BIANCA ROCHA SALES

**POTENCIAL ANTITUMORAL DO COMPOSTO 7-*EPI*-CLUSIANONA EM
LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA HUMANO CULTIVADAS
COMO MONOCAMADAS E ESFEROIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

BIANCA ROCHA SALES

**POTENCIAL ANTITUMORAL DO COMPOSTO 7-*EPI*-CLUSIANONA EM
LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA HUMANO CULTIVADAS
COMO MONOCAMADAS E ESFEROIDES**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria
Machado Santelli

Versão Original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Sales, Bianca Rocha.

Potencial antitumoral do composto 7-epi-clusianona em linhagens celulares de câncer de mama humano cultivadas como monocamadas e esferoides / Bianca Rocha Sales. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Gláucia Maria Machado Santelli.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia da célula tumoral.

Versão do título para o inglês: Antitumoral potencial of 7-epi-clusianone in human breast cancer cell lines cultured in monolayer and as spheroids.

1. Produtos naturais anticâncer 2. 7-epi-clusianona 3. Cultura tridimensional 4. Bloqueio no ciclo celular 5. Senescência celular 6. Células de tumor de mama humano I. Santelli, Profa. Dra. Gláucia Maria Machado II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0117/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bianca Rocha Sales.

Título da Dissertação: Potencial antitumoral do composto 7-epi-clusianona em linhagens celulares de câncer de mama humano cultivadas como monocamadas e esferoides.

Orientador(a): Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **597/13** referente ao projeto intitulado: "*Bioatividade de compostos extraídos de organismos marinhos: ação antiproliferativa sobre células tumorais humanas em cultura*" sob a responsabilidade de **Bianca Rocha Sales**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 26 de abril de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

À minha mãe, Ivone Rocha da Silva, que com carinho, amor, paciência e humildade dedicou seus melhores momentos a mim, sem querer receber nada em troca. Aos meus avós, Maria Ignês da Rocha Silva e Oswaldo Mariano da Silva, pelo amor e por tudo mais que somente os dois puderam proporcionar.

AGRADECIMENTOS

Todo agradecimento feito aqui, não é suficiente para dizer o quanto ninguém faz nada sozinho e quão grata eu sou a todos que participaram dessa jornada.

À Deus, todo meu agradecimento, essa jornada não foi fácil e sem Ele nada disso seria possível.

À minha mãe, eterna amiga e companheiro, obrigada por tudo, nesses 24 anos que estamos juntas, você foi a minha maior alegria, esperança, força e paz. Eu te amo mais do que a mim mesmo, embora as vezes não saiba expressar esse sentimento, enfim, obrigada por tudo.

Aos meus avós, por terem dedicado todo amor e carinho à uma neta, quase filha, todos os dias da minha vida. À minha madrinha, Irany, por ser tão inspiradora e amiga, à senhora madrinha, toda minha admiração e carinho. Às minhas primas Kawane e Daniele, que me introduziram nesse mundo da ciência, onde eu entrei e me apaixonei.

À toda minha família, cada membro, tem sua contribuição na formação do meu caráter e deste trabalho.

Ao meu pai e meu irmão Felipe, por me ajudarem a entender o que é perdão e recomeço.

Ao Adam, por ser um amigo tão fiel, chato as vezes, mas fazer os meus dias mais alegres, sempre oferecer colo e todo ensinamento científico.

À Natália, por ser uma amiga tão divertida e que entende simples olhares. Obrigada amiga, por tudo.

Essa dissertação não teria saído se não fosse o 45B rsrsrs!

À Bruna, minha amiga da faculdade e da vida, obrigada por fazer parte de tudo e os meus dias mais badalados animal.

À Camila, por toda alegria, pelo momentos mais descontraídos e divertidos, entre um *Western* e outro.

Ao Evandro, obrigada por toda paciência, ensinamento e amizade durante a faculdade e toda jornada.

À Paula, pelas conversas cabeças, amizade e todo ensinamento científico.

À Julyane, por ser amiga e percorrer a longa jornada ao meu lado.

Ao Jorge, meu companheiro de ingresso e de sempre, obrigada por tudo.

À minha orientadora, Gláucia, por todo cuidado, dedicação, confiança e ensinamento oferecido à mim durante toda trajetória, sem cessar.

Ao Roberto Cabado, pela dedicação técnica e conversas entre uma imagem e outra.

À Marlene, por além de manter o laboratório funcionando, ainda conseguir ser como uma mãe pra mim.

À Angel, por me ensinar que sempre podemos ir além e pela amizade.

À Anali, por toda ajuda com experimentos e pela amizade. À Bia Cortez, por todo ensinamento científico e amizade.

À Camila, novamente, e a Vivian Zague por surtarem junto comigo no final da dissertação.

Enfim, agradeço de coração à todos os novatos do BioCeM que de uma forma ou de outra me ajudaram muito na finalização deste trabalho. À Regina Valbom, o que seria de mim sem essa excepcional secretária do programa!

À todos os meus amigos, fora da USP, que entenderam quando não podia encontra-los por conta do trabalho. Principalmente a Rosana e Rebeca, que me incentivaram muito e acreditaram em mim no início da jornada e também nos momentos mais difíceis.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

“Sou do tamanho daquilo que vejo e não da minha altura”.
Carlos Drummond de Andrade.

RESUMO

ROCHA-SALES, B. **Potencial antitumoral do composto 7-*epi*-clusianona em linhagens celulares de câncer de mama humano cultivadas como monocamadas e esferoides**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.

A biodiversidade de plantas brasileiras é uma fonte muito rica de moléculas bioativas, e dentro da proposta da busca por novas drogas antitumorais, avaliamos neste estudo o potencial antiproliferativo do composto 7-*epi*-clusianona, extraído de *Garcinia brasiliensis*, planta popularmente conhecida como bacupari. Foram utilizadas duas linhagens celulares derivadas de tumor de mama humana, Hs 578T e MCF-7, sendo a primeira derivada de tumor mais agressivo, cultivadas em monocamada e como esferoides (cultura 3D). Os esferoides representam modelos de interação celular mais próximos dos tumores *in vivo*, são atualmente propostos para *screening* de drogas anticâncer. Neste estudo foi pela primeira vez estabelecida a cultura de esferoides com as células Hs 578T, sem a adição de componentes de matriz extracelular, o que possibilitou a comparação com os da linhagem MCF-7. Microscopia eletrônica de transmissão possibilitou mostrar que as células dos esferoides de MCF-7 são coesas, concordando com maiores níveis de expressão de caderina-E nestas condições de cultura do que em monocamada. As células Hs 578T se organizam concentricamente com morfologia similar a fibroblasto e os níveis proteicos de caderina-E não detectáveis por *Western Blotting*. O IC₅₀ após 48 horas de tratamento das células é de 20 µM para Hs 578T e 6 µM para MCF-7. A análise do ciclo celular por citometria de fluxo mostrou que o composto é capaz de reter as células em fase G1/G0 em ambas as linhagens em 2D, mas não em 3D. O tratamento com 7-*epi*-clusianona não altera a organização de actina-F e a integridade nuclear, como observado em preparações de imunofluorescência ao microscópio confocal de varredura a laser. Algumas vias de sinalização envolvidas com proliferação celular (PCNA, ERK) e de controle do ciclo celular (ciclina D1 e p53) foram analisadas por *Western Blotting* e PCR em tempo real, após 24 horas de tratamento. O composto é capaz de induzir as células a senescência celular, como mostrado pelo ensaio de detecção de β-galactosidase. Não houve indução de apoptose após tratamento com composto. Esses dados indicam que o composto 7-*epi*-clusianona é uma molécula promissora, que demonstrou potencial antitumoral em células de tumor de mama. A cultura tridimensional se mostrou mais resistente ao tratamento com 7-*epi*-clusianona, portanto estudos mais abrangentes são necessários para melhor entendimento dos efeitos do composto sobre esse tipo de cultura.

Palavras-chave: produtos naturais anticâncer. *Garcinia brasiliensis*. 7-*epi*-clusianona. Cultura tridimensional. Bloqueio no ciclo celular. Senescência celular. Células de tumor de mama humano.

ABSTRACT

ROCHA-SALES, B. **Antitumoral potential of 7-*epi*-clusianone in human breast cancer cell lines cultured in monolayer and as spheroids**. 2015. 78 p. Master Thesis (Cell Biology and Tissue). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.

Brazilian flora is considered one of the most diverse in the world and natural products are some of the important sources of new antitumoral compounds. The aim of this study was to evaluate the antiproliferative potential of 7-*epi*-clusianone, extracted from *Garcinia brasiliensis*, named bacupari in folk medicine. Two cell lines derived from human breast tumor were used, Hs 578T, derived from more aggressive tumor and MCF-7, both cultured in monolayer and as spheroids (3D culture). The spheroids are closer to *in vivo* tumors than cells cultured as monolayers and are currently proposed for screening of anticancer drugs. It was the first time that Hs 578T cells were cultured as spheroids without the addition of extracellular matrix components, which enabled us to analyze morphological differences between both spheroids. Transmission electron microscopy enabled us to show that cells in MCF-7 spheroids are cohesive, in accordance with higher expression levels of E-cadherin in these culture conditions than monolayer. Hs 578T cells assumed fibroblast-like morphology, were organized concentrically and E-cadherin protein levels were not detectable by Western blotting. The IC₅₀ after 48 hours of treatment was 20 µM for Hs 578T cells and 6 µM for MCF-7 cells. Cell cycle analysis by flow cytometry showed induction of cell cycle arrest in G1/S phase due to the treatment with 7-*epi*-clusianone in cells cultured in monolayers, but not in 3D culture model. 7-*epi*-clusianone treatment did not change the organization of F-actin and nuclear integrity, as observed in laser scanning confocal microscopy preparations. Some proteins involved with cell proliferation pathways (PCNA and ERK) and cell cycle control (cyclin D1 and p53) were analyzed by Western blotting and real-time PCR, after 24 hours of treatment. The amount of cells in senescence after treatment with 7-*epi*-clusianone is higher than the control group, as seen by the senescence β-galactosidase staining assay. Apoptosis was not detected. Altogether, these data suggest that 7-*epi*-clusianone is a promising molecule against tumor cells, which demonstrated antitumoral potential against breast cancer cells. The three-dimensional culture was more resistant to treatment with the compound than the monolayer, therefore more comprehensive studies are needed to better understand the effects of 7-*epi*-clusianone on this type of culture.

Keywords: natural products anticancer. *Garcinia brasiliensis*. 7-*epi*-clusianone. Three-dimensional culture. Cell cycle arrest. Cellular senescence. Human breast cancer cell lines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Estimativas dos 10 tipos de câncer mais incidentes para o ano de 2014 separados por sexo, excluindo pele não melanoma.....	15
Figura 02 - <i>Garcinia brasiliensis</i> e 7- <i>epi</i> -clusianona.....	17
Figura 03 – Esquema de troca de meio dos esferoides.....	23
Figura 04 - Curvas de crescimento das linhagens Hs 578T e MCF-7.....	32
Figura 05 – Citotoxicidade de 7- <i>epi</i> -clusianona sobre células Hs 578T e MCF-7.....	33
Figura 06 - Efeito do composto 7- <i>epi</i> -clusianona sobre a proliferação celular de células Hs 578T.....	35
Figura 07 - Efeito do composto 7- <i>epi</i> -clusianona sobre a proliferação celular de células MCF-7.....	35
Figura 08 - Ação do composto 7- <i>epi</i> -clusianona sobre o perfil de ciclo celular em 24 horas.....	37
Figura 09 - Ação do composto 7- <i>epi</i> -clusianona sobre o perfil de ciclo celular em 48 horas.....	38
Figura 10 - Ação do composto 7- <i>epi</i> -clusianona sobre o perfil de ciclo celular em 72 horas.....	39
Figura 11 - Ação do composto 7- <i>epi</i> -clusianona sobre o perfil de ciclo celular em esferoides de células MCF-7.....	41
Figura 12 - Efeito do composto 7- <i>epi</i> -clusianona sobre indução de morte celular: monocamada.....	42
Figura 13 - Efeito do composto 7- <i>epi</i> -clusianona sobre indução de morte celular: esferoides.....	42
Figura 14 – Expressão gênica relativa de ciclina D1 e p53 sobre ação do composto 7- <i>epi</i> -clusianona em monocamada e esferoides.....	44
Figura 15 – Expressão gênica relativa de proteínas de adesão sobre ação do composto 7- <i>epi</i> -clusianona em monocamada e esferoides.....	44
Figura 16 - Níveis de expressão de proteínas envolvidas com a via de proliferação e adesão em células Hs 578T e MCF-7 cultivadas em 2D e 3D após tratamento com 7- <i>epi</i> -clusianona.....	46
Figura 17 - Níveis de expressão de proteínas envolvidas com o ciclo celular em células Hs 578T e MCF-7 cultivadas em monocamada após tratamento de 24 horas com 7- <i>epi</i> -clusianona.....	47
Figura 18 - Efeitos do 7- <i>epi</i> -clusianona sobre senescência celular das linhagens Hs 578T e MCF-7 cultivadas em monocamada.....	48
Figura 19 - Efeitos do 7- <i>epi</i> -clusianona sobre densidade celular de Hs 578T e MCF-7 cultivadas em monocamada.....	49
Figura 20 - Efeitos de 7- <i>epi</i> -clusianona sobre a integridade nuclear e a organização do citoesqueleto de actina de células Hs 578T.....	50
Figura 21 – Efeitos de 7- <i>epi</i> -clusianona sobre a integridade nuclear e a organização do citoesqueleto de actina de células MCF-7.....	51
Figura 22 - Morfologia das células Hs 578T e MCF-7 cultivadas em monocamada e após a formação de esferoides.....	55
Figura 23 - Imagens de cortes semi-finos de esferoides de células Hs 578T e MCF-7.....	56
Figura 24 - Ultraestrutura das células Hs 578T e MCF-7 em esferoides.....	57
Figura 25 - Organização de microtúbulos e microfilamentos nos esferoides das linhagens Hs 578T e MCF-7.....	58

Figura 26 - Morfologia dos esferoides de células Hs 578T e MCF-7 após tratamento com 7- <i>epi</i> -clusianona por 48 horas.....	59
Figura 27 - Imagens de cortes semi-finos de esferoides de células Hs 578T tratados com 7- <i>epi</i> -lusianona por 48 horas.....	60
Figura 28 - Morfologia dos esferoides de células MCF-7 tratados com o composto 7- <i>epi</i> -clusianona depois de 48 horas.....	61
Figura 29 - Ultraestrutura das células Hs 578T em esferoides sob tratamento com 7- <i>epi</i> -clusianona....	62
Figura 30 - Ultraestrutura das células MCF-7 em esferoides sob tratamento com 7- <i>epi</i> -clusianona.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos <i>primers</i> usados para o PCR em tempo real.....	26
Tabela 2 – Anticorpos utilizados nos experimentos de <i>Western blotting</i>	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	<i>Câncer.....</i>	14
1.2	<i>Compostos naturais anticâncer: 7-epi-clusianona.....</i>	16
1.3	<i>Cultura tridimensional: esferoides.....</i>	18
2	OBJETIVOS.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	<i>Cultura de células em monocamada e tridimensional (3D).....</i>	22
3.2	<i>7-epi-clusianona.....</i>	23
3.3	<i>Curva de crescimento: monocamada.....</i>	23
3.4	<i>Teste de viabilidade celular: monocamada.....</i>	24
3.5	<i>Densidade celular após tratamento com 7-epi-clusianona: monocamada.....</i>	24
3.6	<i>Ciclo celular após tratamento com 7-epi-clusianona: monocamada e esferoides.....</i>	25
3.7	<i>Ensaio de detecção de caspase-9: monocamada e esferoides.....</i>	26
3.8	<i>Preparações de RNA e qRT-PCR: monocamada e esferoides.....</i>	26
3.9	<i>Western Blotting: monocamada e esferoides.....</i>	27
3.10	<i>Ensaio de detecção de β-galactosidade: monocamada.....</i>	29
3.11	<i>Microscopia de luz digital e invertida.....</i>	29
3.12	<i>Imunofluorescência para lâmina B1.....</i>	30
3.13	<i>Medida da área dos esferoides.....</i>	30
3.14	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão.....</i>	30
4	RESULTADOS.....	32
4.1	<i>Curvas de crescimento.....</i>	32
4.2	<i>Efeitos do 7-epi-clusianona sobre a viabilidade celular.....</i>	33
4.3	<i>Ação do 7-epi-clusianona sobre a proliferação celular.....</i>	34
4.4	<i>Ação do 7-epi-clusianona sobre o ciclo e a morte celular.....</i>	36
4.5	<i>Análise do perfil de expressão gênica das células sobre ação do 7-epi-clusianona.....</i>	43
4.6	<i>Análise do perfil de expressão proteica das células sobre ação do 7-epi-clusianona.....</i>	45
4.7	<i>Efeitos do composto 7-epi-clusianona sobre a senescência celular.....</i>	47
4.8	<i>Efeitos do 7-epi-clusianona sobre a densidade e morfologia celular: monocamada.....</i>	48
4.9	<i>Efeitos do 7-epi-clusianona sobre a morfologia celular: esferoides.....</i>	52
5	DISCUSSÃO.....	64
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer pode ser definido como um conjunto de mais de centenas de doenças, cujo principal fator é a disfunção no ciclo celular normal das células que constituem os tecidos (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2015). Portanto, o câncer é o resultado de várias alterações no nível molecular que conferem à célula modificações em seu comportamento e, por conseguinte, resultam em alterações na fisiologia da célula e também mudança no fenótipo celular, como o aumento do tamanho do núcleo da célula cancerosa em relação ao da célula normal (GINZBERG; KAFRI; KIRSCHNER, 2015).

Hanahan e Weinberg (2011) listaram as principais alterações que as células precisam adquirir para mudarem seu fenótipo normal e alcançarem o fenótipo tumoral. A inativação de genes supressores de tumor, como TP53 que codifica uma das principais proteínas supressoras tumorais, a p53 e a perda da expressão de caderina-E podem conferir à célula fenótipo tumoral. As células tumorais também se tornam independentes aos sinais de indução de apoptose e de senescência celular (fase irreversível do ciclo celular onde a célula está viável, porém não prolifera mais).

De acordo com as estatísticas publicadas por Saika e Sobue (2013) o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, ficando atrás somente de doenças cardiorrespiratórias. A Sociedade Americana de Câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015) divulgou as estimativas para o ano atual, que apontam a quantidade de novos casos que serão diagnosticados e também a quantidade de mortes previstas para 2015 na América do Norte. Segundo essas estimativas, serão diagnosticados aproximadamente 220 mil novos casos de câncer de próstata, por outro lado as mulheres são acometidas principalmente pelo câncer de mama, que de acordo com essa pesquisa serão aproximadamente 230 mil novos casos em 2015.

Segundo a última estatística feita pelo o INCA (2014) que também é válida para o ano atual, no Brasil seriam diagnosticados 576 mil novos casos de câncer, sendo que os mais incidentes são para homens, o câncer de próstata com 68.800 mil novos

casos, e assim como na América do Norte, o tipo de câncer que mais acomete o sexo feminino é o de mama, de acordo com o INCA foram aproximadamente 57 mil casos diagnosticados (figura 01).

Localização primária	casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 01 - Estimativas dos 10 tipos de câncer mais incidentes para o ano de 2014 separados por sexo, excluindo pele não melanoma (modificado de INCA, 2014).

Devido à alta incidência do câncer de mama na população feminina, essa doença tem sido bastante estudada. Alguns tipos de câncer de mama podem ser listados, como carcinoma ductal de mama (que acomete os ductos glândulares) que é o mais frequente atingindo aproximadamente 80% dos casos, outros subtipos são mais raros, como o carcinoma lobular, que acomete os lóbulos produtores de leite (PEROU et al., 2000). Os tumores de mama podem também ser classificados de acordo com a presença ou não dos receptores hormonais. Os tumores de mama classificados como triplo-negativo são aqueles que não respondem aos tratamentos com drogas hormonais, por não expressarem os receptores de estrógeno (ER-), os receptores de progesterona (PgR-) e a proteína HER-2 (fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2). Esses tumores estão associados a um pior prognóstico dos pacientes por serem mais agressivos (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010).

Apesar de vários estudos demonstrarem que a taxa de sobrevivência de pacientes com câncer aumenta expressivamente quando a doença é descoberta mais precocemente, a taxa de mortalidade ainda é muito alta, no Brasil e no mundo. Tendo em vista que há grande heterogeneidade dos tumores de mama, tanto genotípica quanto fenotípica, a busca por novos fármacos que tenham potencial antitumoral está intensificada (DESANTIS et al., 2014; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Esses dados indicam a importância da busca por novos fármacos, sendo que a biodiversidade da fauna e flora brasileiras pode se tornar uma ferramenta importante na descoberta de novas moléculas bioativas contra a progressão tumoral.

1.2 Compostos naturais anticâncer: 7-*epi*-clusianona

Os fármacos derivados de diferentes organismos, como plantas e animais marinhos tem sido de grande importância para humanidade, no que diz respeito à alívio de dores musculares até o combate de células cancerosas. Há séculos busca-se por novas moléculas que tenham bioatividade, tem se obtido grande sucesso, graças a vasta heterogeneidade de compostos secundários e substâncias que esses organismos produzem, na sua maioria para sua própria defesa (DEMAIN; VAISHNAV, 2011).

No combate ao câncer essa busca é incessante, atualmente, a busca por novos fármacos que sejam menos tóxicos para as células normais (aquelas que não foram acometidas pela doença), que tenham a capacidade de reverter o fenótipo maligno ou que evitem a disseminação do tumor pelo organismo (metástase) têm sido intensificadas. Neste contexto, podemos destacar os estudos que tem como alvo a busca por novos compostos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas.

Alguns fármacos já consolidados na indústria farmacêutica foram primeiramente extraídos de plantas e atualmente são sintetizados em laboratório, como os taxanos, extraídos do teixo, *Texus baccata*, que atua nas células como hiperpolimerizador de microtúbulos, impedindo a divisão mitótica, são altamente utilizados como quimioterápico contra os cânceres de ovário e próstata, por exemplo (KAMPAN et al., 2015). Outro quimioterápico sintetizado em laboratório, bastante utilizado e que também interfere na dinâmica dos microtúbulos, impedindo a proliferação das células cancerosas, é a vincristina, originalmente extraída da planta *Vinca rosea* (JORDAN, 2002).

Outros compostos que também exibiram potencial anticâncer, mas que ainda estão em fase de estudos demonstram ser muito promissores. Dentre eles está o ácido cinâmico, encontrado em frutos cítricos e outros vegetais, que exibe baixa citotoxicidade e demonstrou potencial antiproliferativo em células de melanoma humano (HT-144 e NGM), alterando a organização do citoesqueleto com posterior indução de apoptose (NIERO; MACHADO-SANTELLI, 2013). O pterocarpano, extraído de árvores da espécie *Platymiscium floribundum*, interage com os microtúbulos e aumenta o número de células MCF-7 em pró-metáfase, demonstrando importante atividade antitumoral (MILITÃO et al., 2014).

Dentre os compostos que já foram isolados, o composto 7-*epi*-clusianona tem

sido bastante estudado. Trata-se de uma benzofenona poliprenilada, extraída inicialmente do pericarpo dos frutos de *Garcinia brasiliensis* (figura 02) (SANTOS et al., 1999).

A espécie *Garcinia brasiliensis* (Mart.) Planchon & Triana, sinonímia *Rheedia brasiliensis* Mart., é conhecida na medicina popular como “bacupari”, “bacuri”, “laranjinha”, entre outros, pertence à família Clusiaceae (antiga Guttiferae), apresenta ampla distribuição geográfica: Guiana, Argentina, Bolívia e Brasil (CORRÊA, 1978; OLIVEIRA et al., 2011). Na medicina popular, os frutos já foram utilizados para dores musculares, infecções urinárias, úlceras pépticas e tumores (CORRÊA, 1978). Vários compostos de interesse farmacológico já foram isolados das espécies pertencentes à esta família, por isso tem sido alvo de estudos (SANTOS, 1996).

Figura 02 – *Garcinia brasiliensis* e 7-*epi*-clusianona. A e C - frutos de *Garcinia brasiliensis*; B – árvore, atinge de 5 a 7 metros de altura; D - estrutura química da molécula 7-*epi*-clusianona (modificado de Alves et al., 1999).

Algumas atividades farmacológicas do composto 7-*epi*-clusianona vêm sendo descritas como potencial antimicrobiano (BRANCO DE ALMEIDA et al., 2011; MURATA et al., 2008, 2010a), ação vasoconstritora/vasodilatadora (CRUZ et al., 2006), antianafilático (NEVES et al., 2007), anti-inflamatório (SANTA-CECÍLIA et al., 2012) e antiparasitário (ALVES et al., 1999).

Outro estudo investigou o efeito do composto 7-*epi*-clusianona sobre algumas linhagens de células cancerosas humanas *in vitro* e comparou com o efeito da doxorubicina, foi demonstrado que para a linhagem de mama humana MCF-7, o composto 7-*epi*-clusianona foi mais agressivo, onde o índice de citotoxicidade que inviabiliza 50% das células (IC₅₀) foi de 6,3 µM em detrimento da doxorubicina, que para esta linhagem ficou em 17,1 µM (MURATA et al., 2010b).

Ionta et al. (2015) verificaram o potencial antitumoral do composto 7-*epi*-clusianona sobre células da linhagem A549 (carcinoma de pulmão) e mostraram que após 48 horas de tratamento a viabilidade das células foi reduzida, apresentando o IC₅₀ de 16,13 µM, houve também mudanças na organização do citoesqueleto, paralelamente a este efeito, as células eram encaminhadas para apoptose.

1.3 Cultura tridimensional: esferoides

Embora os resultados obtidos a partir de estudos com a 7-*epi*-clusianona no modelo clássico (monocamada ou bidimensional) sejam muito promissores, eles não refletem características importantes no microambiente tumoral *in vivo*, como por exemplo a interação célula-célula e célula-matriz, outra característica como a polaridade celular, também é perdida no modelo de cultivo em monocamada (CZARNECKA; RUSIN, 2013; XU; FARACH-CARSON; JIA, 2014; KITEL).

Contudo, por muito tempo, a técnica de cultura de células em monocamada foi o único método *in vitro* que possibilitou o entendimento do funcionamento das células e sua complexa biologia molecular. O pioneiro no que tange o desenvolvimento da cultura de células *in vitro*, foi Harrison, que em 1907 manteve pela primeira vez, células de embrião de anfíbios vivas em cultura. A partir disso, tudo foi se aprimorando, desde a confecção de meio de cultura apropriado para cada tipo celular, até o desenvolvimento de culturas tridimensionais. Cultivando células de coração de galinha, Alexis Carrel, notou que havia diferenças na viabilidade das células que ficavam em contato com o meio de cultura, essas células viviam por mais tempo em cultura, então Carrel começou a cultivar todas as células sobre uma superfície formada por fios de seda, o que permitiu melhor interação das células com o meio de cultura. Talvez, esse tenha sido o primeiro registro de cultura de células em três dimensões. Anos depois, Johannes Holtfret, cultivou as células em placas contendo ágar e submeteu essas culturas à rotação, daí surgiu de fato, o primeiro método de

cultura tridimensional, que desde 1950 até os dias atuais, é cada vez mais utilizado e aprimorado (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011a).

Existem vários métodos para se cultivar células tridimensionalmente, alguns modelos de estudo utilizam arcabouço, como moléculas da matriz extra-celular, onde as células se ancoram, outros métodos não submetem as células à ancoragem, como o método da gota pendente e os esferoides multicelulares, onde as células ficam livres no meio de cultura (MONTANEZ-SAURI; BEEBE; SUNG, 2015).

As células, quando cultivadas em esferoides (3D) reorganizam seu citoesqueleto, alteram o nível de proteínas envolvidas com adesão célula-célula e aumentam expressivamente a sinalização entre célula-matriz (ELLIOTT; YUAN, 2011). Ainda que seja uma técnica desenvolvida *in vitro* e não alcance completamente as características celulares *in vivo*, os esferoides são importante ferramenta de estudo para o entendimento da biologia celular e molecular de tumores sólidos (AMARAL et al., 2011b; AMARAL; URABAYASHI; MACHADO-SANTELLI, 2010; SANTINI; RINALDI, 1999).

A própria arquitetura dos esferoides multicelulares lhes confere diferenças na captação de oxigênio entre as células. As células que estão na periferia têm maior acesso ao oxigênio do que as que estão alojadas no interior do esferoide e o mesmo ocorre com a disponibilidade de nutrientes. Foi observado que as células da periferia dos esferoides apresentam uma taxa de proliferação muito maior que as células encontradas do centro. O oposto ocorre com o processo de morte celular. As células do interior dos esferoides tendem a morrer, geralmente por necrose, devido à escassez de fatores fundamentais para a manutenção da sobrevivência e proliferação celulares (FRIEDRICH; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2007; PAGE; FLOOD; REYNAUD, 2013).

Os esferoides têm ganhado bastante espaço no que se refere a estudos para testes com drogas anticâncer, devido ao seu arranjo multicelular e a similaridade com o microambiente tumoral *in vivo*, tem sido amplamente utilizado para o *screening* de novas drogas antineoplásticas (PATEL et al., 2015). Segundo alguns estudos, a resistência às drogas aumenta à medida que a complexidade estrutural aumenta (ELLIOTT; YUAN, 2011; NIERO et al., 2014).

Partindo-se dos dados apresentados, o objetivo do presente estudo foi investigar a ação da 7-*epi*-clusianona sobre células de câncer de mama humano cultivadas em monocamada ou em sistema tridimensional (esferoides). Esperamos

que o uso desses dois sistemas nos permitam fazer inferências sobre mecanismos envolvidos com a quimioresistência das linhagens celulares estudadas.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a atividade biológica do composto 7-*epi*-clusianona, derivado de *Garcinia brasiliensis*, em linhagens de células tumorais de mama humanas, Hs 578T e MCF-7, em dois modelos de culturas diferentes: monocamada e esferoide.

- ✓ Estabelecer e caracterizar a cultura tridimensional de esferoides da linhagem Hs 578T;
- ✓ Determinar o IC₅₀ do composto 7-*epi*-clusianona sobre as linhagens estudadas;
- ✓ Avaliar o efeito do composto sobre a proliferação celular;
- ✓ Avaliar o efeito do composto sobre o ciclo celular, morte celular programada e senescência celular, em monocamada e esferoide;
- ✓ Avaliar o efeito do composto na organização do citoesqueleto;
- ✓ Avaliar o efeito do composto sobre a morfologia das células cultivadas em monocamada e esferoides.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células em monocamada e tridimensional (3D)

As linhagens celulares Hs 578T e MCF-7 derivadas de tumor de mama humano, apresentam diferentes graus de malignidade, sendo a Hs 578T mais agressiva e negativa para os receptores de estrógeno em relação a MCF-7, menos agressiva e positiva para os receptores de estrógeno. Ambas foram obtidas da ATTC (*American Type Culture Collection*) (Manassas, VA, EUA) através do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para as culturas em monocamada (garrafas de 25 mL), ambas as linhagens foram mantidas em estufa com umidade e atmosfera controlada (37 °C; 5% CO₂) e cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Minimum Essential Medium* (DMEM, Sigma, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (DMEM/SFB 10%), (Cultilab, São Paulo, Brasil).

As culturas tridimensionais de esferoides foram obtidas a partir das células cultivadas em monocamada, seguindo o protocolo estabelecido por Amaral et al. (2011). Brevemente, as células cultivadas em monocamada foram submetidas a uma dissociação enzimática com uma solução de tripsina 0,2% + EDTA 0,02% (ácido etilenodiamino tetra-acético) (tripsina/EDTA). Após a neutralização da ação da tripsina com DMEM/SFB 10%, as células foram contadas em citômetro de fluxo *Guava EasyCycle mini* (Millipore Biosciences Tescicula, CA, EUA) e 4×10^5 células foram inoculadas em placas de Petri com 60 mm de diâmetro, diluídas em 5 mL de DMEM/SFB 10%. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37 °C por 24 horas. Após esse período, as células foram ressuspensas cuidadosamente com micropipetador (1000 mL), para soltar as células que estavam aderidas. Então, as placas foram colocadas novamente na estufa.

A cada 48 horas, a partir do dia do plaqueamento, o meio foi trocado e para isso os esferoides foram transferidos das placas para tubos de fundo cônico de 15 mL. Depois de aproximadamente 10 minutos, pelo processo de sedimentação, os esferoides eram encontrados no fundo do tubo. Então, o meio foi retirado e os esferoides foram ressuspensos com meio de cultura fresco e transferidos para novas placas (figura 03). As imagens das culturas foram obtidas pelo microscópio de

luz invertido digital EVOS AME-3302 (Aeleusden, Holanda). Todos os experimentos com os esferoides foram realizados a partir do sétimo dia de cultivo.

Figura 03 – Esquema de troca de meio dos esferoides (modificado de RIZZO, 2015).

3.2 7-*epi-clusianona*

O composto 7-*epi-clusianona* é derivado de *Garcinia brasiliensis*, o qual foi isolado e purificado a partir do extrato hexânico de epicarpo (ALVES et al., 1999). O referido composto trata-se de uma benzofenona tetraprenilada, cuja estrutura química foi determinada por diferentes métodos espectroscópicos (ALVES et al., 1999; MURATA et al., 2008). Alíquotas diluídas em DMSO na concentração de 20 mM, foram gentilmente cedidas pelo professor Doutor Marcelo Henrique dos Santos da Universidade Federal de Viçosa.

3.3 Curva de crescimento: monocamada

As células Hs 578T e MCF-7 foram cultivadas em placas de Petri de 35 mm, com densidade inicial de 1×10^4 células por placa. As células foram submetidas a dissociação enzimática com a solução tripsina (0,05%) / EDTA (0,2%) e o número de células foi determinado no 2º, 4º, 6º, 8º, 10º e 12º dia após o plaqueamento. Os

experimentos foram realizados em triplicata. As células foram quantificadas por meio do citômetro de fluxo *Guava EasyCycle mini* (Millipore Biosciences Tescula, CA, EUA).

3.4 Teste de viabilidade celular: monocamada

O kit CellTiter 96® (Promega) foi utilizado para determinar o índice de citotoxicidade que inviabiliza 50% das células na cultura (IC₅₀), do composto 7-*epi*-clusianona. Resumidamente, 3×10^4 células foram plaqueadas em cada poço contendo 100 µL de DMEM/SFB 10% numa placa de 96 poços. Depois de 24 horas, várias concentrações (5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM e 25 µM) de 7-*epi*-clusianona foram adicionadas. Após 48 horas de tratamento com a droga, 20 µL da solução MTS (sal de tetrazólio) foi adicionada em cada poço e a placa foi novamente incubada por 4 horas. O controle negativo para esse experimento foram células somente em DMEM/SFB 10% livre de droga (controle de células viáveis) e para o controle positivo as células foram submetidas a tratamento hipotônico (células inviáveis). Sabendo que o ensaio de MTS é um teste colorimétrico, o meio de cultura que as células lisadas utilizaram foi utilizado como branco. O resultado foi obtido num leitor de placa ELISA (Biotek) medindo-se a absorbância em 490 nm e analisados pelo programa PRISMA GraphPad®. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental.

O teste de viabilidade celular ainda não está padronizado para o sistema tridimensional de esferoides multicelulares, e levando em consideração alguns resultados de outras pesquisas que mostraram maior resistência a drogas para esse tipo de cultura, as concentrações utilizadas para os testes com os esferoides foram de 20 µM e 40 µM (para alguns experimentos) para Hs 578T e 6 µM e 12 µM para a MCF-7.

3.5 Densidade celular após tratamento com 7-*epi*-clusianona: monocamada

As células Hs 578T e MCF-7 foram cultivadas em placas de Petri de 35 mm, com densidade inicial de 1×10^4 células por placa em 2 mL de DMEM/SFB 10%. Após 24 horas do plaqueamento, as células receberam tratamento com 7-*epi*-clusianona, 10 µM e 20 µM para Hs 578T; 3 µM e 6 µM para MCF-7. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 1 mL PBSA e

submetidas a dissociação enzimática com a solução tripsina/EDTA (500 µL) para dissociação das células. Foi adicionado 500 µL de DMEM/SFB 10% para inativação da tripsina, essa suspensão foi cuidadosamente homogeneizada e 500 µL foi utilizado para determinar o número de células por placa após o tratamento. As células foram quantificadas por meio do citômetro de fluxo *Guava EasyCycle mini* (Millipore Biosciences Tescilla, CA, EUA). Os outros 500 µL foram fixados para quantificação de DNA por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6 Ciclo celular após tratamento com 7-*epi*-clusianona: monocamada e esferoides

As células, cultivadas em monocamada, foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^4 , sendo submetidas aos tratamentos (10 µM e 20 µM para Hs 578T; 3 µM e 6 µM para MCF-7). Após determinados períodos de tratamento (24, 48 e 72 horas), o DMEM/SFB 10% foi retirado e transferido para um tubo de 15 mL, assim como o PBSA que foi utilizado para retirar os resíduos de SFB, então a suspensão de células foi obtida por digestão enzimática com tripsina/ EDTA e também foi transferida para o mesmo tubo de 15 mL com fundo cônico. As células foram centrifugadas por 8 minutos a 1000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas em 1 mL de PBSA, e submetidas a nova centrifugação (8 minutos a 1000 rpm), o sobrenadante foi descartado e foi adicionado aos tubos com as células metanol 75% gelado, por no mínimo 1 hora a 4 °C. Após esse período as células foram novamente submetidas a centrifugação por 8 minutos a 1000 rpm, sendo lavadas em 1 mL de PBSA e submetidas novamente a centrifugação. As células foram coradas por 1 hora (PBSA, 3 mg/mL RNAase e 30 µg/mL de iodo de propídeo). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo *Guava EasyCycle mini* (Millipore Biosciences Tescilla, CA, EUA).

Foi realizado ciclo celular somente com os esferoides da linhagem MCF-7. Os esferoides foram cultivados por 7 dias, no sétimo dia foram submetidos a tratamento com 6 µM e 12 µM de 7-*epi*-clusianona por 48 horas. A partir deste ponto, a técnica foi a mesma da monocamada, exceto que para melhor dissociação das células no esferoide, a cada 2 minutos a suspensão células + tripsina/EDTA era ressuspensas cuidadosamente.

3.7 Ensaio de detecção de caspase-9: monocamada e esferoides

Após dissociação enzimática das células em monocamada e dos esferoides, as células foram ressuspensas em 1×10^5 células/mL. Foi adicionado 10 μ L de *Caspase Reagent Working Solution* (Guava Technologies) à suspensão de células. Depois de 1 hora de incubação a 37 °C foram adicionados 100 μ L de $1 \times$ *Apoptosis Wash Buffer* em cada amostra, seguido de centrifugação a 300 G por 7 minutos. As células foram ressuspensas em 200 μ L de *Caspase 7-AAD Working Solution*. Depois de 10 minutos em temperatura ambiente e no escuro, as amostras foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo *Guava EasyCycle mini* (Millipore Biosciences Tescicula, CA, EUA). Todos os reagentes descritos neste item são parte do *Guava Caspase Kit* (Millipore®).

3.8 Preparações de RNA e qRT-PCR: monocamada e esferoides

A extração de RNA das linhagens estudadas foi feita com ChargeSwitch Total RNA Cell Kit. O RNA foi quantificado utilizando o aparelho NanoDrop ND1000 Spectrophotometer. Os níveis de expressão foram determinados por reações de RT-PCR em tempo real em um aparelho da Corbett Research modelo Rotor Gene 6000 real-time cycler, o kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Ambion) e Sybr-Green (Invitrogen). As condições dos qRT-PCR foram 45 °C por 10 min; 95 °C por 15 min, 40 ciclos [95 °C por 15 seg; 52 °C por 20 seg; 72 °C por 30 seg], seguindo então o *melt*. Os primers utilizados constam na tabela 01. A normalização foi feita pelo RNA total (BUSTIN, 2000, 2002).

Tabela 01 – Sequências dos primers usados para o PCR em tempo real.

Primer/Sequência	TM (°C)
CyclinD1_right: TTTCTTCTTGACTGGCACGC	55
left: TTTGTTGTGTGTGCAGGGAG	
P53_right: TTGCGGAGATTCTCTTCCTCTGTG	59
left: ATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGC	
Ncad_right: GACGGTTCGCCATCCAGAC	55
left: TCGATTGGTTTGACCACGG	

Ecad_right: AAAGTGATGACCTCCCATGC
55
left: TACCTGCTCACGTCAAATGC

3.9 Western Blotting: monocamada e esferoides

As células cultivadas em monocamada foram lavadas três vezes com PBSA e depois lisadas em tampão RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1,0%, ácido deoxicolato de sódio 0,5% em Tris 50 mM-HCl, pH=7,5) contendo uma mistura com inibidores de proteases e fosfases (NaF e ortovanadato) (Sigma-Aldrich). Para a extração das proteínas dos esferoides, eles foram transferidos das placas para tubos de 15 ml e submetidos a centrifugação, 1000 rpm por 5 minutos. O meio foi retirado e foi adicionado 1 mL de PBSA e então submetidos novamente à centrifugação. Então o PBSA foi retirado e os esferoides foram lisados também em tampão RIPA. Os esferoides foram misturados ao tampão RIPA com auxílio de uma pipeta, até verificar a completa dissociação de suas células. Os lisados, tanto da monocamada quanto dos esferoides (separadamente), foram transferidos a tubos de 2 mL de fundo cônico. Os lisados provenientes de ambos os tipos de culturas celulares foram sonicados por 2 segundos a uma amplitude de 20% e, em seguida, centrifugados a 12000 G por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para quantificação das proteínas.

As proteínas foram quantificadas através do método de BCA (Pierce Inc Rockford, IL, EUA). A leitura da absorbância foi realizada por leitor de placa ELISA (Biotek), utilizando o filtro de 595 nm. Em seguida, foram diluídas em tampão de amostra contendo 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6,8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol e fervidas por 5 minutos. Foi carregado 30 µg de proteína por poço, que foram separadas em gel de poli-acrilamida 10% (preparado com 1,5 M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Foi realizada eletroforese seguindo o método SDS-PAGE. O padrão de peso molecular utilizado foi o *Precision Plus Standards-Dual Color* (Bio-Rad).

Após a separação, as proteínas foram transferidas (100 V, 250 mA por 2 horas) para membrana de PVDF (Amersham Bioscience, GE). Após a transferência as proteínas da membrana foram coradas com solução de *Ponceau* 0,5% por 3 minutos

para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes em TBS (0,02 M) por 10 minutos.

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em TBS-tween (TTBS) por 1 hora. As membranas contendo proteínas fosforiladas foram bloqueadas em 5% de soro albumina bovina (BSA), diluído em TTBS por 30 minutos, com inibidores de fosfatase e o bloqueio foi seguido de duas lavagens com TTBS.

As membranas foram incubadas com os anticorpos, descritos na tabela 02, diluídos em solução de bloqueio, por 12 horas a 4 °C sob agitação. No caso das membranas contendo proteínas fosforiladas, a incubação dos anticorpos foi em TTBS. Após 4 lavagens intercaladas com TBS e TTBS de 10 minutos cada, a membrana foi incubada com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (1:1000) (Kit ECL, Amersham, GE), lavada novamente e revelada por quimioluminescência (ECL, Amersham, GE) conforme especificações do fabricante. Os resultados obtidos foram registrados em filme radiográfico Hyperfilm (Amersham, GE).

Tabela 02 - Anticorpos utilizados nos experimentos de *Western blotting*.

Anticorpo/Empresa/Breve Descrição	Concentração
Actina (camundongo) / Sigma Anti- β -Actina (A2228) - marca a actina	1:2000
Akt 1,2,3 (coelho) / Santa Cruz Biotechnology (sc 8312) - marca a Akt total 1, 2 e 3.	1:400
Akt fosfo 1,2,3 (coelho) / Santa Cruz Biotechnology (sc 7985-R) - marca Ser 473 fosforilada de Akt1, Ser 474 fosforilada de Akt2 e a Ser 472 de Akt3.	1:300
Ciclina D1 (camundongo) / Santa Cruz Biotechnology cyclin D1 (A-12) sc-8396 - marca a cadeia completa de aminoácidos da ciclina D1 humana	1:500
E-caderina (coelho) / Santa Cruz Biotechnology E-cadherin (H-108) sc-7870 - Marca a E-caderina	1:200
ERK 1 (coelho) / Santa Cruz Biotechnology (sc 93)	1:2000

- marca a região C-terminal de ERK 1 total.		
ERK fosfo (camundongo) / Santa Cruz Biotechnology (sc 7383)		1:500
- marca uma sequência de aminoácidos contendo a tirosina fosforilada Tyr 204 de ERK 1.		
PCNA (camundongo) / Abcam Inc. (PC10) ab29		1:1000
- marca o antígeno de proliferação celular (PCNA)		
p53 (camundongo) / Sigma Anti-p53 (P5813)		1:300
-marca a proteína p53		

3.10 Ensaio de detecção de β -galactosidase: monocamada

O ensaio de senescência celular por detecção de β -galactosidase foi realizado de acordo com o protocolo do kit *Senescence β -Galactosidase Staining* (código #9860 - Cell Signaling TECHNOLOGY®).

As células Hs 578T e MCF-7 foram plaqueadas 1×10^5 por poço em placa de 6 wells contendo lamínula, 24 horas após plaqueamento as células receberam tratamento com 7-*epi*-clusianona (10 μ M e 20 μ M para Hs 578T; 3 μ M e 6 μ M para MCF-7). Após 48 horas de tratamento, as células foram lavadas uma vez com PBSA e foi adicionado 1 mL de *fixative solution* (1 X) por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas uma vez com PBSA. Então, foi adicionado 1 mL de *β -galactosidase staining solution* por placa. A placa recebeu vedação completa com *parafilm* e foi incubada numa estufa a 37 °C *overnight*.

As lâminas foram montadas com 8 μ L de glicerol 70% e as imagens foram adquiridas com microscópio de fluorescência Optiphot-2 Nikon. A quantificação de células senescentes (que apresentavam coloração azul na região perinuclear) foi feita com *software* ImageJ®.

3.11 Microscopia de luz digital e invertida

Todas as imagens digitais desse trabalho, tanto das culturas em monocamada e também dos esferoides, foram obtidas por microscopia de contraste de fase usando microscópio invertido digital EVOS AME-3302 (Aeleusden, Holanda).

3.12 Imunofluorescência para lâmina B1

As células foram plaqueadas (1×10^5 células/35 x 11 mm placa) e mantidas em cultura por até 72 horas. Vinte e quatro horas após o plaqueamento as células foram tratadas com diferentes concentrações de 7-*epi*-clusianona (10 μ M e 20 μ M para Hs 578T; 3 μ M e 6 μ M para MCF-7). Após 48 horas de tratamento, as células foram lavadas em PBSA e fixadas em formaldeído a 3,7% por 30 minutos. Após três lavagens de cinco minutos cada em PBSA, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% por 15 minutos. Após novas lavagens em PBSA, as células foram tratadas com ribonuclease (RNAse 10 mg/mL) por 40 minutos, em seguida foram realizadas mais lavagens. Então as células foram incubadas *overnight* em temperatura ambiente com o anticorpo primário anti-Lâmina B1 (1:100, Abcam - 16048). Após nova bateria de lavagens, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a FITC para ambos primários por 90 minutos, seguido de novas lavagens as células foram novamente incubadas com faloidina 633 *Alexa Fluor* (Invitrogen®) para análise do citoesqueleto de actina. O núcleo foi contracorado com iodeto de propídeo (10 μ g/mL) e as lâminas foram montadas em Vectashield Vector. As imagens foram obtidas com *Laser Scanning Confocal Microscopy* (Zeiss- LSM510).

3.13 Medida da área dos esferoides

Imagens digitais dos esferoides foram obtidas com microscópio invertido digital EVOS AME-3302 (Aeleusden, Holanda). Foram adquiridas imagens nos dias 1, 4 e 7, após o plaqueamento dos esferoides das linhagens Hs 578T e MCF-7. Um total de 30 imagens foram adquiridas de cada linhagem. Utilizando o *software* Axio Vision SE64 Rel. 4.9.1, foi determinada a área dos esferoides.

3.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após a retirada do meio de cultura, os esferoides foram lavados com uma solução de tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e fixados com a solução de glutaraldeído 2,5% com formaldeído 2%. Após 2 horas a temperatura ambiente, o fixador foi retirado e o material passou por 3 banhos de 5 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após este processo iniciou-se a pós-fixação com uma

solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Os esferoides foram lavados em água destilada e seguiram para uma gradual desidratação etílica de 15 minutos cada banho (50, 70, 80, 90 e 2 x 100% etanol).

Na etapa final da desidratação o material ficou imerso em óxido de propileno durante 10 minutos (2 banhos de 5 minutos), seguindo para um banho de uma mistura de resina Epon® (Electron Microscopy Science, PA, EUA) mais óxido de propileno (1:1) durante 5 horas. A mistura foi substituída por resina Epon® pura, permanecendo as células nesta solução por mais 5 horas. A inclusão das células foi feita em formas de silicone preenchidas com a mesma resina, sendo esta polimerizada após 72 horas em estufa a 65 °C.

Após o desbaste dos blocos de resina, foram feitos cortes em ultramicrotomo com espessura de 0,5 µm, sendo estes montados em lâmina de vidro, corados com azul de toluidina e visualizados ao microscópio de luz. Escolhida a região de interesse no bloco, foram feitos cortes na espessura de 70 a 90 nm, sendo posteriormente colocados em telas de cobre (200 *mesh*). O material foi contrastado em uma solução de acetato de uranila a 4% por 30 minutos, posteriormente lavados em água e colocados em uma solução de citrato de chumbo a 10%. Após serem novamente lavados, retirou-se o excesso de água destilada e as telas de cobre foram acondicionadas em um porta-telas e mantidas em ambiente resfriado (geladeira, 4 °C). O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol® (Queensland, Brisbane, Austrália) 1010 (80 kV).

4 RESULTADOS

4.1 Curvas de crescimento

Foram realizadas as curvas de crescimento da linhagem Hs 578T e MCF-7 para determinação da densidade inicial para os experimentos seguintes (figura 04). Ambas as curvas apresentam fase de crescimento exponencial, embora a linhagem Hs 578T cresça mais lentamente do que a MCF-7, as densidades iniciais sempre foram iguais para as duas linhagens, isso porque morfologicamente as células Hs 578T são maiores que as MCF-7.

Figura 04 – Curvas de crescimento das linhagens Hs 578T e MCF-7.

4.2 Efeitos do 7-*epi*-clusianona sobre a viabilidade celular

O efeito citotóxico do composto 7-*epi*-clusinona foi avaliado em diferentes concentrações (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M e 25 μ M), sobre as células em cultura derivadas de tumores de glândula mamária, o que nos permitiu encontrar a faixa de concentração que foi utilizada nos demais experimentos. O ensaio de MTS demonstrou que o IC₅₀ (índice de citotoxicidade) para a linhagem Hs 578T determinado pelo é 20 μ M, sendo que para a linhagem MCF-7 é 6 μ M (figura 05). Portanto, as concentrações utilizadas para os experimentos com a cultura em monocamada foram: 20 μ M e 10 μ M para Hs 578T e 3 μ M e 6 μ M para MCF-7 (IC₅₀ e metade do mesmo).

Figura 05 – Citotoxicidade de 7-*epi*-clusianona sobre células Hs 578T e MCF-7. As células foram tratadas com concentrações crescentes de 7-*epi*-clusianona por 48 horas (IC₅₀ de 20 μ M para Hs 578T e 6 μ M para MCF-7). A citotoxicidade foi determinada por teste colorimétrico, MTS, em que a intensidade de cor é proporcional ao número de células viáveis.

4.3 Ação do 7-*epi*-clusianona sobre a proliferação celular

O efeito sobre a proliferação celular foi inicialmente avaliado pela contagem das células submetidas a tratamento com 7-*epi*-clusianona por 24, 48 e 72 horas. O número inicial de células por placa foi 1×10^4 (placa de 35 mm). Em 24 horas de cultura após plaqueamento, a linhagem Hs 578T controle aumentou para $7,32 \times 10^4$ células por placa, enquanto os grupos tratados nas duas concentrações apresentou 5×10^4 células por placa (figura 06). A linhagem MCF-7 controle apresentava $8,32 \times 10^4$ em 24 horas após plaqueamento, enquanto que os grupos tratados cresceram menos, 6×10^4 células por placa em ambos tratamentos. É importante ressaltar que somente as células que ainda permaneciam aderidas à placa de cultura antes da degradação enzimática com tripsina foram contadas (figura 07).

Os grupos que ficaram sob tratamento por 48 horas apresentaram maiores diferenças em relação ao número de células. Em 48 horas o grupo controle da Hs 578T atingiu $17,93 \times 10^5$ células por placa, sendo que no tratamento com $10 \mu\text{M}$ de 7-*epi*-clusianona apresentou diferença brusca no número de células por placa (9×10^4) e essa diminuição no número de células foi maior no tratamento de $20 \mu\text{M}$, $8,13 \times 10^4$ células por placa (figura 06). A linhagem MCF-7 em 48 horas no grupo controle atingiu $16,6 \times 10^4$ células por placa, enquanto que no grupo tratado com $3 \mu\text{M}$ $12,11 \times 10^4$ células por placa, a diferença foi ainda mais expressiva no grupo tratado com $6 \mu\text{M}$ ($4,37 \times 10^4$ células por placa) (figura 07).

Em 72 horas a linhagem Hs 578T entrou em confluência, ou seja, o controle permaneceu em 17×10^4 células por placa, o grupo tratado com $10 \mu\text{M}$ de 7-*epi*-clusianona 10×10^4 células por placa e com $20 \mu\text{M}$ houve diminuição do número de células por placa ($7,34 \times 10^4$), isso pode ser um indício de indução de morte celular (figura 06). Nas 72 horas de tratamento, o controle da linhagem MCF-7 foi o que mais apresentou diferenças em relação ao número de células por placa, que em 48 horas foi de $16,6 \times 10^4$ e em 72 horas passou para $26,6 \times 10^4$ células por placa, enquanto o grupo tratado com $3 \mu\text{M}$ $15,18 \times 10^4$ e na maior concentração do composto para esta linhagem $5,18 \times 10^4$ células por placa (figura 07).

Figura 06 - Efeito do composto 7-*epi*-clusianona sobre a proliferação celular de células Hs 578T. As células (1×10^4 células/placa) foram plaqueadas e após 24 horas receberam tratamento com diferentes concentrações de 7-*epi*-clusianona (10 µM e 20 µM). O número de células foi contado após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Figura 07 - Efeito do composto 7-*epi*-clusianona sobre a proliferação celular de células MCF-7. As células (1×10^4 células/placa) foram plaqueadas e após 24 horas receberam tratamento com diferentes concentrações de 7-*epi*-clusianona (3 µM e 6 µM). O número de células foi contado após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

4.4 Ação do 7-*epi*-clusianona sobre o ciclo e a morte celular

Considerando que houve efeito sobre o número de células, fomos investigar qual seria o efeito do tratamento sobre o ciclo celular e depois a morte celular. As células Hs 578T quando submetidas ao tratamento com 7-*epi*-clusianona, nas duas concentrações, 10 μ M e 20 μ M por 24 horas apresentaram aumento de 10% na população de células na fase G1/G0 comparadas com o grupo controle (figura 08 A), e diminuição da frequência ou número de células em fase S e G2/M nas duas concentrações do composto. A linhagem MCF-7 (figura 08 B) nas primeiras 24 horas de tratamento demonstrou pequena diminuição da quantidade de células em fase S quando comparadas ao grupo controle nas duas concentrações (17%, 14% e 10%; controle, 3 μ M e 6 μ M respectivamente).

Em 48 horas de tratamento na linhagem Hs 578T, o aumento das células em fase G1/G0 foi de 54% no grupo controle para 61% nas células tratadas com 10 μ M, sendo que nas células tratadas com 20 μ M de 7-*epi*-clusianona, a retenção de células em fase G1/G0 foi ainda mais expressiva, 80% (figura 09 A). Logo, no grupo tratado com a maior concentração do composto, a frequência das células nas outras fases do ciclo celular estava diminuída. O perfil de ciclo celular das células MCF-7 que foram submetidas a 48 horas de tratamento com 7-*epi*-clusianona também demonstrou que as duas células sofrem bloqueio de ciclo celular em fase G1/G0 (figura 09 B). Houve aumento de 10% na frequência de células em fase G1/G0 nos dois grupos de tratamento, tanto em 3 μ M quanto em 6 μ M, consequentemente houve diminuição das células em fase S e G2/M.

Após 72 horas de tratamento com o composto 7-*epi*-clusianona houve aumento de 14,4% de células em G1/G0 no grupo tratado com 20 μ M em relação ao grupo controle para as células Hs 578T (figura 10 A). Para a linhagem MCF-7 a porcentagem de células em G1/G0 no período de 72 horas de tratamento foi ainda mais abundante, 48%, 54% e 74%, controle, 3 μ M e 6 μ M respectivamente (figura 10 B). Isso indica que para a linhagem MCF-7, o aumento da frequência de células em G1/G0 é tempo-dependente, logo quanto maior o tempo de tratamento com o composto, mais células são retidas na fase G1/G0 nesta linhagem.

Figura 08 - Ação do composto 7-*epi*-clusianona sobre o perfil de ciclo celular em 24 horas. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento. Células Hs 578T (A) e células MCF-7 (B).

Figura 09 - Ação do composto 7-*epi*-clusianona sobre o perfil de ciclo celular em 48 horas. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento. Células Hs 578T (A) e células MCF-7 (B).

Figura 10 - Ação do composto 7-*epi*-clusianona sobre o perfil de ciclo celular em 72 horas. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo após 72 horas de tratamento. Células Hs 578T (A) e células MCF-7 (B).

Para saber se o composto *7-epi-clusianona* poderia aumentar a frequência de células em G1/G0 na linhagem MCF-7 cultivada em 3D, avaliamos também o perfil de ciclo celular dos esferoides após 7 dias de cultivo. Os esferoides da linhagem MCF-7 foram tratados com 6 μ M e 12 μ M por 48 horas. Como ilustrado na figura 11, foi possível notar que não houve aumento na frequência de células em fase G1/G0, como seria esperado de acordo com os resultados em monocamada. Esse dado indica que os esferoides da linhagem MCF-7 não são sensíveis ao composto nas concentrações utilizadas (6 μ M e 12 μ M). Não foi possível analisar o efeito do composto sobre os esferoides da linhagem Hs 578T, pois cultivadas tridimensionalmente, as células não sofrem dissociação enzimática com tripsina/EDTA 0,05%. Mesmo aumentando a concentração da solução de tripsina/EDTA para 0,5%, não obtivemos sucesso, pois os esferoides ainda permaneciam íntegros.

Afim de avaliar a capacidade do composto *7-epi-clusianona* de induzir morte celular, foi realizado o ensaio de detecção de caspase-9 por citometria de fluxo, os resultados mostraram que o composto não foi capaz de induzir morte celular de ambas linhagens cultivadas em monocamada. Este ensaio também mostra se as células morreram por necrose, entretanto, nenhum tipo de morte celular foi encontrado em decorrência do tratamento com *7-epi-clusianona* nas linhagens Hs 578T e MCF-7 (figura 12). O ensaio de detecção de caspase-9 com os esferoides da linhagem MCF-7 sob tratamento com *7-epi-clusianona* também foi realizado. Os resultados indicam que o composto induziu aumento de aproximadamente 10% da população de células em morte tardia (apoptose tardia) em relação ao grupo controle (figura 13).

Figura 11 - Ação do composto 7-*epi*-clusianona sobre o perfil de ciclo celular em esferoides de células MCF-7. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento, em esferoides com 7 dias de cultivo.

Figura 12 - Efeito do composto 7-*epi*-clusianona sobre indução de morte celular: monocamada. As células Hs 578T e MCF-7 foram tratadas por 48 horas e depois submetidas ao ensaio de detecção de caspase-9. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo.

Figura 13 - Efeito do composto 7-*epi*-clusianona sobre indução de morte celular: esferoides. Os esferoides da linhagem MCF-7 foram tratados por 48 horas e depois submetidos ao ensaio de detecção de caspase-9. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo.

4.5 Análise do perfil de expressão gênica das células sobre ação do 7-*epi*-clusianona

O PCR em tempo real foi realizado para determinar a quantidade de cópias de RNA mensageiro de ciclina D1, p53, caderina-E e caderina-N nas culturas em monocamada e esferoides, sendo que o RNA total foi extraído após 24 horas de tratamento com 7-*epi*-clusianona.

Houve diminuição dos níveis de ciclina D1 nas células Hs 578T em monocamada tratadas com 10 μ M em relação ao controle, para a linhagem MCF-7 também houve diminuição dos níveis de RNA mensageiro de ciclina D1 em ambos os tratamentos em relação ao controle. Nos esferoides da linhagem Hs 578T os níveis de RNA mensageiro parecem ter aumentado em relação ao controle, porém, para a linhagem MCF-7 houve uma sutil diminuição dos níveis de mensageiro (figura 14).

O nível de RNA mensageiro de p53 aumentou no grupo tratado com 20 μ M em relação ao grupo controle da linhagem Hs 578T em monocamada, mas para as células MCF-7 não houve diferenças entre grupos tratados e controle em monocamada. Nos esferoides da linhagem Hs 578T, os níveis de expressão do RNA mensageiro de p53 no grupo tratado com 7-*epi*-clusianona parecem ter aumentado em relação ao grupo controle da mesma linhagem, assim como o grupo de esferoides tratados com 12 μ M da linhagem MCF-7 também aumentaram os níveis de RNA mensageiro de p53 (figura 14).

Com relação aos níveis de expressão das proteínas de adesão, para as células Hs 578T cultivadas em monocamada houve aumento gradual na expressão de RNA mensageiro de caderina-E decorrentes do tratamento com 7-*epi*-clusianona, ou seja, quanto maior o tratamento, mais a célula expressava esse RNA. Contudo, para a linhagem MCF-7 houve diminuição gradativa decorrente do tratamento com o composto, ou seja, quanto mais concentrada estava a droga, menos a célula produzia RNA mensageiro de caderina-E. Ambas as linhagens, Hs 578T e MCF-7 em monocamada, expressam níveis basais de caderina-N, porém, o tratamento com 20 μ M de 7-*epi*-clusianona induziu a células Hs 578T a expressarem altas quantidades de caderina-N. Nos esferoides de ambas as linhagens, os níveis de expressão de caderina-E aumentaram nos grupos tratados com o composto. Enquanto que os níveis de expressão de caderina-N aumentaram sutilmente nos grupos tratados com 7-*epi*-clusianona (figura 15).

Figura 14 – Expressão gênica relativa de ciclina D1 e p53 sobre ação do composto 7-epi-clusianona em monocamada e esferoides. Controle: células em meio livre de droga. Hs 578T - T1: monocamada/10 μ M; esferoide/20 μ M; T2: monocamada/ 20 μ M; MCF-7 – T1: monocamada/ 3 μ M; esferoide/ 6 μ M; T2: monocamada/ 6 μ M; esferoide/ 12 μ M.

Figura 15 – Expressão gênica relativa de proteínas de adesão sobre ação do composto 7-epi-clusianona em monocamada e esferoides. Controle: células em meio livre de droga. Hs 578T - T1: monocamada/10 μ M; esferoide/20 μ M; T2: monocamada/ 20 μ M; MCF-7 – T1: monocamada/ 3 μ M; esferoide/ 6 μ M; T2: monocamada/ 6 μ M; esferoide/ 12 μ M.

4.6 Análise do perfil de expressão proteica das células sobre ação do 7-*epi*-clusianona

Os resultados indicam que o composto 7-*epi*-clusianona é capaz de diminuir a proliferação celular bloqueando as células numa fase específica do ciclo celular, G1/G0. *Western blotting* foi utilizado para detectar os níveis de expressão proteica de p-ERK, ERK total, PCNA e caderina-E nas linhagens Hs 578T e MCF-7, nos dois modelos propostos neste estudo: 2D e 3D, tratadas com 7-*epi*-clusianona (figura 16). Os resultados indicam que houve diminuição de p-ERK nos seguintes grupos: Hs 578T 20 μ M 2D e 3D, o grupo 2D da linhagem MCF-7 não apresenta p-ERK, para o grupo 3D a quantidade desta proteína foi constante. ERK total manteve-se constante em todos os grupos de estudo. Os níveis de expressão proteína de PCNA aumentaram apenas no grupo controle 3D da linhagem MCF-7, em relação aos outros grupos de tratamento, assim como da outra linhagem. A proteína caderina-E foi utilizada também para auxiliar na caracterização dos esferoides. Não foi detectada a expressão dessa proteína na linhagem Hs 578T, enquanto que a mesma está aumentada nas culturas controle 3D da linhagem MCF-7. A proteína β -actina foi utilizada como controle de *loading*.

De acordo com os resultados obtidos, foi visto que o composto interfere na proliferação das células Hs 578T e MCF-7, porém não foi detectada alteração no nível de expressão das proteínas relacionadas as vias de proliferação que foram analisadas. A análise do perfil de conteúdo de DNA explicou porque o número de células diminuía nos grupos tratados com o composto 7-*epi*-clusianona, essas células estavam bloqueadas em fase G1/G0 do ciclo celular.

Portanto, fomos investigar se havia alteração nos níveis proteicos de ciclina D1, p53, Akt fosforilada, Akt total. Somente as células cultivadas em monocamada foram analisadas, visto que não houve aumento na frequência de células em fase G1/G0 nos esferoides.

Não há níveis detectáveis de ciclina D1 na linhagem Hs 578T, mas há níveis baixos dessa proteína no grupo controle da linhagem MCF-7. A proteína p53 manteve-se constante em todos os grupos da linhagem Hs 578T, enquanto que na linhagem MCF-7 houve aumento de expressão dessa proteína nos grupos tratados, se compararmos com o grupo controle desta mesma linhagem. Akt fosforilada só está presente no grupo controle da linhagem Hs 578T, ausente em todos os demais grupos

Hs 578T tratadas e MCF-7 controle e tratados. A proteína Akt total também se apresenta somente no grupo controle da linhagem Hs 578T, mas não foi detectada nos tratamentos. Entretanto, pudemos observar baixos níveis de expressão dessa proteína em todos os grupos da linhagem celular MCF-7. A proteína β -actina foi utilizada como controle de *loading* (figura 17).

Figura 16 - Níveis de expressão de proteínas envolvidas com a via de proliferação e adesão em células Hs 578T e MCF-7 cultivadas em 2D e 3D após tratamento com 7-*epi*-clusianona. Houve diminuição de ERK fosforilada nos grupos tratados com 20 μ M das células Hs 578T cultivadas em 2D e 3D. Não houve diferenças nos níveis de ERK total em nenhum grupo de tratamento. Houve aumento na expressão de PCNA nas células MCF-7 cultivadas em 3D em relação àquelas cultivadas em monocamada; tal efeito não foi observado nas células Hs 578T. Os níveis de caderina-E aumentam nas células MCF7 cultivadas em 3D e o tratamento com 7-*epi*-clusianona parece diminuir esses níveis. Não houve detecção de caderina-E na linhagem Hs 578T, mesmo no modelo 3D. A expressão de β -actina foi usada como controle de *loading*.

Figura 17 - Níveis de expressão de proteínas envolvidas com o ciclo celular em células Hs 578T e MCF-7 cultivadas em monocamada após tratamento de 24 horas com 7-*epi*-clusianona. Não foi detectada ciclina D1 na linhagem Hs 578T, mas há níveis baixos dessa proteína na linhagem MCF-7 no grupo controle que diminui com o tratamento. Não houve diferenças nos níveis de p53 nas células Hs 578T. Houve aumento na expressão de p53 nas células MCF-7 tratadas. Akt fosforilada encontrada apenas em Hs 578T controle, assim como Akt total para esta linhagem. Não houve diferença nos níveis Akt total nas células MCF-7. A expressão de β -actina foi usada como controle de *loading*.

4.7 Efeitos do composto 7-*epi*-clusianona sobre a senescência celular

O ensaio de detecção de β -galactosidase foi realizado para identificar a presença de células senescentes nas culturas tratadas com 7-*epi*-clusianona, cultivadas em monocamada. Os resultados indicam que o número de células senescentes aumentou, em ambas linhagens, nos grupos tratados com o composto em relação ao grupo controle, embora, as células senescentes também estejam presentes nas culturas que não receberam tratamento com 7-*epi*-clusianona. Todas as células com coloração para β -galactosidase foram computadas, porém para confirmar a validade do experimento, as células que apresentavam citoplasma extenso e que geralmente eram multinucleadas, foram utilizadas como controle positivo de senescência celular, pois, essas características são de células que perderam a capacidade de divisão celular (figura 18).

Figura 18 - Efeitos do 7-*epi*-clusianona sobre senescência celular das linhagens Hs 578T e MCF-7 cultivadas em monocamada. A e B – grupo controle de células Hs 578T; C e D células MCF7, grupo controle. Cabeças de setas indicam células senescentes, identificadas pela atividade da enzima β -galactosidase em pH 6, que produz coloração azulada; E – dados quantitativos referentes as células senescentes. Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase. Barras = 100.00 μ m.

4.8 Efeitos do 7-*epi*-clusianona sobre a densidade e morfologia celular: monocamada

A análise das preparações celulares ao microscópio de luz de ambas linhagens celulares cultivadas primeiramente em monocamada, demonstrou que houve grande diminuição da população celular que foi tratada com o composto 7-*epi*-clusianona, dados mostrados na figura 19.

A integridade do núcleo e a organização do citoesqueleto de actina foram analisadas por microscopia confocal de varredura a laser em preparações de imunofluorescência coradas por faloidina-FITC e anti-lamina B1. Foi avaliada a integridade do envoltório nuclear, visto que em preparações de imunofluorescência dos esferoides tratados com 7-*epi*-clusianona foram encontradas alterações na morfologia nuclear (figuras 20, 21), o DNA foi corado com iodeto de propídeo. Não foram encontradas figuras apoptóticas nos grupos controles e tratados de ambas linhagens. Nas células MCF-7 sob tratamento de 3 μ M foi possível observar figuras mitóticas, assim como no grupo controle, enquanto que os outros grupos tratados de ambas linhagens não apresentaram células em mitose. O citoesqueleto de actina não sofreu alterações em sua organização mostrando fibras de estresse mesmo no tratamento com a maior concentração (Hs 578T 20 μ M). Esses resultados indicam que o composto 7-*epi*-clusianona nas concentrações utilizadas nesse trabalho não interfere na integridade nuclear e também não induz alterações morfológicas via microfilamentos.

Figura 19 - Efeitos do 7-*epi*-clusianona sobre densidade celular de Hs 578T e MCF-7 cultivadas em monocamada. As fotomicrografias de luz das linhagens Hs 578T e MCF-7 indicam diminuição na densidade celular nos grupos tratados com 7-*epi*-clusianona em relação aos grupos controles de ambas linhagens. Também é possível observar aumento na frequência de células que se soltam do substrato em resposta ao tratamento (setas). Imagens obtidas ao microscópio invertido de luz. Barras = 400 μ m.

Figura 20 - Efeitos de 7-*epi*-clusianona sobre a integridade nuclear e a organização do citoesqueleto de actina de células Hs 578T. A imunomarcagem para lamina-B1 (verde) mostra que o envoltório nuclear permanece íntegro mesmo nos grupos tratados. As setas indicam células em divisão mitótica. A organização do citoesqueleto de actina foi determinada por coloração com faloidina (azul). Não foram observadas alterações nos grupos tratados em relação aos controles. O DNA foi corado com iodeto de propídeo (vermelho). Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser.

Figura 21 - Efeitos de 7-*epi*-clusianona sobre a integridade nuclear e a organização do citoesqueleto de actina de células MCF-7. A imunomarcagem para lamina-B1 (verde) mostra que o envoltório nuclear permanece íntegro mesmo nos grupos tratados. A seta indica célula em divisão mitótica. A organização do citoesqueleto de actina foi determinada por coloração com faloidina (azul). Não foram observadas alterações nos grupos tratados em relação aos controles. O DNA foi corado com iodeto de propídeo (vermelho). Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser.

4.9 Efeitos do 7-epi-clusianona sobre a morfologia celular: esferoides

Analizamos inicialmente a organização celular dos esferoides. A partir das observações feitas com microscópio de luz invertido observamos que as duas linhagens, Hs 578T e MCF-7, formaram esferoides com formato bem definido e esféricos (figura 22 B, D). Ao microscópio de luz, os esferoides das células Hs 578T são mais densos do que os esferoides da MCF-7 (figura 22 B). Apesar das diferenças morfológicas encontradas nas células em monocamada, Hs 578T tipicamente com formato estrelado (figura 22 A) e a MCF-7 crescendo em domus (figura 22 C) muito próximas umas das outras, não é possível diferenciar os esferoides de ambas linhagens, pois são bastante similares ao microscópio de luz.

Ambas as linhagens apresentam heterogeneidade com relação às dimensões dos esferoides (figura 22 E), sendo que encontramos maior homogeneidade quanto ao tamanho apenas no dia 1 após o plaqueamento (primeiras 24 horas de cultivo). Os esferoides foram analisados ao microscópio eletrônico de transmissão para melhor caracterização de sua organização morfológica. Os cortes semi-finos de aproximadamente 0,5 μm , foram feitos a partir dos blocos para microscopia eletrônica de transmissão. A figura 23 A e D mostra um aspecto geral dos esferoides que evidencia a diferença na organização das células nos esferoides das duas linhagens. Ao maior aumento, a diferença fica mais evidente, sendo que as células dos esferoides da linhagem MCF-7 (figura 23 B) se organizam de forma mais coesa, apresentando figuras mitóticas principalmente na periferia. Quando observamos os esferoides da linhagem Hs 578T (figura 23 E) as células estão menos coesas, e as células na periferia do esferoide se organizam de forma mais densa. A maioria das células da linhagem MCF-7 (figura 23 C) no interior dos esferoides ainda mantém seus núcleos intactos e todo seu citoplasma, sendo que poucas células estão em provável processo de degeneração celular. Figuras mitóticas não foram encontradas. O interior dos esferoides da linhagem Hs 578T (figura 23 F) contém pouquíssimas células integras, quanto a organização nuclear e citoplasmática, essas evidências morfológicas que observamos indicam que a maioria das células se encontra em possível processo de morte celular.

Observando a ultraestrutura podemos ver a disposição das células na região externa do esferoide (figura 24 A e F). A organização coesa das células MCF-7 lembra

a organização típica de uma célula de tumor derivada de epitélio que ainda retém muitas de suas características, como a expressão de proteínas de adesão célula-célula e de junções de oclusão (figura 24 B). A célula Hs 578T no esferoide (figura 24 F) é fusiforme, com morfologia semelhante a fibroblasto, as células estão dispostas em camadas, e quanto mais próximas do interior mais degeneradas as células estão. Há poucas junções de adesão e junção célula-célula (figura 24 G). Com maior aumento observa-se na região interna do esferoide células íntegras, e que mantêm os limites entre uma célula e outra muito próximos (figura 24 B e C), o que não é verdadeiro para linhagem Hs 578T (figura 24 G e H), onde não encontramos células que ainda mantêm suas características normais, mas sim células com nucléolo e cromatina muito evidente, e podemos ainda encontrar a presença de proteínas como o colágeno (figura 24 H).

Os microfilamentos, evidenciados a partir das preparações coradas com faloidina, estão organizados de modo diferente da monocamada, provavelmente para que a célula mantenha sua morfologia tridimensional. Fibras de estresse não foram observadas em ambas as linhagens. A partir da coloração do DNA nuclear com iodeto de propídeo, podemos identificar muitas figuras mitóticas em a linhagem MCF-7. A linhagem Hs 578T também apresenta mitoses, porém em menor proporção se comparada à MCF-7 (figura 25).

As diferenças morfológicas dos esferoides tratados com o composto *7-epi-clusianona* foram observadas em microscopia de luz convencional (figura 26). Nos esferoides tratados da linhagem Hs 578T, visualizamos que as bordas dos esferoides estão com células que provavelmente estão se destacando dos mesmos. No grupo controle a borda do esferoide permanece bem contínua, com um ou outro ponto de destaque. Na linhagem MCF-7 esse efeito é mais drástico, muitas células se destacam, e podemos encontrá-las ao redor dos esferoides livres no meio de cultura.

Os cortes semi-finos dos esferoides da linhagem Hs 578T tratados com *7-epi-clusianona* mostraram que a organização das células em camadas na periferia do esferoide foi perdida (figura 27), e na maior concentração do composto (40 μ M) podemos visualizar algumas células em degeneração na borda, o que não acontece para o grupo controle. No interior do esferoide há maior quantidade de células em degeneração celular, principalmente quando tratados com a maior concentração de *7-epi-clusianona*. O grupo controle embora apresente células em degeneração nesta

região, ainda apresenta algumas células com núcleo e citoplasma aparentemente íntegros.

As células da periferia dos esferoides tratados com 7-*epi*-clusianona da linhagem MCF-7 (figura 28) perdem sua natureza coesa e se tornam células facilmente destacáveis da esfera. No interior do esferoide tratado com a maior concentração é possível visualizar células com núcleos aparentemente maiores que aqueles encontrados no grupo controle, que poderiam estar associados ao processo de degeneração celular.

Analisando a ultraestrutura dos esferoides da linhagem Hs 578T foi possível observar que as células da periferia apresentam aspecto saudável, com nucléolo bastante evidente (figura 29 A) e novamente encontramos estruturas semelhantes às fibras colágenas (figura 29 B). Em contrapartida, os esferoides que receberam tratamento com 7-*epi*-clusianona apresentam-se com células deterioradas (figura 29 C) e parecem ter perdido a capacidade de produzir elementos de matriz extracelular, pois foram encontradas fibras colágenas em menor quantidade (figura 29 D), como no grupo controle.

Na figura 30, podemos observar a ultraestrutura dos esferoides da linhagem MCF-7 que foram submetidos ao tratamento com 7-*epi*-clusianona. No grupo controle as células mantêm sua característica original (altamente coesas), enquanto o grupo tratado com 6 μ M apresenta células com aspecto degenerado, característica que fica mais marcante quando observamos os esferoides que foram tratados com a maior concentração, há também perda da coesividade entre as células (12 μ M).

Figura 22 - Morfologia das células Hs 578T e MCF-7 cultivadas em monocamada e após a formação de esferoides. A - células Hs 578T cultivadas em monocamada com morfologia fibroblástica; B - esferoides da linhagem Hs 578T; C - células MCF-7 cultivadas em monocamada apresentando morfologia tipicamente epitelial; D - esferoides de células MCF-7; E - histograma da área dos esferoides das duas linhagens após diferentes dias de cultivo (dados em pixels ao quadrado). Imagens obtidas ao microscópio invertido de luz. Barras = 400 μ m.

Figura 23 - Imagens de cortes semi-finos de esferoides de células Hs 578T e MCF-7. A e B- organização geral dos esferoides de MCF-7; D e E- organização geral dos esferoides da linhagem Hs 578T; figuras mitóticas foram comumente encontradas na periferia dos esferoides de MCF-7 (cabeças de setas). Organização das células na região interior dos esferoides (C, F). Imagens obtidas por microscopia invertida de luz.

Figura 24 - Ultraestrutura das células Hs 578T e MCF-7 em esferoides. A e F morfologia das células MCF-7 e Hs 578T na periferia dos esferoides; é possível observar morfologia cúbica das células MCF-7 na periferia do esferoide (A), enquanto as células Hs 578T periféricas possuem morfologia achatada (F); B e G- junções celulares observadas nos esferoides de ambas as linhagens celulares; C e D- as células MCF-7 no interior dos esferoides mantêm íntimo contato entre si; H e I- região interna de esferoides de Hs 578T. Fibras colágenas são apontadas (seta). Indícios de deterioração celular são mostrados em I. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 25 - Organização de microtúbulos e microfilamentos nos esferoides das linhagens Hs 578T e MCF-7. Citoesqueleto de actina foi corado com faloidina-633 (azul). Os microtúbulos corados por anti- $\alpha\beta$ tubulina - FITC em verde. O DNA foi corado com iodeto de propídeo (vermelho). As setas apontam células em divisão mitótica. Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. Barras = 100 μ m.

Figura 26 - Morfologia dos esferoides de células Hs 578T e MCF-7 após tratamento com 7-*epi-clusianona* por 48 horas. Os esferoides dos grupos controles de ambas as linhagens apresentam uma borda lisa e contínua, enquanto os esferoides dos grupos tratados apresentam células que parecem estar se desprendendo. Células MCF-7 não aderidas aos esferoides ficam evidentes nos grupos tratados. Imagens obtidas a partir de microscopia invertida de luz. Barras das micrografias de Hs 578T correspondem a 200 μm e as de MCF-7 a 400 μm .

Figura 27 - Imagens de cortes semi-finos de esferoides de células Hs 578T tratados com 7-*epi*-clusianona por 48 horas. A e B- esferoides do grupo controle. C e D- esferoides tratados com 20 μ M de 7-*epi*-clusianona. É possível notar que as células da periferia do esferoide não estão mais organizadas concêntrica como no grupo controle (C), e que há maior quantidade de células em aparente processo de degeneração no interior do esferoide (D). E e F- esferoides tratados com a maior concentração de 7-*epi*-clusianona onde se pode observar células que estão se destacando dos esferoides e ausência de organização concêntrica. Células em aparente processo de degeneração podem ser visualizadas em F (setas). Imagens obtidas ao microscópio de luz.

Figura 28 - Morfologia dos esferoides de células MCF-7 tratados com o composto 7-*epi*-clusianona depois de 48 horas. A e B- esferoides do grupo controle. C e D- esferoides tratados com 6 μ M de 7-*epi*-clusianona. É possível notar que as células da periferia do esferoide não estão mais coesas como no grupo controle (C). E e F- esferoides tratados com 12 μ M de 7-*epi*-clusianona onde se pode observar células que estão se destacando dos esferoides e ausência de coesão entre as células. Células em aparente processo de degeneração podem ser visualizadas em F (setas). Imagens obtidas ao microscópio de luz.

Figura 29 - Ultraestrutura das células Hs 578T em esferoides sob tratamento com 7-*epi*-clusianona. A e B grupo controle; A - morfologia das células Hs 578T na periferia do esferoide; é possível observar a célula com morfologia saudável, apresentando nucléolos bastante evidentes; B – abundância de fibras colágenas. C e D grupo tratado com 20 µM de 7-*epi*-clusianona por 48h; C – destaque de célula com morfologia deteriorada; D – ausência de fibras colágenas. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. A, C e D barra = 10 µm; B barra = 2 µm.

Figura 30 - Ultraestrutura das células MCF-7 em esferoides sob tratamento com 7-*epi*-clusianona. A e B grupo controle; A - morfologia das células MCF-7 altamente coesas; C e D grupo tratado com 6 µM de 7-*epi*-clusianona por 48h; C – células mantêm adesões apenas na camada mais externa do esferoide; D – aspecto degenerado das células do interior do esferoide; E e F grupo tratado com 12 µM; E - células em total estado de degeneração celular; F - perda da coesividade celular. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Barras = 10 µm.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos o potencial antitumoral do composto 7-*epi*-clusianona em duas linhagens de células tumorais de mama, cultivadas em monocamada (2D) e esferoides (3D). Devido à necessidade de desenvolver métodos que se aproximem das respostas celulares *in vivo*, diversas técnicas de cultura 3D têm sido desenvolvidas, afim de recapitular mecanismos fisiológicos naturais das células, como hipóxia, os quais são perdidos no contexto bidimensional (TANNER; GOTTESMAN, 2015). Para tanto, neste trabalho utilizamos a cultura de esferoides formados a partir da agregação de células no meio de cultura considerando que eles mimetizariam regiões de micro metástases e tumores avasculares (FRIEDRICH et al., 2007).

Os esferoides das células Hs 578T e MCF-7 foram desenvolvidos sem o uso de nenhum arcabouço de matriz extracelular, pois não era interessante que houvesse nenhuma interferência de fatores externos, uma vez que o foco era investigar o efeito do composto 7-*epi*-clusianona nas células, exclusivamente. Contudo, alguns modelos de culturas 3D utilizam componentes de matriz extracelular, como colágeno tipo I (SZOT et al., 2011) ou outros componentes de matriz extracelular, como por exemplo, o complexo proteico gelatinoso derivado de sarcoma murino *Engelbreth-Holm-Swarm* (EHS), conhecido como Matrigel® (SONG et al., 2014).

Neste trabalho analisamos os efeitos do 7-*epi*-clusianona sobre o ciclo celular de células Hs 578T e MCF-7 por citometria de fluxo, observamos aumento de células em fase G1/G0 em 24 e 48 horas de tratamento para a linhagem Hs 578T, para a linhagem MCF-7 aumento de células em G1/G0 principalmente em 72 horas. Embora tenhamos observado mais células retidas em G1/G0 em 72 horas na linhagem MCF-7 (isso indica que o tratamento é tempo-dependente), mantivemos os tratamentos por 48 horas nas duas linhagens, pois em 72 horas a quantidade de células restantes na placa de cultura não era suficiente para os experimentos. Esse bloqueio em fase específica do ciclo celular (G1/G0) corrobora os dados de Ionta et al. (2015), que analisaram os efeitos do composto 7-*epi*-clusianona em células não pequenas de câncer de pulmão da linhagem A549, concomitantemente ao bloqueio no ciclo celular em fase G1/G0, foi observado aumento de apoptose na população celular via ativação de caspase-3.

Compostos do mesmo grupo da molécula 7-*epi*-clusianona também mostraram potencial citotóxico em algumas linhagens de células tumorais, dentre essas células, as linhagens sensíveis às benzofenonas são as células derivadas de câncer de cólon (KAN et al., 2013), MCF-7 (LAKSHMI et al., 2013), HepG2 (fígado) (REIS et al., 2014), OVCAR-3 (ovário) (PINHATTI et al., 2013).

Os efeitos de extrato de líquens tropicais (*Parmotrema reticulatum*), que também contém benzofenonas, foram avaliados sobre o ciclo celular de células MCF-7, A549 (carcinoma de pulmão) e WI-38 (fibroblastos normais de pulmão) por citometria de fluxo, e somente a linhagem MCF-7 foi sensível ao tratamento (130 µg) com o extrato, apresentando aumento de células em S e G2/M (GHATE et al., 2013). Outro estudo observou o efeito da boldina, outra benzofenona natural extraída do boldo, sobre o ciclo celular de células MDA-MB-231, e encontrou acúmulo de células em G2/M de maneira dose-dependente (12,5 até 50 µg), quanto maior a concentração mais células eram retidas nessa fase do ciclo celular (PAYDAR et al., 2014).

Avaliando as atividades antiproliferativas do composto securinina-L, extraído das raízes de *Securinega suffruticosa*, sobre a linhagem MCF-7, os autores observaram bloqueio de ciclo celular em fase G1 utilizando 40 µM do composto (LI et al., 2014). Esses estudos demonstram que as benzofenonas atuam sobre o ciclo celular, em fase G1/G0 ou em G2/M, embora tenham efeito em fases diferentes do ciclo celular, ambas as benzofenonas demonstraram potencial antitumoral.

Outro composto, isolado de *Garcinia cowa*, planta pertencente ao mesmo gênero que *Garcinia brasiliensis* da qual o 7-*epi*-clusianona é extraído, corroboram os dados obtidos nesse trabalho. O composto gutiferona- K ou GUT-K, induziu o aumento da frequência de células derivadas de câncer de cólon (HT-29) em fase G1/G0 do ciclo celular (KAN et al., 2013).

Apesar de outros estudos demonstrarem que benzofenonas tem potencial citotóxico e induziram apoptose (KAN et al. 2013; REIS et al., 2014), o mesmo não aconteceu para as linhagens estudadas neste trabalho, pois o ensaio de detecção caspase-9 por citometria de fluxo mostrou que o 7-*epi*-clusianona não é capaz de induzir morte por apoptose nas duas linhagens estudadas em monocamada. Embora em outro estudo, o composto 7-*epi*-clusianona tenha induzido apoptose de células da linhagem A549 (IONTA et al., 2015). Todavia, na linhagem MCF-7 em 3D, observamos aumento de 10% na frequência de células em apoptose no grupo tratado com 12 µM por 48 horas, em relação ao grupo controle.

Visto que o composto exerce efeito antiproliferativo sobre as células usadas neste trabalho, a expressão de proteínas relacionadas com a via de proliferação celular foi estudada. A análise da expressão de ERK total e ERK fosforilada, demonstra que na linhagem Hs 578T não há diferença na ativação de ERK, mas há diminuição de ERK fosforilada em 20 μ M, comparando os grupos controle e tratados por 48 horas com 10 μ M de 7-*epi*-clusianona. Esses dados indicam que menos células estão proliferando. O modelo de cultivo 3D apresentou diminuição de ERK fosforilada somente em 20 μ M indicando que as células proliferam menos nessa faixa de concentração. A proteína ERK quando ativada é translocada para o núcleo, fosforilando e ativando vários fatores de transcrição. Esses fatores por sua vez, levam à transcrição de genes relacionados à proliferação celular, portanto, ERK fosforilada é indicativo que as células estão proliferando (NEUZILLET et al., 2014). As células podem proliferar independente da ativação de ERK, como demonstrado num estudo onde o composto GUT-K diminui a proliferação de células HT-29 independente de ERK (KAN et al., 2013).

Houve fosforilação de ERK na cultura em monocamada, porém esta proteína ativada está aumentada nas culturas 3D, sem diferenças entre grupo controle e tratados. Isso demonstra um padrão de expressão proteica diferente nos dois tipos de cultivo. Um estudo demonstrou que a ativação de ERK está envolvida com a via de indução de apoptose, observando os efeitos do kaempferol, um composto natural (flavonoide), na linhagem MCF-7, e que a fosforilação de ERK está aumentada no modelo de cultivo 3D (KIM et al., 2008). Talvez este aumento de fosforilação de ERK na cultura 3D esteja relacionada com a apoptose, como visto pelo ensaio de caspase.

A expressão proteica de PCNA também foi analisada, tendo em vista que as células diminuíram sua proliferação quando submetidas ao tratamento com 7-*epi*-clusianona, porém não houve alteração na expressão da mesma, tanto nos grupos controles quanto nos grupos tratados para as duas linhagens, exceto pelo aumento de PCNA no grupo controle da MCF-7 cultivada em esferoides. Outro estudo também demonstrou aumento de PCNA em esferoides da linhagem MCF-7, cultivados num sistema tridimensional semelhante ao deste estudo (ZHENG et al., 2012). A proteína PCNA ou antígeno nuclear de proliferação celular está intimamente relacionada com a proliferação celular e duplicação do DNA, logo, quanto mais DNA é duplicado, mais PCNA a célula irá expressar e isso é um indicativo de que as células estão proliferando (STRZALKA; ZIEMIENOWICZ, 2011).

A linhagem Hs 578T expressa caderina-E em baixas concentrações não detectáveis pela técnica de *Western blotting*, mas expressa caderina-N, como mostrado pelo PCR em tempo real (KENNY et al., 2007; SHAH; GAU; SABNIS, 2014), observando a figura 23 F e G percebemos raras junções célula-célula nesses esferoides, enquanto que para a linhagem MCF-7 há grande quantidade de junções de adesão.

A linhagem MCF-7 expressa caderina-E como sua principal proteína de adesão célula-célula (KENNY et al., 2007), os grupos controles e tratado com 3 μ M não apresentam diferenças na expressão dessa proteína, entretanto há diminuição de caderina-E no grupo tratado com 6 μ M do composto, embora, de acordo com a expressão gênica, o tratamento com 7-*epi*-clusianona diminuiu os níveis de RNA mensageiro. A expressão de caderina-E aumenta no grupo controle dos esferoides em relação ao controle da monocamada da linhagem MCF-7, aumento esperado pois, as interações célula-célula aumentam muito no modelo tridimensional (SHIN et al., 2013). A caderina-E é uma das principais proteínas de adesão célula-célula do tecido epitelial, é fundamental para manter as junções de adesão que formam os tecidos (SHIN et al., 2013). A análise da expressão de caderina-E nos permitiu caracterizar ambas linhagens quanto às suas proteínas de adesão e também verificar se o tratamento com o composto 7-*epi*-clusianona alterava a expressão dessa proteína, visto que nas figuras 25, 26 e 27 encontramos células (principalmente na periferia) que estão se desprendendo dos esferoides, provavelmente, devido ao tratamento.

Para investigar os mecanismos pelo qual o composto 7-*epi*-clusianona bloqueia as células em fase G1/G0, também foi necessário pesquisar os elementos de regulação do ciclo celular, como ciclina D1, p53 e Akt. Neste trabalho mostramos que houve depleção de ciclina D1 e concomitante aumento de p53 nas células MCF-7 em monocamada e esferoides, tratadas com o composto. Esses dados indicam que o bloqueio em G1/G0 acontece independentemente da presença de ciclina D1, visto que essa proteína é reguladora da passagem da fase G1/G0 para S do ciclo celular (SHIMURA; FUKUMOTO; KUNUGITA, 2013).

Hahm et al. (2015), estudaram os efeitos de extratos de *Opuntia humifusa*, e demonstraram que as células de carcinoma cervical ficavam retidas em G1/G0 do ciclo celular independente de acúmulo de ciclina D1, corroborando os resultados encontrados neste estudo. O aumento de p53 também corrobora os dados de Hahm et al. (2015). O mesmo ocorre na linhagem Hs 578T, exceto pelo aumento de p53,

visto que esta linhagem apresenta mutação na proteína p53 (HYUN et al., 2013).

Em geral, quando há dano de DNA a principal proteína supressora tumoral (p53) é ativada na tentativa de reparar o dano. Logo, as células ficarão retidas em alguma fase do ciclo celular temporariamente se esse dano for irreversível, as células irão ativar o programa de morte celular (apoptose) ou ficarão retidas permanentemente em senescência celular (ITAHANA; DIMRI; CAMPISI, 2001; MOMBACH; BUGS; CHAOUIYA, 2014). De fato, muitos estudos já demonstraram que células que foram tratadas com compostos naturais e ficaram retidas em G1/G0 (DANTAS et al., 2015; GAO et al., 2015; WANG et al., 2015), inclusive o tratamento com 7-*epi*-clusianona em linhagem de câncer de pulmão (IONTA et al., 2015), ou em fase S (GOMES et al., 2015) são posteriormente encaminhadas para morte celular.

Como já discutido e demonstrado que as células Hs 578T e MCF-7 não são encaminhadas para morte celular por apoptose após tratamento com 7-*epi*-clusianona, fomos investigar se a indução de senescência celular seria um dos efeitos do composto. Relatos recentes demonstraram que a β -galactosidase é um bom marcador de células senescentes, uma vez que só estas células apresentam a enzima *lysosomal- β -galactosidase* ativa (WAGNER et al., 2015).

Nas culturas em monocamada, foi visto que o tratamento com 7-*epi*-clusianona induziu senescência celular, o que pode sugerir dano irreversível no DNA (HANEMANN, 2015; MOMBACH; BUGS; CHAOUIYA, 2014). Estudos demonstram que a proteína p53 está intimamente envolvida com a indução de senescência celular, através da sensibilização por alguns sinais, como encurtamento dos telômeros, danos ao DNA (ITAHANA; DIMRI; CAMPISI, 2001), logo, o aumento na expressão dessa proteína pelas células MCF-7 pode estar relacionado com a entrada dessas células em senescência celular, como mostrado pelo ensaio de coloração de β -galactosidase. Outra pesquisa também demonstrou que compostos derivados de saponina, induziram aumento da frequência de células A549 em fase G1/G0 e aumento de células em senescência celular, fase permanente do ciclo (GASPAROTTO et al., 2014).

Esses dados indicam que o composto 7-*epi*-clusianona tem potencial antitumoral, retendo as células em fase G1/G0 do ciclo celular encaminhando-as para estágio permanente, ou seja, essas células perdem a capacidade de divisão celular, pois estão senescentes.

Partindo para análises morfológicas das células submetidas a ação do 7-*epi*-

clusianona, notamos diminuição da população celular cultivada em monocamada. A análise da morfologia nuclear à luz do microscópio de fluorescência, nos permitiu observar a integridade nuclear através da imunomarcação da proteína lamina B1. A lamina B1 é uma das principais constituintes do envoltório nuclear e pode ser usada como marcador da integridade da membrana que envolve o núcleo (YOUNG et al., 2014). Não houve diferenças morfológicas nucleares e os envoltórios estão íntegros nos grupos controles e nos tratados.

A organização do citoesqueleto de actina também foi observada e não houve alterações entre os grupos controles e os grupos submetidos ao tratamento em ambas linhagens. Embora o mesmo composto tenha alterado a organização dos microtúbulos e dos microfilamentos em células da linhagem A549 tratadas com 10 μ M e 20 μ M de 7-*epi*-clusianona (IONTA et al., 2015). Outros trabalhos que também investigaram a ação de produtos naturais sobre o citoesqueleto das células mostraram desorganização dos microtúbulos, em células MCF-7 por ação do geodiamolídeo H (FREITAS et al., 2008) e do citoesqueleto de actina, em células de melanoma humano sob tratamento com ácido cinâmico (NIERO; MACHADO-SANTELLI, 2013).

Os esferoides têm sido muito utilizados como o modelo de cultura tridimensional para o *screening* de drogas anticâncer, por exibir características comuns aos tecidos de origem, que não podem ser observadas na monocamada (PATEL et al., 2015). Por ser uma técnica relativamente simples, barata e reprodutível, no futuro poderá diminuir o número de animais de laboratório para este tipo de pesquisa (BENIEN; SWAMI, 2014).

Neste trabalho, desenvolvemos os esferoides da linhagem Hs 578T baseados na técnica de cultivo de esferoides desenvolvidos por Amaral et al. (2011). Essa técnica de cultivo de células apresenta algumas vantagens como já mencionado, porém algumas características que os esferoides desenvolvem ao longo do cultivo ficam fora de nosso controle, como o tamanho dos esferoides (MEHTA et al., 2012). Há grande heterogeneidade quanto às dimensões dos esferoides, como demonstrado neste estudo, diferente de outros modelos de cultivo tridimensionais como o método da gota pendente (*hanging drop*), em que se pode ter maior controle sobre esse aspecto (MEHTA et al., 2012).

Morfologicamente, ambos esferoides, tanto de Hs 578T quanto da MCF-7, apresentam similaridades como uma região no centro do esferoide, que segundo a literatura é a região que mais apresenta células deterioradas, que estão morrendo

provavelmente por necrose. Também apresentam um padrão, as células que estão proliferando se encontram principalmente na periferia dos esferoides em ambas linhagens estudadas (FRIEDRICH et al., 2007).

Os dados do nosso estudo corroboram os de Kenny et al. (2007) que classificaram a morfologia de esferoides formados a partir de células de câncer de mama, cultivados em matriz extracelular rica em leucina. Os esferoides da linhagem MCF-7 são estruturados como uma massa de células, com núcleos desorganizados e robustas interações células-células, já para a linhagem Hs 578T os esferoides foram classificados com formato estrelado, com núcleos também desorganizados e corpo celular bastante alongado com processos invasivos. Apesar das características morfológicas entre a linhagem Hs 578T serem muito parecidas as descritas, os esferoides formam verdadeiras esferas, mas as células da sua periferia se assemelham muito às descritas por Kenny et al. (2007).

Outra característica dos esferoides formados pela linhagem Hs 578T é a produção de moléculas de matriz extracelular. Diversos estudos descreveram a produção de moléculas da matriz extracelular pelos esferoides, não só a produção de colágeno como no caso deste estudo, mas outras proteínas importantes como fibronectina, laminina e elastina (HAMILTON et al., 1998). Quando submetidos ao tratamento com 7-*epi*-clusianona, observamos drástica diminuição dessas proteínas de matriz, que são observadas em abundância no grupo controle. O citoesqueleto, tanto os filamentos de actina quanto os microtúbulos, sofre rearranjo para comportar as células na sua nova conformação tridimensional.

Apesar do composto ter demonstrado atividade citotóxica em baixas concentrações, entre 3 μ M e 40 μ M, nos dois tipos de cultura, alguns trabalhos demonstraram que os modelos tridimensionais tendem a apresentar maior resistência à drogas, devido a própria arquitetura e disposição das células (NIERO et al., 2014). Estudos mostraram maior resistência dos esferoides da MCF-7 à doxorubicina, independente de proteínas envolvidas com a resistência a múltiplas drogas, mas via proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (dit FAUTE et al., 2002). Lee et al. (2010) avaliaram o efeito do 5-Fluoracil sobre a linhagem MCF-7 cultivadas em monocamada e esferoides formados em gel de agarose, encontraram maior resistência à droga nos esferoides. Esses dados mostram que as concentrações de algumas drogas já utilizadas como quimioterápicos e compostos com potencial anticâncer, devem ser alteradas de acordo com o método de avaliação, uma vez que o modelo tridimensional

exibe maior resistência a drogas (NIERO et al., 2014). Nossos dados, corroboram os dados da literatura, de fato os esferoides exibem maior resistência aos tratamentos com drogas antineoplásticas, porém são importante ferramenta para o estudo de novas moléculas bioativas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os dados expostos no presente estudo, podemos fazer algumas inferências em relação aos efeitos do 7-*epi*-clusianona sobre as linhagens celulares estudadas e também sobre a cultura tridimensional feita com as células Hs 578T:

- ✓ As células Hs 578T e MCF-7 foram sensíveis ao tratamento com 7-*epi*-clusianona, pois as concentrações do IC₅₀ para ambas as linhagens são baixas, em relação a outros compostos com potencial quimioterápico. Contudo, entre as duas linhagens estudadas, a MCF-7 é mais sensível do que a Hs 578T.
- ✓ O composto apresenta efeito antiproliferativo nas linhagens estudadas em monocamada, via retenção de células em fase G0/G1 do ciclo celular. Para as células MCF-7 cultivadas em esferoides não houve alteração na população em fase específica do ciclo celular em relação ao grupo controle.
- ✓ A diminuição da expressão de ciclina D1 e o aumento de p53 na linhagem MCF-7 tratada com o composto podem estar relacionados com o processo de reparo no DNA. O mesmo não pode ser inferido para a linhagem Hs 578T, visto que essa célula apresenta mutação em p53.
- ✓ O tratamento com 7-*epi*-clusianona não foi capaz de induzir apoptose em nenhuma das linhagens cultivadas em monocamada ou na linhagem MCF-7 cultivada em esferoides.
- ✓ Houve aumento da frequência de células senescentes na população de células de ambas as linhagens cultivadas em monocamada em função do tratamento com 7-*epi*-clusianona.
- ✓ Os microfilamentos não sofreram alteração após tratamento com o composto, em nenhuma das linhagens cultivadas em monocamada, assim como não houve mudanças na disposição da lâmina B1 após tratamento.
- ✓ Os esferoides de ambas as linhagens são arredondados, visto ao microscópio de luz, mas apresentam diferenças morfológicas quando observados ao microscópio eletrônico. As células da linhagem MCF-7 se organizam de forma coesa e as células da linhagem Hs 578T se apresentam de forma concêntrica na periferia do esferoide.

- ✓ O aumento da expressão de PCNA no grupo controle da linhagem MCF-7 cultivada como esferoide indica que essa linhagem, quando cultivada em 3D prolifera mais que na monocamada e como houve diminuição nos grupos tratados com 7-epi-clusianona, pode ser um indício de que há diminuição da proliferação também nos esferoides devido ao tratamento, assim como acontece na monocamada.
- ✓ Os maiores níveis de expressão de caderina-E nos esferoides da linhagem MCF-7 indicam que há maior interação célula-célula nos esferoides, como já era esperado.
- ✓ A linhagem Hs 578T apresenta baixos níveis de caderina-E, mas expressa caderina-N, por ser uma linhagem que já sofreu transição epitélio-mesenquima.
- ✓ O tratamento com o composto induziu as células Hs 578T a diminuir a expressão de proteínas de matriz extracelular, alterando o microambiente tumoral que as células estabelecem quando cultivadas em esferoides.

REFERÊNCIAS*

- ALVES, T. M. et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 2, p. 369-371, 1999.
- AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e suas aplicações em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, p. 1-20, 2011a.
- AMARAL, J. B. et al. Cell death and lumen formation in spheroids of MCF-7 cells. **Cell Biol. Int.**, v. 34, n. 3, p.267-274, 2010.
- AMARAL, J. B. et al. MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 17, n. 11, p. 1097-1107, 2011b.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures. Atlanta: American Cancer Society. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>> Acesso em 26 de julho de 2015.
- BENIEN, P.; SWAMI, A. 3D tumor models: history, advances and future Perspectives. **Future Oncol.**, v. 10, n. 7, p. 1311-1327, 2014.
- BRANCO DE ALMEIDA, L. S. et al. Effects of 7-epiclusianone on Streptococcus mutans and Caries Development in Rats. **Planta Med.**, v. 77, p. 40-45, 2011.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1978, v. 3, 747 p.
- CRUZ, A. J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, v. 13, n.6, p.442-445, 2006.
- DANTAS, B. B. et al. Effects of curine in HL-60 leukemic cells: cell cycle arrest and apoptosis induction. **J. Nat. Med.**, v. 69, p. 218-223, 2015.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for câncer chemotherapy. **Microb. Biotechnol.**, v. 4, n. 6, p. 687-699, 2011.
- DESANTIS, C.E. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, **CA Cancer J. Clin.**, v.64, n.4, p.252-271, 2014.
- ELLIOTT, N.T.; YUAN, F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. **J. Pharm. Sci.**, v. 100, n. 1, p. 59-74, 2011.
- FOULKES, W. D. et al. Triple-negative Breast Cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 363, n. 20, p. 1938-1948, 2010.
- FREITAS, V.M. et al. Thegeodiamolide H, derived from Brazilian sponge *Geodia corticostylifera*, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. **J. Cell Physiol.**, v. 216, n. 3, p.583-594, 2008.
- FRIEDRICH J. et al. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge?. **Int J. Radiat. Biol.**, v. 83, n. 11-12, p. 849-871, 2007.
- GAO, J. et al. Evaluation of cytotoxic and apoptotic effects of individual and mixed 7-ketophytosterol oxides on human intestinal carcinoma cells. **J. Agric. Chem.**, v. 63, p. 1035-1041, 2015.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- GASPAROTTO, J. Hecogenin acetate inhibits reactive oxygen species production and induces cell cycle arrest and senescence in the A549 human lung cancer cell line. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 14, n. 8, p. 1128-1135, 2014.
- GHATE, N. B. et al. An antioxidant extract of tropical lichen, *Parmotrema reticulatum*, induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cell line MCF-7. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013.
- GINZBERG, M. B. et al. Cell Biology. On being the right (cell) size. **Science**, v. 348, p. 771-778, 2015.
- GOMES, D. L. et al. Methanolic extracts from brown seaweeds *Didyota ciliolata* and *Dictyota menstrualis* induce apoptosis in human cervical adenocarcinoma HeLa cells. **Molecules**, v. 20, p. 6573-6591, 2015.
- HAHM, S. W. et al. Anticancer properties of extracts from *Opuntia humifusa* against human cervical carcinoma cells. **J. Med. Food**, v. 18, n. 1, p. 31-44, 2015.
- HAMILTON, G. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. **Cancer Letters**, v. 131, p. 29-34, 1998.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer: next generation. **Cell**, v. 144, p.646-674, 2011.
- HANEMANN, S. S. L. **Estudo in vitro da atividade antiproliferativa de 7-epiclusianona sobre linhagens celulares de carcinoma de mama humana**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2015.
- HYUN, M. K. CG0009, a novel glycogen synthase kinase 3 inhibitor, induces cell death through cyclin D1 depletion in breast cancer cells. **PloS One**, v. 8, n. 4, 2013.
- INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Estimativas 2014. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>> Acesso em 15 de maio de 2015.
- INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. O que é o câncer? Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>> Acesso em de 15 maio de 2015.
- IONTA, M. et al. 7-Epi-Clusianone, a Benzophenone from *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae) Acts as an Inductor of Cell Cycle Arrest in G1/S Transition and Induces Apoptosis in A549 Cells. **Molecules**, v. 20, p. 1-13, 2015.
- ITAHANA, K.; DIMRI, G.; CAMPISI, J. Regulation of cellular senescence by p53. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 2784-2791, 2001.
- JORDAN, M. A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2002.
- KAMPAN, N. C. et al. Paclitaxel and its evolving role in the management of ovarian cancer. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, n. 413076, p. 1-21, 2015.
- KAN, W. L. et al. Antitumor effects of novel compound, guttiferone K, on colon cancer by p21Waf1/Cip1-mediated G(0)/G(1) cell cycle arrest and apoptosis. **Int. J. Cancer**, v. 132, n. 3, p. 707-716, 2013.
- KENNY, P. A. et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Mol. Oncol.**, p. 84-96, 2007.
- KIM, B. W. Sustained ERK activation is involved in the kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition. **Cancer Biol. Ther.**, v.7, p. 1080-1089, 2008.
- KITEL, R. et al. Three-dimensional cell cultures. Applications in basic science and biotechnology. **Postepy. Biochem.**, v. 59, n. 3, p. 305-14, 2013.

- LAKSHMI, R. V. et al. Design, synthesis, and anticancer properties of novel benzophenone-conjugated coumarin analogs. **Arch. Pharm.**, v. 346, n. 12, p. 901-11, 2013.
- LEE, S. Y. Implication of necrosis linked p53 aggregation in acquired apoptotic resistance to 5-FU in MCF-7 multicellular tumor spheroids. **Oncol. Rep.**, v. 24, p. 73-79, 2010.
- LI, M. et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of L-securinine on human breast cancer MCF-7 cells. **Pharmazie**, v. 69, n. 3, p. 217-223, 2014.
- MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 164, p. 192-204, 2012.
- MILITÃO, G. C. et al. Pterocarpanes induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. **Biochimie**, v. 104, p. 147-155, 2014.
- MOMBACH, J. C. M.; BUGS, C. A.; CHAOUIYA, C. Modelling the onset of senescence at the G1/S cell cycle checkpoint. **BMC Genomics**, v. 15, n. 7, p. 1-11, 2014.
- MONTANEZ-SAURI, S. I. et al. Microscale screening systems for 3D cellular microenvironments: platforms, advances, and challenges. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 72, p. 237-249, 2015.
- MURATA, R. M. et al. Antiproliferative effect of benzophenones and their influence on cathepsin activity. **Phytother Res**, v. 24, n. 3, p. 379-383, 2010b.
- MURATA, R. M. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, v. 26, n. 7, p. 865-872, 2010a.
- MURATA, R. M. et al. Inhibitory effects of 7-epiclusianone on glucan synthesis, acidogenicity and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Lett.**, v. 282, n. 2, p. 174-181, 2008.
- NEUZILLET, C. et al. MEK in cancer and cancer therapy. **Pharma Therapeutics**, v. 141, p. 160-171, 2014.
- NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Med.**, v. 73, n. 7, p. 644-649, 2007.
- NIERO, E. L. et al. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 28, p. 33-37, 2014.
- NIERO, E. L. O; Machado-Santelli, G. M. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 23, p. 32-31, 2013.
- OLIVEIRA, A. K. M. et al. Potencial alelopático de folhas frescas de bacupari (*Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana) na germinação de alface. **R. Bras. Bioci.**, v. 9, n.4, p. 550-553, 2011.
- PAGE, H. et al. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond, **Cell Tissue Res.**, v. 352, n. 1, p. 123-131, 2013.
- PATEL, N. R. et al. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems. **Ther. Devil.**, v. 6, n. 4, p. 509-520, 2015.
- PAYDAR, M. et al. Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using in vitro and in vivo models. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 8, p. 719-33, 2014.
- PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v.406, n. 6797, p. 747-752, 2000.
- PINHATTI, A. V. et al. Antiproliferative activity of the dimeric phloroglucinol and benzophenone derivatives of *Hypericum* spp. native to southern Brazil. **Anticancer Drugs**, v. 24, n. 7, p. 699-703, 2013.

REIS, F. H. Clusianone, a naturally occurring nemorosone regioisomer, uncouples rat liver mitochondria and induces HepG2 cell death. **Chem. Biol. Interact.**, v. 212, p. 20-29, 2014.

RIZZO, C. L. **Avaliação da proliferação e migração celular mediadas pela ativação do EGFR em linhagens celulares de câncer de pulmão cultivadas como monocamada e esferoides**. 2015. 158 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SAIKA, K.; SOBUE, T. Cancer statistics in the world. **Gan To Kagaku Ryolho**, v.40, n.13, p. 2475-2480, 2013.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. 7-epiclusianone, the natural prenylated benzophenone, inhibits superoxide anions in the neutrophil respiratory burst. **J. Med. Food**, v. 15, n. 2, p. 200-5, 2012.

SANTINI, M. T.; RAINALDI, G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. **Pathobiology**, v. 67, n. 3, p. 148-157, 1999.

SANTOS, M. H. **Estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana* (PL. E TR.) e aplicações biológicas dos seus constituintes**. 1996. 135 f. Tese (Doutorado em Ciência). Curso de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1996.

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

SHAH, P.; GAU, Y.; SABNIS, G. Histone deacetylase inhibitor entinostat reverses epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by reverse the repression of E-cadherin. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 143, p. 99-111, 2014.

SHIMURA, T.; FUKUMOTO, M.; KUNUGITA, N. The role of cyclin D1 in response to long-term exposure to ionizing radiation. **Cell Cycle**, v. 12, n. 17, p. 2738-2743, 2013.

SHIN, C. S. et al. Development of an in vitro 3D Tumor Model to Study Therapeutic Efficiency of an Anticancer Drug. **Mol. Pharm.**, v. 10, n. 6, 2013.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer. J. Clin.**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.

SONG, H. H. G. et al. Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 79-80, p. 19-29, 2014.

STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of Botany**, v. 1, n. 107, p. 1127-1140, 2011.

SZOT, C. S. et al. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. **Biomaterials**, v. 32, n. 31, p. 7905-7912, 2011.

TANNER, K.; GOTTESMAN, M. M. Beyond 3D culture models of cancer. **Sci. Transl. Med.**, v. 7, n. 283, p. 1-4, 2015.

WAGNER, J. et al. Overexpression of the novel senescence marker β -galactosidase (GLB1) in prostate cancer predicts reduced PSA recurrence. **PloS One**, v. 15, n. 10, 2015.

XU, X. et al. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. **Biotechnol. Adv.**, v. 10, 2014.

YOUNG, S. G. et al. Nuclear Lamins and Neurobiology. **Mol. Cell Biol.**, v. 34, n. 15, p. 2776, 2014.

ZHENG, H. et al. Rotary culture promotes the proliferation of MCF-7 cells encapsulated in three-dimensional collagen-alginate hydrogels via activation of the ERK1/2-MAPK pathway. **Biomed. Mater.**, v. 7, n. 1, 2012.