

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
INDIARA CORREIA PEREIRA

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE PIRONAS ISOLADAS DE *Aniba heringerii*
EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS HUMANAS: POTENCIAL EFEITO EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA.

CAMPO GRANDE – MS

2017

INDIARA CORREIA PEREIRA

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE PIRONAS ISOLADAS DE *Aniba heringerii*
EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS HUMANAS: POTENCIAL EFEITO EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Trentin Perdomo.

CAMPO GRANDE – MS

2017

INDIARA CORREIA PEREIRA

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE PIRONAS ISOLADAS DE *Aniba heringerii*
EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS HUMANAS: POTENCIAL EFEITO EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de
Mestre.

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o
conceito

_____.

Campo Grande, 10 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA

CONCEITO

Prof^a Dra. Renata Perdomo Trentin – Orientadora

Prof^a Dra. Danielle Bogo – FACFAN – UFMS

Dra. Ana Tereza Guerrero - FioCruz

Prof^a Dra. Simone S. Weber – UFMS (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e a todos os professores credenciados a ele.

À CAPES/CNPq pelo fomento: bolsa de mestrado fornecida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células, onde pude aprender técnicas e desenvolver meu trabalho.

Ao Prof^o Dr. Rodrigo Juliano de Oliveira por disponibilizar a estrutura do laboratório CetroGen para análises de citometria.

À Prof^o Dra. Renata Trentin Perdomo por todo ensinamento, atenção, amizade e orientação.

À Anna Basso pelo acompanhamento nas leituras de citometria.

À Kelly Filippin por colaborar com o ensinamento sobre as metodologias de apoptose.

Às técnicas do Laboratório de Ensino de Hematologia – LAC, Rita, Regina e Debora por contribuírem no preparo dos materiais de laboratório.

Ao Prof^o. Dr. João Ernesto de Carvalho por doar as células neoplásicas utilizadas nesse trabalho.

À Ana Lucia Ruiz e todas as meninas do CPQBA/UNICAMP pela atenção, alegria e experiências trocadas.

À Prof. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares e, por todos os ensinamentos, cuidados com materiais e equipamentos, contribuindo para o sucesso dos experimentos em todas as suas fases.

À Rosiane Tsujisaki pela atenção, ajuda e amizade.

Ao João Renato Pessarini por todo apoio, companheirismo e amizade.

Aos meus queridos amigos que estiveram presentes ou que mesmo de longe torceram por mim.

Às divas do Laboratório de Cultura Celular e Biologia Molecular, Alexandra Paola, Camila Nantes, Caroline Farias, Claudia Stutz, Lanna Heemann, Kamylla Souza, Mariah Ojeda e Magali Costa pela amizade e por tornarem os dias e os experimentos mais leves.

Às minhas tias, Laura e Rosana, por todo apoio, orações e por ficarem felizes por minha conquista.

Ao meu namorado, Fernando, pelo carinho, dedicação, compreensão e paciência.

Em especial a minha família, meus pais Edison e Roselene e minha irmã Alana, por fazerem do meu sonho o sonho deles. Obrigada não só por estarem perto, mas por me darem suporte emocional, carinho e amor. Por entenderem os meus dias difíceis. Aproveito para pedir desculpas pela minha ausência, mas foi necessário. A vocês o meu mais sincero amor.

Por fim, o de maior importância, Deus, que na sua infinita bondade colocou as pessoas certas para fazerem parte desse momento. Obrigada pelo amor incondicional, discernimento, sabedoria, disposição e por manter minha Fé intacta independente da ocasião.

*“Faça as coisas o mais simples que
você puder, porém não se restrinja às mais
simples”*

Albert Einstein

RESUMO

Stiril-pironas são metabólitos secundários comumente encontrados no gênero *Lauraceae* e apresentam distintas atividades biológicas. A espécie *Aniba heringerii* foi o alvo dos nossos estudos e desta espécie foram isoladas as stiril-pironas, desidrogoniotalamina (DGTN), dímero 1-desidrogoniotalama (DGTN-1) e dímero 2-desidrogoniotalama (DGTN-2). Estas substâncias foram avaliadas quanto à atividade antiproliferativa frente a seis linhagens neoplásica (PC-03; 786-0; HT-29; NCI/ADR-RES; MCF-7 E MDA-MB-231) e uma não neoplásica (NIH/3T3) para obtenção do índice de seletividade. As metodologias utilizadas contemplam, a coloração pelo método de Sulforrodamina B (SRB), para avaliação de citotoxicidade, corantes fluorescentes (laranja de acridina e brometo de etídeo) para avaliação da morfologia da morte celular e a citometria de fluxo para avaliar a ativação da caspase-3 e a parada do ciclo celular. A substância DGTN, demonstrou moderada a fraca atividade antiproliferativa, semelhante para todas as linhagens neoplásicas, concentração que inibe 50% de crescimento (GI_{50}) entre 90,4 e 175,7 μ M. Já seus dímeros, mostraram-se com potencial atividade para células neoplásicas de mama MCF-7 e MDA-MB-231, DGTN-1 (GI_{50} 12,24 e 34,22 μ M) e DGTN-2 (4,42 e 50,25 μ M), respectivamente. As substâncias DGTN e DGTN-2 tratadas induziram alterações morfológicas características de apoptose dose-dependente em linhagens de mama MCF-7 e MDA-MB-231. No entanto, não foi verificada ativação da caspase-3 nas concentrações e tempo testado. Por fim, foi avaliada a intervenção das substâncias DGTN e DGTN-2 no ciclo celular das células de mama. Células MCF-7 tratadas com as stiril-pironas demonstraram parada de ciclo na fase G1. Para as células MDA-MB-231 tratadas, a pausa de ciclo celular aconteceu na fase G2/M. As substâncias em estudo mostraram-se potenciais candidatos a fármacos contra células neoplásicas de mama por mecanismos que envolvem a via da apoptose independente de caspase-3.

Palavras-chave: Stiril-pirona, atividade antiproliferativa, apoptose, células MCF-7, células MDA-MB-231.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diferença imuno-histoquímica das classes de câncer de mama.	16
Figura 2	Demonstração das fases do ciclo celular e os eventos que ocorrem em cada etapa	18
Figura 3	Característica morfológica do processo de apoptose.	20
Figura 4	Ilustração dos genes envolvidos na cascata de ativação das caspases pela via extrínseca e intrínseca, culminando em morte celular apoptótica.	21
Figura 5	Imagens da árvore de <i>Aniba heringerii</i>	24
Figura 6	Estrutura química e peso molecular das substâncias isoladas de <i>Aniba heringerii</i> .	26
Figura 7	Representação da placa teste, onde a linha A e H são os poços brancos e as triplicatas de concentrações de amostras ficam nas linhas inferiores. Representa também o controle positivo e negativo.	28
Figura 8	Padrão de análise da morfologia de morte celular.	29
Figura 9	Características morfológicas das células MCF-7 após 48 horas de tratamento (A) controle negativo: células não tratadas; (B) controle positivo: célula tratadas com 2,5 µg/mL de doxorubicina (C) células tratadas com 25 µg/mL de DGTN; (D) células tratadas com 25 µg/mL de DGTN-2.	33
Figura10	Característica morfológica das células MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento (a) controle negativo: células não tratadas; (b) controle positivo: células tratadas com doxorubicina 2,5 µg/mL; (c) células tratadas com 25 µg/mL de DGTN; (d) células tratadas com 25 µg/mL de DGTN-2.	34
Figura11	Efeito da DGTN e DGTN-2 nas concentrações de 0,5, 2,5, 25 e 250 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A) células de mama MCF-7 submetidas a tratamento com DGTN. B) células de mama MCF-7 submetidas a tratamento com DGTN-2. C)	35

células de mama MDA-MB-231 submetidas a tratamento com DGTN. D) células de mama MDA-MB-231 submetidas a tratamento com DGTN-2.

- Figura12 Efeito das amostras DGTN e DGTN-2 na ativação da caspase-3. Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas e como controle positivo as células foram tratadas com doxorubicina. 37
- Figura13 Efeito das substâncias isoladas de *Aniba heringuerii* no ciclo celular das células de mama MCF-7, tratadas por 48h. A) controle negativo, células sem tratamento; B) controle positivo, células tratadas com doxorubicina; C) células tratadas com 107 μM de DGTN D) células tratadas com 50,25 μM de DGTN-2. 38
- Figura14 Efeito das substâncias isoladas de *Aniba heringuerii* no ciclo celular das células de mama MDA-MB-231, tratadas por 48h. A) controle negativo, células sem tratamento; B) controle positivo, células tratadas com doxorubicina; C) células tratadas com 98 μM de DGTN D) células tratadas com 4,4 μM de DGTN-2. 39

LISTA DE SIGLAS

7-AAD - 7-aminoactimycin D

BAX – Bcl-2 associado a proteína X

Bcl-2 – linfoma de célula B2

BRCA1 – câncer de mama 1

BRCA2 – câncer de mama 2

CDK1 – cinase dependente de ciclina 1

CDK2 – cinase dependente de ciclina 2

CDK3 – cinase dependente de ciclina 3

CDK4 – cinase dependente de ciclina 4

CDK6 – cinase dependente de ciclina 6

DGTN – desidrogoniotalamina

DGTN-1 – dímero 1 desidrogoniotalamina

DGTN-2 – dímero 2 desidrogoniotalamina

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

ER – receptor de estrogênio

GI₅₀ – Inibição de 50% de crescimento

ERBB2 – oncogêne homólogo de receptor de tirosina quinase

HeLa – linhagem celular de adenocarcima

HER-2 – receptor de crescimento epidérmico humano 2

HL-60 – linhagem celular de leucemia promielocítica aguda

HT-29 – linhagem celular de adenocarcinoma de cólon

IS – índice de seletividade

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KB – carcinoma epidérmico de boca

Ki-67 marcador proliferativo

MCF-7 – linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano

MDA-MB-231 – linhagem celular de adenocarcinoma de mama

MDM2 – sigla em inglês "*murine double minute 2*"

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NCI/ADR-RES linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente

NIH/3T3 – linhagem celular de fibroblasto murino

PC-03 linhagem celular de carcinoma de próstata

PR – receptor de progesterona

RPM – rotação por minuto

RPI1 – receptores de interações proteína quinase 1

RPI3 – receptores de interações proteína quinase 3

SRB – sulforrodamina B

TCA – ácido tricloroacético

TNBC – câncer de mama triplo negativo

TNF – fator de necrose tumoral

U937 - linhagem celular de linfócito pleural

SUMÁRIO	
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 CÂNCER	14
2.2 CLASSIFICAÇÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO	14
2.3 CICLO CELULAR	17
2.4 VIAS DE MORTE CELULAR	18
2.5 TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS	21
2.6 PRODUTOS NATURAIS	22
2.7 FAMÍLIA <i>LAURACEAE</i>	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	25
4.1.1 EXTRAÇÃO	
4.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	27
4.2.1 CULTURAS CELULARES	
4.2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	
4.2.3 TESTE DE CITOTOXICIDADE	
4.3 ENSAIO MORFOLÓGICO	29
4.4 CICLO CELULAR	29
4.5 CASPASE-3	30
4.6 ANÁLISE DOS DADOS	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	44

REFERÊNCIAS.....	45
------------------	----

1 INTRODUÇÃO

As estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2015) para o câncer de mama em 2016-2017 são de 57.960 mil novos casos, sendo as mulheres as principais vítimas. Quando visto por regiões, o câncer de mama tem maior frequência, sequencialmente nas regiões, Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste. Este grande número de casos tem incentivado pesquisas para novos fármacos anticâncer (CRAGG E NEWMAN, 2013).

Agentes anticancerígenos derivados de produtos naturais estão entre os mais estudados. De fato, com a aceitação do mercado quimioterápico pelos derivados de taxanos e camptotecina houve uma aceleração nos estudos com extratos, derivados, metabólitos ativos e isolados de diversas classes naturais (MEDRADO *et al.*, 2015).

Entre os diversos metabólitos secundários, responsáveis pela proteção das plantas, estão as stíril-pironas, uma classe com atividade biológica que inclui citotoxicidade em diferentes células neoplásicas. As stíril-pironas dão origem a um grande grupo de substâncias, por haver a possibilidade de substituição do grupo stíril-aril. Formando assim, diferentes estruturas com diversas atividades biológicas (SEYED *et al.*, 2014).

Para a descoberta de novos ativos anticâncer, o *screening* celular *in vitro* é a técnica mais viável, pois permite testar diversas substâncias em um curto espaço de tempo. (BRANDÃO *et al.*, 2010; MEDRADO *et al.*, 2015). Células neoplásicas possuem alterações nucleares metabólicas importantes para modular sinais proliferativos, são estímulos extrínsecos e intrínsecos que dão suporte para a proliferação descontrolada e ausência de morte celular (CAIRNS; HARRIS; MAK., 2011). De modo geral, as substâncias anticâncer precisam alterar o metabolismo celular para que a proliferação seja comprometida.

Dentre as diversas células disponíveis para cultivo *in vitro* estão as células de mama MCF-7 e MDA-MB-231, que possuem diferenças fenotípicas e histoquímicas. A MCF-7 forma monocamada em ilhas e expressa receptor estrogênico. A MDA-MB-231 desenvolve-se em monocamada alongada e não expressa receptores hormonais, somente manifesta presença de fatores de crescimento epidérmico (ATCC, 2016A; B).

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anticâncer *in vitro* de três stirlipironas, isoladas de *Aniba heringerii*. Utilizando o modelo de cultura celular foi identificado alterações morfológicas em células de mama MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com os isolados, além de vias envolvidas na atividade biológica. O objetivo deste estudo foi avaliar

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

Câncer é a denominação empregada a um grupo de doenças reconhecidas como problema de saúde pública. Particularmente em países em desenvolvimento onde a dependência econômica para uso de tecnologias é precária, há um aumento alarmante de casos de câncer de colo do útero e mama. As medidas de políticas públicas, principalmente educativas, e a pesquisa por formas de prevenção e tratamento são os maiores aliados para diminuir a progressão dos casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Há uma etiologia comum para o câncer independente do tecido de origem, que contempla crescimento desordenado de células anormais, modificações genéticas e origem multifatorial. No entanto, alguns aspectos são específicos do tecido de origem e podem ser associados à formação da carcinogênese. Incluem impactos sofridos por agentes carcinógenos, fatores promotores de crescimento desordenado e instalação do tumor (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014).

No Brasil, o câncer de mama é o de maior incidência entre as mulheres. Em 2015 a mortalidade por câncer de mama acometeu cerca de 10 mil mulheres, com idade inferior a 65 anos. As estimativas para 2026 são de aproximadamente 300 mil novos casos, crescimento de quase 25% em 10 anos. São diversos fatores relacionados à origem desta neoplasia: idade, hormônios endógenos e exógenos, histórico familiar, exposição a agentes mutagênicos, fatores epigenéticos, tabagismos, alcoolismo e lesões no tecido mamário (CHAPPUIS *et al.* 2017; AMBATIPUDI *et al.*, 2017).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO

A maturação e proliferação das células mamárias são dependentes de hormônio, relacionado principalmente ao estrogênio e a progesterona. O estrogênio é um regulador fisiológico de proliferação celular, enquanto a progesterona controla a maturação celular (HULKA; LIU; LININGER., 1994; BERNSTEIN, 2002). Genes como ciclina D1, MDM2, HER-2 permitem a progressão ou interrupção do ciclo celular e estão subordinados, na maior parte das vezes, ao estímulo estrogênico. Impulsos proliferativos, como os hormonais, devem ser cessados em patologias como o câncer.

Para isso terapias anti-hormônio podem ser aplicadas (HENDERSON E FEIGELSON, 2000; ROSEN *et al.*, 2005).

O câncer de mama possui variações na expressão de genes e moléculas *in situ* entre tumores, devido a isso é denominado de doença heterogênea (POLYAK, 2011). Tem origem nas células epiteliais que envolvem os ductos mamários. As diferenças são observadas na histologia, histoquímica e clínica, e servem para classificar a doença e seu potencial de invasão (PARK *et al.*, 2010). Com isso, podem-se descrever subdivisões do câncer de mama: tumores luminal, tumores HER2-amplificado e os denominados triplo-negativos (TNBC) (MORRIS *et al.*, 2007).

Os subtipos possuem diferença nos fatores de risco, formas de progressão e resposta ao tratamento (POLYAK, 2011). Tumor luminal é responsivo a terapia hormonal, por serem positivos para receptores de estrogênio (ER) e/ou progesterona (PR). Tumores HER2 possuem superexpressão do oncogene ERBB2-amplificado (SØRLIE *et al.*, 2001; CAREY *et al.*, 2006). Em tumores triplo-negativos (TNBC) não são expressos receptores ER, PR e ERBB2-amplificado (LAMBERTINI *et al.*, 2016).

Os tumores relacionados aos receptores hormonais são os de maior ocorrência quando comparados aos outros subtipos. Contudo, têm melhor prognóstico por serem mais sensíveis às terapias com hormônios liberadores de hormônio agonista luteinizante, agentes antiestrogênicos e inibidores de aromatase. O mecanismo consiste no bloqueio da ligação do hormônio ao seu receptor específico, assim interrompendo a proliferação celular (GOLDHIRSCH *et al.*, 2009).

Tumores HER2 possuem receptores pertencentes à família das tirosinas quinases transmembranares e quando ativos codificam as proteínas envolvidas na cascata de sinalização do crescimento e a manutenção dos tumores (KUROKAWA *et al.*, 2000). A superexpressão desse receptor foi vista em 10-30% dos cânceres de mama invasivos (LUMACHI *et al.*, 2013).

O câncer tipo TNBC, tem uma incidência de 20% quando comparado aos demais casos de câncer de mama, acomete pacientes mais jovens, pode afetar e comprometer o linfonodo, e são mais agressivos. Os pacientes acometidos têm maior chance de recidiva e menos de 30% sobrevivem cinco anos. O medicamento utilizado na clínica é a cisplatina, um quimioterápico que altera a estrutura do DNA e como consequência induz a apoptose. Contudo, este quimioterápico não é específico e agride grande parte do epitélio normal (HAFFTY *et al.*, 2006).

As características distintas dos subgrupos do câncer de mama são devido às alterações genômicas como, mutações, rearranjos, deleções e ampliações, e como resposta há uma expressão de oncogênes e redução da expressão dos supressores tumorais. É possível que existam várias maneiras de desenvolvimento de cada tipo de tumor, no entanto, a perda de função de genes como BRCA1 e/ou BRCA2 resulta na ineficiência de reparo ao dano do DNA e como consequência, a formação oncogênica de tumores basais (HAFFTY *et al.*, 2006). Teorias como diversidade clonal, celular e alterações epigenéticas também são aceitas para explicar a heterogeneidade de traços relacionada à tumorigênese (SZYF, 2009). A característica agressiva dos subtipos basais de TNBC é assegurada pela alta expressão de mRNA e Ki-67 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2009; LEHMANN *et al.*, 2011).

Nesse contexto, para uma terapia eficiente é necessário entender a progressão do tumor, os fenótipos celulares, o microambiente e as vias de sinalização citoquímica que constantemente sofrem alterações. Metodologias como as avaliações imuno-histoquímicas são eficientes na classificação dos tumores (PARK *et al.*, 2010). A diferença fenotípica do tumor de mama está representada na figura 1.

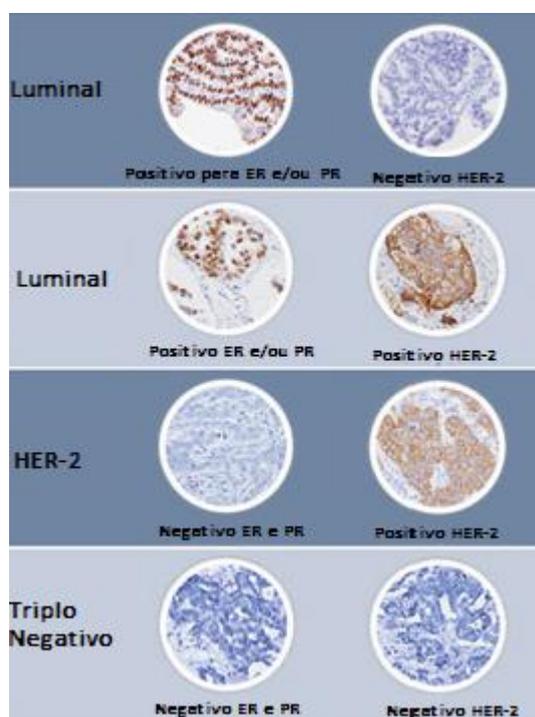


Figura 1- Diferença imuno-histoquímica das classes de câncer de mama. Adaptado de: Fonte Medicina Diagnóstica <<http://fontemd.com/exames/imuno-histoquimica/>>

De fato, as funções moleculares como: ciclo celular e resposta aos danos ao DNA são modificados em células tumorais. Desta forma, agentes que estão

envolvidos nesse processo são os principais alvos de escolha para estudos de novos quimioterápicos (NIETO-JIMÉNEZ *et al.*, 2016).

2.3 CICLO CELULAR

Ciclo celular é a denominação empregada ao evento de replicação do DNA e segregação cromossômica (STINCHCOMB *et al.*, 1979; SLOW *et al.*, 2011). É um processo de transmissão de informação genética às células filhas. A fidelidade das informações transmitidas é assegurada pelo monitoramento cuidadoso do genoma durante a replicação do DNA. No entanto, células cancerígenas sofrem mutações nas vias de checagem e reparo, fazendo com que esse monitoramento seja falho e assim transmitindo informações incorretas as células filhas (ZABLUDOFF *et al.*, 2008).

O DNA passa por danos endógenos e exógenos, que precisam ser reparados antes do término do ciclo celular. Este processo é dividido em dois períodos, a mitose e a interfase (VERMEULEN *et al.*, 2003). A mitose é denominada de fase M, onde ocorre a divisão celular. A cada mitose, há um intervalo, isto é, a interfase. Esta é dividida em fase G1/G0, S e G2, e em cada uma dessas fases há execução de processos que acarretam a divisão celular (HARTVVELL E WEINERT, 1989; MURAKAMI E NURSE, 2000). Para que o ciclo seja monitorado, substâncias reguladoras como, cinases dependentes de ciclina (CDK) são ativas em pontos específicos. As CDKs pertencem à família serina/treonina e são responsáveis por coordenar as fases do ciclo celular, G1 (CDK4, CDK6, CDK2), S (CDK2), G2 e M (CDK1) (NURSE E BISSETT, 1981).

Para que todas as etapas do ciclo sejam bem-sucedidas são necessárias ligações entre cinases e ciclinas. Para início e permissão da entrada das células na fase G1, as ciclinas do tipo D ligam-se as CDK4 e CDK6, neste momento as células são preparadas para a síntese do DNA. A progressão para a fase S é dependente da associação da ciclina E com CDK2, período minucioso do ciclo, onde acontece a replicação do DNA (HINDS *et al.*, 1992). O complexo de ciclina A com CDK2 é essencial para a progressão para G2, quando as células se preparam para a mitose. Por fim, a fusão entre ciclina A e CDK1 permite a entrada em fase M e como consequência a divisão em duas células filhas (MOTOKURA *et al.*, 1991).

Para que a sequência de eventos seja ordenada e não existam bases incompletas ou aberrações, pontos de restrições e checagens são posicionados entre as fases G1-S e G2-M. Em G1-S a parada do ciclo é induzida por danos dependente

de p53. Esta por sua vez estimula genes como o p21, que quando manifestado inibem as CDK, promovendo a estagnação do ciclo para mecanismos de reparo (LEVINE, 1997; SILICIANO *et al.*, 1997). O ponto de checagem G2-M é independente de p53. Quando necessário, há uma pausa do ciclo e o complexo entre CDK e ciclina não é formado. Caso o dano seja severo e não reparável, vias de morte celular são acionadas (LEVINE, 1997).

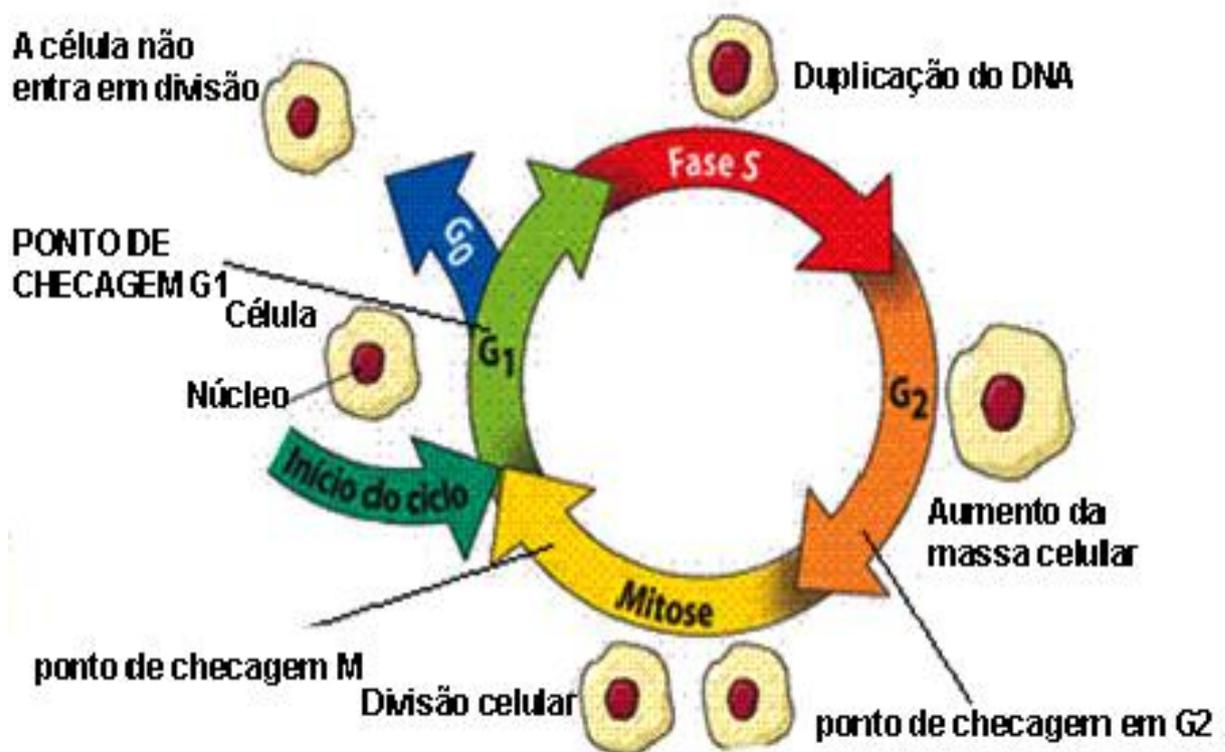


Figura 2- Demonstração das fases do ciclo celular e os eventos que ocorrem em cada etapa. Imagem adaptada de <https://www.google.com.br/search?q=morfologia+apoptose+e+necrose&tbm>

2.3 VIAS DE MORTE CELULAR

As células danificadas por estímulos físicos, químicos e mecânicos, quando não reparados, induzem às vias de morte programada. O comitê de Nomenclatura de morte celular (DCNT) classificou os tipos de morte celular, usando critérios morfológicos e bioquímicos, em necrose, autofagia e apoptose (KROEMER *et al.*, 2009; GALLUZZI *et al.*, 2012). A morte celular pode ocorrer individualmente ou atingindo tecidos vizinhos, de forma ordenada ou aleatória. Fisiologicamente, é importante para a manutenção dos tecidos, pois a deficiência de morte ou o excesso

dela, resulta em patologias como o câncer e doenças degenerativas (RICCI E ZONG, 2006; GALLUZZI *et al.*, 2012).

São evidências da necrose, a perda da integridade da membrana plasmática, lise das organelas celulares e extravasamento de líquidos no tecido, culminando em uma resposta inflamatória (VANLANGENAKKER *et al.*, 2012). Os eventos bioquímicos da morte celular por necrose acontecem mediante ligação entre receptores TNF (fator de necrose tumoral). Contudo, cinase RIP1 e RIP3 têm papel crucial para a eficiência desta via, especialmente quando a via de apoptose está bloqueada. De fato, fisiologicamente o bloqueio de uma via de morte celular desencadeia a ativação de outra, são vários os motivos de inibição dentre eles, manipulações genéticas ou interações de agentes farmacológicos (GALLUZZI *et al.*, 2012; VANLANGENAKKER *et al.*, 2012).

A apoptose foi descoberta em 1970 durante uma pesquisa com nematóides. Quando foi observado que tal morte apresentava genes controladores do processo. Extrapolando esta informação para os mamíferos descobriram as caspases, que são cisteínas proteases responsáveis em clivar resíduos de aspartato, e são as controladoras do processo apoptótico (KANG *et al.*, 2002; ASHKENAZI E SALVESEN, 2014). Em humanos seis caspases estão envolvidas na apoptose (caspases -3, -6, -7, -8, -9), e são divididas em iniciadoras (caspases -8 e -9) e efetoras (caspases -3, -6 e -7) (ELMORE, 2007). A atividade das caspases iniciadoras e efetoras resulta nas características morfológicas finais. Observa-se encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, eventos bioquímicos como externalização da fosfatidilserina e alterações na membrana, formação dos corpos apoptóticos e por fim, fagocitose (ELMORE, 2007; ASHKENAZI E SALVESEN, 2014). A figura 3 representa de forma computadorizada as mudanças morfológicas da morte apoptótica.

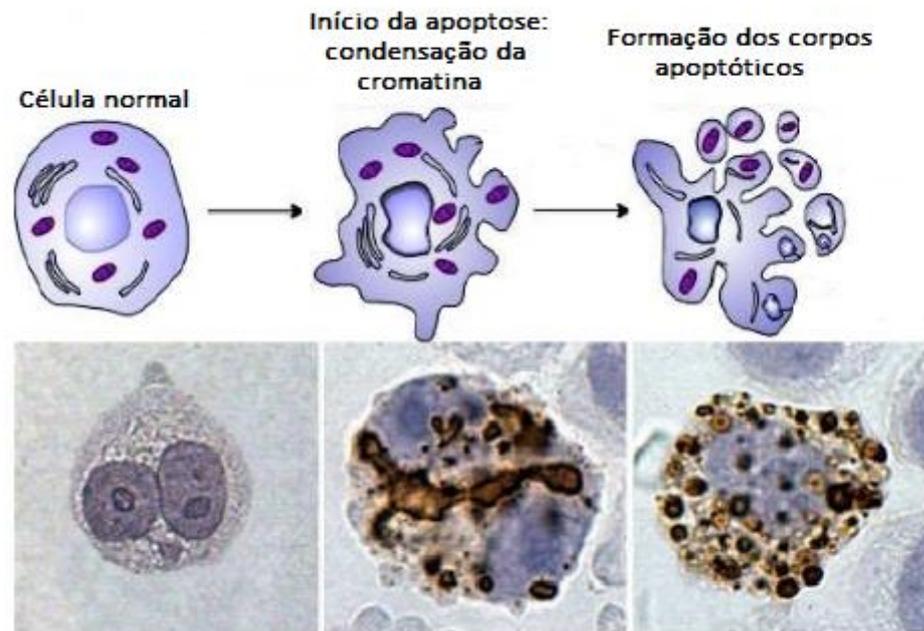


Imagem computadorizada dos estágios da apoptose após parada de ciclo celular.

Figura 3- Característica morfológica do processo de apoptose adaptado da: apresentação do Dr. Dinesh Junior, residente do Departamento de Fisiologia JIPMER. <<https://www.slideshare.net/dineshthangavel1/apoptosis-9298529>>

Após privação de fatores essenciais de sobrevivência, como por exemplo, a integridade do DNA, a cascata de eventos apoptóticos é iniciada por via intrínseca ou extrínseca. A via intrínseca é codificada por genes da família Bcl-2, que controlam a ativação de genes mitocondriais agonistas ao estímulo apoptótico BAX/BAC (WILLIS *et al.*, 2005; MOORE *et al.*, 2010). Assim, poros na membrana mitocondrial aparecem e o citocromo C é liberado. Com essa alteração conformacional é ativada a pró-caspase 9, que por sua vez estimula as caspases efetoras, caspase 3 e a caspase 7 para execução da morte apoptótica (DEVERAUX E REED, 1999)

A cascata de ativação de via extrínseca é administrada por clivagem de caspase-6 ou por receptores de membrana específicos de morte, que ao serem estimulados ativam a caspase-8 (CAIN; BRATTON e COHEN., 2002). Esta pode diretamente ativar caspase 3 e 7. No entanto, caso esta ativação não ocorra, há uma alternativa indireta que relaciona BH3 e BID, proteínas responsáveis pela clivagem dos genes pro-apoptóticos BAX/BAC (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Como os processos de morte dependem de diversas etapas, as células tumorais algumas vezes conseguem evadir-se. Especialmente quando mutações

desativam sensores e efetores da via, tornando a célula resistente à morte por apoptose (HANAHAN E WEINBERG, 2011). Na clínica, a modulação, substituição e bloqueio de genes são alternativas estudadas para novos agentes antineoplásicos induzirem a morte por apoptose.

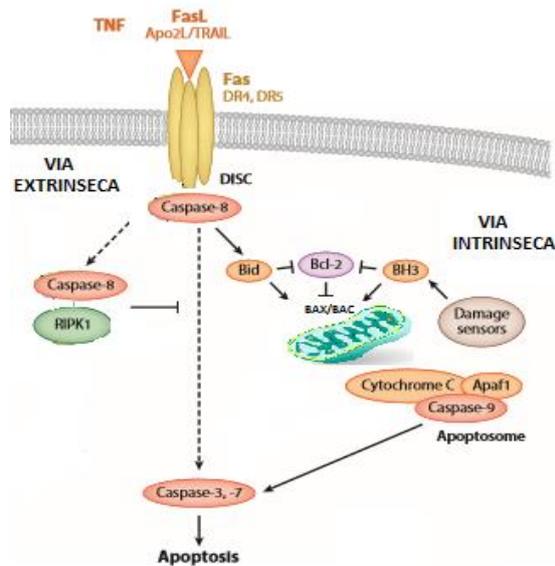


Figura 4- Ilustração dos genes envolvidos na cascata de ativação das caspases pela via extrínseca e intrínseca, culminando em morte celular apoptótica. Adaptado de Avi Ashkenazi e Guy Salvesen, 2014.

2.5 TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS

Em descrições históricas observa-se que o câncer foi citado em um Papiro descrito 1600 a.c, e até o século XIX era compreendido como uma doença incurável (SALVONI E EBBELL, 1940; PAPAC, 2001). A inserção de anestésicos nas remoções cirúrgicas, fez com que as cirurgias tornassem estratégias para a retirada dos tumores. Em 1960 a radioterapia começou a ser usada, e esta combinação de técnicas ganhou espaço, já que era eficiente para tratar até mesmo o câncer metastático. Nesse cenário, a descoberta das mostardas nitrogenadas trouxe uma nova forma de tratamento, incorporando todas as células neoplásicas, iniciando o uso de agentes quimioterápicos (PAPAC, 2001; WU *et al.*, 2006).

O uso da mostarda nitrogenada na clínica abriu espaço para a descoberta de novos agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, clorambucil, bussulfan. Os quimioterápicos atualmente utilizados possuem mecanismos que aumentam os danos ao DNA (BRUCE E LIN, 1971). E com esta instabilidade genética a probabilidade de

morte celular é maior. Para uma resposta terapêutica mais eficaz, em alguns casos, é utilizado um complexo quimioterápico, que consiste na associação de diferentes mecanismos de ação (MINSKY *et al.*, 2002).

Os mecanismos citotóxicos são variados e podem agir por diferentes vias de ação. Os agentes alquilantes, por exemplo, formam pontes intercadeias e interferem na transcrição, agindo especialmente na fase S, mas pode ocorrer arraste para fase G2. Já os alcaloides da vinca, que são inibidores da formação de microtúbulos, acarretam bloqueio do ciclo celular em metáfase. E os antimetabólitos estão relacionados a fase S do ciclo celular, interferindo no metabolismo dos ácidos nucléicos, e como consequência, na replicação (MANCINI, 2011).

O fato do aumento excessivo de danos ao DNA causado pelos quimioterápicos leva a parada de ciclo e morte celular. As células cancerígenas por estarem em rápida proliferação são as mais afetadas. No entanto, células do sistema imunológico também são atingidas, o que provoca supressão imunológica (PETERS; BROWN, 2015). Com isso, a busca de agentes anticancerígenos seletivos para células mutadas tem conduzido novas pesquisas.

2.6 PRODUTOS NATURAIS

Na Mesopotâmia 2600 a.c, já existiam registros medicinais de cerca de mil produtos naturais usados pela população para diferentes patologias. Anos depois a civilização Greco-Romana colaborou para disseminar a fitoterapia para outras regiões (CRAGG E NEWMAN, 2013).

A alguns anos a pesquisa está voltada para a descoberta de novos agentes com mecanismo de ação preventivo ou de tratamento para o câncer (FANG *et al.*, 2008; SIRIWATANAMETANON *et al.*, 2010) Estudos etnobotânicos relatam que mais de 80 espécies brasileiras são usadas para prevenção e tratamento do câncer (DE MELO *et al.*, 2011).

Muitos fármacos utilizados na clínica para o tratamento de câncer são de origem vegetal e consistiram em protótipos para o desenvolvimento de medicamentos anticâncer, tais como, vimblastina, vincristina, podofilotoxina e outros (Mantle *et al.*, 2000; Granada *et al.*, 2009). A preocupação com novas descobertas de protótipos e o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer fica claro quando, Medicinal Chemistry em 2015 faz a triagem de mais de 900 bioativos para diferentes vias de morte celular, dentre elas, apoptose, inibidores de proteínas tirosina quinases,

inibidores de topoisomerasas e mediadoras de danos ao DNA (MEDICINAL CHEMISTRY, 2015).

Essa importante fonte de ativos tem sua atividade anticâncer relacionada à presença de metabólitos secundários produzidos pra auxiliar na proteção da planta (CHIDLEY *et al.*, 2016)

2.7 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, muito comum nas Américas e Ásia, pouco comum na África. É composta por cerca de 2500 espécies distribuídas em 52 gêneros (ROHWER, 1993). No Brasil, encontram-se aproximadamente 420 espécies de 23 gêneros, maior parte distribuída pelo Nordeste. Estudos demonstram que a família *Lauraceae* integra o *ranking* de espécies importantes para a diversidade da Mata Atlântica (MORI *et al.*, 1983).

Os diferentes gêneros apresentam características semelhantes, são plantas lenhosas, vão desde arbustos a árvores de aproximadamente 50 metros, as folhas em geral são simples, flores pequenas com 2-10 mm geralmente actinomorfas, bissexuadas, unissexuadas ou polígamas, pétalas brancas, amarelas, esverdeadas ou avermelhadas (PEDRALLI, 1987; BAITELLO *et al.*, 2001).

Atividades biológicas como, potencial antimicrobiano, interação com receptores colinérgicos, opióides e com os canais de potássio são comprovadas e atribuídas aos terpenos e óleo essencial encontrados em algumas espécies (PEANA *et al.*, 2003; SIMIĆ *et al.*, 2004).

Dentre a diversidade de gêneros, em estudos está o *Aniba*, constituída de 41 espécies, presente nos Andes, montanhas do norte da Venezuela, Guiana e Brasil (MORAES, 2005). Algumas espécies são utilizadas na medicina popular, é o caso de *Aniba riparia* (Nees) Mez e *Aniba hastmanniana* (Nees) Mez, que possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro e antiparasitária, respectivamente (MARQUES, 2001).

Aniba heringerii é popularmente conhecida por canela ou pau-louro. Uma espécie de flores grandes, facilmente encontrada no cerrado e caatinga (MORAES, 2005). Em sua família é comumente encontrado derivados aromáticos de pironas monocíclicas. As pironas são classificadas conforme a presença ou ausência de aril – stiril na posição C-6 e OMe na posição C-4 (BITTENCOURT *et al.*, 1971). Geralmente

há um anel heterocíclico de seis átomos, que é mediador de metabólitos responsáveis pela defesa de plantas, insetos e animais (SCHMIDT *et al.*, 2006).



Figura 5– Imagens da árvore de Aniba heringerii fonte: < https://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/large1/cat_single1-212.htm>

As pironas englobam um vasto grupo de substâncias com atividade vasodilatadora (REZENDE *ET AL.*, 2015), citotóxico (CHEN *et al.*, 2005) e anti-inflamatório (CALIXTO *et al.*, 2004). São várias as diversidades estruturais, sendo levadas em considerações os diferentes centros esterogênicos e cadeias laterais. A desidrogoniotalamina é uma stiril-pirona, uma molécula quase plana, estabilizada pela ligação intermolecular C-CHO com um anel heterocíclico (MU *et al.*, 1999)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiproliferativa e vias envolvidas na citotoxicidade *in vitro* de pironas isoladas da *Aniba heringerii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar atividade antiproliferativa das stiril-pironas nas linhagens PC-03, 786-0, HT-29, NCI/ADR-RES, MCF-7, MDA-MB-231 e seletividade em NIH/3T3

Avaliar o efeito das substâncias isoladas na estrutura morfológica das células de mama MCF-7 e MDA-MB-231;

Avaliar o efeito das substâncias isoladas no ciclo celular.

Avaliar expressão de caspase-3 das células MDA-MB-231 tratadas com as substâncias isoladas;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Aniba heringerii foi coletada no município de Campo Grande – MS, o material vegetal foi coletado e identificado por Dr. Arnildo Pott e Dra. Vali Joana Pott, em julho de 2011, na Fazenda Modelo da Embrapa, em Campo Grande – MS [lat: -20.558722 long: -54.792]. Uma exsicata foi depositada no herbário CGMS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o número 33400.

4.1.1 Extração

As substâncias em estudo fazem parte de um trabalho de doutorado do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS, sob orientação da Prof^a Dr^a. Fernanda Garcez. São pironas isoladas da fase hexânica das folhas de *Aniba heringerii* (Figura 6). Este estudo é continuidade da dissertação desenvolvida com extratos, por uma aluna do grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares em parceria com o Laboratório Pesquisa LP1 do Instituto de Química da UFMS. O Extrato etanólico das folhas foi anteriormente testado nas linhagens PC-03, 786-0, HT-29, NCI/ADR-RES, MCF-7 E NIH/3T3. Como os resultados mostraram-se promissores foi dada continuidade nas pesquisas da fase hexânica, e então foram isoladas as substâncias desidrogoniotalamina (DGTN), dímero 1-desidrogoniotalamina (DGTN-1), dímero 2-desidrogoniotalamina (DGTN-2).

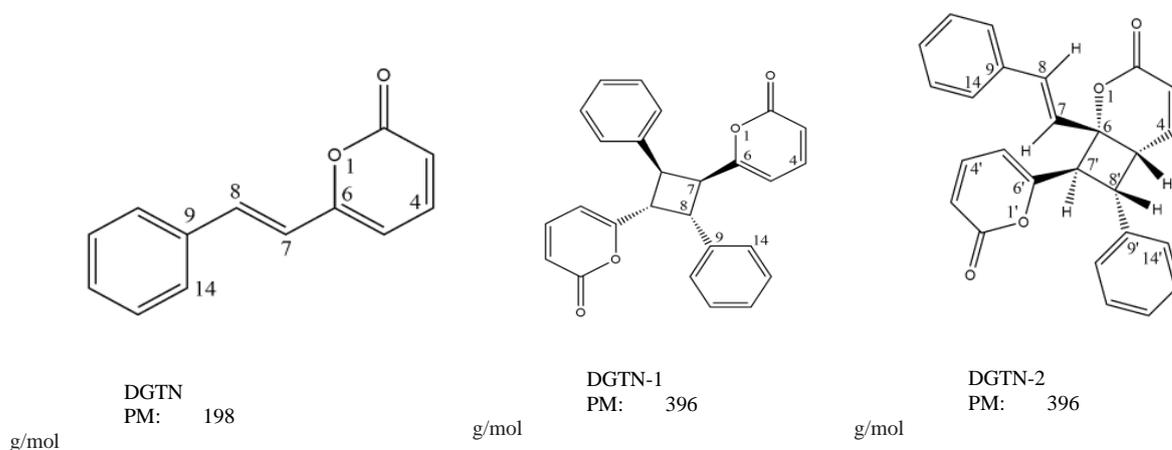


Figura 6- Estrutura química e peso molecular das substâncias isoladas de *Aniba heringerii*.

4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade é eficiente como *screening* de substâncias ativas em células neoplásicas. É possível observar atividade citostática e citocida. A atividade citocida é observada quando ocorre morte celular e a citostática quando ocorre inibição do crescimento celular (MONKS *et al.*, 1991)

4.2.1 Culturas celulares

Para avaliação da atividade antiproliferativa foram utilizadas as linhagens de células neoplásicas humanas: MCF-7 (ATCC–HTB-22, adenocarcinoma de mama), 786-0 (ATCC–CRL-1932, adenocarcinoma de rim), PC-03 (ATCC-CRL-1435, carcinoma de próstata); HT-29 (ATCC-HTB-38, adenocarcinoma de cólon); NCI/ADR-RES (adenocarcinoma de ovário resistente); MDA-MB-231 (ATCC-HTB-26 adenocarcinoma de mama) e para a determinação do índice seletividade a linhagem não tumoral NIH/3T3 (fibroblasto murino). As células neoplásicas foram doadas pelo Prof^o. Dr. João Ernesto de Carvalho – UNICAMP. A linhagem não tumoral foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro - UFRJ. Todas as linhagens celulares estão mantidas em nitrogênio líquido. Para os testes de citotoxicidade foram descongeladas e cultivadas em incubadora a 37°C (5% de CO₂) (FRESHNEY, 2005).

4.2.2 Preparo das amostras

As amostras-teste, DGTN, DGTN-1, DGTN-2 foram ressuspensas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL e diluídas em meio de cultura no momento do experimento. A maior diluição apresenta concentração de DMSO menor que 0,4%, evitando a citotoxicidade pelo DMSO.

4.2.3 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado usando método de coloração sulforrodamina B (SRB) que baseia-se na afinidade deste corante pelas proteínas básicas presentes nas células íntegras, fixadas pelo ácido tricloroacético (SKEHAN, 1990).

Após obtenção da densidade celular suficiente, foi iniciado o experimento, uma placa zero (T₀) foi preparada com triplicata celular e triplicata de meio de cultura (branco). Ao mesmo tempo foi preparada a placa teste, os poços das linhas A e H representam os brancos da amostra (onde não foi colocada suspensão celular), nos

demais poços foram colocadas $7,5 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ células. Placa T0 e placa teste foram levadas para a incubadora 37°C (5% de CO_2) durante 24 horas.

Passado 24 horas as placas teste foram retiradas da incubadora, a placa T0 foi corada pelo método de sulforrodamina B (SRB). A placa T0 é importante como ponto inicial do experimento, mostrando crescimento celular e viabilidade antes da inserção das amostras. Estes dados são usados para mensurar a GI_{50} (inibição de crescimento de 50%) (HOUGHTON *et al.* 2007)

Enquanto isso as amostras foram colocadas em triplicata na placa teste, nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Como controle negativo foi utilizado doxorubicina nas concentrações 0,025, 0,25, 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$, foi levada para incubadora e mantida nas mesmas condições da placa T0, durante 48 horas.

Após 48 horas a placa foi retirada da incubadora e corada pelo método de sulforrodamina B (SRB), consiste em: aspirar o sobrenadante dos poços, adicionar 100 μL de TCA 20% (ácido tricloroacético), incubar a 4°C protegido da luz, durante 30 minutos. Logo após, a placa é lavada em água corrente para tirar o excesso de TCA e em placa seca é adicionado 50 μL de SRB, incubado por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, as placas são lavadas com ácido acético 1%, para retirar o excesso de corante e após a secagem da placa foi adicionado 100 μL de trizma base (10 mM) para solubilizar o corante ligado às proteínas de membranas das células e levada para agitação por 20 minutos. Por fim, o resultado foi obtido em absorbância em 540 nm. A porcentagem de crescimento de cada amostra-teste foi calculada em software-SoftMax Pro6.3, utilizando-se as fórmulas segundo Monks *et al.*, (1991). A concentração que inibe 50% de crescimento foi determinado usando o programa Origin Versão 6.0. A figura 7 representa a placa teste, descrevendo a linha branco, o controle negativo e as concentrações de cada poço.

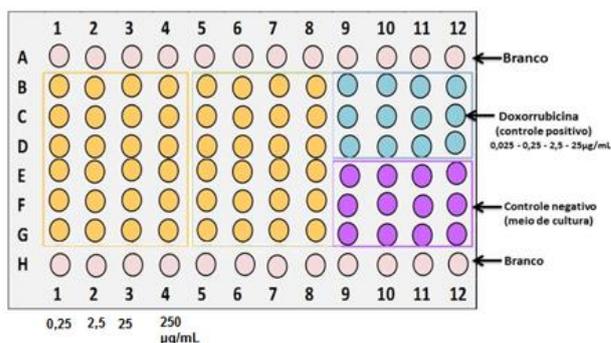


Figura 7- Representação da placa teste, onde a linha A e H são os poços brancos e as triplicatas de concentrações de amostras ficam nas linhas inferiores. Representa também o controle positivo e negativo.

4.3 ENSAIO MORFOLÓGICO

Por essa metodologia é possível distinguir quatro populações celulares, baseado na integridade da membrana: (I) células vivas com a membrana íntegra coram-se uniformemente de verde; (II) células em apoptose, onde a membrana está rompida e possui fragmentação do DNA mostram uma coloração verde no núcleo, citoplasma e corpos apoptóticos; (III) células em processo de apoptose tardia mostram pontos corados de laranja e (IV) células necróticas, apresentam coloração laranja uniforme por toda extensão celular (MCGAHON *et al.*, 1995).

Células de mama MCF-7 e MDA-MB-231 foram distribuídas na densidade de $7,5 \times 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ e incubadas por 24 horas, logo após foram tratadas com a substância teste nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e novamente incubadas por 24, 48 e 72 horas. Após incubação os poços foram tripsinizados e a suspensão celular foi transferida para microtubos de 1,5 mL, e centrifugados por 10 minutos a 1000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspendido em 50 μL de solução tampão de PBS. Em seguida foi adicionado solução de laranja de acridina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e brometo de etídio (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1:1. Esta solução final foi colocada em lâmina, coberta com lamínula e observado 100 células em microscópio de fluorescência (Olympus BX41), aumento 400X. Como controle positivo foi utilizado doxorubicina. O padrão de análise está representado na figura 7.

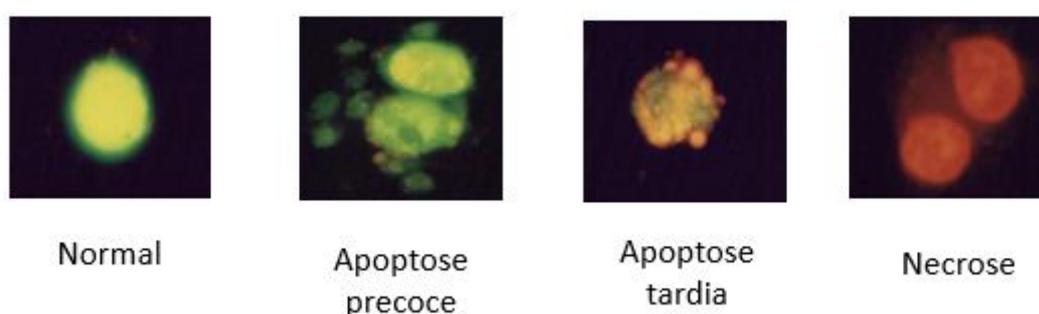


Figura 8- Padrão de análise da morfologia de morte celular.

4.4 CICLO CELULAR

Foram cultivadas 1×10^6 células MCF-7 e MDA-MB-231 em placa de 24 poços, mantidas em incubadora a 37°C (5% de CO₂), durante 24 horas. Após este período as células foram tratadas com as amostras-teste na concentração de GI₅₀ para cada linhagem, incubadas novamente nas mesmas condições por 48 horas. Em seguida,

foram transferidas para microtubos, centrifugadas, lavadas 2x com PBS. A suspensão celular foi transferida para placa de fundo em U, adicionado 45 µL de solução de lise de membrana (0,1 % triton x-100; 0,1 mM de EDTA), 50 µL de RNase e 5 µL de 7AAD, mantida durante 30 minutos em gelo e ao abrigo da luz. Após, foram lavadas 2x com PBS e levadas para leitura em citômetro. Usado o canal de fluorescência FL-2 e adquirido 10.000 eventos.

4.5 CASPASE-3

O ensaio foi realizado utilizando-se o PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 (BD Pharmingen). Este se liga covalentemente e irreversivelmente ao sítio ativo, emitindo sinal de fluorescência detectado pelo canal FL-2. Qual ensaio foi realizado somente com a linhagem MDA-MB-231 porque a linhagem MCF-7 possui deleção desta caspase (WENDT et al. 2006).

Células MDA-MB-231 foram cultivadas na densidade de 1×10^6 em placas de 12 poços, após 24 horas de incubação em 37°C (5% de CO₂) foram tratadas nas concentrações da GI₅₀ e TGI das amostras-teste. Após 48 horas as células foram tripsinizadas, transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas 1x com PBS gelado. Logo, foram ressuspensas em 300 µL de BD Cytotfix/ Cytoperm 1x, incubadas em gelo por 20 minutos. Posteriormente foram centrifugadas e o sobrenadante aspirado. Então, as células foram lavadas duas vezes com BD Perm/Wash, transferidas para uma placa de 96 poços com fundo em U, adicionados 40 µL de BD Perm/Wash e 10 µL do anticorpo Rabbit Anti-Active Caspase-3. A placa foi mantida por 30 minutos no gelo e no escuro, lavada duas vezes com BD Perm/Wash e levada para leitura em citômetro Accuri 6. Foram adquiridos 10.000 eventos, os testes foram realizados em duplicata.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

A porcentagem de crescimento celular obtida segundo Monks et al.(1991) foi utilizada na elaboração de gráficos por regressão não linear para obtenção da GI₅₀ e TGI em programa de análise de dados Origin 6.0.

Os resultados de morfologia e citometria de fluxo foram analisados utilizando o programa Bioestat 5.0. O teste ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett foi usado para comparação das amostras com o controle, e para comparação entre as doses foi usado o pós-teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Os resultados de citotoxicidade das substâncias isoladas de *Aniba henriquerii* estão descritos na tabela 1. Para melhor compreensão e comparação da atividade, consideramos: amostras potencialmente ativas: GI_{50} até $10\mu M$, moderadamente ativas GI_{50} entre 10 e $35\mu M$, pouco ativas GI_{50} entre 36 e $100\mu M$ e inativas $GI_{50} > 100\mu M$.

A substância DGTN e seus dímeros foram avaliados em seis linhagens de células neoplásicas e uma linhagem de célula não neoplásica. Os resultados mostram que as substâncias isoladas de *Aniba henriquerii* reduzem a viabilidade das células neoplásicas. DGTN mostra um perfil citotóxico semelhante para todas as linhagens, com maior resistência em 786-0, onde apresenta GI_{50} $175,7\mu M$.

Para o dímero DGTN-1 foi encontrada atividade citotóxica moderada, especialmente nas linhagens de mama, com concentração de GI_{50} de $34,22\mu M$ para MDA-MB-231 e para MCF-7 de $12,24\mu M$ para inibir 50% de crescimento das células. Assim como DGTN, DGTN-1 não mostrou citotoxicidade para as células de câncer renal, 786-0.

Dentre as substâncias em estudo, o dímero DGTN-2, apresentou as menores concentrações de GI_{50} , caracterizando maior potencial citotóxico. As linhagens celulares resistentes às terapias, NCI/ADR-RES e MDA-MB-231 apontaram GI_{50} de 10 e $4,42\mu M$, respectivamente.

Tabela 1- Valores de GI_{50} (μM) das amostras isoladas da *Aniba henriquerii* e do controle positivo doxorrubicina nas linhagens celulares. Para *screening* foi utilizado seis linhagens neoplásicas e uma linhagem não neoplásica.

AMOSTRAS	Linhagens celulares						
	PC-03	786-0	HT-29	NCI/ADR-RES	MCF-7	MDA-MB-231	NIH/3T3
DGTN	90,4±0,66	175,7±4,9	145,05±0,45	143,4±0,66	107±0,23	98±2,9	1267±9
DGTN-1	96,3±11,21	567±0,66	88,7±4,9	68,28±0,68	12,24±0,11	34,22±0,17	503±9,4
DGTN-2	69,5±6,21	61,73±1,3	69,7±4,3	10±0,63	50,25±2,4	4,42±0,22	158±13,1
DOXO	0,24±0,06	0,16±0,02	0,28±0,01	3,30±0,09	0,25±0,01	1,84±0,18	0,28±0,06

GI_{50} : concentração que inibe 50% do crescimento celular.

Para avaliação do índice de seletividade as células NIH/3T3 foram tratadas com as amostras-teste. Como observado, as três substâncias não foram tóxicas para esta linhagem celular (tabela 2). Nesta tabela também são apresentadas as concentrações de inibição parcial do crescimento GI_{50} e inibição total do crescimento TGI em ($\mu\text{g/mL}$ e μM) das substâncias DGTN e DGTN-2 nas linhagens de mama. Estas concentrações foram escolhidas pois representam intensidades diferentes de estímulos, o que pode resultar em resposta celular também diferente. Desta forma, essas foram as doses usadas nos testes relacionados a mecanismos de ação.

Como foi observada seletividade para células de mama MDA-MB-231 e MCF-7 entre as linhagens neoplásicas, os posteriores ensaios são para elucidação dos mecanismos envolvidos na atividade citotóxica da DGTN e DGTN-2.

Tabela 2- Valores de GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$ e μM), TGI (μM) e índice de seletividade (IS) das amostras DGTN e DGTN-2 nas linhagens de mama MCF-7 e MDA-MB-231.

Linhagens celulares		
AMOSTRA	MCF-7	MDA-MB-231
DGTN		
GI_{50} $\mu\text{g/mL}$	21,22	19,52
GI_{50} μM	107	98
TGI μM	>1000	600
IS	11,8	12,9
DGTN-2		
GI_{50} $\mu\text{g/mL}$	11,18	1,45
GI_{50} μM	50,5	4,4
TGI μM	80,7	50
IS	14,6	35,7

TGI: Inibição total do crescimento
IS: Índice de seletividade

5.1 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE DESCOLAMENTO CELULAR

Durante o tempo de tratamento das células, no teste de citotoxicidade, foi avaliado o efeito de descolamento das células de mama MCF-7 e MDA-MB-23. Nas figuras abaixo (9 e 10), pode-se observar a diminuição na confluência, gerando espaçamento entre as células tratadas, diferente do que observado nas células não tratadas. A concentração de 25 µg/mL apresentou um efeito de descolamento celular suficiente para a visualização da citotoxicidade mantendo uma população celular viável (células aderidas), no entanto estas células apresentam características diferentes, comparado ao controle de células não tratadas. Observam-se nas figuras 5B e 5C alterações como, perda de identidade de crescimento em ilhas, característica da linhagem MCF-7, retração celular com morfologia anômala. Na figura 5D, o efeito de descolamento celular foi mais intenso quando comparado ao tratamento com DGTN, na mesma concentração. A morfologia celular em 5D apresenta-se vacuolizada, tanto no citoplasma como no núcleo, representando perda de integridade de membrana, possivelmente, estado apoptótico.

Células MCF-7

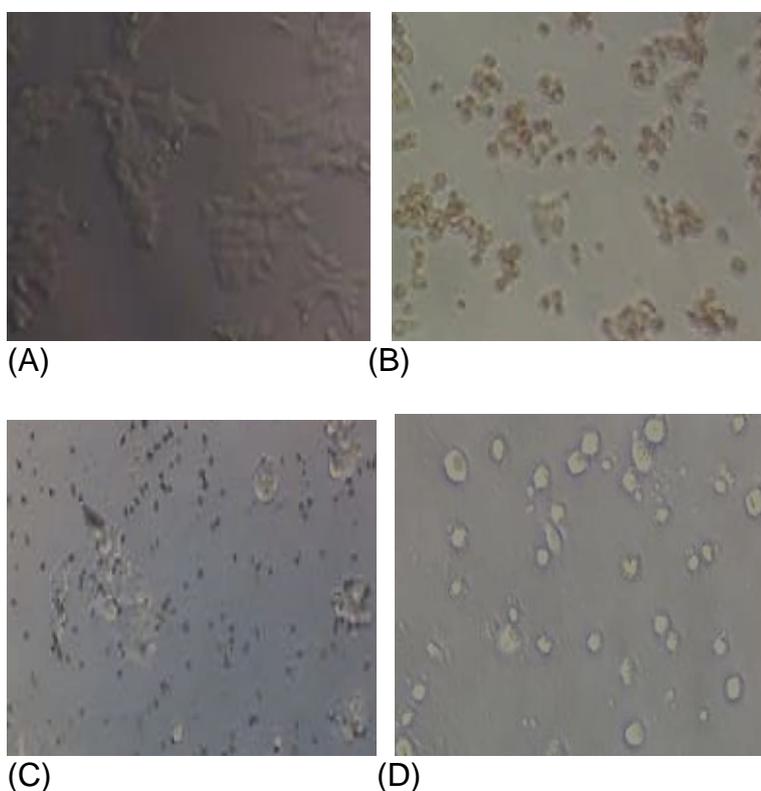


Figura 9 - Características morfológicas das células MCF-7 após 48 horas de tratamento (A) controle negativo: células não tratadas; (B) controle positivo: célula tratadas com 2,5 µg/mL de doxorubicina (C) células tratadas com 25 µg/mL de DGTN; (D) células tratadas com 25 µg/mL de DGTN-2.

A característica de crescimento da linhagem MDA-MB-231 é representada por monocamada homogênea como observado na figura 6ª. As figuras 6B-C-D representam o efeito do tratamento destas células, com alterações como, espaçamento e deslocamento celular, perda das características morfológicas comparadas com as células não tratadas. O efeito da DGTN-2 foi mais intenso, com presença de maior intensidade das alterações.

Células MDA-MB-231

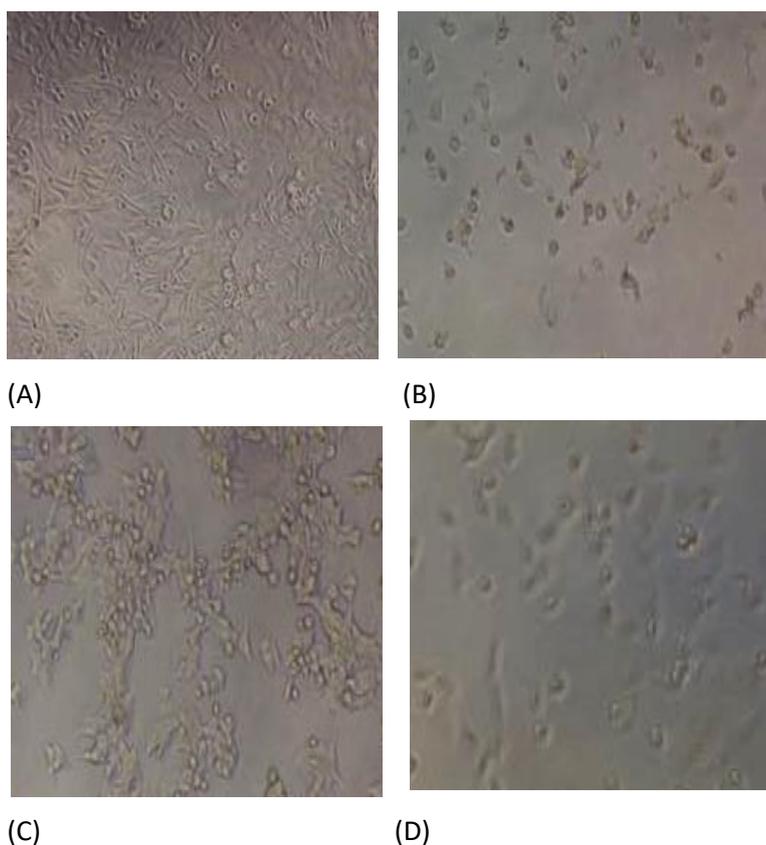


Figura 10- Característica morfológica das células MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento (A) controle negativo: células não tratadas; (B) controle positivo: células tratadas com doxorubicina 2,5 µg/mL; (C) células tratadas com 25 µg/mL de DGTN; (D) células tratadas com 25 µg/mL de DGTN-2.

5.3 ENSAIO MORFOLÓGICO DE APOPTOSE

As substâncias DGTN e DGTN-2 foram avaliadas pelo teste morfológico em células neoplásicas de mama, onde demonstraram potencial apoptótico. As células do controle negativo, ou seja, não tratadas, como esperado, apresentaram a menor porcentagem de células apoptóticas comparado às células tratadas.

As células MCF-7, tratadas por 24 horas nas doses de 0,25 e 2,5µg/mL de DGTN não apresentaram resposta significativas quando comparadas ao controle negativo. Após 48 horas de tratamento, mostraram maior número de células em

apoptose quando comparado ao número de células dos tempos de 24 e 72 horas. Foi evidenciado necrose nas células tratadas com DGTN-2, de forma dose-dependente, com aumento significativo na concentração de 25µg/mL. Durante tratamento de 24 horas não foi visto diferença significativa entre as doses, no entanto, quando comparadas ao controle o aumento é significativo ($p < 0,01$).

Para as células MDA-MB-231 a concentração de 25 µg/mL apresentou aumento significativo em 72 horas de tratamento, propagando a via apoptótica. Em ambas as linhagens, na maior concentração de tratamento, após 72 horas, houve morte celular completa e alterações de morfologia intensa, que impossibilitou a contagem de células íntegras. Desta forma, as substâncias DGTN e DGTN-2 em 250 µg/mL não apresentam valores representativos (Figura 11).

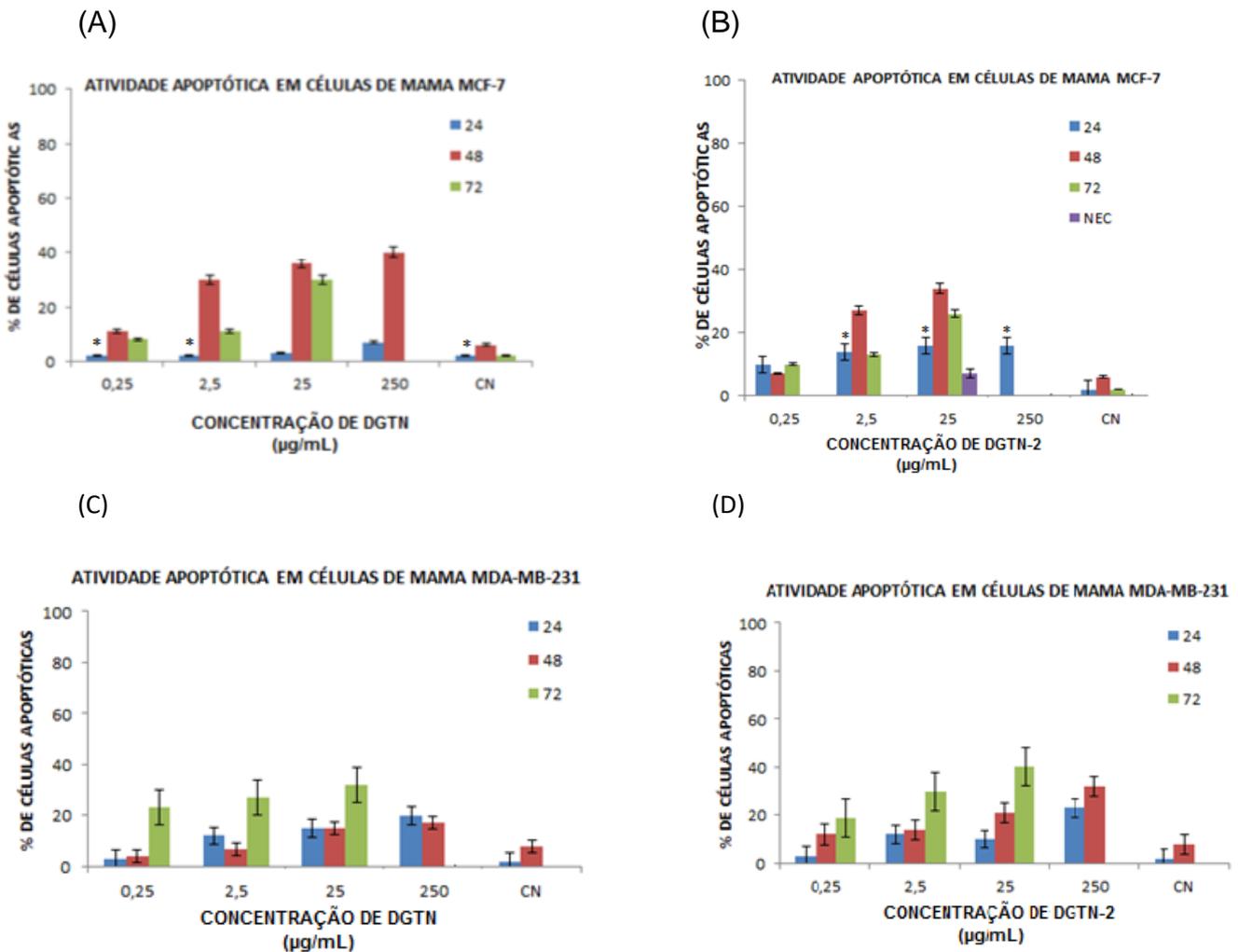


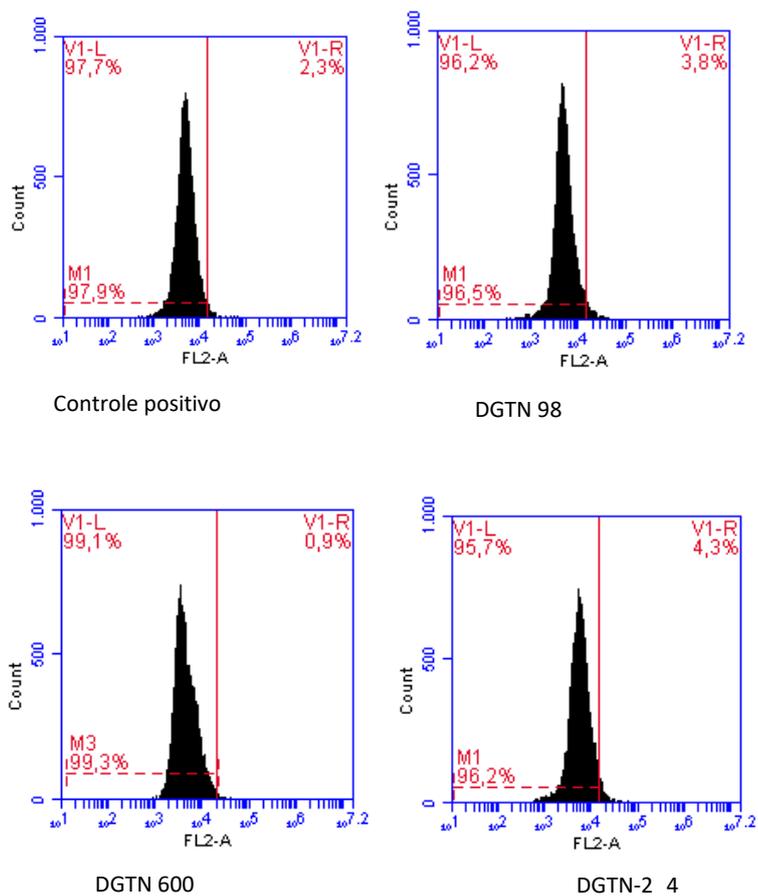
Figura 11- Efeito da DGTN e DGTN-2 nas concentrações de 0,5, 2,5, 25 e 250 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A) células de mama MCF-7 submetidas a tratamento com DGTN. B) células de mama MCF-7 submetidas a tratamento com DGTN-2. C) células de mama MDA-MB-231 submetidas a

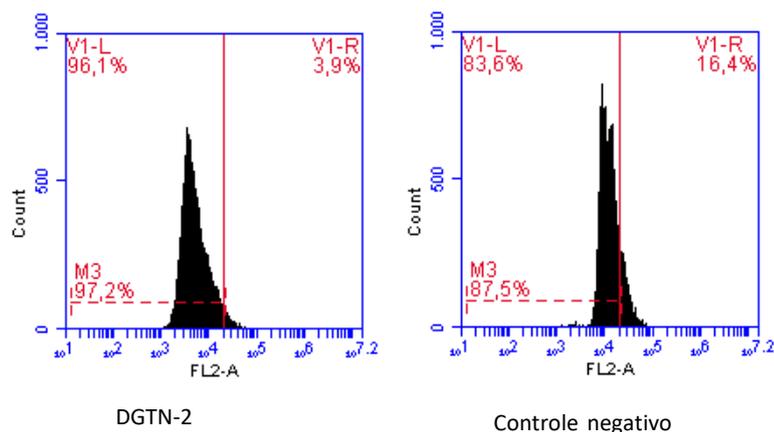
tratamento com DGTN. D) células de mama MDA-MB-231 submetidas a tratamento com DGTN-2. Estatística realizada usando ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett ($p < 0,01$). *Quando a substância não possui diferença significativa em comparação ao controle ou entre as doses.

5.4 CASPASE-3

Posterior à quantificação de apoptose após os tratamentos, foi avaliado a presença da caspase-3 ativa. As células MDA-MB-231 tratadas com a GI_{50} e TGI dos compostos DGTN e DGTN-2, após 48 horas não apresentaram expressão de caspase-3. As células tratadas com doxorrubicina expressaram 16,4% de caspase-3 ativa. Os dados podem ser observados nos histogramas. Figura 12.

(A)





(B)

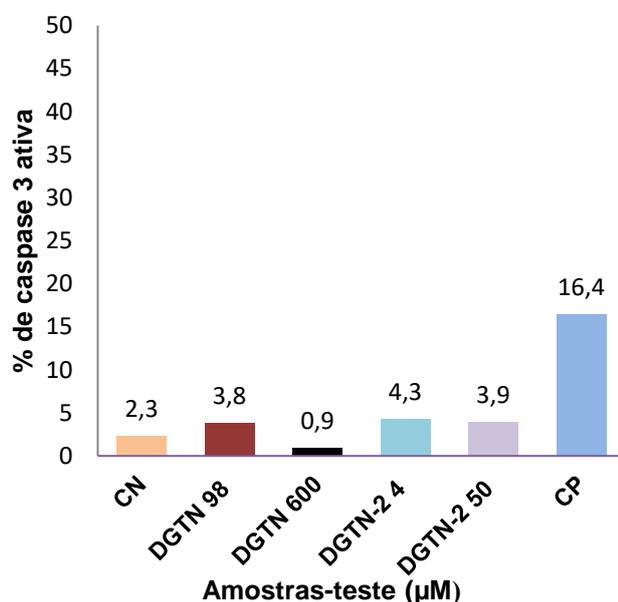


Figura 12- Efeito das amostras DGTN e DGTN-2 na ativação da caspase-3. (A) No histograma é mostrada a porcentagem de caspase ativa, como controle negativo foram utilizadas células não tratadas e como controle positivo as células foram tratadas com doxorrubicina. (B) O gráfico compara a quantidade de caspase ativa entre controle e tratamento. Para estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste Dunnett ($p < 0,01$).

4.4 CICLO CELULAR

Para avaliação do ciclo celular as células foram tratadas nas concentrações de GI_{50} de cada amostra-teste. Os dados podem ser observados nos histogramas (Figura 13 e 14).

As células MCF-7 não tratadas apresentam maior quantidade de células em fase G2/M (67,1%). Quando expostas ao tratamento com DGTN fazem arraste para

fase G1 (58,2%) e S (33%). E após tratamento com DGTN-2 estagnam em fase G1 (87,5).

As células MDA-MB-231 quando não tratadas mostraram maior quantidade na fase G2/M 37,7%. Após receber tratamento com DGTN permanecem em G2/M, porém com arraste para 83,4% das células. Como consequência há menos células em fase G1 e S.

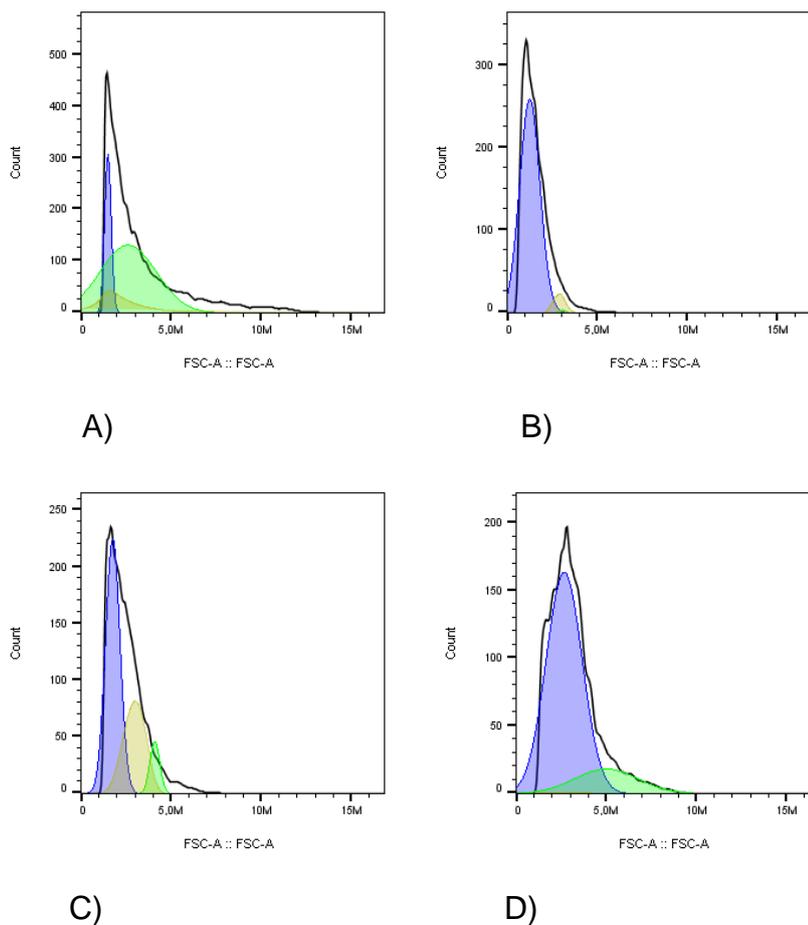


Figura 13- Efeito das substâncias isoladas de *Aniba heringuerii* no ciclo celular das células de mama MCF-7, tratadas por 48h. A) controle negativo, células sem tratamento; B) controle positivo, células tratadas com doxorubicina; C) células tratadas com 107 μM de DGTN D) células tratadas com 50,25 μM de DGTN-2.

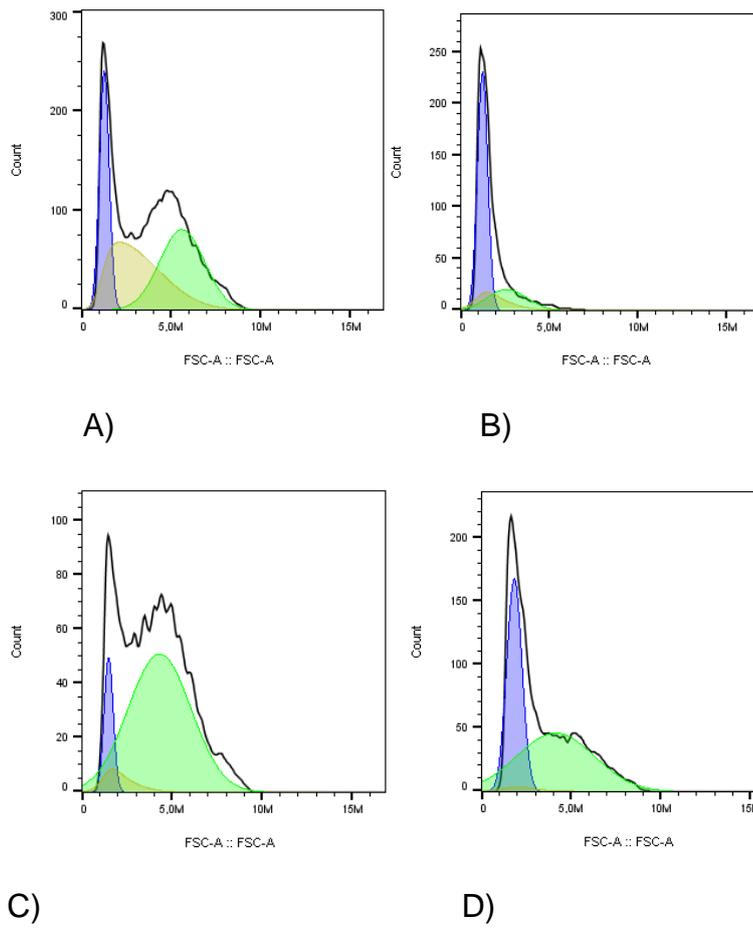


Figura 14 - Efeito das substâncias isoladas de *Aniba heringuerii* no ciclo celular das células de mama MDA-MB-231, tratadas por 48h. A) controle negativo, células sem tratamento; B) controle positivo, células tratadas com doxorrubicina; C) células tratadas com 98 μM de DGTN D) células tratadas com 4,4 μM de DGTN-2. Análise estatística usando ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett ($p > 0,01$).

Tabela-3 Mostra a quantidade de células em cada fase do ciclo celular. Pode-se comparar o controle negativo com os tratamentos nas linhagens de mama, MCF-7 e MDA-MB-231.

MCF-7	Fases do ciclo celular		
Amostra	G1	S	G2/M
CN	18,3	12,0	67,1
DGTN	58,2	33,0	8,27
DGTN-2	87,5	0,60	17,1

MDA-MB-231			
Amostra	G1	S	G2/M
CN	24,5	37,4	37,7
DGTN	11,8	6,06	83,4
DGTN-2	42,7	2,5	60,3

5. DISCUSSÃO

Estudos anteriores com o extrato etanólico das folhas da espécie *Aniba heringerii* mostram moderada atividade citotóxica nas linhagens celulares B16-F10, PC-03 e MCF-7, com GI_{50} entre 25,06 e 55,63 $\mu\text{g/mL}$. E pouco ativo para as linhagens 786-0, HT-29, UACC e NCI/ADR-RES nas concentrações de GI_{50} entre 130,08 e 209,72 $\mu\text{g/mL}$ (MARTINS, 2014). A fase hexânica, advinda do extrato, manteve o potencial citotóxico para B16-F10, PC-03 e MCF-7, contudo para 786-0, UACC e NCI/ADR-RES obteve moderada atividade com GI_{50} entre 43,18 e 55,06 $\mu\text{g/mL}$, muito inferior as GI_{50} entre 130,08 e 209,72 encontradas no extrato etanólico (TÓFOLI, 2013; MARTINS, 2014).

O potencial anticâncer demonstrado pelo extrato etanólico e pela fase hexânica (MARTINS, 2014), despertou o interesse do estudo das substâncias presentes. Como a fase hexânica foi a mais ativa, os testes fitoquímicos continuaram e dela foram obtidas as stiril-pironas (DGTN; DGTN-1 e DGTN-2).

Os resultados da atividade antiproliferativa de DGTN e DGTN-2 mostram potente atividade para células de mama MDA-MB-231 e MCF-7. A substância desidrogoniotalamina (DGTN) e seus dímeros são inéditos da espécie *Aniba heringerii*. No entanto, a goniothalamina, estrutura química conhecida e similar a DGTN, é obtida de espécies do gênero *Goniothalamus* e apresenta atividade antiproliferativa. Este efeito foi relatado por De Fatima *et. al* (2008) em diferentes linhagens neoplásicas.

DGTN-2 mostrou-se mais de 20X mais citotóxica contra as linhagens de mama quando comparada a DGTN, esta atividade pode ser quimicamente explicada. O dímero DGTN-2 possui uma fundição do anel lactônico com o ciclo-butânico, sem dupla ligação, o que possibilita a rotação molecular e facilita a ligação ao sítio de ação. A molécula DGTN tem conjugação estendida desde o anel aromático até o anel lactônico, deixando-a planar, o que dificulta a ligação ao sítio de ação (DE FÁTIMA *et al.*, 2006).

A atividade citotóxica é consequência de mudanças físicas no metabolismo celular, como a diminuição da confluência, o espaçamento e descolamento celular. Estas características foram vistas *in vitro* e corroboram e complementam o efeito antiproliferativo das amostras, uma vez que, impedindo a adesão celular impossibilita

a formação de tumores. Este descolamento infere que as amostras têm capacidade de hidrolisar proteínas de membrana, a ponto de comprometer a integridade da monocamada (TOFFOLI *et al.*, 2007). A perda de potencial de adesão, retração celular, degradação da cromatina, redução do núcleo e vacuolização são características reacionais das células e representam atividade apoptótica (MCGAHON *et al.*, 1995). Algumas destas características também foram evidenciadas nas células de mama MCF-7 e MDA-MB-231 quando tratadas com resveratrol (POZO-GUISADO *et al.*, 2002).

Além das proteínas de membrana responsáveis pela adesão celular, temos também componentes relacionados à sinalização de morte celular, como por exemplo as fosfatidilserinas, que são responsáveis pelo controle da entrada de substâncias na célula, ou seja, efluxo celular (ALABSI *et al.*, 2013). Em nosso estudo avaliamos indiretamente a integridade da membrana, quando observamos as células coradas com laranja de acridina/brometo de etídeo e identificamos presença de processo apoptótico.

As células íntegras fazem o efluxo do brometo de etídeo, não permitindo corar-se de vermelho-alaranjado. O brometo de etídeo quando atravessa membrana celular e intercala as bases nitrogenadas do DNA, emite fluorescência, o que possibilita identificar mudanças estruturais (THOMPSON, 1995). Os resultados mostram cerca de 35% de células coradas, representando ausência de integridade celular.

Ambas as linhagens celulares tratadas mostraram morfologia apoptótica com condensação de cromatina e formação de corpos apoptóticos. Dentre as sinalizações de morte celular por apoptose existem duas vias envolvidas, uma dependente e outra independente de caspase. Algumas neoplasias possuem deleção de caspases, como o carcinoma mamário MCF-7. Por isso, as vias envolvidas exclusivamente para tal neoplasia são independentes de caspase-3 (JÄNICKE *et al.*, 1998; SUSIN *et al.*, 2000; CAREY *et al.*, 2006).

Contudo, a simples presença do gene caspase-3 não impõe que a via apoptótica seja desencadeada por sua ativação. Como observado nos resultados as células MDA-MB-231 expressam caspase-3, no entanto, não estava ativa no tempo e doses testadas. Como nestas doses e tempo foram encontradas mudanças

conformacionais, possivelmente as substâncias induzam apoptose por via independente de caspase-3.

Stiril-pironas, como DGTN e DGTN-2, induzem altos níveis de estresse oxidativo em células MDA-MB-231, levando a apoptose devido dano ao DNA. O mesmo estudo aponta dependência de caspase-2 na via de morte (SEYED *et al.*, 2014). A caspase-2 é ativada por moléculas apoptogênicas da membrana mitocondrial, que facilitam a ativação da fase de degradação apoptótica sem que as caspases iniciadoras sejam expressas (SUSIN *et al.*, 2000). Essas afirmações justificam a baixa ativação de caspase-3 nas células de mama tratadas.

Os resultados apontam que a apoptose causada pelas amostras, DGTN e DGTN-2, em célula MDA-MB-231 é específica de fase G2/M, 60,3 e 83,4%, respectivamente. A fase G2/M possui um ponto de checagem independente da atividade de p53. O gene p53, por sua vez, está relacionado à ativação da caspase-3 e via intrínseca da apoptose. Neste contexto, pode-se dizer que o mecanismo envolvido na resposta celular ao tratamento foi apoptose, com parada de ciclo em G2/M sem ativação de caspase-3.

O efeito de parada de ciclo em G2/M parece ser característico das células neoplásicas tratadas com substâncias como as stiril-pironas. Células de câncer renal e de mama tratadas com goniotalamina também demonstraram parada de ciclo celular em G2/M (CHEN *et al.*, 2005).

Desta forma fica confirmado que um dos mecanismos que levam a morte celular quando tratadas com as stiril-pironas está relacionado com o checkpoint da fase G2/M. Alguns quimioterápicos utilizados na clínica, como os agentes alquilantes, inibidores do fuso mitótico e inibidores de topoisomerasas, atuam independente de p53 nas fases G2/M.

Os resultados de MCF-7 mostraram indução de parada de ciclo celular em G1 após tratamento com DGTN e DGTN-2. O mesmo achado foi descrito em células de mama submetidas a tratamento com 5-acetyl goniotalamin (5GTN), stiril-pirona extraída de *Goniothalamus marcanii* (BOONMUEN *et al.* 2016).

Com os dados analisados é possível que DGTN e DGTN-2 possam ser moldes para novos agentes anticâncer, devido potencial citotóxico, especialmente para neoplasias mamárias

6. CONCLUSÃO

As pironas isoladas das folhas da *Aniba heringerii* apresentaram inibição da proliferação principalmente para células de mama MCF-7 e MDA-MB-231. A substância desidrogoniotalamina (DGTN) para células MCF-7, mostrou capacidade de induzir morte pelo mecanismo de apoptose, e parada de ciclo em G1.

O dímero 2-desidrogoniotalamina (DGTN-2) demonstrou potencial citotóxico principalmente para MDA-MB-231, e características apoptóticas em todas as doses testadas. Contudo, levou a célula para apoptose independente de caspase-3 e ficou evidente que as substâncias interferem no ciclo celular.

Desta forma, é interessante continuar os estudos para elucidação completa das vias envolvidas na citotoxicidade. Verificar especialmente qual a relação entre as stiril-pironas e as proteínas de membrana celular.

REFERÊNCIA

ALABSI, A. M. et al. Induction of caspase-9, biochemical assessment and morphological changes caused by apoptosis in cancer cells treated with goniiothalamine extracted from *Goniiothalamus macrophyllus*. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 11, p. 6273-80, 2013.

AMBATIPUDI, S. et al. DNA methylome analysis identifies accelerated epigenetic ageing associated with postmenopausal breast cancer susceptibility. **European Journal of Cancer**, v. 75, p. 299-307, 2017.

ASHKENAZI, A.; SALVESEN, G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 337-356, 2014.

ATCC. MCF7 (ATCC® HTB-22™). 2016a. Disponível em: < <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#documentation> >. Acesso em: 10 de junho.

_____. MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). 2016b. Disponível em: < <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx> >. Acesso em: 10 de junho.

BAITELLO, J. B.; AGUIAR, O.; COE-TEIXEIRA, B. Novas espécies de Lauraceae para a flora brasileira. **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, n. 3, p. 445-450, 2001.

BERNSTEIN, L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 3-15, 2002.

BITTENCOURT, A. et al. The natural occurrence of 6-styryl-2-pyrone and their synthesis. **Tetrahedron**, v. 27, n. 5, p. 1043-1048, 1971.

BOONMUEN, Nittaya et al. 5-Acetyl goniiothalamine suppresses proliferation of breast cancer cells via Wnt/ β -catenin signaling. **European journal of pharmacology**, v. 791, p. 455-464, 2016.

BRANDÃO, H. N., DAVID, J. P.L., COUTO, R. D., NASCIMENTO, J. A. P., DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRUCE, W.; LIN, H. An Empirical Cellular Approach to the Improvement of Cancer Chemotherapy. In: (Ed.). **Current Concepts in the Management of Lymphoma and Leukemia**: Springer, v. 36, p.47-51, 1971.

CAIN, K.; BRATTON, S. B.; COHEN, G. M. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. **Biochimie**, v. 84, n. 2, p. 203-214, 2002.

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

CALIXTO, J. B; Campos, M. M; Michel, F. O; Santos, A. R. S; Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta medica**, v. 70, n. 02, p. 93-103, 2004.

CAREY, L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Jama**, v. 295, n. 21, p. 2492-2502, 2006.

CHAPPUIS, P. O. et al. Genetic predisposition to breast and ovarian cancer. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 18, n. 4, p. 287 - 295, 2017.

CHEN, W.-Y. et al. Goniiothalamine induces cell cycle-specific apoptosis by modulating the redox status in MDA-MB-231 cells. **European journal of pharmacology**, v. 522, n. 1, p. 20-29, 2005.

CHIDLEY, C.; Trauger, S. A.; Birsoy, K.; O'Shea, E. K.; The anticancer natural product ophiobolin A induces cytotoxicity by covalent modification of phosphatidylethanolamine. **Elife**, v. 5, p. e14601, 2016.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DE FÁTIMA, Â. Kohn, L. K.; Carvalho, J. E.; Pilli, R. A.; Show more. Cytotoxic activity of (S)-goniiothalamine and analogues against human cancer cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 3, p. 622-631, 2006.

DE FÁTIMA, Â. et al. Cytotoxicity of goniiothalamine enantiomers in renal cancer cells: involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy. **Chemico-biological interactions**, v. 176, n. 2, p. 143-150, 2008.

DE MELO, J. G.; Santos, A. G.; De Amorim, E. L. C.; Do Nascimento, S. C.; De Albuquerque, U. P.; Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2011, p. 14, 2011.

DEVERAUX, Q. L.; REED, J. C. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. **Genes & development**, v. 13, n. 3, p. 239-252, 1999.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FANG, R.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J. Cytotoxic effects of compounds from *Iris tectorum* on human cancer cell lines. **Journal of ethnopharmacology**, v. 118, n. 2, p. 257-263, 2008.

FRESHNEY, R. I. **Culture of specific cell types**. Wiley Online Library, 2005.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107, 2012.

GOLDHIRSCH, A. et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Annals of oncology**, v. 20, n. 8, p. 1319-1329, 2009.

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C. L.; NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E.; O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 129-139, 2009.

HAFPTY, B. G. et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 24, n. 36, p. 5652-5657, 2006.

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

HARTVVELL, L. H.; WEINERT, T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. v. 144, n. 5, p. 646-674, 1989.

HENDERSON, B. E.; FEIGELSON, H. S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 427-433, 2000.

HINDS, P. W. et al. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. **Cell**, v. 70, n. 6, p. 993-1006, 1992.

HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007.

HULKA, B. S.; LIU, E. T.; LININGER, R. A. Steroid hormones and risk of breast cancer. **Cancer**, v. 74, n. S3, p. 1111-1124, 1994.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Estimativa 2016/2017. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2015 Disponível em<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>.

JÄNICKE, R. U.; SPRENGART, L. M.; WATI, R. M.; and PORTER, A. G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9357-9360, 1998.

KANG, S.; S WANG, S.; KUIDA, K.; YUAN, J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock. **Cell Death Differ**, v. 9, p. 1115-1125, 2002.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3, 2009.

KUROKAWA, H. et al. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. **Cancer research**, v. 60, n. 20, p. 5887-5894, 2000.

LAMBERTINI *et al.* Reproductive behaviors and risk of developing breast cancer according to tumor subtype: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **Cancer treatment reviews**, v.49, p 65-76, 2016.

LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750-2767, 2011.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **cell**, v. 88, n. 3, p. 323-331, 1997.

LUMACHI, F.; Brunello, A.; Maruzzo, M.; Basso, U.; Basso, S. M.M. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 5, p. 596-604, 2013.

MANCINI, R. S. Chemotherapy administration sequence: A review of the literature and creation of a sequencing chart. 2011.

MANTLE, D.; LENNARD, T.; PICKERING, A. T. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. **Adverse drug reactions and toxicological reviews**, v. 19, n. 3, p. 223-240, 2000.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MARTINS, L. A. V. **Avaliação do potencial anticâncer de espécies vegetais de Mato Grosso do Sul**. 2014. Dissertação de Mestrado.

MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in cell biology**, v. 46, p. 153-185, 1995.

MEDRADO, H.; Davida, J. M.; Davidb J. P.; Brandão, H. N. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. **Quim Nova**, v. 28, n. 2, p. 243-258, 2015.

MINSKY, B. D. et al. INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy. **Journal of clinical oncology**, v. 20, n. 5, p. 1167-1174, 2002.

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MOORE, M. J. CALEB, Q. W.; KENNEDY, J.; SILVER, P. A. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. **Cell**, v. 142, n. 4, p. 625-636, 2010.

MORAES, P. L. R. D. Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, p. 253-270, 2005.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; DE CARVALHO, A. M.; DOS SANTO, T. S.; Southern Bahian moist forests. **The Botanical Review**, v. 49, n. 2, p. 155-232, 1983.

MORRIS, G. J. et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African–American and Caucasian patients. **Cancer**, v. 110, n. 4, p. 876-884, 2007.

MOTOKURA, T. et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. **Nature**, v. 350, n. 6318, p. 512-515, 1991.

MU, Q. et al. Three new styrylpyrones from goniothalamus leiocarpus. **Chinese Chemical Letters**, v. 10, n. 2, p. 135-138, 1999.

MURAKAMI, H.; NURSE, P. DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeasts. **Biochemical Journal**, v. 349, n. 1, p. 1-12, 2000.

NIETO-JIMÉNEZ, C. et al. DNA-damage related genes and clinical outcome in hormone receptor positive breast cancer. **Oncotarget**, 2016.

NURSE, P.; BISSETT, Y. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. **Nature**, v. 292, n. 5823, p. 558-560, 1981.

PAPAC, R. J. Origins of cancer therapy. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 74, n. 6, p. 391, 2001.

PARK, S. Y.; Gönen, M.; Kim, H. J.; Michor, F.; Polyak, K. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 2, p. 636-644, 2010.

PEANA, A. T. et al. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European journal of pharmacology**, v. 460, n. 1, p. 37-41, 2003.

PEDRALLI, G. A família Lauraceae Lindley no RS, Brasil: gêneros Endlicheria Nees, Laurus L. e Cryptocarya R. Br. **Acta Botanica Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 27-41, 1987.

PETERS, C.; BROWN, S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. **Biosci Rep**, v. 35, n. 4, p.e 225, 2015.

POLYAK, K. Heterogeneity in breast cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 10, p. 3786-3788, 2011.

POZO-GUISADO, E.; BARRIENTOS, A. A.; NAVARRO, S. M.; JOSEFAT, B. S.; Salguero, P. M. F. 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, 2002.

REZENDE, B. A. et al. Dihydrogoniotalamin, an Endothelium and NO-Dependent Vasodilator Drug Isolated from Aniba panurensis. **Planta medica**, v. 81, n. 15, p. 1375-1381, 2015.

RICCI, M. S.; ZONG, W.-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **The oncologist**, v. 11, n. 4, p. 342-357, 2006.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: (Ed.). **Flowering Plants- Dicotyledons**: Springer, p.366-391, 1993

ROSEN, E.; FAN, S.; ISAACS, C. BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12, n. 3, p. 533-548, 2005.

SALVONI, F.; EBBELL, B. **The papyrus Ebers. The greatest egyptian medical document**: JSTOR 1940.

SCHMIDT, D. Conrad, J.; Klaiber, I.; Beifuss, U. Synthesis of the bis-potassium salts of 5-hydroxy-3-oxopent-4-enoic acids and their use for the efficient preparation of 4-hydroxy-2 H-pyran-2-ones and other heterocycles. **Chemical communications**, n. 45, p. 4732-4734, 2006.

SEYED, M. A.; JANTAN, I.; BUKHARI, S. N. A. Emerging anticancer potentials of goniotalamin and its molecular mechanisms. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

SILICIANO, J. D. et al. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. **Genes & development**, v. 11, n. 24, p. 3471-3481, 1997.

SIMIĆ, A. et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 713-717, 2004.

SLOW, C. C.; NIEDUSZYNSKA, S. R.; MÜLLER, C. A.; NIEDUSZYNSKI, C. A. OriDB, the DNA replication origin database updated and extended. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. 682-686, 2011.

SIRIWATANAMETANON, N.; Fiebich, B. L.; Efferth, T.; Prieto, J. M.; & Heinrich, M. Traditionally used Thai medicinal plants: in vitro anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 196-207, 2010.

SØRLIE, 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, 2001.

STINCHCOMB, D.; STRUHL, K.; DAVIS, R. yeast chromosomal replicator. **Nature**, v. 282, p. 1, 1979.

SUSIN, S. A. et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 4, p. 571-580, 2000.

SZYF, M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 49, p. 243-263, 2009.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1456-1462, 1995.

Toffoli, M. C.; Gabra, B. H.; Teixeira, C. F.; Sirois, P.; & Jancar, S. Endothelins mediate neutrophil activation, ProMMP-9 release and endothelial cell detachment. **Inflammation**, v. 30, n. 1-2, p. 28-37, 2007.

TÓFOLI, D. Busca de substâncias bioativas em Lauraceas de Mato Grosso do Sul: constituintes fixos e voláteis de *Aniba heringerii* vattimo-gil e *Mezilaurus crassiramea* (Meissner) Taubert ex Mez. . 2013. Dissertação de Mestrado.

VANLANGENAKKER, N.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 75-86, 2012.

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, 2003.

WENDT *et al.* Induction of p21CIP/WAF-1 and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. **Oncogene**, v. 25, n.7, p. 972-980, 2006.

WILLIS, S. N. et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. **Genes & development**, v. 19, n. 11, p. 1294-1305, 2005.

WU, H.-C.; CHANG, D.-K.; HUANG, C.-T. Targeted therapy for cancer. **J Cancer Mol**, v. 2, n. 2, p. 57-66, 2006.

ZABLUDOFF, S. D. et al. AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 9, p. 2955-2966, 2008.