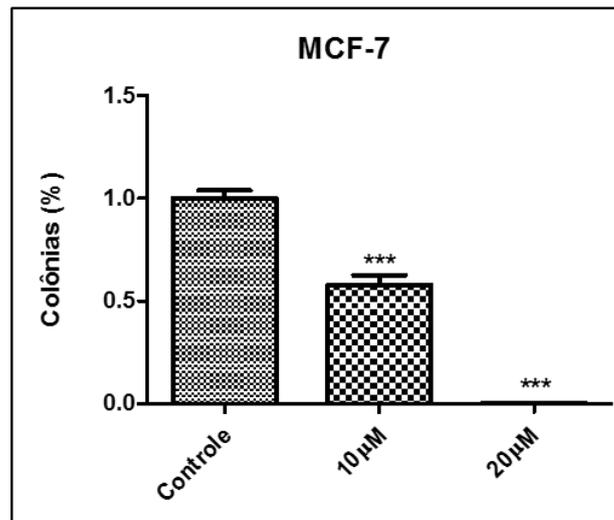
Nota: Frequência de células marcadas somente com Iodeto de Propídio (G1, S e G2) e células marcadas com Iodeto de Propídio e Histona H3-fosforilada (M). Culturas de MCF-7 e Hs 578T foram tratadas por 24h com 7-epiclusianona em diferentes concentrações. Vincristina (VINC) foi utilizada como controle positivo.

Fonte: Da autora.

5.6 Capacidade clonogênica

O ensaio clonogênico foi realizado para avaliar a capacidade de 7-epiclusianona em inibir a formação de colônias, um aspecto importante para determinar a eficiência do composto em inibir a proliferação celular por períodos prolongados. Os resultados mostraram que a capacidade de formar colônias foi significativamente menor em culturas de MCF-7 tratadas com 7-epiclusianona por 24 horas em relação às culturas usadas como controles (Figura 15). Essa abordagem não foi utilizada para a linhagem Hs 578T, considerando que esse tipo celular não cresce em colônias.

Figura 15 - Capacidade clonogênica de células da linhagem MCF-7.



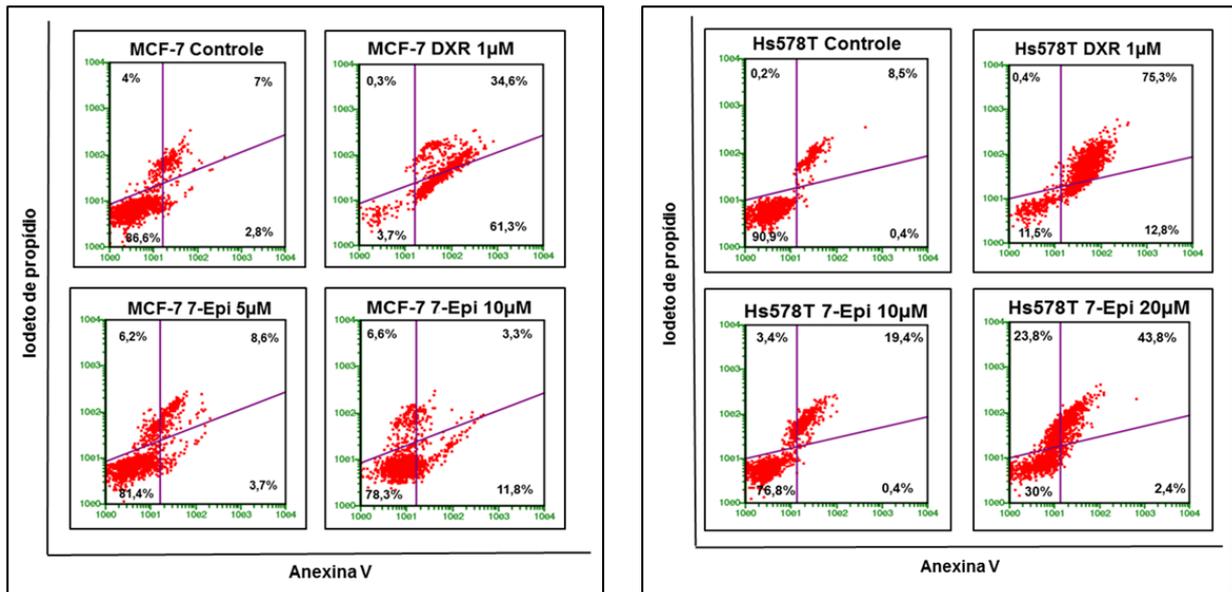
Nota: Capacidade clonogênica de células da linhagem MCF-7 após 24h de tratamento com 7-epiclusianona. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

5.7. Análise do perfil de externalização de fosfatidilserina por marcação com Anexina V

A análise de progressão do ciclo celular, realizada previamente por citometria de fluxo, evidenciou aumento da população Sub-G1 em culturas de MCF-7 e Hs 578T tratadas com 7-epiclusianona. Assim, foram realizados novos ensaios para a identificação de células apoptóticas, os quais incluíram marcação para Anexina V e ativação de caspase-3. A análise do padrão de marcação para Anexina V e Iodeto de Propídio mostrou que a atividade citotóxica de 7-epiclusianona, em parte, está relacionada com a indução de apoptose. Foi observado aumento na frequência de células positivas para Anexina V em culturas de MCF-7 tratadas por 24 horas com 7-epiclusianona 10 µM (11,8%) quando comparada ao grupo controle (2,8%). Em culturas de Hs 578T também foi observado aumento de células positivas para Anexina V em culturas tratadas com 7-epiclusianona a 20 µM (2,4%) em relação ao ao grupo controle (0,4%) (Figuras 16 e 17). A doxorrubicina (DXR) foi usada como controle positivo.

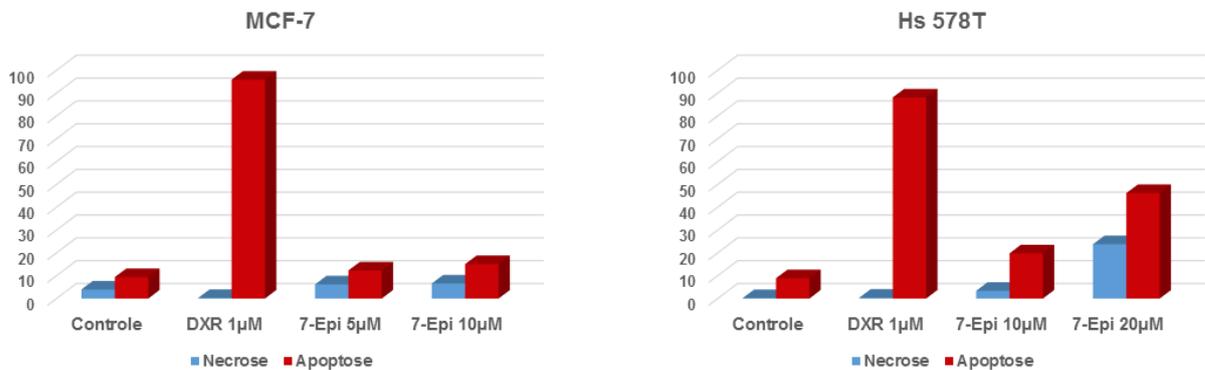
Figura 16 – Dot Plots do perfil de externalização de fosfatidilserina por marcação com Anexina V.



Nota: Dot Plots evidenciando células vivas (quadrante inferior esquerdo), células em fase inicial de apoptose (quadrante inferior direito), células em fase tardia de apoptose (quadrante superior direito) e células necróticas (quadrante superior esquerdo). As células foram tratadas com 7-epiclusianona por 24h.

Fonte: Da autora.

Figura 17 – Representação gráfica da frequência de morte celular por citometria de fluxo.



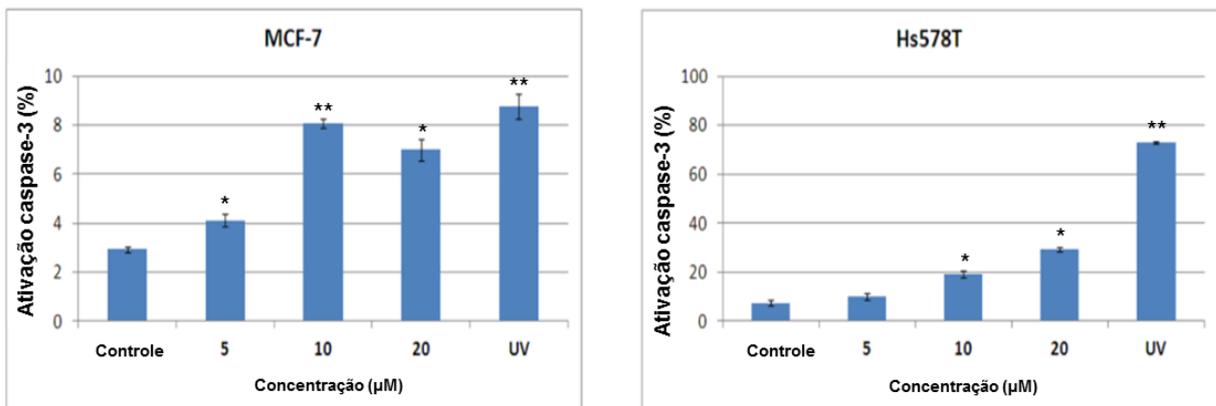
Nota: Frequência de morte celular por citometria de fluxo com dupla marcação Anexina V/IP, após o tratamento de 24h com 7-epiclusianona na linhagem MCF-7 e Hs 578T. A doxorubicina (DXR) foi usada como controle positivo.

Fonte: Da autora.

5.8 Análise do perfil de ativação de caspase-3

A atividade pró-apoptótica de 7-epiclusianona foi confirmada utilizando um parâmetro adicional para avaliar a indução de apoptose. Foram realizados ensaios para a determinação do perfil de ativação de caspase-3, os quais foram analisados por citometria de fluxo. Os dados mostraram que o tratamento induz ativação de caspase-3 tanto em culturas de MCF-7 como nas culturas de Hs 578T tratadas com 7-epiclusianona a 10 e 20 μM . Contudo, a frequência de células com caspase-3 ativada foi maior em amostras de Hs 578T (Figura 18). Esses resultados corroboram os dados previamente observados pela análise de Anexina V e mostram, portanto, que 7-epiclusianona apresenta atividade pró-apoptótica sobre as linhagens celulares estudadas.

Figura 18 – Representação gráfica da ativação de Caspase-3 por citometria de fluxo.



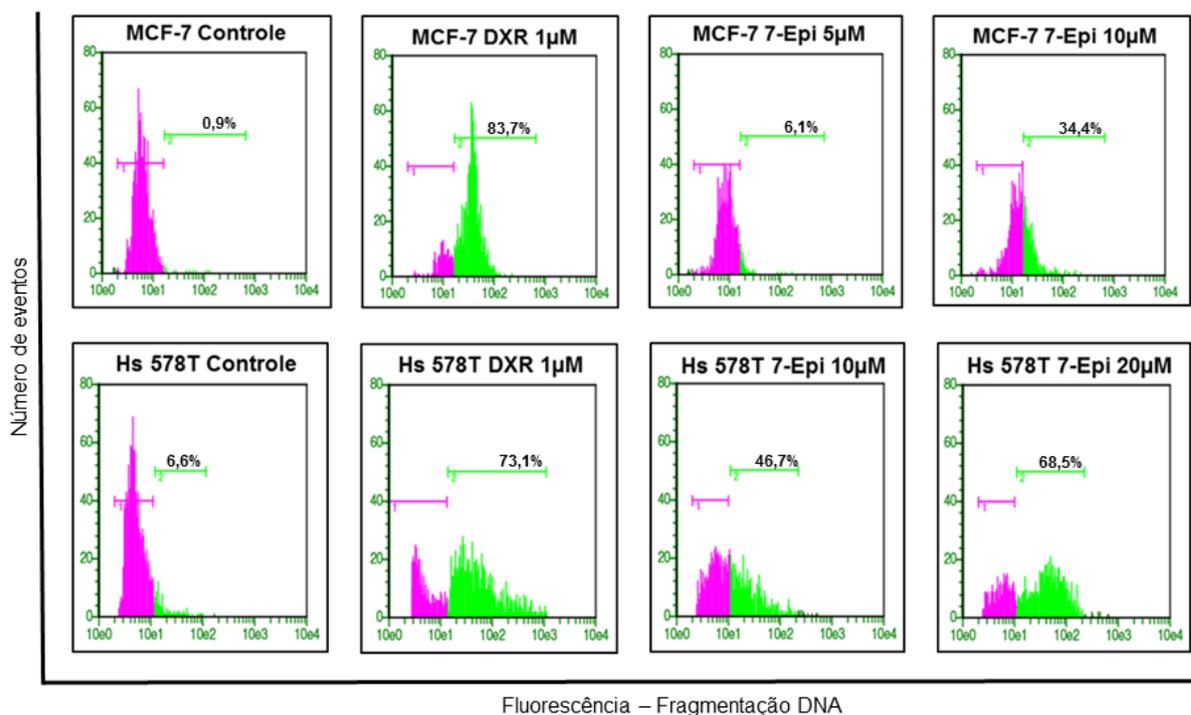
Nota: Ativação de Caspase-3 determinada por citometria de fluxo em amostras de células MCF-7 e Hs 578T tratadas por 48h com 7-epiclusianona. Ultra-violeta (UV) foi usado como controle positivo, o grupo foi exposto à radiação UV por 1 minuto (GL T8 15W/ 254nm). *p < 0,05 e **p < 0,01 de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

5.9 Análise do perfil de fragmentação de DNA determinado por TUNEL

O padrão de fragmentação de DNA induzido por 7-epiclusianona foi avaliado por TUNEL, cuja análise foi realizada por citometria de fluxo. Os dados mostram que houve aumento significativo na frequência de células positivas para TUNEL em consequência ao tratamento com 7-epiclusianona. Em culturas de MCF-7 foram observadas as seguintes frequências de células em apoptose: (0,9%, controle; 6,1%, 7-epi a 5 μM ; e 34,4%, 7-epi a 10 μM). Nas amostras de Hs 578T, as frequências foram: (6,6%, controle; 46,7%, 7-epi a 10 μM ; e 68,5%, 7-epi a 20 μM) (Figuras 19). A doxorubicina (DXR) foi utilizada como controle positivo na concentração de 1 μM .

Figura 19 – Histogramas da distribuição de células não apoptóticas e apoptóticas obtidos por citometria de fluxo.



Nota: Distribuição de células não apoptóticas (1) e apoptóticas (2), após tratamento com 7-epiclusianona por 48 h das linhagens MCF-7 e Hs 578T.

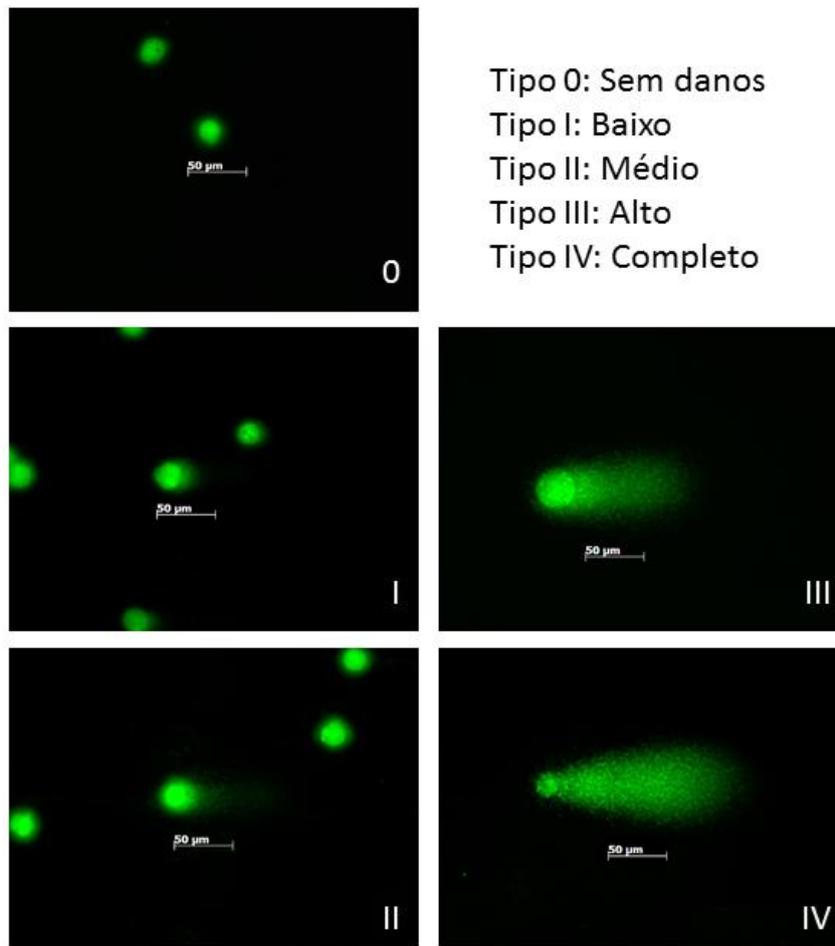
Fonte: Da autora.

5.10 Ensaio de Cometa realizado em condições alcalinas

O ensaio do Cometa é largamente utilizado para análise de dano ao DNA em células individuais e, portanto, foi empregado no presente estudo para avaliar a atividade genotóxica da 7-epiclusianona sobre as linhagens MCF-7 e Hs 578T.

O padrão de fragmentação de DNA, observado nas preparações citológicas, pode ser evidenciado na figura 20. O sistema de classificação e o método de análise foram realizados de acordo com o item 4.13 descrito na seção de materiais e métodos.

Figura 20 – Imagens fluorescentes do cometa observadas em preparações citológicas.



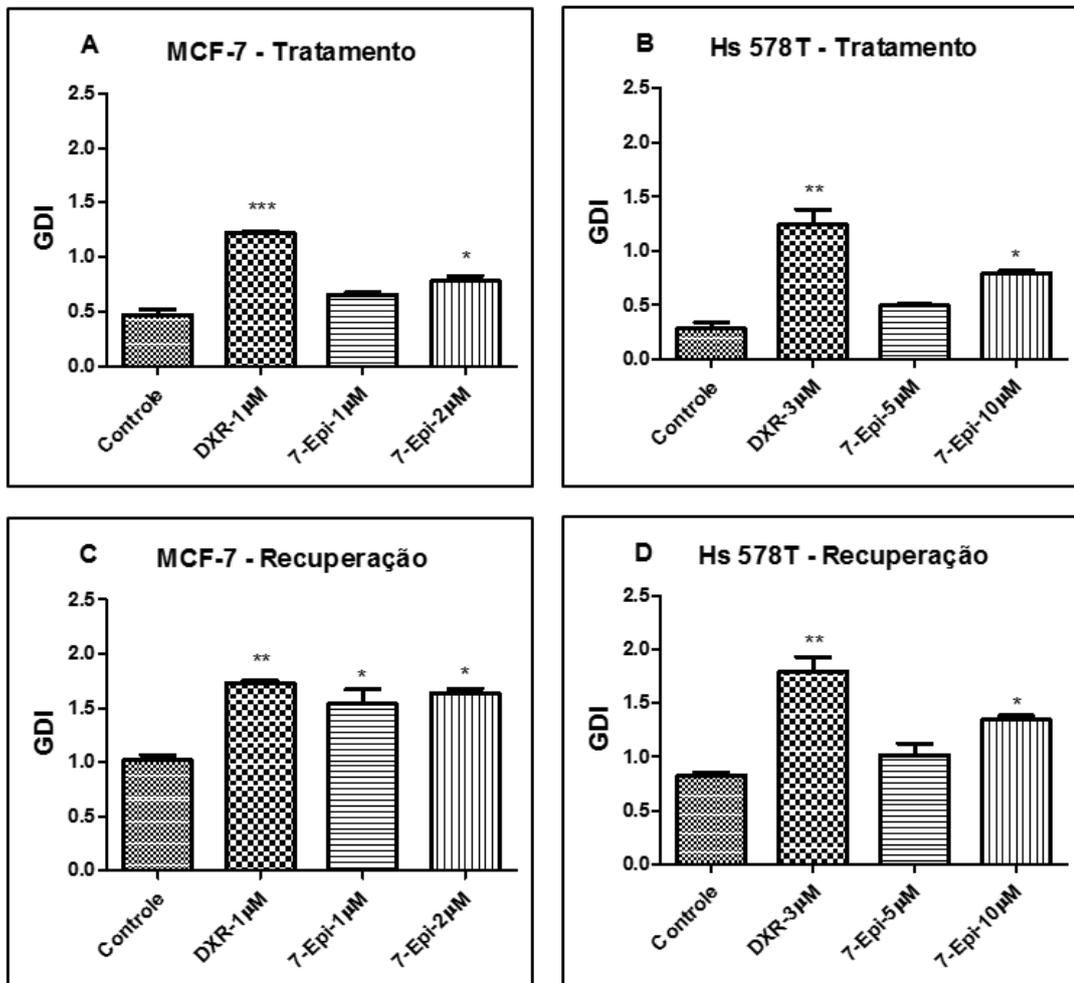
Nota: Imagens fluorescentes do cometa mostrando nucleoides não danificados (0) e danificados (I – IV), utilizado para avaliação visual. As células foram coradas com *Sybr Green* e capturadas em microscópio fluorescente, aumento 40X.

Fonte: Da autora.

De acordo com os resultados, foi possível observar uma diferença significativa do índice de dano genético (GDI) em amostras de MCF-7 tratadas com 7-epiclusianona na concentração de 2 μ M (Figura 21-A), bem como em culturas de Hs 578T tratadas a 10 μ M (Figura 21 -B).

Com o objetivo de verificar se as lesões observadas ao término do tratamento poderiam ser reparadas, as culturas foram recuperadas por 24h em meio fresco, sem a presença do composto. Os resultados mostraram que os índices de danos genéticos ainda eram maiores nas amostras tratadas em relação aos grupos controles (Figuras 21C e 21D). A doxorubicina (DXR) foi usada como controle positivo na concentração de 1 μ M para MCF-7 e de 3 μ M para Hs 578T.

Figura 21 – Representação gráfica da quantificação do índice de dano genético.



Nota: Quantificação do índice de dano genético (GDI) em culturas de células MCF-7(A) e Hs 578T (B) tratadas por 6h com 7-epiclusianona em diferentes concentrações e recuperadas em meio fresco por 24h (C-D) após tempo de tratamento. A doxorubicina (DXR) foi usada como controle positivo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey.

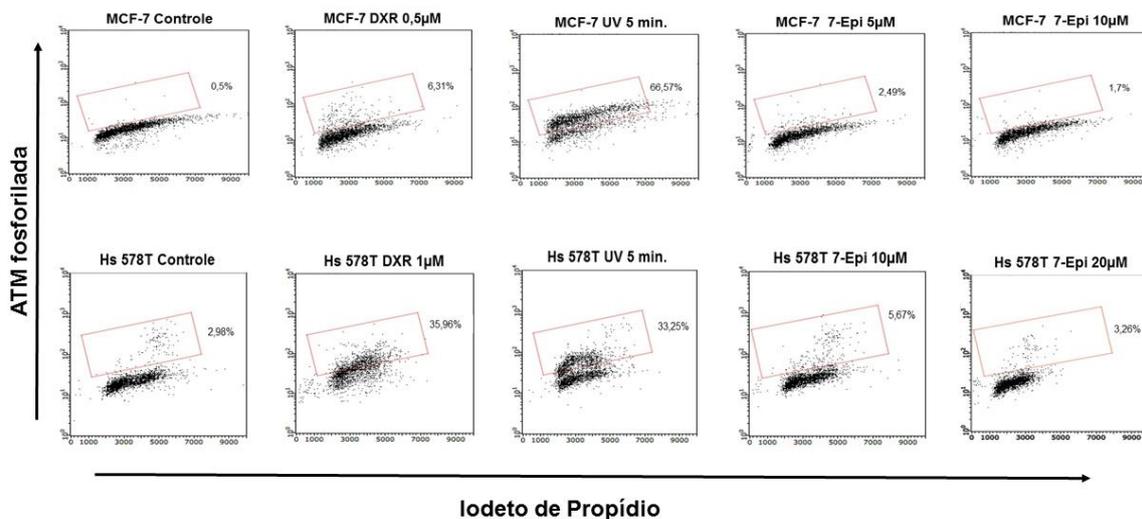
Fonte: Da autora.

5.11 Perfil de ativação de ATM determinado por citometria de fluxo

Considerando os resultados obtidos pelo ensaio do Cometa, foi analisado por citometria de fluxo o perfil de ativação de ATM em amostras de MCF-7 e Hs 578T tratadas por 6 horas e recuperadas em meio fresco, livre do composto, por 24 horas.

Os resultados demonstram aumento significativo de ATM fosforilada nas linhagens MCF-7 e Hs 578T, após tratamento com 7-epiclusianona, nas concentrações de 5 μM e 10 μM , respectivamente (Figura 23 A-B). Foram utilizadas como controle positivo de reação amostras expostas à irradiação Ultravioleta, por 5 minutos (GL T8 15W/ 254nm), e tratadas com doxorrubicina, nas concentrações de 0,5 μM para MCF-7 e 1 μM para Hs 578T, foram utilizadas como controle positivo (Figuras 22 e 23).

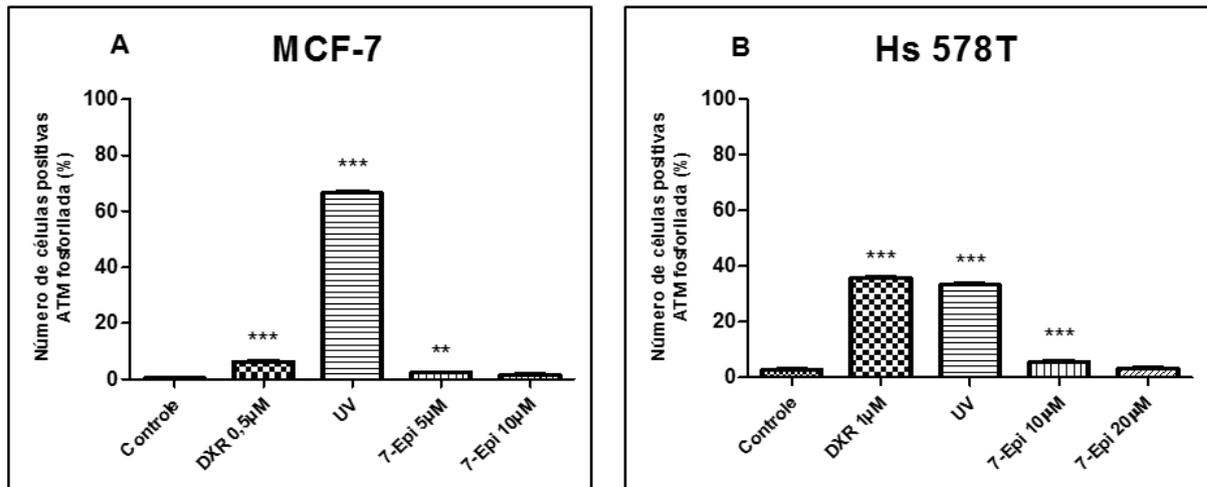
Figura 22 - Dot Plots, obtidos por citometria de fluxo, evidenciando células marcadas com ATM fosforilada.



Nota: Culturas de MCF-7 e Hs 578T foram tratadas por 6h com 7-epiclusianona em diferentes concentrações e recuperadas em meio fresco, livre do composto, por 24 horas. Doxorrubicina (DXR) foi utilizada como controle positivo.

Fonte: Da autora.

Figura 23 – Representação gráfica da frequência de células MCF-7e Hs 578T marcadas com anti-ATM fosforilada obtidas pela análise de citometria de fluxo.



Nota: As células foram tratadas por 6 h com 7-epiclusianona e recuperadas por 24 h em meio fresco. Doxorubicina e Irradiação Ultravioleta (UV) foram usadas como controle positivo.

Fonte: Da autora.

5.12 Perfil de expressão e ativação de ERK

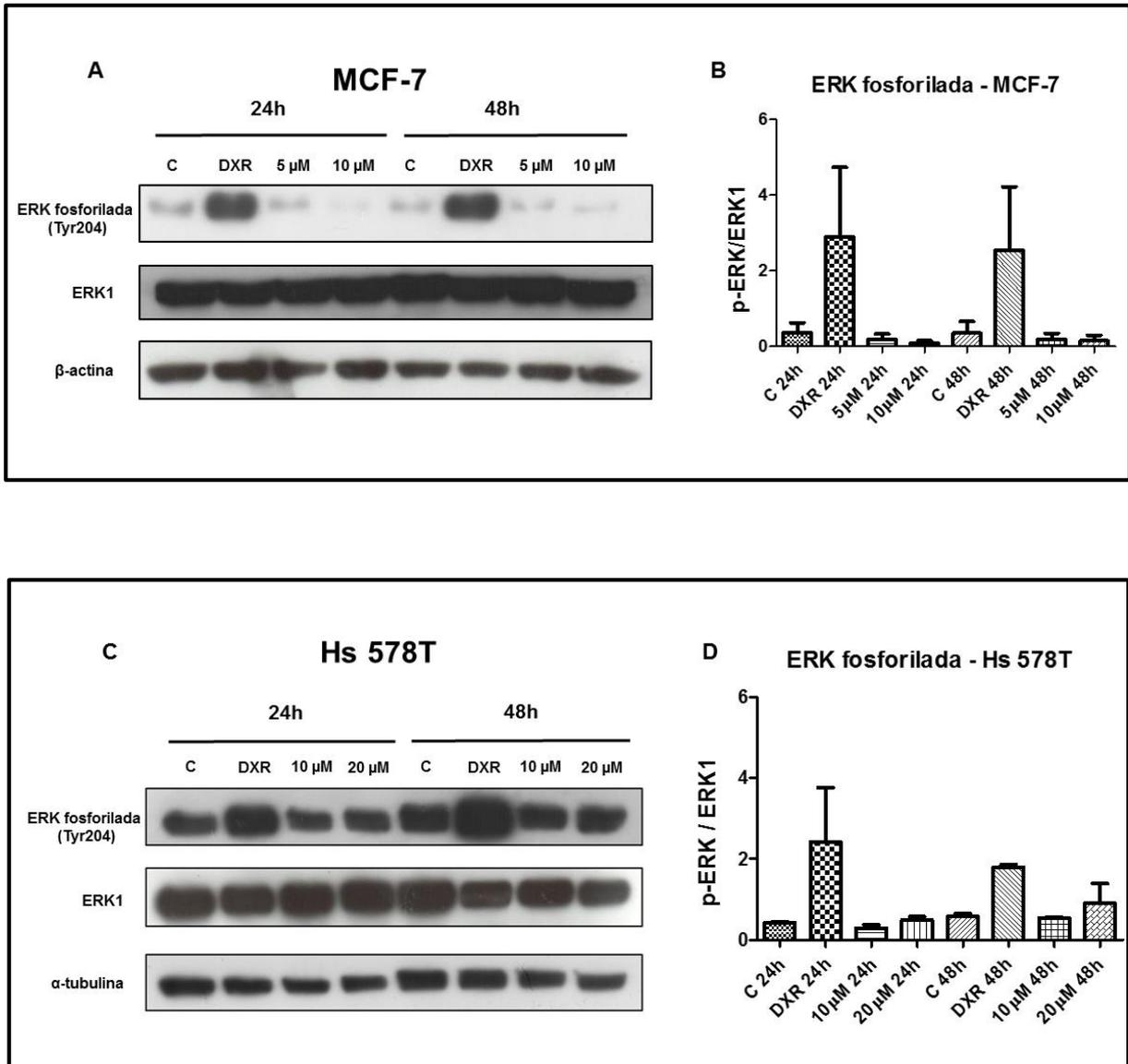
Para investigar possíveis alvos moleculares envolvidos com a atividade antiproliferativa/citotóxica de 7-epiclusianona sobre as linhagens celulares estudadas, foi analisado o perfil de expressão e ativação de ERK, um dos membros da família de MAPs cinases (MAPKs).

Como observado na Figura 26, houve redução na expressão de ERK fosforilada em culturas de MCF-7 (Figura 24A) tratadas com 7-epiclusianona a 5µM e 10 µM, no período de 24 e 48 horas, em relação às culturas utilizadas como controle. A expressão da ERK fosforilada em cultura de MCF-7, foi menor a uma concentração de 10µM tratada por 48 horas. Portanto, essa redução se mostrou dependente da concentração do composto e do tempo de tratamento.

Por outro lado, a expressão de ERK fosforilada manteve-se praticamente constante em culturas de Hs 578T (Figura 24C) tratadas com 7-epiclusianona a 10µM e 20 µM, no período de 24 e 48 h, em relação às culturas utilizadas como controle.

A doxorubicina (DXR) foi usada como controle positivo a uma concentração de 3 μM . As células tratadas com DXR apresentaram expressão aumentada de ERK fosforilada em ambas as linhagens, após 24 e 48 horas de tratamento.

Figura 24 - Expressão de ERK fosforilada (Tyr 204) e ERK1 em células MCF-7 e Hs 578T obtidas por *immunoblot*.



Nota: Expressão de ERK fosforilada (Tyr 204) e ERK1 obtidas por *immunoblot*, após tratamento com 7-epiclusianona, por 24 e 48 h, em células MCF-7(A) e Hs 578T(C). A Doxorubicina (DXR) foi usada como controle positivo de reação na concentração de 3 μM e a β -actina e α -tubulina foram utilizadas como controle de carregamento das amostras no gel. Representação gráfica da quantificação de ERK fosforilada na linhagem MCF-7 (B) e Hs 578T (D).

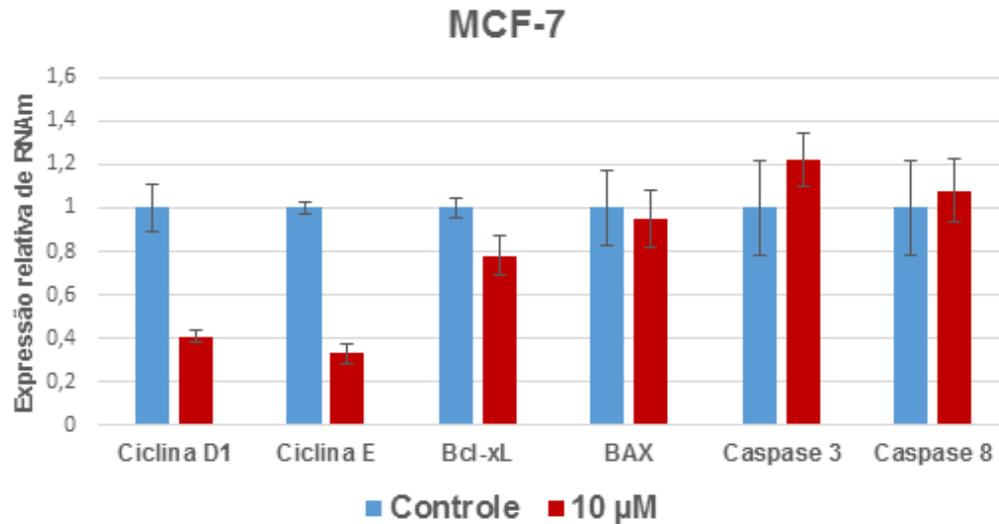
Fonte: Da autora.

5.13 Perfil de expressão de genes envolvidos na regulação da proliferação e morte celular

Para investigar a influência da 7-epiclusianona na modulação da expressão gênica nas linhagens estudadas, foi analisado o perfil de expressão, no nível de RNA mensageiro (RNAm), de genes envolvidos na proliferação, sobrevivência e morte celular pela técnica de PCR.

Em culturas MCF-7 tratadas com 7-epiclusianona a 10 μ M por 24 horas, foi observado redução no perfil de expressão dos genes que codificam para ciclina D1 e ciclina E, cujos produtos são reguladores na progressão de G1 e transição G₁/S, respectivamente. Além disso, os níveis de RNAm para Bcl-xL foram ligeiramente menores em relação as amostras usadas como controle (Figura 25). Não foram observadas drásticas alterações no perfil de expressão de Bax, Caspase-3 e Caspase-8 (Figura 25). Em relação as culturas Hs 578T, tratadas com 7-epiclusianona a 20 μ M, foi observado aumento dos níveis de expressão de RNAm para ciclina D1 com concomitante diminuição no perfil de expressão de ciclina E. A expressão de Bcl-xL foi ligeiramente menor em relação ao grupo controle e houve diminuição dos níveis de RNAm para caspase-8. Não foram observadas modificações drásticas no perfil de expressão de Bax e caspase-3 (Figura 26).

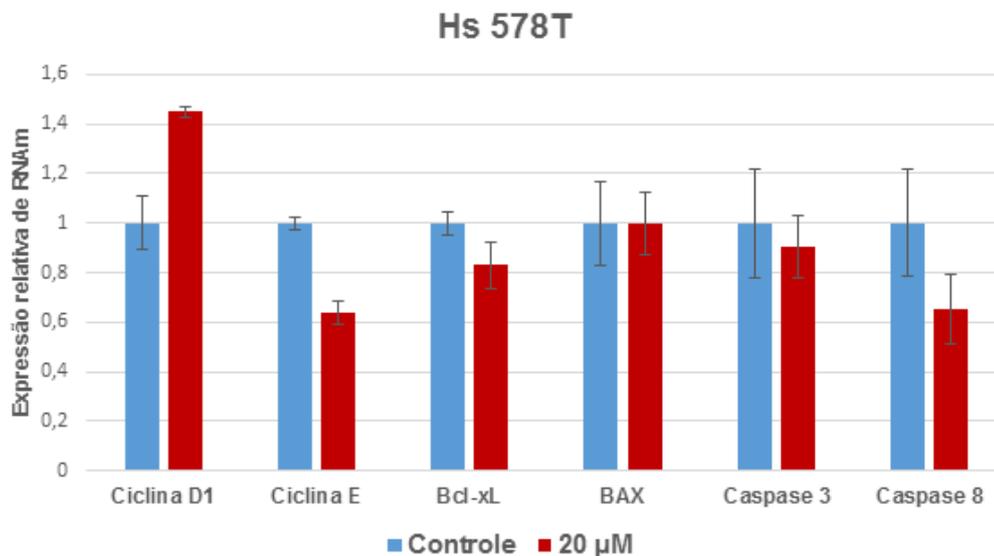
Figura 25 – Representação gráfica do perfil de expressão (RNAm) de genes relacionados a regulação de proliferação e morte celular na linhagem MCF-7.



Nota: Perfil de expressão (RNAm) determinado por q-RT-PCR de genes relacionados a regulação de proliferação e morte celular. As células da linhagem MCF-7 foram tratadas por 24 horas com 7-epiclusianona a 10 µM. β - actina e Gus foram utilizados como controles endógenos.

Fonte: Da autora.

Figura 26 – Representação gráfica do perfil de expressão (RNAm) de genes relacionados a regulação de proliferação e morte celular na linhagem Hs 578T.



Nota – Perfil de expressão (RNAm) determinado por q-RT-PCR de genes relacionados a regulação de proliferação e morte celular. As células da linhagem Hs 578T foram tratadas por 24 horas com 7-epiclusianona a 20 µM. β - actina e Gus foram utilizados como controles endógenos.

Fonte: Da autora.

6 DISCUSSÃO

A atividade antiproliferativa da 7-epiclusianona sobre linhagens derivadas de cânceres humanos foi descrita por Murata et al. (2010). Recente estudo demonstrou que em células derivadas de carcinoma de pulmão (A549), a qual apresenta o gene *TP53* selvagem, a atividade antiproliferativa de 7-epiclusianona está relacionada principalmente ao bloqueio do ciclo celular na transição G1/S (IONTA et al., 2015). Contudo, os efeitos de 7-epiclusianona sobre células derivadas de tumor de mama ainda não foram publicados. Assim sendo, o presente estudo objetivou analisar os aspectos biológicos relacionados à atividade antiproliferativa da 7-epiclusianona sobre duas linhagens celulares derivadas de câncer de mama que apresentam diferentes perfis genéticos (MCF-7 e Hs 578T).

A linhagem MCF-7 apresenta receptores de estrogênio (RE+) e de progesterona (RP+), expressa baixos níveis de HER2 e apresenta o gene *TP53* selvagem. Por outro lado, a linhagem Hs 578T apresenta fenótipo triplo-negativo, ou seja, é negativa para os receptores hormonais e HER2 e apresenta mutação no gene *TP53*. Assim sendo, a linhagem MCF-7 representa um subtipo de câncer menos agressivo em relação a Hs 578T que, por sua vez, apresenta algumas características compartilhadas por tumores de difícil tratamento (ZAJAC et al., 2008; JUNTTILA et al., 2009; SUBIK et al., 2010).

Os dados obtidos mostraram que a 7-epiclusianona apresenta atividade antiproliferativa e/ou citotóxica sobre as linhagens MCF-7 e Hs 578T, sendo esses efeitos dependentes da concentração utilizada. Redução na viabilidade celular foi observada em ambas as linhagens, sendo esse efeito dependente da concentração usada e do tempo de tratamento. Resultados similares foram obtidos por Ye et al. (2014) quando trataram MCF-7 com o Garcinol, uma benzofenona poliisoprenilada derivada de *Garcinia assigu*.

A análise realizada por citometria de fluxo evidenciou aumento significativo na população G0/G1 com concomitante diminuição na população de células na fase S do ciclo, sugerindo que o composto induz bloqueio do ciclo na transição G1/S. Entretanto, esses efeitos foram observados em culturas de MCF-7 tratadas com 7-epiclusianona nas concentrações de 5 e 10 μM ; ao passo que nas culturas de Hs

578T, os referidos eventos foram observados em culturas tratadas com 10 e 20 μM . Dessa forma, a concentração necessária para induzir bloqueio do ciclo, especificamente na transição G1/S, varia considerando as linhagens celulares estudadas, de modo que a Hs 578T parece ser mais resistente em relação a MCF-7. A redução na frequência de células na fase S do ciclo foi confirmada, na linhagem MCF-7, usando um marcador específico, a bromodeoxiuridina (BrdU).

Os dados de citometria também mostraram redução na população celular em G2/M após 24h de tratamento com 7-epiclusianona, entretanto esse tipo de análise não permite a distinção entre as populações G2 e M. Dessa forma, foram realizados testes adicionais para determinar especificamente a frequência de células em divisão usando imunomarcagem para Histona H3 fosforilada (Ser10). Redução na frequência de células em mitose foi evidenciada em culturas de MCF-7 tratadas com 7-epiclusianona a 5 e 10 μM e de Hs 578T tratadas com 10 e 20 μM .

A atividade antiproliferativa está intimamente associada à mudança do perfil de expressão de moléculas que regulam direta ou indiretamente o ciclo celular (POZO-GUISADO et al., 2002). Considerando os resultados obtidos, é possível que 7-epiclusianona tenha modulado os níveis de expressão de reguladores importantes da transição G1/S, os quais incluem as ciclinas D e E (KUROSE et al., 2012; PARK et al., 2014).

A análise do perfil de expressão gênica, em nível de RNA mensageiro (RNAm), mostrou que 7-epiclusianona reduz os níveis de RNAm correspondentes às ciclinas D1 e ciclina E na linhagem MCF-7, enquanto que, na linhagem Hs 578T, foi observado uma tendência a redução dos níveis de expressão apenas para ciclina E. A ciclina D1 tem um papel fundamental na progressão do ciclo celular através da fase G1, cujos níveis podem ser positivamente regulados em sistemas celulares que apresentam receptores de estrógeno ativos. Essa relação foi demonstrada por Tobin e Bergh (2012) que verificaram redução nos níveis de expressão de ciclina D1 pelo uso de antagonistas aos receptores estrogênicos. Contudo, no presente estudo foi verificado que 7-epiclusianona também induz bloqueio do ciclo na transição G1/S na linhagem Hs 578T, a qual não apresenta receptores de estrógeno, sugerindo que esse bloqueio foi em consequência de eventos independentes desse receptor.

Popolo et al. (2011) relataram que uma benzofenona poliisoprenilada, denominada Nemorosona, inibe a proliferação de células MCF-7 e que a responsividade desse tipo celular ao composto deve-se a presença de receptores de estrógeno tipo α (RE α +), pois o mesmo composto não teve efeito sobre células da linhagem MDA-MD-231, as quais são negativas para receptores do tipo α (RE α -). Camargo et al. (2015) verificaram inibição de expressão dos genes *CCND1* e *CCNDE* na linhagem MCF-7 após 24 horas de tratamento com Nemorosona. Dessa forma, é possível que a atividade antiproliferativa de 7-epiclusianona sobre a linhagem MCF-7, observada no presente estudo, também esteja relacionada à modulação da atividade do RE α .

Drogas anti-estrógeno são muito utilizadas no tratamento de determinados tipos de câncer de mama. O tamoxifeno representa um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) e o Fulvestrant anula completamente a transcrição de genes sensíveis a esse hormônio (LAM et al., 2009).

Em geral, as funções do RE α são moduladas por interações moleculares, contudo modificações pós-traducionais, principalmente fosforilação, estão relacionadas à regulação desse receptor (ANBALAGAN; ROWAN, 2015). Dentro desse contexto, diferentes proteínas-cinases estão envolvidas com a regulação do RE α , as quais incluem CDK2/ciclina A (ROGATSKY; TROWBRIDGE; GARABEDIAN, 1999) e membros da família de proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPK) (THOMAS et al., 2008).

De acordo com Dupont e Leroith (2001), a ativação da via Erk1/2 pelo estímulo do estrógeno promove proliferação celular em células MCF-7. Curiosamente, no presente estudo a 7-epiclusianona inibiu a fosforilação de ERK1 ao mesmo tempo em que foi observado bloqueio do ciclo celular na transição G1/S. Os dados sugerem, portanto, que a atividade antiproliferativa frente a linhagem MCF-7 esteja relacionada à sua interação na via de sinalização de MAPK (Raf/Mek,ERK), cuja modulação interfere tanto no bloqueio do ciclo na transição G1/S como na regulação do RE α . Resultados similares foram descritos por Popolo et al. (2011) que observaram redução na expressão de pERK1/2 em células MCF-7, após tratamento com Nemorosona por 24h, sendo esse evento potencializado pela utilização de um inibidor de receptor de estrógeno (ICI 182.780). A fosforilação de ERK1/2 trata-se de um evento chave na chamada via não genômica da sinalização

de estrógeno (DONG et al., 2007). Assim sendo, ERK1(p44) e ERK2(p42) têm atraído grande interesse nas pesquisas e representam alvos importantes para o tratamento do câncer (ROBERTS; DER, 2007). Por outro lado, nas condições experimentais utilizadas nesse estudo, o composto estudado não alterou o perfil de expressão/ativação de ERK em células da linhagem Hs 578T, negativa para receptores hormonais. Os dados novamente sugerem que a atividade antiproliferativa de 7-epiclusianona é mediada por mecanismos distintos nas linhagens Hs 578T e MCF-7. Assim, faz-se necessário a continuidade do estudo para identificar os possíveis alvos moleculares de 7-epiclusianona em células com perfil triplo negativo.

Foi observado aumento significativo na expressão de ERK fosforilada nas linhagens MCF-7 e Hs 578T, tratadas com DXR. A ativação da via de ERK1/2 é normalmente associada a proliferação e sobrevivência celular. No entanto, essa via estimula o processo de apoptose em resposta a esse fármaco (LU; XU, 2006).

O presente estudo também verificou significativa redução na capacidade de células MCF-7 em formar colônias, após tratamento com 7-epiclusianona. Esses resultados reforçam o potencial antitumoral do composto estudado demonstrando sua efetividade em inibir proliferação por períodos prolongados, uma característica importante para o desenvolvimento de compostos com atividade antineoplásica. Resultados semelhantes foram observados por Ahmad et al. (2010) que relataram inibição na capacidade de formação de colônias das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento por 72 horas com Garcinol.

Em paralelo a investigação dos possíveis mecanismos relacionados à atividade antiproliferativa de 7-epiclusianona frente as linhagens estudadas, diferentes abordagens metodológicas foram empregadas com o intuito de analisar os eventos associados à atividade citotóxica exercida pelo composto, inicialmente detectada nos ensaios de viabilidade e, posteriormente, confirmada pelo significativo aumento da população Sub-G1 em culturas tratadas com 7-epiclusianona em concentrações igual ou superior a 10 μ M.

Os dados obtidos pelo ensaio de Anexina V mostraram que 7-epiclusianona induz morte por ambos os processos, apoptose e necrose; contudo dentro da faixa de concentração utilizada no presente estudo, a frequência de apoptose foi sempre

maior em relação a de necrose nas culturas tratadas. Os dados sugerem, portanto, que 7-epiclusianona tem proeminente atividade pró-apoptótica, especialmente sobre a linhagem Hs 578T. Em conjunto, os ensaios realizados para análise de apoptose (Anexina V, TUNEL e ativação de caspase-3) mostraram que 7-epiclusianona induz apoptose mais eficientemente na linhagem Hs 578T em relação a MCF-7. Os efeitos do composto na ativação de caspase-3 foi drasticamente maior sobre a linhagem Hs 578T em relação a MCF-7. Ahmad et al. (2010) também verificaram uma proeminente atividade pró-apoptótica do Garcinol sobre células derivadas de tumor de mama altamente metastático (MDA-MB-231), sendo esse efeito mediado pela ativação de caspase-3.

Considerando a atividade pró-apoptótica de 7-epiclusianona, previamente observada, foi realizada a análise do perfil de expressão, em nível de RNAm, dos genes *Bcl-xL* e *Bax*. Não foram evidenciadas alterações no perfil de expressão de *Bax* nas linhagens estudadas em consequência ao tratamento, entretanto, os níveis de expressão de *Bcl-xL* foram levemente menores em culturas de Hs 578T e MCF-7 tratadas com 7-epiclusianona. Estudo recente mostrou que o Garcinol foi efetivo em reduzir os níveis de expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL na linhagem MCF-7 (YE et al., 2014). Contudo, novos estudos devem ser realizados para melhor caracterizar os eventos envolvidos com a atividade pró-apoptótica de 7-epiclusianona sobre as linhagens testadas.

Dando continuidade a investigação, foi também analisado o potencial de 7-epiclusianona em induzir lesões no DNA. De acordo com os dados obtidos no ensaio de cometa, o composto é efetivo em induzir quebras no DNA, contudo esse efeito é dependente da concentração utilizada. A análise foi realizada em dois estágios: ao término do tratamento e com 24 horas após a remoção do composto do meio de cultura. O perfil do índice de dano (GDI) foi muito semelhante em amostras Hs 578T analisadas ao final do tratamento e com 24 horas de recuperação. Ao contrário, na linhagem MCF-7 foi observado aumento significativo no GDI em culturas tratadas com 7-epiclusianona a 1 μ M, evento não foi observado ao término do tratamento.

Com o objetivo de melhor entender o tipo de lesão causada frente ao tratamento com 7-epiclusianona, foi avaliado o perfil de ativação de ATM. As vias de sinalização ATM-Chk2 e ATR-Chk1 são frequentemente ativadas em células

expostas a diversas tensões genotóxicas, como radiação ionizante e quimioterapia citotóxica. Respostas celulares ao dano no DNA coordenadas por essas duas vias, são ativadas por quebras de fita dupla e de fita simples, respectivamente (SMITH et al., 2010). No presente estudo foi observado aumento significativo na frequência de ATM fosforilada nas culturas de ambas as linhagens estudadas tratadas com 7-epiclusianona, quando comparado aos grupos controles. Esse evento foi observado nas culturas de MCF-7 e Hs 578T tratadas com o composto a 5 μ M e 10 μ M, respectivamente. O mesmo não ocorreu quando concentrações superiores foram utilizadas, provavelmente, devido a maior citotoxicidade desencadeada. Dessa forma, o composto testado foi efetivo em induzir quebras do tipo dupla fita nas linhagens testadas e a atividade pró-apoptótica de 7-epiclusianona pode estar relacionada ao seu potencial de induzir, direta ou indiretamente, lesões no DNA.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que 7-epiclusianona apresenta um grande potencial antitumoral contra células derivadas de câncer de mama. Os dados mostraram, de forma inédita, que o potencial antitumoral do composto está relacionado à sua capacidade de inibir proliferação e induzir apoptose. Além disso, o potencial pró-apoptótico de 7-epiclusianona foi seletivamente maior sobre células da linhagem Hs 578T, as quais apresentam características genéticas compartilhadas por tumores de difícil tratamento. Juntos, os dados coletados no presente trabalho abrem a perspectiva para o delineamento de novas abordagens experimentais *in vivo* que comprovem o potencial anticâncer de 7-epiclusianona.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados podemos concluir que:

- a) 7-epiclusianona apresenta atividade antiproliferativa e citotóxica contra as linhagens MCF-7 e Hs 578T, contudo o efeito citotóxico é dependente da concentração utilizada;
- b) a atividade antiproliferativa da 7-epiclusianona sobre as linhagem MCF-7 e Hs 578T está relacionada à sua capacidade de bloquear o ciclo celular na transição G1/S;
- c) a atividade citotóxica da 7-epiclusianona sobre as linhagens estudadas está relacionada à atividade pró-apoptótica desse composto;
- d) 7-epiclusianona induz apoptose de forma mais efetiva na linhagem Hs 578T em relação a MCF-7;
- e) a atividade pró-apoptótica da 7-epiclusianona pode estar relacionada ao seu potencial de induzir lesões no DNA;
- f) 7-epiclusianona modula de forma diferenciada o perfil de expressão gênica nas linhagens celulares estudadas, como observado pela redução dos níveis de RNAm correspondentes a ciclina D1 (MCF-7) e ciclina E (MCF-7 e Hs 578T);
- g) 7-epiclusianona representa um promissor agente antitumoral sobre células derivadas de câncer de mama, de modo que os dados obtidos no presente estudo abrem perspectivas para que novas abordagens *in vivo* sejam realizadas.

REFERÊNCIAS

ABDULKAREEM, I.H; ZURMI, I.B. Review of hormonal treatment of breast cancer. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 15, n. 1, p. 9-14, Jan./Mar., 2012.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113-131, mar. 2002.

AHMAD, A. et al. Apoptosis-inducing effect of garcinol is mediated by NF-kappaB signaling in breast cancer cells. **Journal of Biochemistry Cellular**, v. 109, n. 6, p. 1134-1141, Apr. 2010.

ALMEIDA, L.S.B. et al. Effects of 7-epiclusianone on *Streptococcus mutans* and caries development in rats. **Planta Medica**, v. 77, n. 1, p. 40–45, Jan. 2011.

ANBALLAGAN, M.; ROWN, B.G. Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 15, p. 20-29, Jan. 2015.

ANTONI, L. et al. CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? **Nature Reviews Cancer**. v. 7, n. 12 , p. 925-936, Dec. 2007.

ARELLANO, M; MORENO, S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the Cell cycle. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 29, n. 4, p. 559-573, Apr. 1997.

ARIAS-ROMERO L.E.; CHERNOFF J. p21-activated kinases in ErbB2-positive breast câncer. **Small GTPases**, v. 1, n. 2, p. 124-128, Sept. 2010.

BARDOU, V. J. et al. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 10, p. 1973-1979, May 2003.

BARGAU, R.C. et al. Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. **International Journal of Cancer**, v. 60, n. 6, p. 854-859, Mar. 1995.

BECKMANN, M.W. et al. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 75, n. 6, p. 429-439, June 1997.

BERTOS, N.R.; PARK, M. Breast cancer - one term, many entities? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 10, p. 3789-3796, Oct. 2011.

BISSELL, M.J. et al. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation**, v. 70, n. 9-10, p. 537-546, Dec. 2002.

BRANDÃO, H.N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, jul. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **INCA: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

BREHM, A. et al. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. **Nature**, v. 391, n. 6667, p. 597-601, Feb. 1998.

BORNER, Christoph. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 11, p. 615–647, Jan. 2003.

CAMARGO M.S. et al. Effects of nemorosone, isolated from the plant *Clusia rosea*, on the cell cycle and gene expression in MCF-7 breast cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 22, n. 1, p. 153-157, Jan. 2015.

CÁNEPA, E.T. et al. INK4 Proteins, a Family of Mammalian CDK Inhibitors with Novel Biological Functions. **IUBMB Life**, v. 59, n. 7, p. 419–426, July 2007.

CAVAS, T.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, v. 22, n. 4, p. 263-268, Apr. 2007.

CHIM, C.S. et al. Methylation of INK4 and CIP/KIP families of cyclin dependent kinase inhibitor in chronic lymphocytic leukaemia in Chinese patients. **Journal Clinical Pathology**, v. 59, n. 9, p. 921-926, Sept. 2006.

CHOUDHURI, T. et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. **FEBS Letters**, v. 512, n. 1-3, p. 334-340, Feb. 2002.

COELHO, L. P. et al. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through Activation of the Nitric Oxide-cGMP Pathway. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 1, p. 206–214, Oct. 2008.

DEL BUFALO D. et al. Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. **FASEB Journal**, v. 11, n. 12, p. 947-953, Oct. 1997.

DEROGIS, P.B.M.C. et al. Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 278-282, Mar. 2008.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, 2002, 604p.

DONG, S. et al. Activation of rapid signaling pathways and the subsequent transcriptional regulation for the proliferation of breast cancer MCF-7 cells by the treatment with an extract of Glycyrrhiza glabra root. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 12, p. 2470-2478, Dec. 2007.

DUMITRESCU, R.G.; COTARLA I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? **Journal of Cellular and Molecular. Medicine**, v. 9, n. 1, p. 208-221, Dec. 2005.

DUPONT, J.; LEROITH, D.L. Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects. **Journal of Clinical Pathology-molecular Pathology**, v. 54, n. 3, p. 149-154, June 2001.

DURONIO, R.J; XIONG, Y. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 5, n. 3, p. 1-12, Mar. 2013.

ELKHOLI, R. et al. Putting the pieces together: How is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? **Cancer & Metabolism**, v. 2, n. 16, p. 1-15, Oct. 2014.

ELLIS, I.O. et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. 11. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 20, n. 6, p. 479-489, June 1992.

ELME, A. et al. Obesity and physical inactivity are related to impaired physical health of breast cancer survivors. **Anticancer Research**, v. 33, n. 4, p. 1595-1602, Mar. 2013.

FESIK, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug Discovery. **Nature Reviews Cancer**. V. 5, n. 11, p. 876-885, Nov. 2005.

FUNARI, C.S.; FERRO V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, abr./jun. 2005.

GHOBRIAL, I.M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A.A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, n. 3, p. 178–194, May/June 2005.

GILTANE; BALKO. Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. **Discovery Medicine**, v. 17, n. 95, p. 227-234, May 2014.

GLOBOCAN INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER.. Breast Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. **WHO**, 2012.

GONZALEZ-ANGULO, A.M.; BLUMENSCHNEIN, G.R. Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer. **Cancer Treatment Review**, v. 39, n. 10, p. 313-320, Oct. 2013.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, maio 2005.

HAMILTON, R. Being Young, Female, and BRCA Positive. **American Journal of Nursing**, v. 112, n. 10, p. 26-31, Oct. 2012.

HAN, J.Y. et al. Association of Germline Variation in CCNE1 and CDK2 with Breast Cancer Risk, Progression and Survival among Chinese Han Women. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 1-11, Nov. 2012.

HIRATA, B. K. B. et al. Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior. **Disease Markers**, v. 2014, p. 1-12, Jan. 2014.

HOLSTEGE, H. et al. BRCA1-mutated and basal-like breast cancers have similar aCGH profiles and a high incidence of protein truncating TP53 mutations. **BMC Cancer**, v. 10, n. 654, p. 1-15, Nov. 2010.

INAL, A. et al. Endocrine therapy alone vs chemotherapy plus endocrine therapies for the treatment of elderly patients with endocrine-responsive and node positive breast cancer: A retrospective analysis of a multicenter study (Anatolian Society of Medical Oncology). **Journal of Balkan Union of Oncology**, v. 18, n. 1, p. 64-69, June 2013.

IONTA, M. et al. 7- Epiclusianone, a benzophenone extracted from *Garcinia brasiliensis* (*Clusiaceae*), induces cell cycle arrest in G1/S transition in A549 cells. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12804-12816, July 2015.

JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n.2, p. 69-90, Mar./Apr. 2011.

JUNTILLA, T.T. et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. **Cancer Cell**, v. 5, n. 5, p. 429-440, May 2009.

KASTAN, M.B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 32, n. 7015, p. 316–323, Nov. 2004.

KOBOLDT, D.C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, Oct. 2012.

KOFF, A. et al. Formation and Activation of a Cyclin E-cdk2 Complex During the G1 Phase of the Human Cell Cycle. **Science**, v. 257, n. 5077, p. 1689-1694, Sept. 1992.

KUROSE, H. et al. Alterations in Cell Cycle and Induction of Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cells Treated with α -Mangostin Extracted from Mangosteen Pericarp. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. 672428, p. 1-9, Apr. 2012.

LAM, L. et al. Tamoxifen and ICI 182,780 increase Bcl-2 levels and inhibit growth of breast carcinoma cells by modulating PI3K/AKT, ERK and IGF-1R pathways independent of ER α . **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 118, n. 3, p. 605–621, Dec. 2009.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nature Reviews Drugs Discovery**, v. 8, n. 7, p. 547-566, July 2009.

LEES, Emma. Cyclin dependent kinase regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 6, p. 773-780, Dec. 1995.

LI, C.I.; URIBE, D.J.; DALING, JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 9, p. 1046–1052, Sept. 2005.

LU, Z.; XU, S. ERK1/2 MAP Kinases in Cell Survival and Apoptosis. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 58, n. 11, p. 621-631, Nov. 2006.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, Mar. 2009.

MATSUOKA, S. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1160-1166, May 2007.

MAVADDAT, N. et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 11, p. 812-822, June 2013.

MCDONALD, E.R.; EL-DEIRY, W.S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. **International Journal of Oncology**, v. 16, n. 5, p. 871-886, May 2000.

MIKY, Y et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 66-71, Oct. 1994.

MIRZOEVA, O.K. Basal Subtype and MAPK/ERK Kinase (MEK)-Phosphoinositide 3-Kinase Feedback Signaling Determine Susceptibility of Breast Cancer Cells to MEK Inhibition. **Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. 565-572, Jan. 2009.

MURATA, R.M. et al. Antiproliferative Effect of Benzophenones and their Influence on Cathepsin Activity. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 379–383, Mar. 2010.

NAKAYAMA, K.I; NAKAYAMA, K. Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. **BioEssays**, v.20, p.1020–1029, 1998.

NEDIALKOV, P.T. et al. Elegaphenone and 7-epi-clusianone, the major cytotoxic constituents of *Hypericum elegans*. **Natural Product Research**, v. 5, n. 18, p. 1743–1750, Oct. 2011.

NELSON, C.M.; BISSEL, M.J. Modeling dynamic reciprocity: Engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5, p. 342-352, Oct. 2005.

PARISE, C.A. et al. Breast Cancer Subtypes as Defined by the Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) among Women with Invasive Breast Cancer in California, 1999–2004. **The Breast Journal**, v. 15, n. 6, p. 593-602, Nov./Dec. 2009.

PARK, S.H. et al. Luteolin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis Through Extrinsic and Intrinsic Signaling Pathways in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 33, n. 3, p. 219–231, 2014.

PARKER, J.S. et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 8, p. 1160-1167, Mar. 2009.

PAULINELLI, R.R. et al. A situação do câncer de mama em Goiás, no Brasil e no mundo: tendências atuais para a incidência e a mortalidade. **Revista Brasileira Saúde Materno. Infantil**, v. 3, n. 1, p. 17-24, jan./mar. 2003.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 47-752, Aug. 2000.

PIETENPOL, J.A; STEWART, Z.A. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, v. 181/182, p. 475-481, Dec. 2002.

PINES, Jonathon. Cyclins, CDKs and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 6, p. 63-72, Apr. 1995.

PITARQUE, M. et al. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. **Mutation research**, v. 440, n. 2, p. 195-204, Apr. 1999.

POPOLO, A. et al. Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 89, n. 1, p. 50-57, Jan. 2011.

POZO-GUISADO, E. et al. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB- 231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. **Biochemical Pharmacology**. v. 64, n. 9, p. 1375-1386, Nov. 2002.

RECHSTEINER, M.; ROGERS, S.W. PEST sequences and regulation by proteolysis. **Trends Biochemistry Science**, v. 21, n. 7, p. 267-271, July 1996.

REIS-FILHO, J.S.; LAKHANI, S.R. Breast cancer special types: why bother? **Journal of Pathology**, v. 216, n. 4, p. 394-398, Dec. 2008.

RHO, O. et al. Growth factor signaling pathways as targets for prevention of epithelial carcinogenesis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 50, n. 4, p. 264-279, Apr. 2011.

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

ROGATSKY, I.; TROWBRIDGE, J.M., GARABEDIAN, M.J. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 32, p. 22296-223002, Aug. 1999.

ROUSSEL, Martine. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. **Oncogene**, v. 18, n. 38, p. 5311-5317, Sept. 1999.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Development of the human breast. **Maturitas**, v. 24, n. 1, p. 2-15, Sept. 2004.

SAINI, K.S. et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 8, p. 935-946, Dec. 2013.

SANTA-CECÍLIA, F.V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 280-285, Nov. 2011.

SANTOS, M.H. et al. Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* (bacupari) sobre bactérias patogênicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 35, n. 2, p. 297-301, jul./dez.1999.

SANTOS, M.H. et al. 7-epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 654-660, 1999.

SCHULZE, A. et al. Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, n. 24, p. 11264-11268, Nov. 1995.

SÉVENO, C. et al. γ -Secretase inhibition promotes cell death, Noxa upregulation, and sensitization to BH3 mimetic ABT-737 in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 3, p. 2-15, June 2012.

SHAH, S.P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature**. v. 486, n. 7403, p. 395-399, Apr. 2012.

SHERR, Charles. Cancer Cell Cycles. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1672-1676, Dec. 1996.

SHIN, M.S., et al. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. **Cancer Research**, v. 61, n. 13, p. 4942-4946, July 2001.

SIEGEL, R.; MILLER, K.D.; JEMAL, A.; Cancer Statistics, 2015. **A cancer Journal for clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, Jan./Feb. 2015.

SILVA, M.M.; SILVA V. H. Envelhecimento: importante fator de risco para o câncer. **Arquivos Brasileiros de Ciências da saúde**, v. 30, n. 1, p. 11-18, jan./jun. 2005.

SIMÃO, T.A. et al. Tp53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. **International Journal of Cancer**, v. 101, n. 1, p. 69-73, Sept. 2002.

SMALLEY; ASHWORTH, M.; ASHWORTH, A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 11, p. 832-844, Nov. 2003.

SMITH, J. et al. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Advances in Cancer Research**, v. 108, p. 73-112, 2010.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, Sept. 2001.

SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-2675, Dec. 2004.

SOTIRIOU, C., PUSZTAI, L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 8, p. 780-790, Feb. 2009.

SUBIK, K. et al. The expression patterns of eR, pR, HeR2, cK5/6, eGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast cancer cell Lines. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 4, p. 35-41, May 2010.

SUN, J.; LIU, R.H. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. **Cancer Letters**. v. 241, n. 1, p. 124-134, Sept. 2006.

SUZUKI, K.; MATSUBARA, H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-7, June 2011.

TAKAHASHI, M. Distinct prognostic values of p53 mutations and loss of estrogen receptor and their cumulative effect in primary breast cancers. **International Journal of Cancer**, v. 89, n. 1, p. 92-99, Jan. 2000.

THAM, Y.L. et al. The rates of chemotherapy-induced amenorrhea in patients treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide Followed by a taxane. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 2, p. 126-132, Apr. 2007.

THOMAS, S. et al. Targeting the Bcl-2 Family for Cancer Therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 17, n. 1, p. 61-75, Jan. 2013.

THOMAS, R.S. et al. Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 173-184, Apr. 2008.

TOBIN, N.T; BERGH J. Analysis of Cyclin D1 in Breast Cancer: A Call to Arms. **Current Breast Cancer Reports**, v. 4, n. 3, p. 171-173, Sept. 2012.

TURNER, N.C.; REIS-FILHO, J.S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5846-5853, Sept. 2006.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, June 2003.

VOGELSTEIN, B.; SUR, S.; PRIVES, C. p53 : The most frequently altered gene in human cancers. **Nature education**, v. 3, n. 9, p. 6, 2010.

WANG,L. et al. A combination of insulin and ubiquitin A20 promotes osteocalcin expression in adipose-derived stem cells. **Biochemical Cell Biology Journal**, v. 91, n. 6, p. 513-518, Dec. 2013.

WEIGEL, B.; BISSEL, M.J. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**. V. 18, n. 5, p. 311-321, Oct. 2008.

WEIGELT B. et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 4, p. 339-349, Apr. 2010.

WEIGELT, B; REIS-FILHO, J.S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, n. 12, p. 718-730, Dec. 2009.

WEINBERG, O.K.; MARQUEZ-GARBAN, D.C.; PIETRAS, R.J. New approaches to reverse resistance to hormonal therapy in human breast cancer. **Drug Resistance Updates**, v. 8, n. 4, p. 219–233, Aug. 2005.

WOOSTER, R. et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 789-792, Dec.1995.

YE, X. et al. Garcinol, an Acetyltransferase Inhibitor, Suppresses Proliferation of Breast Cancer Cell Line MCF-7 Promoted by 17β -Estradiol. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 12, p. 5001-5007, 2014.

ZAJAC, M. et al. Mitotic catastrophe cell death induced by heat shock protein 90 inhibitor in BRCA1-deficient breast cancer cell lines. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 8, p. 2358-2366, Aug. 2008.

ZHANG, P. The cell cycle and development: redundant roles of cell cycle regulators. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 11, n. 6, p. 655-662, Dec. 1999.

ZHOU, X., LI, Y., CHEN, X. Computational identification of bioactive natural products by structure activity relationship. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. v. 29, n. 1, p. 38-45, Aug. 2010.