

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-
Oeste - Faculdade de Medicina - FAMED

**Avaliação do potencial antitumoral do lipídio resorcinólico 3-heptil-3,4,6-
trimetoxi-3 hisobenzofurano-1-ona em células de câncer de mama**

Tese de Doutorado
Ana Paula Maluf Rabacow Giovaneti

Campo Grande/MS
2019

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-
Oeste - Faculdade de Medicina - FAMED

Ana Paula Maluf Rabacow Giovaneti

Avaliação do potencial antitumoral do lipídio resorcinólico 3-heptil-3,4,6-trimetoxi-3 hisobenzofurano-1-ona em células de câncer de mama

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Campo Grande – MS
2019

Lipídio Avaliação do potencial antitumoral do lipídio resorcinólico 3-heptil-3,4,6-trimetoxi-3 hisobenzofurano-1-ona em células de câncer de mama

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Presidente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho (Membro permanente)
Universidade Católica Dom Bosco – UCDB

Prof. Dra. Danielle Bogo (Membro permanente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Prof. Dra. Luana Silva Soares (Membro permanente)
Universidade Católica Dom Bosco – UCDB

Prof. Dra. Mariana de Oliveira Mauro (Membro permanente)
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS

Agradecimentos

Manifesto os meus sinceros agradecimentos ao meu **orientador** Professor Doutor Rodrigo Juliano Oliveira pela paciência, confiança, ensinamentos e cordialidade com que sempre me recebeu. Sou grata pela liberdade de ação que me permitiu, sendo decisiva para meu desenvolvimento profissional.

Obrigada a **equipe** e as **amizades** conquistadas no Centro de Estudos em Células, Terapia Celular e Genética Toxicológica - CeTroGen, entre tantos ensaios e noites perdidas, nosso ganho foi maior. Nomes que quando eu reler a tese me trarão a memória cada rosto e cada história vivida, risadas, anseios, receios, angústias, enfim um período saudoso onde nossa carreira acadêmica se preparava para ter um início.

Raíssa, Edwin, Lucas, João, Andreza, Bruno, Luana, Giovana, Laynna, Luane, Leal, Bruna, Ana, Yasmin, Larissa, Juliana, Silvia, Natan, Vivi e Geyson .

A todas as pessoas que **contribuíram** para que essa trajetória fosse cumprida

À experiência acadêmica, sou grata a conquista da capacidade de discernimento para seguir ou não exemplos como inspiração.

Por fim, a conclusão de que na vida é preciso equilíbrio em todos os pontos, se uma viga não estiver estruturada, a casa cai. Em 4 anos, muito aprendizado extracurricular.

A **CAPES** agradeço o fomento da bolsa que me possibilitou a realização do Doutorado.

Agradecimentos

Deixo ainda o meu agradecimento por seres cuja importância não cabe em regras apertadas e fogem a qualquer norma científica.

A *Deus*, pela oportunidade

Ao meu filho *Pedro*, pelo motivo

Ao *Fernando*, por me fazer mais forte

A minha *mãe*, pela doçura

Ao meu *paí*, pela luta

A *Fabiana*, minha estrela, pela empatia

A *Daniella*, pelas cores

A minha vózinha *Norma*, pelo exemplo

Ao *Erson*, meu sogro, segundo pai, pelo acolhimento, pelo amor

A *Sandra*, minha querida sogra (*in memoriam*) pela alegria, pelo laço eterno

A *Dani*, minha cunhada, pela confiança, por me permitir o cuidado

A você dor, o mérito pelos passos mais lentos, o abandono a pressa de se chegar a lugar nenhum.

Filho, nossa vida de nada vale se não for compartilhar.

Mamãe.

“Somos todos anjos de uma só asa, e só podemos voar quando nos abraçamos uns aos outros”. Fernando Pessoa.

RESUMO

Rabacow, A.P.M. Avaliação do potencial antitumoral do lipídio resorcinólico 3-heptil-3,4,6-trimetoxi-3 hisobenzofurano-1-ona em células de câncer de mama (Tese de doutorado) Campo Grande – MS: Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2019.

Nos últimos anos, a busca por novos agentes experimentais anticancerígenos derivados de produtos naturais ou análogos sintéticos têm sido alvo de pesquisa constante. Em virtude desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antitumoral do lipídio resorcinólico 3-Heptil-3,4,6-trimetoxi-3hisobenzofuran-1-ona (AMS35AA), descrever o mecanismo de morte celular, e seus efeitos quando combinados com quimioterápicos em linhagem tumoral de câncer de mama. O ensaio *in vitro* MTT indicou que o AMS35AA reduziu o efeito citotóxico dos quimioterápicos tamoxifeno, doxorrubixina, cisplatina e irinotecano em 4%, 6%, 2% e 143,3%, respectivamente. Já a citotoxicidade do 5-Fluorouracil (5-FU) foi aumentada pelo composto em 30%. O AMS35AA (14, 281 56, 112 uM) demonstrou genotoxicidade elevando o escore em 2.53x, 2x, 93x, 3.84x e 2.88x, respectivamente e, quando associado ao 5-FU o incremento de danos foi 63.19%. Após 16 horas livre de droga o escore foi elevado a 1.88x, 2x, 2.97x e 2.03x, e quando associada ao 5-FU o incremento foi de 178.72% ($p < 0.05$). A análise citológica após 4 horas de tratamento com AMS35AA demonstrou aumento de morte celular em 2.6x; 2.76x; 3.4x e 2.86x respectivamente, para as mesmas concentrações. Após 16 horas em meio livre de droga, o aumento foi de 1.54x; 2.77x; 2.45x e 2.12x ($p < 0.05$). A associação indicou aumento de 7.4x e 5.96x para os experimentos de 4 h e 4 h seguidos de 16 h, respectivamente. As células MCF-7 foram negativas para o teste de integridade de membrana. A associação induziu acúmulo das células nas fases sub-G1 e G2/M ($p < 0.05$) do ciclo celular. O AMS35AA provocou aumento da expressão de p53 e redução de BAX e a associação aumentou ATR, p53, p21, GADD45, BAK, CASP7 e CASP9 e reduziu BCL-2 ($p < 0.05$). Em síntese, o AMS35AA isolado e em associação com 5-FU reduziu a viabilidade celular, aumentou apoptose e dano genômico, além de fazer parada de ciclo. Nossos resultados sugerem que o AMS35AA tem potencial para o tratamento do câncer de mama, uma vez que é capaz de exercer efeitos citotóxicos e citostáticos na linhagem tumoral de MCF-7 e também pode ser um adjuvante na terapia do câncer quando em combinação com 5-FU.

Palavras-chave: lipídios resorcinólicos; Citotoxicidade; Genotoxicidade; MCF-7

ABSTRACT

Rabacow, A.P.M. The resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of the antitumor potential in breast cancer cell line (Doctorate Thesis) Campo Grande – MS: Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2019.

In recent years, the search for new anticancer experimental agents derived from natural products or synthetic analogues has been the subject of constant research. The aim of this study was to evaluate the antitumor potential of the resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3-isobenzofuran-1-one (AMS35AA), describe the mechanism of cell death, and its effects when combined with chemotherapeutic in breast cancer tumor line. The *in vitro* MTT assay indicated that AMS35AA reduced the cytotoxic effect of the chemotherapeutic agents tamoxifen, doxorubicin, cisplatin and irinotecan by 4%, 6%, 2% and 143.3%, respectively. The cytotoxicity of 5-Fluorouracil (5-FU) was increased by the compound by 30%. AMS35AA (14, 281 56, 112 μ M) demonstrated genotoxicity by raising the score by 2.53x, 2x, 93x, 3.84x and 2.88x, respectively, and when associated with 5-FU the increment of damage was 63.19%. After 16 hours drug free the score was elevated to 1.88x, 2x, 2.97x and 2.03x, and when associated with 5-FU, the increment was 178.72% ($p < 0.05$). Cytological analysis after 4 hours of treatment with AMS35AA demonstrated increased cell death by 2.6x; 2.76x; 3.4x and 2.86x respectively, for the same concentrations. After 16 hours in drug-free medium, the increase was 1.54x; 2.77x; 2.45x and 2.12x ($p < 0.05$). The association indicated an increase of 7.4x and 5.96x for the 4 h and 4 h followed 16 h, respectively. MCF-7 cells were negative for the membrane integrity test. The association induced accumulation of cells in the sub-G1 and G2/M ($p < 0.05$) phases of the cell cycle. AMS35AA resulted in increased p53 expression and BAX reduction and the association increased ATR, p53, p21, GADD45, BAK, CASP7 and CASP9 and reduced BCL-2 ($p < 0.05$). In summary, AMS35AA alone and in combination with 5-FU reduced cell viability, increased apoptosis and genomic damage, and stopped the cellular cycle. Our results suggest that AMS35AA has potential for the treatment of breast cancer since it is capable of exerting cytotoxic and cytostatic effects on the tumoral MCF-7 line and may also be an adjuvant in cancer therapy when in combination with 5-FU.

Keywords: resorcinol lipids; Cytotoxicity; Genotoxicity; MCF-7

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5 - Fluorouracil
AMS35AA	3-Heptil-3,4,6-trimetoxi-3H-isobenzofurano-1-ona
AMS49	3-Heptil-4,6-dihidroxi- 3H-isobenzofurano-1-ona
AR	Alquilresorcinol
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
BAX	Bcl2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro Padrão da Média
GADD45	Proteína induzida ao dano ao DNA e parada do ciclo
IC₅₀	Concentração da droga que reduz a viabilidade celular em 50%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	Jun N-terminal quinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólico
PBS	Solução Tampão Fosfato
RT-PCR	Reverse transcription – Polymerase chain reaction
SBF	Soro Bovino Fetal
SERM	Modulador seletivo dos receptores de estrogênio
TS	Timidilato sintase

LISTA DE TABELAS

Manuscrito - Table I – Oligonucleotides sequences.....32

Manuscrito - Table II – Frequency of cells with DNA damage, class of damage and score of the Comet assay on MCF-7 breast cancer line after 4 hours of treatment with AMS35AA.....37

Manuscrito - Table III – Frequency of cells with DNA damage, class of damage and score of the Comet assay on MCF-7 breast cancer line after 4 hours of treatment with AMS35AA followed by 16 hour free of treatment.....37

LISTA DE ILUTRAÇÕES

Tese - Figura 1 - Anatomia da mama feminina sadia.....	18
Tese - Figura 2 - Tipos de câncer de mama	19
Tese - Figura 3 - Ciclo celular, checkpoints e proteínas reguladoras.....	22
Tese - Figura 4 - Resorcinol (1) e alquilresorcinol (2)	26
Tese - Figura 5 - Síntese do lipídio resorcinólicos AMS35AA por Navarro e colaboradores, 2014.....	28
Manuscrito - Figure 1 – Determination of IC ₅₀ values by MTT.....	33
Manuscrito - Figure 2 -The IC ₅₀ determination of AMS35AA in MCF-7 cells.....	34
Manuscrito - Figure 3 - Effects of AMS35AA when associated with chemotherapeutic agents on cell viability in the MCF-7 breast cancer tumor line using the MTT assay...	35
Manuscrito - Figure 4 - The percentage of apoptotic cells treated with different concentrations of AMS35AA; 5-F and Association in MCF-7 cells for 4 hours and 4 hours followed by 16 hours in drug free medium.	39
Manuscrito - Figure 5 - Cytoplasmic membrane integrity MCF-7 cells assessed by flow cytometry shows a percentage increase for the viable cell population of Control, AMS35AA and AMS35AA + 5-FU.....	36

Manuscrito - Figura 6 - Results of the cell cycle analysis by flow cytometry.....38

Manuscrito - Figure 7 - Relative expression genes involved in DNA-damage and apoptosis.....49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Câncer.....	16
2.2 Câncer de mama.....	17
2.3 Ciclo celular, checkpoints e proteínas reguladoras.....	20
2.4 Abordagem terapêutica	23
2.5 Lipídios Resorcinólicos.....	25
3. OBJETIVOS.....	299
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. MANUSCRITO.....	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
6. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama, uma doença crônica de origem multifatorial, é o segundo tipo mais frequente de neoplasia no mundo, atrás somente do câncer de pele do tipo não melanoma, e uma das principais causas de morte entre as mulheres (MACHADO; SOARES; OLIVEIRA, 2017). No Brasil, o cenário não é diferente e a incidência para o biênio de 2016/2017 foi de mais de 58.000 casos (INCA, 2016).

Por ser um dos mais incidentes, o câncer de mama é um dos cânceres mais estudados pelos pesquisadores em todo o mundo (GONÇALVES et al., 2012) e a linhagem MCF-7 foi a que produziu mais dados até hoje para alicerçar as pesquisas com fins de aplicação na clínica médica do que qualquer outra linhagem tumoral de câncer de mama (LEE; OESTERREICH; DAVIDSON, 2015; SWEENEY et al., 2012).

O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum de câncer de mama. Inicia-se nas células dos ductos, possuindo potencial para invadir tecidos adjacentes (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Com o desenvolvimento do tumor primário, pode ocorrer o processo de angiogênese no qual as células suprem-se de vasos sanguíneos para nutrir-se de acordo com as necessidades metabólicas da massa tumoral. Essa neovascularização possibilita uma rota de fuga pela qual as células tumorais entram no sistema circulatório do organismo podendo atingir órgãos, como por exemplo, ossos, pulmões, fígado, cérebro (LIZOTTE et al., 2016).

Um câncer localizado na mama exige um tratamento mais agressivo que inclua o uso de drogas quimioterápicas, cujo objetivo é a redução da progressão tumoral (BONADONNA et al., 1998). A quimioterapia emprega drogas isoladas ou combinadas para o tratamento sistêmico de neoplasias que inibem o processo de crescimento e divisão celular (CLEATOR; PARTON; DOWSETT, 2002). Como exemplos de drogas utilizadas na terapêutica contra o câncer mamário pode-se mencionar: tamoxifeno, doxorrubicina, cisplatina, 5-fluorouracil (5-FU), gencitabine, irinotecano, paclitaxel, dentre outras (OSBORNE, 2014).

Vale ressaltar que as terapias atuais, incluindo cirurgia, quimioterapia, terapia hormonal e radioterapia, não são seletivas no tratamento do câncer de mama primário e metastático, provocando importantes efeitos colaterais (MUEHLMANN et al., 2014). Sendo assim, os fármacos utilizados na terapêutica atuam sem especificidade, provocando citotoxicidade, destruindo ou inibindo não apenas as células neoplásicas,

como também as células normais do paciente (LEJEUNE et al., 1996). Ademais a resistência à terapêutica é comum no tratamento de quaisquer subtipos de neoplasia mamária (FERTIG et al., 2015).

Mediante ao exposto, pesquisas com enfoque em novas abordagens terapêuticas para o tratamento de câncer revestem-se de relevância. Derivados naturais e sintéticos são pesquisados como fontes de compostos bioativos de diferentes classes com diversas atividades. Estudos com lipídeos resorcinólicos não isopropênicos ou alquilresorcinóis, tais como o 3-Heptil-3,4,6-trimetoxi-3H-isobenzofurano-1-ona (AMS35AA) (NAVARRO et al., 2014) e o 3-Heptil-4,6-dihidroxi-3H-isobenzofurano-1-ona (AMS49) (OLIVEIRA et al., 2015) tiveram suas ações anticânceres sugeridas pelo nosso grupo de estudo. Estes compostos têm em comum a capacidade de aumentar a frequência de apoptose nos rins e fígado dos animais tratados. Além disso, AMS35AA e AMS49 não são tóxicos considerando que eles não induzem cometas ou micronúcleos em células de animais saudáveis e potencializam os efeitos genotóxicos da ciclofosfamida. Ademais, esses compostos não alteraram os parâmetros biométricos, peso absoluto e relativo, dos órgãos de camundongos, o que sugere ausência de toxicidade (NAVARRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Dessa forma, o AMS35AA e o AMS49 podem ser candidatos à prospecção de novos quimioterápicos ou adjuvantes quimioterápicos.

Ressalta-se ainda que o AMS35AA foi efetivo imunomodulador, aumentando o número de linfócitos circulantes, uma atividade interessante, visto que, um dos efeitos colaterais induzido pelo uso de quimioterápicos é a acentuada linfopenia (NAVARRO et al., 2014). Em geral, esta redução de linfócitos pode impedir a sequencia do tratamento de pacientes com câncer e o AMS35AA foi eficiente em reverter esse quadro frente à administração da ciclofosfamida.

Diante desses relatos, as perguntas que esse trabalho procurou responder foram: qual o potencial antitumoral do AMS35AA isolado e combinado com agentes quimioterápicos comerciais e qual o mecanismo de morte celular em linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

O câncer é a terceira principal causa de mortalidade no mundo. Foram diagnosticados 14,71 milhões de novos casos somente em 2012 (INCA, 2016). O Fundo Mundial de Estatísticas do Câncer (WCRF) fez uma projeção de 27 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2035 e 24 milhões de mortes pela doença. Os países em desenvolvimento serão os mais afetados, entre eles o Brasil (MINKO; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ; POZHAROV, 2013; WHO, 2017).

O processo de tumorigênese depende do acúmulo sequencial de mutações dentro de células que tiveram sua capacidade de reparar os danos no DNA comprometida. Esses desajustes celulares são devidos às alterações moleculares em vias de sinalização oncogênica ou em vias de sinalização de genes supressores de tumor (HAHN; WEINBERG, 2002). Diferentes combinações de mutações e até eventos resultantes de alterações epigenéticas são capazes de contribuir para a transformação neoplásica, sendo este processo uma característica comum para mais de 100 tipos de cânceres humanos (SAWAN et al., 2008). As modificações moleculares que ocorrem durante esse processo podem conferir maior potencial proliferativo; replicação descontrolada; imortalidade das células; insensibilidade a sinais supressores de crescimento; indução da angiogênese; reprogramação do metabolismo energético; instabilidade genômica e mutabilidade; fuga à destruição imunológica; promoção da inflamação; evasão à apoptose; capacidade de invadir tecidos adjacentes e promover metástases (VIDEIRA; REIS; BRITO, 2014).

Embora uma célula tumoral possa abrigar milhares de alterações genéticas, apenas as células que apresentam fatores de crescimento seletivo, como a presença de alguns receptores, podem sofrer a transformação maligna e a progressão tumoral (KITAMURA; QIAN, 2015). Os genes que se alteram no desenvolvimento e progressão de uma neoplasia ainda estão sendo objeto de intensa investigação. A identificação de tais genes levou a buscas mais detalhadas dos mecanismos fisiológicos que controlam a proliferação celular. Os subprodutos dos genes envolvidos no processo tumoral estão relacionados a atividades como regulação do ciclo celular, transmissão de sinais de crescimento, regulação da diferenciação e morte celular e designação da imortalidade celular. De maneira geral, a alteração dos

genes ocorre nas células somáticas. No entanto, em casos raros, pode advir de predisposição genética (STADLER et. al., 2010).

Em muitos casos de formação de tumor há uma ligação direta entre o efeito do carcinógeno e mutações específicas, como a ativação do oncogene KRAS ou a desativação do gene supressor tumoral p53. A exposição à radiação ionizante é também causa de câncer com ligação a prejuízos genéticos. Muitos dados associam casos de câncer decorrentes de radioterapias e quimioterapias usadas no tratamento de malignidades em fase inicial (LANE, 1992).

Conseqüentemente, o câncer surge do ganho de sinais proliferativos e da perda de genes que inibem a proliferação celular (WHYTE et al., 1988).

2.2 Câncer de mama

A glândula mamária é um órgão par situada na parede anterior do tórax sobre o músculo peitoral maior (Figura 1). O tecido mamário é um parênquima epitelial formado pelos sistemas lobular e ductal, envolvidos por tecido conjuntivo fibroso e adiposo, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (LOUISA; SANDRA; BETH, 2007). O sistema lobular é formado pelos lobos mamários que são unidades da mama, em números de 10 a 20, e são constituídos pelo agrupamento de inúmeros lóbulos (pequenas formações saculares reunidas em número de 10 a 100). Já o sistema ductal é constituído por um ducto principal e suas ramificações intra e extralobulares (DILLON D; GUIDI AJ, 2014).

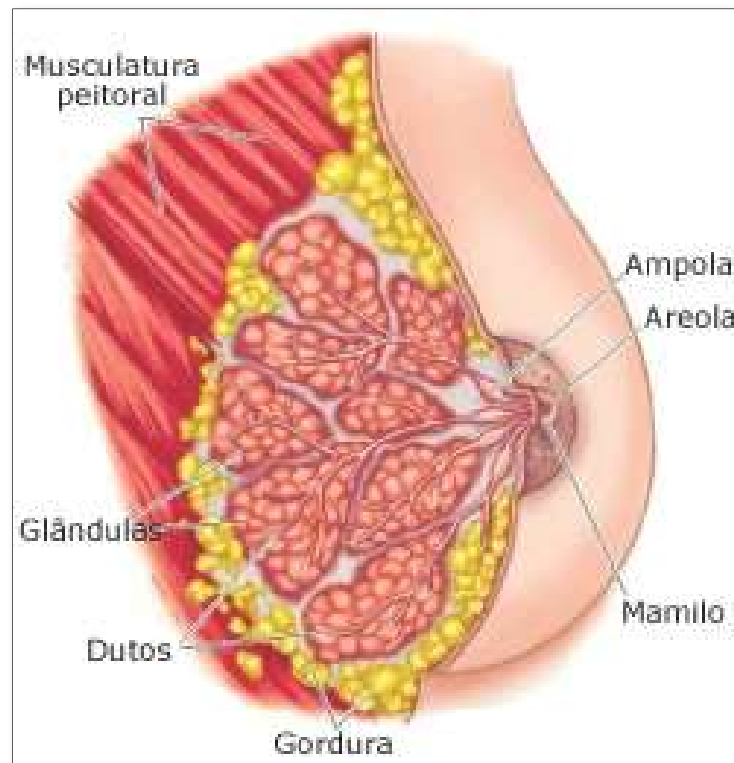


Figura 1. Anatomia da mama feminina sadia Fonte: BONTRAGER, 2011.

O câncer de mama constitui um importante problema de saúde pública em todo o mundo, sendo esta a neoplasia maligna de maior incidência (43,3/100.000 mulheres) e mortalidade (12,9/100.000) entre as mulheres, com cerca de 1,7 milhão de novos casos somente em 2012 (STEWART; WILD, 2014; WHO, 2017).

A etiologia dessa neoplasia é variada e é influenciada tanto por causas genéticas como por fatores externos, como o ambiente e o hábito de vida. Além desses fatores de risco, o carcinoma de mama pode desenvolver-se devido a elementos endócrinos e à história reprodutiva (ELLSWORTH et al., 2010; TIEZZI, 2009).

Existem diversos tipos de câncer mamário, agrupados em invasivos e não invasivos (Figura 2). O mais frequente é o carcinoma, classificado em ductal ou lobular. Se a malignidade for local, o carcinoma é denominado *in situ*. No entanto, se as células malignas penetram o tecido exterior dos lóbulos ou dos canais, é infiltrante ou invasivo. O carcinoma ductal invasivo, que se inicia nas células dos ductos podendo invadir tecidos adjacentes representa 80% de todos os carcinomas da mama (DILLON DA; GUIDI AJ, 2014).

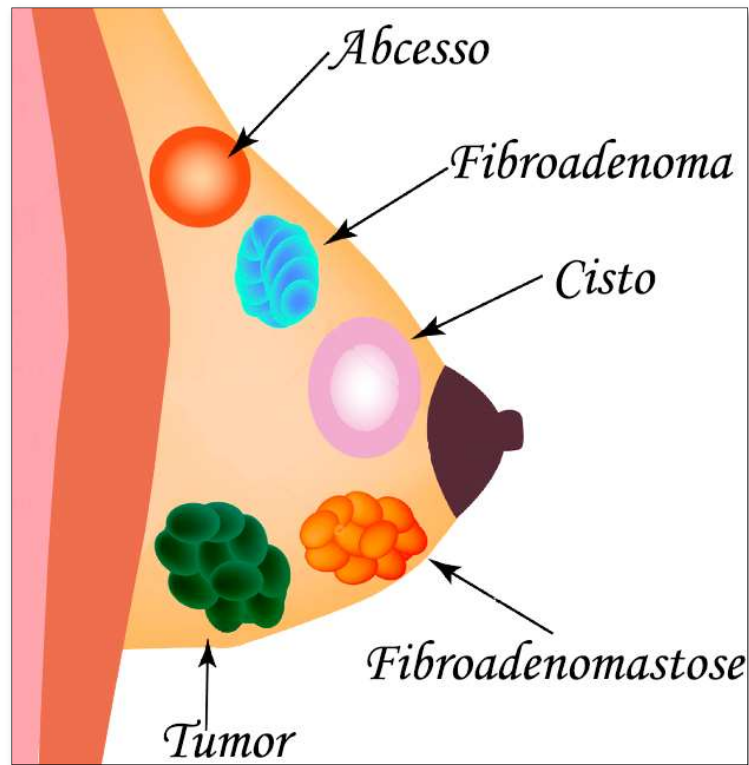


Figura 2. Tipos de câncer de mama. Fonte: DILLON DA; GUIDI AJ, 2014.

Em regiões de poucos recursos, a maioria dos pacientes é diagnosticada em estágio avançado e nessas condições a sobrevida pode variar entre 10 a 40% (STEWART; WILD, 2014). Além disso, 20 a 30% das pacientes podem apresentar recidiva do câncer de mama, o que leva a uma maior probabilidade de desenvolvimento de metástase (LOBBEZOO et al., 2015).

Tratando-se, dessa forma, de uma doença de significativa preocupação para a saúde pública faz-se necessário providências que levem à redução do número de óbitos, bem como o aprimoramento no tratamento, melhorando sua eficácia sem aumentar os efeitos colaterais.

2.3 Ciclo celular, checkpoint e proteínas reguladoras

A progressão desregulada do ciclo celular caracteriza o processo tumoral e, por isso, tem sido foco de pesquisa para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos (DE ALMEIDA et al., 2005).

O mecanismo de divisão celular é precisamente coordenado com a progressão de uma fase para outra por meio de uma maquinaria bioquímica ligada a sinais extracelulares de controle de crescimento e proliferação. A maior parte dos mecanismos envolvidos na evolução de uma célula normal para potencialmente maligna está relacionada a interferência no ciclo celular (HAHN; WEINBERG, 2002).

O ciclo celular pode ser dividido em cinco fases: G1, S, G2, M e G0. A fase G1 (gap 1); a fase S (síntese de DNA); G2 (gap 2); a fase M (mitose); e G0 (repouso) representado na figura 3. Pode-se ainda dividir o ciclo em duas partes, a interfase e a mitose (BARR; GRUNEBERG, 2007).

A interfase é a preparação para a divisão da célula, onde é realizada a síntese de componentes e da qual fazem parte as fases G1, S e G2. A fase G1 é a mais variável em termos de duração, é o período durante o qual a célula sintetiza RNA e proteínas. A fase S é a fase em que ocorre a síntese de DNA, e tem uma duração média de 8 horas. A fase G2 tem uma duração relativamente constante, variando entre 30 a 90 minutos (BASERGA, 1965). Durante esta fase a síntese de RNA e proteínas mantém-se, mas não há síntese de DNA. A fase M começa com a mitose, que se inicia na profase e termina na telofase. Durante este período não há síntese de DNA, a síntese de proteínas é reduzida ao mínimo e a síntese de RNA está limitada ao início da prófase e à telofase tardia (MALUMBRES & BARBACID, 2001).

Completada a divisão celular, as células retornam para fase G0 (repouso). Contudo, células tumorais, após terminarem seu processo de replicação não retornam para G0 e sim para fase G1, preparando-se novamente para entrar em divisão celular (DE ALMEIDA et al., 2005).

A mitose abrange cinco fases - profase, prometafase, metafase, anafase e telofase. Na profase há início da condensação da cromatina, o nucléolo desaparece e inicia-se a formação do fuso mitótico pelos centrossomas, movendo-se para os pólos da célula. A prometafase inicia-se com a ruptura do envelope nuclear. Os microtúbulos do fuso mitótico e os cinetócoros se ligam e se associam aos

centrossomas, e há movimento dos cromossomas para a zona equatorial da célula, formando a placa metafásica. A célula encontra-se na metáfase até que todos os cromossomas estejam alinhados, e em seguida, na anáfase, os cromossomas são segregados para pólos opostos. Na telófase o DNA inicia a descondensação e faz-se constricção da região mediana do fuso. Após esta fase a célula sai de mitose num processo coordenado com a citocinese, conduzindo à divisão completa em duas células (BARR; GRUNEBERG, 2007).

A passagem de uma fase para outra, ocorre apenas após ativação dos “checkpoints” (Figura 3), que são pontos de checagem regulados por proteínas que conduzem a célula a apoptose quando não há condição favorável de replicação. A falha ou mutação de alguma dessas proteínas pode levar ao surgimento de tumores (GALLORINI; CATALDI; DI GIACOMO, 2012). Os pontos de checagem ocorrem predominantemente em G1, na transição G1/S; G2 na transição G2/M e na mitose, na transição metáfase/anáfase (MALUMBRES; BARBACID, 2005).

A regulação nesses pontos de checagem é exercida por diversas moléculas, dentre as quais se destacam as ciclinas, as proteínas quinase dependentes de ciclinas (CDK) e os inibidores das quinase-ciclina CDKI. As atividades das CDK são contrabalanceadas pelas CKIs, que incluem os inibidores universais como o P21, P27, e P57 que atuam em vários períodos do ciclo celular (SCHWARTZ; SHAH, 2005).

Outro componente envolvido no ponto de checagem e no reparo de erros no DNA é o fator de transcrição p53. Quando ocorrem danos irreparáveis à molécula de DNA o p53 pode ativar a transcrição de vários genes envolvidos no controle celular como o p21, Gadd45, BAX, APAF-1, PTEN, PUMA (KLEIN, 2004; RESNICK; INGA, 2003). A ativação de p53 em resposta ao agente carcinogênico ocorre através da ATM (ataxia-telangiectasia mutante) quinase e as respectivas quinases no sentido do fluxo, CHK1 e CHK2. A proteína p53 é um supressor tumoral codificado pelo gene TP53 e é um importante regulador do ciclo celular, atuando sobre o crescimento, multiplicação, proliferação, apoptose e, estabilidade cromossomal (LIU et al., 2014).

Tal gene encontra-se mutado em 50% de todos os tumores e no de mama são observadas mutações em 18%-25% dos tumores primários (SCHON e TISCHKOWITZ, 2017).

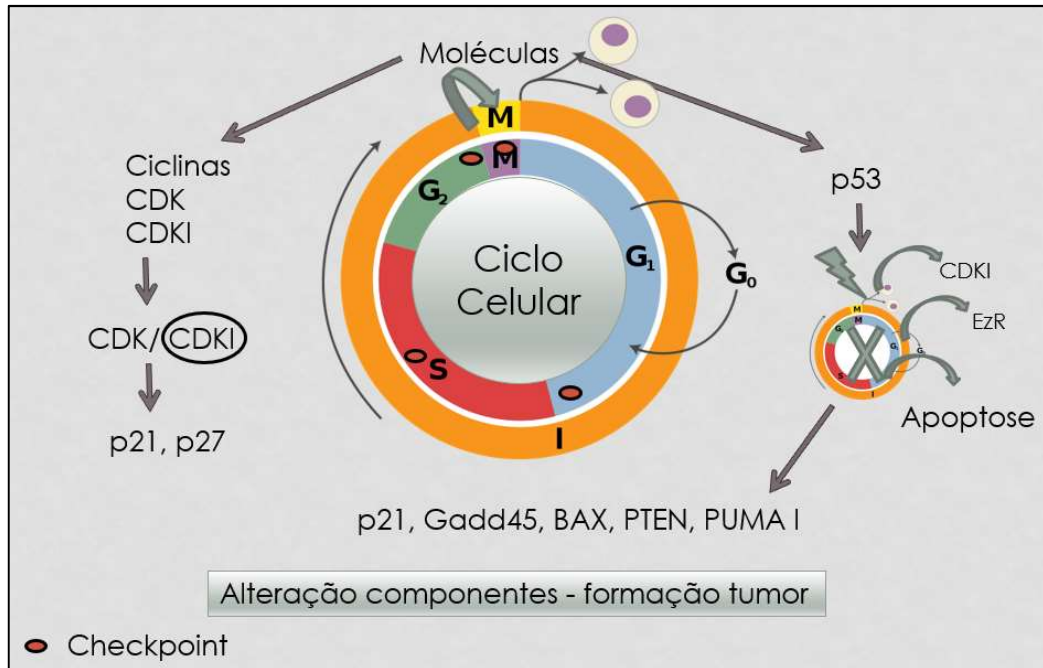


Figura 3. Ciclo celular, checkpoints e proteínas reguladoras. Fonte: Adaptado de Celcyclus oefenen, 2018.

A p53 desempenha um papel importante no prognóstico do câncer de mama. Sua super expressão resulta em um fenótipo mais agressivo, tumores pouco diferenciados, altas taxas de proliferação e de grau histológico e nuclear, o que leva a um mal prognóstico, diminuindo significativamente a sobrevida global, principalmente nos pacientes com tumores basais (YADAV et al., 2015). Apesar de tais características, tumores que superexpressam TP53 têm mostrado boa resposta à quimioterapia (BERTHEAU et al., 2013).

A proteína p21 também tem sido alvo de pesquisa em câncer com base em sua expressão seletiva em tumores, mas não em tecidos normais. A p21 é induzida por mecanismos independentes e dependentes de p53 atuando em ambas as funções, tanto como supressor tumoral, provocando parar de ciclo celular, quanto na apoptose (XIA, M. et. al, 2011).

As vias de apoptose desreguladas observadas em cânceres humanos frequentemente resultam da superexpressão de proteínas antiapoptóticas, podendo iniciar um câncer quando há a regulação positiva de variantes pró-cancerígenas provenientes de genes apoptóticos (FIEBIG, 2013). A indução da apoptose ocorre por

meio de duas vias principais: a via extrínseca (receptor de morte) e a via intrínseca (mitocôndria). A via apoptótica intrínseca está sob o controle das pró-enzimas mitocondriais. A maioria das mortes celulares em vertebrados ocorre através da via mitocondrial da apoptose (LLAMBI, 2011). Esta via é controlada pela família de proteínas BCL-2 (B-cell CLL/linfoma 2) e regulam a integridade da membrana externa mitocondrial. Quando a apoptose surge como resultado da cooperação entre estas proteínas, as duas proteínas efetoras pró apoptóticas: BAX (BCL-2-associated X protein) and BAK (BCL-2 antagonistic killerproteína X associada a BCL-2 rompe a membrana externa mitocondrial em um processo conhecido como 'permeabilização da membrana externa mitocondrial' (MOMP) (YADAV et al., 2015). Se o MOMP ocorre, as proteínas localizadas no compartimento inter-membrana mitocondrial entram no citosol e ativam caspases e proteases de cisteína que coordenam a desmontagem da célula. O MOMP é combatido pelas proteínas pró-sobrevivência BCL-2, como BCL-2, BCL-W, BCL-xL, A1/Bfl1 e MCL-1, que impedem a capacidade de BAX e BAK de permeabilizar a membrana mitocondrial externa (LLAMBI, 2011).

Modificações nos componentes do ciclo celular e nas vias de sinalização de checkpoint incidem na maioria dos tumores, resultantes da alteração de oncogenes e genes supressores tumorais, os quais têm fundamentais implicações na otimização de regimes terapêuticos e na seleção de novos alvos que atuam no ciclo celular (STEWART; WESTFALL; PIETENPOL, 2003).

2.4 Abordagem terapêutica

No câncer de mama, por ser uma doença sistêmica, a quimioterapia é recomendada em todos os tipos, diferente dos demais carcinomas cujos tratamentos são escolhidos de acordo com o tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos, margens cirúrgicas e/ou receptores hormonais (INCA, 2016).

Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer de mama incluem os agentes alquilantes, os antimetabólitos, as platinas, os inibidores mitóticos, dentre outros (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010). Apesar dos progressos no tratamento, os medicamentos quimioterápicos possuem um índice terapêutico estreito, o que não possibilita muitas vezes a administração de uma

quantidade suficiente de droga para obtenção da eficácia máxima (SENKUS et al., 2015).

O Tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrogênio. Ele é utilizado para o tratamento de câncer de mama em estágios iniciais ou avançados (JAIYESIMI et al., 1995). Seu mecanismo de ação se deve a concorrência pelo: a) sítio de ligação de receptores de estrogênio α : presentes nos tecidos do aparelho reprodutivo e mamas, e responsáveis pela mediação do desenvolvimento sexual e função reprodutiva; b) sítio de ligação de receptores de estrogênio β presentes no ovário e cérebro. Sua eficácia no câncer de mama é devida a essa ação antagonista, impedindo que o estrogênio estimule a produção de RNA e proteínas intracelulares, inibindo a propagação de células neoplásicas (DOWSETT et al., 2010).

A Doxorubicina, uma antraciclina, é atualmente um dos mais potentes e mais utilizados antineoplásicos, tanto na forma isolada quanto na poliquimioterapia (ROMERO et al., 2015). É um antibiótico antineoplásico citotóxico amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos. As antraciclinas causam danos irreversíveis às células, por se intercalarem com a dupla fita de DNA, inibir a síntese de proteína e produzir espécies reativas de oxigênio, provocando a morte celular (BODLEY et al., 1989).

A Cisplatina, um composto platinado, tem o uso limitado pelo seu efeito tóxico, e por essa razão, é incluída no arsenal terapêutico somente quando o câncer de mama torna-se metastático (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003). Ela exerce seus efeitos citotóxicos por meio de interações covalentes com as bases púricas do DNA, levando a formação de adutos intra e intercadeias os quais inibem a replicação e a transcrição e ativam vias de transdução de sinais que culminam em parada do ciclo celular e apoptose (TANIDA et al., 2012).

O Irinotecano, um análogo semi-sintético da Camptotecina, por ser extremamente tóxico é empregado apenas em câncer de mama inoperável ou recorrente. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da enzima Topoisomerase I, levando a quebras de fitas no DNA que resulta em parada de ciclo culminando em morte celular (SOORYAKUMAR et al., 2011).

O 5- Fluorouracil é um análogo da base pirimidina uracil, que tem seu Hidrogênio da posição 5 substituído por um átomo de flúor. É um antimetabólito, ou

seja, uma molécula com estrutura bioquímica semelhante a um metabólito necessário para as reações naturais do organismo, sendo sua similaridade suficiente para ser reconhecida pelo mesmo, mas insuficiente para a manutenção das funções normais, e, portanto, altera o metabolismo celular, o que inclui a divisão celular. Quando administrado em associação com outros agentes quimioterápicos, melhora a sobrevida de pacientes com câncer (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). O 5-FU exerce seu mecanismo de ação de duas maneiras: inibindo a atividade da enzima timidilato sintase (TS) ou incorporando-se ao DNA e/ou RNA. Após a administração, o 5-FU penetra imediatamente nas células gerando os compostos trifosfato de fluorouridina (FUTP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) ou monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP). O FUTP é incorporado ao RNA e provoca redução da sua estabilidade com perda funcional e morte celular (SAVVA-BORDALO et al., 2010). FdUTP é incorporado pelo DNA alterando a estabilidade e reparo e promovendo assim quebras nas fitas. Por sua vez, o metabólito ativo FdUMP liga-se a enzima TS inibindo sua atividade (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; NOORDHUIS et al., 2004).

Devido à inespecificidade das drogas antineoplásicas em relação às células tumorais, os quimioterápicos atingem também as células saudáveis, principalmente as que se multiplicam constantemente, provocando reações adversas. Sendo assim, o grande desafio para o tratamento de cânceres é a distinção entre essas células. Nesse contexto, agentes que demonstram seletividade são de grande valia para estudos mais arraigados, sendo eles de origem natural ou sintética, por esse motivo, a síntese orgânica tem focado para o desenvolvimento de drogas cada vez mais potente e mais específica (SIEGEL et al., 2017).

2.5 Lipídeos resorcinólicos

Substâncias ativas originadas de fontes naturais são utilizadas há muito tempo no tratamento de enfermidades. Um amplo espectro dos medicamentos encontrados no mercado é derivado direta ou indiretamente (como modelo de síntese para gerar um pró-fármaco para o desenvolvimento de novos agentes) de produtos vegetais, micro-organismos, organismos vertebrados e invertebrados (CHIN et al., 2006). Na busca por esses novos medicamentos são envolvidos diversos conhecimentos que

vão desde aspectos agrônômicos, botânicos, químicos e toxicológicos (PARIKKA; WÄHÄLÄ, 2009).

Consonante a este fato, os derivados resorcinólicos ou alquilresorcinóis representam substâncias de importante interesse farmacológico e o estudo de suas propriedades continua em evidência (Figura 4). Estes agentes constituem uma classe de compostos bioativos que são amplamente distribuídos na natureza, sendo produzidos por bactérias, protozoários, algas, plantas e animais, com grande variedade de potencial biológico e industrial (KOZUBEK; TYMAN, 1999). No entanto, podem ser também de origem sintética apresentando características específicas em diversos ensaios e modelos experimentais (DE ARAÚJO et al., 2017; NAVARRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

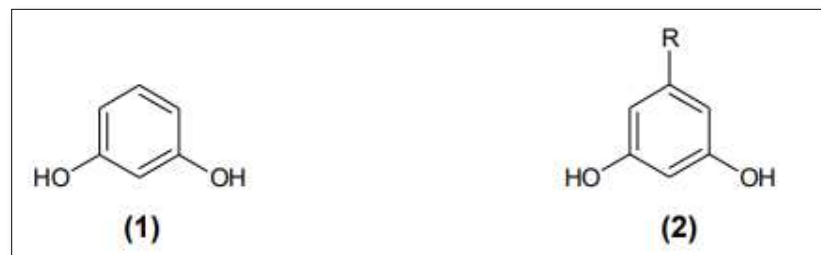


Figura 4. Resorcinol (1) e alquilresorcinol (2) Fonte: KOZUBEK; TYMAN, 1999.

Em geral, essa classe de lipídios tem cadeia lateral variando entre C-5 e C-27 podendo ser saturados ou insaturados, ex. mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexano. O anel aromático pode conter um grupo metila (metilcardol) e as hidroxilas podem ser mono ou dimetiladas e diacetiladas. Alguns exibem um grupo carboxila, esterificado ou livre, entre as hidroxilas. Esta classe de lipídeos possui propriedades anfifílicas que são atribuídas à presença de cadeias laterais não isoprenóides diretamente ligadas ao anel hidróxibenzeno permitindo assim a interação com a bicamada lipoproteica, formação de lipossomos e proteção contra estresse oxidativo (KOZUBEK; TYMAN, 1999). Também apresentam propriedades inibidoras de crescimento celular, tal como de células tumorais (BARBINI et al., 2006; NAVARRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; SALADINO et al., 2000).

A primeira espécie em que os lipídios resorcinólicos foram encontrados foi a *Ginkgo biloba*, que por sua vez demonstrou intensa atividade antitumoral. Posteriormente sua ocorrência foi verificada em outras famílias de plantas superiores, tais como Proteaceae, Myrsinaceae, Primulaceae, Miristicaceae, Iridaceae, Araceae, Asteraceae, Leguminosae e Gramineae (ITOKAWA et al., 1989). Mais adiante, estudos verificaram que esse lipídio e derivados isolados do óleo de farelo de trigo são componentes ativos para a prevenção do câncer de cólon, com efeito inibidor em células cancerosas (ZHU et al., 2011). Recentemente um estudo da substância 1-O-Metil-6-acetoxi-5(Z)-(pentadec-10-enil) resorcinol isolado de *Labisia pumila* mostrou atividade citotóxica em células cancerosas da mama, cólon e próstata (AL-MEKHLAFI et al., 2012).

As citosporonas e seus análogos são lipídios resorcinólicos isolados dos fungos *Cytospora sp.* e *Diaporthe sp.* Essas substâncias têm atraído a atenção de pesquisadores devido ao seu potencial biológico com atividades fungicidas, alelopáticas, bactericidas e citotóxicas. Nessa perspectiva as citosporonas são alvo de estudo do nosso grupo de pesquisa nos quais demonstramos que os compostos 3-Heptil-3,4,6-trimetoxi-3H-isobenzofurano-1-ona (AMS35AA) (NAVARRO et al., 2014) e 3-Heptil-4,6-dihidroxi-3H-isobenzofurano-1-ona (AMS49) (OLIVEIRA et al., 2015) possuem capacidade terapêutica para o tratamento do câncer.

Em 2008, foi descrito que a citosporona B se liga especificamente ao domínio de ligação do receptor órfão nuclear Nur77 causando apoptose; e por isso alguns grupos de pesquisa concentraram esforços tentando sintetizar citosporonas desde então (ZHAN et al., 2008).

O lipídio resorcinólico sintético AMS35AA (3) foi sintetizado por Navarro e colaboradores em 2014 a partir da citosporona (2), que foi preparada por acilação do ácido dimetoxibenzóico (1) com cloreto de octanoílo com 93% de rendimento. Os isômeros (3) e (4) foram obtidos após o tratamento de (2) com metanol na presença de NaBH₄ a temperatura ambiente durante 72 horas, produzindo 31% para (3) - AMS35AA e 40% para (4) - AMS35BB (Figura 5).

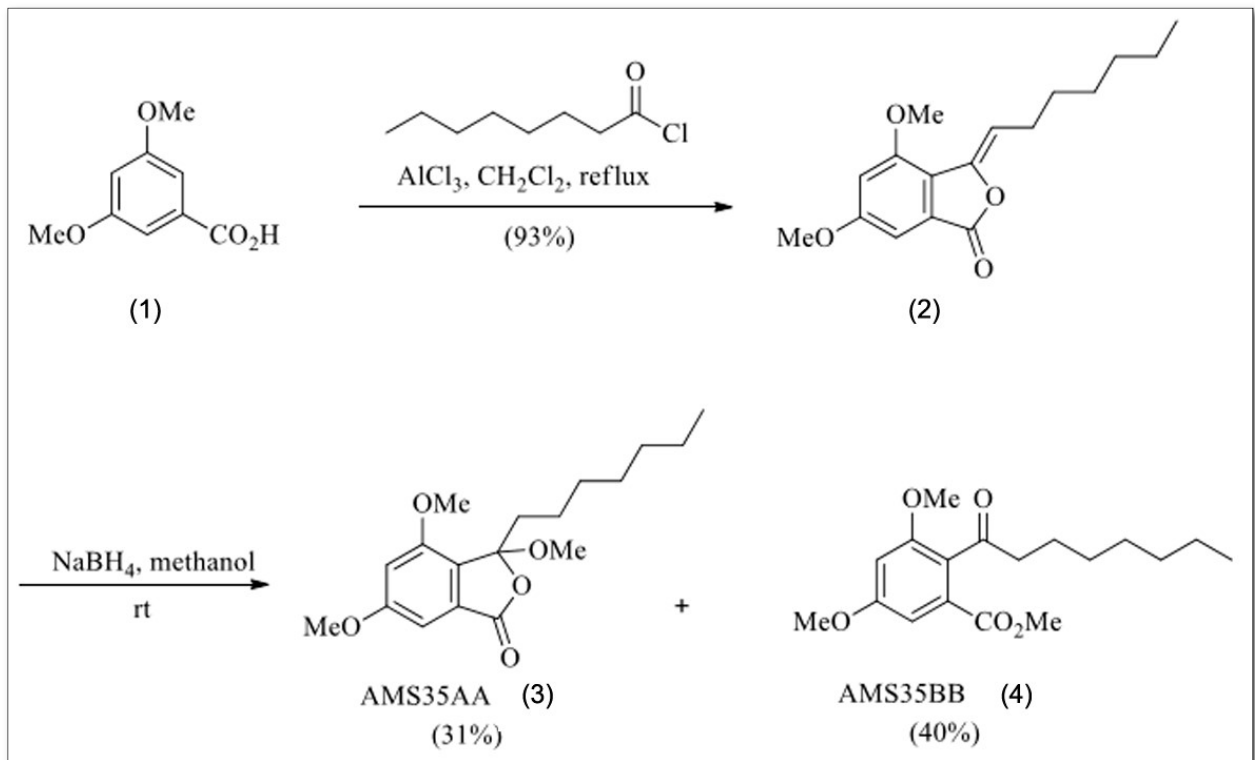


Figura 5. Síntese do lipídio resorcinólicos AMS35AA. Fonte: Navarro e colaboradores, 2014.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antitumoral, descrever o mecanismo de morte celular e os efeitos do 3-heptil-3,4,6-trimetoxi-3 hisobenzofurano-1-ona em combinação com diferentes quimioterápicos comerciais na linhagem tumoral de adenocarcinoma mamário MCF-7.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade citotóxica do AMS35AA pelo ensaio de MTT;

Investigar os efeitos combinatórios do AMS35AA e diferentes agentes antitumorais comerciais (tamoxifeno, doxorubicina, cisplatina, 5-fluorouracil e irinotecano);

Verificar a capacidade do AMS35AA em causar danos no DNA e morte celular por apoptose;

Verificar os efeitos do AMS35AA sobre a integridade de membrana e sua influência sobre o ciclo celular;

Descrever o mecanismo de morte celular induzido pelo AMS35AA;

Investigar os efeitos do AMS35AA sobre a expressão de genes relacionados a danos no DNA (ATR, p53, GADD45 e p21) e morte celular por apoptose (BAK, BAX, CASP6, CASP7, CASP9 e BCL-2).

4. MANUSCRITO

A presente pesquisa gerou um artigo no periódico internacional **Anticancer Research**.

RABACOW, A.P.M.; MEZA, A.; OLIVEIRA, E. J. T.; VITOR, N.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; MATOS, M. F. C.; GOMES, R. S.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A.; OLIVEIRA, R. J. The resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3*H*-isobenzofuran-1-one: evaluation of the antitumor potential in breast cancer cell line. **Anticancer Res**, v. 38, p. 4565 – 4576, 2018

Evaluation of the Antitumor Potential of the Resorcinolic Lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one in Breast Cancer Cells

ANA PAULA MALUF RABACOW^{1,2}, ALISSON MEZA³, EDWIN JOSÉ TORRES DE OLIVEIRA^{1,4}, NATAN DE DAVID¹, NEIMAR VITOR³, ANDRÉIA CONCEIÇÃO MILAN BROCHADO ANTONIOLLI-SILVA^{1,2}, MARIA DE FÁTIMA CEPA MATOS⁵, RENATA TRENTIM PERDOMO⁵, ROBERTO DA SILVA GOMES⁶, DÊNIS PIRES DE LIMA^{3,7}, ADILSON BEATRIZ^{3,7} and RODRIGO JULIANO OLIVEIRA^{1,2,7*}

¹*Stem Cell Study Center, Cell Therapy and Toxicological Genetics - CeTroGen, Maria Aparecida Pedrossian University Hospital - HUMAP, Brazilian Hospital Services Company - EBSEH, Federal University of Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brazil;*

²*Post-graduate Program in Health and Development in the Central-West Region, Dr. Hélio Mandetta Medical School – FAMED, Federal University of Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brazil;*

³*Post-graduate Program in Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brazil;*

⁴*Post-graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Center for Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina/PR, Brazil;*

⁵*Laboratory of Molecular Biology and Cell Cultures, Federal University of Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil;*

⁶*Faculty of Exact Sciences and Technology - FACET, Federal University of Grande Dourados – UFGD, Dourados, MS, Brazil;*

⁷*Master Program in Pharmacy, Center for Biological and Health Sciences - CCBS, Federal University of Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brazil*

Abstract. *Background/Aim:* In recent years, the search for new anticancer experimental agents derived from natural products or synthetic analogues, such as resorcinolic lipids, has received increased attention. The present study aimed to evaluate the antitumor potential, describe the cell death mechanism and the effects of 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one (AMS35AA) in combination with different chemotherapeutic agents in the MCF-7 cell line. *Materials and Methods:* Analysis of cytotoxic, genotoxic, membrane integrity, cell death and gene expression induced by the compound was performed. *Results:* The AMS35AA

and its association with 5-FU demonstrated reduction of cell viability; increase of cell death; enhancement of genomic damage and accumulation of cells in G₂/M phase. *Conclusion:* AMS35AA has potential for breast cancer treatment since it is capable of exerting cytotoxic and cytostatic effects in a breast cell line and also could be an adjuvant in cancer therapy when combined with 5-FU.

Non-isopropenic resorcinolic lipids or alkylresorcinols (ARs) agents are widely distributed and are being produced by bacteria, protozoa, algae, plants and animals (1). They are amphiphilic in nature due to the non-isoprenoid side chains attached to the hydroxybenzene ring and are believed to be also derived from the polyketide (acetate) pathway. In general, these resorcinolic lipids have a long carbon chain, varying between C-5 and C-27 being able to be saturated or unsaturated, e.g. mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexane linked to a resorcinol ring, with one or both hydroxyls methylated. The aromatic ring may contain a methyl (methylcardol) group and the hydroxyls may be mono or dimethylated and diacetylated. Some exhibit a carboxyl group, esterified or free, between the hydroxyls (2).

Correspondence to: Rodrigo Juliano Oliveira, Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica - CeTroGen. Avenida Senador Felinto Müller, n 355, Bairro Vila Ipiranga CEP: 79080-190 Campo Grande, MS, Brazil. Tel: +55 6733453068, CeTroGen: 55 67984346510, e-mail rodrigo.oliveira@ufms.br

Key Words: Resorcinolic lipids, cytotoxicity, genotoxicity, breast cancer, 5-FU, qPCR.

Among the resorcinolic lipids those that stressed relevance are the 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one (AMS35AA) (3), the 3-Heptyl-4,6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one (AMS49) (4) and the 3-hexyl-5,7-dimethoxy-isochromen-1-one (isocoumarin) (5). These compounds share the ability to increase the frequency of apoptosis in the kidneys and liver of treated animals. In addition, AMS35AA and AMS49 did not show any toxicogenicity, considering that they do not induce micronuclei and they further potentiate the genotoxic effects of cyclophosphamide (3, 4). On the other hand, isocoumarin has genotoxic action (increases comet frequency and micronuclei) and at the same time has antigenotoxic action against damage induced by cyclophosphamide and cisplatin (5). Thus, it is perceived that AMS35AA and AMS49 are candidates as new chemotherapeutics and adjuvants, which was not occurred in the isocoumarin experiment because it reduced the commercial drug effects.

We further emphasize that AMS35AA was effective in causing immunomodulation and consequently in increasing the number of lymphocytes. In general, the reduction of lymphocytes in patients treated with chemotherapy is an undesirable adverse effect that prevents the treatment of patients with cancer. Thus, we chose to use AMS35AA in combination with commercial chemotherapeutics. The present study evaluated the effects of AMS35AA in combination with the chemotherapeutic agents: tamoxifen, doxorubicin, cisplatin, 5-fluorouracil and irinotecan with respect to ability to induce cytotoxicity and cell death in MCF-7 mammary adenocarcinoma cells.

Materials and Methods

Chemical agents. The following chemotherapeutics agents were used: tamoxifen (Sanofi Aventis; Paris, France); doxorubicin (Bergamo; Bergamo, Italy); cisplatin (Gunther, São Paulo, Brazil); 5-fluorouracil (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and irinotecan (Janssen Beersse, Belgium®). The resorcinolic lipid AMS35AA (3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one), the test compound, was obtained as previously described by Navarro, *et al.* (2014) (3).

Cell line and culture conditions. MCF-7 cells, human breast adenocarcinoma cell line was used in this study. The cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Gibco® Life Technologies, CA, USA), 0.1% penicillin/streptomycin (10,000 U, 30110-01, LGC® (Gibco® Life Technologies).

Cell viability assay. The cytotoxic potential of AMS35AA was evaluated by the MTT colorimetric test performed as described by Pesarini *et al.* (2017) and Schweich *et al.* (2017), with modifications (6, 7). Cells were seeded at a density of 3×10³ in 96 well culture plates in a supplemented DMEM medium and

incubated in 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 24 h for adherence and stabilization. Thereafter, the treatments were performed for 72 h in supplemented DMEM culture medium: A) for the determination of IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration) of the chemotherapeutic agents; a.1) tamoxifen (2.5; 5; 7.5; 10; 20 µM); a.2) doxorubicin (0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 µM); a.3) cisplatin (2.5; 5.0; 10; 25; 50 µM); a.4) 5-fluorouracil (5-FU) (0.1; 1.0; 2.5; 5; 10 µM); and a.5) irinotecan (5; 10; 20; 40; 60 µM). b) different concentrations of the AMS35AA (14, 28, 56, 84, 112, 140, 210 and 280 µM); B: The AMS35AA IC₅₀ (54 µM) associated with the chemotherapeutic agents IC₅₀: tamoxifen (7 µM), doxorubicin (0.35 µM), cisplatin (2 µM), 5-FU (2 µM) and irinotecan (20 µM) established according to experiment A. At the end of treatment, the cells were incubated with 100 µl of MTT (Invitrogen® Life Technologies, 0.005 g MTT, 5 ml PBS, 10 ml DMEM) for 4 h under the same conditions. Plates were dried and 100 µl of DMSO were added. The absorbance was measured at 540nm in ELISA Plate Analyzer ROBONIK® spectrophotometer. Three independent replicates were performed in quintuplicate. The combination Index (CI) was calculated from the values of the affected cell fractions (FA): CI<1 indicates synergism; CI=1 indicates additive effect and CI>1 indicates antagonistic effect using CompuSyn software (www.combosyn.com) (8). The percentage of damage reduction (DR%, positive values) (9) as well as the percentage of damage increase (DI%, negative values) were also calculated as described by Navarro, 2014 and Oliveira, 2015 with adaptations (3, 4), according to the formula presented below:

$$DR \text{ or } DI\% = \frac{\text{Drug viability mean} - \text{association viability mean (Drug + AMS35AA)} \times 100}{\text{Drug viability mean} - \text{control mean}}$$

Genotoxicity test. The Comet assay alkaline version was performed as described by Singh *et al.* (1988), with modifications. All samples were processed in triplicate. 1×10⁵ cells were seeded in a DMEM medium supplemented with 10% foetal bovine serum and incubated in 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 24 h. The cells were exposed to the treatment for 4 h and the concentrations were: 14, 28, 56 and 112 µM for AMS35AA; it was also submitted to the treatment the AMS35AA IC₅₀ (54 µM) in combination with 5-FU IC₅₀ (2.5 µM); Positive Control (5-FU; 2.5 µM) and Negative Control. The cells were trypsinized and centrifuged at 1200 rpm for 5 min. Microscope slides were covered with a thin layer of Low Melting Point Agarose. 20 µl of cell suspension was added to 120 µl of low melting point at 37°C. The cells were lysed in a cold high salt and detergent containing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0-10.5, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide pH=10) for 1 h in fridge. The slides were then carefully placed in a horizontal electrophoresis chamber unit containing freshly-made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 12.6) for 20 min for DNA denaturation. The slides were electrophoresed for 20 min at 25 volts and 300 mA, and then the buffer was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5). The material was stained (100 µl ethidium bromide, 2×10⁴ mg/ml) and analyzed under 400x magnification with an epifluorescence microscope (Bioval®, Model L 2000A, Valencia, Spain) equipped with a 420-490 nm excitation filter and 520 nm barrier filter. The comets were classified according to Kobayashi *et al.* (1995) (10). The %DR and/or %DI were calculated as described in the cell viability assay. All steps were conducted in the dark.

Table I. Oligonucleotides sequences

Gene	Forward	Reverse	Size (pb)
<i>ATR</i>	CCTTCAGATTTCCCTTGAATAC	GCAGTTCATGTTTTGATGAG	137
<i>p53</i>	TACCACCATCCACTACAAC	GACAGGCACAAACACGCAC	145
<i>GADD45</i>	TCAGCGCACGATCACTGTC	CCAGCAGGCACAAACACCAC	82
<i>p21</i>	TAGCAGCGGAACAAGGAG	AAACGGGAACCAGGACAC	249
<i>p38</i>	ATGTCTCAGGAGAGGCCACGTTCT	AATGGTCTGGAGAGCTTCTTCA	242
<i>JNK</i>	CGACCTTCTATGACGATGC	GTGGTGGTGATGTGCC	253
<i>BAK</i>	CTGTTTGAGAGTGGCATC	ATGCTGGTAGACGTGTAG	84
<i>BAX</i>	CCTTCTTTGAGTTCGGTG	TTCAGGTACTAGTCATCCAC	100
<i>CASP-6</i>	CCAGACAGACAAGCTGGACA	TGTACCAGGAGCCATTCAACA	235
<i>CASP-7</i>	TCACCATGCGATCCATCAAGACCA	TTTGTCTGTTCCGTTTCGAACGCC	148
<i>CASP-9</i>	CTCTACTTTCCAGGTTT	TTCACCGAAACAGCATT	168
<i>BCL-2</i>	GGACGAACTGGACAGTAAC	GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC	127

Cell death. To evaluate the apoptotic or necrotic cells, a morphological assay was performed according to the protocol for cell death of Oliveira *et al.* (2007), with modifications (9). In a 12-well plate, 2×10^5 cells were seeded in a DMEM medium and incubated in 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 24 h. The cells were exposed to the treatment for 4 h and the concentrations were: 14, 28, 56 and 112 µM for AMS35AA; IC₅₀ of the compound (54 µM) in combination with 5-FU IC₅₀ (2.5 µM); Positive Control (5-FU) and Negative Control. A second experiment was realized in the same conditions, after 4 h followed by 16 h (to verify repair) in a drug free medium. The cells were trypsinized and centrifuged at 1200 rpm for 5 min. For the preparation of the slides, 20 µl of cell suspension and 2 µl of ethidium bromide dye (100 µg/ml) and 2 µl of acridine orange (100 µg/ml) were used, following the protocol of Oliveira *et al.* (2007) (9). The assay was performed in three independent replicates. 100 cells per slide were analyzed under a fluorescence microscope at a magnification of 400×.

Cell-cycle analysis. In brief, MCF-7 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells per well in a supplemented DMEM medium and incubated in 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 24 h. Then, the cells were exposed to the treatment for 24 h, as following: a) AMS35AA (IC₅₀ 54 µM); b) AMS35AA (IC₅₀ 54 µM) in combination with 5-FU (IC₅₀ 2.5 µM); Positive Control (5-FU; 2.5 µM) and Negative Control. After 24 h of treatment, the cells were trypsinized, centrifuged at 1,200 rpm for 5 min and resuspended in 100 µl of PBS. Next, 5 µl of RNase was added, and the cells were incubated at 37°C for 30 min. Lysis of DNA was performed using 100 µl of lysis solution (50 µg/l PI, 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100), and incubated on ice in the dark for 30 min. Fluorescence intensity (from 10,000 cells) was immediately analyzed by flow cytometry (BD Accuri™ C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) with 488-nm laser excitation (7).

Membrane Integrity. The cells were prepared as described above. After that, 25 µl of PI 50 µg/ml was added to resuspended cells for 5 min at room temperature in the dark. Fluorescence intensity (from 10,000 cells) was immediately analyzed by flow cytometry (BD Accuri™ C6) with 488-nm laser excitation (7).

Gene expression analysis. RT-qPCR analysis has been applied in an attempt to determine changes in gene expression profiles. Table I contains the oligonucleotides sequences used to amplify genes involved in the DNA damage (*ATR*, *p53*, *GADD45* and *p21*) and apoptosis (*BAK*, *BAX*, *CASP6*, *CASP7*, *CASP9* and *BCL-2*). In a 6 well plates a total of 2×10^5 cells/well were seeded in a supplemented DMEM medium and incubated in 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 24 h. Then, the cells were incubated for 24 h with: a) different concentrations of AMS35AA (14, 28, 56 and 112 µM); b) IC₅₀ of the compound in combination with IC₅₀ of 5 FU (2.5 µM), c) Negative Control and d) Positive Control. Briefly, for RNA extraction, the cells were treated with guanidine isothiocyanate buffer (GuSCN 5 mol/l, Tris HCL 11.2 g/l pH6.4, EDTA NaOH 7.43 g/l, 7.8 ml Triton X-100) and 50 µl of magnetic beads (bioMérieux® Marcy-l'Étoile, France) was added to each sample (200 µl). Right after successive washes in GuSCN/citrate and ethanol were performed. The nucleic acids are eluted in 30 µl of RNase free water. The samples were quantified using a spectrophotometer. The ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm (NanoVue™ Plus spectrophotometer - Life Sciences®) is used to assess the purity of RNA, and only samples with a ratio between 1.8 and 2.1 were used in further experiments. The cDNA was obtained by reverse transcription and amplified by PCR (T100™ - Thermal Cycler, Bio-Rad™, Hercules, California, EUA) using the GoScript Reverse transcription (RT) System (Promega®, Madison, EUA) following the instructions from the manufacturer. Real-time PCR was carried out in triplicate by a Rotor Gene® (Qiagen, Hilden, Alemanha) instrument. Reactions were prepared in a total volume of 20 µl, containing 10 µl of GoTaq® Master Mix (Promega Madison, EUA), 2 pmol of each oligonucleotide, 500 ng of cDNA and ddH₂O. The cycling parameters were as follows: 95°C for 5 min (initial denaturation), 40 cycles at 95°C for 2 sec (denaturation), and 60°C for 30 sec (annealing and extension). At the end, the melting curve was generated to analyze the specificity. The GAPDH (beta-actin) was used as a reference gene. The results were analyzed in the Rotor Gene® v2.3.1 (Qiagen) software.

Statistical analysis. The results were expressed as means±standard error of the mean (SEM) and analyzed by ANOVA/Tukey test using the GraphPad Prism software (version 3.02; San Diego, CA, USA). The level of significance adopted was $p \leq 0.05$.

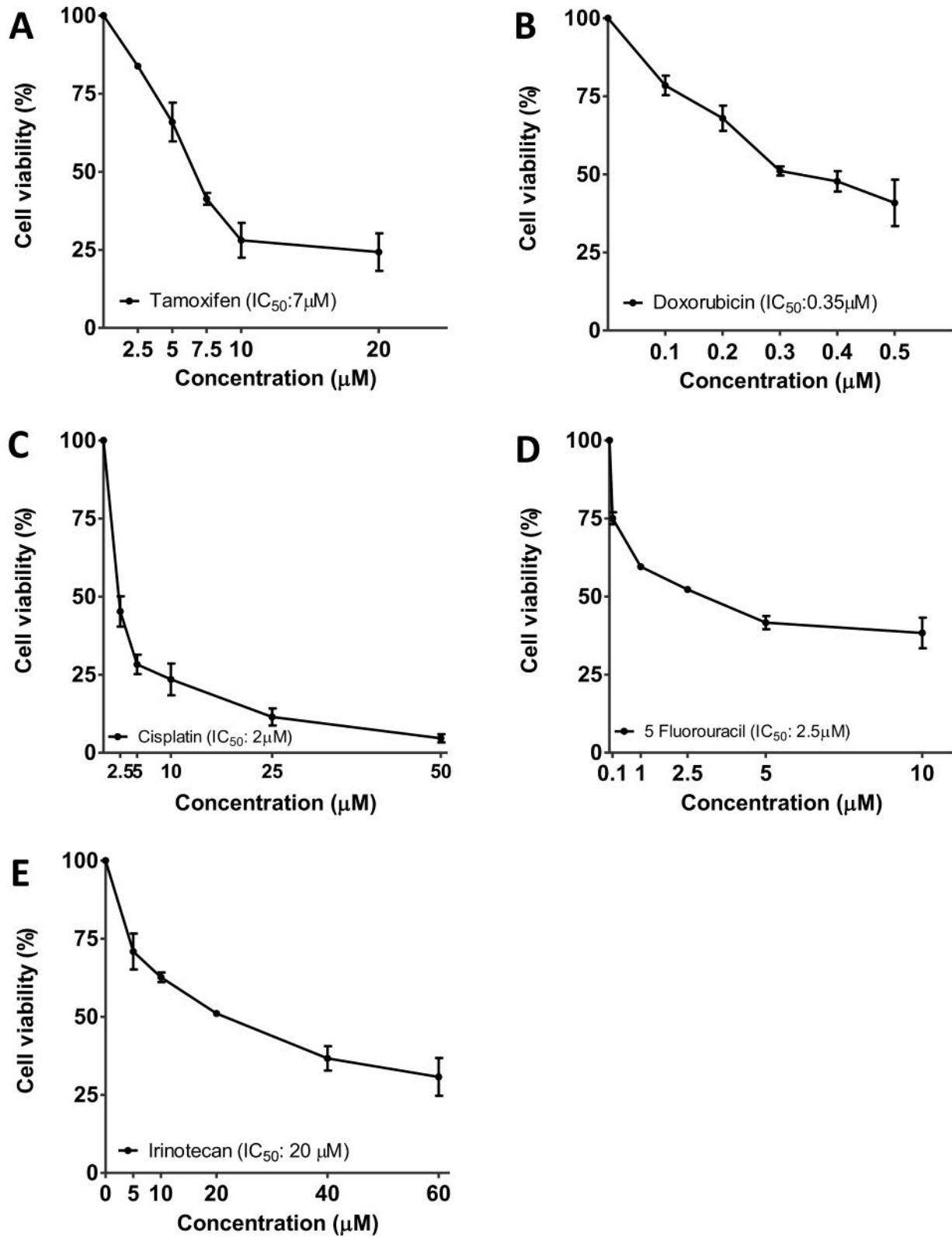


Figure 1. Determination of IC_{50} values. MCF-7 cells were treated for 72 h with various concentrations of tamoxifen, doxorubicin, cisplatin, 5-FU and Irinotecan as mentioned in Materials and Methods section. MTT assay was then used to determine the cell viability (%). For each experiment, three independent replicates were performed in quintuplicates. The mean and standard error of the mean (SEM) – (bar), are shown in the plot.

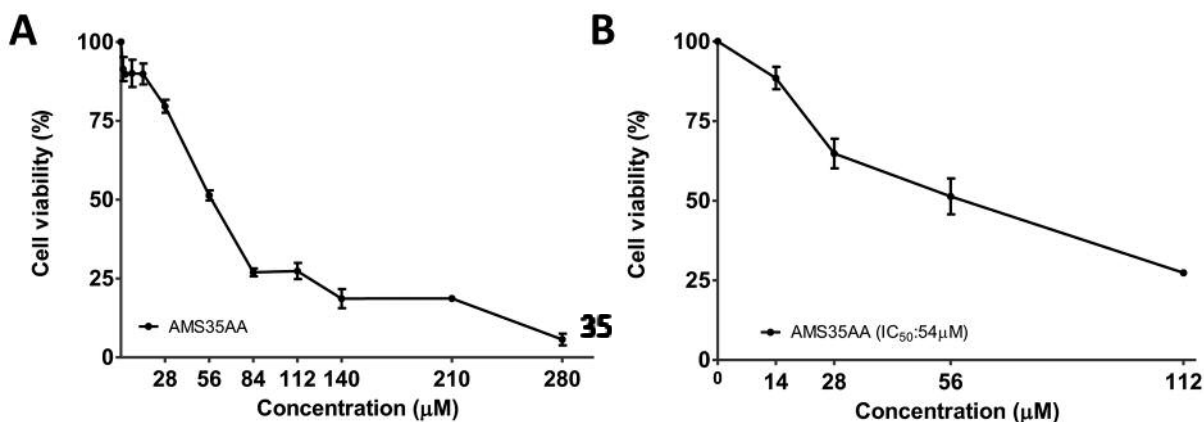


Figure 2. Determination of range and IC_{50} value of AMS35AA. (A) The range determination of AMS35AA in MCF-7 cells. (B) Determination of IC_{50} value of AMS35AA. The cells were treated for 72 h with different concentrations (14, 28, 56 and 112 μ M) For each experiment, three independent replicates were performed in quintuplicates. The mean and (SEM) – (bar) are shown in the plot.

Results

IC_{50} determination of the commercial chemotherapeutic agents. The IC_{50} of the commercial chemotherapeutic agents was established by pilot run using CompusSyn software. The IC_{50} of tamoxifen (Figure 1A), doxorubicin (Figure 1B), cisplatin (Figure 1C), 5-FU (Figure 1D) irinotecan (Figure 1E), was, respectively, 7 μ M, 0.35 μ M, 2 μ M, 2.5 μ M and 20 μ M.

IC_{50} determination of the AMS35AA and cell viability study. The first MTT assay demonstrated that concentrations higher than 14 μ M were capable of reducing significantly cell viability of MCF-7 (Figure 2A). After that, a smaller range was tested to establish the IC_{50} . In this second run, concentrations of 14, 28, 56 and 112 μ M of AMS35AA reduced the cell viability to ($p < 0.05$) 88.50 ± 3.5 , 64.82 ± 4.65 , 51.36 ± 5.62 and 27.37 ± 0.76 , respectively and the IC_{50} was 54 μ M (Figure 2B).

Cell viability: effects of AMS35AA associated with chemotherapeutic agents. The cytotoxic effect of tamoxifen, doxorubicin, cisplatin and irinotecan was reduced by AMS35AA and the percentages of damage reduction were 4%, 6%, 2% and 143.3%, respectively. According to the combination index AMS35AA has antagonistic action on tamoxifen, doxorubicin, cisplatin and irinotecan. When AMS35AA was combined with 5-FU, a 30% increase in damage was observed and, therefore, the combination index indicated an additive effect (Figure 3).

AMS35AA causes genomic damage and potentiates the effects of 5-FU. AMS35AA is genotoxic and increases the frequency of DNA lesions by 2.61 \times , 2.79 \times , 3.60 \times and 2.82 \times at 14, 28,

56 and 112 μ M and the score by 2.53 \times , 2.93 \times , 3.84 \times and 2.88 \times , for the same concentrations, respectively (Table II). When AMS35AA was combined with 5-FU at their IC_{50} values there was a 21.03% increase in the frequency of lesioned cells and a 63.19% increase in the score (Table II). When the same test was performed after 16 h of recovery, the frequency of lesioned cells was increased by 1.88 \times , 2 \times , 2.97 \times and 2.03 \times and the score at 1.89 \times , 2.02 \times , 3, 32 \times and 1.97 \times , respectively. It was also observed that the increase in damages was in the order of 27.6% for the frequency of lesioned cells and 178.72% for the score, respectively (Table III).

AMS35AA induces cell death. A cytological analysis of cell death (differential apoptosis and necrosis) 4h after treatment demonstrated that all concentrations caused a significant increase in the frequency of cell death. The increases were 2.6 \times , 2.76 \times , 3.4 \times and 2.86 \times , relative to the control, for the concentrations of 14, 28, 56 and 112 μ M, respectively. In the evaluation after 16 h, a significant increase was observed only at concentrations above 28 μ M. There was an increase by 1.54 \times ; 2.77 \times ; 2.45 \times and 2.12 \times , relative to the control, for the concentrations of 14 (non-significant), 28, 56 and 112 μ M, respectively (Figure 4). At the concentration of 56 μ M, there was more apoptosis in the experiment after 16 h. The combination of AMS35AA with 5-FU at their IC_{50} values demonstrated potentiation ($p < 0.05$) of apoptotic effects of 5-FU by 7.4 \times and 5.96 \times for the experiment evaluated with and without recovery (Figure 4). According to this cytological assay cell death occurred by apoptosis and no necrotic cells were observed.

AMS35AA does not cause rupture of plasma membrane. The MCF-7 cells were negative for PI test by flow cytometry (Figure 5), confirming the membrane integrity.

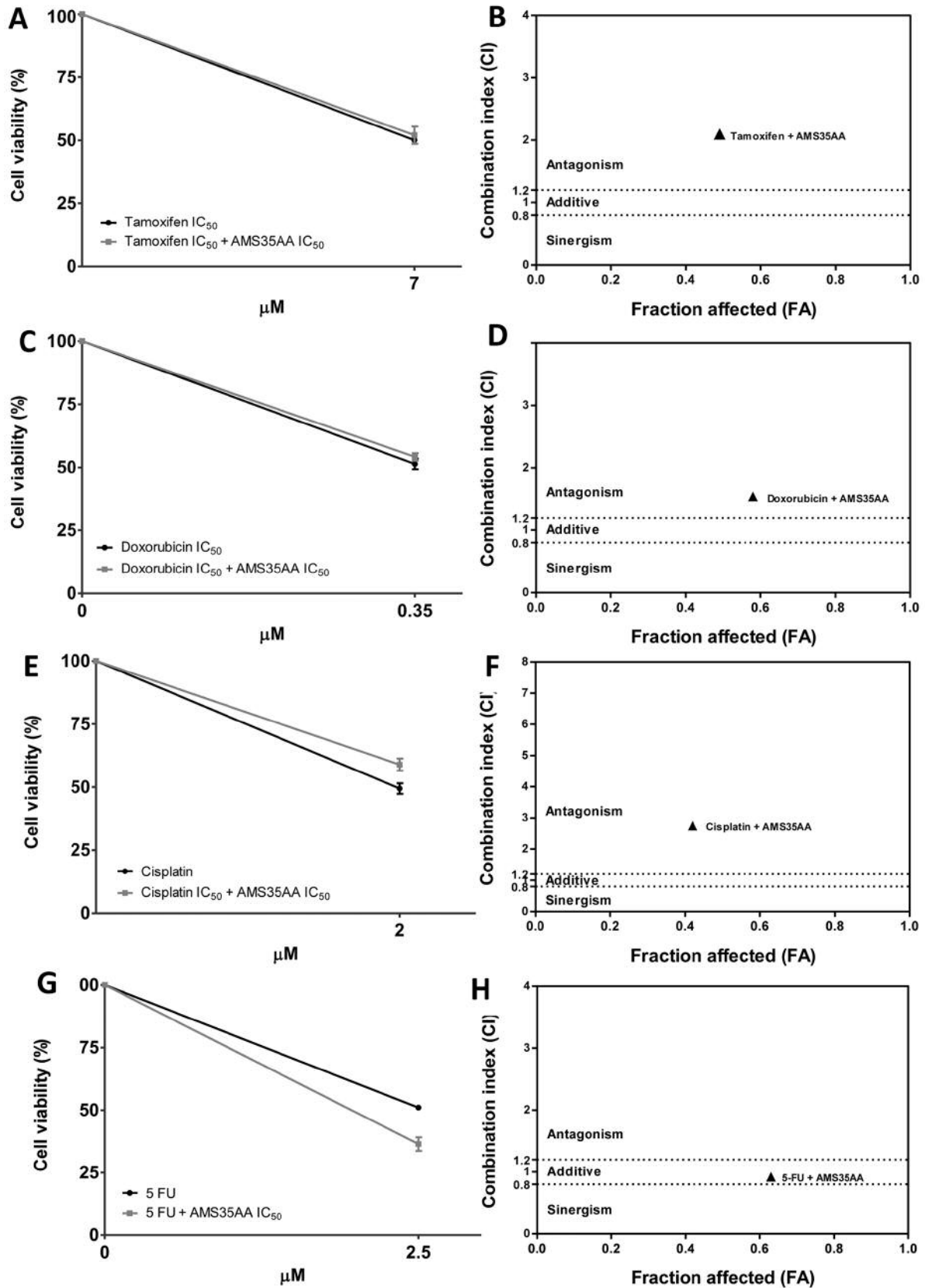


Figure 3. *Continued*

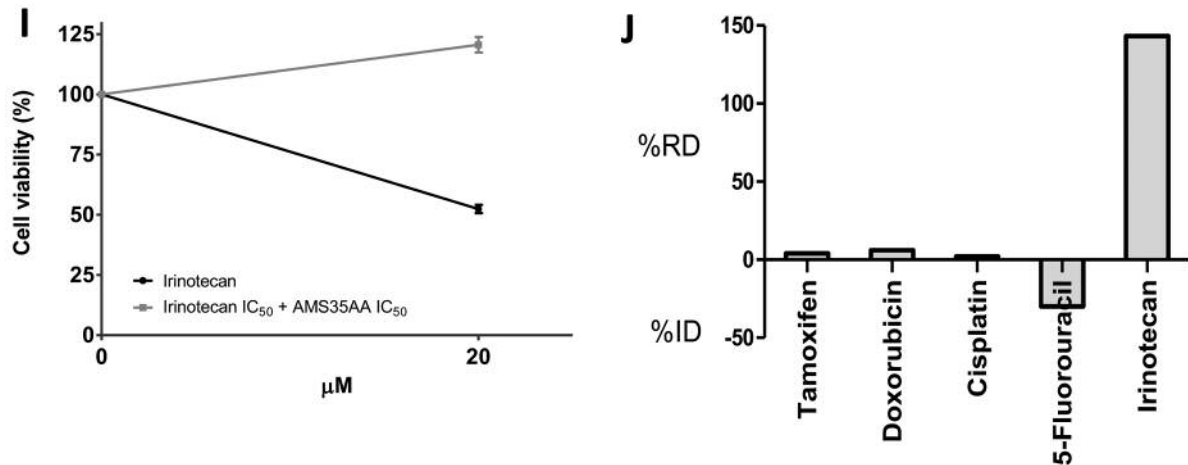


Figure 3. Effects of AMS35AA when associated with chemotherapeutic agents on cell viability in the MCF-7 breast cancer tumor line using the MTT assay. Chemotherapeutics alone (black line); chemotherapeutics combined with AMS35AA (gray line). (A) Tamoxifen IC₅₀ and tamoxifen IC₅₀ in combination with AMS35AA IC₅₀; (B) Combination Index between tamoxifen and AMS35AA; (C) Doxorubicin IC₅₀ and doxorubicin IC₅₀ in combination with AMS35AA IC₅₀; (D) Combination Index between doxorubicin and AMS35AA; (E) Cisplatin IC₅₀ and cisplatin IC₅₀ in combination with AMS35AA IC₅₀; (F) Combination Index between cisplatin and AMS35AA (G) 5-FU IC₅₀ and 5-FU IC₅₀ in combination with AMS35AA IC₅₀; (H) Combination Index between 5-FU and AMS35AA; (I) Irinotecan IC₅₀ and irinotecan IC₅₀ in combination with AMS35AA IC₅₀. The combination index of irinotecan was not calculated since the affected fraction cannot be negative to generate CI. For each experiment, three independent replicates were performed in quintuplicates. The mean and (SEM) – (bar) are shown in the graphs (A), (C), (E), (G) and (I). The combination index values were calculated according to the Chou and Talalay method using the CompuSyn software. (J) Percentual of damage reduction (DR%, positive values) and Percentage of damage increase (DI%, negative values).

Combination of AMS35AA with 5-FU induces inhibition of cell cycle progression (sub-G₁ and G₂/M arrest). AMS35AA and 5-FU caused a statistically significant reduction of cells at the S phase and increase of cells in the G₂/M phase. In addition, the combination of these two compounds was still able to reduce the frequency of cells in G₁ and S phases and increase the frequency in the G₂/M phase. This increase in G₂/M was 1.48x comparing to 5-FU and AMS35AA + 5-FU (Figure 6).

Gene expression. AMS35AA caused a significant increase in the expression of p53 levels (Figure 7A) and a significant reduction in BAX expression (Figure 7B). 5-FU increased ($p < 0.05$) expression of ATR, p53, p21, GADD45 (Figure 7A) and BAK (Figure 7B) and reduced ($p < 0.05$) BCL-2 expression (Figure 7B). The combination of these two compounds caused a significant increase in the expression of ATR, p53, p21, GADD45 (Figure 7A), BAK, CASP7 and CASP9 (Figure 7B), and significant reduction of BCL-2 (Figure 7B).

Discussion

AMS35AA is a resorcinol lipid that was firstly synthesized and tested by our research group. A therapeutic potential for cancer therapy was demonstrated (3). Since then, we have challenged breast cancer cells (MCF-7) with this compound

and our results are promising. This study verified that AMS35AA has a cytotoxic and cytostatic effect on MCF-7 cells since a reduction of cell viability and cell cycle arrest were found.

According to Navarro *et al.* (2014) AMS35AA is neither genotoxic nor mutagenic in Swiss mice (3). However, the present search indicates that this resorcinolic lipid is genotoxic to MCF-7 cells. These results may suggest a selective action on tumor cells, a fact also suggested by Navarro *et al.* (2014) (3). This ability to cause genomic damage was confirmed by the comet assay and also corroborates for this finding: (i) the reduction of cell viability observed in the MTT assay; (ii) the increase of cell death verified in the cytological assay (differential apoptosis/necrosis); and (iii) the increase of p53 levels.

Most likely the three methoxy groups of AMS35AA can be demethylated on position 4 and 6 and maybe also in position 3. This benzofuran can become very reactive, especially when the demethylation occurs at the 3-position. The furan side can be opened, which leads to a reactive molecule that may explain the genotoxicity towards MCF-7 cells. The hydroxyl groups on position 4 and 6 are less reactive. Catechol setting, *i.e.* 4 and 5 or 5 and 6 hydroxyl-groups, are chemically more reactive (11).

It is believed that these DNA damages lead the cells to apoptosis since AMS35AA did not cause damage to

Table II. Frequency of cells with total DNA damage, class of damage and score of the Comet assay on MCF-7 breast cancer line after 4 h of treatment with AMS35AA.

Experimental groups	DNA damage	Class of damage				Score
		0	1	2	3	
Control	18.04±3.46 ^a	81.96±2.19	10.04±3.79	4.67±1.20	3.33±1.20	29.37±4.26 ^a
5-Fluorouracil	76.67±4.46 ^c	23.33±3.15	42.67±4.63	13.00±1.53	21.00±1.15	131.67±4.35 ^c
14 µM AMS35AA	47.01±1.67 ^b	53±1.26	28.33±10.5	10.01±1.15	8.67±2.60	74.36±0.88 ^b
28 µM AMS35AA	50.33±1.85 ^b	49.67±1.84	27.00±2.00	11.00±2.08	12.33±1.86	85.99±3.38 ^b
56 µM AMS35AA	65±4.04 ^c	34.97±3.46	31.66±3.71	19.00±2.00	14.33±2.73	112.65±1.86 ^c
112 µM AMS35AA	51±5.52 ^b	49.02±4.15	28.00±3.51	12.33±1.45	10.67±1.76	84.66±8.17 ^b
ASSOCIATION	89±10.00 ^d	10.1±2.55	19±3.78	32.66±3.18	37.33±2.08	196.31±5.33 ^d

Association (AMS35AA IC₅₀ + 5 – FU IC₅₀). Mean±SEM of number of total cells/300 cells (100 cells/treatment/repetition). Different letters indicate statistically significant differences. ANOVA/Tukey-Kramer (*p*≤0.05).

Table III. Frequency of cells with total DNA damage, class of damage and score of the Comet assay on the MCF-7 breast cancer line after 4 h of treatment with AMS35AA followed by 16 h free of treatment.

Experimental groups	DNA damage	Class of damage				Score
		0	1	2	3	
Control	24.66±3.48 ^a	75.34±6.02	12.36±1.28	7.66±2.08	4.66±3.78	41.66±15.53 ^a
5-fluorouracil	79.65 ±4.16 ^c	20.35±8.62	46.66±8.62	12.33±3.05	20.66±3.05	95±4.04 ^c
14 µM AMS35AA	46.33±4.09 ^{a,b}	53.66±7.37	26.00±6.55	8.33±2.51	12.00±7.00	78.66±22.48 ^{a,b}
28 µM AMS35AA	49.33±2.18 ^b	50.66±3.78	25.33±2.51	13.00±3.60	11.00±1.00	84.33±9.01 ^b
56 µM AMS35AA	73.33±3.93 ^c	26.67±6.80	30.00±4.35	21.66±4.61	21.67±2.08	138.33±10.40 ^c
112 µM AMS35AA	50±2.51 ^b	50.02±4.35	26.66±3.21	14.66±4.04	8.66±2.08	82.00±9.16 ^b
ASSOCIATION	94.83±0.88 ^d	5.17±6.55	46.66±7.76	22.84±5.25	25.33±2.30	190.33±15.04 ^d

Association (AMS35AA IC₅₀ + 5 – FU IC₅₀). Mean±SEM of number of total cells/300 cells (100 cells/treatment/repetition). Different letters indicate statistically significant differences. ANOVA/Tukey-Kramer (*p*<0.05).

membrane integrity and there was already indication of cell death by apoptosis in the morphological assay. In addition, accumulation of cells in G₂/M phase was observed when the cells were treated with the resorcinol lipid. This cell cycle arrest in G₂/M phase may occur in response to DNA damage (p53 increase). It was also supposed to happen a late apoptosis after treatment with AMS35AA. This late apoptosis could be suggested since comet and apoptosis assays demonstrated that even in the absence of treatment, the frequency of DNA damage and cell death were maintained at similar statistical levels. The reduction of BAX, a pro-apoptotic protein, may be related to the occurrence of late apoptosis (12).

Another fact that may justify the reduction of BAX is that BAX protein levels declined in the cytosol at 3 and 8 h respectively after treatment, which was subsequent to cytochrome *c* release. It is, therefore, possible that in these cells, sufficient BAX resides at the mitochondrial membrane to induce cytochrome *c* release after death signal, and further

apoptotic insult leads to increasing amounts of BAX translocating to the mitochondria (13).

These data indicate that AMS35AA may be cytotoxic and cytostatic in MCF-7 cells, suggesting two possible mechanisms of action for its anticancer effect. Therefore, the present study indicates an alternative cell death pathway (DNA damage-mediated apoptosis) for the literature proposed for resorcinolic lipids until now (14, 15).

A Chinese research group in 2008 found evidence, by molecular biology studies, that cytosporone B, also a resorcinolic lipid, showed to be cytotoxic on many strains of tumors behaves as a natural ligand to the orphan nuclear receptor Nur77 of eukaryote cells. (14, 15). Its expression is induced in response to cellular stress, serum withdraw or treatment with apoptotic agents or mitogenic factors. The amoitone B, another resorcinolic lipids, is one of the most active analogues of cytosporone B. It has similar response with respect to cellular viability assays and apoptosis. It also

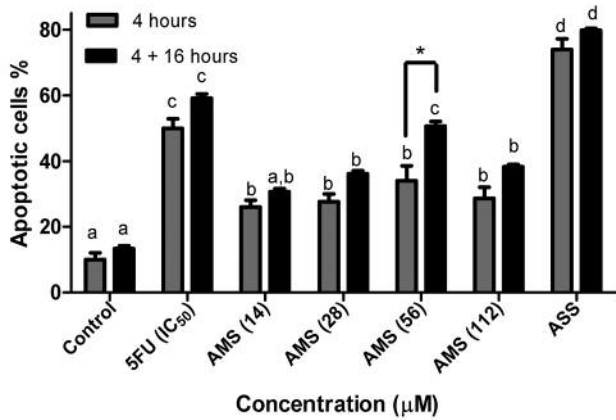


Figure 4. Graph showing the percentage of apoptotic cells treated with different concentrations of AMS35AA (14, 28, 56 and 112 μM); IC₅₀ (5-FU) and combination of AMS35AA and 5-FU at their IC₅₀ values in MCF-7 cells for 4 h (gray bars) and 4 h followed by 16 h (black bars) in drug free medium. 100 cells were analyzed per slide under a fluorescence microscope at a magnification of 400×. The cells were classified by morphological appearance and differential staining by ethidium bromide and orange acridine. The graphs represent the mean and SEM of three independent replicates. Necrotic cells were not found. Statistical differences were analyzed by ANOVA/Tukey. Different letters indicate statistical differences ($p \leq 0.05$).

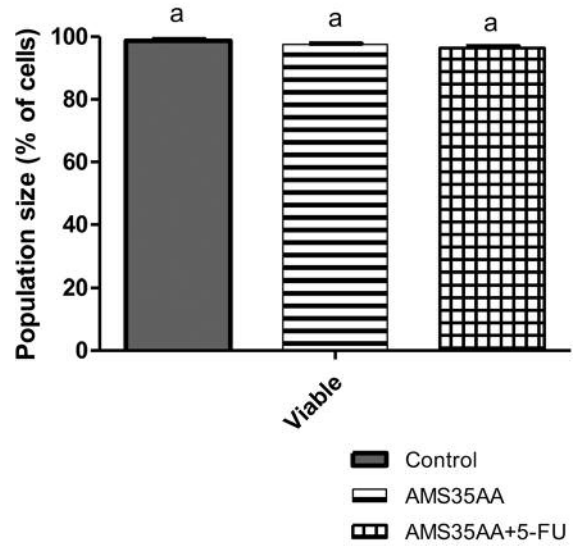


Figure 5. Cytoplasmic membrane integrity MCF-7 cells assessed by flow cytometry shows a percentage increase for the viable cell population of Control, AMS35AA and AMS35AA + 5-FU. Data are presented as mean±SEM of three separate experiments. Statistical differences were analyzed by ANOVA/Tukey. Different letters indicate statistical differences ($p \leq 0.05$).

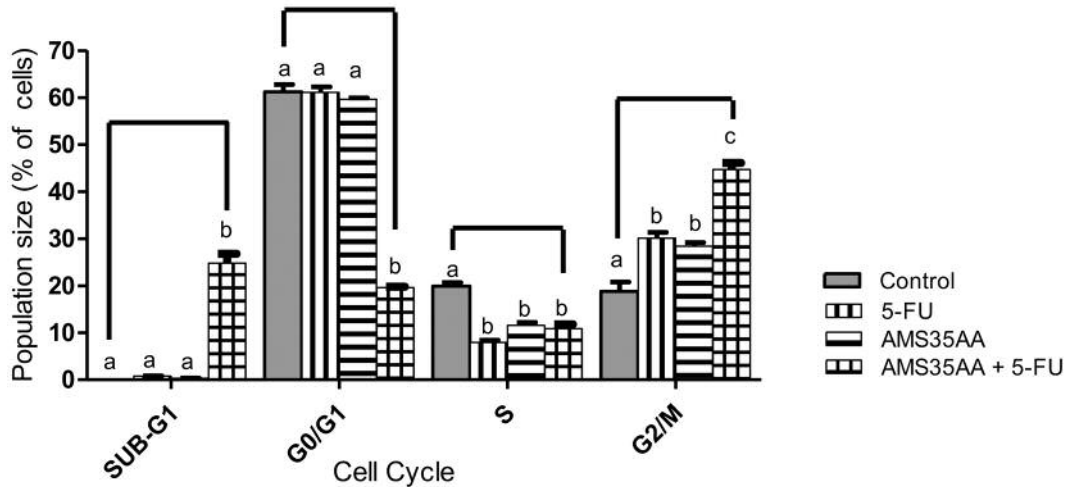


Figure 6. Results of the cell-cycle analysis by flow cytometry. The cell-cycle distribution was quantified and is shown in bar graphs including sub G₁, G₀/G₁, S and G₂/M phases. AMS35AA in combination with 5-FU induces inhibition of cell cycle progression (sub-G₁ arrest and G₂/M). Data are presented as mean±SEM of three separate experiments. Statistical differences were analyzed by ANOVA/Tukey. Different letters indicate statistical differences ($p \leq 0.05$).

demonstrates affinity for Nur77 and antitumor activity in vivo (16). In addition, some alkyresorcins exhibit activity in colon neoplastic cells (SW620), inhibiting proliferation by more than 70%, in lung neoplastic cells (H1299) and in

hepatome cells (HepG2) by more than 40%. In hepatocytes (HL-7702), human hepatoblasts (ME-Hep4) and fibroblasts (NIH3T3), the effect was smaller, suggesting that their activity by Nur77 is cell type dependent (14, 16).

The chemotherapeutic drugs cisplatin, tamoxifen, doxorubicin, 5-FU and irinotecan used in the treatment of breast cancer were analyzed in a cell viability test to verify the ability of AMS35AA to potentiate their effects. 5-FU was the only drug that demonstrated agonism when combined with AMS35AA. All the others presented antagonism. On that account, the combination of AMS35AA with cisplatin, tamoxifen, doxorubicin and irinotecan are not indicated in view of their reduction in anticancer action. Equivalent finding was presented by Mauro *et al.*, 2017 in a similar study (16).

5-FU was the only chemotherapeutic agent that potentiated the effect of AMS35AA. For this reason, the other agents were not used in the upcoming association tests. The combination index value between the resorcinolic lipid and 5-FU were less than 1 indicating strong additivism additive effect in MCF-7 cells (8).

Experimental agents derived from natural or synthetic products offer opportunities to evaluate not only totally new chemical classes of anticancer agents, but also relevant mechanisms of action. In some studies on anticancer properties of natural or synthetic products, it was shown that resorcinolic lipids are able to inhibit both DNA and RNA synthesis and to possess the ability for DNA strand scission (17). Regarding the 5-FU mechanism of action, it was found that this pyrimidine antagonist is converted to the active element 5-FdUMP (5-fluorodeoxyuridine-monophosphate) (18). This metabolite interacts with the enzyme thymidylate synthase causing the suppression of thymidine triphosphate (TTP) and, thus, preventing DNA synthesis. In addition, 5-FU inhibits RNA processing and is incorporated into DNA at the site where TTP is suppressed. 5-FU is also capable of causing single strand breaks and double strands of DNA (17, 19).

These combined mechanisms of action may be responsible for the additive effect (increase of 30% of the affected fraction) observed for AMS35AA and 5-FU according to the combination index proposed by Chou and Talalay (1983) (8). The data below corroborate for this: potentiation of the anticancer effects and the increase of DNA damage evaluated by the comet assay, increase in the expression of ATR, p53, p21 and GADD45 (genes involved in DNA damage), which occurred in both 5-FU treated cells and in those treated with the combination of 5-FU + AMS35AA; and also, cell-cycle arrest in G₂/M phase observed more prominently in the combined treatment. In addition, there was an increase in the frequency of apoptosis, evaluated by the cytological method, which is associated with absence of cell membrane damage (evaluated by the flow cytometry test) and increased expression of the BAK, CASP7, CASP 9 and reduction of BCL-2 expression (genes involved in apoptosis) in the combined treatment (5-FU + AMS35AA). Many studies report the presence of proteins that may be linked to this accumulation in sub G₁ phase, as is the case of p21 increase expression (20).

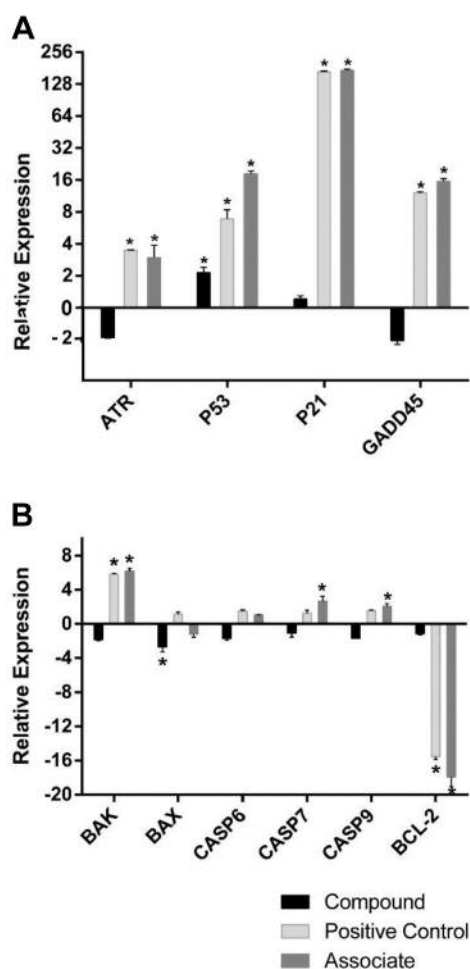


Figure 7. Relative expression of genes involved in (A) DNA-damage ATR, P53, P21, GADD45 and (B) Apoptosis BAK, BAX, CASP6, CASP7, CASP9 and BCL-2 obtained by Real Time PCR.

Gamper, 2017, has reported similar results in a study of alkylresorcinol in human hepatocarcinoma cell, demonstrating: (1) morphological alterations of apoptosis; (2) DNA fragmentation, detected by laddering and appearance of a sub-G₁ phase population; and (3) condensed and fragmented nuclei by acridine orange-PI (20).

MCF-7 breast cancer cells do not express caspase 3, thought by some to be a critical component of the apoptosis cascade. Despite this, MCF-7 cells undergo morphological apoptosis after treatment with a variety of agents and conditions (21). In agreement with this finding, the present work demonstrates that MCF-7 cells expressed damaged and apoptosis genes after treatment with AMS35AA. The underlying molecular mechanisms of toxicity of various antineoplastic drugs are only partially known, in spite of their extended clinical use. There is compelling evidence that one

of their main effectors is the p53, known as an important mediator in the action of many drugs (22). DNA damage signal through ATM/ATR or *via* CHK1/CHK2 can activate p53 in a direct or indirect manner, respectively (23). The results of this study indicate that P21 may function as a primary response gene. In addition, it appears to be involved in G₂/M phase cell accumulation, explaining its high expression in the Real Time PCR test (24). This research indicates that AMS35AA treatment down-regulates Bcl-2 (anti-apoptotic) expression. It could be inducing a conformational change of Bcl-2, with activation of caspase-7 and -9 in MCF-7 cells which favor spontaneous apoptotic cell death (25). The expression of BAX (pro-apoptotic) was also down regulated. Therefore, this finding suggests that the pathway that leads to apoptosis is BAX-dependent. The compound inhibited ATR, the upstream activator of CHK1, avoiding the DNA repair. But when combined with 5-FU there was an increase in ATR, however, not enough to repair the damage.

Our results suggest that AMS35AA has potential for the treatment of breast cancer since it is capable of exerting cytotoxic and cytostatic action in MCF-7 tumoral lineage. In addition, it is possible to affirm that cell death is mediated by DNA damage that leads cells to apoptosis by caspases activation. Finally, our results further suggest that AMS35AA is able to potentiate the effects of the chemotherapeutic agent 5-FU, for this reason it is a candidate to be an adjuvant in breast cancer therapy.

Conflicts of Interest

The Authors declare that they have no conflicts of interest regarding this study.

Acknowledgements

The Authors would like to thank FUNDECT - Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for financial support.

References

- Rodrigues FHA: Ação antioxidante de derivados do líquido da castanha de cajú (LCC) sobre a degradação termooxidativa do POLI (1,4-CIS-ISOPRENO), 2006. Available from: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/1247> [Last accessed on June 4 2018]
- Kozubek A and Tyman J: Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chem Rev* 99: 1-26, 1999.
- Navarro SD, Beatriz A, Meza A, Pesarini JR, Gomes RDS, Karaziack CB, Cunha-Laura AL, Monreal ACD, Romão W, Lacerda Júnior V, Mauro MDO and Oliveira RJ: A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur J Med Chem* 75: 132-142, 2014.
- Oliveira RJ, Navarro SD, de Lima DP, Meza A, Pesarini JR, da Silva Gomes R, Karaziack CB, de Oliveira Mauro M, Cunha-Laura AL, Monreal ACD, Romão W, Júnior VL and Beatriz A: A novel cytosporone 3-Heptyl-4,6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: Synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. *BMC Cancer* 15: 561, 2015.
- de Araújo FHS, de Figueiredo DR, Auharek SA, Pesarini JR, Meza A, Gomes R da S, Monreal ACD, Antonioli-Silva ACMB, de Lima DP, Kassuya CAL, Beatriz A and Oliveira RJ: In Vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5,7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. *Genet Mol Biol* 40: 665-675, 2017.
- Pesarini JR, Oliveira RJ, Pessatto LR, Milan Brochado Antonioli-Silva AC, Felicidade I, Nardi NB, Camassola M, Mantovani MS and Ribeiro LR: Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Biomed Pharmacother* 91: 861-871, 2017.
- Schweich LDC, Oliveira EJTD, Pesarini JR, Hermeto LC, Camassola M, Nardi NB, Brochado TMM, Antonioli-Silva ACMB and Oliveira RJ: All-trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. *Biomed Pharmacother* 96: 1267-1274, 2017.
- Chou T-C and Talalay P: Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci* 4: 450-454, 1983.
- Oliveira RJ, Matuo R, da Silva AF, Matiazi HJ, Mantovani MS and Ribeiro LR: Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicol Vitro* 21: 41-52, 2007.
- Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M and Sofuni T: A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun* 3: 103-115, 1995.
- de Oliveira Mauro M, Matuo R, de David N, Strapasson RLB, Oliveira RJ, Stefanello MÉA, Kassuya CAL, de Ceba Matos M de F, Faria FJC and Costa DS: Actions of sesquiterpene lactones isolated from *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* in MCF7 cell line and their potentiating action on doxorubicin. *BMC Pharmacol Toxicol* 18: 53, 2017.
- Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T and Reed JC: Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with bax. *J Biol Chem* 270: 11962-11969, 1995.
- Mooney LM, Al-Sakkaf KA, Brown BL and Dobson PRM: Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Cancer* 87: 909-917, 2002.
- Zhan Y, Du X, Chen H, Liu J, Zhao B, Huang D, Li G, Xu Q, Zhang M, Weimer BC, Chen D, Cheng Z, Zhang L, Li Q, Li S, Zheng Z, Song S, Huang Y, Ye Z, Su W, Lin SC, Shen Y and Wu Q: Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat Chem Biol* 4: 548-556, 2008.

- 15 Xu QY, Wang JF, Huang YJ, Zheng ZH, Song SY, Zhang YM and Su WJ: Metabolites from mangrove endophytic fungus *Dothiorella* sp. *ACTA Oceanol Sin* 23: 541-547, 2004.
- 16 Xia Z, Cao X, Rico-Bautista E, Yu J, Chen L, Chen J, Bobkov A, Wolf DA, Zhang X-K and Dawson MI: Relative impact of 3- and 5-hydroxyl groups of cytosporone B on cancer cell viability. *Med Chem Commun* 4: 332-339, 2013.
- 17 Madrigal RV, Spencer GF, Plattner RD and Smith CR: Alkyl- and alkenylresorcinols in *Rapanea laetevirens* seed lipids. *Lipids* 12: 402-406, 1977.
- 18 Jetté L, Bissoon-Haqqani S, Le François B, Maroun JA and Birnboim HC: Resistance of colorectal cancer cells to 5-FUdR and 5-FU caused by mycoplasma infection. *Anticancer Res* 28: 2175-2180, 2008.
- 19 Gamper I, Burkhart DL, Bywater MJ, Garcia D, Wilson CH, Kreuzaler PA, Arends MJ, Zheng YW, Perfetto A, Littlewood TD and Evan GI: Determination of the physiological and pathological roles of E2F3 in adult tissues. *Sci Rep* 7: 9932, 2017.
- 20 Müller H, Schmidt D, Steinbrink S, Mirgorodskaya E, Lehmann V, Habermann K, Dreher F, Gustavsson N, Kessler T, Lehrach H, Herwig R, Gobom J, Ploubidou A, Boutros M and Lange BMH: Proteomic and functional analysis of the mitotic *Drosophila* centrosome. *EMBO J* 29: 3344-3357, 2010.
- 21 Liang Y, Yan C and Schor NF: Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene* 20: 6570-6578, 2001.
- 22 Lowe SW, Ruley HE, Jacks T and Housman DE: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967, 1993.
- 23 Ou Y-H: p53 C-Terminal Phosphorylation by CHK1 and CHK2 Participates in the Regulation of DNA-Damage-induced C-Terminal Acetylation. *Mol Biol Cell* 16: 1684-1695, 2005.
- 24 Cayrol C, Knibiehler M and Ducommun B: p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16: 311-320, 1998.
- 25 Youle RJ and Strasser A: The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59, 2008.

Received May 17, 2018

Revised June 2, 2018

Accepted June 4, 2018

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os ensaios executados conclui-se que o lipídio resorcinólico não isopropênico

AMS35AA:

- É citotóxico para células tumorais MCF-7;
- Potencializa o efeito citotóxico do quimioterápico 5-fluorouracil;
- É genotóxico e provoca morte celular por apoptose;
- Não provoca ruptura da membrana plasmática;
- Induz acúmulo das células nas fases sub-G1 e G2/M do ciclo celular;
- A morte celular por apoptose ocorre pela ativação de caspases por via independente de BAX, uma via alternativa ao mecanismo de morte proposto até o momento.

Sendo assim, por apresentar capacidade tanto citotóxica como citostática em células MCF-7, o AMS35AA demonstrou potencial para o tratamento do câncer de mama. Além de potencializar os efeitos genotóxicos do quimioterápico 5-FU, sugerindo uma possível possibilidade de associação na terapêutica.

6. REFERÊNCIAS

- AL-MEKHLAFI, N. A. et al. Alkenylresorcinols and cytotoxic activity of the constituents isolated from *Labisia pumila*. **Phytochemistry**, v. 80, p. 42–49, 2012.
- BARBINI, L. et al. Induction of apoptosis on human hepatocarcinoma cell lines by an alkyl resorcinol isolated from *Lithraea molleoides*. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 37, p. 5959–5963, 2006.
- BARR, F. A.; GRUNEBERG, U. **Cytokinesis: Placing and Making the Final CutCell**, 2007.
- BASERGA, R. the Relationship of the Cell Cycle To Tumor Growth and Control of Cell Division: a Review. **Cancer research**, v. 25, p. 581–595, 1965.
- BERTHEAU, P. et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast*, v. 22 Suppl 2, p. S27-9, 2013
- BODLEY, A. et al. DNA Topoisomerase II-mediated Interaction of Doxorubicin and Daunorubicin Congeners with DNA. **Cancer Research**, v. 49, n. 21, p. 5969–5978, 1989.
- BONADONNA, R. C. et al. Role of Tissue-Specific Blood Flow and Tissue Recruitment in Insulin-Mediated Glucose Uptake of Human Skeletal Muscle. **Circulation**, v. 98, n. 3, p. 234–241, 1998.
- BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. **Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review).***Oncology reports*, 2003.
- CHIN, Y. W. et al. Drug discovery from natural sources. **Aaps J**, v. 8, n. 2, p. E239-53, 2006.
- CLEATOR, S.; PARTON, M.; DOWSETT, M. **The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer***Endocrine-Related Cancer*, 2002.
- DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- DE ARAÚJO, F. H. S. et al. In Vivo chemotherapeutic insight of a novel isocoumarin (3-hexyl-5,7-dimethoxy-isochromen-1-one): Genotoxicity, cell death induction, leukometry and phagocytic evaluation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 665–675, 2017.
- DILLON DA, GUIDI AJ, S. S. C. Pathology of invasive breast cancer. In: **Diseases of the Breast**. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2014.
- DOWSETT, M. et al. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 3, p. 509–18, 2010.
- ELLSWORTH, R. E. et al. Breast cancer in the personal genomics era. **Current genomics**, v. 11, n. 3, p. 146–61, 2010.

FERTIG, E. J. et al. Analysis of gene expression of secreted factors associated with breast cancer metastases in breast cancer subtypes. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

FIEBIG, A.A.; ZHU W., HOLLERBACH, C.; LEBER B.; ANDREWS, D.W. Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. **BMC Cancer**. v. 6, p. 213, 2006.

GALLORINI, M.; CATALDI, A.; DI GIACOMO, V. **Cyclin-dependent kinase modulators and cancer therapy** *BioDrugs*, 2012.

GONÇALVES, L. L. C. et al. Câncer de mama feminino: aspectos clínicos e patológicos dos casos cadastrados de 2005 a 2008 num serviço público de oncologia de Sergipe. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 12, n. 1, p. 47–54, 2012.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **The New England journal of medicine**, v. 347, n. 20, p. 1593–1603, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. [s.l: s.n.].

ITOKAWA, H. et al. A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from Ginkgo biloba L. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 37, n. 6, p. 1619–21, 1989.

JAIYESIMI, I. A. et al. Use of tamoxifen for breast cancer: Twenty-eight years later. **Journal of Clinical Oncology**, v. 13, n. 2, p. 513–529, 1995.

KENNETH L. BONTRAGER. **Bontrager Manual Prático De Técnicas E Posicionamento Radiográfico**. [s.l: s.n.].

KITAMURA, T.; QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. **Immune cell promotion of metastasis** *Nature Reviews Immunology*, 2015.

KLEIN, G. Cancer, apoptosis, and nonimmune surveillance. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, n. 1, p. 13–17, 2004.

KOZUBEK, A.; TYMAN, J. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. **Chem Rev.**, v. 99, p. 1–26, 1999.

LLAMBI F, GREEN D.R. Apoptosis and oncogenesis: Give and take in the BCL-2 family. **Curr Opin Genet Dev**. v. 21, . p. 2–20, 2011.

LANE DP. Cancer: p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 15, p. 358, 1992.

LEE, A. V; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. E. MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, p. djv073--djv073, 2015.

LEJEUNE, M. et al. Granulocyte functions in children with cancer are differentially sensitive

to the toxic effect of chemotherapy. **Pediatric Research**, v. 39, n. 5, p. 835–842, 1996.

LIZOTTE, P. H. et al. In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 295–303, 2016.

LOBBEZOO, D. J. A. et al. Prognosis of metastatic breast cancer: are there differences between patients with de novo and recurrent metastatic breast cancer? **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 9, p. 1445–1451, 2015.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. **5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies** **Nature Reviews Cancer**, 2003.

LOUISA, S.; SANDRA, C.; BETH, M. **National Breast Cancer Foundation in Australia** **Breast**. [s.l: s.n.].

MACHADO, M. X.; SOARES, D. A.; OLIVEIRA, S. B. Significados do câncer de mama: Para mulheres no contexto do tratamento quimioterápico. **Physis**, v. 27, n. 3, p. 433–451, 2017.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. **Mammalian cyclin-dependent kinases** **Trends in Biochemical Sciences**, 2005.

MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. S. **Treatment of breast cancer** **American Family Physician**, 2010.

MINKO, T.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, L.; POZHAROV, V. **Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers** **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2013.

MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1199–1213, 2014.

NAVARRO, S. D. et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 132–142, 2014.

NOORDHUIS, P. et al. **A non-radioactive sensitive assay to measure 5-fluorouracil incorporation into DNA of solid tumors**. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Anais...*2004

OLIVEIRA, R. J. et al. A novel cytosporone 3-Heptyl-4,6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: Synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, 2015.

OSBORNE, C. Systemic Therapy Treatment Guidelines. In: WOLTERS KLUWER HEALTH (Ed.). **Diseases of the Breast**. 5. ed. Philadelphia: [s.n.].

PARIKKA, K.; WÄHÄLÄ, K. An expedient synthesis of 5-n-alkylresorcinols and novel 5-n-alkylresorcinol haptens. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 5, 2009.

RESNICK, M. A.; INGA, A. Functional mutants of the sequence-specific transcription factor p53 and implications for master genes of diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 17, p. 9934–9, 2003.

ROMERO, A. et al. Functional Analysis of the GlcP Promoter in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3207–3217, 2015.

SALADINO, R. et al. A new and efficient synthesis of ortho- and para-benzoquinones of cardanol derivatives by the catalytic system MeReO₃–H₂O₂. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 4, p. 581–586, 2000.

SAVVA-BORDALO, J. et al. Promoter methylation and large intragenic rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. **BMC Cancer**, v. 10, 2010.

SAWAN, C. et al. **Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer** *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2008.

SCHON, K.; TISCHKOWITZ, M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. **Breast Cancer Res Treat**, 2017.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. A. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9408–21, 2005.

SENKUS, E. et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 26, p. v8–v30, 2015.

SHERR C.J. Cancer cell cycles. **Science**, v. 274, p. 1672, 1996.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SOORYAKUMAR, D. et al. Molecular and cellular pharmacology of the novel noncamptothecin topoisomerase I inhibitor Genz-644282. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 8, p. 1490–1499, 2011.

STADLER ZK, THOM P, ROBSON ME, et al. Genome-wide association studies of cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, p. 4255 - 67, 2010.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **World Health Organization**, p. 1–2, 2014.

STEWART, Z. A.; WESTFALL, M. D.; PIETENPOL, J. A. **Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy** *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003.

SWEENEY, E. E. et al. Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: Significant clinical progress despite limitations. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 9, n. 2, p. 143–163, 2012.

TANIDA, S. et al. **Mechanisms of cisplatin-induced apoptosis and of cisplatin sensitivity: Potential of BIN1 to act as a potent predictor of cisplatin sensitivity in gastric cancer treatment** *International Journal of Surgical Oncology*, 2012.

TIEZZI, D. G. Epidemiologia do câncer de mama. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 31, n. 5, p. 213–215, 2009.

VIDEIRA, M.; REIS, R. L.; BRITO, M. A. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1846, n. 2, p. 312–25, 2014.

WHYTE P, BUCHKOVICH KJ, HOROWITZ JM, et al. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, v. 334, p. 124, 1988.

WHO. **Guide To Cancer Early Diagnosis**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer Fact Sheet N297**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>.

XIA M.; KNEZEVIC D. and VASSILEV L.T.: p21 does not protect cancer cells from apoptosis induced by nongenotoxic p53 activation. *Oncogene*, v. 30, p. 346-355, 2011.

YADAV, B. S.; CHANANA, P.; JHAMB, S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J Clin Oncol*, v. 6, n. 6, p. 252-63, 2015.

ZHAN, Y. et al. Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nature Chemical Biology*, v. 4, n. 9, p. 548–556, 2008.

ZHU, Y. et al. 5-Alk(en)ylresorcinols as the major active components in wheat bran inhibit human colon cancer cell growth. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 13, p. 3973–3982, 2011.