

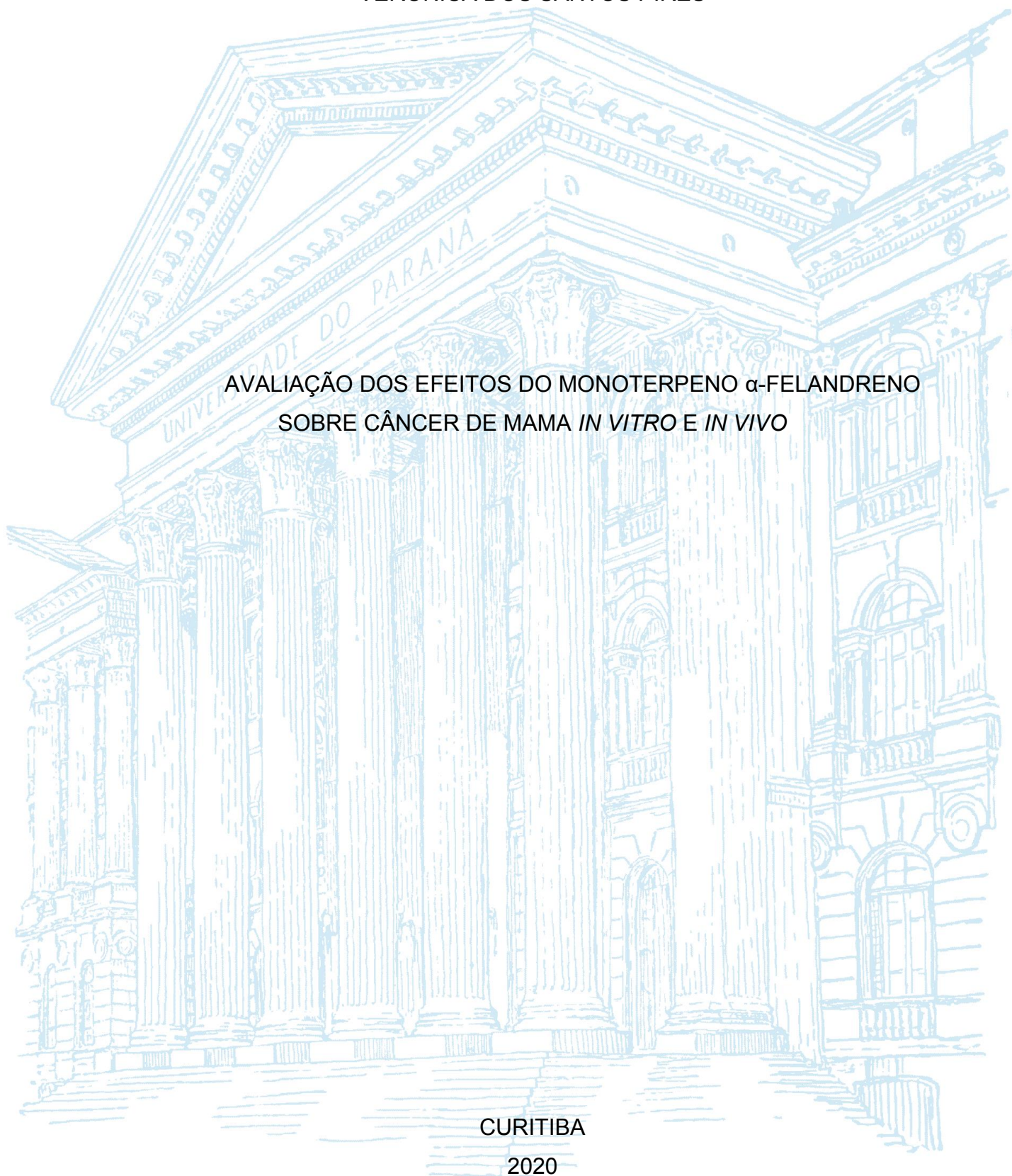
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VERÔNICA DOS SANTOS PIRES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MONOTERPENO α -FELANDRENO
SOBRE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO*

CURITIBA

2020



VERÔNICA DOS SANTOS PIRES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MONOTERPENO α -FELANDRENO
SOBRE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO*

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Edneia A. S. R. Cavaliere
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Giseli Klassen

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Pires, Verônica dos Santos

Avaliação dos efeitos do monoterpene α -felandreno sobre câncer de mama *in vitro* e *in vivo*. / Verônica dos Santos Pires. – Curitiba, 2020.
80 p.: il.

Orientadora: Edneia A. S. R. Cavalieri.

Coorientadora: Giseli Klassen

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Mamas – Câncer. 2. Carcinoma de Ehrlich. 3. Epigenômica. 4. Metástase. 5. Terpenos. I. Título. II. Cavalieri, Edneia Amancio de Souza Ramos, 1981-. III. Klassen, Giseli., 1966. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 616.99449



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VERÔNICA DOS SANTOS PIRES** intitulada: **Avaliação dos Efeitos do Monoterpeno alpha-phellandrene sobre o Câncer de Mama in vitro e in vivo.**, sob orientação da Profa. Dra. EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS CAVALIERI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 17 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

18/12/2020 19:23:55.0

EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS CAVALIERI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

11/01/2021 13:16:30.0

CARLA CRISTINE KANUNFRE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

05/01/2021 22:46:53.0

JOSÉ CLAUDIO CASALI DA ROCHA

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1695 - E-mail: posmpp@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 66213

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 66213

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por me permitir realizar mais esta etapa em minha vida.

À professora Edneia, serei eternamente grata por ter me dado a oportunidade de começar, por ter me acolhido de volta, pela orientação e todos os ensinamentos; por cada vez que buscou o melhor e lutou por nós, muito obrigada!

À professora Giseli, obrigada pela co-orientação, pelo acolhimento no LabEpi e por todos os ensinamentos compartilhados.

Todos os professores que de alguma forma compartilharam seu tempo e conhecimentos, seja em disciplinas ou no dia a dia, muito obrigada.

Fernando Augusto, sempre te disse que você era o mestrando e eu a IC. Obrigada pela amizade e parceria. Espero compartilhar muito tempo de bancada com você, Suzana.

Aos demais colegas de laboratório, também sou grata. Lucas, por ter passado o bastão para mim e ter me ensinado tudo sobre o LabEpi; Claudinha por todo ensinamento e apoio; Julia, Michelle, Leonardo, João, Yan, obrigada a todos.

Agradeço aos colegas e laboratórios vizinhos do LabNefro, LabNeuro, Limq e Lpcv por cada reagente, equipamento, experimento ou experiências compartilhadas, em especial às professoras Alexandra Acco e Célia Regina na parceria e auxílio dos experimentos *in vivo* e de imunofluorescência.

Agradeço à minha família por todo incentivo, apoio e amor.

Em especial, agradeço à Kimberlly pelo apoio incondicional e ter me ajudado a tornar tudo isso possível. Você segurou a barra tantas vezes e me fez acreditar que daria tudo certo. Por todo amor, cumplicidade e felicidade: obrigada! Você foi fundamental para que eu conseguisse.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, a PRPPG-UFPR e à Fundação Araucária pelo financiamento, e à CAPES pela bolsa: obrigada pela oportunidade de aprender e desenvolver este projeto.

RESUMO

O câncer é responsável por milhares de mortes todos os anos, no Brasil e no mundo, sendo esse fato influenciado parcialmente pelas limitações das drogas antitumorais e por mecanismos de resistência. Neste contexto, a identificação de novas moléculas que possam ser utilizadas como adjuvantes no tratamento do câncer é de extrema importância, principalmente se considerarmos que os quimioterápicos atuais possuem diversos efeitos colaterais e não se mostram eficazes contra o processo de metástase. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral do monoterpreno α -felandreno (PLD) no câncer de mama *in vitro*, utilizando as linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, e *in vivo* utilizando o modelo tumoral de Ehrlich, o carcinoma mamário murino. *In vitro*, o α -felandreno promoveu a redução da viabilidade celular de maneira dose e tempo-dependente, com IC₅₀ de 810,5 nM para a linhagem MCF-7 e 466,8 nM para a MDA-MB-231. O tratamento com 100 nM do PLD por 48 h, diminuiu a taxa de proliferação, migração e a capacidade de adesão celular à laminina da linhagem MDA-MB-231 enquanto os dados de expressão gênica mostraram que o α -felandreno influencia nas vias de morte por apoptose nas linhagens tumorais. O composto promoveu o aumento na expressão de genes que caracterizam melhor prognóstico no câncer, tais como *CDH1* e *ADAM33*, bem como a redução da atividade de MMP-2. Como primeiro relato na literatura, o α -felandreno promoveu a desmetilação global da linhagem MDA-MB-231 mostrando propriedade desmetilante desse composto. *In vivo*, o PLD diminuiu significativamente o volume e peso dos tumores, e valores dos parâmetros hematológicos mostraram aumento na quantidade de leucócitos dos animais. Na histologia, foi evidenciado a diminuição da intensidade de necrose nos tumores de animais tratados com o α -felandreno, enquanto os dados da expressão gênica mostraram a ativação da morte celular por apoptose e necroptose. Portanto, esses resultados permitem sugerir que o α -felandreno possui atividade antitumoral e pode influenciar em processos metastáticos *in vitro* e *in vivo*, sendo necessários mais estudos para caracterizar os mecanismos moleculares e efeitos epigenéticos do composto.

Palavras-chave: Epigenética. Metástase. Terpenos. Tumor de Ehrlich.

ABSTRACT

Cancer is responsible for thousands of deaths every year, in Brazil and in world, and this fact is influenced, in part, by limitations of antitumor drugs and by resistance mechanisms. In this context, the identification of new molecules that can be used as adjuvants in the treatment of cancer is extremely important, mainly if we consider that the current chemotherapies have side diverse effects and do not show effectiveness against the metastasis process. The objective of this work was to evaluate the antitumoral activity of monoterpene α -phellandrene (PLD) in the breast cancer in vitro, using the tumor lines MCF-7 and MDA-MB-231, and in vivo, using the Ehrlich's tumor model, the murine breast carcinoma. In vitro, the α -phellandrene promoted the reduction of cell viability in a dose and time-dependent manner, with IC₅₀ of 810,5 nM for MCF-7 cell line and 466,8 nM for the MDA-MB-231. The treatment with 100 nM of PLD by 48 hours, decreased the rate of proliferation, migration and capacity of cell adhesion to laminin of the line MDA-MB-231 while the gene expression data suggest that α -phellandrene influences in the death pathways by apoptosis in tumor lines. The compound was able to promote an increase in the expression of genes that characterize a better prognosis in cancer, such as CDH1 and ADAM33, as well a reduction of MMP-2 activity, suggesting that the compound favors the inhibition of metastatic processes. As the first report in the literature, α -phellandrene promoted the global demethylation of the MDA-MB-231, suggesting a demethylating property of this compound. In vivo, PLD significantly decreased the volume and weight of the tumors and values of hematological parameters suggested effects in the animals' immune response. In the tumor histology, a decrease in the intensity of necrosis was observed in animals treated with α -phellandrene, while data of gene expression suggests the activation of cell death by apoptosis and necroptosis. Therefore, these results suggest that α -phellandrene has antitumor activity and may influence metastatic processes in vitro and in vivo, requiring further studies to characterize the molecular mechanisms and epigenetics effects of the compound.

Keywords: . Epigenetics. Metastasis. Terpenes. Ehrlich's tumor.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA.....	21
FIGURA 2 - METILAÇÃO DO DNA.....	24
FIGURA 3 - O MONOTERPENO α -FELANDRENO.....	26
FIGURA 4 - ANÁLISE MORFOLÓGICA DA LINHAGEM MDA-MB-231 TRATADA COM α -FELANDRENO.....	37
FIGURA 5 - EFEITO DO α -FELANDRENO NA VIABILIDADE CELULAR.....	38
FIGURA 6 - EFEITO DO α -FELANDRENO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	39
FIGURA 7 - EFEITO DO α -FELANDRENO NA MIGRAÇÃO CELULAR.....	40
FIGURA 8 - EFEITO DO α -FELANDRENO NA ADESÃO CELULAR.....	41
FIGURA 9 - EFEITO DO α -FELANDRENO NA EXPRESSÃO GÊNICA <i>IN VITRO</i> ...41	
FIGURA 10 - ATIVIDADE DE MMP-2 APÓS O TRATAMENTO COM α -FELANDRENO.....	42
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO GLOBAL.....	43
FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL.....	44
FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	45
FIGURA 14 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	46
FIGURA 15 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TUMOR DE EHRLICH.....	47
FIGURA 16 - CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE NECROSE DOS TUMORES.....	48
FIGURA 17 - EFEITO DO α -FELANDRENO NA EXPRESSÃO GÊNICA <i>IN VIVO</i> ...49	
FIGURA 18 - MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO PARA O α -FELANDRENO NOS MODELOS TUMORAIS DE MAMA.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS E MASSA CORPORAL AO PESO DOS ANIMAIS VEÍCULO E TRATADOS COM α -FELANDRENO.....	45
TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE NECROSE DOS TUMORES.....	48

LISTA DE SIGLAS

5-azadC – 5-aza-2'-deoxicitidina

5-meC – 5-metilcitosina

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

BSA – Albumina sérica bovina (BSA)

CpGs – Dinucleotídeos CpGs

DEPEC – Dietilpirocarbonato

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNMTs – DNA metiltransferases

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

HER-2 – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2

MEC – Matriz extracelular

MMPs – Metaloproteinases

MTX – Metotrexato

NO – Óxido Nítrico

PFA – Paraformaldeído

PLD – α -felandreno

RE – Receptor de estrógeno

RP – Receptor de progesterona

SFB – Soro fetal bovino

TEM – Transição epitélio-mesênquima

TNBC – Subtipo triplo negativo

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 CÂNCER	14
2.2 CÂNCER DE MAMA	15
2.2.1 Classificações do câncer de mama	16
2.2.2 Terapias para o câncer de mama.....	18
2.3 MECANISMOS MOLECULARES: PROGRESSÃO TUMORAL E METÁSTASE	19
2.4 EPIGENÉTICA	23
2.5 O MONOTERPENO α -FELANDRENO	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 LINHAGENS E CULTIVO CELULAR	29
4.1.1 Ensaio de viabilidade celular	29
4.1.2 Curva de proliferação celular.....	30
4.1.3 Ensaio de migração celular (<i>Wound healing</i>)	30
4.1.4 Ensaio de adesão celular	31
4.1.5 Avaliação do padrão de expressão dos genes alvo em linhagens tumorais	31
4.1.5.1 Extração de RNA e síntese do cDNA.....	31
4.1.5.2 PCR em tempo real	32
4.1.6 Análise da Atividade Gelatinolítica por Zimografia	32
4.1.7 Extração de DNA.....	33
4.1.8 Quantificação de 5-meC.....	34
4.2 ENSAIOS <i>in vivo</i>	34
4.2.1 Análise histopatológica dos tumores	35
4.2.2 Avaliação do padrão de expressão gênica nos tumores murinos	36
4.2.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	36
4.2.2.2 PCR em tempo real	36
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 RESULTADOS	37
5.1 EFEITOS DO α -FELANDRENO SOBRE A VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	37

5.2 ENSAIO DE MIGRAÇÃO (<i>WOUND HEALING</i>)	39
5.3 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR	40
5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM LINHAGENS TUMORAIS.....	41
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMP-2.....	42
5.6 EFEITOS DO α -FELANDRENO NA METILAÇÃO DO DNA	43
5.7 EFEITOS ANTITUMORAIS DO α -FELANDRENO <i>IN VIVO</i>	43
5.7.1 Crescimento tumoral	43
5.7.2 Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	45
5.7.3 Análise histopatológica.....	47
5.7.4 Avaliação da expressão gênica nos tumores	48
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICE I – CLASSIFICAÇÃO DAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA MCF7 E MDA-MB-231.....	78
APÊNDICE II - INICIADORES DE RT-qPCR PARA LINHAGENS HUMANAS	79
APÊNDICE III - INICIADORES DE RT-qPCR PARA CAMUNDONGOS (<i>Mus musculus</i>).....	80

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2018, foram diagnosticados mais de 18 milhões de novos casos de câncer no mundo com mais de 9 milhões de mortes, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, sendo os cânceres de pulmão (com traqueia e brônquios, 2,09 milhões de casos), mama (2,09 milhões de casos) e próstata (1,28 milhão de casos) os três mais frequentes (Mattiuzzi e Lippi, 2019). Cerca de 90% das mortes por câncer são relacionadas ao processo metastático, o qual envolve várias etapas, como invasão local, intravasamento, circulação, extravasamento e colonização (Reymond *et al.*, 2013).

Em comparação com os tumores primários, os tumores metastáticos respondem mal aos tratamentos atuais, como radioterapia, quimioterapia e terapia direcionada que são mais potentes contra células em proliferação, uma vez que as células metastáticas podem estar dormentes durante algumas etapas do processo metastático (Zhang *et al.*, 2019). Além disso, os medicamentos atuais e as abordagens para neutralizar os efeitos adversos induzidos pela quimioterapia são frequentemente ineficazes, e não tratam das sequelas potenciais a longo prazo, promovendo mais desconforto ao paciente que está em tratamento. Nesse sentido, novas abordagens para melhorar a tolerância e reduzir as sequelas da quimioterapia do câncer são urgentemente necessárias (Nurgali *et al.*, 2018).

A busca incessante por alternativas aos tratamentos convencionais faz com que novas abordagens como a imunoterapia e as drogas epigenéticas (epi-drogas) sejam extremamente promissoras. Ambas já demonstraram serem eficientes de forma isolada ou como adjuvantes e a combinação das duas terapias parece ser ainda mais potente no tratamento de diversos cânceres (Jones *et al.*, 2019).

Algumas epi-drogas são derivadas de compostos naturais e têm demonstrado grande eficiência como agentes antitumorais, como, por exemplo, a curcumina, um polifenol com potencial anticâncer (Sa e Das, 2008) e com propriedades de regulação de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA (Fang *et al.*, 2007). Várias classes de compostos naturais têm sido investigadas sobre as propriedades antitumorais e vêm demonstrando serem capazes de afetar a progressão do câncer por meio de diversos mecanismos, principalmente através da modulação de vários fatores de transcrição oncogênicos (Salehi *et al.*, 2018).

Os terpenos, constituintes do óleo essencial de várias plantas, têm sido amplamente estudados quanto a sua atividade anticâncer, demonstrando o efeito de forma isolada ou contribuindo para a sensibilização de diversos cânceres aos tratamentos convencionais (Cox-Georgian *et al.*, 2019). O monoterpeneo α -felandreno tem sido relacionado à algumas propriedades biológicas, bem como sua atividade antitumoral também foi relatada *in vitro*. O composto apresentou resultados contra linhagens de carcinoma hepático humano bem como contra linhagens de leucemia murina (Hsieh *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016). Por mais que a atividade antitumoral do α -felandreno já tenha sido relatada, pouco se sabe sobre essa propriedade e ainda não se tem dados sobre a atuação do composto em processos metastáticos, bem como, até o momento, não foram descritos os efeitos epigenéticos do α -felandreno.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antitumorais do α -felandreno *in vitro* e *in vivo* em câncer de mama.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e está entre as principais causas de morte antes dos 70 anos de idade na maioria dos países, segundo dados do *Global Cancer Observatory*, o qual estimou mais de 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes por esta causa em todo o mundo, apenas em 2018 (Bray *et al.*, 2018). Atualmente o câncer é a segunda causa mundial de morte, atrás da doença cardíaca isquêmica, mas deve se tornar a primeira até 2060 (Mattiuzzi e Lippi, 2019).

No Brasil, segundo dados do Inca (2019), foram estimados quase 686 mil novos casos de neoplasias malignas para o ano de 2020. Os homens são acometidos principalmente pelo câncer de próstata, o qual representa 29,2% dos casos, seguido dos cânceres de cólon e reto (9,1%) e traqueia, brônquio e pulmão (7,9%). Nas mulheres, o câncer de mama é o mais prevalente, representando 29,7% dos casos, seguido do câncer de cólon e reto (9,2%) e do câncer do colo do útero (7,4%).

Os números de novos casos e a mortalidade por câncer estão crescendo rapidamente em todo o mundo. As razões podem estar associadas ao envelhecimento e crescimento populacional, bem como às mudanças na prevalência e na distribuição dos fatores de risco para o câncer, dos quais vários estão associados ao desenvolvimento socioeconômico. Em países em desenvolvimento, verifica-se o declínio dos tipos de câncer associados às infecções e ao aumento daqueles associados a incorporação de hábitos e atitudes associados à urbanização, como sedentarismo e alimentação inadequada, por exemplo (Bray *et al.*, 2018). Por mais que esses países concentrem as maiores taxas de incidência da doença, a taxa de morte vem diminuindo durante as últimas décadas. Por outro lado, os países de baixa e média renda concentram 70% das mortes globais por câncer. Em geral os pacientes permanecem sem diagnóstico até atingirem estágios avançados da doença, quando a probabilidade de tratamento curativo é muito reduzida (Middleton *et al.*, 2019; Siegel *et al.*, 2019).

A implementação da prevenção primária do câncer, ou seja, a identificação e modificação de fatores de risco, juntamente com melhoras e avanços nas terapêuticas disponíveis, compõem o conjunto de estratégias fundamentais para a melhoria do

cenário do câncer em todo o mundo (Bray *et al.*, 2018; Middleton *et al.*, 2019).

2.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente no Brasil e no mundo entre as mulheres. Para o ano de 2018 foram estimados aproximadamente 2,1 milhões de novos casos em todo mundo, com mais de 626 mil mortes. No Brasil, foram estimados 66.280 novos casos de câncer de mama, para cada ano do triênio 2020-2022, correspondendo a taxa de incidência de 61,61 novos casos a cada 100 mil mulheres (Bray *et al.*, 2018; Inca, 2019).

Muitos fatores estão associados com o risco do câncer de mama, sendo que a idade acima dos 50 anos é considerado o mais importante (Inca, 2019). Embora a doença ocorra a nível global, sua incidência, mortalidade e taxas de sobrevivência variam consideravelmente entre as diferentes partes do mundo, o que pode ser devido a muitos fatores, tanto endógenos quanto exógenos. Assim como a idade, o gênero é um dos principais fatores de risco, considerando que o câncer de mama é frequentemente uma doença exclusiva de mulheres e seu surgimento é muito raro em homens, sendo relacionado a menos de 1% de todos os casos de câncer (Momenimovahed e Salehiniya, 2019).

Raça, etnia, genética e histórico familiar também são fatores não modificáveis associados ao câncer de mama. Vários fatores genéticos contribuem para esse risco, sendo que a causa mais comum de de câncer de mama hereditário é devido a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. O risco de desenvolver câncer de mama próximo dos 70 anos é de 55 – 65% para os portadores da mutação em *BRCA1* e de 45% para os mutados em *BRCA2*, sendo que próximo dos 80 anos esse risco aumenta para 79% e 69%, respectivamente. De maneira similar, os fatores hereditários também exercem grande influência sobre o risco do câncer. Mulheres com histórico familiar de câncer de mama, que são negativas em termos de mutações *BRCA*, têm aproximadamente 11 vezes mais probabilidade de desenvolver câncer de mama (Ahmad, 2019; Momenimovahed e Salehiniya, 2019).

Ainda, muitos outros fatores modificáveis também podem estar associados ao risco aumentado de câncer de mama, incluindo densidade mamográfica, história reprodutiva (por exemplo, idade na menarca, idade na menopausa, paridade e idade no primeiro nascimento vivo), fatores hormonais exógenos (por exemplo, uso de

contraceptivo oral e uso de terapia de reposição hormonal pós-menopausa), fatores antropométricos (por exemplo, altura e índice de massa corporal), fatores de estilo de vida (por exemplo, prática de exercícios físicos, dieta, consumo de álcool e tabaco), bem como fatores ambientais (por exemplo, a exposição à poluição e à agentes químicos e radioativos). Esses fatores se combinados aos fatores hereditários e/ou genéticos, podem melhorar a estratificação de risco (Ahmad, 2019; Lee *et al.*, 2019).

A detecção do câncer em estágio inicial pode reduzir significativamente as taxas de mortalidade por câncer de mama a longo prazo. A mamografia é a técnica de rastreamento padrão atual, porém, apresenta limitações sobre a detecção para indivíduos com menos de 40 anos e mamas densas, e pode apresentar baixa sensibilidade a pequenos tumores, menores de 1 mm (Jafari *et al.*, 2018). Outras técnicas de imagem, como ultrassom, ressonância magnética, tomografia computadorizada e por emissão de pósitrons, podem ser usadas para diagnóstico e monitoramento de pacientes em vários estágios. Além disso, análises histológicas através de biópsia e a utilização de marcadores moleculares e bioquímicos também podem ser empregados como ferramentas auxiliares de diagnóstico, indicação terapêutica e acompanhamento de pacientes com câncer de mama (Wang, 2017).

2.2.1 Classificações do câncer de mama

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea e pode ser classificada em diversos tipos de acordo com características histológicas ou moleculares. A classificação histológica é feita com base na origem da célula envolvida, sendo divididos em carcinomas – que correspondem aos cânceres de origem no componente epitelial da mama, que consiste nas células que revestem os lóbulos e os ductos terminais; e sarcomas – uma forma muito mais rara de câncer de mama, decorrentes dos componentes do estroma da mama, que incluem miofibroblastos e células dos vasos sanguíneos. Os carcinomas podem ainda ser subclassificados como ductais ou lobulares, e de acordo com o extensão do tumor, podendo ser dados como invasivos ou *in situ* (não invasivos) (Feng *et al.*, 2018; Ahmad, 2019).

Dos carcinomas *in situ*, o ductal é o mais comum, o qual se desenvolve dentro do lúmen do ducto mamário, e por mais que se apresente limitado e seja considerado não invasivo, pode ter alto potencial de evolução para a forma invasiva do câncer. Os

avanços na biologia molecular permitiram estabelecer fortes relações entre o carcinoma ductal *in situ* e o câncer de mama invasivo, sugerindo que as formas *in situ* podem ser precursoras dos carcinomas invasivos (Burstein *et al.*, 2004). Quando na forma invasiva, esses tumores estão relacionados aos piores prognósticos, pois possuem células capazes de infiltrar o estroma mamário, com ocorrência frequente disseminação de metástases (Caldarella *et al.*, 2013). O carcinoma ductal invasivo é tipo de câncer de mama mais prevalente, já que representa cerca de 80% de todos os casos, enquanto o lobular invasivo é responsável por 10 – 15%. Juntos, os carcinomas invasivos são os mais prevalentes, somando 90 – 95% de todos os casos de câncer de mama. As formas ductal e lobular podem ter diferentes prognósticos e opções de tratamento, sendo importante a distinção entre elas (Feng *et al.*, 2018).

A classificação molecular do câncer de mama pode ser feita através de técnicas como imunoistoquímica e hibridização fluorescente *in situ* – FISH, as quais permitem medir a expressão dos marcadores proteicos teciduais como o receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER-2)(Bianchini *et al.*, 2016). Os cânceres de mama são subdivididos em Luminal A, o qual apresenta expressão dos receptores de estrógeno (RE+) e/ou progesterona (RP+), bem como a ausência de superexpressão de HER-2; Luminal B, que é RE+, RP+ e pode apresentar HER-2+; o subtipo HER2 possui RE-, RP- e superexpressão de HER-2; enquanto o subtipo triplo negativo (TNBC) não expressa RE e RP e não superexpressa HER-2 (Bianchini e Gianni, 2014; Tao *et al.*, 2015). Ainda, a classificação molecular também pode ser realizada com base no perfil de expressão gênica, subdividindo o câncer de mama em cinco tipos diferentes que incluem luminal A e B, *basal-like* (BLBC), HER2 enriquecido e *normal-like*. Dentre esses subtipos, o *basal-like* é o mais agressivo, sendo responsável por cerca de 15% do câncer de mama invasivo. Cerca de 90% dos casos de TNBC são BLBC, ambos altamente agressivos e com piores prognósticos (Vuong *et al.*, 2014; Bianchini *et al.*, 2016). A presença de marcadores é útil no direcionamento do tratamento, sendo que os pacientes com subtipos luminais A, B e HER-2 apresentam maior sensibilidade aos tratamentos direcionados, enquanto os pacientes com tumores triplos negativos apresentam mau prognóstico, sendo que a agressividade deste subtipo se deve, em parte, à falta de terapia específica (Ahmad, 2019).

2.2.2 Terapias para o câncer de mama

As abordagens terapêuticas que são empregadas para o tratamento do câncer de mama incluem cirurgia citorrredutora, o tratamento por radiação, a terapia endócrina ou molecular direcionadas e a quimioterapia. Devido à heterogeneidade da doença, o protocolo de tratamento requer que a terapia seja analisada para cada caso de acordo com a caracterização e o estágio da doença (Ahmad, 2019). A terapia local para câncer de mama não metastático consiste na ressecção cirúrgica como a mastectomia parcial ou radical, e amostragem ou remoção dos linfonodos axilares, considerando a radiação pós-operatória. A terapia sistêmica pode ser neoadjuvante, que ocorre no pré-operatório e facilita o manejo cirúrgico; pós-operatória (adjuvante), ou ambas (Waks e Winer, 2019).

Embora todos os tipos de tumor de mama possam ser tratados com quimioterapia, as opções terapêuticas no câncer de mama em estágio inicial e tardios são afetadas significativamente pela expressão dos marcadores moleculares (Chavez *et al.*, 2010). Os tumores que expressam RE e RP são tratados com agentes que interferem na produção ou ação hormonal. Antagonistas seletivos do RE, como o tamoxifeno, podem bloquear a ligação entre o estrogênio e o seu receptor. Por outro lado, moduladores de expressão de RE, como fulvestrant, interferem diretamente na síntese do receptor (Tang *et al.*, 2016). Os tumores que superexpressam HER-2 tendem a ser mais agressivos quando comparados aos RE+ e RP+, pois podem receber mais fatores de crescimento por meio dos receptores superexpressos na superfície celular. Por outro lado, os tumores HER-2+ podem ser tratados de forma eficaz com drogas direcionadas ao receptor. Anticorpos monoclonais anti-HER-2, como o trastuzumab, podem interromper o ciclo celular ao bloquear o receptor e promover a escassez do fator de crescimento, resultando em proliferação reduzida (Ahmad, 2019; Waks e Winer, 2019). Já as pacientes com câncer de mama triplo negativo não se beneficiam da terapia hormonal/molecular direcionada devido à ausência de receptores-alvo, como RE, RP e HER-2. Portanto, essas pacientes têm de longe o pior prognóstico devido à falta de tratamentos direcionados, sendo que a cirurgia e quimioterapia, individualmente ou em combinação, são as poucas opções disponíveis (Chavez *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2016). Alguns estudos estão buscando novos alvos nesse tipo de câncer na tentativa de desenvolver terapêuticas direcionadas. A utilização de anticorpos contra o receptor do fator de crescimento

endotelial vascular (VEGFR) e contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) têm sido vista como uma alternativa, já que esses receptores são significativamente mais expressos em TNBC em comparação aos outros tipos tumorais (Ahmad, 2019).

Apesar das numerosas combinações e os regimes de medicamentos, a maioria das pacientes com câncer de mama avançado pode desenvolver resistência ao tratamento, além dos efeitos colaterais serem extremamente severos. Nesse sentido, a busca de terapias alternativas é incessante. A imunoterapia tem sido utilizada como nova abordagem terapêutica que envolve a estimulação do sistema imunológico. Essa forma de terapia tem vários mecanismos de ação, incluindo: direcionar antígenos específicos encontrados na superfície das células tumorais e aumentar os efeitos antitumorais do sistema imunológico. Contudo, seu custo ainda é muito alto e inacessível. Outra abordagem é a combinação de compostos bioativos naturais com os quimioterápicos tradicionais, o que, em alguns casos, pode potencializar a eficácia anticâncer e reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia (Nurgali *et al.*, 2018; Ahmad, 2019).

2.3 MECANISMOS MOLECULARES: PROGRESSÃO TUMORAL E METÁSTASE

Há pelo menos duas décadas, os mecanismos envolvidos na tumorigênese vêm sido discutidos por diversos autores. Hanahan e colaboradores, em suas revisões, descreveram dez capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento em várias etapas de tumores humanos, sendo elas (1) Autossuficiência em sinais de crescimento, (2) Insensibilidade a sinais supressores do crescimento, (3) Evasão da apoptose, (4) Capacidade de imortalidade replicativa, (5) Sustentação da angiogênese, (6) Capacidade de invasão e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000), (7) Instabilidade genômica e mutação, (8) Inflamação pró-tumoral, (9) Alterações no metabolismo energético e (10) Evasão do sistema imune, definindo assim as 10 marcas do câncer (Hanahan e Weinberg, 2011).

Com o passar dos anos e o crescente número de estudos envolvendo o câncer, diversos autores debatem sobre essas características. Alguns autores sugerem adicionar um microambiente tumoral estimulante como uma capacidade necessária para a tumorigênese (Fouad e Aanei, 2017). Nos últimos anos, a perspectiva sobre o câncer tem mudado consideravelmente, sendo que o tumor não

é mais visto apenas como uma massa de células malignas, mas sim como um microambiente tumoral complexo em que outras subpopulações de células são recrutadas para formar uma estrutura biológica autossuficiente (Peltanova *et al.*, 2019). O estroma do microambiente tumoral é formado por um tecido complexo contendo matriz extracelular (MEC) e agentes celulares, como fibroblastos, células neuroendócrinas, células adiposas, células inflamatórias e redes vasculares sanguíneas e linfáticas (Wang *et al.*, 2017), assim como outras macromoléculas, incluindo proteínas estruturais fibrosas, glicoproteínas, fatores de crescimento e proteoglicanos, que formam uma estrutura que fornece suporte físico e bioquímico a outras células circundantes.

A MEC é altamente dinâmica, pois é constantemente depositada, remodelada e degradada durante o desenvolvimento até a maturidade para manter a homeostase do tecido. No câncer, a MEC torna-se frequentemente desregulada e desorganizada, o que favorece a transformação celular maligna (Peltanova *et al.*, 2019). A organização dos constituintes da MEC forma um microambiente específico do tecido que desempenha um papel crítico na progressão do tumor, sendo crucial para controlar comportamentos invasivos celulares e determinar a eficiência da metástase, já que pode afetar tumores por meio da secreção extracelular, alterar o fenótipo das células do estroma ou das células tumorais, pode proteger as células tumorais da vigilância imunológica, além de promover um ambiente hipóxico ou ácido no qual as células tumorais têm maiores vantagens de sobrevivência (Wang *et al.*, 2017).

Ainda, a MEC pode servir como sítios de ligação, controlando a adesão e o movimento das células. Proteínas como colágeno, elastina, fibronectina, laminina e tenascina, juntamente com receptores de adesão celular como as integrinas, influenciam na adesão e proliferação celular, bem como fornecem um suporte estrutural ao longo do qual as células migram para fora e para dentro do microambiente tumoral. O aumento da produção de colágeno, laminina e elastina também resulta em rigidez elevada do tumor em comparação com o tecido normal circundante (Walker *et al.*, 2018; Peltanova *et al.*, 2019).

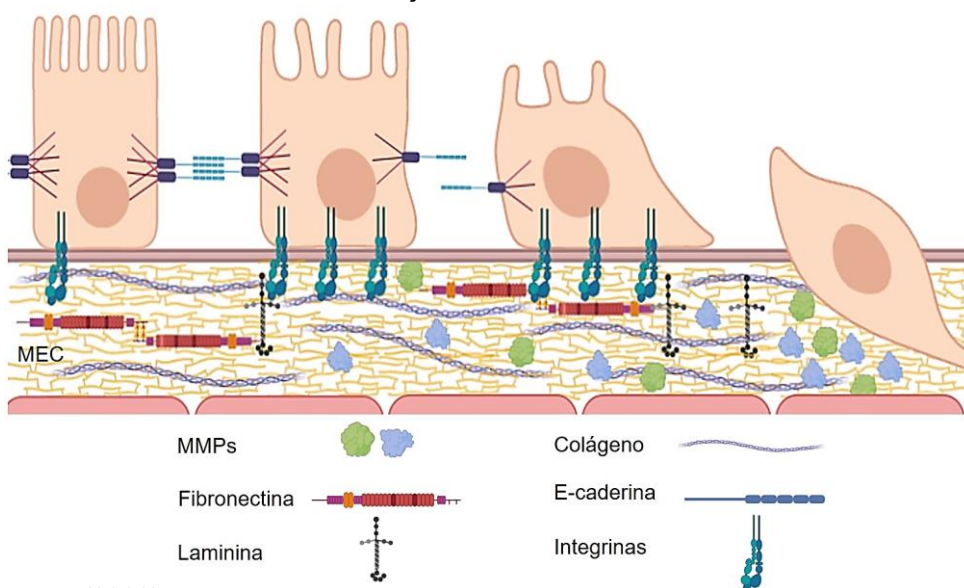
As metaloproteinases, ou MMPs, pertencem à uma família de endopeptidases dependentes de zinco, as quais são responsáveis pela proteólise da matriz extracelular e membranas basais e são implicadas em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos. A primeira hipótese em torno da função das MMPs foi atribuída à sua capacidade de degradar a MEC, permitindo que as células tumorais

migrassem para locais distantes (Alaseem *et al.*, 2019). Dessa forma, as MMPs suportam a maioria dos processos tumorigênicos, incluindo proliferação, invasão, angiogênese e metástase, já que podem modular a resposta inflamatória com a ativação de citocinas e quimiocinas, bem como promover a proliferação tumoral e angiogênese, através da ativação de diversos fatores de crescimento (Arvelo *et al.*, 2016).

A metástase é caracterizada pela disseminação das células tumorais para tecidos ou órgãos distantes. É responsável por cerca de 90% da mortalidade de pacientes com câncer e é um processo complexo que envolve várias etapas (Reymond *et al.*, 2013). Essa cascata de eventos inclui cinco passos principais: invasão, intravasamento, circulação, extravasamento e colonização.

A primeira etapa da cascata metastática é a invasão no local do tumor primário. Este processo é iniciado pela ativação da transição epitélio-mesênquima (TEM) (FIGURA 1), na qual vias de sinalização regulam a dinâmica do citoesqueleto, promovendo dissociação célula-célula, fornecendo a propriedade de movimento e favorecendo a invasão da matriz extracelular circundante. Isso permite que as células tumorais migrem para longe do tumor primário e se infiltrem nos tecidos adjacentes (Alizadeh *et al.*, 2014; Peltanova *et al.*, 2019). Nesta fase, o direcionamento é realizado por quimiocinas produzidas tanto pelas células tumorais, quanto pelo tecido a ser colonizado (Mittal, 2018).

FIGURA 1. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA



FONTE: A autora (2020).

NOTA: MEC – Matriz extracelular; MMPs – Metaloproteinases;

Para iniciar a disseminação para locais secundários, as células tumorais devem intravasar na circulação sanguínea ou no sistema linfático. A dispersão de células tumorais no sistema linfático leva à metástase de linfonodo em primeira instância, enquanto a metástase distal geralmente requer que as células tumorais se disseminem através da via hematogênica (Gómez-Cuadrado *et al.*, 2017). Após a entrada na circulação, as células tumorais podem se disseminar amplamente por todo o corpo e são conhecidas como células tumorais circulantes. Ao atingir os órgãos distais, as células tumorais sobreviventes podem aderir ativamente aos vasos sanguíneos maiores e extravasar por meio da migração transendotelial ou transcelular, antes da colonização (Reymond *et al.*, 2013).

Esse processo pode ser promovido por alterações induzidas por fatores e vesículas extracelulares secretados pelo tumor primário. Essas alterações envolvem fibroblastos, células endoteliais e células imunes, que podem estabelecer coletivamente um nicho pré-metastático que fornece um ambiente que favorece o recrutamento de células tumorais circulantes e seu crescimento. Juntamente com as células do estroma, as células tumorais estabelecem uma rede de sinalização para promover seu crescimento e satisfazer as demandas metabólicas e pró-angiogênicas, a fim de formar novas redes vasculares e facilitar sua sobrevivência inicial no novo tecido (Arvelo *et al.*, 2016; Mittal, 2018).

Uma vez estabelecidas no órgão metastático, as células tumorais são referidas como células tumorais disseminadas, as quais podem estar presentes por anos, até décadas em estado latente como células únicas ou micrometástases, em um processo chamado de dormência. A colonização se dá quando as células tumorais disseminadas iniciam o processo de crescimento, dando origem ao tumor secundário, também chamado de macrometástase (Fares *et al.*, 2020).

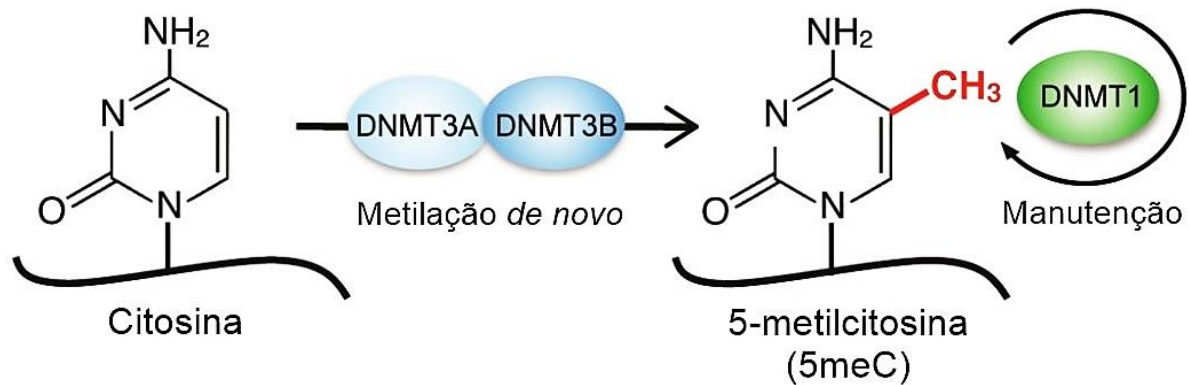
Cada uma das etapas necessárias na produção da metástase, desde a chegada das células malignas ao seu crescimento e proliferação no órgão hospedeiro, é conduzida por alterações genéticas e epigenéticas adquiridas e acumuladas durante o curso da progressão tumoral. O progresso da metástase envolve uma interação complexa entre dissociação e adesão celular, sobrevivência, proteólise, migração, angiogênese, mecanismos de escape imunológico e o estabelecimento no novo local (Alizadeh *et al.*, 2014).

2.4 EPIGENÉTICA

Os primeiros relatos relacionados a epigenética foram feitos por Conrad Waddington na década de 1940, quando ele propôs o termo “epigenótipo” para descrever as interações dos genes com seu ambiente e sua responsabilidade pela expressão do fenótipo (Waddington, 1942). Com o passar dos anos e com o avanço nas descobertas dos mecanismos que envolviam esses processos, o termo foi aperfeiçoado e utilizado como a definição de todas as alterações reversíveis e herdáveis no genoma que não envolviam a alteração na sequência de nucleotídeos do DNA (Feinberg e Tycko, 2004). Essa herança epigenética foi associada com a regulação da expressão gênica, a qual pode propagar um padrão regulatório às gerações de células-filhas, através da meiose e mitose, bem como pode ser passado para novas gerações de descendentes, através das células germinativas (Martin e Zhang, 2007). As alterações epigenéticas são feitas através de três mecanismos principais: metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas (incluindo metilação, acetilação, fosforilação, sumoilação e ubiquitinação) e RNAs não codificantes – ncRNAs (Handel *et al.*, 2010; Esteller, 2011).

A metilação do DNA é a modificação epigenética que melhor foi descrita em eucariontes. O processo de metilação ocorre pela adição covalente de um grupo metil ao carbono 5 de citosinas, que em 90% dos casos, são adjacentes às guaninas – os chamados dinucleotídeos CpGs, gerando 5-metilcitosina (5meC) (Bird, 1986). O grupamento metil é transferido da S-adenosilmetionina, a qual provém de moléculas como metionina, ácido fólico ou vitamina B12 obtidas a partir da dieta (Mcgee *et al.*, 2018) e essa reação é catalisada por uma família de enzimas chamadas DNA metiltransferases (DNMTs). O genoma humano codifica cinco DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L, dentre as quais, DNMT1, DNMT3A e DNMT3B participam do processo de metilação do DNA. O DNA não metilado passa pelo processo de metilação “*de novo*” realizado pelas enzimas DNMT3 durante os estágios embrionários, enquanto a DNMT1 é responsável pela metilação de manutenção que acontece durante a replicação celular (FIGURA 2) (Lyko, 2018).

FIGURA 2. METILAÇÃO DO DNA



FONTE: Adaptado de Ambrosi *et al.* (2017).

NOTA: As enzimas DNA metiltransferases adicionam um grupo metil ao carbono 5 da citosina, formando a 5-metilcitosina. As DNMT3 são responsáveis pela metilação *de novo*, enquanto a DNMT1 faz a metilação de manutenção.

Os CpGs estão dispersos por todo o genoma e as regiões que os concentram em maior densidade são chamadas Ilhas CpG (Antequera, 2003). Essas ilhas podem estar localizadas no corpo do gene ou nas regiões promotoras, sendo que a metilação dos CpGs em porções regulatórias dos genes, está relacionada com o silenciamento transcricional, o qual pode ocorrer pela inibição da ligação de fatores de transcrição ou por mudanças na estrutura da cromatina (Antequera e Bird, 2018).

Mecanismos epigenéticos são essenciais para o desenvolvimento normal e manutenção de padrões de expressão de genes em mamíferos. A alteração desses processos epigenéticos, principalmente quando relacionados à metilação do DNA, pode levar a mudanças na função de genes e à transformação celular maligna. Mudanças globais na epigenética são características de diversas doenças, incluindo o câncer (Sharma *et al.*, 2010). O câncer é visto como um conjunto de doenças que são impulsionados por anormalidades genéticas e epigenéticas progressivas que interagem em todos os estágios do desenvolvimento do câncer, e juntas promovem a progressão tumoral (Baylin e Ohm, 2006).

O epigenoma do câncer é marcado por essas alterações no padrão normal das células originárias e a identificação de genes hipermetilados (o que resulta no silenciamento do gene) ou hipometilados (que resulta em aumento da transcrição) pode levar à descoberta de fatores importantes para o início e a progressão do tumor (Baylin e Ohm, 2006; Esteller, 2008).

Enquanto a metilação é um mecanismo bem descrito na literatura, a desmetilação do DNA se mostra um processo quimicamente e geneticamente estável,

mas pouco compreendido. Enquanto a desmetilação passiva acontece na falta da manutenção funcional da metilação durante a replicação celular (Atlasi e Stunnenberg, 2017), a desmetilação enzimática é realizada pelas proteínas TET, uma família de enzimas metilcitosina dioxigenases (Wu e Zhang, 2017). O fato de que modificações epigenéticas são reversíveis, torna a regulação epigenética passível de intervenção farmacológica. Os fármacos análogos da citosina 5-azacitidina (Azacitidina) e o 5-aza-2'-deoxicitidina (5-azadC; Decitabine) promovem a desmetilação através da inativação das DNMTs, com consequente desmetilação do DNA, ocasionando a reativação dos genes supressores de tumor silenciados por metilação (Stresemann e Lyko, 2008; Seelan *et al.*, 2018). Porém, este fármaco só é utilizado em algumas situações clínicas, como adjuvante ao tratamento da Síndrome mielodisplásica e leucemias (Feinberg e Tycko, 2004) e se mostrou pouco eficiente em tumores sólidos até o momento. Nesse sentido, é constante a busca por drogas que possuem atividades modulatórias epigenéticas. Alguns compostos naturais, como a curcumina, genisteína, resveratrol e sulforafano, mostraram ser capazes de promover alterações epigenéticas em vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama (Ahmad, 2019), abrindo a possibilidade de compostos similares possam se tornar adjuvantes no tratamento do câncer.

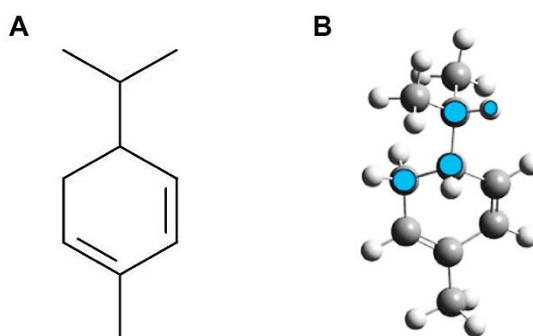
2.5 O MONOTERPENO α -FELANDRENO

Os terpenos, também chamados de isoprenóides ou terpenóides, ocorrem amplamente na natureza. Estes hidrocarbonetos são classificados de acordo com sua estrutura química e número de carbonos, podendo ser: hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) ou politerpenos (> C₄₀) (Tetali, 2019). Essa classe de hidrocarbonetos pode ser encontrada em uma grande variedade de flores e plantas, frutas e vegetais e até em alguns animais. Uma ampla gama de propriedades biológicas desses compostos é descrita, incluindo efeitos antitumorais, antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios e antiparasitários (Jiang *et al.*, 2016).

O α -felandreno (5-isopropil-2-metil-1,3-ciclohexadieno; PLD) é um monoterpeno cíclico (FIGURA 3) encontrado em plantas utilizadas como ervas e temperos e é muito comum na indústria de perfumes e alimentos (Lin *et al.*, 2013). O

composto já foi identificado em diversos óleos essenciais, como em algumas variedades da Cúrcuma (*Curcuma zedoaria* Christm), Funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.), Eucaliptos (*Eucalyptus dives* Schauer; *Eucalyptus staigeriana* F.v. Muell.), Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L), Limão (*Citrus limon* L) e Pinheiros (*Pinus taeda* L., *Pinus virginiana* Mill) (Lima *et al.*, 2012).

FIGURA 3. O MONOTERPENO α -FELANDRENO



FONTE: Adaptado de Marzec *et al.* (2011).

NOTA: A estrutura química (A) e molecular (B) do α -felandreno (5-isopropil-2-metil-1,3-ciclohexadieno).

As atividades biológicas do α -felandreno permanecem pouco estudadas, mas há relatos de suas propriedades bactericida (İşcan *et al.*, 2012), antifúngica (Zhang *et al.*, 2017) e larvica (Chaaban *et al.*, 2019). Hsieh e colaboradores demonstraram que o α -felandreno promove a necrose de maneira dose-dependente em células de hepatocarcinoma. Neste estudo, foi observada uma diminuição na viabilidade de células sem alteração dos genes clássicos relacionados a apoptose, como Bax, Bcl-2 e as caspases. Além disso, houve aumento significativo na produção de óxido nítrico (NO), o que provoca danos na membrana mitocondrial e resulta na depleção de ATP e consequente necrose (Hsieh *et al.*, 2014). Em contrapartida, outro estudo dos mesmos autores utilizando a mesma linhagem de carcinoma hepático, demonstraram que o tratamento com o α -felandreno foi também capaz de induzir a expressão de genes classicamente associados a autofagia, indicando que mais de uma via de morte celular pode ocorrer simultaneamente em resposta a esse composto (Hsieh *et al.*, 2015).

Estudos realizados por Lin e colaboradores demonstraram os efeitos do α -felandreno sobre a resposta imune *in vivo*, com o aumento da fagocitose por macrófagos, estímulo da produção e da atividade de células *Natural Killers*, e da proliferação de células T e B, monócitos e macrófagos (Lin *et al.*, 2013). Já *in vitro*, os

pesquisadores demonstraram que o α -felandreno exibiu efeitos regulatórios sobre alguns genes associados aos danos no DNA, ciclo celular e apoptose em células WEHI-3 de leucemia murina, além de promover a morte dessas células por apoptose (Lin *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016). Quanto às propriedades anti-inflamatórias, Siqueira *et al.* (2016) demonstraram que o tratamento com α -felandreno foi capaz de atenuar a resposta inflamatória através da diminuição do rolamento, inibição da adesão leucocitária e diminuição de citocinas pró-inflamatórias *in vivo*, indicando seu potencial para o tratamento de doenças inflamatórias. Outro estudo *in vitro* demonstrou que o α -felandreno estimulou a proliferação e a migração de fibroblastos, protegendo os macrófagos dos danos oxidativos através da diminuição dos níveis intracelulares de NO e ânion superóxido. Além disso, o PLD foi capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a Interleucina-6 e o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) através da modulação das atividades de NF- κ B, de modo que os autores sugeriram a aplicação futura do α -felandreno em produtos e formulações de cicatrização de feridas cutâneas (De Christo Scherer *et al.*, 2019).

A atividade antitumoral do α -felandreno foi avaliada indiretamente em um estudo de Bendaoud *et al.* (2010), o qual demonstrou que os óleos essenciais de *S. molle* e *S. terebinthifolius*, que possuem 46,52% do α -felandreno, tiveram atividades antioxidantes e antitumorais na linhagem de câncer de mama MCF7, corroborando com os efeitos citotóxicos descritos anteriormente por compostos similares.

Alguns estudos têm trazido que o α -felandreno possui ação sobre diversas linhagens celulares, inclusive tumorais, mas pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo e não foram encontrados, até o momento, estudos *in vivo* sobre atividades antitumorais deste composto.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação antitumoral do α -felandreno em modelos câncer de mama, *in vitro* e *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do α -felandreno sobre linhagens tumorais de mama frente a processos envolvendo viabilidade e proliferação celular, migração e adesão;
- Avaliar possíveis alterações epigenéticas induzidas pelo composto α -felandreno;
- Determinar o efeito do α -felandreno no crescimento do carcinoma de Ehrlich *in vivo*, bem como possíveis alterações histopatológicas induzidas pelo composto;
- Identificar alterações na expressão de genes relacionados à morte celular, progressão tumoral e metástase *in vitro* e *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS E CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares utilizadas foram obtidas da ATCC e cultivadas segundo seus protocolos. Para este estudo, foram utilizadas as linhagens de câncer de mama MCF7, do tipo luminal e MDA-MB-231, triplo negativa (APÊNDICE I). As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Gibco*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, *Gibco*) e 2 mM de glutamina. As garrafas foram mantidas sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Os tratamentos foram realizados com o composto α -felandreno (PLD) (Merck KGaA) isolado e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, 11 μ M).

4.1.1 Ensaio de viabilidade celular

O efeito do composto α -felandreno sobre a viabilidade celular foi avaliado através do método colorimétrico do MTT, o qual utiliza o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium (MTT, Merck KGaA). Neste ensaio, a clivagem dos anéis tetrazolium do MTT formado pelas desidrogenases mitocondriais, resultam na formação do formazan, um cristal de coloração violeta, pelas células viáveis e com metabolismo ativo (Mosmann, 1983). Em placas de 96 poços, 5 x 10³ células foram adicionadas por poço, em triplicatas. No dia seguinte, o meio foi retirado e as células foram submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de PLD por 24, 48 e 72 horas. Após esses períodos, o meio foi retirado e a solução de MTT 0,5 mg/mL foi adicionada aos poços (100 μ L/poço), seguindo para incubação a 37 °C por 4 h. Após a aspiração do MTT, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO, e a absorbância aferida em leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular para cada concentração testada foi calculada de acordo com a fórmula: Viabilidade (%) = (Abs.amostra/ Abs.controle) x 100, onde Abs.amostra indica o valor de absorbância obtido na concentração-teste e Abs.controle indica a absorbância obtida nos poços que não receberam tratamento a partir de experimentos em triplicata. A determinação do IC₅₀ (concentração na qual a viabilidade celular corresponde a 50%) do composto foi determinada a partir da curva dose-resposta utilizando regressão não-linear no *software GraphPad Prism®* (versão 8.0.1).

4.1.2 Curva de proliferação celular

Para análise da proliferação celular foi utilizado o método do cristal violeta. Para este ensaio, 3×10^3 células foram transferidas para placas de 96 poços, divididas em concentração/tempo diferentes, em triplicata. Após 24 h, estas foram tratadas com PLD 100 nM por 24, 48 e 72 horas. Após esse período, o meio foi retirado, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 2 % por 30 minutos, lavadas duas vezes com PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 1,8 mM), coradas com 100 μL da solução de cristal violeta 0,2% em etanol 5%, durante 5 minutos, e então lavadas novamente com PBS para a remoção do corante residual. O corante foi então eluído com 100 μL de solução de ácido acético 33% em água ultrapura. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos, e a leitura da absorbância realizada em leitor de microplacas sob 570 nm. Este ensaio consiste na ligação do corante cristal violeta ao núcleo das células, o que permite quantificar dados relativos à densidade celular presente em monocamadas de células cultivadas. Após a eluição e leitura de absorbância, é possível estabelecer uma relação direta entre a absorbância e o número de células presentes nos poços.

4.1.3 Ensaio de migração celular (*Wound healing*)

A avaliação da migração celular após tratamentos com α -felandreno foi feita através do método de *Wound healing*. Para tanto, $2,5 \times 10^5$ células/poço foram cultivadas em placa de 12 poços e deixadas aderir por 16 h até a confluência de aproximadamente 90%. Em seguida, as células foram tratadas com PLD na concentração de 100 nM por 48 horas. Após o período de tratamento, o meio contendo o composto foi substituído por meio sem SFB, por um período de 4 horas. Em seguida, utilizando-se uma ponteira de 200 μL , fez-se um risco (fenda) no centro de cada poço. Estes então foram cuidadosamente lavados com PBS para a remoção de fragmentos celulares não aderidos. A fim de promover a manutenção das células, estas foram mantidas com meio de cultivo sem SFB por 48 horas. Para monitorar a migração celular sobre a fenda, imagens das células foram capturadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000), em dois campos diferentes por poço. A

área de fechamento do risco pela migração celular foi medida através do *software ImageJ* e a porcentagem de fechamento foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$\% \text{ fechamento} = \frac{A_t = \Delta h - A_t = 0h}{A_t = 0h} \times 100$$

onde $A_t = 0h$ é a medida da área do risco imediatamente após sua realização e $A_t = \Delta h$ é a medida da área do risco após 24 ou 48 horas de incubação com o composto.

4.1.4 Ensaio de adesão celular

O ensaio de adesão celular foi realizado em placas de 96 poços, onde foram adicionados 15 µg/mL de fibronectina, colágeno I ou laminina, diluídos em PBS. As proteínas foram incubadas na placa a 4°C por 16 h e, posteriormente, bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA) 1% a 37 °C por 1 hora. Na sequência, 5×10^4 células previamente tratadas com α -felandreno foram plaqueadas sobre as diferentes proteínas da MEC e deixadas aderir por 2 horas. Em seguida, os poços foram lavados para retirar células não aderidas, e as células restantes foram fixadas com PFA 4% e coradas com cristal violeta 0,5% em metanol 20%. Após sucessivas lavagens com água destilada, utilizando-se solução de etanol 50% em citrato de sódio 1 M pH 4,5, fez-se a extração do corante e a absorbância da reação foi lida em 550 nm usando um leitor de microplacas.

4.1.5 Avaliação do padrão de expressão dos genes alvo em linhagens tumorais

4.1.5.1 Extração de RNA e síntese do cDNA

Para a análise da expressão gênica nas linhagens, 5×10^4 células/poço foram transferidas para placas de 6 poços crescidas até a confluência aproximada de 80%. Em seguida, foram tratadas com α -felandreno na concentração de 100 nM por 48 horas. Após este período, as células foram lisadas com 1 mL de TRIzol (*Invitrogen*), incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e transferidas para microtubos. Em seguida, foram adicionados 250 µL de clorofórmio a cada tubo, os quais foram homogeneizados por inversão, incubados no gelo por 3 minutos e centrifugados a 12.000 x g a 4 °C, por 20 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para novos tubos contendo 500 µL de isopropanol absoluto para a precipitação do RNA e então,

foram incubados a -20°C por aproximadamente 16 horas. As amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ a 4°C por 20 minutos, o isopropanol foi descartado e o RNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% em água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a $7.500 \times g$ a 4°C . Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e o precipitado de RNA foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 20 μL de água DEPC. A qualidade e a pureza do RNA foram estimadas em espectrofotômetro *NanoDrop* 2000 (Thermo Scientific) e em gel de agarose 1% corado com SYBRTM Safe 1:10000 (Thermo Fischer Scientific Inc.). O RNA isolado (1 μg) foi reversamente transcrito utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Os cDNAs foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

4.1.5.2 PCR em tempo real

A avaliação da expressão gênica das linhagens foi realizada pela técnica de RT-qPCR. Os genes humanos avaliados foram: *ADAM33*, *BAX*, *BCL2*, *CASP8*, *CDH1*, *ITGB1*, *MMP2*, *NFE2L2*, *TP53* e *VEGFA*. Foram avaliadas eficiências de todos os oligos, sendo os genes constitutivos utilizados o *GAPDH* e *HPRT*. As sequências dos oligos estão descritas no APÊNDICE II. Após padronização da reação, as análises foram definidas com a concentração dos oligos em 600 nM e a diluição do cDNA de 1:2 em sistemas utilizando SYBR®Green (*Applied Biosystems*) no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*). O cálculo da expressão foi realizado segundo Livak e Schmittgen (2001), utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

4.1.6 Análise da Atividade Gelatinolítica por Zimografia

A avaliação da secreção e da atividade gelatinolítica da proteína MMP-2 foi realizada por zimografia (Leber e Balkwill, 1997). Neste ensaio, foi utilizado o meio de cultura condicionado de MDA-MB-231 expostas ou não ao tratamento com α -felandreno a 100 nM por 48 horas. Aproximadamente 6 mL do sobrenadante de cada uma das condições testadas foi concentrado a vácuo (Savant SPD SpeedVac) em 100 μL , o qual foi precipitado utilizando metanol e clorofórmio. As proteínas foram ressuspendidas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH; 0,5% Deoxicolato; 150 mM

NaCl, 0,1% SDS), quantificadas pelo método de Bradford (De Bradford, 1976) e adicionadas ao tampão de amostra sem agente redutor, contendo 2% SDS, 60 mM Tris pH 6,8, 30 % de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, o gel foi lavado em solução de 10 mM de Tris pH 8,0 contendo 2,5% de Triton X-100. Em seguida, o gel foi incubado em solução de incubação (5 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, 1 mM ZnSO_4) a 37 °C por aproximadamente 48 horas. Após esse período, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 e descorado com solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético. As bandas resultantes da degradação da gelatina foram analisadas por densitometria utilizando o *software ImageJ*.

4.1.7 Extração de DNA

O isolamento do DNA das linhagens foi feito através do método fenol-clorofórmio. Para isso, as células foram crescidas em uma garrafa de 25 cm² e tratadas com α -felandreno ou 5-azadC (Merck KGaA) na concentração de 100 nM por 24 horas. Após este período, as células foram retiradas da garrafa com TRIple (Invitrogen) e transferidas para tubos tipo falcon de 15 mL. A cada tubo foi adicionado 4 mL de tampão TES (TrisHCl pH 8,0 0,1 M, EDTA 0,5 M, SDS 10%, RNase 10 mg/mL, proteinase K 0,05 mg/mL), os quais foram incubados a 55 °C por 16 horas. Após essa incubação, foram adicionados 4 mL de fenol aos tubos, os quais foram homogeneizados por inversão por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo falcon contendo 4 mL de clorofórmio e homogeneizado por 5 minutos. Após centrifugação a 3.000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo do tipo falcon de 50 mL e adicionado 2,5 x o volume de etanol absoluto a 4 °C e 400 μL de acetato de potássio 3 M pH 6,0. As amostras foram incubadas a -20 °C a noite toda. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 30 minutos a 4 °C, o precipitado lavado com 20 mL de etanol 70% gelado e centrifugadas novamente a 13.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por mais 10 minutos a 13.000 x g. Após o descarte do sobrenadante, o DNA precipitado foi seco em estufa a 37 °C e ressuspendido em água ultrapura estéril. A qualidade do DNA foi determinada através de eletroforese em gel

de agarose 0,8% corado com SYBR™ Safe (Thermo Fischer Scientific Inc.) 1:10000, e a concentração e a pureza foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

4.1.8 Quantificação de 5-meC

Utilizando 100 ng de DNA nuclear extraído da linhagem MDA-MB-231 após os tratamentos com α -felandreno e com 5-azadC, foi feita a quantificação de 5-meC utilizando um kit de ELISA (*EpigenTek*). A 5-meC é detectada utilizando anticorpos de captura e detecção e, em seguida, quantificada colorimetricamente pela leitura da absorbância em 450 nm utilizando-se um leitor de microplaca. Através de uma curva-padrão, pode-se calcular a porcentagem de DNA metilado, o qual será proporcional à intensidade da leitura medida.

4.2 ENSAIOS *in vivo*

Esse trabalho foi realizado conforme normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA-UFPR/nº1225). Para avaliar o efeito antitumoral do α -felandreno *in vivo*, utilizou-se o tumor de Ehrlich sólido, um modelo de carcinoma de origem mamária murino. Cerca de 2×10^6 células da linhagem de Ehrlich foram cultivadas na forma ascítica em camundongos Swiss fêmeas. Após quatro passagens, o tumor de Ehrlich sólido foi induzido através da inoculação subcutânea de $2,5 \times 10^6$ destas células em 0,2 mL de solução isotônica na região pélvica de cada animal. Os animais, já inoculados com o tumor, foram divididos em 4 grupos, sendo 7 animais por grupo: (1) grupo controle, que não recebeu tratamento algum; (2) grupo controle positivo, o qual foi tratado com o quimioterápico Metotrexato (MTX) 2,5 mg/kg; (3) grupo tratado com PLD 25 mg/kg e (4) grupo tratado com PLD 25 mg/kg e MTX (1,5 mg/kg). Os tratamentos foram realizados via intraperitoneal, com intervalos de 3 dias entre aplicações. Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12h/12h de claro e escuro, com livre acesso a água e alimento. A duração total do experimento foi de 21 dias a partir da indução do tumor sólido, nos quais a massa corporal e o tamanho do tumor foram aferidos com o auxílio de um paquímetro. A medida dos tumores foi feita nos dias 7, 11, 15, 18 e 21. O volume tumoral foi calculado utilizando a fórmula $v = 0,52 \times$

$a \times b^2$, na qual v corresponde ao volume, a e b correspondem ao maior e menor diâmetro tumoral, respectivamente (Mishra *et al.*, 2018). Ao final dos 21 dias, os animais foram anestesiados com injeções intraperitoniais de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e eutanasiados. O sangue foi coletado da veia cava inferior em tubos contendo heparina e utilizado para análises de parâmetros bioquímicos e hematológicos no Hospital Veterinário da UFPR. Os parâmetros avaliados foram: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, proteínas totais, albumina e globulina, além do hemograma de cada um dos animais. Dados dos mesmos parâmetros de camundongos saudáveis (NAIVE) foram utilizados para fins de comparação. Os tumores foram extraídos, mensurados em peso e volume e fracionados. Parte foi submetida a extração de RNA e DNA e parte foi armazenada para análise histopatológica. Alguns órgãos também foram extraídos para pesagem e posterior comparação entre os grupos.

4.2.1 Análise histopatológica dos tumores

Para a preparação de lâminas histológicas, fragmentos dos tumores foram fixados em solução de formalina 10% por 48 horas. Após a fixação, o material foi desidratado por incubações sucessivas com etanol e xilol e incluídos em blocos de parafina. Utilizando-se um micrótomo, foram obtidas seções de 5 μ m de tecido, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica. O material foi classificado em parâmetros histológicos por dois patologistas distintos, com duplo cego, em grau de necrose e subdivididos em quatro categorias (0 – ausente; I – até 25%; II – entre 26 e 50%; III – entre 51 e 75%; e IV – maior do que 76%) (De Souza *et al.*, 2017); e presença de inflamação e identificação de células inflamatórias. As imagens das lâminas foram obtidas em scanner de lâminas (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) da Universidade Federal do Paraná.

4.2.2 Avaliação do padrão de expressão gênica nos tumores murinos

4.2.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para o isolamento do RNA total dos tumores, o tecido tumoral foi homogeneizado no aparelho TissueLyser (Qiagen) em microtubos de 2 mL aos quais foram adicionados 1 mL de TRIzol. Posteriormente, a técnica foi procedida conforme item 4.1.5.1.

4.2.2.2 PCR em tempo real

A avaliação da expressão gênica foi realizada pela técnica de RT-qPCR. Os genes murinos avaliados foram: *Adam33*, *Bax*, *Bcl2*, *Casp8*, *Cdh1*, *Hif1a*, *Icam1*, *Itgb1*, *Mmp2*, *Nfe2l2*, *Nfkb1a*, *Nos2*, *Pik3ca*, *Ripk1*, *Ripk3* e *Vegfa*. Foram avaliadas eficiências de todos os oligos, sendo os genes constitutivos utilizados foram *GAPDH* e *RPLP0* murinos. As sequências dos oligos estão descritas no APÊNDICE III. Após a padronização da reação, as análises foram realizadas com a concentração dos oligos em 800 nM e da diluição do cDNA de 1:5, em sistemas utilizando *SYBR®Green* (Applied Biosystems) no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems). O cálculo da expressão foi realizado segundo Livak e Schmittgen (2001), utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

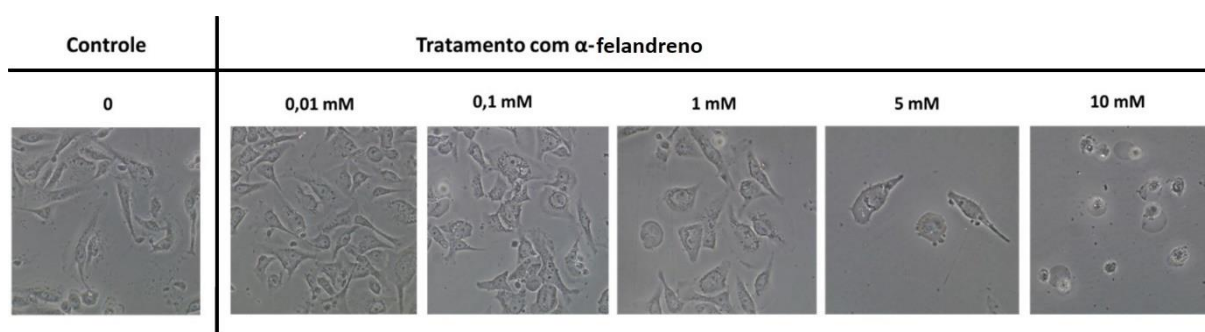
As significâncias estatísticas foram obtidas por Análise de variância de uma via (ANOVA one-way), seguida do pós-teste de Dunnett ou duas vias (ANOVA two-way), seguida pelo pós-teste de Sidak, para comparativo das variáveis frente ao controle e entre si. Foram consideradas significativas diferenças com valor de $p < 0,05$ e intervalo de confiança $\geq 95\%$. As análises estatísticas dos dados foram realizadas através do software *GraphPad Prism* versão 8.0.1.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DO α -FELANDRENO SOBRE A VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

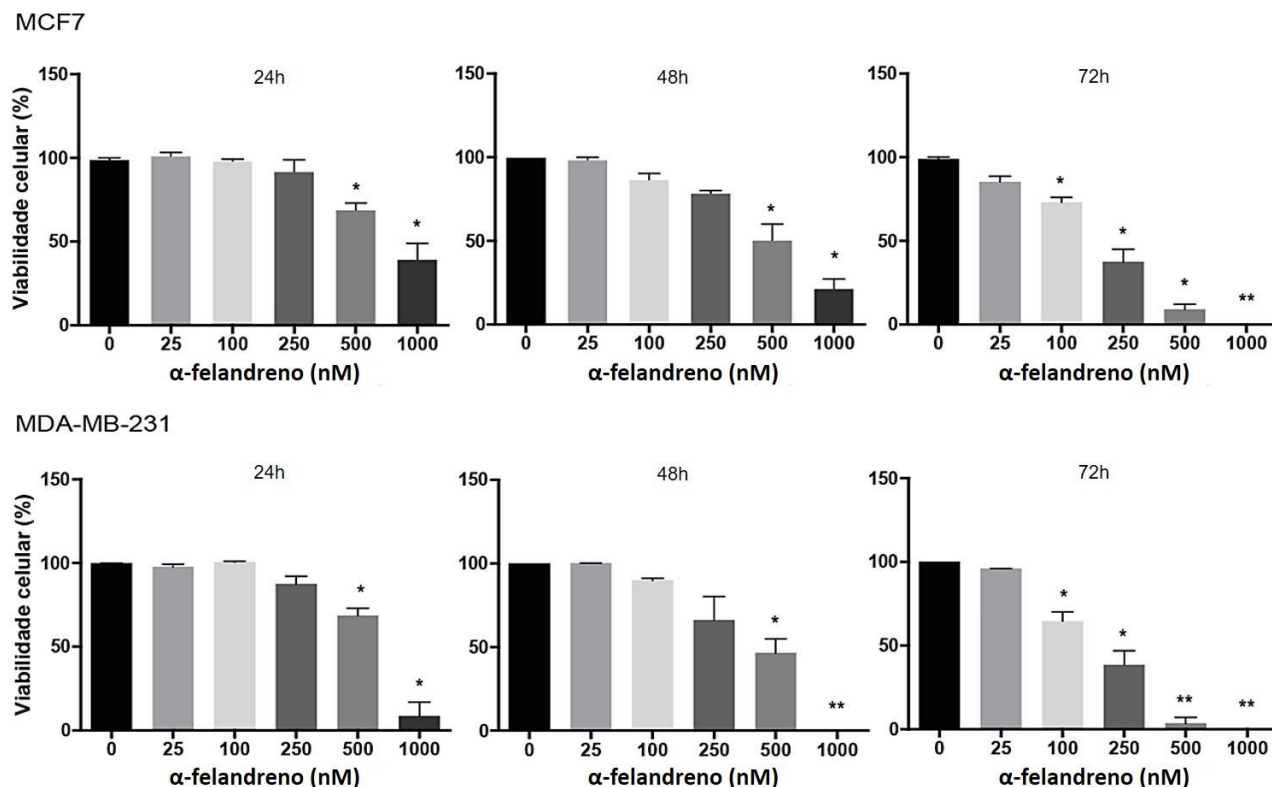
A viabilidade celular foi avaliada inicialmente pela morfologia celular, e posteriormente pelo ensaio de MTT. Para isso, a linhagem MDA-MB-231 foi tratada com concentrações que variaram de 0,01 mM a 10 mM. A partir da análise da morfologia, foi possível observar que a partir da concentração de 1 mM houve alteração morfológica celular importante, sendo as concentrações de 5 e 10 mM as que apresentaram maiores efeitos sobre a linhagem testada (FIGURA 4).

FIGURA 4. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA LINHAGEM MDA-MB-231 TRATADA COM α -FELANDRENO



NOTA: É possível observar que o composto provoca alterações fenotípicas nas células, que se tornam mais arredondadas e sofrem tumefação e morte à medida que a concentração aumenta.

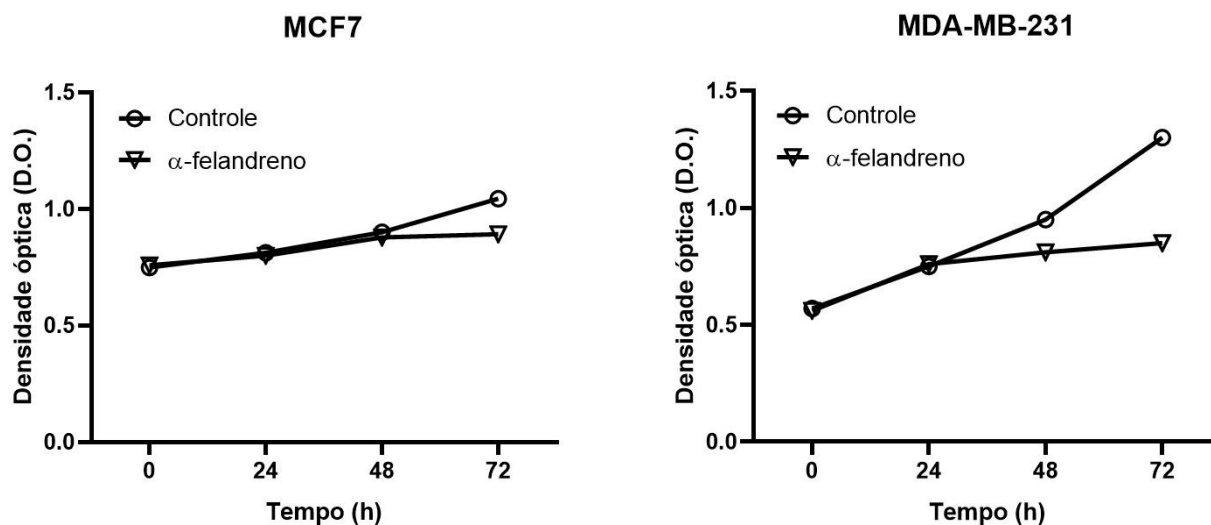
Para obtenção dos valores de IC₅₀, as linhagens tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF7 foram tratadas com PLD. Visto o efeito agressivo visualizado do α -felandreno nas culturas em concentrações maiores, foram testadas concentrações em escala nM de maneira crescentes do composto (0 – 1000 nM) com tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas. Foi possível observar uma redução da viabilidade celular concentração e tempo-dependente nas linhagens (FIGURA 5) sendo que para ambas as linhagens a redução foi significativa a partir de 500 nM em 24 e 48 horas, e a partir de 100 nM em 72 horas.

FIGURA 5. EFEITO DO α -FELANDRENO NA VIABILIDADE CELULAR

NOTA: As concentrações utilizadas variaram entre 0 e 1000 nM, em 24, 48 e 72 h de tratamento. O * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$.

O cálculo do IC₅₀ do α -felandreno foi de 810,5 nM para a linhagem MCF7 e 466,8 nM para a MDA-MB-231. A partir das curvas de concentração dose-resposta e o efeito tóxico observado nas doses mais altas, a concentração escolhida para prosseguir com os tratamentos posteriores foi de 100 nM por 48 horas. Esta concentração foi escolhida por não provocar uma redução significativa da viabilidade celular em nenhuma das linhagens nesse tempo de incubação.

Para avaliar se o α -felandreno é capaz de alterar a proliferação das células tumorais (FIGURA 6).

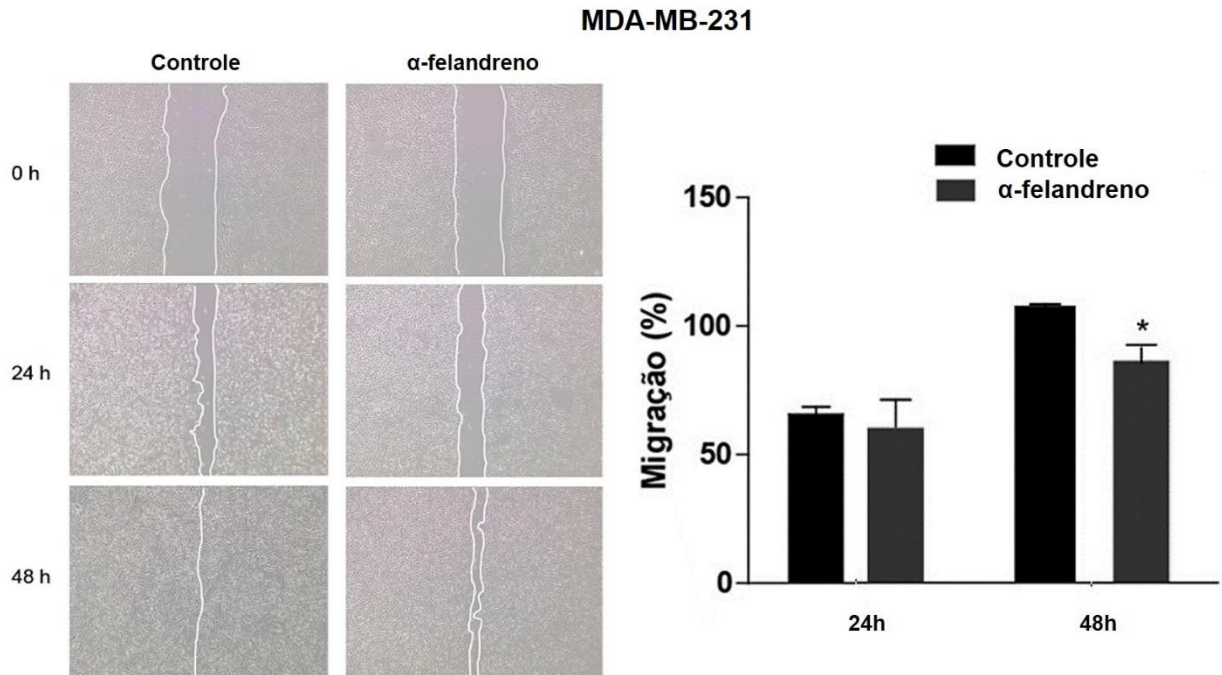
FIGURA 6. EFEITO DO α -FELANDRENO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

NOTA: As linhagens tumorais de mama foram expostas a 100 nM do composto por 24, 48 e 72 horas e a absorbância foi obtida após a coloração com cristal violeta. Os gráficos representam os valores de absorbância.

O α -felandreno foi capaz de diminuir a proliferação em ambas as linhagens tumorais, sendo mais eficiente na linhagem MDA-MB-231, com uma redução evidente em 48 horas, enquanto a MCF7, apresentou esse efeito após 72 horas.

5.2 ENSAIO DE MIGRAÇÃO (*WOUND HEALING*)

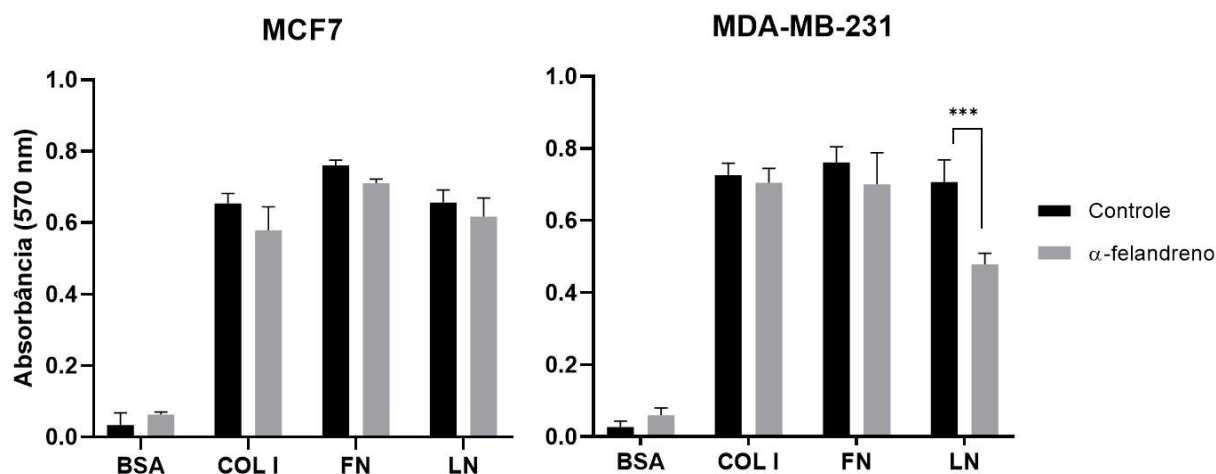
A partir dos resultados de viabilidade, a linhagem MDA-MB-231 foi tratada com 100 nM de α -felandreno por 48 horas e submetida ao ensaio de migração. Comparado ao controle, foi possível observar que o tratamento reduziu a migração celular (FIGURA 7).

FIGURA 7. EFEITO DO α -FELANDRENO NA MIGRAÇÃO CELULAR

NOTA: Os gráficos mostram a porcentagem de fechamento da fenda após 24 e 48 horas. O * representa $p < 0,05$.

5.3 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

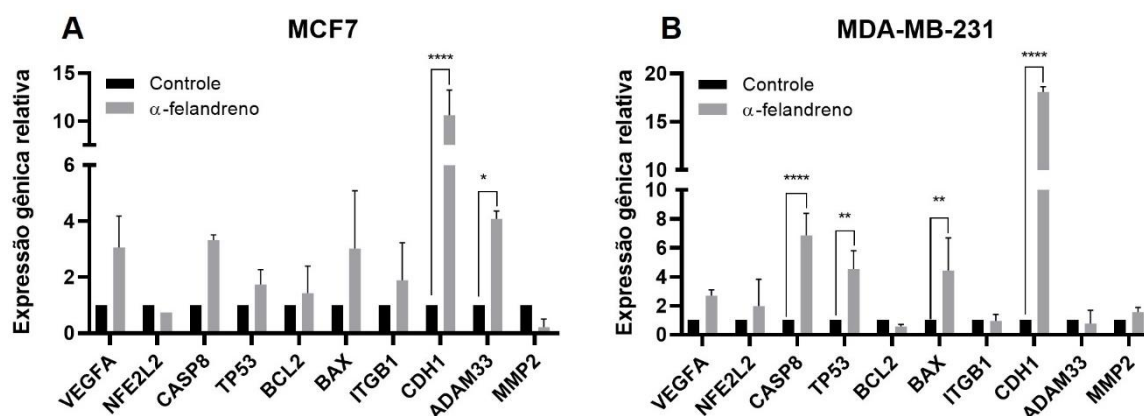
Para o ensaio de adesão as células tratadas com PLD foram adsorvidas sobre o colágeno I, fibronectina e laminina, proteínas constituintes da MEC (FIGURA 8). O α -felandreno promoveu a inibição significativa na adesão da linhagem MDA-MB-231 em contato com a laminina em aproximadamente 32,3%.

FIGURA 8. EFEITO DO α -FELANDRENO NA ADESÃO CELULAR

NOTA: Os gráficos representam os valores de absorbância obtidos após adesão e coloração com cristal violeta. Albumina sérica bovina (BSA), colágeno tipo I (COL I), fibronectina (FN), laminina (LN). O *** representa $p < 0,0001$.

5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM LINHAGENS TUMORAIS

A técnica de RT-qPCR foi utilizada para avaliar o perfil de expressão gênica nas linhagens MDA-MB-231 e MCF7 tratadas com α -felandreno. Genes relacionados a apoptose – *CASP8*, *BAX*, *BCL2* e *TP53*, antioxidantes – *NRF2* (*NFE2L2*), vascularização – *VEGF* (*VEGFA*), e relacionados a progressão tumoral e metástase – *ADAM33* (*ADAM33*), metaloproteinase de matriz 2 (*MMP2*), E-caderina (*CDH1*) e Integrina β_1 (*ITGB1*) (FIGURA 9) se mostraram diferencialmente expressos nessa condição.

FIGURA 9. EFEITO DO α -FELANDRENO NA EXPRESSÃO GÊNICA *IN VITRO*

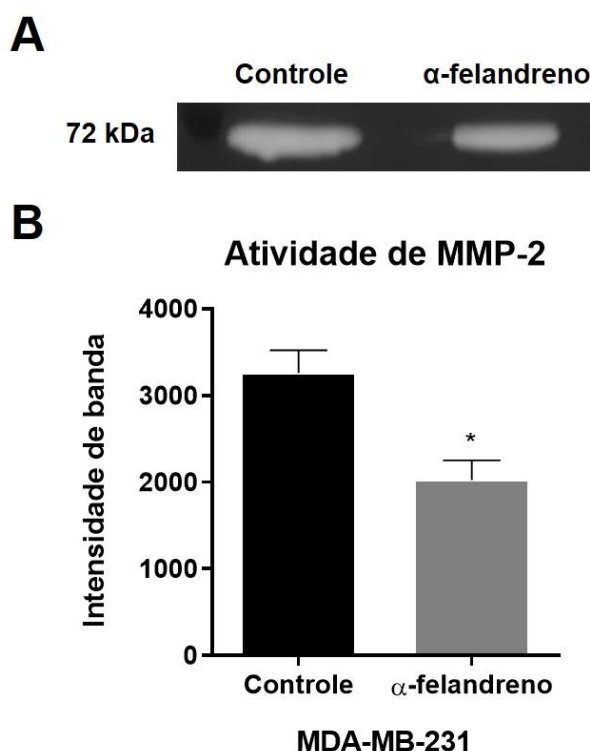
NOTA: A análise de expressão gênica foi realizada por RT-qPCR utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os gráficos representam a expressão gênica relativa para as linhagens de câncer de mama MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B), submetidas ou não (controle) ao tratamento com α -felandreno por 48 horas. O * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e **** representa $p < 0,0001$.

Na linhagem MCF7, o α -felandreno contribui para o aumento, mesmo que de forma não significativa, *CASP8*, *TP53* e *BAX* (FIGURA 9A). Para a linhagem MDA-MB-231, o PLD promoveu o aumento significativo da expressão dos genes *CASP8*, *TP53* e *BAX*, e a diminuição de *BCL2*, mesmo que de maneira não significativa (FIGURA 9B). Além disso, promoveu um discreto e não significativo aumento de *VEGFA* em ambas as linhagens. Em relação aos genes relacionados à progressão tumoral e metástase, o α -felandreno promoveu o aumento significativo de *CDH1* em ambas as linhagens, e de *ADAM33* na linhagem MCF7.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMP-2

Em virtude da diminuição da expressão de MMP2 na linhagem MCF7 e manutenção dos valores na linhagem MDA-MB-231 tratada com PLD, foi realizado o ensaio de zimografia para avaliar a atividade da proteína (FIGURA 10).

FIGURA 10. ATIVIDADE DE MMP-2 APÓS O TRATAMENTO COM α -FELANDRENO



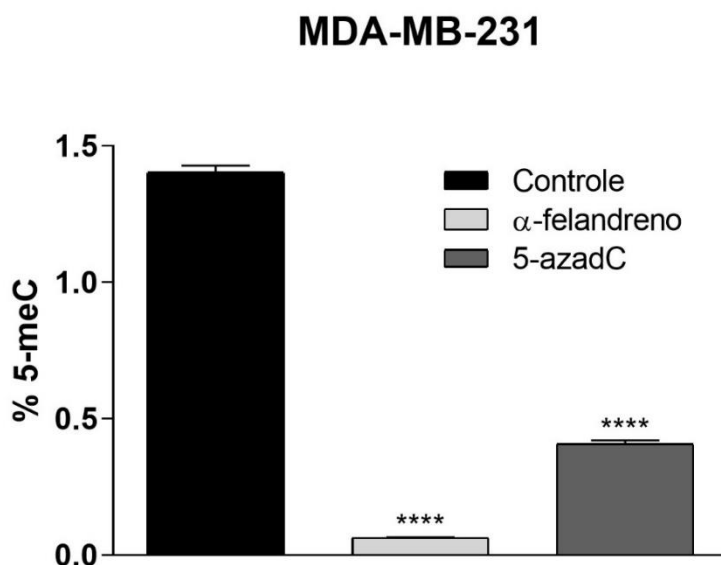
NOTA: A linhagem MDA-MB-231 foi tratada com 100 nM de α -felandreno por 48 horas. A avaliação da atividade gelatinolítica da proteína foi realizada por zimografia. As bandas correspondem a degradação da gelatina (A) e o gráfico representa a intensidade das bandas avaliadas com o *software ImageJ*. O * representa $p < 0,05$.

Esse resultado mostrou que o α -felandreno diminui a atividade da MMP-2, com diminuição da secreção da forma ativa para o meio extracelular.

5.6 EFEITOS DO α -FELANDRENO NA METILAÇÃO DO DNA

Para avaliar o possível efeito na metilação global gerada pelo α -felandreno, a linhagem MDA-MB-231 foi comparada ao agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (5-azadC). Através da dosagem da 5-meC no DNA nuclear da linhagem tratada com os compostos, foi possível evidenciar o efeito desmetilante do α -felandreno muito evidente em relação ao 5-Aza, sugerindo uma ação com efeito desmetilante do monoterpeno (FIGURA 11).

FIGURA 11. AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO GLOBAL



NOTA: A análise da metilação global foi realizada através da dosagem de 5-meC no DNA nuclear da linhagem MDA-MB-231 após os tratamentos com α -felandreno ou 5-azadC por 24 horas. O **** representa $p < 0,0001$ em relação ao controle.

5.7 EFEITOS ANTITUMORAIS DO α -FELANDRENO *IN VIVO*

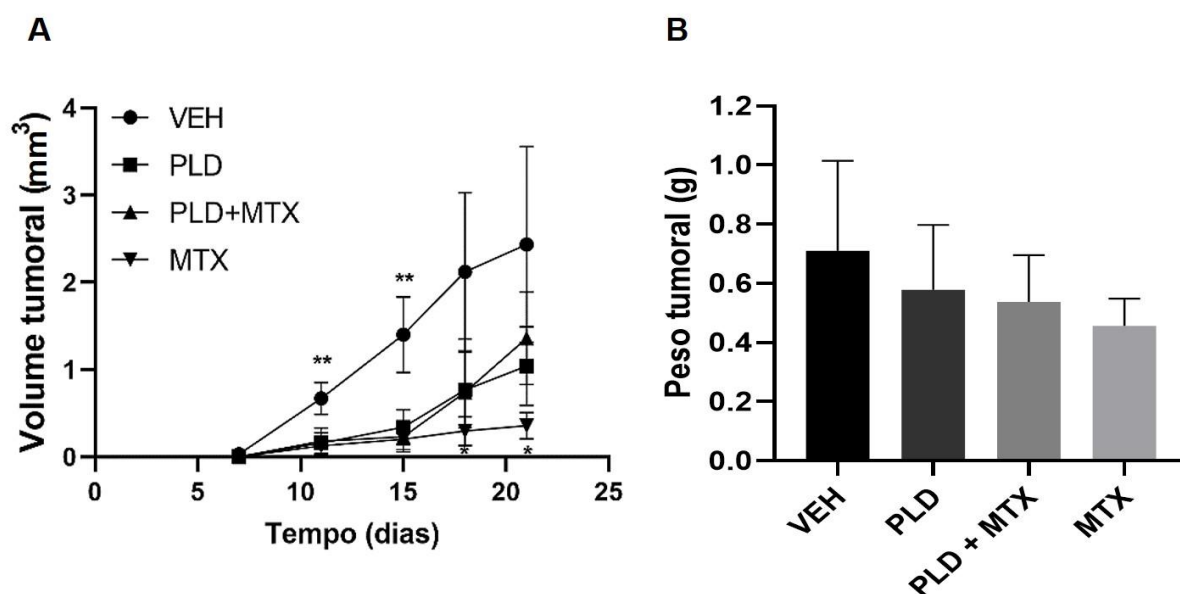
5.7.1 Crescimento tumoral

A atividade antitumoral do α -felandreno *in vivo* foi avaliada através do modelo de carcinoma de Ehrlich em camundongos Swiss. Os animais foram divididos em quatro grupos sendo o grupo veículo (VEH), que recebeu apenas água destilada e os

animais em tratamento, com o grupo α -felandreno 25 mg/kg (PLD), grupo tratado com quimioterápico metotrexato 2,5 mg/kg (MTX) e o grupo α -felandreno 25 mg/kg combinado com MTX 1,5 mg/kg (PLD+MTX). O volume tumoral foi medido a partir do sétimo dia até o final do tratamento, quando os animais foram eutanasiados e obtido os tumores e o sangue total dos animais (FIGURA 12). Foram utilizados animais sem tumores e não tratados para comparação dos valores hematológicos dos objetos desse estudo.

Os dois grupos que receberam o tratamento com α -felandreno mostraram significativa redução do crescimento tumoral nos 11º e 15º dias em relação ao grupo veículo. Para as medições seguintes – nos dias 18 e 21 –, apesar de a média ser menor que a do grupo veículo, este valor não foi significativo. Os tratamentos com o α -felandreno demonstraram menor eficiência na redução da taxa de crescimento tumoral quando comparado ao composto MTX.

FIGURA 12. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL



NOTA: O efeito antitumoral do α -felandreno foi avaliado utilizando o modelo de carcinoma de Ehrlich em camundongos. Os animais tratados com água (VEH), α -felandreno (PLD), metotrexato (MTX) ou a combinação entre eles tiveram o volume tumoral avaliado entre os dias 7 e 21 de tratamento. Após O volume dos tumores (A) foram avaliados nos dias 7, 11, 15, 18 e 21, enquanto o peso (B) foi mensurado após a eutanásia. O * representa $p < 0,05$ e ** indica $p < 0,01$ em relação ao veículo.

Não houve diferença significativa no peso do tumor. Também não foram observadas diferenças significativas na massa corporal e no peso relativo dos órgãos dos animais ao longo do tratamento (TABELA 1), assim como não foram observadas alterações comportamentais nos animais.

TABELA 1 – PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS E MASSA CORPORAL AO PESO DOS ANIMAIS VEÍCULO E TRATADOS COM α -FELANDRENO

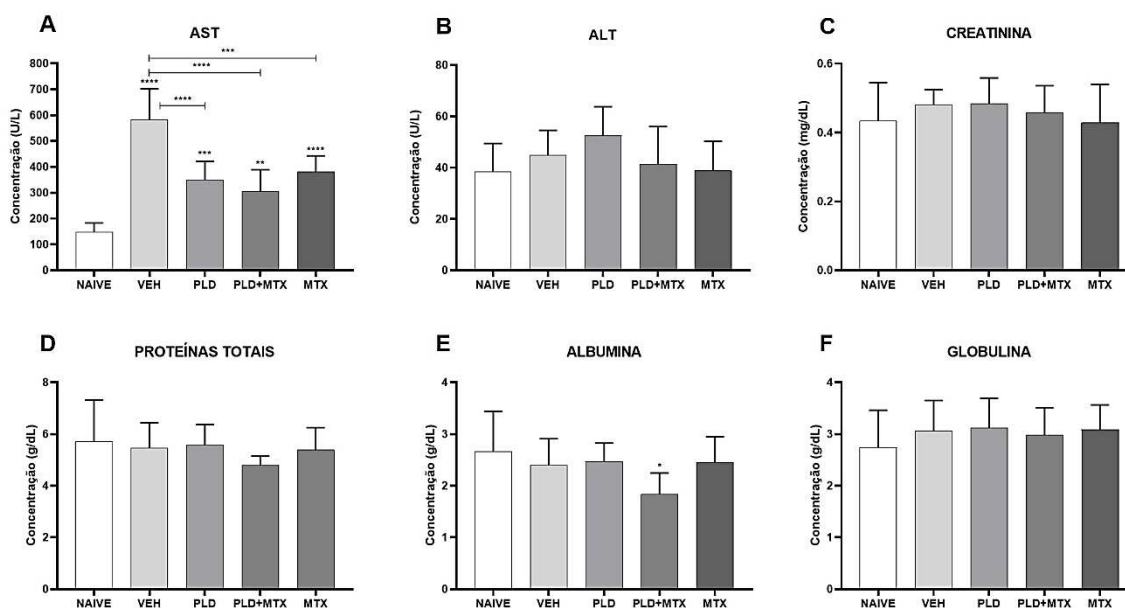
Órgão	VEH	PLD	PLD + MTX	MTX
Massa corporal	26,05 $\pm$ 2,40	26 $\pm$ 2,51	26,61 $\pm$ 1,38	27,11 $\pm$ 2,03
Fígado	5,60 $\pm$ 0,62	6,15 $\pm$ 0,69	5,78 $\pm$ 0,26	5,47 $\pm$ 0,41
Rins	1,34 $\pm$ 0,14	1,25 $\pm$ 0,08	1,22 $\pm$ 0,13	1,20 $\pm$ 0,09
Baço	0,95 $\pm$ 0,21	0,82 $\pm$ 0,33	0,79 $\pm$ 0,10	0,85 $\pm$ 0,28
Pulmões	0,72 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,07	0,80 $\pm$ 0,21	0,74 $\pm$ 0,06

NOTA: Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão com n = 7.

5.7.2 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os indicadores bioquímicos nos animais foram comparados aos animais sem a inoculação do tumor de Ehrlich (NAIVE). Dentre os indicadores avaliados, animais com tumores apresentam aumento significativo nos níveis de AST. O tratamento com PLD foi capaz de diminuir significativamente este efeito quando comparado ao veículo (VEH), tanto de forma isolada quanto combinado com MTX (PLD+MTX), sendo mais efetivo que o tratamento isolado com MTX (FIGURA 13A). Os demais parâmetros bioquímicos (ALT, creatinina, proteínas totais, albumina, globulina) não apresentaram alterações significativas, exceto para albumina, que apresentou a redução no grupo PLD + MTX (FIGURA 13E).

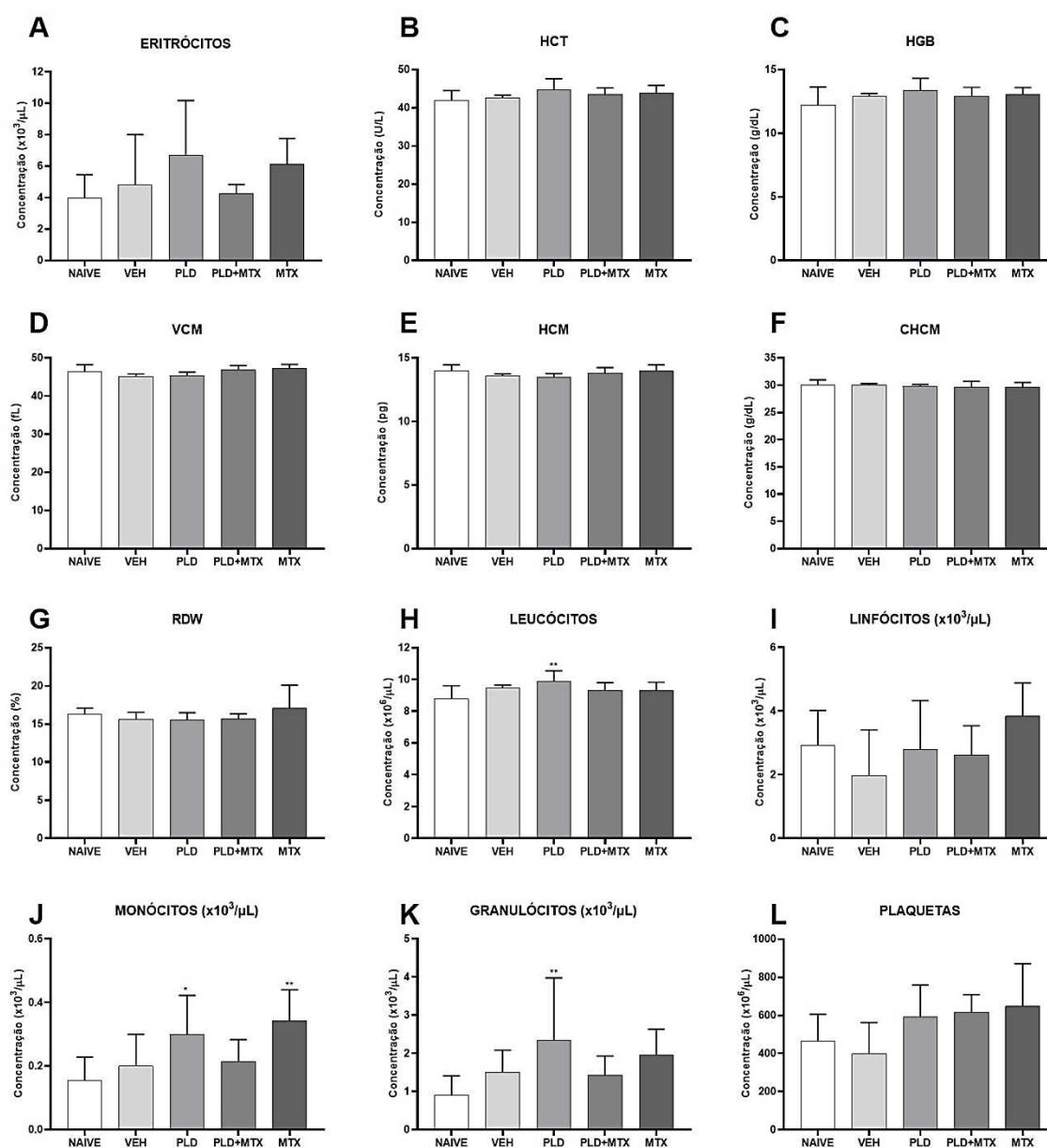
FIGURA 13. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS



NOTA: AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase. O * representa $p < 0,05$, * representa $p < 0,01$, *** representa $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, onde se sobre a coluna é em relação ao NAIVE, se sobre linha é em relação ao VEH.

Quanto aos parâmetros hematológicos, o grupo tratado com α -felandreno apresentou alteração significativa nos valores dos leucócitos totais, discreta de monócitos e granulócitos quando comparados ao NAIVE (FIGURA 14H, J e K), sugerindo aumento na resposta imunológica dos animais. Os demais parâmetros hematológicos não apresentaram alterações significativas.

FIGURA 14. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

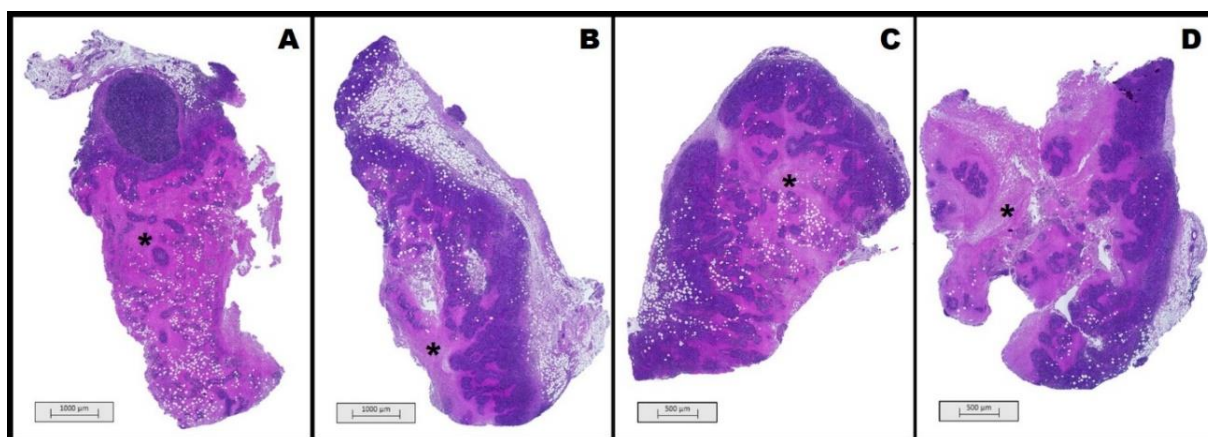


NOTA: HCT – Hematócrito; HGB – Hemoglobina; VCM – Volume corpuscular médio; HCM – Hemoglobina corpuscular média; CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW – Red Cell Distribution Width. O * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$ em relação ao NAIVE.

5.7.3 Análise histopatológica

Os tumores foram analisados quanto a presença de infiltrado inflamatório e áreas de necrose (FIGURA 15).

FIGURA 15. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TUMOR DE EHRLICH



NOTA: Coloração com hematoxilina e eosina. As figuras representam os tumores de animais do grupo veículo (A), tratado com α -felandreno (B), α -felandreno combinado com MTX (C) e o grupo tratado com MTX (D). Os * representam zonas de necrose.

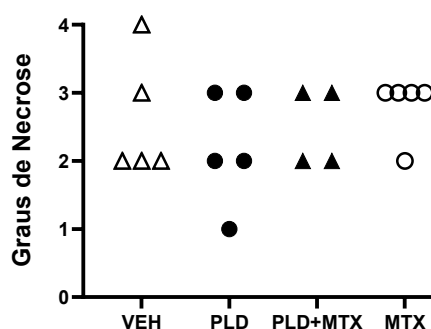
Na análise dos cortes histológicos foi possível observar a presença de infiltrado inflamatório periférico leve a moderado caracterizado pela presença de células polimorfonucleares em todas as lâminas, sem diferenças entre os grupos. Quanto à necrose, o grupo veículo apresentou maior intensidade de área de necrose classificadas como grau II, o que compreende entre 26 e 50% da área tumoral, e tumores de animais em graus III e IV, com áreas de até 100% de necrose. Já os grupos que receberam o tratamento com α -felandreno sozinho ou combinado com a dose de MTX tiveram a maior parte dos tumores classificados como grau II e III (26% – 75% da área), sem amostras em grau IV, apresentando então, um grau de necrose menor nessas condições. O grupo PLD foi o único a apresentar redução no grau de necrose, apresentando amostras em grau I. Já os animais tratados com o quimioterápico MTX apresentaram maior grau de necrose, sendo que a maioria foi classificada com grau III (TABELA 2; FIGURA 16). Esses resultados sugerem que o α -felandreno diminui a intensidade de necrose nos tumores e isso, pode contribuir para um melhor prognóstico.

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE NECROSE DOS TUMORES

NECROSE	VEH	PLD	PLD+MTX	MTX
Grau I	-	+	-	-
Grau II	+++	++	++	+
Grau III	+	++	++	++++
Grau IV	+	-	-	-

NOTA: Foram avaliadas lâminas histológicas de 5 dos 7 animais pertencentes a cada grupo (exceto PLD+MTX n=4), classificando-as quanto a área de necrose em relação a área tumoral total. Cada + representa um animal avaliado.

FIGURA 16. CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE NECROSE DOS TUMORES



NOTA: Foram avaliadas lâminas histológicas de 5 dos 7 animais pertencentes a cada grupo (exceto PLD+MTX n=4), classificando-as quanto a área de necrose em relação a área tumoral total.

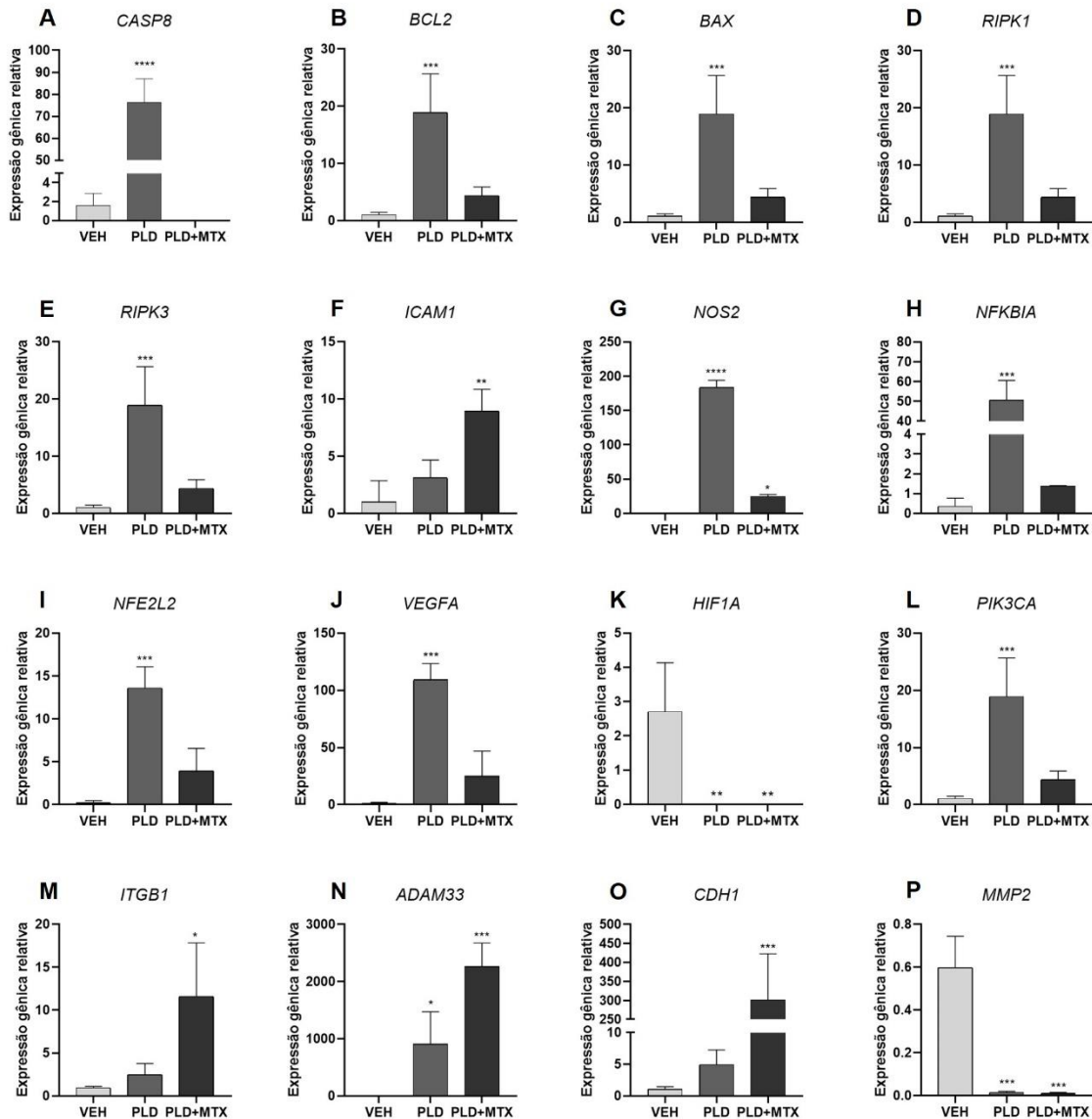
5.7.4 Avaliação da expressão gênica nos tumores

Os tumores coletados foram avaliados quanto ao perfil de expressão gênica. Foram avaliados genes de diversas vias moleculares como apoptose – Caspase 8 (*Casp8*), *Bax* e *Bcl2*; necroptose – *Ripk1* e *Ripk3*; adesão intercelular – *Icam1*; inflamatórias, como óxido nítrico sintase 2 (*Nos2*) e I κ Ba - inibidor de NF- κ B (*Nfkb1a*); vias de transdução de sinal – *Pik3ca*; antioxidantes – NRF2 (*Nfe2l2*); angiogênese HIF1- α (*Hif1a*) e VEGF (*Vegfa*) e genes que participam do processo de progressão tumoral e metástase – ADAM33 (*Adam33*), metaloproteinase de matriz 2 (*Mmp2*), E-caderina (*Cdh1*) e Integrina β_1 (*Itgb1*) (FIGURA 17).

Os tumores dos animais tratados com α -felandreno tiveram alteração na expressão relativa de diversos genes. Esse grupo apresentou aumento significativo na expressão relativa dos genes relacionados a apoptose intrínseca e extrínseca (*Casp8*, *Bcl2*, *Bax*). Ainda, o tratamento promoveu aumento também de genes relacionados a via de necroptose (*Ripk1* e *Ripk3*) sugerindo uma relação com os achados histológicos dos tumores (FIGURA 17A, B, C, D e E) enquanto o aumento

expressivo de *Icam1*, *Nos2* e *Nfkb1a* corroboram com a avaliação histológica que evidenciou o infiltrado inflamatório nos tumores (FIGURA 17F, G e H).

FIGURA 17. EFEITO DO α -FELANDRENO NA EXPRESSÃO GÊNICA *IN VIVO*



NOTA: A análise de expressão gênica foi realizada por RT-qPCR utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os gráficos representam a expressão gênica relativa para os diferentes tratamentos. O * representa $p < 0,05$, *** representa $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Os tumores do grupo PLD aumentaram significativamente a expressão de *Nfe2l2*, indicando um efeito antioxidante do composto enquanto a diminuição da necrose pode ser relacionada ao aumento observado de *Vegfa*, sugerindo uma melhora da vascularização do tumor, o que corrobora com a diminuição significativa da expressão de *Hif1a*, já que o aumento de VEGF tende a reduzir a hipóxia tecidual

(FIGURA 17I, J e K). Considerando a relação do *Pik3ca* com vias de transdução de sinal e considerando as diversas vias moleculares que sofreram alteração com o tratamento com α -felandreno, o aumento significativo da expressão desse gene é justificado (FIGURA 17L).

Assim como o grupo PLD que aumentou significativamente a expressão de *Adam33*, os tumores dos animais do tratamento PLD+MTX também tiveram aumento na expressão desse gene e de *Cdh1*, e ambos os grupos diminuíram significativamente a expressão de *Mmp2* (FIGURA 17N, O e P). Ao comparar os resultados dos grupos PLD e PLD+MTX, se observou melhores resultados para o α -felandreno de forma isolada do que quando associado ao MTX, considerando, por exemplo, que a associação dos compostos aumentou a expressão de *Itgb1*, um processo que pode favorecer a progressão tumoral, embora esse grupo tenha aumentado *Adam33* e *Cdh1* de forma mais expressiva do que o composto isolado (FIGURA 17M, N e O).

6 DISCUSSÃO

A busca por alternativas aos tratamentos atuais para o câncer de mama é constante, principalmente com as taxas de morte por câncer. O presente trabalho buscou avaliar os efeitos antitumorais do α -felandreno (PLD) em modelos de câncer de mama, *in vitro* e *in vivo*. Ao mesmo tempo, também foi avaliado seus possíveis efeitos na metilação global do DNA a fim de sugeri-lo como uma possível epi-droga.

Esse trabalho evidenciou que o tratamento com α -felandreno promoveu redução significativa da viabilidade celular das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF7. Os resultados foram significativos a partir da concentração de 500 nM em 24 horas nas linhagens tumorais de mama. Hsieh *et al.* (2014) observaram redução significativa da viabilidade da linhagem J5 (tumor de fígado) na concentração de 30 μ M a partir de 12 horas de incubação com α -felandreno. Lin *et al.* (2016) relataram alterações na morfologia de células WEHI-3 (leucemia murina) tratadas com concentrações entre 5 e 50 μ M por 24 horas e demonstraram que essas concentrações diminuíram a viabilidade celular. Em outro estudo, Lin *et al.* (2015) relataram redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 20 μ M, por 48 horas. O presente estudo demonstrou que o composto α -felandreno foi capaz de reduzir a viabilidade celular em concentrações muito inferiores às encontradas nesses estudos. As concentrações em μ M foram testadas neste trabalho e apresentaram altos níveis de citotoxicidade, promovendo alterações morfológicas agressivas e morte celular intensa. Como o propósito do trabalho era avaliar os mecanismos celulares envolvidos no potencial antitumoral do composto, o tratamento com a concentração de 100 nM por 48 horas foi escolhida para os demais experimentos já que este não provocou alterações visuais extremas nas linhagens.

O tratamento com o α -felandreno reduziu a proliferação celular em ambas as linhagens de câncer de mama, sendo esta redução mais bem evidenciada na linhagem MDA-MB-231, uma linhagem do tipo triplo negativa. A capacidade de diminuir a proliferação celular de linhagens tumorais é uma característica que tem sido comumente atribuída aos monoterpenos. Wagner *et al.* (2002) relataram em seu estudo a capacidade antiproliferativa do álcool perfílico, derivado do monoterpeno D-limoneno, sobre as linhagens tumorais MCF-10A e MDA-MB-435. De maneira similar, Pudełek *et al.* (2019) avaliaram os efeitos do monoterpeno α -thujone sobre as linhagens humanas de glioblastoma multiforme T98G e U87, e sobre a linhagem de

astrócitos murinos C8-D1A, onde observaram efeito citotóxico e antiproliferativo nas linhagens tumorais, e não relataram efeitos deletérios para a linhagem normal de astrócitos murinos. Através do ensaio de migração, observou-se que o α -felandreno também foi capaz de reduzir a migração da linhagem MDA-MB-231 de maneira significativa. Em outro estudo que avaliou os efeitos do α -felandreno sobre a migração e proliferação celular após tratamento nas concentrações de 10, 100 e 200 μ M na linhagem L929 de fibroblastos (*Mus musculus*), o α -felandreno aumentou de forma significativa a proliferação e a migração dessa linhagem após o tratamento na concentração de 200 μ M (De Christo Scherer *et al.*, 2019). Esses resultados são sugestivos de que o efeito inibitório do α -felandreno varia com as características da linhagem celular, sendo que para linhagens tumorais de mama seu efeito suprimiu a proliferação e a migração, enquanto para uma linhagem com características de normalidade, seu efeito aparenta ser benéfico e favorecer o crescimento dessas células.

A disseminação metastática de células malignas é a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer. Os eventos que envolvem a metástase é iniciada pela migração celular, a adesão das células aos componentes da MEC e a invasão nos tecidos circundantes, portanto, uma diminuição desses processos pode contribuir para a prevenção de metástase (Hamidi e Ivaska, 2018; Meirson *et al.*, 2020). Os efeitos do α -felandreno sobre a capacidade de adesão das linhagens às proteínas de adesão presentes no microambiente tumoral (colágeno I, laminina e fibronectina) não mostraram diferenças significativas na linhagem MCF7, o que condiz com o caráter pouco migratório e não invasivo desta linhagem. Já para a linhagem MDA-MB-231 o tratamento com α -felandreno foi capaz de reduzir de maneira significativa a adesão das células à proteína laminina, mas não ao colágeno I e nem à fibronectina. Wagner *et al.* (2002) tiveram achados similares, já que seus compostos derivados do monoterpeno D-limoneno não afetaram a adesão das linhagens tumorais MCF-10A e MDA-MB-435 à fibronectina. A maioria dos tumores são de origem epitelial e geralmente são cercados por membrana basal nos estágios iniciais. As lamininas são os principais substratos de adesão nesse tecido e suas interações com integrinas na superfície da célula regulam não somente a adesão das células epiteliais à membrana basal, mas também sua proliferação, polaridade e capacidade de diferenciação celular. Notavelmente, muitas dessas funções são necessárias para o fenótipo metastático, tornando as lamininas ideais para facilitar a progressão do câncer, sendo

a sua superexpressão associada a um pior prognóstico (Maltseva e Rodin, 2018; Gordon-Weeks *et al.*, 2019). Ross *et al.* (2015) demonstraram através de modelos de xenoenxerto de câncer de mama que a expressão do gene da cadeia $\alpha 4$ da laminina (LAMA4) pode promover o reinício do tumor em vários órgãos através da proliferação e disseminação das células tumorais e a formação de micrometástases. Nesse sentido, a diminuição da adesão das células tumorais à laminina promovida pelo tratamento com o α -felandreno pode representar a capacidade de diminuição do processo metastático de linhagens tumorais por mecanismos que ainda precisam serem melhores esclarecidos.

Alguns estudos relataram que o tratamento com α -felandreno seria capaz de induzir células tumorais à morte por apoptose, necrose ou autofagia (Hsieh *et al.*, 2014; Hsieh *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2016). No presente trabalho, o tratamento com α -felandreno aumentou significativamente a expressão relativa de genes relacionados a morte celular por apoptose na linhagem MDA-MB-231. Os níveis de *CASP8* foram aumentados de maneira significativa, acompanhados do aumento de *BAX* e *TP53* e diminuição de *BCL2*, sugerindo favorecimento da via intrínseca. Esses achados condizem com o estudo de Lin e colaboradores, que evidenciaram diminuição da expressão proteica de Bcl2, aumento de Bax e da atividade das Caspases 3, 8, 9 e 12 e assim determinaram que o α -felandreno induziu a morte por apoptose em células WEHI-3 (leucemia murina) (Lin *et al.*, 2016). A indução da apoptose promovida pelo α -felandreno condiz com a diminuição da adesão à laminina observada no ensaio de adesão, já que esta foi relacionada com aumento da resistência celular à apoptose (Maltseva e Rodin, 2018). Para a linhagem MCF7, as análises da expressão gênica não demonstraram nenhuma alteração significativa para os genes de morte celular analisados, mas foi possível evidenciar o aumento de *CASP8*, *TP53*, *BCL2* e *BAX*, sugerindo uma possível atuação tanto pela via intrínseca quando extrínseca.

Ainda, é possível observar um aumento de *VEGFA* de maneira não significativa em ambas as linhagens. Esse resultado contrasta com o de Lima (2019), o qual observou diminuição significativa da expressão desse gene na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com o monoterpeno L-carvone. Ainda, este estudo não observou alteração para a linhagem MCF7, sugerindo que, embora pertencentes à mesma classe de compostos, os monoterpenos podem abordar diferentes mecanismos no processo antitumoral.

Quanto aos genes relacionados a progressão tumoral e metástase, observou-se um aumento significativo nos níveis de *CDH1*, para ambas as linhagens, bem como nos níveis de *ADAM33* para a linhagem MCF7. Ainda, a linhagem MDA-MB-231 não apresentou diferenças nos valores de *MMP2*, e como a expectativa era de diminuição desse valor, foi avaliada a atividade da proteína MMP-2, a qual mostrou-se diminuída no ensaio de zimografia, demonstrando um efeito inibitório sobre a degradação mediada pela proteína.

O gene *CDH1* codifica a glicoproteína transmembrana E-caderina que é importante na manutenção da adesão célula-célula em tecidos epiteliais (Liu *et al.*, 2016). A diminuição de E-caderina está relacionada com a transição epitélio-mesênquima e isso desempenha papel importante em processos de invasão e metástase em diversos tipos de câncer (Kim *et al.*, 2016). Considerando que α -felandreno induziu o aumento significativo da expressão de *CDH1* é possível que o composto possa melhorar o cenário tumoral, e contribui com a possibilidade de sua interferência nos processos de adesão entre as células. Esse resultado pode ser complementado pelo aumento da expressão de *ADAM33*, já descrito pelo grupo de pesquisa em Epigenômica/UFPR como pouco expresso nos cânceres de mama mais agressivos, estando sua ausência associada com aumento da agressividade tumoral e possibilidade de metástases (Manica *et al.*, 2017). A presença de *MMP2*, por sua vez, está relacionada aos piores prognósticos e favorecimento das metástases, e diversos estudos relacionam a sua diminuição com melhor sobrevida das pacientes (Nakopoulou *et al.*, 2003; Talvensaari-Mattila *et al.*, 2003; Têtu *et al.*, 2006) mostrando um efeito positivo do composto na diminuição da expressão gênica e atividade proteica.

Os genes *CDH1*, *ADAM33* e *MMP2* são sabidamente regulados por mecanismos epigenéticos (Sarrió *et al.*, 2003; Seniski *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2014). Considerando isso e a diversidade de efeitos que o α -felandreno promoveu nas linhagens tumorais, buscou-se avaliar se esses efeitos poderiam estar relacionados com a capacidade do composto em promover alterações no perfil de metilação nas células. Para isso, foi dosada a concentração de 5-meC presente no núcleo das células após o tratamento com α -felandreno e os resultados comparados com o tratamento com 5-azadC, um conhecido agente desmetilante. Esse experimento permitiu demonstrar um efeito significativo na desmetilação global promovida pelo α -felandreno. Era esperado um aumento da expressão do gene *ADAM33* em ambas as

linhagens, porém, isso ocorreu apenas na linhagem MCF7. Isso pode ser explicado pelo fato de a MCF7 já expressar *ADAM33*, bem como a regulação do silenciamento do gene parece ser influenciado pela metilação de CpGs específicos (Seniski *et al.*, 2009), sugerindo que a desmetilação inespecífica não seria suficiente para aumentar a expressão desse gene. Considerando que não se sabe através de quais mecanismos o α -felandreno promove a desmetilação nas linhagens, é provável que seja necessário um tratamento mais prolongado ou em maior concentração para promover a desmetilação suficiente em MDA-MB-231 ao ponto de que esta aumente a sua expressão de *ADAM33*, além de ensaios específicos para identificar de fato o padrão de metilação apresentado pelo gene em questão após o tratamento.

A hipermetilação do gene *CDH1* já foi descrita para diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (Gall e Frampton, 2013), e restabelecer a sua expressão, e, portanto, a de E-caderina, tem sido visto como uma estratégia promissora para reverter processos metastáticos e de resistência aos tratamentos (Song *et al.*, 2019b). Vários compostos naturais têm sido estudados nesse sentido e têm demonstrado a capacidade de aumentar a expressão de E-caderina por diversos mecanismos (Song *et al.*, 2019a). O α -felandreno pode estar promovendo este efeito através de suas propriedades desmetilantes, entretanto, outros ensaios como verificação da proteína ou mesmo análise do perfil de metilação desse gene após o tratamento são necessários para determinar como isso poderia estar ocorrendo.

O estudo de Pereira e colaboradores demonstraram que a desmetilação do gene *MMP2* na linhagem MCF7 induzida pelo contato da célula com a proteína de matriz fibronectina, promoveu aumento da sua expressão gênica bem como da secreção de formas ativas de MMP-2. Apesar de ser esperado que o PLD pudesse promover o aumento da expressão de *MMP2* pela desmetilação, foi observada a diminuição da expressão desse gene, o que pode ser justificado devido a regulação desse gene por outros mecanismos epigenéticos além da metilação do DNA, como as mudanças nas marcas de histonas (Pereira *et al.*, 2014). Isso sugere que os mecanismos epigenéticos do α -felandreno possam envolver outros mecanismos, inclusive na interação de outras proteínas regulatórias de MMP2.

Até o momento, se sabe muito pouco a respeito da capacidade de outros monoterpenos sobre mecanismos epigenéticos. Andrianasolo *et al.* (2006) demonstraram que o extrato orgânico da alga vermelha de Madagascar (*P. hornemannii*), que contém halomon e outros monoterpenos halogenados, foi capaz de

inibir fortemente a atividade de DNMT1, sendo que a sua inibição pode acarretar um processo de hipometilação global, como o que foi evidenciado aqui pelo tratamento com α -felandreno. Sabendo-se da importância da epigenética no câncer e que até o momento nada foi descrito relacionando o α -felandreno e sua propriedade desmetilante, considera-se esse resultado muito relevante e promissor. Porém, estudos mais robustos são necessários para avaliar por quais mecanismos o α -felandreno foi capaz de promover a desmetilação global e localizada antes de relacioná-lo com a terapia epigenética.

O potencial antitumoral do α -felandreno foi avaliado em experimentos *in vivo* através do modelo de carcinoma mamário murino de Ehrlich. Foi observada uma diminuição no volume e peso tumoral para os animais tratados com o α -felandreno ou quando associado ao MTX. A diminuição de volume foi significativa entre os dias 11º e 15º para os dois grupos (PLD e PLD+MTX) quando comparados ao veículo (VEH). Em estudo recente realizado pelo grupo de pesquisa em Epigenômica/UFPR no mesmo modelo tumoral de Ehrlich com outro monoterpreno, o L-carvone, apresentou resultados similares, já que este composto também diminuiu de forma significativa o volume tumoral dos animais a partir do 15º dia (Lima, 2019). Há relatos que o tratamento com o óleo essencial de *C. ambrosioides*, o qual possui vários monoterpenos em sua composição, possui a capacidade de inibir os tumores ascítico e sólido de Ehrlich aumentando a sobrevivência dos animais que foram tratados com esses compostos (Nascimento *et al.*, 2006). Este estudo reforça a proposição das atividades antitumorais distintas que os monoterpenos podem desempenhar *in vivo*.

Os tratamentos disponíveis para o câncer de mama estão relacionados a fortes efeitos adversos como náuseas, vômitos, constipação, anorexia, diarreia, fadiga, dor, parestesia e dispneia, os quais acabam por promover grande debilitação nas pacientes (Montemurro *et al.*, 2016). As atuais abordagens para neutralizar os efeitos adversos induzidos pela quimioterapia são frequentemente ineficazes e muitas vezes não abordam as sequelas potenciais de longo prazo, ou ainda, podem induzir outros efeitos colaterais que apenas aumentam o desconforto das pacientes. Nesse sentido, novas abordagens para melhorar a tolerância e reduzir as sequelas da quimioterapia do câncer são urgentemente necessárias (Nurgali *et al.*, 2018).

Muitos estudos documentaram a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de vários compostos naturais, incluindo atividades contra invasão e metástase, quimioproteção e como tratamentos adjuvantes (Salehi *et al.*, 2018). O tratamento

com o α -felandreno não apresentou indícios de alterações fisiológicas nos animais, já que não promoveu alterações significativas no peso corporal, no peso relativo dos órgãos ou na análise histológica do fígado após o tratamento de 21 dias. As análises bioquímicas no sangue dos animais com tumor de Ehrlich mostram um aumento significativo nos níveis sanguíneos de AST em todos os animais, e o tratamento com α -felandreno foi capaz de diminuir significativamente esses valores de AST quando comparados com o grupo veículo, aparentando maior eficiência nesse parâmetro quando comparado ao MTX. De forma isolada o PLD reduziu em 41% as taxas de AST e quando combinado PLD+MTX a redução foi de 37%. Efeito similar foi observado Uchida e colaboradores, que induziram lesão hepática em camundongos através de altas dosagens de acetaminofeno e os trataram com óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*), que é composto por vários monoterpenos como citral, geranial e mirceno. O pré-tratamento com 125, 250 e 500 mg/kg do óleo essencial mostrou redução significativa os níveis séricos de AST, com diminuições de até 94% em relação ao controle (Uchida *et al.*, 2017). Resultados similares foram vistos no tratamento com óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Foeniculum vulgare*, os quais possuem α -felandreno e outros monoterpenos em sua composição, ao mostrarem a capacidade de diminuir a hepatotoxicidade promovida pelo quimioterápico ciclofosfamida (El-Naggar *et al.*, 2016; Sheweita *et al.*, 2016). Porém, nesses três estudos os níveis séricos de ALT também foram reduzidos, efeito esse aqui não observado, já que o α -felandreno promoveu apenas a diminuição de AST. Isso sugere que novas abordagens experimentais são necessárias a fim de se avaliar a existência desse provável efeito hepatoprotetor do composto.

O grupo PLD+MTX apresentou diminuição significativa dos níveis séricos de albumina. A albumina é a proteína plasmática mais abundante e, devido a sua estabilidade e capacidade de ligação a outras moléculas, a albumina é um fator importante na farmacocinética de muitos medicamentos e é uma excelente plataforma de distribuição de fármacos (Sleep, 2015). A diminuição dos níveis de albumina pode estar associada a hepatotoxicidade (Taye *et al.*, 2009) e, embora não tenham sido observadas diferenças nos níveis de outros marcadores hepáticos ou na histologia, esse resultado sugere uma avaliação mais cuidadosa quando compostos são utilizados em associação. O tratamento prolongado com MTX ou quando em associação já foi descrito como causa de hipoalbuminemia (Gutierrez-Ureña *et al.*, 1996; Hernandez-Baldizon, 2012) e cerca de 50% da dose administrada de MTX tem

a capacidade de se ligar de maneira reversível à albumina, podendo diminuir a sua disponibilidade sérica (Martins e Arruda, 2004). Alguns estudos descreveram a capacidade de monoterpenos em se ligar a albumina e a sugeriram como mecanismo de entrega desses compostos (Kaissi *et al.*, 2015; Shafreen *et al.*, 2017). Nossos resultados demonstraram que α -felandreno ou MTX, quando administrados isoladamente não promoveram a diminuição significativa da albumina, somente quando associados. Com base nisso, sugere-se que essa diminuição possa estar associada ao sequestro proporcionado pela interação entre ambos os compostos como mecanismo de distribuição dos mesmos, sugerindo que as associações entre quimioterápicos precisam ser avaliadas com cautela.

Alterações significativas na série branca dos animais, aumentando os valores dos leucócitos totais, monócitos e granulócitos quando comparado ao NAIVE (FIGURAS 10H, J, K, L, M e N) também foram evidenciados. Esse resultado pode ser resultante de uma possível promoção do processo inflamatório nos animais pelo PLD. Resultados similares foram observados no estudo de Lin e colaboradores, o qual avaliou os efeitos do α -felandreno sobre a resposta imune de camundongos BALB/c. Após o tratamento com 25 mg/kg do composto, os animais tiveram aumento de células T, monócitos e macrófagos. Além disso, o α -felandreno foi capaz de promover a atividade fagocítica dos macrófagos e a atividade das células *Natural Killer* nos esplenócitos, aumentando a proliferação de células B (Lin *et al.*, 2013). Os demais parâmetros hematológicos não apresentaram alterações significativas.

Nas análises histológicas foi visto um perfil variado na presença de necrose. Os grupos PLD e PLD + MTX se concentraram em tumores classificados como grau II e III (de 26% a 75% da área necrose), enquanto o veículo e o MTX apresentaram graus III e IV (> 51%; > 76%) de área de necrose coagulativa. Observando a intensidade dada pela quantidade de cruzes é possível sugerir que os tratamentos com PLD, em ambas as situações (sozinho ou combinado), se mostraram baixos. O PLD foi o único a diminuir drasticamente a área de necrose conferindo aos tumores o grau I.

A terapia anticâncer frequentemente induz à hipóxia tecidual e a depleção metabólica, que favorece a morte celular por necrose e provoca uma resposta inflamatória local devido aos fatores secretados pelas células mortas (Karsch-Bluman *et al.*, 2019). Porém, a secreção desses fatores necróticos pode promover a progressão do câncer ao apoiar diferentes etapas na cascata de formação tumoral e

resultar em um fenótipo mais agressivo, além de estar associado a evasão e provável resistência ao tratamento (Vakkila e Lotze, 2004). O α -felandreno foi capaz de diminuir a necrose dos tumores e favorecer a apoptose, contribuindo de modo benéfico aos tecidos adjacentes.

Corroborando os achados histológicos, a expressão de genes relacionados com morte celular, vascularização e inflamação nos tumores, apresentaram aumento significativo dos genes relacionados a apoptose intrínseca e extrínseca (*Casp8*, *Bcl2*, *Bax*, *TP53*), o que corrobora com as análises *in vitro* (FIGURA 9). Genes relacionados à necroptose, uma necrose regulada, como *Ripk1*, *Ripk3*, também se mostraram aumentados. Esses dados podem contribuir para a duplicidade de eventos de morte celular no tecido tumoral, em que as vias de morte por apoptose e necroptose são predominantes. Assim, sugere-se que a morte por necrose evidenciada na histologia possa ser na verdade, necroptose, evento esse, impossível de ser avaliado na análise morfológica.

A literatura mostra que a via extrínseca da apoptose e necroptose podem ser ativadas através dos receptores de morte da família do TNF- α , como TNFR1 e TNFR2 ou CD95 (Apo-1/Fas). Quando os receptores são estimulados por seus agonistas (FasL e TNF- α , por exemplo), eles conduzem à trimerização do receptor e ao recrutamento de proteínas adaptadoras como o domínio de morte (DD) e o domínio efetor de morte (DED), as quais na sequência recrutam pró-caspase 8 ou RIP1. Em condições normais, a pró-caspase é ativada e a caspase 8 ativa cliva o RIP1, dando sequência a via apoptótica. Porém, a caspase 8 pode ser inativada por um inibidor (zVAD), permitindo que RIP1 juntamente com RIP3 promovam a via da necroptose (Ouyang *et al.*, 2012). Diferentes tipos de mecanismos de morte podem coexistir e interagir uns com os outros dentro de uma célula, mas, em última análise, um mecanismo pode se sobrepor ao outro (Su *et al.*, 2015). Nesse sentido o α -felandreno pode estar promovendo a ativação das duas vias, mas provavelmente apenas uma seja a responsável pela morte celular. Experimentos adicionais que analisem a expressão proteica são necessários para compreender melhor este efeito.

O α -felandreno também promoveu o aumento de diversos genes relacionados às respostas inflamatórias e antioxidantes nos tumores, tais como *Nos2*, *Nfkb1a*, *Nfe2l2* e *Pik3ca*. Esse resultado está de acordo com o infiltrado inflamatório observado na sua histologia, bem como com o aumento de células inflamatórias observado nos parâmetros hematológicos.

O gene *Nos2* codifica a enzima iNOS que pertence à família de óxido nítrico sintases responsáveis pela produção de Óxido Nítrico (NO). Estas desempenham diversas funções incluindo neurotransmissão, vasodilatação, regulação imunológica e defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos (Hussain *et al.*, 2004). O papel do NO dentro do câncer é descrito como ambíguo, variando com a quantidade em que é produzido, os níveis consumo, tempo e localização celular da exposição. Ainda, o tipo de câncer associado também parece influenciar, sendo seu papel relacionado com os mecanismos que envolvem angiogênese, apoptose, ciclo celular, invasão e metástase (Mocellin, 2009; Choudhari *et al.*, 2013). Entre as propriedades antitumorais do NO, estão a indução da apoptose por meio da via extrínseca, com o aumento da expressão dos receptores de morte, ou através da via intrínseca com o aumento de *TP53* e pela atividade de radicais livres, a qual promove danos à membrana mitocondrial (Muntané e De La Mata, 2010). O aumento da expressão desses genes pode indicar que estão sendo ativados em conjunto pelo PLD. Considerando que o NO manifesta suas ações biológicas por meio de uma ampla rede de reações químicas de maneira dependente, trabalhos sugerem que as concentrações de NO encontradas em tumores sólidos são insuficientes para produzir apoptose, pois a concentração necessária para causar a citotoxicidade não pode ser alcançada pelas células tumorais (Choudhari *et al.*, 2013). Nesse sentido, o aumento de *Nos2* observado pelo tratamento com α -felandreno, tanto de forma isolada quanto associado ao MTX, pode auxiliar na promoção da atividade antitumoral de NO.

Ainda, o tratamento com α -felandreno promoveu aumento significativo de *Nfkb1a*, que traduz a proteína I κ B α , responsável pela inibição do fator de transcrição NF κ B (Morotti *et al.*, 2017). O NF- κ B desempenha uma função bem conhecida na regulação das respostas imunes e inflamatórias, assim como um papel importante na oncogênese através da regulação de genes envolvidos em muitos processos de desenvolvimento e progressão do câncer, como proliferação, migração e resistência à apoptose (Dolcet *et al.*, 2005). Nesse sentido, o aumento da expressão de seu inibidor *Nfkb1a* promovido α -felandreno pode se tratar tanto de um mecanismo de controle da resposta inflamatória no tumor, como parte de sua atividade antitumoral. Outro composto biológico, como por exemplo, o sulforafano, também pode atuar como um inibidor de NF- κ B (No *et al.*, 2014) sendo que a presença de NF- κ B é apontada como uma das causas de quimiorresistência em diversos tipos de câncer (Ben-Neriah e Karin, 2011). Assim, o α -felandreno poderia contribuir para diminuir a resistência de

tumores as terapias alvo e para a terapêutica por deixar as células tumorais acessíveis a outras drogas, entretanto, novos ensaios deverão complementar essa hipótese.

O tratamento também aumentou a expressão de *Pik3ca*. Esse gene codifica a porção catalítica (p110 α) da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a qual através da via de sinalização PI3K-AKT, é ativada por muitos tipos de estímulos celulares ou tóxicos e regula funções celulares fundamentais, como transcrição, tradução, proliferação, crescimento e sobrevivência (Osaki *et al.*, 2004). Mutações nesse gene foram relatadas em muitos tipos de câncer humano, incluindo cólon, mama, cérebro, fígado, estômago e pulmão, favorecendo processos de crescimento tumoral, transformação, adesão, sobrevivência e motilidade (Karakas *et al.*, 2006). No câncer de mama, a mutação é identificada em 32,5% das pacientes e foi associada aos tipos menos agressivos de tumores (Kalinsky *et al.*, 2009). Ainda que o aumento da expressão desse gene possa ser considerado mau prognóstico para a maioria dos cânceres, a ativação da via de PI3K-AKT é dependente de uma extensa cascata de fosforilações e da ativação de várias outras proteínas e quinases (Hennessy *et al.*, 2005). Portanto, é possível que o α -felandreno possa estar ativando essa via por ser tóxico à célula tumoral considerando que essa via atua em resposta aos estímulos danosos.

O gene *Nfe2l2* também se mostrou aumentado com o tratamento do α -felandreno. Esse gene codifica o fator de transcrição NRF2, um regulador central da homeostase redox, metabólica e proteica (Dodson *et al.*, 2019). Por estar envolvido na regulação de vários genes citoprotetores e por ser o principal mecanismo de defesa celular contra agressões exógenas e endógenas, incluindo xenobióticos e estresse oxidativo, o NRF2 tem sido postulado como um gene supressor de tumor (Menegon *et al.*, 2016). No entanto, as propriedades protetoras do NRF2 podem ser adotadas pelas células tumorais, protegendo-as do estresse oxidativo, de agentes quimioterápicos e da radioterapia (Jung *et al.*, 2018). A mudança entre um papel benéfico ou prejudicial do NRF2 no câncer depende do controle da sua atividade, das condições do microambiente e o estágio tumoral, além do tipo de célula envolvida (Catanzaro *et al.*, 2017). Um exemplo de composto natural com atividade anticâncer é do Sulforafano, obtido a partir de vegetais crucíferos (brócolis, couve-flor, couve de Bruxelas entre outros), e que demonstrou ser capaz de induzir a expressão gênica e proteica de NRF2 por diferentes mecanismos, em linhagens tumorais e modelos animais (Yang *et al.*, 2016). A sua atividade foi descrita como indutora do acúmulo citoplasmático e nuclear de NRF2 (Houghton *et al.*, 2016), além de promover a inibição

de enzimas DNMTs nas células de câncer de próstata murino e de câncer de mama humano, ocasionando a hipometilação do promotor de NRF2, com consequente aumento de expressão (Su *et al.*, 2014). Esse aumento de NRF2 mostrou-se citoprotetor em células de epitélio mamário e em camundongos expostos a radiação UV protegendo-as da transformação maligna (Catanzaro *et al.*, 2017). Adicionalmente, foi relatado que níveis elevados de NRF2 podem favorecer a quimiorresistência (Dodson *et al.*, 2019) e desse modo, é possível inferir que o aumento do NRF2 pode atuar prejudicialmente ou protetivamente dependendo do tipo de câncer e da terapia à ele empregada (Milczarek *et al.*, 2011; Lubelska *et al.*, 2016). Os dados do tratamento com α -felandreno demonstram uma similaridade com os efeitos promovidos pelo sulforafano, uma vez que este se mostrou capaz de promover a desmetilação global em linhagens tumorais, promoveu o aumento de NRF2 ao mesmo tempo que induziu a morte celular nos tumores, e ainda, apresentou grande expressão de *Nfkb1a*, o inibidor de NF-kB.

Alguns estudos relatam que mecanismos antioxidantes favorecem a ação de alguns quimioterápicos que utilizam essas vias para bioativação ou biorredução, diminuindo a quimiorresistência dos tumores. Esse efeito já visto para doxorubicina e mitomicina, utilizados no tratamento do câncer de mama, os quais na presença do antioxidante, tiveram seus efeitos potencializados tornando as células mais sensíveis aos outros tratamentos (Wang *et al.*, 1999; Fimognari *et al.*, 2006) o que pode ser promovido também pelo α -felandreno.

Os valores na expressão de *Vegfa*, apresentaram aumento significativo nos animais tratados com PLD, assim como nas linhagens tumorais em menor proporção. Esse resultado corrobora com os achados histológicos, visto que houve a diminuição de área de necrose tumoral dos animais desse grupo. Embora o aumento de VEGF esteja relacionado a um perfil mais agressivo dos tumores de mama, essa associação depende da existência de uma relação entre o VEGF e seu indutor, o Fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α) (Garieri, 2008). Os tumores dos animais tratados com α -felandreno, tanto na forma isolada quanto em associação ao MTX, apresentaram redução significativa na expressão do gene *HIF1A* em relação aos veículos, o que sugere que o aumento de VEGF levou a uma melhor vascularização tumoral diminuindo a hipóxia do tecido e consequente diminuição de HIF-1 α . A hipóxia é uma característica fundamental do microambiente tumoral e está associada à agressividade do tumor, potencial metastático e resistência à terapia (Cosse e Michiels, 2008). A

quimiorresistência pode estar associada aos fatores relacionados à hipóxia, dentre eles, a vascularização insuficiente que impede a penetração da droga no tumor, bem como a acidificação do microambiente tumoral promovida pela hipóxia, o que prejudica a captação de certas drogas amplamente utilizadas no tratamento de TNBC, por exemplo, além dos efeitos citotóxicos de uma série de drogas que são dependentes de oxigênio (Nedeljković e Damjanović, 2019). Keunen e colaboradores evidenciaram através do modelo de xenoenxerto de glioblastoma, que o tratamento com Bevacizumabe, um anticorpo monoclonal anti-VEGF, promoveu um microambiente tumoral mais hipóxico e favoreceu uma mudança metabólica nas células tumorais em direção à glicólise, levando a maior invasão de células tumorais no tecido normal (Keunen *et al.*, 2011). Esse processo de invasão tumoral mediado por hipóxia está relacionado ao fato de que esse estado regula positivamente várias metaloproteinases, dentre elas a MMP-2, além de promover a repressão de E-caderina, aumentando o potencial metastático (Cosse e Michiels, 2008).

Ainda, foi evidenciado que nos tumores dos animais PLD houve um aumento significativo na expressão de *Adam33* e diminuição significativa de *Mmp2*, resultados estes também vistos no grupo PLD+MTX, com aumento significativo de *Cdh1*. Esse resultado foi corroborado pelos valores de expressão apresentados pelas linhagens tumorais tratadas, e com a zimografia que evidencia a diminuição da atividade gelanolítica de MMP-2. Considerando esses fatos, o aumento de *Vegfa* e a redução de *Hif1a* produzidos pelo tratamento com o α -felandreno, assim como o aumento da expressão de *Adam33* e *Cdh1* nos tumores e diminuição de *Mmp2*, são corroborados com os dados já vistos e o α -felandreno parece ter potencial para reduzir os processos de metástase e ajudando na sensibilização desses tumores às terapias convencionais.

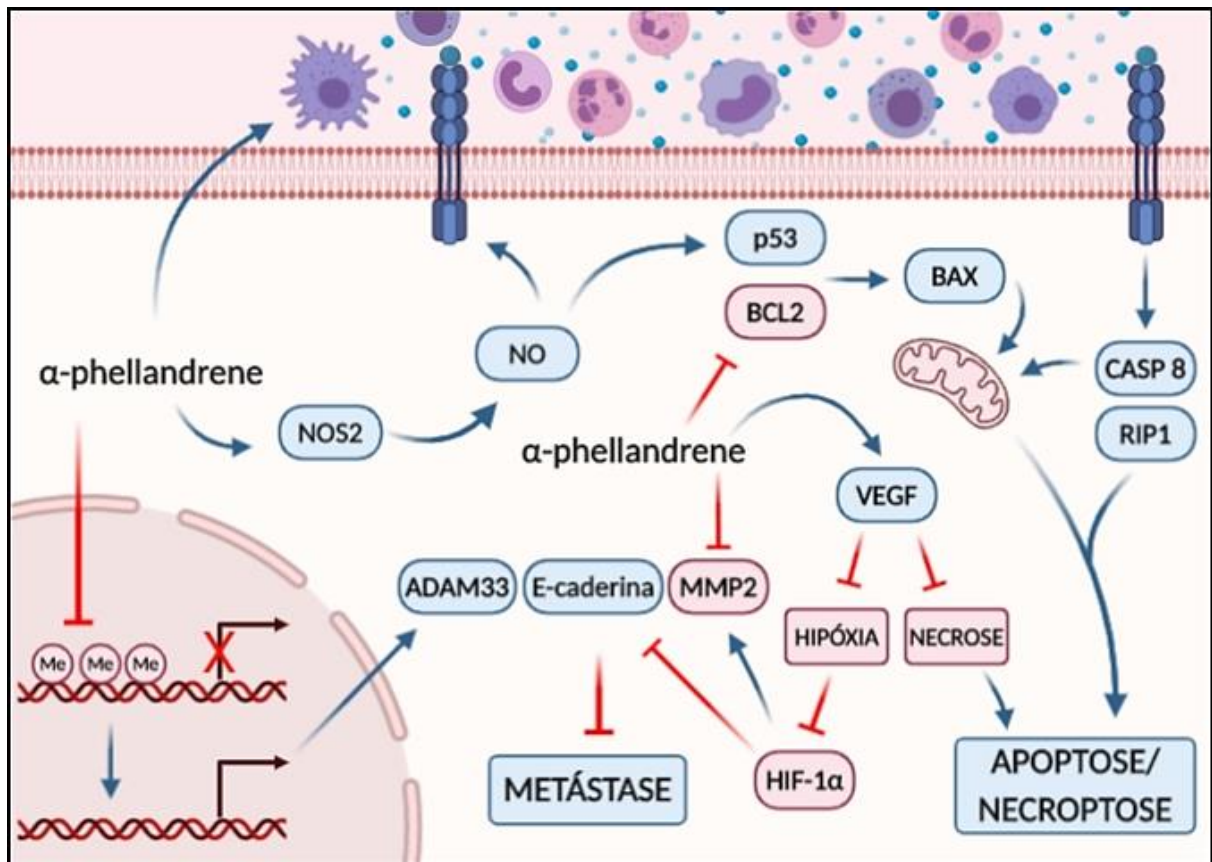
Adicionalmente, sabendo da regulação por metilação desses genes, o α -felandreno parece possuir um efeito desmetilante sugerindo a possibilidade do seu uso como uma epi-droga, contudo, análises mais aprofundadas precisarão ser realizadas.

O grupo PLD + MTX apresentou aumento significativo da expressão de *Icam1* nos tumores, não observado para o tratamento isolado. Esse resultado pode contribuir para a melhora da resposta imunológica contra as células tumorais, já que a sua expressão está relacionada com a interação entre essas células e com linfócitos T (Haustein *et al.*, 2014). Contudo, há relatos que a capacidade de invasão das células

de câncer de mama foi positivamente correlacionada com a expressão proteica de ICAM-1, através do favorecimento de processos de adesão e migração celular (Rosette *et al.*, 2005). Considerando que os tumores submetidos ao tratamento com o PLD + MTX promoveu o aumento da expressão de outros genes relacionados com a diminuição dos processos metastáticos (*Adam33* e *Cdh1*), seria necessário avaliar se o aumento da expressão do gene *Icam1* se reflete na proteína.

Os resultados evidenciados com o tratamento *in vitro* e *in vivo* com α -felandreno nesse trabalho se mostraram benéficos pela diminuição da viabilidade celular, diminuição da necrose e favorecimento de uma morte celular controlada, como a apoptose e necroptose, e com a ativação de genes envolvidos com a diminuição da quimiorresistência. Além disso, o composto foi capaz de controlar a expressão de alguns genes importantes envolvidos com processos antimetastáticos, que podem contribuir nos tratamentos antineoplásicos. A associação do monoterpene com MTX se mostrou menos eficaz quando comparado ao α -felandreno isolado, demonstrando que as drogas precisam ter seus mecanismos de ação e metabolismo elucidados, e que às vezes, a combinação entre antagonistas pode atrapalhar o tratamento dos pacientes. Por fim, este trabalho mostrou o potencial antitumoral do α -felandreno *in vitro* e *in vivo*, reportando pela primeira vez a suas propriedades desmetilantes nos modelos de câncer de mama (FIGURA 18).

FIGURA 18. MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO PARA O α -FELANDRENO NOS MODELOS TUMORAIS DE MAMA



Fonte: a autora (2020).

NOTA: Representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação do α -felandreno nos modelos tumorais. Os elementos em azul são favorecidos pelo composto, enquanto os em vermelho, são reprimidos.

7 CONCLUSÕES

Este estudo reportou pela primeira vez na literatura as propriedades antitumorais do composto α -felandreno *in vitro* e *in vivo*, onde:

- O monoterpeno α -felandreno apresentou potencial antitumoral nas linhagens tumorais de mama MCF7 e MDA-MB-231, além de apresentar efeitos na desmetilação global. O monoterpeno também reduziu a viabilidade, progressão e migração celular das linhagens avaliadas, além de apresentar indícios de atividade antimetastática pela diminuição da adesão das linhagens às proteínas da MEC, bem como da atividade de proteínas relacionadas com a sua degradação.
- A expressão gênica das linhagens e dos tumores tratados mostrou o aumento da expressão de genes relacionados com melhor prognóstico no que se refere a diminuição da capacidade metastática, além da evidência da morte celular induzida por apoptose e necroptose, e isso pode ter sido favorecido pelo aumento das células inflamatórias e uma ação antioxidante de genes regulados pelo composto.
- Ensaios *in vivo* no modelo de carcinoma mamário murino demonstraram que o composto reduziu o peso e volume dos tumores, sem alterar significativamente os parâmetros sanguíneos dos animais. Ainda, foi possível evidenciar que o α -felandreno possui potencial para ser uma epi-droga visto que se mostrou capaz de regular a expressão gênica de *ADAM33*, *CDH1* e *MMP2*, genes sabidamente regulados por metilação do DNA.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. **Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress**. Springer Nature, 2019. ISBN 3030203018.
- ALASEEM, A. et al. Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management. *Seminars in cancer biology*, 2019, Elsevier. p.100-115.
- ALIZADEH, A. M.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor biology**, v. 35, n. 9, p. 8483-8523, 2014. ISSN 1010-4283.
- AMBROSI, C.; MANZO, M.; BAUBEC, T. Dynamics and context-dependent roles of DNA methylation. **Journal of molecular biology**, v. 429, n. 10, p. 1459-1475, 2017. ISSN 0022-2836.
- ANDRIANASOLO, E. H. et al. DNA methyl transferase inhibiting halogenated monoterpenes from the madagascar red marine alga portieria h ornemannii. **Journal of natural products**, v. 69, n. 4, p. 576-579, 2006. ISSN 0163-3864.
- ANTEQUERA, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 8, p. 1647-1658, 2003. ISSN 1420-682X.
- ANTEQUERA, F.; BIRD, A. CpG islands: A historical perspective. In: (Ed.). **CpG Islands**: Springer, 2018. p.3-13.
- ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Tumour progression and metastasis. **Ecancermedicalsecience**, v. 10, 2016.
- ATLASI, Y.; STUNNENBERG, H. G. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 11, p. 643, 2017. ISSN 1471-0064.
- BAYLIN, S. B.; OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 2, p. 107-116, 2006. ISSN 1474-1768.
- BEN-NERIAH, Y.; KARIN, M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. **Nature immunology**, v. 12, n. 8, p. 715-723, 2011. ISSN 1529-2916.
- BENDAOUD, H. et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of Schinus molle L. and Schinus terebinthifolius Raddi berries essential oils. **Journal of food Science**, v. 75, n. 6, p. C466-C472, 2010. ISSN 0022-1147.
- BIANCHINI, G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 13, n. 11, p. 674, 2016. ISSN 1759-4782.

BIANCHINI, G.; GIANNI, L. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 2, p. e58-e68, 2014. ISSN 1470-2045.

BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v. 321, n. 6067, p. 209-213, 1986. ISSN 0028-0836.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018. ISSN 0007-9235.

BURSTEIN, H. J. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 14, p. 1430-1441, 2004. ISSN 0028-4793.

CALDARELLA, A. et al. Invasive breast cancer: a significant correlation between histological types and molecular subgroups. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 139, n. 4, p. 617-623, 2013. ISSN 0171-5216.

CATANZARO, E. et al. Nrf2: a potential therapeutic target for naturally occurring anticancer drugs? **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 21, n. 8, p. 781-793, 2017. ISSN 1472-8222.

CHAABAN, A. et al. Insecticide activity of Curcuma longa (leaves) essential oil and its major compound α -phellandrene against *Lucilia cuprina* larvae (Diptera: Calliphoridae): Histological and ultrastructural biomarkers assessment. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 153, p. 17-27, 2019. ISSN 0048-3575.

CHAVEZ, K. J.; GARIMELLA, S. V.; LIPKOWITZ, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast disease**, v. 32, n. 1-2, p. 35, 2010.

CHOUDHARI, S. K. et al. Nitric oxide and cancer: a review. **World journal of surgical oncology**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2013. ISSN 1477-7819.

COSSE, J.-P.; MICHIELS, C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 8, n. 7, p. 790-797, 2008. ISSN 1871-5206.

COX-GEORGIAN, D. et al. Therapeutic and medicinal uses of terpenes. In: (Ed.). **Medicinal Plants**: Springer, 2019. p.333-359.

DE BRADFORD, R. Determinación de proteínas: método de bradford. 1976.

DE CHRISTO SCHERER, M. M. et al. Wound healing activity of terpinolene and α -phellandrene by attenuating inflammation and oxidative stress in vitro. **Journal of tissue viability**, v. 28, n. 2, p. 94-99, 2019. ISSN 0965-206X.

DE SOUZA, C. E. A. et al. Ruthenium complex exerts antineoplastic effects that are mediated by oxidative stress without inducing toxicity in Walker-256 tumor-bearing rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 110, p. 228-239, 2017. ISSN 0891-5849.

DODSON, M. et al. Modulating NRF2 in disease: timing is everything. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 59, p. 555-575, 2019. ISSN 0362-1642.

DOLCET, X. et al. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows archiv**, v. 446, n. 5, p. 475-482, 2005. ISSN 0945-6317.

EL-NAGGAR, S. A. et al. Efficacy of Rosmarinus officinalis leaves extract against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 10, p. 2007-2016, 2016. ISSN 1388-0209.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 11, p. 1148-1159, 2008. ISSN 0028-4793.

_____. Non-coding RNAs in human disease. **Nature reviews genetics**, v. 12, n. 12, p. 861-874, 2011. ISSN 1471-0064.

FANG, M.; CHEN, D.; YANG, C. S. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 1, p. 223S-228S, 2007. ISSN 0022-3166.

FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2020. ISSN 2059-3635.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143, 2004. ISSN 1474-1768.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & diseases**, v. 5, n. 2, p. 77-106, 2018. ISSN 2352-3042.

FIMOIGNARI, C. et al. Sulforaphane increases the efficacy of doxorubicin in mouse fibroblasts characterized by p53 mutations. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 601, n. 1-2, p. 92-101, 2006. ISSN 0027-5107.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

GALL, T. M.; FRAMPTON, A. E. Gene of the month: E-cadherin (CDH1). **Journal of clinical pathology**, v. 66, n. 11, p. 928-932, 2013. ISSN 0021-9746.

GARIERI, A. P. **Produção de VEGF e HIF-1 α em pacientes com Carcinoma de Mama localmente avançado submetidos à quimioterapia neoadjuvante**. 2008. 50 Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

GÓMEZ-CUADRADO, L. et al. Mouse models of metastasis: progress and prospects. **Disease models & mechanisms**, v. 10, n. 9, p. 1061-1074, 2017. ISSN 1754-8403.

GORDON-WEEKS, A. et al. Tumour-derived laminin $\alpha 5$ (LAMA5) promotes colorectal liver metastasis growth, branching angiogenesis and notch pathway inhibition. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 630, 2019.

GUTIERREZ-UREÑA, S. et al. Pancytopenia secondary to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 39, n. 2, p. 272-276, 1996. ISSN 0004-3591.

HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 3, p. 31-46, 2018. ISSN 1474-1784.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. ISSN 0092-8674.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. ISSN 0092-8674.

HANDEL, A. E.; EBERS, G. C.; RAMAGOPALAN, S. V. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. **Trends in molecular medicine**, v. 16, n. 1, p. 7-16, 2010. ISSN 1471-4914.

HAUSTEIN, M. et al. Cannabinoids increase lung cancer cell lysis by lymphokine-activated killer cells via upregulation of ICAM-1. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 2, p. 312-325, 2014. ISSN 0006-2952.

HENNESSY, B. T. et al. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 12, p. 988-1004, 2005. ISSN 1474-1784.

HERNANDEZ-BALDIZON, S. How to effectively use methotrexate in rheumatoid arthritis? **Reumatología Clínica (English Edition)**, v. 8, n. 1, p. 42-45, 2012. ISSN 2173-5743.

HOUGHTON, C. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. Sulforaphane and other nutrigenomic Nrf2 activators: can the clinician's expectation be matched by the reality? **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016. ISSN 1942-0900.

HSIEH, L.-C. et al. Induction of α -phellandrene on autophagy in human liver tumor cells. **The American journal of Chinese medicine**, v. 43, n. 01, p. 121-136, 2015. ISSN 0192-415X.

HSIEH, S.-L. et al. Induction of necrosis in human liver tumor cells by α -phellandrene. **Nutrition and cancer**, v. 66, n. 6, p. 970-979, 2014. ISSN 0163-5581.

HUSSAIN, S. P. et al. Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. **Cancer research**, v. 64, n. 19, p. 6849-6853, 2004. ISSN 0008-5472.

INCA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro. 2019

IŞCAN, G. et al. Biotransformation of (-)-(R)- α -phellandrene: Antimicrobial activity of its major metabolite. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 8, p. 1525-1532, 2012. ISSN 1612-1872.

JAFARI, S. H. et al. Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 7, p. 5200-5213, 2018. ISSN 0021-9541.

JIANG, Z.; KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. **Current protocols in plant biology**, v. 1, n. 2, p. 345-358, 2016. ISSN 2379-8068.

JONES, P. A. et al. Epigenetic therapy in immune-oncology. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 3, p. 151-161, 2019. ISSN 1474-1768.

JUNG, B.-J. et al. Dysregulation of NRF2 in cancer: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Biomolecules & therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 57, 2018.

KAISSI, R. et al. Binding of Monoterpenes to Human Serum Albumin: Investigation of the Effect of Hydrophobicity and Structure. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2015. ISSN 2164-9634.

KALINSKY, K. et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 16, p. 5049-5059, 2009. ISSN 1078-0432.

KARAKAS, B.; BACHMAN, K.; PARK, B. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. **British journal of cancer**, v. 94, n. 4, p. 455-459, 2006. ISSN 1532-1827.

KARSCH-BLUMAN, A. et al. Tissue necrosis and its role in cancer progression. **Oncogene**, v. 38, n. 11, p. 1920-1935, 2019. ISSN 1476-5594.

KEUNEN, O. et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 9, p. 3749-3754, 2011. ISSN 0027-8424.

KIM, S. A. et al. Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. **British journal of cancer**, v. 114, n. 2, p. 199-206, 2016. ISSN 1532-1827.

LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Analytical biochemistry**, v. 249, n. 1, p. 24-28, 1997. ISSN 0003-2697.

LEE, A. et al. BOADICEA: a comprehensive breast cancer risk prediction model incorporating genetic and nongenetic risk factors. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 8, p. 1708-1718, 2019. ISSN 1530-0366.

LIMA, D. F. et al. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 283-292, 2012. ISSN 0022-3573.

LIMA, L. T. F. D. **Efeitos antitumorais do L-Carvone sobre câncer de mama *in vitro* e *in vivo***. 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologie a Patologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

LIN, J.-J. et al. Alpha-phellandrene promotes immune responses in normal mice through enhancing macrophage phagocytosis and natural killer cell activities. **in vivo**, v. 27, n. 6, p. 809-814, 2013. ISSN 0258-851X.

LIN, J.-J. et al. α -Phellandrene alters expression of genes associated with DNA damage, cell cycle, and apoptosis in murine leukemia WEHI-3 cells. **Anticancer research**, v. 34, n. 8, p. 4161-4180, 2014. ISSN 0250-7005.

LIN, J. J. et al. Alpha-phellandrene-induced apoptosis in mice leukemia WEHI-3 cells in vitro. **Environmental toxicology**, v. 31, n. 11, p. 1640-1651, 2016. ISSN 1520-4081.

LIN, J. J. et al. Alpha-phellandrene-induced DNA damage and affect DNA repair protein expression in WEHI-3 murine leukemia cells in vitro. **Environmental toxicology**, v. 30, n. 11, p. 1322-1330, 2015. ISSN 1520-4081.

LIU, J. et al. CDH1 promoter methylation correlates with decreased gene expression and poor prognosis in patients with breast cancer. **Oncology letters**, v. 11, n. 4, p. 2635-2643, 2016. ISSN 1792-1074.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. ISSN 1046-2023.

LUBELSKA, K. et al. Sulforaphane regulates NFE2L2/Nrf2-dependent xenobiotic metabolism phase II and phase III enzymes differently in human colorectal cancer and untransformed epithelial colon cells. **Nutrition and cancer**, v. 68, n. 8, p. 1338-1348, 2016. ISSN 0163-5581.

LYKO, F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 2, p. 81, 2018. ISSN 1471-0064.

MALTSEVA, D.; RODIN, S. Laminins in metastatic cancer. **Molecular Biology**, v. 52, n. 3, p. 350-371, 2018. ISSN 0026-8933.

MANICA, G. C. et al. Down regulation of ADAM33 as a predictive biomarker of aggressive breast cancer. **Scientific reports**, v. 7, p. 44414, 2017. ISSN 2045-2322.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 3, p. 266-272, 2007. ISSN 0955-0674.

MARTINS, G. A.; ARRUDA, L. Tratamento sistêmico da psoríase-Parte I: metotrexato e acitretina Systemic treatment of psoriasis-Part I: methotrexate and acitretin. **An Bras Dermatol**, v. 79, n. 3, p. 263-278, 2004.

MARZEC, K. M. et al. Comparative matrix isolation infrared spectroscopy study of 1, 3-and 1, 4-Diene monoterpenes (α -Phellandrene and γ -Terpinene). **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 17, p. 4342-4353, 2011. ISSN 1089-5639.

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current cancer epidemiology. **Journal of epidemiology and global health**, v. 9, n. 4, p. 217-222, 2019. ISSN 2210-6014.

MC GEE, M.; BAINBRIDGE, S.; FONTAINE-BISSON, B. A crucial role for maternal dietary methyl donor intake in epigenetic programming and fetal growth outcomes. **Nutrition reviews**, v. 76, n. 6, p. 469-478, 2018. ISSN 0029-6643.

MEIRSON, T.; GIL-HENN, H.; SAMSON, A. O. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. **Oncogene**, v. 39, n. 9, p. 2024-2026, 2020. ISSN 1476-5594.

MENEGON, S.; COLUMBANO, A.; GIORDANO, S. The dual roles of NRF2 in cancer. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 7, p. 578-593, 2016. ISSN 1471-4914.

MIDDLETON, D. R. et al. Environmental geochemistry and cancer: a pertinent global health problem requiring interdisciplinary collaboration. **Environmental Geochemistry and Health**, p. 1-10, 2019. ISSN 1573-2983.

MILCZAREK, M. et al. Combination treatment with 5-fluorouracil and isothiocyanates shows an antagonistic effect in Chinese hamster fibroblast cells line-V79. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 68, n. 3, p. 331-342, 2011. ISSN 0001-6837.

MISHRA, S. et al. Subcutaneous Ehrlich ascites carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018. ISSN 2045-2322.

MITTAL, V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 13, p. 395-412, 2018. ISSN 1553-4006.

MOCELLIN, S. Nitric oxide: cancer target or anticancer agent? **Current cancer drug targets**, v. 9, n. 2, p. 214-236, 2009. ISSN 1568-0096.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 11, p. 151, 2019.

MONTEMURRO, F. et al. Self-evaluation of adjuvant chemotherapy-related adverse effects by patients with breast cancer. **JAMA oncology**, v. 2, n. 4, p. 445-452, 2016. ISSN 2374-2437.

MOROTTI, A. et al. I κ B- α : At the crossroad between oncogenic and tumor-suppressive signals. **Oncology Letters**, v. 13, n. 2, p. 531-534, 2017. ISSN 1792-1074.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. ISSN 0022-1759.

MUNTANÉ, J.; DE LA MATA, M. Nitric oxide and cancer. **World journal of hepatology**, v. 2, n. 9, p. 337, 2010.

NAKOPOULOU, L. et al. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. **Breast cancer research and treatment**, v. 77, n. 2, p. 145-155, 2003. ISSN 0167-6806.

NASCIMENTO, F. R. et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life sciences**, v. 78, n. 22, p. 2650-2653, 2006. ISSN 0024-3205.

NEDELJKOVIĆ, M.; DAMJANOVIĆ, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 957, 2019.

NO, J. H.; KIM, Y.-B.; SONG, Y. S. Targeting nrf2 signaling to combat chemoresistance. **Journal of cancer prevention**, v. 19, n. 2, p. 111, 2014.

NURGALI, K.; JAGOE, R. T.; ABALO, R. Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 245, 2018. ISSN 1663-9812.

OSAKI, M.; OSHIMURA, M. A.; ITO, H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 667-676, 2004. ISSN 1360-8185.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012. ISSN 0960-7722.

PELTANOVA, B.; RAUDENSKA, M.; MASARIK, M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 63, 2019. ISSN 1476-4598.

PEREIRA, I. T. et al. Fibronectin affects transient MMP2 gene expression through DNA demethylation changes in non-invasive breast cancer cell lines. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e105806, 2014. ISSN 1932-6203.

PUDEŁEK, M. et al. Therapeutic potential of monoterpene α -thujone, the main compound of *Thuja occidentalis* L. essential oil, against malignant glioblastoma multiforme cells in vitro. **Fitoterapia**, v. 134, p. 172-181, 2019. ISSN 0367-326X.

REYMOND, N.; D'ÁGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 858-870, 2013. ISSN 1474-1768.

ROSETTE, C. et al. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 5, p. 943-950, 2005. ISSN 1460-2180.

ROSS, J. B. et al. Identification of molecular determinants of primary and metastatic tumour re-initiation in breast cancer. **Nature cell biology**, v. 17, n. 5, p. 651-664, 2015. ISSN 1476-4679.

SA, G.; DAS, T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. **Cell division**, v. 3, n. 1, p. 14, 2008. ISSN 1747-1028.

SALEHI, B. et al. Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 8, p. 1425-1449, 2018. ISSN 0951-418X.

SARRIÓ, D. et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. **International journal of cancer**, v. 106, n. 2, p. 208-215, 2003. ISSN 0020-7136.

SEELAN, R. S. et al. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on gene expression. **Drug metabolism reviews**, v. 50, n. 2, p. 193-207, 2018. ISSN 0360-2532.

SENISKI, G. G. et al. ADAM33 gene silencing by promoter hypermethylation as a molecular marker in breast invasive lobular carcinoma. **BMC cancer**, v. 9, n. 1, p. 80, 2009. ISSN 1471-2407.

SHAFREEN, R. B. et al. Interaction of human serum albumin with volatiles and polyphenols from some berries. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 297-303, 2017. ISSN 0268-005X.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2010. ISSN 0143-3334.

SHEWEITA, S. A.; EL-HOSSEINY, L. S.; NASHASHIBI, M. A. Protective effects of essential oils as natural antioxidants against hepatotoxicity induced by cyclophosphamide in mice. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0165667, 2016. ISSN 1932-6203.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7-34, 2019. ISSN 0007-9235.

SIQUEIRA, H. D. A. S. et al. α -Phellandrene, a cyclic monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. **Life sciences**, v. 160, p. 27-33, 2016. ISSN 0024-3205.

SLEEP, D. Albumin and its application in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 12, n. 5, p. 793-812, 2015. ISSN 1744-7593.

SONG, Y. et al. Restoring E-cadherin expression by natural compounds for anticancer therapies in genital and urinary cancers. **Molecular Therapy-Oncolytics**, v. 14, p. 130-138, 2019a. ISSN 2372-7705.

SONG, Y. et al. Targeting E-cadherin expression with small molecules for digestive cancer treatment. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 7, p. 3932, 2019b.

STRESEMANN, C.; LYKO, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. **International journal of cancer**, v. 123, n. 1, p. 8-13, 2008. ISSN 0020-7136.

SU, Z.-Y. et al. Requirement and epigenetics reprogramming of Nrf2 in suppression of tumor promoter TPA-induced mouse skin cell transformation by sulforaphane. **Cancer prevention research**, v. 7, n. 3, p. 319-329, 2014. ISSN 1940-6207.

SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 2015. ISSN 1476-4598.

TALVENSAARI-MATTILA, A.; PÄÄKKÖ, P.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. **British journal of cancer**, v. 89, n. 7, p. 1270-1275, 2003. ISSN 1532-1827.

TANG, Y. et al. Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. **Clinical breast cancer**, v. 16, n. 5, p. 335-343, 2016. ISSN 1526-8209.

TAO, Z. et al. Breast cancer: epidemiology and etiology. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 72, n. 2, p. 333-338, 2015. ISSN 1085-9195.

TAYE, A. et al. Hepatoprotective effect of pentoxifylline against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. **Annals of hepatology**, v. 8, n. 4, p. 364-370, 2009.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 1-8, 2019. ISSN 0032-0935.

TÊTU, B. et al. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 3, p. R28, 2006. ISSN 1465-542X.

UCHIDA, N. S. et al. Protective effect of Cymbopogon citratus essential oil in experimental model of acetaminophen-induced liver injury. **The American journal of Chinese medicine**, v. 45, n. 03, p. 515-532, 2017. ISSN 0192-415X.

VAKKILA, J.; LOTZE, M. T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 641-648, 2004. ISSN 1474-1741.

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1-14, 2014. ISSN 0945-6317.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. **Endeavor**, v. 1, p. 18-20, 1942.

WAGNER, J. E. et al. Perillyl alcohol inhibits breast cell migration without affecting cell adhesion. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, 2002. ISSN 2314-6133.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast cancer treatment: a review. **Jama**, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019. ISSN 0098-7484.

WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3028, 2018.

WANG, L. Early diagnosis of breast cancer. **Sensors**, v. 17, n. 7, p. 1572, 2017.

WANG, M. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761, 2017.

WANG, X. et al. Enhanced cytotoxicity of mitomycin C in human tumour cells with inducers of DT-diaphorase. **British journal of cancer**, v. 80, n. 8, p. 1223-1230, 1999. ISSN 1532-1827.

WU, X.; ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 9, p. 517, 2017. ISSN 1471-0064.

YANG, L.; PALLIYAGURU, D. L.; KENSLER, T. W. Frugal chemoprevention: targeting Nrf2 with foods rich in sulforaphane. *Seminars in oncology*, 2016, Elsevier. p.146-153.

ZHANG, J.-H. et al. Anti-fungal activity, mechanism studies on α -Phellandrene and Nonanal against *Penicillium cyclopium*. **Botanical studies**, v. 58, n. 1, p. 1-9, 2017. ISSN 1999-3110.

ZHANG, P. et al. Nanomedicine-based immunotherapy for the treatment of cancer metastasis. **Advanced Materials**, v. 31, n. 49, p. 1904156, 2019. ISSN 0935-9648.

**APÊNDICE I – CLASSIFICAÇÃO DAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA MCF7
E MDA-MB-231**

Linhagem	RE	RP	HER2	Subtipo
MCF7	Pos	Pos	Neg	Luminal A
MDA-MB-231	Neg	Neg	Neg	Basal

Pos – Positivo; Neg – Negativo;

APÊNDICE II - INICIADORES DE RT-qPCR PARA LINHAGENS HUMANAS

Gene	Universal (5'-3')	Reverso (5'-3')
<i>GAPDH</i>	CTGCACCACCAACTGCTTA	CATGACGGCAGGTCAGGTC
<i>HPRT</i>	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA	TCCAGCAGGTCAGCA AAGAAT
<i>ADAM33</i>	CAGGACCCGGAAGTACCTG	GCCACCTGAATGTCCAGAG
<i>BAX</i>	TCCCCCGAGAGGTCTTTT	CGGCCCCAGTTGAAGTTG
<i>BCL2</i>	TTGGCCCCCGTTGCTT	GAGAACAGGGTACGATAACCG
<i>CASP8</i>	GGATGCCTTGATGTTATTCC	AGTTCCCTTTCCATCTCCTC
<i>CDH1</i>	CCCGGGACAACGTTTATT	GTCGTTACGAGTCACTTCAG
<i>MMP2</i>	AGCTCCCGGAAAAGATTGATG	CAGGGTGCTGGCTGA GTAGAT
<i>NFE2L2</i>	CAACTACTCCCAGGTTGC	AGCCGAAGAAACCTCATTG
<i>ITGB1</i>	AATGTAACCAACCGTAGC	CAGGTCCATAAGGTAGTAGA
<i>TP53</i>	AGCTACGGTTTCCGTCTGGG	CTTGTTGAGGGCAGGGGAGT
<i>VEGF</i>	CCTATGTGCAGAGGAATTATG	CCACTGTGTTGAGGGCAATG

Concentração utilizada: CDH1 – 900 nM; demais genes – 600 nM.

APÊNDICE III - INICIADORES DE RT-qPCR PARA CAMUNDONGOS (*Mus musculus*)

Gene	Universal (5'-3')	Reverso (5'-3')
<i>GAPDH</i>	GGTGAAGCAGGCATCT	TGTTGAAGTCGCAGGAG
<i>RPLP0</i>	CGACCTGGAAGTCCAACTAC	ACTTGCTGCATCTGCTTG
<i>ADAM33</i>	TATTGCTGCCGCTGTTGCTG	CCAGGATCCAGTGGGGAGTG
<i>BAX</i>	GCCTCCTCTCCTACTTC	CCTCAGCCCATCTTCTT
<i>BCL2</i>	CACTTGCCACTGTAGAGA	GCTTCACTGCCTCCTT
<i>CASP8</i>	CCAGGAAAAGATTTGTGTCTA	GGCCTTCCTGAGTACTGTCACCTG
<i>CDH1</i>	GGTTTTCTACAGCATCACCG	GCTTCCCCATTTGATGACAC
<i>HIF1A</i>	ACCTTCATCGGAAACTCCAAAG	CTGTTAGGCTGGGAAAGTTAGG
<i>ICAM1</i>	CAATTTCTCATGCCGCACAG	AGCTGGAAGATCGAAAGTCCG
<i>ITGB1</i>	TTGTGGAGGCAATGGCGTGTGC	ACAGACGCCAAGGCAGGTCTGA
<i>MMP2</i>	CAGGGAATGAGTACTGGGTCTA	ACTCCAGTTAAAGGCAGCATCTAC
<i>NFE2L2</i>	GTGGATCCGCCAGCTACTCCCA	TGGGGATATCCAGGGCAAGCGA
<i>NFKBIA</i>	GCTACCCGAGAGCGAGGAT	GCCTCCAAACACACAGTCATCAT
<i>NOS2</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGGTTTCG
<i>RIPK1</i>	TCATCTAGCGGGAGGTTGGA	ATGCCCAGTAGCTTCACCAC
<i>RIPK3</i>	CCAGAGGCCACTTGTGTAGCG	CGCTTTAGAAGCCTTCAGGTTGAC
<i>VEGFA</i>	ACTGGACCCTGGCTTTACTGCT	TGATCCGCATGATCTGCATGGTG

Concentração utilizada: 800 nM