

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DO FUNGO *Trichoderma asperelloides* SOBRE
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS**

ORIENTADO: Bárbara Gomes Kunzmann

ORIENTADOR: Profa. Dra. Adriana Abalen Martins Dias

CO-ORIENTADOR(ES): Profa. Dra. Jane Lima dos Santos

Prof. Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes

BELO HORIZONTE

JULHO 2017

BÁRBARA GOMES KUNZMANN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DO FUNGO *Trichoderma asperelloides* SOBRE
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Adriana Abalen Martins Dias

CO-ORIENTADOR(ES): Profa. Dra. Jane Lima dos Santos

Prof. Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes

BELO HORIZONTE

JULHO 2017



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

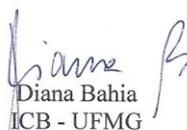


**"Avaliação do efeito biológico do extrato etanólico do fungo
Trichoderma asperelloides sobre células tumorais humanas"**

Barbara Gomes Kunzmann

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Adriana Abalen Martins Dias
ICB - UFMG


Diana Bahia
ICB - UFMG


Álvaro Cantini Nunes
ICB - UFMG

Belo Horizonte, 14 de julho de 2017.

***A todos aqueles que ainda tem fé na
humanidade, e acreditam em dias
melhores.***

AGRADECIMENTOS

É com grande ansiedade que finalmente chego à essa parte! Como é bom poder agradecer! E tenho muito a agradecer de fato.

É até estranho que uma das páginas mais importantes seja considerada opcional, difícil imaginar alguém que não tem o que agradecer ou a quem agradecer, mas se essa pessoa existe, não é da minha conta, não é mesmo?!

Então vamos lá!

Primeiramente, gostaria de agradecer a meus pais, Vânia e Paulo, é claro. Sem o sacrifício deles, eu não teria as oportunidades que me trouxeram até aqui e vão me levar muito além (espero!). Também agradeço a minhas irmãs, Nathália e Bianca, que serviram de ombro para desabafos e distrações para os momentos difíceis.

Gostaria de agradecer, mas um agradecimento daqueles megaultrapowerespeciais, a meu grande amor, Lucas Teixeira Souza. Na sua simplicidade, sempre me apoiou, me guiou, me alegrou e me engordou (não tão grata nessa parte), seja em momentos de luz ou escuridão. E foi de grande importância nessa jornada que agora se encerra (ou será que começa?), servindo de pau-para-toda-obra, me protegendo dos meus medos dos cantos escuros daquele ICB a noite, ficando até tarde comigo porque a porcaria do endnote resolveu criar personalidade. Enfim, por muitas coisas que fez, deixou de fazer, e que sei que ainda fará por mim.

Adriana Abalen, minha querida orientadora, que, apesar dos puxões de orelha, sempre me quis muito bem, e sempre esperou o melhor de mim, buscando de todas as formas a transformação de um projeto em um trabalho incrível, fica aqui o meu MUITO OBRIGADA!

Agradeço também, meus co-orientadores, Jane e Tiago, que me guiaram, orientaram e me ajudaram de todas as formas que estava ao alcance de vocês. Sem vocês não haveria mestrado.

Um agradecimento mega especial ao Jamil cuja ajuda foi peça decisiva nessa jornada, apesar de até hoje eu não conseguir distinguir de quando ele está brincando ou não.

Também gostaria de agradecer a fofa da Marliete, mais que uma colaboração se transformou em uma grande amiga e me ajudou imensamente. Não sei o que eu faria sem você!

Agradeço a meus amigos do LGEX, João, Pri, Flavinha(s), Octavius, Xico, Estefânia, Victor, Ana Flávia e Leo. Seus zueiros, me ensinaram MUITO, e me divertiram igualmente.

Bruninha, gema, muito obrigada pelos almoços, me diverti horrores!

Meus amigos da bio, do Santo Antônio, do Santa Maria, muito obrigada por estarem sempre ao meu lado, e compreenderem minhas faltas!

Agradeço ao pessoal do Laboratório de vírus e de Micologia que cederam gentilmente seus equipamentos, e sempre me ajudaram com muita boa vontade.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Genética, e professores, cujo os ensinamentos são de grande valor para mim.

Agradeço a CAPES por fornecer a minha bolsa.

Agradeço aos funcionários do ICB e da UFMG que colocam a ordem nesse lugar e facilitaram muito a minha vida e de muitos outros.

Agradeço aos meus colegas da pós, em especial, ao João Locke, meu grande amigo.

A todos que me ajudaram de alguma forma e quiseram meu bem, fica aqui o meu muito obrigada!

Agradeço à Goku, salvador da terra e do universo.

Sumário

RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 O Câncer.....	16
1.2 Abordagens terapêuticas no tratamento do câncer	20
1.3 Câncer de mama.....	24
1.4 Tratamentos derivados de fontes naturais.....	29
1.5 O gênero <i>Trichoderma</i>	30
1.6 O <i>Trichoderma asperelloides</i>	31
2- JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	34
3. – OBJETIVOS.....	36
3.1-Objetivo Geral	36
3.2 - Objetivos específicos	36
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1- Cultura de células	37
4.2 -O fungo <i>Trichoderma asperelloides</i>	37
4.2.1 Identificação morfológica e molecular do isolado LIBASP02.....	37
4.3- Armazenamento do fungo	41
4.4- Obtenção do extrato etanólico do fungo (ExtTa)	41
4.5- Fracionamento do ExtTa por Cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC).....	41
4.6- Caracterização do Extrato e frações de <i>T. asperelloides</i>	42
4.6.1 -Dosagem de proteína pela técnica do Ácido Bicinconínico (BCA)	42
4.6.2 -Dosagem de Açúcares Redutores Totais por DNS	43
4.6.3 -Viabilidade microbiológica	43
4.7- Avaliação do efeito citotóxico	44
4.8 Avaliação do efeito biológico do extrato no ciclo celular	44
4.9- Avaliação do efeito do ExtTa sobre o estresse oxidativo.....	45

4.10 -Análise da Indução de Autofagia por MET	45
4.11 Perfil eletroforético das frações de <i>T. asperelloides</i>	46
4.12 Análise estatística	46
5. RESULTADOS	47
5.2 Caracterização do ExtTa e frações obtidas por Cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC)	47
5.2.1 Viabilidade microbiana	47
5.2.2 Dosagem de proteínas e carboidratos	48
5.3 Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e das frações.....	52
5.4 Avaliação de efeitos biológicos produzidos por ExtTa 1	64
5.4.1 Avaliação do efeito no estresse oxidativo	64
5.4.2 Avaliação do efeito do tratamento com o extrato de <i>T. asperelloides</i> sobre o ciclo celular.....	66
5.4.3 Avaliação da indução de vacúolos autofágicos por MET.....	71
5.5 Avaliação do conteúdo proteico por SDS-PAGE das frações do extrato de <i>T. asperelloides</i>	74
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO	89
8. PERSPECTIVAS	90
9. REFERÊNCIAS	92

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016 para o Brasil.	25
Figura 2 - Morfologia de urédias conidiais, conidióforos, conídios e clamidiosporos de fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	33
Figura 3 - Características morfológicas do isolado LIBASP02 do fungo <i>Trichoderma asperelloides</i>	39
Figura 4 - Árvore filogenética do isolado LIBASP02 de <i>Trichoderma asperelloides</i> baseada no marcador <i>tef1</i>	40

Figura 5 - Avaliação de viabilidade microbiana nas preparações do extrato do fungo <i>T. asperelloides</i>	48
Figura 6 - Fracionamento por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) do extrato etanólico ExtTa 1 de <i>Trichoderma asperelloides</i>	49
Figura 7 - Fracionamento por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) do ExtTa 2 de <i>T. asperelloides</i>	51
Figura 8 – Quantificação do conteúdo de proteínas e carboidratos presentes no extrato etanólico do fungo <i>Trichoderma asperelloides</i>	52
Figura 9 - Conteúdo proteico e de carboidratos nas frações e pools do ExtTa 1 de <i>T. asperelloides</i>	53
Figura 10 - Conteúdo proteico e de carboidratos nas frações e pools do ExtTa 2.....	54
Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa 1 sobre as linhagens de adenocarcinoma de mama e humano e murino, e fibroblasto.	56
Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade das frações do ExtTa 1 para a linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.	57
Figura 13 - Avaliação da citotoxicidade das frações do ExtTa 1 para a linhagem de fibroblasto não tumorigênico GM637.....	58
Figura 14 - Avaliação da citotoxicidade dos pools do ExtTa 1 para a linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.	58
Figura 15 Avaliação da citotoxicidade dos pools do ExtTa 1 para a linhagem de fibroblasto não tumorigênico GM637.....	59
Figura 16 Avaliação da citotoxicidade do ExtTa 2 sobre os fibroblastos GM637 e as células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.	59
Figura 17 - Avaliação da citotoxicidade da fração 4.1 sobre os fibroblastos GM637 e as células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.	60
Figura 18 -Avaliação da citotoxicidade da fração 4.2 sobre o fibroblasto GM637 e adenocarcinoma mamário MDA-MB-231.	60
Figura 19 - Avaliação da citotoxicidade da fração 5.1 sobre o fibroblasto GM637 e o adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.	61
Figura 20 - Avaliação da citotoxicidade da fração 5.2 sobre o fibroblasto GM637 (A-C) e o adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.	61
Figura 21 - Avaliação da citotoxicidade da fração 6.1 sobre o fibroblasto GM637 e adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.	62
Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade da fração 6.2 sobre o fibroblasto GM637 e o adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.	62
Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade da fração 7.2 sobre o fibroblasto GM637 e o adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.	63

Figura 24 - Avaliação do efeito do extrato de <i>T. asperelloides</i> sobre o estresse oxidativo nas linhagens GM637 e MDA-MB-231	65
Figura 25 - Avaliação da indução de estresse oxidativo através da produção de ROS do ExtTa 1 para a linhagem MDA-MB-231.....	66
Figura 26 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular em adenocarcinoma mamário MDA-MB-231.....	68
Figura 27 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular da linhagem MDA-MB-231.	69
Figura 28 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular do fibroblasto GM637.	70
Figura 29 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular do fibroblasto GM637.	70
Figura 30 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular do adenocarcinoma mamário MDA-MB-231.....	71
Figura 31 - Microscopia eletrônica de transmissão de células da linhagem MDA-MB 231... ..	72
Figura 32 - Microscopia eletrônica de transmissão do fibroblasto GM637.....	73
Figura 33- Perfil eletroforético em gel SDS-Page das frações dos extratos de <i>T. asperelloides</i>	75
Figura 34 – Perfil eletroforético em SDS-Page das frações do extrato de <i>T. asperelloides</i> ..	76
Figura 35 – Perfil eletroforético em SDS-Page das frações do extrato de <i>T. asperelloides</i> ..	76

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 para mulheres, exceto pele não melanoma (Números arredondados para múltiplos de 10)	19
Tabela 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 para homens, exceto pele não melanoma (Números arredondados para múltiplos de 10)	19
Tabela 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no EUA estimados para 2016 para homens, exceto pele não melanoma.	20
Tabela 4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no EUA estimados para 2016 para mulheres, exceto pele não melanoma.....	20
Tabela 5 - Concentração e conteúdo total dos extratos ExtTa 1 e 2 de <i>T. asperelloides</i>	47
Tabela 6 - Proteínas e carboidratos totais das frações e pools de ExtTa 1	53
Tabela 7 - Proteínas e carboidratos totais presentes nas frações 4.2, 5.2, 6.2, 7.2 e 12.2 do ExtTa 2.....	54
Tabela 8 - Valor de IC50 e Índice de Seletividade (IS) do ExtTa 1 para as células GM637, MCF7, MDA-MB-231 e 4T1	57

Tabela 9 - IC50 para as linhagens GM637 e MDA-MB-231 e IS para ExtTa 1 e 2 e respectivas frações.....	63
---	----

Lista de Abreviaturas

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido Bicinconínico
BDA	Batata Dextrose Ágar
BSA	Albumina do Soro Bovino
CCND1	Ciclina D1
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	<i>Dubelco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitrosalicílico
ER	Receptor de estrogênio
ExtTa	Extrato etanólico de <i>T. asperelloides</i>
FMA	Ágar Farinha de Milho
FPLC	Cromatografia Líquida Rápida de Proteína
HER2	Receptor de crescimento epitelial humano 2
IARC	International Agency for Research on Cancer Concentração inibitória da viabilidade de 50% das células
IC50	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INCA	
IP	Iodeto de Propídeo
IS	Índice de Seletividade
Ki-67	Antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal K1-67
LGEX	Laboratório de Genética Experimental
LPS	Lipopolissacarídeo
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	Brometo de 3-[4,-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MYC	Fator de transcrição bHLH
PBS	Tampão fosfato salino
PR	Receptor de progesterona
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Radioterapia
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	SDS - polyacrylamide gel electrophoresis
SFB	Soro fetal Bovino
SNA	Ágar Nutriente Sintético
TAE	Tris-Acetato-EDTA
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz

UFMG
UFV
UNIFESP

Universidade Federal de Minas Gerais
Universidade federal de Viçosa
Universidade Estadual de São Paulo

RESUMO

O câncer é uma doença multifatorial que pode acometer qualquer indivíduo, independente da classe social, econômica, raça e região geográfica e que onera bastante o sistema de saúde. É imprescindível o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menores efeitos adversos e estudos visando avaliar o potencial terapêutico de novas substâncias antitumorais são de suma importância. Princípios ativos têm sido isolados com sucesso de fontes naturais como plantas e microrganismos. O quimioterápico rapamicina, por exemplo, é um antibiótico isolado de microrganismos. *Trichoderma asperelloides* é um fungo micoparásita saprófito, heterotrófico, cosmopolita, envolvido no processo de reciclagem de nutrientes e regulação da microbiota associada ao solo que tem sido utilizado como biocontrole de fitopatógenos, em substituição ao uso de fungicidas químicos. Princípios ativos com atividade microbicida, antiviral, imunomodulatória e antitumoral já foram isolados do extrato de fungos do mesmo gênero (*T. viride*, *T. harzianum* e *T. asperellum*). Não há estudos, entretanto, reportando moléculas antitumorais derivadas de *T. asperelloides*. O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito biológico do extrato etanólico do fungo *T. asperelloides* (ExtTa) e de suas frações sobre linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231 e MCF7) e murino (4T1). O extrato total de hifas e esporos (ExtTa) foi obtido em etanol 95% e as frações isoladas por FPLC. Verificou-se por SDS-Page uma predominância de proteínas de massa molecular entre 30 e 3,5 kDa e de glicoproteínas (coloração de Schiff) no extrato. Os efeitos biológicos do extrato e de suas frações foram avaliados *in vitro* em linhagens de adenocarcinoma de mama. Nos ensaios de viabilidade celular utilizando o MTT, foi observada toxicidade para as células tumorais, sendo a MDA-MB-231 mais sensível apresentando índice de seletividade (IS) de 1,6 em comparação com a linhagem não tumorigênica de fibroblasto humano GM637. As frações 4.1 e 5.2 do extrato apresentaram IS ainda maior de 1,96 e 1,92, respectivamente. A ação do ExtTa não envolve o aumento da produção de ROS (avaliação utilizando a sonda DFCH-DA), entretanto ele induz parada na fase G0-G1 e redução de células MDA-MB-231 na fase S (avaliado por citometria de fluxo). Foi observado por microscopia eletrônica de transmissão um aumento na produção de vacúolos autofágicos nas linhagens MDA-MB-231 e GM637, após o tratamento com ExtTa. Os resultados sugerem que o extrato de *T. asperelloides* possui potencial citotóxico contra linhagens tumorais, promove parada do ciclo celular e formação de vacúolos autofágicos na linhagem de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231.

PALAVRAS-CHAVE: *Trichoderma asperelloides*, câncer, citotoxicidade, ciclo celular, autofagia.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease, with the potential to assail any individual, with no regards to social class, religion, race or place. The development of effective forms of cancer treatment, with minor side effects is of extreme relevance due to the importance of this disease in the world and its excessive cost to the public health system. Therefore, the discovery and evaluation of new therapeutic substances is highly regarded. Many of the active principles being studied today were isolated from natural resources, such as plants and microorganisms. In fact, a few of the chemotherapy drugs largely deployed in the medical facilities, like the rapamycin, are antibiotics produced by fungi or bacteria. The fungus *Trichoderma asperelloides* is a saprophytic, heterotrophic and cosmopolite micoparasite, related to the soil nutrient recycling and regulation that has been used as a mean of biocontrol of phytopathogens, replacing the chemical fungicides. Active principles with bactericide, antiviral, imunomodulator and antitumoral properties have already been isolated in fungi of this same genre (*T. viride*, *T. harzianum* and *T. asperellum*). However, there has been no studies regarding antitumoral molecules in the *T. asperelloides* extract. The aim of this project was to evaluate the biological effects of the etanolic extract of the *T. asperelloides* (ExtTa) fungus and its fractions on human (MDA-MB-231 and MCF7) and mouse (4T-1) breast tumor cell lineages. The hyphae and spore extract was made with 95% ethanol and the fractions were separated by FPLC. Using BCA (bicinchoninic acid) and DNS (dinitrosalisilic acid) 40,00 mg/ml and 139,07 mg/ml of protein and 7,08 mg/ml and 10,20 mg/ml of carbohydrates were isolated in ExtTa 1 and 2 respectively. SDS-Page of the protein showed that most of the proteins presented a mass between 30 and 3,5 kDa and the Schiff staining showed predominance of glycoproteins. Cellular viability MTT assay showed that the extracts had high toxicity to tumor cells. The non-tumor human fibroblast lineage GM637 was used to determine the selectivity index (SI) and MDA-MB-231 was the most susceptible cell line. Fractions 4.1 and 5.2 showed a higher IS (1,96 and 1,92 respectively). The influence of ExtTa on the oxidative stress was measured using a DFCH-DA probe, which showed no influence over the production of ROS. Also, flow cytometry showed that the ExtTa seems to induce G0-G1 cell cycle arrest and reduction of the number of MDA-MB-23 cells in S phase. An increase on the number of autophagic vesicles in both MDA-MB-231 and GM637 lineages was observed through ETM (electronic transmission microscopy), after the treatment with ExtTa. These results suggest that the *T.asperelloides* has a cytotoxic potential against tumor cells and biological effects on cycle cell arrest and autophagy vesicle formation on the adenocarcinoma MDA-MB-231.

Keywords: *Trichoderma asperelloides*; cancer; cytotoxicity; cell cycle; autophagy

1 - INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer

Relatos registrados relacionados à condição patológica referida como câncer na civilização datam desde tempos remotos e remontam 3 mil anos a.C (A.C.S., 2014). O termo “câncer” tem sua origem atribuída a Hipócrates (460-370 a.C.), considerado “pai da medicina”, que utilizou os termos “carcinomas” e “carcinoma” para descrever tumores, devido a semelhança dos vasos sanguíneos a patas de caranguejos. Posteriormente, Galeno (130-200 a.C.) utilizou o termo “oncos” para descrever tumores com base no inchaço característico observado nesta doença.(Gallucci, 1985; A.C.S., 2014)

De acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) (Inca, 2014) , o “Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos”. Os tumores, entretanto, não são apenas massas de células em proliferação, mas um complexo tecidual formado por diversos tipos celulares, que interagem entre si (Hanahan e Weinberg, 2011). Sendo assim, o entendimento da biologia dos tumores não pode ser simplesmente a partir da enumeração dos traços comuns observados em células cancerígenas, mas também pela compreensão das contribuições provenientes do microambiente associado ao tumor. (Hanahan e Weinberg, 2011).

O início da carcinogênese tem como fundamento principal a ocorrência de mutações em genes-chave causadas por múltiplos agentes carcinogênicos. Tais genes-chave podem ser caracterizados em 3 grupos: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo do DNA (Parsa *et al.*, 2016;Gerger *et al.*, 2007).

Os proto-oncogenes são genes cuja função normal na célula está relacionada ao controle da divisão celular. Geralmente Alterações no material genético desses genes os transformam em oncogenes, o que perpetua a célula no ciclo celular, fazendo-a se dividir repetidamente e sem controle. Entre os proto-oncogenes mais reconhecidos, se encontram o Receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), fator de transcrição bHLH (MYC) e ciclina D1 (CCND1)(Parsa *et al.*, 2016).

Os genes supressores de tumor estão envolvidos com o controle de “parada” no ciclo celular. Ao sofrer mutações podem perder sua capacidade de promover a parada no ciclo celular, e se a maquinaria celular não é capaz de descobrir e reparar danos no DNA pode gerar novas mutações e mais alterações no fenótipo da célula, acumulando características típicas de células cancerígenas. Um exemplo de gene supressor de tumor é o proteína de tumor p53 (TP53), que é responsável pelo comando de parada da proliferação celular quando são

detectados erros na replicação do DNA, caso não seja possível a correção, então é realizada a sinalização para a célula seguir para apoptose (Ingvarsson, 2001) . Os genes BRCA1 e BRCA2 são outros exemplos de genes supressores de tumor em que a mutação é herdada(Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1994)

A carcinogênese é um processo lento, podendo levar muitos anos até que uma célula cancerígena dê origem a um tumor que seja detectável. No processo de carcinogênese células normais podem evoluir progressivamente para um estado neoplásico, e, ao longo dessa progressão, adquirir, em sucessão, marcas características que conferem a capacidade de se tornarem tumorigênicas e malignas (Hanahan e Weinberg, 2011). Essas marcas são: a capacidade de sustentação de sinais de proliferação; escape da ação de supressores de crescimento, dos mecanismos de morte celular programada e da destruição pelo sistema imune; capacidade proliferativa ilimitada; promoção da resposta inflamatória; ativação de mecanismos de invasão e metástase; indução da angiogênese; instabilidade genômica; e desregulação do metabolismo energético. O entendimento dessas marcas do câncer é essencial para o desenvolvimento de terapias-alvo. No início do processo carcinogênico, alterações epigenéticas podem ocorrer, como, por exemplo, o silenciamento de genes supressores de tumor. Um dos aspectos interessantes desse tipo de alteração é que talvez possam ser revertidas pela modificação dos fatores que levam à regulação epigenética, como a dieta e o estilo de vida (Pistollato, 2015).

A carcinogênese pode ser dividida didaticamente em três estágios: iniciação, promoção e progressão (Reddy *et al.*, 2003; Almeida, 2005).

Na Iniciação, o contato com algum tipo de agente carcinogênico provoca modificações genéticas nas células saudáveis, alterações que podem envolver mutações de ganho de função e superexpressão de oncogenes-chave, juntamente com mutações de perda de função, deleção e silenciamento epigenético de genes conhecidos como supressores de tumor (Hanahan e Weinberg, 2011). As mutações podem ser induzidas por diversos tipos de agentes carcinogênicos, como a radiação ionizante, metabólitos reativos celulares, luz UV, entre outras.

Na Promoção, as células com alterações genéticas entram em contato com os chamados oncopromotores. Os fatores de promoção podem ser agentes químicos ou biológicos, endógenos ou exógenos, como é o caso de vários tipos de vírus (papilomavirus, Epstein-barr, hepatite B), assim como a ação de hormônios, o processo inflamatório, fatores que atuam no crescimento celular. A exposição aos oncopromotores leva ao acúmulo de novas alterações. Consistente com os princípios darwinianos, o câncer evolui através dessas mutações aleatórias que modificam o DNA das células cancerígenas, além de alterações epigenéticas

que irão alterar várias vias de sinalização, seguida por uma seleção de células que conseguem sobreviver e proliferar em circunstâncias que normalmente desencadeariam o processo de morte celular (Almeida, 2005; Tanaka, 2013)

Finalmente, no terceiro estágio, conhecido como Progressão, as células se multiplicam de maneira descontrolada e irreversível, são instáveis geneticamente, apresentam falta de controle mitotótico, metástase, além de alterações bioquímicas, metabólicas e morfológicas (Almeida, 2005; Tanaka, 2013). Esse fenótipo das células cancerígenas se deve, em grande parte, a reativação ou modificação de programas celulares utilizados normalmente durante o desenvolvimento celular. Esses programas controlam processos coordenados, como a proliferação celular, migração, apoptose, diferenciação celular durante a embriogênese e a homeostase tecidual.

A Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC) (J *et al.*, 2014) já relacionou mais de 107 fatores de riscos ao desenvolvimento de câncer em humanos, podendo estes serem físicos, químicos ou biológicos (IARC) (J *et al.*, 2014). A exposição à luz ultravioleta é considerada um dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de pele (Massari *et al.*, 2007), enquanto o tabaco, entre outros agentes químicos, está associado ao câncer de pulmão (Veglia *et al.*, 2007). Entre os fatores biológicos, infecção por vírus como Epstein-Barr, HPV, hepatite B e C estão associados a linfoma de Hodgkin e hepatocarcinomas, respectivamente (J *et al.*, 2014).

A predisposição genética é responsável por cerca de 5% dos carcinomas (Sonnenschein e Soto, 2008). Tendo como exemplo clássico as mutações nos genes BRCA-1 e 2 associados aos cânceres de mama e ovário (Lynch *et al.*, 2008). É comumente aceito que o câncer pode ser causado tanto por mutações induzidas de maneira exógena, quanto por mutações herdadas geneticamente. Mas há alguns tipos de câncer que não podem ser explicados por essas duas fontes de mutação do DNA. Tomasetti *et al.*, 2017 propõe que erros aleatórios na replicação do DNA em células tronco podem ocorrer, se perpetuando para sua progênie, concluindo que 65% das diferenças de risco de alguns tipos de câncer está relacionada à divisão celular em células tronco.

O câncer pode acometer qualquer indivíduo, independente da classe social, econômica, religião, raça e região geográfica. De acordo com o *World Cancer Report 2014* (Iarc, 2014), o câncer é uma doença de grande importância na saúde pública mundial, com uma estimativa de incidência de 14 milhões de novos casos por ano em 2012, sendo uma das principais causadoras de morte em vários países, principalmente naqueles em desenvolvimento, onde estima-se que ocorram 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025 (Iarc, 2014). No Brasil, de acordo com o INCA (Inca, 2014), estima-se que entre 2016-2017

ocorram cerca de 600 mil novos casos de câncer. Os tumores mais frequentes em mulheres são: mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) (Tabela 1). Em homens os mais comuns são de próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%) (Tabelas 1 e 2). Nos Estados Unidos, o câncer configura a segunda maior causa de morte, e em 2016 surgiram, aproximadamente, 1.685.210 novos casos, levando a 595.690 óbitos (Siegel *et al.*, 2016) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados no Brasil para 2016 para mulheres, exceto pele não melanoma (Números arredondados para múltiplos de 10)

Localização Primária	Número de casos novos	% do Total
Traqueia, Brônquio e Pulmão	72.160	26
Mama Feminina	40.450	14
Cólon e Reto	23.170	8
Pâncreas	20.330	7
Ovário	14.240	5
Corpo do Útero	10.470	4

Fonte: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tbregioes_consolidado.asp (Maio, 2017)

Tabela 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados no Brasil para 2016 para homens, exceto pele não melanoma (Números arredondados para múltiplos de 10)

Localização Primária	Número de casos novos	% do Total
Próstata	61.200	28,6
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1
Cólon e Reto	16.660	7,8
Estômago	12.920	6,0
Cavidade Oral	11.140	5,2
Esôfago	7.950	3,7
Bêxiga	7.200	3,4
Laringe	6.360	3,0
Leucemias	5.540	2,6
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5

Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=BR> (Maio, 2017)

Tabela 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no EUA estimados para 2016 para homens, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Número de mortes	% do Total
Traqueia, Brônquio e Pulmão	85.920	27
Próstata	26.120	8
Cólon e Reto	26.020	8
Pâncreas	21.450	7
Fígado e ducto biliar	18.280	6
Leucemia	14.130	4
Esôfago	12.720	4
Bêxiga	11.820	4
Linfoma não Hodgkin	11.520	4
Sistema Nervoso Central	9.440	3
Total	314.290	100

Fonte: Adaptado de Siegel, Miller and Jemal 2016.

Tabela 4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no EUA estimados para 2016 para mulheres, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Número de mortes	% do Total
Traqueia, Brônquio e Pulmão	72.160	26
Mama Feminina	40.450	14
Cólon e Reto	23.170	8
Pâncreas	20.330	7
Ovário	14.240	5
Corpo do Útero	10.470	4
Leucemia	10.270	4
Fígado e ducto biliar	8.890	3
Linfoma não Hodgkin	8.630	3
Sistema Nervoso Central	6.610	2
Total	281.400	100

Fonte: Adaptado de Siegel, Miller and Jemal 2016.

1.2 Abordagens terapêuticas no tratamento do câncer

O tratamento do câncer tem como principal objetivo a erradicação da doença do organismo do paciente. Contudo, na impossibilidade de cura, busca-se a utilização de tratamentos que diminuam os sintomas provocados pela doença, preservando a qualidade de vida do paciente, além do alongamento da expectativa de vida.

Várias abordagens terapêuticas são empregadas no tratamento do câncer e, a utilização dessas abordagens de maneira isolada ou em associação tem demonstrado uma

maximização das chances de cura ou contenção da doença (Almeida, 2005).Dentre os tratamentos utilizados estão cirurgia, radioterapia, quimioterapia e o transplante de medula óssea.

A cirurgia é o tratamento mais efetivo para tumores localizados primariamente e regiões linfáticas associadas (Urruticoechea *et al.*, 2010). Sendo utilizada como um tratamento único, a cirurgia cura mais pacientes do que qualquer outro tipo de tratamento sozinho, uma vez que a cirurgia se baseia na remoção e morte de 100% das células tumorais (Urruticoechea *et al.*, 2010).

A radio e a quimioterapia vieram na época de 1920 e 1940, respectivamente, e são capazes de matar apenas uma fração de células tumorais a cada tratamento, sendo consideradas tratamentos complementares (Urruticoechea *et al.*, 2010).

Ao longo das últimas décadas, ocorreu um grande aperfeiçoamento tanto na técnica, quanto no uso da modalidade de terapia combinada, utilizando a quimio e a radioterapia como adjuvantes e neoadjuvantes à cirurgia, levando à redução de maneira significativa da morbidade e mortalidade associadas com a cirurgia de tumores sólidos. Com os novos avanços, a cirurgia consegue remover completamente metástases selecionadas a partir de critérios clínicos padronizados, resultando em 30-40% na taxa de 5 anos de sobrevivência (Figueras *et al.*, 2007),contudo, essa opção terapêutica é restrita a metástases confinadas, que apenas representa 10/15% dos casos (Ohlsson *et al.*, 1998).

Na radioterapia (RT), utilizam-se radiações para destruir um tumor ou apenas impedir que as células cancerígenas aumentem (Inca, 2014). A RT é utilizada no tratamento em cerca de 45% de novos casos (Delaney *et al.*, 2005), sendo responsável pela cura de 40% dos casos de câncer, o que representa uma ótima correlação entre efetividade e custo, já que , em países desenvolvidos, a RT representa cerca de 5% dos investimentos em controle do câncer (Urruticoechea *et al.*, 2010). A RT sozinha é capaz de curar uma variedade de tumores, como por exemplo, estágios iniciais de câncer de cabeça e pescoço, câncer de próstata e estágios iniciais do Linfoma de Hodgkin (Urruticoechea *et al.*, 2010)..

Abordagens quimioterápicas como a neoadjuvância (administração do quimioterápico antes da RT), concomitância (durante a RT) e de manutenção (dando sequência a RT) mostraram um aperfeiçoamento no controle local e na erradicação de micrometástases (Urruticoechea *et al.*, 2010);(Almeida, 2005)

Por quase um século, a terapia sistêmica foi dominada pelo uso de quimioterápicos citotóxicos, sendo muito dessas drogas agentes que causam danos ao DNA e são articuladas para matar ou inibir a proliferação celular (Urruticoechea *et al.*, 2010). Essas drogas são,

frequentemente, administradas em uma única dose ou em pequenas sessões de terapia na maior dose possível, sem chegar em níveis de toxicidade que ameacem a vida, a chamada “Dose Máxima Tolerada” (DMT) (Kerbel e Kamen, 2004). O uso da DMT requer um longo período para recuperação das células saudáveis do paciente, e apesar dos últimos avanços tecnológicos, o uso de quimioterápicos apenas no tratamento de células cancerígenas pode levar a seleção de clones resistentes a drogas, devido à grande instabilidade do DNA e alta taxa de mutação de células tumorais (Bailar e Gornik, 1997).

Porém, esses tratamentos não afetam apenas as células doentes, mas também as células saudáveis do organismo, causando diversos efeitos no paciente, como por exemplo, cansaço, fraqueza, enjoo, entre outros. Além da debilitação do paciente pela rádio e quimioterapia, outro problema é a falta de garantia da cura do paciente, ou que o tumor não voltará alguns anos após o tratamento. Dentro desse contexto, um dos grandes desafios da abordagem quimioterápica do câncer é o desenvolvimento de fármacos que apresentem baixa toxicidade ao organismo do paciente, mas que apresentem uma alta eficiência contra as neoplasias. (Almeida, 2005).

O melhor entendimento da carcinogênese e biologia tumoral, devido a uma investigação intensiva e avanço tecnológico, principalmente na área molecular, leva a um aumento das oportunidades de inovação no tratamento do câncer, uma vez que permite o desenvolvimento de abordagens específicas a cada tipo de câncer e personalizadas ao tumor de cada paciente. (Baudino, 2015; Lheureux *et al.*, 2017). Há um crescente número de possibilidades em abordagens terapêuticas que não existiam há 20 anos. A identificação de várias alterações na regulação de processos biológicos, na fisiologia e morfologia dos tumores e seu respectivo microambiente ajudou a direcionar o desenvolvimento de drogas (Hanahan e Weinberg, 2000; 2011; Lheureux *et al.*, 2017). Atualmente existem várias modalidades de terapias-alvo, como por exemplo interações com receptores de superfície celular (anticorpos monoclonais), cascatas de sinalização intracelular (através de inibidores de tirosinas-quinases), ou do microambiente, relacionados a efeitos na vascularização do tumor ou hipóxia. Também foram vistos resultados interessantes através da conjugação anticorpo-droga ajudando aumentar a citotoxicidade da droga (Tolcher, 2016; Urruticoechea *et al.*, 2010). A modulação do ambiente imunológico através da promoção na alteração das dinâmicas da propagação das células imunes é uma área de estudo bastante ativa, incluindo terapias utilizando ex-vivos como propagação de células imunes, vacinas e inibidores de checkpoint (Vanneman e Dranoff, 2012; Farkona *et al.*, 2016). E, ainda, o melhoramento da entrega de agentes-alvo em células de câncer a partir do uso de nano-partículas, como as “*porphysomes*” apresenta uma oportunidade tremenda na precisão do efeito apenas em células cancerígenas e redução da toxicidade colateral (Raghavan *et al.*, 2016). A terapia viral é um outro conceito que visa o

uso de vírus oncolíticos, que crescem seletivamente em células tumorais (Parato *et al.*, 2005). Outro mecanismo antitumoral utilizando vírus é a replicação dos mesmos em células tumorais o que pode ativar a resposta imune contra o tumor em si (Urruticoechea *et al.*, 2010).

As aberrações em várias vias de sinalização celulares são essenciais para regulação celular do metabolismo, desenvolvimento do tumor, crescimento, proliferação, metástase e reorganização citoesquelética (Polivka e Janku, 2014), e são principalmente essas as vias que as novas terapias tem como alvo. Por exemplo, a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, possui um papel crítico na transformação de tumores em tumores malignos e subsequentemente, seu crescimento, proliferação e metástase (Mabuchi *et al.*, 2015) , uma vez que tal via regula aspectos centrais da biologia do câncer, como o metabolismo, crescimento celular e sobrevivência (Engelman, Luo e Cantley, 2006). O melhor entendimento das interações entre as moléculas dessa via, e as desregulações de várias etapas em células tumorais contribuiu para o desenvolvimento de duas drogas anticancerígenas aprovadas: everolimo e temsirolimo, que possuem essa via como alvo, especificamente inibindo-a (Lheureux *et al.*, 2017).

As inovações terapêuticas que presenciamos atualmente não deixaram de lado os tratamentos ditos convencionais, como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O aumento do conhecimento acerca da massa tumoral, seu desenvolvimento e microambiente envolvido, assim como o advento de novas tecnologias, principalmente aquelas conhecidas como Sequenciamento de Nova Geração (NGS) foram e são importantes na transposição de barreiras antigamente encontradas por essas chamadas terapias convencionais. (Bernie 2017; Lhereux et al 2017, Schneider et al 2017). O NGS ajuda a traçar perfis de expressão gênica que se encontram diferenciados nos diferentes tipos de câncer, inclusive ajudando a identificar genes que estão envolvidos na sensibilidade ou resistência a RT e quimioterapia (Bernier 2017; Lhereux et al 2017), a identificação desses genes e a avaliação nos padrões de expressão gênica ajudam a desenvolver novas abordagens terapêuticas que possam maximizar o efeito da RT e quimioterapia, através de um *insight* mais específico e personalizado do tumor. Um grande exemplo é como as investigações da interação entre a RT e o sistema imune do paciente levou ao levantamento de novos mecanismos que, quando explorados, possuem o potencial para aumentar a eficiência da RT transpondo as barreiras previamente encontradas, através de imunomodulação (Weichselbaum *et al.*, 2017). Há evidências que indicam que RT pode, através de diversos mecanismos, ativar a resposta imune tanto localmente quanto sistemicamente, que pode estimular a sobrevivência do tumor ou promover a morte do tumor (Lugade *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Sharabi *et al.*, 2015), um equilíbrio entre esses efeitos da RT através do uso da imunomodulação é primordial para que haja um melhor resultado dessa terapia

No tratamento do câncer, são mais eficientes as abordagens terapêuticas multimodais, que consistem na combinação de vários tipos de tratamentos, de forma a potencializar o tratamento e diminuir os efeitos adversos e a morbidade associados a ele. A combinação de terapias com vários modos de ação visa uma das características principais do câncer, que é a heterogeneidade da massa tumoral devido à grande instabilidade genética de células cancerígenas, pois as células dentro do microambiente tumoral não são necessariamente clones, e podem ter reações diferentes a um determinado agente antitumoral.

1.3 Câncer de mama

O câncer que possui maior incidência e a maior mortalidade na população feminina mundial é o câncer de mama, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Inca, 2014). Só em 2012 ocorreram cerca de 1,7 milhões de novos casos de câncer de mama no mundo (25% de todos os cânceres em mulheres) e cerca de 500 mil óbitos (15% de todos os casos de morte por câncer em mulheres) (World Cancer Report, 2014).

Para o Brasil, em 2016 a estimativa foi de cerca de 58 mil novos casos de câncer de mama, com um risco de 56,2 casos a cada 100 mil mulheres (INCA). O número de óbitos por causa do câncer de mama no Brasil é considerado elevado, cerca de 14 óbitos para cada 100 mil mulheres em 2013 (Inca, 2014).

Apesar de um grande aumento na incidência do câncer de mama, a sua mortalidade está em declive ao longo dos anos (Hassan *et al.*, 2010); (Guarneri e Conte, 2004). E grande parte do motivo para isso se deve ao tratamento sistêmico da doença através da terapia hormonal, assim como uso de quimio e radioterapia adjuvante para controlar qualquer resquício metastático da doença, reduzir sua taxa de recorrência e melhorar a sobrevida no longo-prazo (Hassan *et al.*, 2010).

Existem múltiplos fatores que causam este tipo de câncer, dentre eles estão fatores biológicos relacionados ao sistema endócrino, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida, assim como envelhecimento, história familiar de câncer de mama, alta densidade do tecido mamário (Inca, 2014), e fatores genéticos, como a herança de mutações nos genes BRCA 1 e BRCA 2, genes supressores de tumor cujas mutações são encontradas em 30 e 40% dos casos de câncer familiar, respectivamente (Berry *et al.*, 1997; Burke *et al.*, 1997). A adoção da prática de exercícios e a alimentação saudável estão associadas a uma diminuição de 30% do risco de desenvolvimento desse tipo de câncer. O Ministério da Saúde no Brasil recomenda a

mamografia bial para mulheres entre 50 a 69 anos como estratégia de rastreamento de tumor de mama.

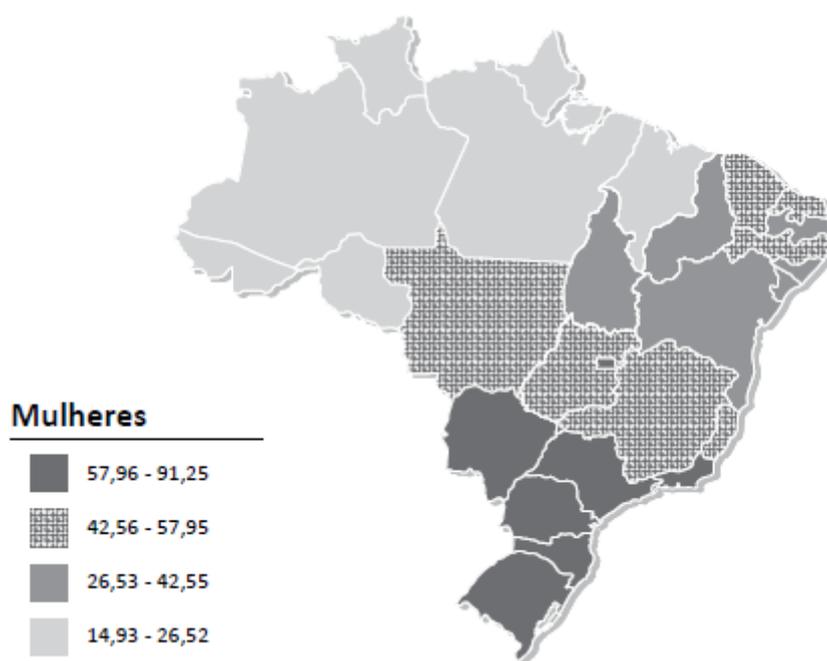


Figura 1 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016 para o Brasil.

O câncer que possui maior incidência e a maior mortalidade na população feminina mundial é o câncer de mama, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (INCA). A incidência de câncer de mama no Brasil a cada 100 mil mulheres está representada em **cinza escuro** (57,96-91,25); **hachurado** (42,56-57,95); **cinza intermediário** (26,53-42,55) e **cinza claro** (14,93-26,52).

Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/mapa.asp?ID=5> (2017)

Apesar dos avanços advindos de um melhor entendimento das terapias adjuvantes para os estágios iniciais do câncer de mama, o tratamento da doença metastática ainda é um grande desafio (Hassan *et al.*, 2010). A doença metastática, apesar de incurável, é sensível ao tratamento com quimioterápicos, sendo possível aumentar a qualidade e prolongamento da vida do paciente(Hassan *et al.*, 2010).

O entendimento das bases moleculares do câncer de mama possibilitou o desenvolvimento de novas terapias-alvo em potencial (Hassan *et al.*, 2010). Como, por exemplo, o uso de O trastuzumabe ou trastuzumab (nome comercial: Herceptin®, en:Genentech), um anticorpo monoclonal humanizado, contra HER-2/neu, que foi largamente estudado de maneira bem sucedida em testes clínicos (Henson *et al.*, 2006).

O carcinoma de mama não é apenas uma única doença, abrangendo vários tipos biologicamente distintos, com características patológicas diferentes e uma variedade de

implicações clínicas (Dai *et al.*, 2015); (Tang *et al.*, 2008); (Spitale *et al.*, 2009); (Iwamoto e Pusztai, 2010). Evidências sugerem que câncer de mama com características divergentes histopatológicas e biológicas exibem comportamentos diferentes podendo levar a variadas respostas a tratamentos, sendo necessárias abordagens terapêuticas diferenciadas (Blows *et al.*, 2010). Levando em consideração o acima exposto, o agrupamento correto dos cânceres de mama em subtipos clinicamente relevantes é de grande importância.

O desenvolvimento da doença pode ser predito a partir do uso de fatores de prognóstico, sendo os mais comuns utilizados PR (receptor de progesterona), ER (receptor de estrogênio), Ki-67 (antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal K1-67) e HER-2 (receptor do fator de crescimento epitelial humano 2) que se referem à resposta do tumor a tratamentos antitumorais (Parsa *et al.*, 2016); (Esteva e Hortobagyi, 2004); (Lønning, 2007); (Dai *et al.*, 2015)), assim como avaliação de características clinico-patológicas como o tamanho do tumor, o estágio do tumor e o envolvimento de linfonodos (Vallejos *et al.*, 2010);(Cheang *et al.*, 2009).

O hormônio estrogênio possui um papel importante no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, tanto que três fatores de risco importantes para o surgimento da doença estão associados ao desbalanceamento na secreção de estrogênio. São eles: idade da primeira menstruação, idade na menopausa e idade da primeira gravidez (Parsa *et al.*, 2016). Cerca de 60% do câncer de mama são ER-positivos (Shao e Brown, 2004). Acredita-se que o risco de câncer é maior em idade mais avançada, pois há uma exposição por um período maior a agentes carcinogênicos, além da diminuição da eficiência de proteção do sistema imunológico com o passar dos anos (Parsa *et al.*, 2016);(Balducci, 2005). O câncer de mama que ocorre antes dos 40 anos, geralmente é considerado clinicamente mais agressivo e tem alta probabilidade de metástase (Benz *et al.*, 2003).

O gene HER-2 é considerado um proto-oncogene, pois é um receptor que se liga a fatores de crescimento, induzindo atividade de tirosina-kinase, promovendo o crescimento e proliferação celular durante as fases G1-S do ciclo celular (Parsa *et al.*, 2016), mutações nesse gene o transformam em oncogene, resultando em crescimento e divisão celular incontrolável. O oncogene HER-2 é encontrado super-expresso em cerca de 20-30% dos casos de câncer de mama (Parsa *et al.*, 2016).

O biomarcador Ki-67 é considerado um fator de prognóstico em câncer de mama. Quando encontrado em níveis altos, geralmente, indica um prognóstico ruim, relacionado a invasividade do tumor e curto período de sobrevivência do paciente (Parsa *et al.* 2016)

O desenvolvimento de tecnologia e o avanço de técnicas biomoleculares, como a análise de da expressão gênica em larga escala por meio de microarranjos, elucidou que a resposta da

célula tumoral ao tratamento está relacionada à características moleculares intrínsecas (Wooster e Weber, 2003) (Dai *et al.*, 2015); (Spitale *et al.*, 2009); (Tang *et al.*, 2008); (Desmedt *et al.*, 2009); (Iwamoto e Pusztai, 2010); (Parsa *et al.*, 2016). Atualmente existem vários tipos de classificação e divisão de grupos de subtipos de câncer de mama que são baseados no perfil de expressão proteica, a partir de um grande painel de biomarcadores muito bem caracterizados (Sørlie *et al.*, 2001), (Perou *et al.*, 2000); (Abd El-Rehim *et al.*, 2005); (Hu *et al.*, 2006); (Sotiriou e Pusztai, 2009). Contudo, todas essas classificações podem ser posicionadas em 3 grandes grupos: Luminal, Super-expressão de HER2 e triplo-negativo (TNP). Câncer do subtipo luminal apresenta perfil de expressão remanescente do componente epitelial luminal da mama (Perou *et al.*, 2000), sendo considerado o subtipo de tumor mais comum entre os carcinomas mamários. (Dai *et al.*, 2015). De maneira geral, o tumor do subtipo luminal responde bem à terapia hormonal, mas não muito bem a quimioterapia convencional (Brenton *et al.*, 2005).

O subtipo de super-expressão de HER2, em geral, é considerado ER negativo, PR negativo, HER2 positivo (Vallejos *et al.*, 2010), e cerca de 40 a 80% desse tipo de tumor possui mutação em TP53 (Dai *et al.*, 2015). Não foi encontrada uma associação com idade ou raça para esse subtipo (O'Brien *et al.*, 2010). A combinação de trastuzumabe com quimioterapia adjuvante e neoadjuvante representa o tratamento padrão para câncer desse subtipo (Brenton *et al.*, 2005).

Os tumores Triplo-negativos são assim chamados por serem negativos para os receptores ER, PR e HER2, com um perfil de expressão semelhante ao de células epiteliais basais de outras partes do corpo e células normais da mama, as células mioepiteliais (Perou *et al.*, 2000). Há um grande interesse nesse tipo de tumor, pois eles possuem uma progressão clínica bastante agressiva e, atualmente, não há uma terapia-alvo padronizada (Dai *et al.*, 2015), sendo a quimioterapia o tratamento sistêmico padrão utilizado, tendo como base os quimioterápicos baseados em taxanos e antraciclinas (Bianchini *et al.* 2016; von Minckwitz *et al.* 2012). Esse subtipo é frequentemente associado principalmente a indivíduos na premenopausa, com desenvolvimento comum em mulheres afro-americanas, (Dai *et al.*, 2015).

Uma das maiores dificuldades no tratamento do câncer de mama é o desenvolvimento de resistência ao tratamento com quimioterápicos (Corona *et al.*, 2017). Nesse sentido, faz-se relevante a busca por novas ferramentas e abordagens terapêuticas que possam aumentar a eficiência do tratamento desse tipo de câncer, visando a minimização e o retardo da ocorrência da resistência às drogas. Um exemplo deste tipo de estudo é o estudo clínico randomizado de Fase III, chamado de BOLERO-2 (Piccart *et al.*, 2014). O estudo mostrou que a sinalização aberrante pela via mTOR está associada à resistência às terapias endócrinas

e indicou, analisando uma população de pacientes pós-menopausa, com câncer de mama avançado receptor de hormônio positivo, que o uso de um inibidor específico de mTOR, Everolimo, em combinação com Exemestano em pacientes que foram previamente tratados com um inibidor de aromatase não-esteroidal durante o teste de droga, levou a uma melhora significativa na sobrevida livre de progressão (PFS) dos pacientes (Baselga *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2013). A ativação de mTOR está associada a proliferação celular e sinalização de vias metabólicas, levando a uma vantagem na manutenção da sobrevivência de células cancerígenas (Corona *et al.*, 2017). De fato, a ativação da via de mTOR por PIK3 está frequentemente associada a resistência a tratamentos endócrinos (Generali *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2010; Corona *et al.*, 2017).

A ocorrência de mutações somáticas é uma forma bem reconhecida de resistência adquirida à terapia hormonal por câncer de mama metastático (Corona *et al.*, 2017). Um exemplo é a mutação no gene ESR1 (receptor 1 de estrogênio) em pacientes com tumor de mama metastático (Robinson *et al.*, 2013). No entanto, foi observado que o tratamento de pacientes que apresentam essa mutação com compostos terapêuticos-alvo, como é o caso no inibidor de mTOR, Everolimo ou a droga Faslodex® causaram uma melhora no índice PFS (Chandarlapaty *et al.*, 2016; Cristofanilli *et al.*, 2016)

Corona e colaboradores (2017) sugerem que uma terapia baseada na combinação de quimioterapia e imunoterapia pode ser interessante no tratamento de câncer de mama do tipo triplo-negativo, uma vez que uma porção de tumores desse subtipo têm se mostrado altamente imunogênicos, com alta porcentagem de linfócitos infiltrados no tumor (Loi *et al.*, 2013) altos níveis de genes da família B7 tipo 1 (Freeman *et al.*, 2000), proteínas de morte celular programada 1 ligante 1 (PD-L1) (Wimberly *et al.*, 2015) e níveis de expressão gênica do mRNA (Bianchini *et al.*, 2016) quando comparado a outros subtipos de carcinoma mamário. Uma alta expressão de marcadores de tumor e alta densidade de linfócitos infiltrados no tumor está associado com benefícios da quimioterapia em tumor triplo-negativo (Desmedt *et al.*, 2009; West *et al.*, 2011; Issa-Nummer *et al.*, 2013). Esses resultados sugerem que o tratamento quimioterápico possui melhores resultados na presença de um sistema imune eficiente. Além disso, vários estudos demonstram que a imunoterapia em carcinoma mamário pode ajudar a reduzir o risco de metástases ou manter a dormência do tumor (Schmidt *et al.*, 2008; Bianchini *et al.*, 2010; Pusztai *et al.*, 2016; Corona *et al.*, 2017). Corona *et al.* 2017 ainda ressaltam que existem algumas moléculas-alvo que estão sobre investigação clínica e podem ser de interesse, por exemplo os inibidores de polimerase poli(ADP-ribose) PARP, conhecido por sua “letalidade sintética” (Turner *et al.* 2008).

1.4 Tratamentos derivados de fontes naturais

O desenvolvimento de tratamentos contra o câncer, que sejam eficazes e apresentem menores efeitos adversos, é de extrema relevância quando se considera a importância desta doença no mundo e o quanto ela onera o sistema público de saúde.

Produtos naturais no tratamento de doenças começaram a ser utilizados a mais de 1.000 anos no oriente (Wasser, 2002) e são usados até hoje no mundo inteiro. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 80% da população mundial depende da medicina tradicional, que usa produtos naturais, para atender suas necessidades básicas de saúde (Farnsworth, 1994); (Duraipandiyar *et al.*, 2006), (Bhanot *et al.*, 2011), sendo comum o uso de extrato de fungos em pacientes que também usam a cirurgia, quimio ou radioterapia no tratamento de tumores (Mueller *et al.*, 2008);(Wasser, 2014). Plantas e microorganismos são importantes fontes de compostos e princípios ativos utilizados em medicamentos e, dos agentes antitumorais utilizados hoje na clínica, 60% são provenientes de fontes naturais (Cragg e Newman, 2005) ,como plantas, bactérias e fungos.

Portanto, estudos visando avaliar o potencial terapêutico de substâncias naturais, provenientes de plantas e microrganismos, no tratamento contra o câncer, são imprescindíveis.

Entre as primeiras moléculas isoladas de plantas e utilizadas no tratamento de câncer se encontram os Vinca Alkaloides que foram isolados de *Catharanthus roseus*, uma planta originalmente endêmica de Madagascar. Os Vinca Alkaloides podem ser usados isoladamente ou combinados a outros quimioterápicos no tratamento de vários tipos de câncer, entre eles linfomas, leucemias, câncer de mama, testículo e pulmão (Prakash *et al.*, 2013). Existem quatro medicamentos principais derivados de Vinca Alkaloides: Vimblastina, Vinorelbina, Vincristina e Vindesina. Outros fármacos como a Rapamicina e seus análogos foram obtidos da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Esta droga apresenta uma potente atividade imunossupressora (Alberts Mw, 1993), ao inibir as vias de sinalização necessárias para a ativação da proliferação em células T, bloqueando o ciclo celular na fase tardia de G1 não somente em células T e B, mas também de osteosarcomas e rhabdomiosarcomas (Alberts Mw, 1993). Os exemplos citados ilustram como a identificação de moléculas que possuem como alvo vias de sinalização importantes em tumores, apresentam grande potencial como ferramentas terapêuticas.

O uso de fungos para fins medicinais já foi reportado na China, Rússia, Japão, Coreia, Estados Unidos e Canadá (Wasser e Weis, 1999). A medicina chinesa e japonesa utiliza extratos fúngicos, compostos isolados de fungos, assim como o fungo inteiro em tratamentos antitumorais como auxiliares na cirurgia, radioterapia ou quimioterapia (Lindequist *et al.*, 2005);(Zhang *et al.*, 2009). Tanto polissacarídeos constituintes da parede celular quanto glicoproteínas isoladas de fungos foram identificadas apresentando atividade antineoplásica, um exemplo são os beta-glucanos (Vetvicka, 2011). Algumas destas moléculas exercem seus efeitos antitumorais ao influenciarem o sistema imune, estimulando macrófagos, células T e Células Natural-Killers (Wasser, 2002; Lindequist *et al.*, 2005). Além dessas, alguns metabólitos secundários, como a Cordicepina isolado de várias espécies do gênero de ascomiceto *Cordyceps*, mostraram efeito pró-apoptótico em várias linhagens celulares derivadas de tumores (Wu *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008)

1.5 O gênero *Trichoderma*

Em 1794, Person descreveu pela primeira vez o gênero *Trichoderma*, sendo a espécie *Trichoderma viride* a única reconhecida e aceita dentre as três identificadas. Até o ano de 1969 não houve a identificação de nenhuma nova espécie para este gênero, porém, em 1969 Rifaí identificou nove espécies relacionadas, mas morfologicamente distintas e as reconheceu como pertencentes ao gênero *Trichoderma*. A diferenciação das espécies desse gênero apenas por parâmetros morfológicos não se mostrou uma tarefa fácil, porém, com o desenvolvimento das técnicas moleculares a eficácia e precisão dos métodos aumentou o que tornou possível a identificação de um número maior de espécies deste gênero(Jaklitsch, 2009; Hoyos-Carvajal e Bissett, 2011).

O banco de dados virtual GenBank (NCBI) classifica esse gênero como pertencente ao Domínio Eucariota, “Grupo” Fungi/Metazoa, Reino Fungi, Filo Ascomicota, Subfilo Pezizomicotina, Classe Sordariomycetes, Subclasse Hipocreomicetidae, Ordem Hipocreales, “Família” Hipocreales mitospóricos (ou Família Hipocreacea, Gênero *Hypocrea* na forma teleomórfica). Essa classificação é baseada no Index Fungorum (www.indexfungorum.org) que é organizado por diferentes e renomadas instituições, sendo constantemente revisado e atualizado o que o torna uma fonte de referência bastante confiável.

As espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* são caracterizadas por apresentarem um crescimento rápido: as colônias atingem de 2 a 9 cm de diâmetro quatro dias após

plaqueamento (Esposito e Da Silva, 1998). O tamanho e formato dos conídios desse gênero são bem variados, podendo ser verdes, amarelos ou hialinos, não existindo conidióforos definidos (Samuels, 1996). Os conídios são produzidos em hifas diferenciadas, e tendem a se agregar em massas (De Carvalho, 2006).

O gênero *Trichoderma* é amplamente distribuído pelo globo terrestre, ocorrendo nos mais diversos tipos de solo e ambientes naturais, além de muitas das espécies serem encontradas associadas a plantas. Em vários países, esse gênero tem sido utilizado em formulações comerciais empregadas no controle biológico de enfermidades causadas em plantas por patógenos, reduzindo assim o uso de fungicidas químicos (Melo, 1991).

1.6 O *Trichoderma asperelloides*

A espécie *Trichoderma asperelloides* já foi identificada como *T. asperellum* e *T. viride*. Em 2010, Samuels e colaboradores utilizaram genealogia multilocus de quatro regiões genômicas (*tef1*, *rpb2*, *act*, *ITS1*, 2 e 5.8s rRNA) para analisar coleções de linhagens de *T. asperellum*, além de marcadores de sequências polimórficas, MALDITOF MS do proteoma e técnicas clássicas de micologia e observaram que dentro da espécie *T. asperellum*, se encaixavam duas espécies irmãs: *T. asperellum* e *T. asperelloides*, sendo a última considerada uma nova espécie.

Há registro de linhagens de *T. asperelloides* em várias regiões do globo terrestre, sendo, portanto, considerada uma espécie cosmopolita, mas que é principalmente encontrada em regiões tropicais (Samuels *et al.*, 2010).

T. asperelloides apresenta uma morfologia semelhante à de *T. asperellum* (Figura 2) com hifas septadas de cor branca e conídios esverdeados evidenciados após 5 a 10 dias de crescimento em ágar batata dextrose à temperatura entre 25-30°C (BDA). *T. asperelloides* é um fungo caracterizado como sendo um micoparasita necrofítico, heterotrófico, natural do solo.

Assim como outros membros do gênero, *T. asperelloides* já foi objeto de alguns estudos visando analisar seu potencial como controle biológico em plantações (Chaparro *et al.* 2011, (Samuels *et al.*, 2010), uma vez que possui capacidade de parasitar outros fungos, inclusive fungos que causam doenças em plantas, como é o caso dos fitoparasitas *Rhizoctonia solani*, *Pythium spp.*, *Sclerotinia spp.*, *Fusarium spp.*, *Phytophthora*. Atualmente, *T. asperelloides* é utilizado na composição do controle biológico TrichoPlus® (BASF) aprovado para uso nos

EUA. De acordo com Samuels et al (2010), o fungo *Trichoderma* SKT-1, usado no controle biológico em plantações de arroz, previamente caracterizado como *T. asperellum* (Watanabe et al., 2005), na realidade trata-se de *T. asperelloides*. Chaparro et al. (2011), demonstraram que a medida que eram expostas a crescentes concentrações de fungicidas, cepas de *T. harzianum* e *T. asperelloides* foram tolerantes a exposição aos agentes químicos, sem, contudo, afetar funções vitais de seu organismo.

Assim como outros membros do gênero, *T. asperelloides* apresenta uma relação benéfica em sua interação com plantas. Em 2014, Gupta (Gupta et al., 2014) demonstrou que *T. asperelloides* é capaz de suprimir a produção de óxido Nítrico (NO) de *Fusarium oxysporum*, um fungo necrofítico patogênico, quando ambos são inoculados em raízes de *Arabidopsis*. Em outro estudo que avaliou a interação de *T. asperelloides* com *Arabidopsis thaliana* (Brotman et al., 2013), foi visto que este fungo é capaz de aprimorar a tolerância da planta ao estresse abiótico, e assim permitir um melhor crescimento da planta em situações de estresse, a partir do aumento da expressão de enzimas antioxidantes e ativando mecanismos de defesa da planta. Além do exposto acima, foi observado que *T. asperelloides* apresentou propriedades de biocontrole em raízes da planta de amendoim contra o fungo patogênico *Sclerotium rolfsii* (Doley et al., 2014). Em 2015, Chagas et al. observaram que cepas de *T. asperelloides* e *T. harzianum* isoladas do produto comercial Trichoplus JCO apresentavam grande eficiência na solubilização de fosfato o que resultava em aumento da biomassa de arroz (Chagas et al., 2015).

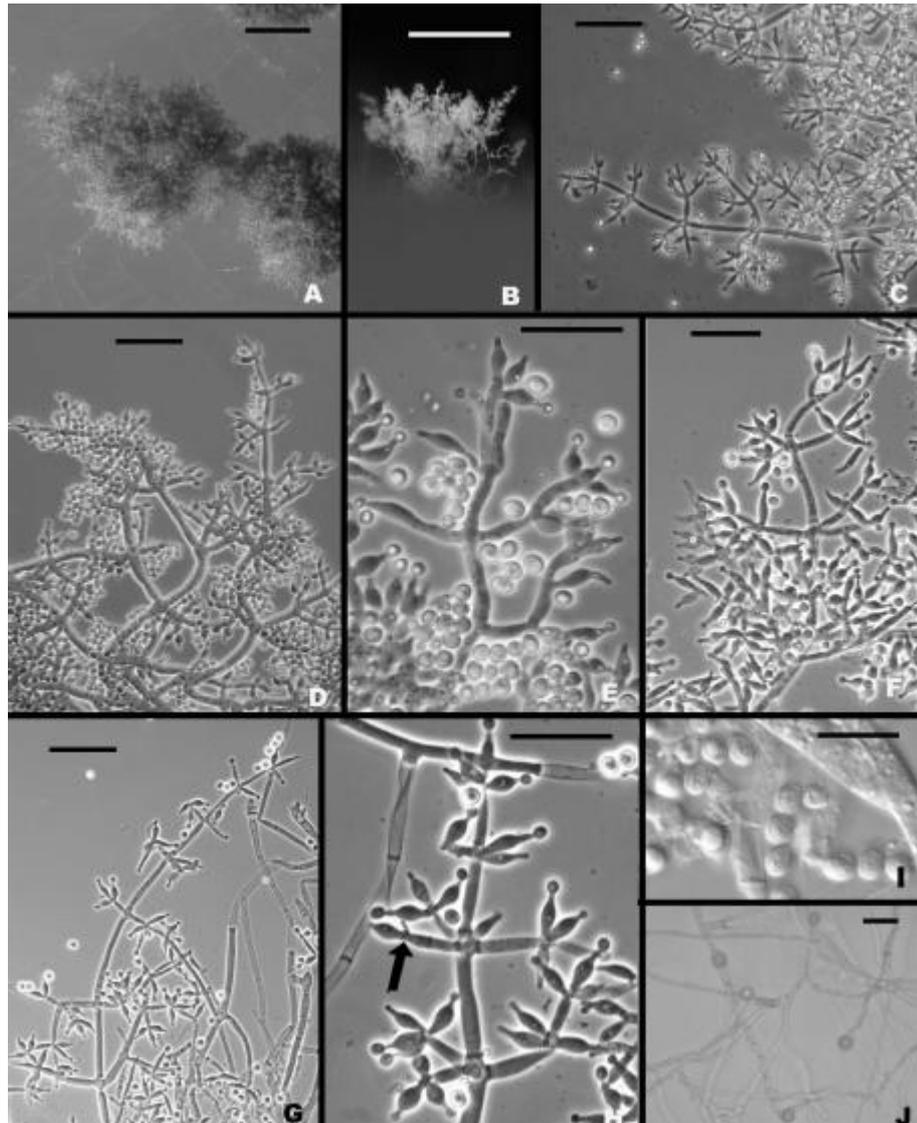


Figura 2 - Morfologia de urédias conidiais, conidióforos, conídios e clamidiosporos de fungos do gênero *Trichoderma*.

Os fungos *T. asperellum* e *T. asperelloides* são espécies morfológicamente parecidas e são classificadas como espécies irmãs. A, B, F-J.: *T. asperelloides*; C-E: *T. asperellum*; A, B: Urédias; C-H: Conidióforos; I: Conídios; J: Clamidiosporos. Barras de escala: A,B – 0,5 mm; C-E, G, J – 20 µm; F, H, I – 10 µm. Adaptado de Samuels 2010.

Em 1980, Kusakabe e colaboradores identificaram uma substância de *Trichoderma viride* que apresentava atividade microbicida, antiviral, imunomoduladora e antitumorigênica. Tal substância é uma enzima denominada L-Lisina-alfa-Oxidase, que causou 50% da inibição do crescimento *in vitro* da célula de linfoma murino, L5187Y (Kusakabe *et al.*, 1980). A mesma enzima foi posteriormente isolada de *Trichoderma harzianum* Rifai, (Lukasheva e Berezov, 2002) e, em 2013, Pokrovsky (Pokrovsky *et al.*, 2013) e colaboradores mostraram que esta substância apresentava uma alta citotoxicidade para uma vasta variedade de linhagens tumorais, incluindo PC3 (câncer de próstata), SKOV3 (câncer de ovário), LS174T e HT29

(câncer de colon), MCF7 (câncer de mama) e K562 (leucemia eritromieloblastoide). Em 2014, Abd El-Rahman (Abd El-Rahman *et al.*, 2014) e colaboradores também demonstraram que a cultura filtrada de *Trichoderma harzianum* e de *Trichoderma asperellum* produziam efeitos citotóxicos contra células de câncer cervical e de mama (HeLa e MCF-7, respectivamente).

Apesar de sua ação como controle biológico ser bem definida, há uma carência de estudos sobre as propriedades farmacológicas de *T. asperelloides*. O único é o estudo sobre os efeitos do extrato do fungo *Trichoderma asperelloides* no controle de protozoários da espécie *Leishmania amazonensis*. Neste estudo coordenado pela Profa Jane Lima dos Santos na Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, e conduzido pela mestranda Danielle Lopes, foi observado que o extrato etanólico de *T. asperelloides* apresentou efeito leishmanicida para formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, a partir da redução do número de parasitas viáveis expostos ao extrato. Frações de baixo peso molecular apresentaram citotoxicidade para as promastigotas de *L. amazonensis* e promoveram alterações morfológicas na mitocôndria, bolsa flagelar com possível aumento de estruturas semelhantes a corpos lipídicos e acidocalcissomos (Lopes e Santos, 2017). Os resultados deste estudo sinalizam, portanto, para a existência de compostos moleculares com princípios ativos com potencial para utilização na clínica presentes no extrato etanólico de *T. asperelloides* e reforçam a necessidade da realização de mais estudos buscando identificar outras propriedades biológicas e ou princípios ativos e moléculas que apresentem potencial farmacológico como, por exemplo, atividade antitumoral.

2- JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O número de novos casos de câncer cresce de maneira alarmante no mundo, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. A busca de novas substâncias com ação antitumoral é essencial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para tratamentos multimodais mais eficientes, menos agressivos, que minimizem desenvolvimento de resistência e recidiva. Várias substâncias com atividade antitumoral têm sido obtidas a partir de microrganismos, especialmente fungos, tais como citocalasinas (*Pyrenohora* sp.; *Phoma* sp.), ofiobolinas (*Bipolaris* sp.), alternasolanol (*Alternaria* sp.) (Evidente *et al.*, 2014). O fungo *Trichoderma asperelloides*, usado como controle biológico de fungos fitopatógenos, pode representar uma fonte natural de princípios ativos a serem usados no tratamento de doenças, dentre elas o câncer. Levando-se em consideração a propriedade antitumoral apresentada

por membros de seu mesmo gênero, torna-se relevante a realização de estudos visando a identificação de possíveis princípios ativos ou moléculas derivados deste microrganismo e que possuam efeito antitumoral.

3. – OBJETIVOS

3.1-Objetivo Geral

- Avaliar o efeito biológico do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* sobre células derivadas de adenocarcinoma de mama humana.

3.2 - Objetivos específicos

- 3.2.1-Obter o extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides*;
- 3.2.2- Caracterizar o extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* por gel filtração em sistema de cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC), fracionamento eletroforético em SDS-PAGE e dosagem do conteúdo proteico e de polissacarídeos;
- 3.2.3-Avaliar o impacto do tratamento com o extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* e de suas frações sobre a viabilidade de células derivadas de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231 e MCF7) e murinho (4T1);
- 3.2.4-Avaliar os efeitos do tratamento com o extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* na promoção do estresse oxidativo e indução da parada do ciclo celular na linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231;
- 3.2.5-Avaliar o impacto do tratamento com o extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* sobre a formação de autofagossomos na linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231;
- 3.2.6- Identificar frações do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* com efeito biológico sobre células da linhagem de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Cultura de células

Foram utilizadas as linhagens celulares humanas MCF7 e MDA-MB-231, derivadas de adenocarcinoma de mama, adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC); e a linhagem celular imortalizada humana de fibroblasto, GM637, gentilmente doada pelo Dr. Luiz Fernando Lima Reis do Hospital Sírio Libanês. Também foram utilizadas as células 4T1 derivadas de adenocarcinoma de mama murinho, adquirida na ATCC. Todas as células foram mantidas criopreservadas no banco de células do Laboratório de Genética Experimental (LGEX). A cultura de tais linhagens foi realizada em meio RPMI-1640 (Vitrocell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 2mM de L-glutamina (Sigma) e 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Sigma) em estufa a 37°C com ambiente saturado em 5% de CO₂.

4.2 - O fungo *Trichoderma asperelloides*

O fungo *Trichoderma asperelloides* foi gentilmente doado pela Coleção de Microorganismos do Laboratório de Microbiologia aplicada à Agroindústria da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. O fungo foi cultivado em placas de petri contendo 20 mL de ágar dextrose de batata (BDA) (HiMedia), 1,8% ágar, em estufa BOD a 28°C durante 5-7 dias.

4.2.1 Identificação morfológica e molecular do isolado LIBASP02

Para confirmação da espécie do fungo, uma amostra do isolado de *Trichoderma* empregado neste estudo (LIBASP02) foi enviada para o Dr. André Rodrigues, coordenador do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro. A identificação da cultura monospórica do isolado LIBASP02 foi feita utilizando marcadores morfológicos e moleculares conforme descrito na Dissertação de mestrado de Danielle Lopes, 2017. Brevemente, as características macroscópicas das colônias (raio de crescimento, cor do micélio, pigmento solúvel, anéis concêntricos e urédias) foram avaliadas em BDA (Ágar Batata Dextrose), FMA (Ágar Farinha de Milho) e SNA (Ágar Nutriente Sintético) durante 7 dias a 25°C, no escuro. Os testes de crescimento foram realizados nos três meios de cultivos e incubados em três temperaturas (25, 30 e 35°C), no escuro. Para a análise das características microscópicas (forma e medidas do conidióforo, células de suporte, fiálides, conídios e clamidósporos) foram realizados microcultivos em BDA e FMA e incubados a 25°C por 72 horas, no escuro. Todas as lâminas foram preparadas utilizando KOH 3M e observadas em microscópio Leica DM750.

Foi realizada a extração do DNA genômico de uma cultura do isolado incubada a 25°C, em BDA, durante três dias, no escuro, para análise molecular (Montoya *et al.*, 2016). A amplificação do gene que codifica para o fator alfa de alongação 1 (*tef1*) foi feita sob as condições e empregando os iniciadores utilizados por Atanasova (Atanasova *et al.*, 2013). Os produtos amplificados obtidos foram purificados e sequenciados utilizando o método bidirecional de Sanger no equipamento ABI 3500 (Life Technologies). As sequências *forward* e *reverse* obtidas foram reunidas no BioEdit (Hall, 1999) A sequência consenso foi alinhada com outras sequências de fungos filogeneticamente relacionados (obtidas do NCBI-GenBank e de Samuels *et al.*, 2010 utilizando o programa MAFFT (Kato e Standley, 2013). O fungo *Protodrea pallida* (CBS 29978) foi utilizado como grupo externo. A árvore filogenética foi inferida mediante a Inferência Bayesiana utilizando o programa MrBayes v.3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012). A árvore gerada inclui um total de 53 sequências de *tef1* cujo alinhamento final apresentou um tamanho de 591pb. O modelo de substituição nucleotídica selecionado para o conjunto de dados (HKY+I+G) foi calculado no programa jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012) utilizando o critério de informação Akaike, com um intervalo de confiança de 95%. Duas corridas independentes foram realizadas, cada uma contendo três cadeias quentes e uma cadeia fria; cada corrida consistiu da amostragem de cadeia de Markov – Monte Carlo (MCMC) com 200.000 gerações. Finalmente, os primeiros 25% das gerações de MCMC foram descartadas como *burn-in*. A árvore final foi editada no programa Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems).

De acordo com Lopes, D. (dissertação, 2017), a identificação morfológica do isolado LIBASP02 mostrou que ele apresenta clamidósporos, conídios ovoides de parede lisa, fiálides ampuliformes. Houve a formação de pústulas nos três meios de cultivo analisados (Figura 3). Não foi observada formação de pigmentos solúveis no meio. A análise filogenética baseada no sequenciamento do gene *tef1* revelou que o isolado LIBASP02 forma um grupo monofilético juntamente com outras sequências de *Trichoderma asperelloides* (Figura 4). Tal agrupamento é um grupo irmão de *T. asperellum* (Figura 4). Os resultados das análises morfológicas estão de acordo com a descrição de *T. asperelloides* apresentada na literatura (Samuels *et al.*, 2010). Em conjunto, os dados morfológicos e moleculares suportam a identificação do isolado LIBASP02 como *T. asperelloides*.

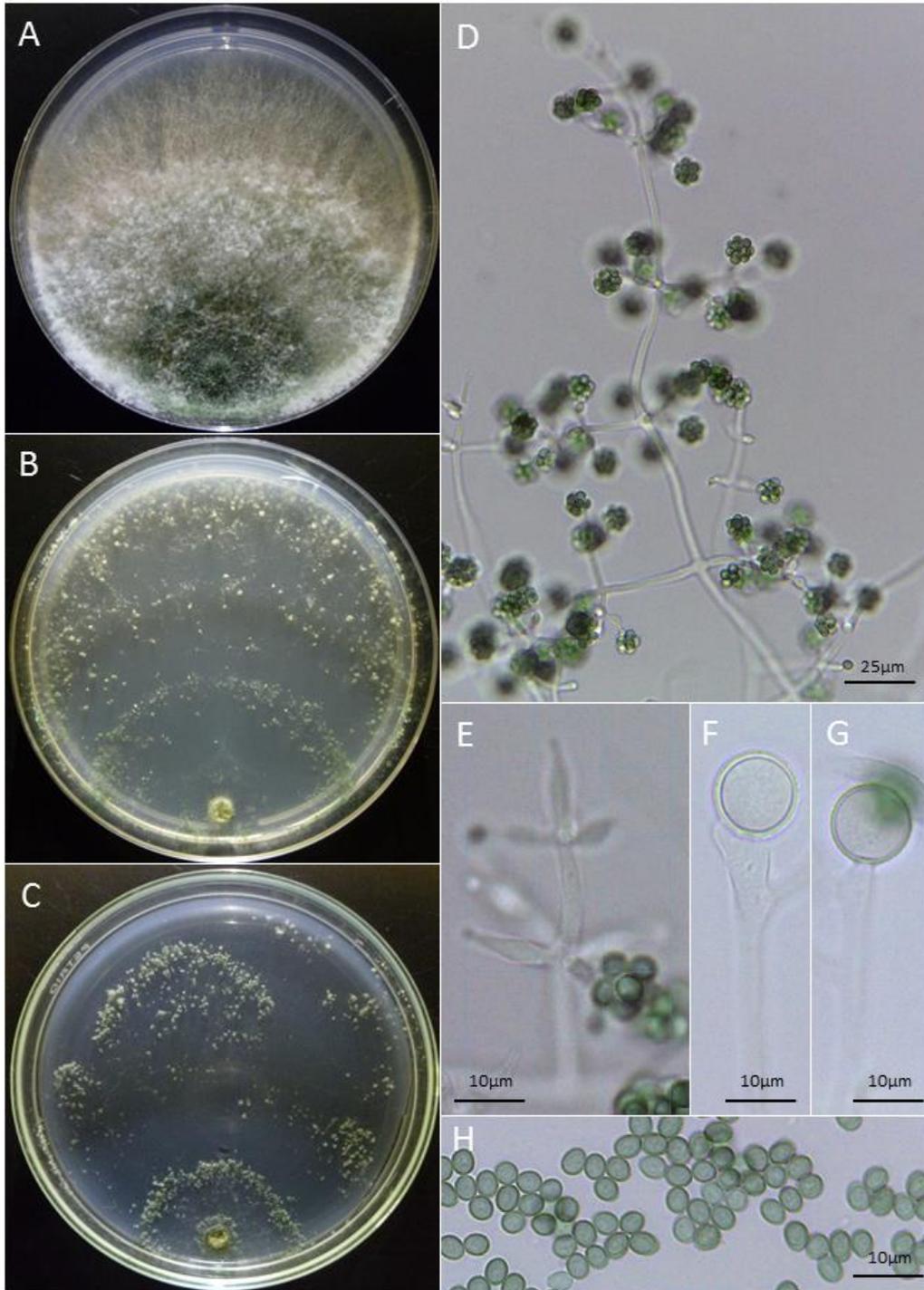
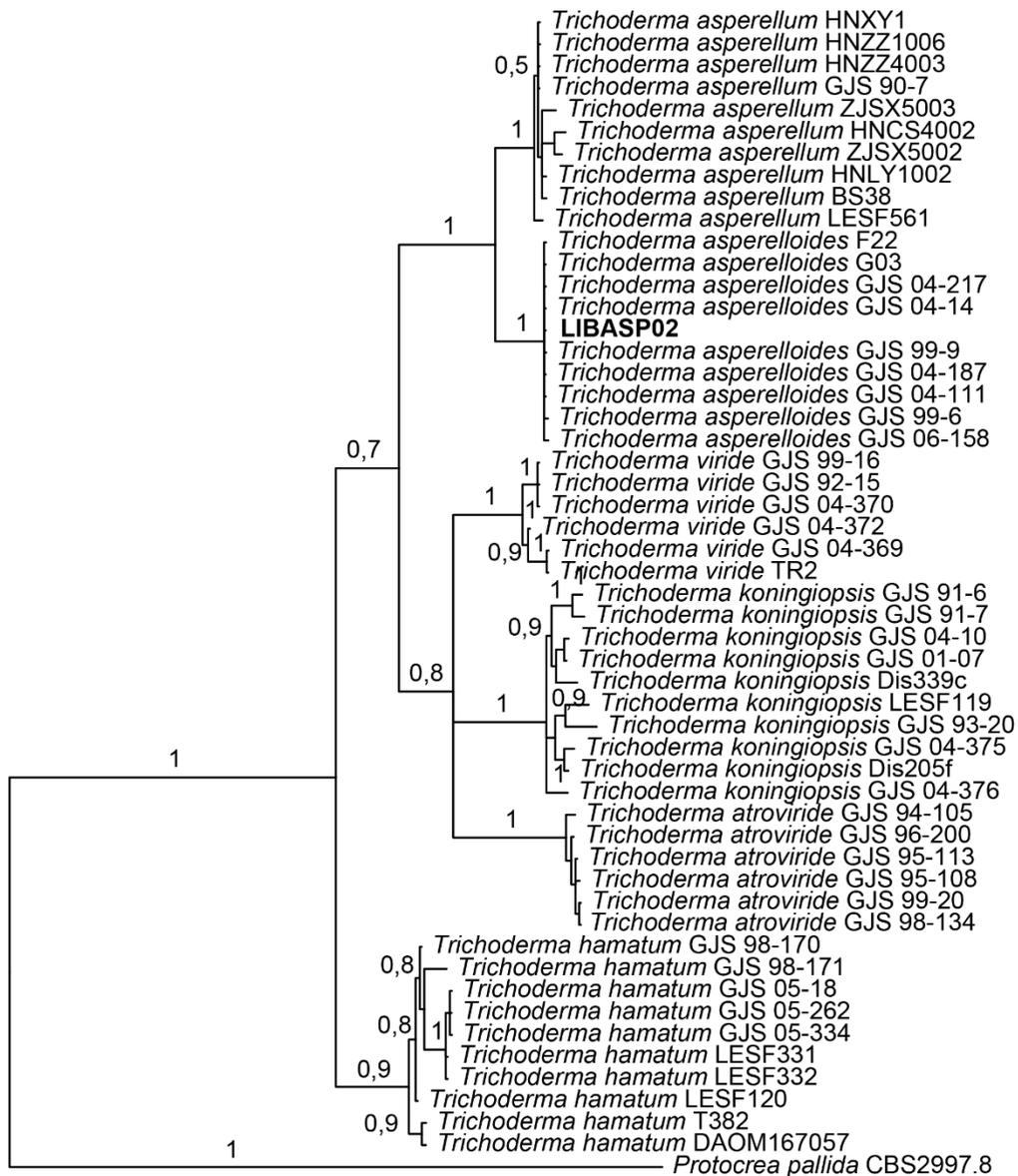


Figura 3 - Características morfológicas do isolado LIBASP02 do fungo *Trichoderma asperelloides*.

O isolado LIBASP02 apresenta clamidósporos, conídios ovoides de parede lisa, fiáldes ampuliformes **A-C**: culturas em meios BDA, FMA e SNA, respectivamente, após 7 dias a 25 °C. **D**: conidióforo. **E**: disposição das fiáldes. **F-G**: Clamidósporos. **J**: Conídios. Fonte: Lopes, D. (2017)



0.07

Figura 4 - Árvore filogenética do isolado LIBASP02 de *Trichoderma asprelloides* baseada no marcador *tef1*.

A árvore foi reconstruída com o algoritmo de Inferência Bayesiana e os números nos ramos indicam as probabilidades posteriores de Monte Carlo. A árvore inclui um total de 53 sequências da região de 591pb do fator alfa de elongação *tef1*. As sequências das demais espécies de *Trichoderma* utilizadas para o alinhamento foram obtidas do NCBI-GenBank e de Samuels et al. (2010). O nome das espécies é seguido pelo código das linhagens. O isolado LIBASP02 é destacado em negrito. A espécie *Protocrea pallida* CBS 29978 foi utilizada como grupo externo. Fonte: Lopes, D. 2017

4.3- Armazenamento do fungo

O estoque das amostras do isolado LIBASP02 de *T. asperelloides* usado neste trabalho foi feito conforme já descrito (Diogo *et al.*, 2005). Brevemente, cubos de meio de cultura BDA com o fungo crescido foram adicionados a tubos de ensaio contendo 5mL de água tipo II estéril e conservados a 4°C.

4.4- Obtenção do extrato etanólico do fungo (ExtTa)

A obtenção do ExtTa foi realizada de acordo com Fukuzawa e colaboradores (Fukuzawa *et al.*, 2008) em colaboração com a doutoranda Marliete Carvalho do Laboratório de Micologia. Brevemente, o fungo foi semeado em placas de petri de 90x15 mm, contendo 20 ml de BDA e incubados a 28° C por 7 dias. Os esporos e micélio do fungo foram raspados com o auxílio de uma ponteira P1000 estéril e coletados em EtOH 95% (Merck), (5 mL/placa). A suspensão etanólica contendo o fungo foi transferida para tubo de microcentrífuga de 10 mL. A suspensão foi homogeneizada e submetida a agitação em agitador orbital (Gerhardt) a 100 rpm por 24 horas e, em seguida, centrifugada a 4.000 g por 20 minutos (centrífuga BR4i- Jouan). O sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL previamente pesados, em alíquotas de 1ml. As alíquotas foram submetidas à secagem em *Speedvac Concentrator plus* (Eppendorf). Finalmente, as amostras de extrato foram pesadas, solubilizadas em DMSO 100% e mantidas a -20°C até o momento do uso. Foram separados, pelo menos, 5 ml da suspensão etanólica para fracionamento por cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC).

4.5- Fracionamento do ExtTa por Cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC)

A cromatografia líquida é, geralmente, utilizada na purificação de polímeros a partir de misturas complexas. O termo refere-se a todos os métodos cromatográficos que apresentam uma fase líquida móvel e uma fase estacionária, que pode apresentar uma resina composta por esferas de agarose com diferentes ligantes, dependendo do tipo de afinidade utilizada para a purificação, podendo ser baseada no tamanho das macromoléculas, hidrofobicidade, distribuição de cargas, fase reversa ou cromatográfica (Niessen *et al.*, 2006),(Welling e Welling-Wester, 1989).

Cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) é um método de cromatografia líquida comumente utilizado para biomacromoléculas, principalmente proteínas, e processos de separação biológica com baixa pressão e alta capacidade (Xia *et al.*, 2012).

A suspensão etanólica do ExtTa foi concentrada em liofilizador K105 (LIOTOP). Esse processo consiste em secar a solução do extrato eliminando todo o líquido por sublimação. Após secagem do extrato, o mesmo foi solubilizado em tampão 20 μ mol Tris-HCl, (Affymetrix) em pH 8. Em seguida, a solução foi submetida à cromatografia utilizando uma coluna de filtração molecular superose TM 12 10/300 GL (GE LifeSciences) acoplada ao equipamento FPLC (Pharmacia biotec, modelo LKB PUMP p500). O monitoramento das frações eluídas foi realizado na região do ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm. O fracionamento foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Fisico-Química de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) com a colaboração do técnico Jamil Silvano de Oliveira. As frações coletadas foram liofilizadas, solubilizadas em DMSO 100% (Sigma) e estocadas em freezer a -20°C até o momento do uso.

4.6- Caracterização do Extrato e frações de *T. asperelloides*

4.6.1 -Dosagem de proteína pela técnica do Ácido Bicinconínico (BCA)

A técnica que foi empregada para quantificação das proteínas do extrato é baseada no uso do ácido bicinconínico (BCA) para a quantificação colorimétrica de proteínas totais. Esse método combina a redução de Cu^{2+} para Cu^{1+} por proteínas, em meio alcalino, com a sensibilidade e seletividade da detecção colorimétrica do cátion de cobre (Cu^{1+}) pelo BCA. A união de duas moléculas de BCA a um íon de cobre resulta na formação de um produto de cor roxa o qual absorve luz no comprimento de 562 nm. A absorbância cresce linearmente com o aumento da concentração de proteínas em um segmento definido (20–2,000 $\mu\text{g/ml}$) (Fischer *et al.*, 1999); (Prozialeck *et al.*, 2002).

A quantificação do conteúdo proteico do extrato e de suas frações foi feita utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante e com a colaboração do laboratório de Imunoquímica de toxinas naturais. Brevemente, foi preparada uma curva padrão, em duplicata, usando diluições seriadas (1:2 a partir de 2mg/mL) da proteína albumina (BSA) em DMSO 100% (Sigma). Em placa de 96 poços, foram colocados 5 μL de cada diluição, em duplicata, e, em seguida, foram acrescentados 200 μL de BCA Working Reagent (WR) em cada poço. A placa foi, então, incubada a 37°C por 30 minutos antes da leitura a 562 nm em espectrofotômetro Varioskan Flash (Thermo Scientific). O DMSO puro (100%) foi usado como branco.

4.6.2 -Dosagem de Açúcares Redutores Totais por DNS

Os carboidratos são componentes dos organismos vivos, presentes em diversos processos metabólicos. Eles podem ser classificados em mono, oligo ou polissacarídeos, sendo que os dois últimos são compostos por moléculas de monossacarídeos unidas por ligações hemiacetalicas, o que torna possível quebrá-los em componentes menores. Já os monossacarídeos não são passíveis de hidrólise e são conhecidos como açúcares redutores, pois em uma reação de oxi-redução, eles são capazes de reduzir o outro componente da reação, conseqüentemente, sendo oxidados. Por conta dessa propriedade redutora, os monossacarídeos são comumente utilizados em testes de dosagem de açúcares.

A fim de aferir a quantidade de Açúcares Redutores Totais (ART) no extrato e frações de *T. asperelloides*, a dosagem indireta de polissacarídeos totais presentes no extrato, foi realizada empregado-se o teste do ácido dinitrosalicílico (DNS) em colaboração com o laboratório de Imunoquímica de toxinas naturais. Este teste baseia-se na reação entre o açúcar redutor (monossacarídeo) e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (que apresenta cor amarela). Ao ser reduzido pelos monossacarídeos, o DNS dá origem a um composto avermelhado que absorve luz no comprimento de onda de 540nm. A absorbância avaliada cresce linearmente com o aumento da concentração de açúcares redutores presentes em uma solução.

Foi construída uma curva padrão utilizando o açúcar Glicose (32 mM)(Sigma), em diluições seriadas 1:2 em DMSO 100% (Sigma). Em uma placa de 96 poços, 5 µL de cada diluição de glicose foram adicionados em duplicata, assim como as amostras e o branco (DMSO 100%). Em seguida 20 µL do reagente DNS foram adicionados em cada poço e a placa foi aquecida a 95°C por 10 minutos, para hidrólise dos polissacarídeos em monossacarídeos redutores. O volume final da reação foi completado para 100 µL com DMSO 100% e a leitura foi feita no comprimento de onda de 540 nm no leitor Varioskan Flash (Thermo Scientific).

4.6.3 -Viabilidade microbiológica

Para confirmação da ausência de fungos e/ou bactérias viáveis no extrato, o mesmo foi diluído em PBS, plaqueado em meio BDA (HiMedia) e outra alíquota inoculada em caldo tioglicolato. As placas e o caldo tioglicolato inoculados foram incubados em estufa a 28°C e 37°C, respectivamente, por 7 dias. Foi também avaliada a viabilidade microbiana no DMSO e no PBS que foram usados como diluentes do extrato.

4.7- Avaliação do efeito citotóxico

A avaliação do efeito citotóxico foi realizada pelo ensaio de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Este ensaio é baseado na capacidade das desidrogenases mitocondriais de clivarem os anéis tetrazolium do corante MTT resultando na formação de cristais azuis.

Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico (diluições seriadas 1:2 partindo de 800 µg/ml) sobre as células. As linhagens celulares foram plaqueadas, (1×10^4 células por poço), em quadruplicata, em 100 µl de meio específico contendo 10% de SBF em placas de 96 poços e após 24 horas de incubação, o meio foi removido e novo meio, contendo o extrato nas diferentes concentrações, foi adicionado. Após 48h de incubação, a cada poço foi adicionada uma solução de MTT (Sigma) em meio de cultura (0,5 µg/µl), e as culturas foram incubadas por 4 horas a 37°C em estufa com atmosfera saturada com 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi removido e 100 µl do solvente (DMSO 100%- Sigma ou Dimetilformamida (Sigma) + SDS 10% (Affymetrix); 1:1 v/v) foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan. Após a solubilização dos cristais de formazan, a leitura da absorbância foi feita a 570 nm no equipamento *Varioskan Flash* (Thermo Scientific). Poços contendo apenas células com meio ou contendo células com meio + DMSO 20%, foram utilizadas como controle. Poços contendo meio com DMSO 20% ou ExtTa foram utilizados como branco.

Para avaliar o potencial do extrato como agente antitumoral, foram considerados alguns parâmetros de citotoxicidade: a concentração que inibe 50% das células (IC₅₀) e o índice de seletividade (IS). O IS consiste na razão entre o IC₅₀ da linhagem celular não tumoral (GM637) e o IC₅₀ da linhagem tumoral (MDA-MB-231, MCF7 ou 4T1), sendo considerado que quanto maior o IS, maior é a seletividade do efeito citotóxico do extrato sobre as células tumorais em relação às células não tumorais.

4.8 Avaliação do efeito biológico do extrato no ciclo celular

As alterações resultantes do tratamento com o ExtTa nas diferentes fases do ciclo celular (G₁, S, G₂/M) foram avaliadas pelo método de Nicoletti e colaboradores (Nicoletti *et al.*, 1991). As células foram plaqueadas, em placas de 6 poços (3×10^5 células por poço), e incubadas por 16 horas a 37 °C em estufa com atmosfera saturada de 5% de CO₂. As células foram, então, incubadas com meio contendo 10% de SFB e ExtTa. A dose de ExtTa usada no tratamento foi calculada com base na concentração de IC₅₀ da linhagem tumoral MDA-MB-231 (30,65 µg/ml), durante os períodos de 3h e 24h, à 37 °C a 5% de CO₂. Após o período de tratamento,

as células foram transferidas para tubos de 1 mL e centrifugadas a 950 g durante 5 minutos em microcentrífuga (Denver Instrument Company, USA). O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado de células foram acrescentados 50 µl de RNase A (100 µg/ml) e 300 µl de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS), contendo 50 mg/ml de iodeto de propídeo - IP (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) e 0,1% de triton X-100 (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) em citrato de sódio a 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri USA). As amostras foram incubadas por 4 h a 4 °C e posteriormente foi feita a análise por citometria de fluxo (BD FACSCan™ pertencente ao Laboratório de Citometria do ICB- UFMG).

4.9- Avaliação do efeito do ExtTa sobre o estresse oxidativo

A quantidade endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi mensurada por um ensaio fluorimétrico, utilizando uma sonda 2',7'-dichlorofluoresceína diacetato (DCFH-DA; Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em colaboração com a doutoranda Marliete Carvalho do Laboratório de Micologia. As células tratadas com o ExtTa (30,65 µg/ml), foram incubadas com sonda específica para quantificação de ROS, em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 3 e 24h. A fluorescência foi mensurada na mesma placa do experimento, em leitor de placas Synergy 2 (BioTek) em comprimentos de onda de excitação e de emissão de 500nm. Os dados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência ± SE.

4.10 -Análise da Indução de Autofagia por MET

Foi avaliado o efeito do ExtTa sobre a taxa de autofagia nas linhagens celulares MDA-MB-231 e GM637. As células foram plaqueadas (6x10⁵ células por poço) em placas de 6 poços e o tratamento realizado utilizando a concentração de IC₅₀ do extrato para MDA-MB-231 (30,65 µg/ml), durante o período de 24h. Como controles positivos, por sabidamente induzem formação de vacúolos autofágicos nestas células, foram utilizados o LPS proveniente de *Escherichia coli* (Sigma) (1 µg/ml) e Rapamicina (10 µM). Após as 24 horas de tratamento, as células foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, lavadas com o mesmo tampão por duas vezes e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM. A seguir, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e infiltradas em resina epóxi Polybed (Polysciences). As amostras polimerizadas foram submetidas a ultramicrotomia para obtenção de cortes ultrafinos que foram coletados em grades de cobre e as amostras contrastadas em citrato de chumbo a 2% e acetato de uranila a 7%. A observação foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV no Centro de Microscopia eletrônica da UESC em colaboração com Danielle Oliveira dos Anjos.

4.11 Perfil eletroforético das frações de *T. asperelloides*

Frações selecionadas do ExtTa foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE para avaliação do perfil de massa molecular do conteúdo proteico. Este ensaio foi realizado com a colaboração do Técnico Jamil Silvano de Oliveira do laboratório de Enzimologia e Físico-Química de proteínas. Brevemente, 20 µg e 30 µg de proteína de cada fração passaram por secagem em aparelho *Speedvac Concentrator plus* (Eppendorf), para evaporação do DMSO. Os sedimentos foram, então, ressuspensos em tampão de amostra 2x (SDS 10%, 2-mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol 2%, Tris-HCl 0,5 M Ph 6.8), fervidas por 5 minutos e, em seguida, as amostradas foram aplicadas nas canaletas de gel de poliacrilamida (10 ou 15%, 1 mm de espessura). O fracionamento eletroforético foi feito a 120 volts, por 3h em tampão de corrida 10X. Como marcadores de tamanho molecular foram usados o Amersham™ECL™ Rainbow™ Marker - Low Range #RPN755E e ThermoScientific Protein Ladder # 26630. Os géis foram fixados em glutaraldeído 10% e corados pela prata, azul brilhante de coomassie ou pelo corante de Schiff (coloração específica para glicoproteínas). Os géis foram visualizados em transiluminador e fotografados utilizando câmara fotográfica digital acoplada a aparelho celular modelo Lenovo Vibe K5.

4.12 Análise estatística

A curva de citotoxicidade do extrato de *T. asperelloides* e frações foi gerada através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Para análises estatísticas do efeito no estresse oxidativo e efeito no ciclo celular foi utilizado o teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Turkey ou Bonferroni entre as amostras, também através do GraphPad 5.0. Foram considerados resultados estatisticamente significantes aqueles com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os extratos etanólicos de *T. asperelloides* foram obtidos a partir de suspensão contendo hifas e esporos do fungo cultivado em meio BDA (Ágar dextrose batata) por 7 dias em etanol 95% conforme descrito anteriormente. Ao todo foram obtidos dois extratos totais do fungo, que foram denominados, respectivamente, de ExtTa 1 e ExtTa 2. Os extratos totais foram secos em secador a vácuo para remoção da fase etanólica e o precipitado homogeneizado em DMSO 100%. Foram obtidos 471 mg totais da primeira preparação de extrato (ExtTa1), na concentração de 393 mg/ml. Da segunda preparação (ExtTa 2) foram obtidos 16,2 mg totais na concentração de 162 mg/ml, conforme mostrado na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração e conteúdo total dos extratos ExtTa 1 e 2 de *T. asperelloides*

Extrato	Concentração (mg/ml)	Conteúdo total (mg)
ExtTa 1	393,0	471,0
ExtTa 2	162,0	16,2

5.2 Caracterização do ExtTa e frações obtidas por Cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC)

5.2.1 Viabilidade microbiana

Uma vez que o extrato seria usado para tratamento de células em cultura, fez-se importante testar se o processo de extração e a solubilização em DMSO haviam sido de fato eficientes para eliminar formas de vida associadas à preparação, de forma a se evitar o carreamento de contaminação para a sala de cultura de células. Para a avaliação da viabilidade microbiana presente nos extratos, alíquotas dos extratos em DMSO foram plaqueadas em BDA e em caldo tioglicolato para verificação da presença de fungos e bactérias, respectivamente. Conforme mostrado na Figura 5, não houve crescimento microbiano em nenhuma das amostras analisadas o que atesta que os extratos não estavam contaminados por fungos ou bactérias, e que poderiam ser utilizados de forma segura na unidade de cultura de células.

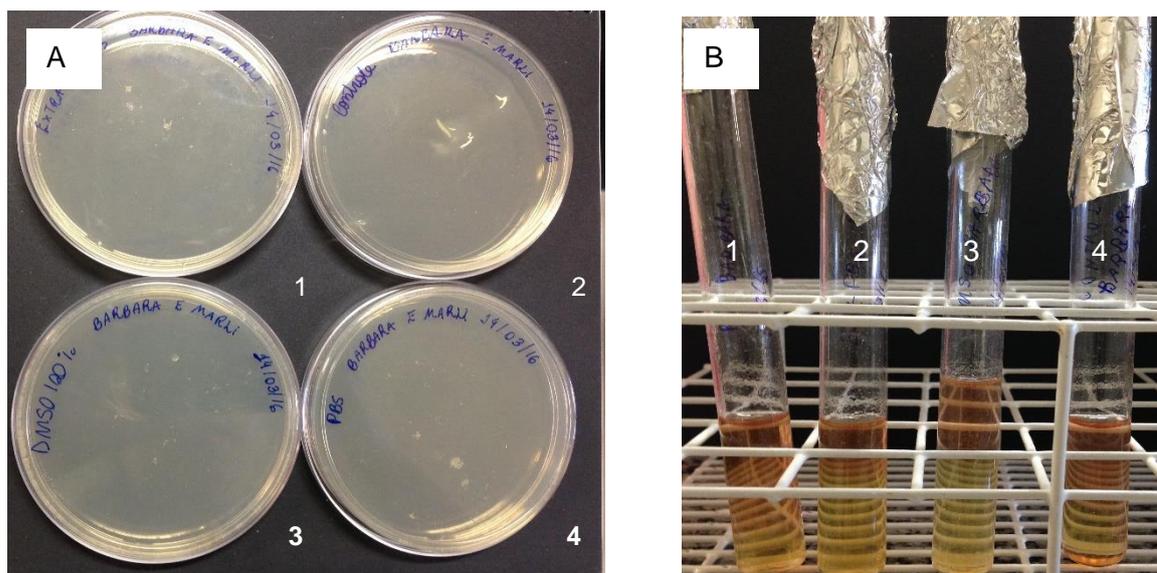


Figura 5 - Avaliação de viabilidade microbiana nas preparações do extrato do fungo *T. asperelloides*

O extrato etanólico de *T. asperelloides* diluído em PBS (A.1;B.2) foi incubado em BDA(A) e caldo tioglicolato (B), a 28°C e 37°C, respectivamente, durante 7 dias, juntamente com três controles: um contendo apenas meio(A.2;B.4), outro com DMSO 100% (A.3;B.1) e outro com PBS (A.4;B.3). Não foi observado crescimento em nenhum dos meios de cultura em nenhuma das amostras analisadas.

5.2.2 Dosagem de proteínas e carboidratos

O fracionamento do extrato ExtTa 1 por FPLC em coluna de filtração molecular superose TM 12 10/300 GL, resultou em 39 frações (Figura 6). A solução etanólica do ExtTa 2 foi separada em 8 alíquotas para seu fracionamento por FPLC devido ao grande volume obtido (47 ml). O fracionamento dessas 8 alíquotas foi realizado em condições semelhantes às aquelas empregadas no fracionamento do ExtTa 1, e foi obtido um total de 40 frações (Figura 7). Para facilitar o entendimento, as frações do extrato ExtTa 1 serão referidas com o número da respectiva fração seguido do numeral 1 (.1), enquanto as frações do ExtTa2 serão referidas com o número da respectiva fração seguido pelo numeral 2 (.2).

As frações obtidas por FPLC de ambos os extratos se encontram em uma faixa de massa molecular que varia entre 158 e 6,5 kDa. As frações que apresentaram maior quantidade de conteúdo molecular são aquelas encontradas na faixa de 1 a 15, e pelos perfis cromatográficos de ExtTa 1 e ExtTa 2, tais frações se encontram organizadas em três grandes picos: pico I, pico II, pico III (Figuras 6 e 7). Ao se comparar o perfil cromatográfico de ExtTa 1 (Figura 6) com ExtTa 2 (Figura 7), é possível observar que apresentam perfil bem semelhante.

A dosagem de proteínas totais presentes no extrato total e nas frações de ambos os extratos foi feita utilizando-se BCA, e a estimativa da concentração de polissacarídeos pelo método

indireto de dosagem de açúcares redutores totais por DNS. Os resultados das dosagens para o extrato ExtTa 1 são apresentados na Figura 8. O resultado das dosagens indicou que ExtTa 1 possui um alto conteúdo proteico e de carboidratos, apresentando cerca de 40 mg/ml e 7 mg/ml respectivamente, como pode ser visto na figura 8. O ExtTa 2 também apresentou um alto conteúdo proteico (139,7 mg/ml), enquanto a concentração de polissacarídeos presente foi de 10,2 mg/ml, como também pode ser visto na figura 8. Foi observado que as frações que apresentaram maior conteúdo molecular foram aquelas de maior peso molecular, isto é, as frações de 1 a 15, tanto para o extrato ExtTa 1 quanto ExtTa 2. Para os demais experimentos, as frações que apresentaram menor conteúdo proteico foram agrupadas em pools cada um composto por 5 frações: frações de 16-20 (pool1), 21-25 (pool2), 26-30 (pool3), 31-35 (pool4) e 36-39 (pool5) (Figura 6).

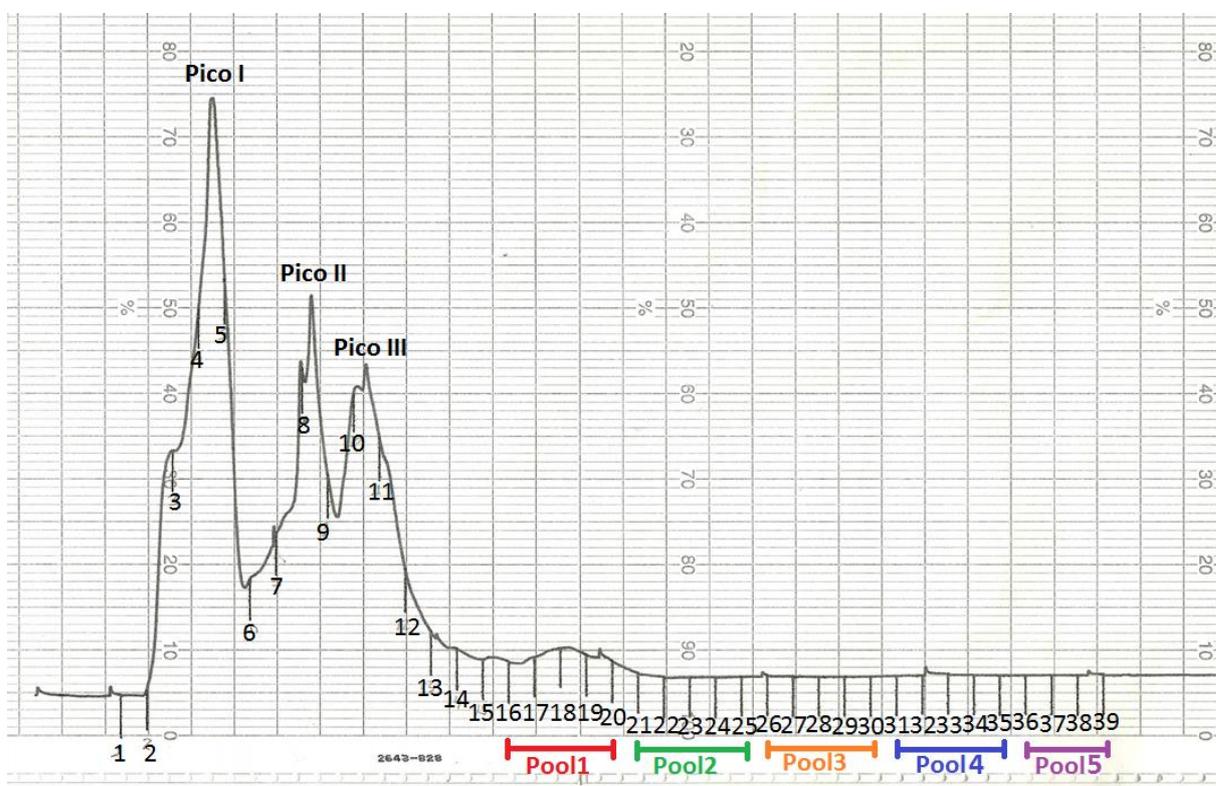


Figura 6 - Fracionamento por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) do extrato etanólico ExtTa 1 de *Trichoderma asperelloides*.

O extrato etanólico de *Trichoderma asperelloides* foi liofilizado e homogeneizado em Tris-HCl (pH 8,5) antes de ser submetido ao fracionamento por FPLC em coluna de filtração molecular superose TM 12 10/300 GL onde foi separado com base no tamanho molecular. Ao todo foram obtidas 39 frações.

O conteúdo proteico e de polissacarídeos de cada fração dos extratos ExtTa 1 e ExtTa 2 também foi avaliado (tabelas 6 e 7 e figuras 9 e 10). A dosagem por BCA do conteúdo proteico das frações corrobora os resultados encontrados pelo fracionamento por FPLC, sendo que as

frações 4.1 e 5.1 do ExtTa 1 apresentaram o maior conteúdo de proteínas (7,75 e 12,06 mg/ml, respectivamente) (figura 9 e tabela 6). As frações que apresentaram maior conteúdo de carboidratos foram as frações 10.1 e 11.1 (3,21 e 1,12 mg/ml) e os pools 2.1 e 3.1 (0,94 e 1,81 mg/ml) como pode ser visto na tabela 6 e figura 9.

As frações 4.2, 5.2, 6.2, 7.2 e 12.2 resultantes do fracionamento por FPLC de ExtTa 2 foram selecionadas para os demais ensaios devido a resultados obtidos de ensaios prévios de citotoxicidade com essas mesmas frações do extrato ExtTa 1. Foram, então, selecionadas 6 das 8 alíquotas das frações citadas acima, solubilizadas em DMSO 100% de maneira a obter-se uma única alíquota de cada fração. Essas alíquotas das frações 4.2, 5.2, 6.2, 7.2 e 12.2 foram então dosadas quanto a quantidade de proteínas por BCA, obtendo um resultado que variou entre 0,4 a 8,9 mg de proteínas totais, e conteúdo de carboidratos relativamente similar, variando entre 2,186 e 2,695 mg totais, como é apresentado na tabela 7. A fração 5.2 apresentou maior conteúdo proteico (12,7 mg/ml), seguida pela fração 6.2 (9,5 mg/ml) (Figura 10 e tabela 7).

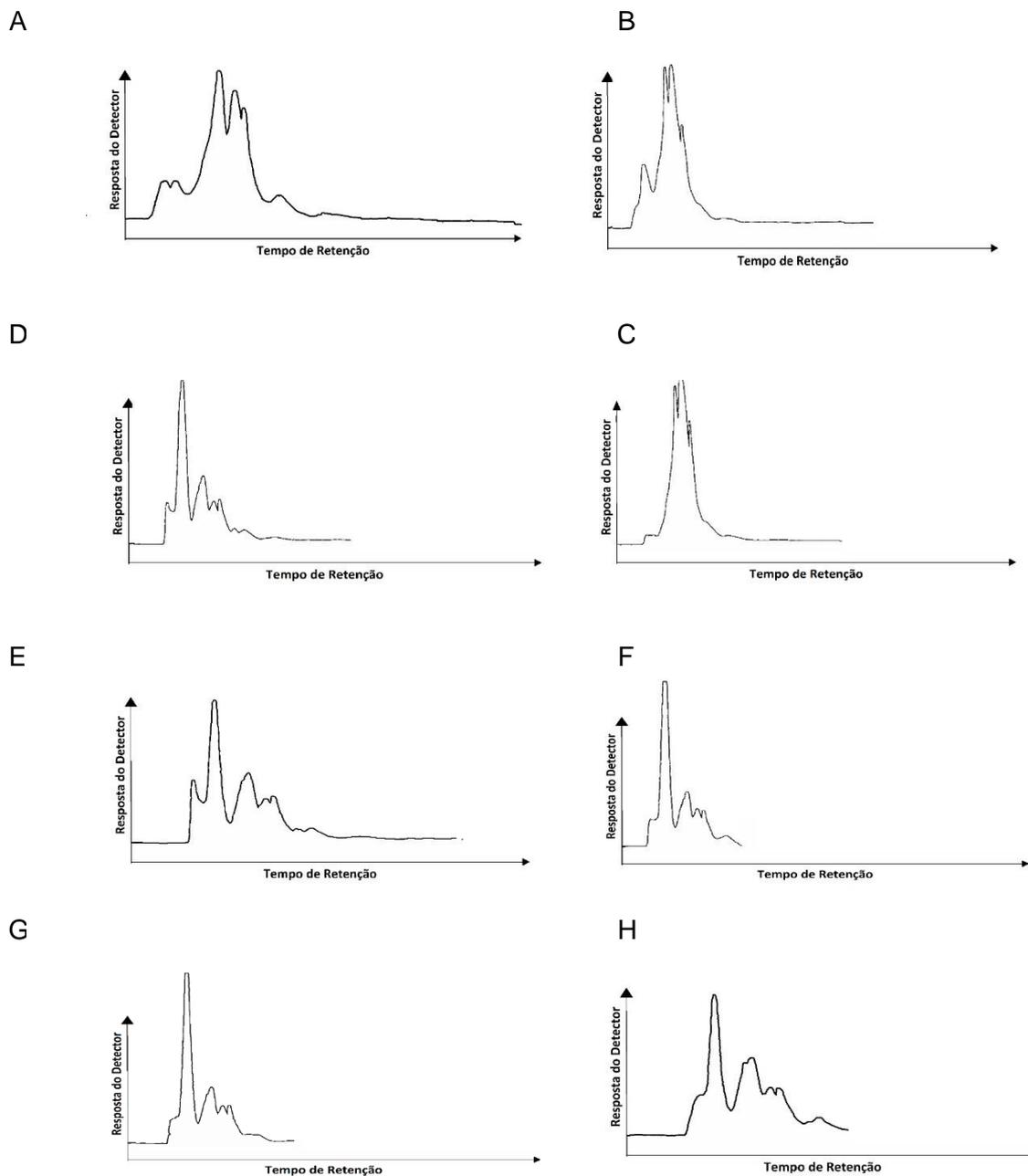


Figura 7 - Fracionamento por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) do ExtTa 2 de *T. asperelloides*. O extrato etanólico de *Trichoderma asperelloides* foi liofilizado e homogeneizado em Tris-HCl (pH 8,5) antes de ser submetido ao fracionamento por FPLC em coluna de filtração molecular superose TM 12 10/300 GL onde foi separado com base no tamanho molecular. As figuras de A-H mostram o fracionamento de 8 aliquotas do ExtTa 2. Ao todo foram obtidas 40 frações.

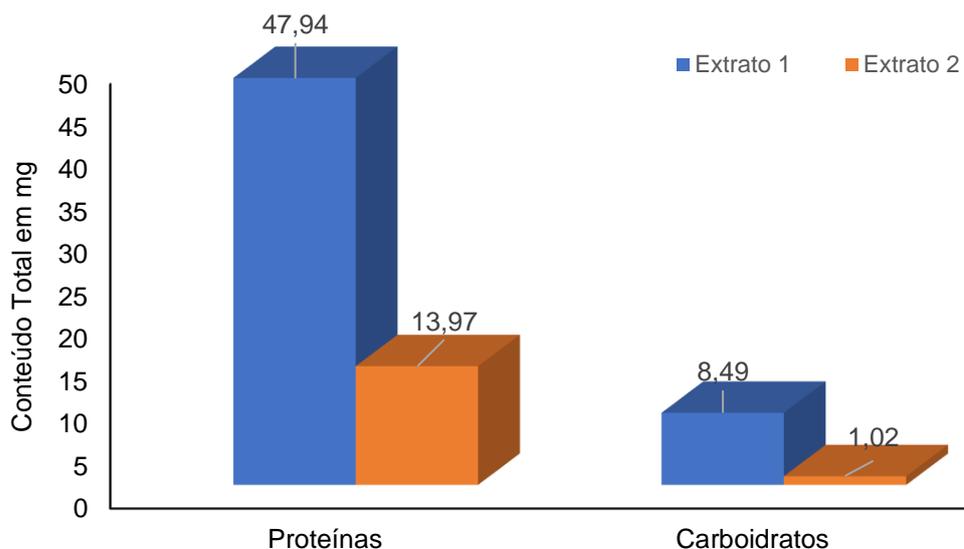


Figura 8 – Quantificação do conteúdo de proteínas e carboidratos presentes no extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides*.

Foi realizada a dosagem proteica e de carboidratos para ExtTa1 (azul) e ExtTa2 (Laranja). A dosagem proteica do extrato foi realizada pelo método de BCA tendo como referência uma curva padrão da proteína albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 562 nm. A dosagem de carboidratos foi realizada de maneira indireta pela dosagem de açúcares redutores totais (ART) pelo método de DNS, utilizando como referência uma curva padrão da glicose. A leitura foi feita por espectrofotometria a 540nm.

5.3 Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e das frações

A avaliação da citotoxicidade do ExtTa 1 foi realizada em duplicata biológica utilizando o método do MTT para as linhagens tumorais de mama humana MDA-MB-231 e MCF7, o fibroblasto humano GM637 e a linhagem de tumor de mama murino 4T1. O ExtTa 1 apresentou citotoxicidade para todas as linhagens, sendo que a linhagem MDA-MB-231 foi a mais sensível (IC50 médio = 30,65 µg/ml) (Tabela 8 e figura 11 C e D) e a linhagem MCF7 foi a menos sensível (IC50 médio = 71,99 µg/ml) (Tabela 8 e figura 11 A e B). O Índice de seletividade (IS), que representa quantas vezes o extrato é mais citotóxico para a linhagem tumoral em relação à linhagem não tumoral, foi calculado para as linhagens MDA-MB-231, MCF7 e 4T1, utilizando como base o IC50 médio do fibroblasto não tumorigênico GM637 (49,31 µg/ml) (Tabela 8 e Figura 11 G e H). Foi observado que o extrato é 0,68 vezes mais citotóxico a linhagem MCF7 e 1,6 vezes mais citotóxico a MDA-MB-231 em relação a GM637. O IC50 médio para a linhagem 4T1 foi de 41,30 µg/ml e IS de 1,33 (Tabela 8 e figura 11 E e F).

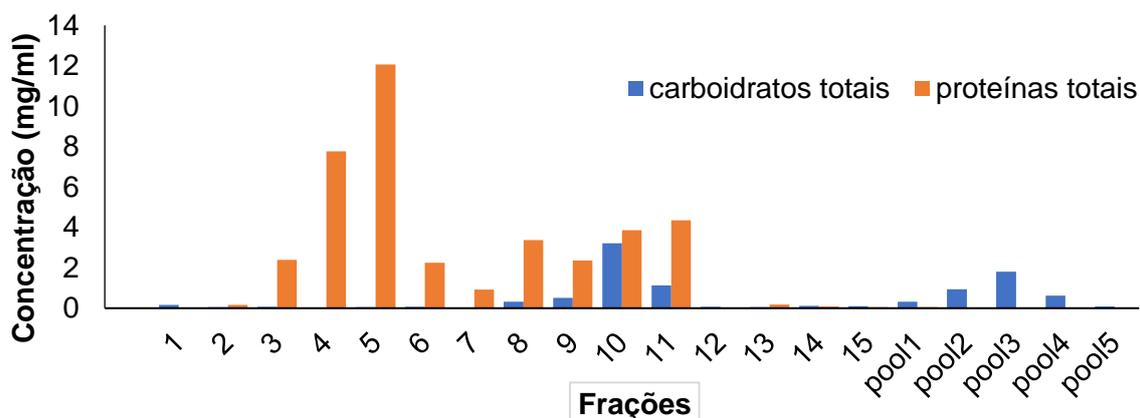


Figura 9 - Conteúdo proteico e de carboidratos nas frações e pools do ExtTa 1 de *T. asperelloides*

A dosagem proteica (laranja) do extrato foi realizada pelo método de BCA tendo como referência uma curva padrão da proteína albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 562 nm. A dosagem de carboidratos (azul) foi realizada de maneira indireta pela dosagem de açúcares redutores totais (ART) pelo método de DNS, utilizando como referência uma curva padrão da glicose. A leitura foi feita por espectrofotometria a 540nm.

Tabela 6 - Proteínas e carboidrato totais das frações e pools de ExtTa 1

Frações	Proteínas totais (µg)	Carboidratos totais (µg)
1	3,55	0,15
2	13,36	0,05
3	190,98	0,07
4	620,75	0,02
5	965,16	0,05
6	179,96	0,07
7	74,36	0,00
8	269,49	0,31
9	188,98	0,5
10	308,84	3,21
11	347,65	1,12
12	2,88	0,07
13	14,26	0,05
14	6,20	0,11
15	4,45	0,09
pool1(16-20)	3,87	0,32
pool2(21-25)	0,00	0,94
pool3(26-30)	0,00	1,81
pool4(31-35)	0,00	0,62
pool5(36-39)	0,35	0,08

Foi realizado um *screening* inicial para verificação da citotoxicidade das frações, para isso, as frações e pools do ExtTa 1 de *T. asperelloides* foram avaliados quanto a sua citotoxicidade sobre as linhagens celulares MDA-MB-231 e GM637 utilizando o método de MTT. Para as frações de 1.1 a 15.1 foi utilizada uma quantidade de 4 e 1 µg/ml de proteínas, porém para os pools de frações, devido a pequena quantidade de proteínas em cada pool, foi escolhido um volume de 10 e 2,5 µl de cada pool para a avaliação da citotoxicidade. Como é apresentado na Figura 12 e 13, as frações 4.1, 5.1 e 15.1 foram aquelas que apresentaram maior citotoxicidade para ambas as linhagens, enquanto as frações 6.1, 7.1 e 12.1 apresentaram uma citotoxicidade maior para a linhagem MDA-MB-231 do que para a GM637. Já as frações 10.1 e 11.1 apresentam uma citotoxicidade maior para a GM637 do que para MDA-MB-231. Os pools de frações não apresentaram grande citotoxicidade para ambas as linhagens (Figuras 14 e 15).

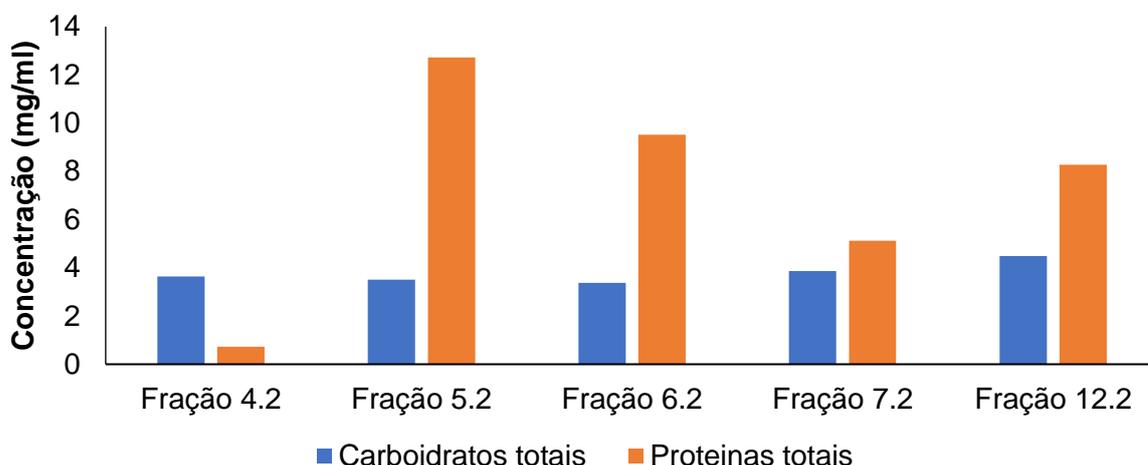


Figura 10 - Conteúdo proteico e de carboidratos nas frações e pools do ExtTa 2.

A dosagem proteica (laranja) do extrato foi realizada pelo método de BCA tendo como referência uma curva padrão da proteína albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 562 nm. A dosagem de carboidratos (azul) foi realizada de maneira indireta pela dosagem de açúcares redutores totais (ART) pelo método de DNS, utilizando como referência uma curva padrão da glicose. A leitura foi feita por espectrofotometria a 540nm.

Tabela 7 Proteínas e carboidratos totais presentes nas frações 4.2, 5.2, 6.2, 7.2 e 12.2 do ExtTa 2

Frações de ExtTa 2	Proteínas totais em mg	Carboidratos totais em mg
4.2	0,43	2,186
5.2	8,90	2,453
6.2	5,70	2,366
7.2	3,07	2,317
12.2	4,96	2,695

Para a avaliação da citotoxicidade do ExtTa 2 sobre as linhagens MDA-MB-231 e GM637 foram usadas diluições seriadas 1:2 do extrato variando entre 800 e 1,26 µg/ml. O ExtTa 2 apresentou uma citotoxicidade semelhante à do ExtTa 1, apresentando IC50 16,57 µg/ml para a linhagem MDA-MB-231 e IC50 25,15 µg/ml para a linhagem GM637, sendo 1,51 vezes mais citotóxico para a linhagem tumoral de mama do que para a linhagem de fibroblasto (Figura 16 e tabela 9)

Com base no *screening* inicial de citotoxicidade utilizando as frações do ExtTa 1, algumas frações de ambos os extratos foram selecionadas para verificação do índice de seletividade, e assim inferir qual fração possa apresentar o princípio ativo cujo efeito foi observado com os extratos. As frações 4.1, 5.1, 6.1 de ExtTa 1 e 4.2, 5.2, 6.2, 7.2 de ExtTa 2 foram selecionadas para tal avaliação. Foi realizado o ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT e foram utilizadas as linhagens MDA-MB-231 e GM637, obtendo-se o IS através da comparação do IC50 de cada fração para a linhagem MDA-MB-231 com o IC50 para GM637. Como é possível observar na figura 17 e na tabela 9, a fração 4.1 apresentou um IS de apenas 0,99, o que indica que ambas as linhagens são igualmente sensíveis a ação dessa fração, já a fração 4.2 apresentou IS de 1,96 (Figura 18), o que indica que a MDA-MB-231 é quase 2 vezes mais sensível a esta fração do que a GM637. A fração 5.1 apresentou IS 1,32, enquanto a fração 5.2 apresentou IS 1,92 (Figura 19), o fibroblasto GM637 apresentou maior sensibilidade ao efeito das frações 6.1, 6.2 e 7.2 do que a linhagem de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 (IS 0,99; 0,8 e 0,85, respectivamente) (Figuras 17-23 e tabela 9).

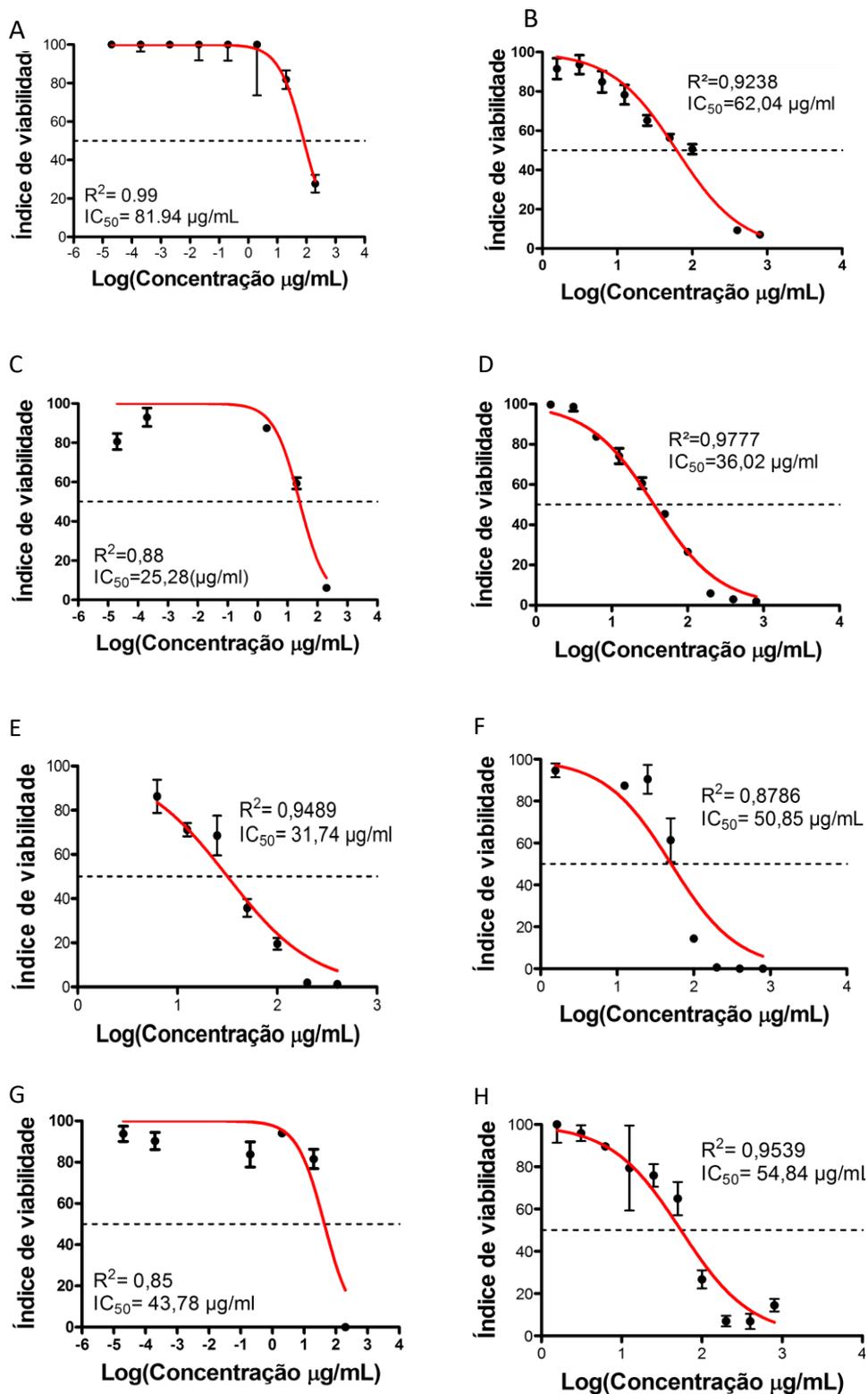


Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa 1 sobre as linhagens de adenocarcinoma de mama e humano e murinho, e fibroblasto.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada em duplicata biológica para as linhagens celulares MCF7 (A-B), MDA-MB-231(C-D), 4T1 (E-F) e GM637 (G-H), utilizando o método de MTT. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações do extrato como indicado nos gráficos e incubadas por 48 h. Ao fim do período de incubação, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e absorvância da solução a 570 nm foi avaliada por espectrofotometria. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% de SFB foram utilizados como controle de morte e sobrevivência, respectivamente.

Tabela 8 - Valor de IC50 e Índice de Seletividade (IS) do ExtTa 1 para as células GM637, MCF7, MDA-MB-231 e 4T1

	IC50 (µg/ml)	IS
GM637	49,30	-
MCF7	62,04	0,69
MDA-MB-231	30,65	1,60
4T1	41,30	1,33

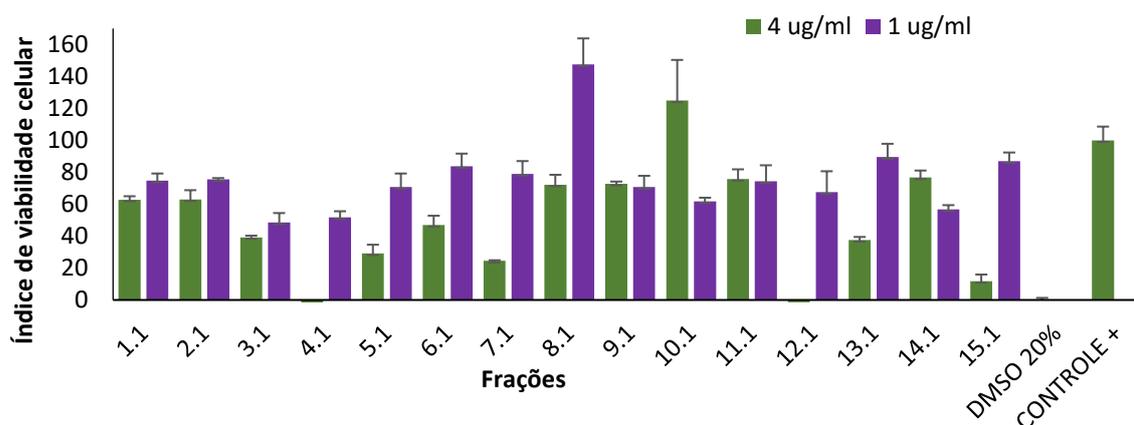


Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade das frações do ExtTa 1 para a linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

As frações de 1 a 15 foram avaliadas quanto a citotoxicidade para a linhagem de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231. As células foram tratadas com 4 (verde) e 1 (roxo) µg/ml de proteína de cada uma das frações por 48h. Ao fim do período de incubamento, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e absorvância da solução a 570 nm foi avaliada por espectrofotometria.

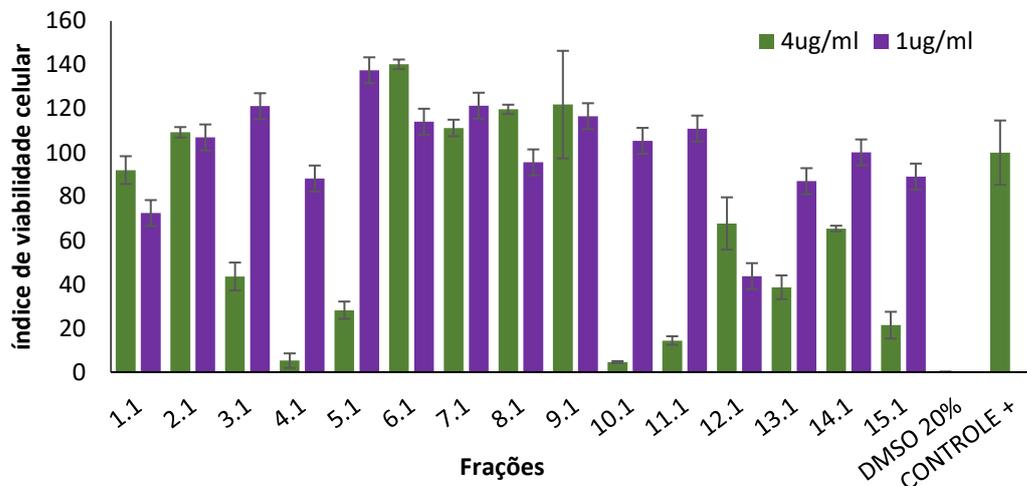


Figura 13 - Avaliação da citotoxicidade das frações do ExtTa 1 para a linhagem de fibroblasto não tumorigênico GM637.

As frações de 1 a 15 (4-verde e 1- roxo µg/ml de proteína de cada fração) foram usadas no tratamento de células GM637. Ao fim do período de 48 horas de incubação, o MTT foi adicionado e, após 4 h os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da absorbância a 570 nm foi realizada no espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados como controle de morte e sobrevivência, respectivamente.

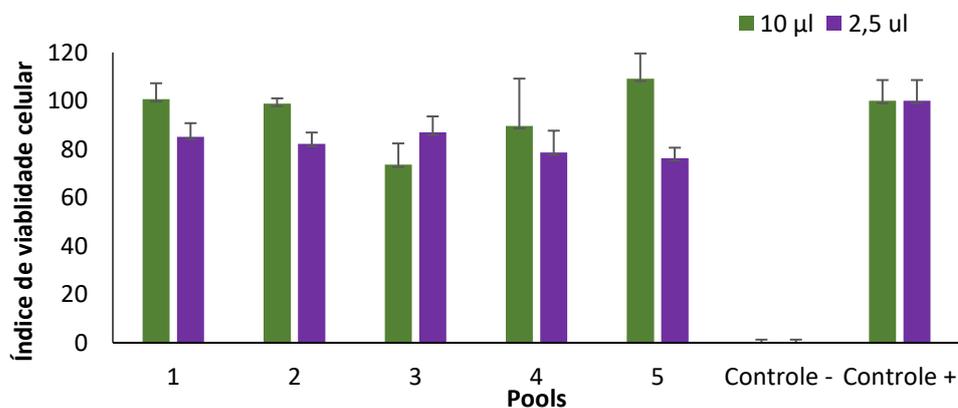


Figura 14 - Avaliação da citotoxicidade dos pools do ExtTa 1 para a linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

Os pools de 1 a 5 (10-verde e 2,5 µl- roxo de cada pool) foram avaliados quanto a sua citotoxicidade para as células MDA-MB-231. Após a incubação por 48h em presença das frações, foi adicionado o MTT e realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da sua absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados como controle de morte e sobrevivências, respectivamente.

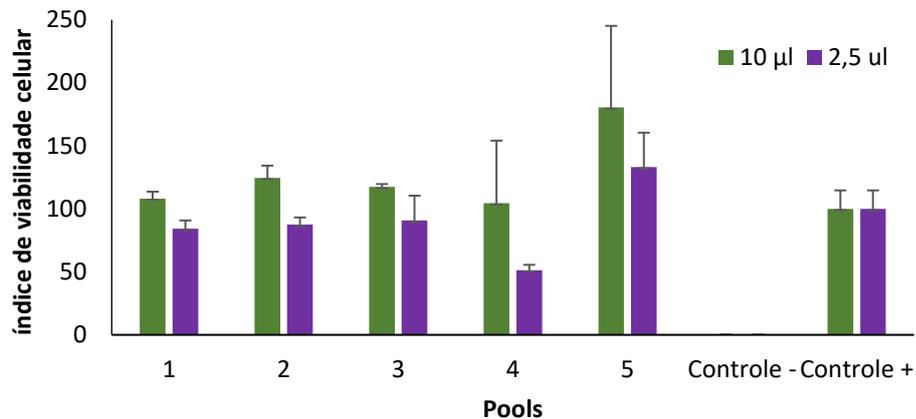


Figura 15 Avaliação da citotoxicidade dos pools do ExtTa 1 para a linhagem de fibroblasto não tumorigênico GM637.

Os pools de 1 a 5 (10-verde e 2,5 µl- roxo de cada pool) foram avaliados quanto a sua citotoxicidade para as células GM637. Após a incubação por 48h em presença das frações, foi adicionado o MTT e realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da sua absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados como controle de morte e sobrevivências, respectivamente.

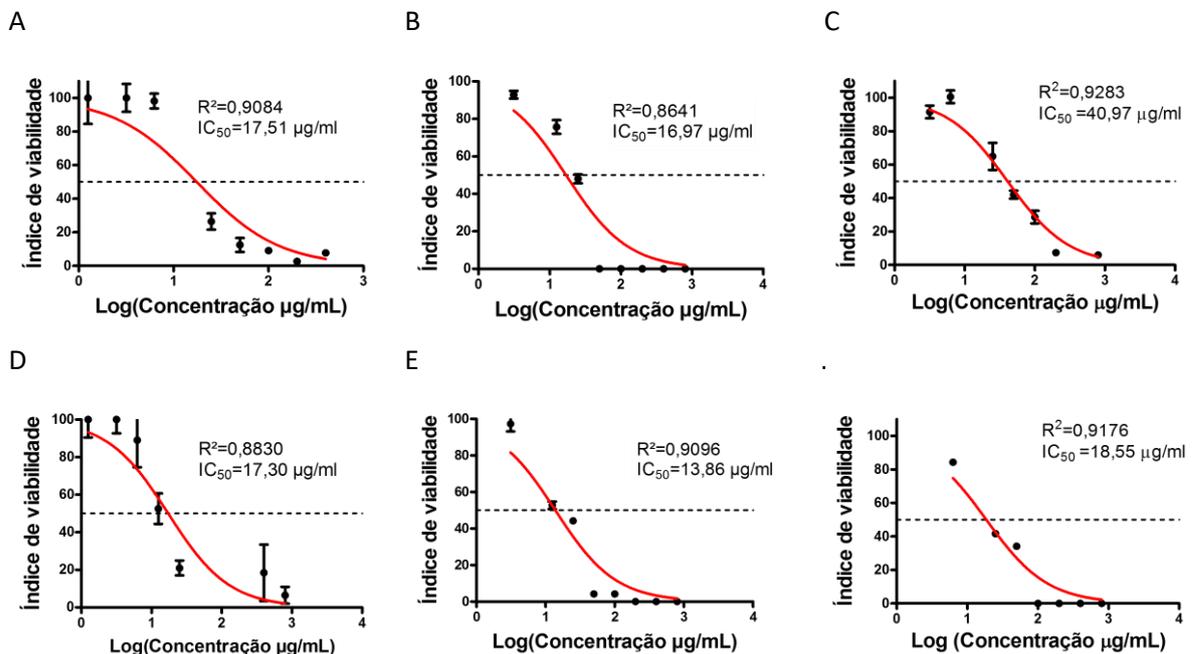


Figura 16 Avaliação da citotoxicidade do ExtTa 2 sobre os fibroblastos GM637 e as células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada em triplicata biológica, utilizando o método de MTT. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com diversas concentrações do extrato e incubadas por 48 h. Ao fim do período de incubação, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados para controle de morte e sobrevivências, respectivamente. Painéis A-C: triplicatas experimentais independentes realizadas com as células GM637; painéis D-F: triplicatas experimentais independentes realizadas com as células MDA-MB-231.

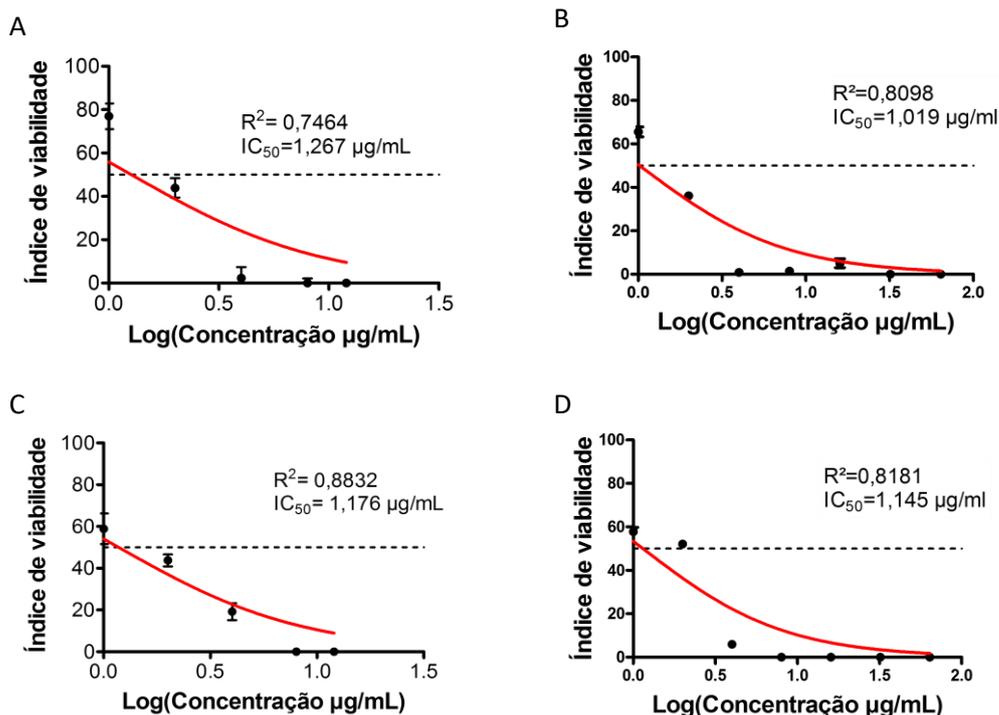


Figura 17 - Avaliação da citotoxicidade da fração 4.1 sobre os fibroblastos GM637 e as células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada em duplicata biológica, utilizando o método de MTT. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com diversas concentrações do extrato e incubadas por 48 h. Ao fim do período de incubamento, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados para controle de morte e sobrevivências, respectivamente. Painéis A-B: duplicatas experimentais independentes realizadas com as células GM637; painéis C-D: duplicatas experimentais independentes realizadas com as células MDA-MB-231.

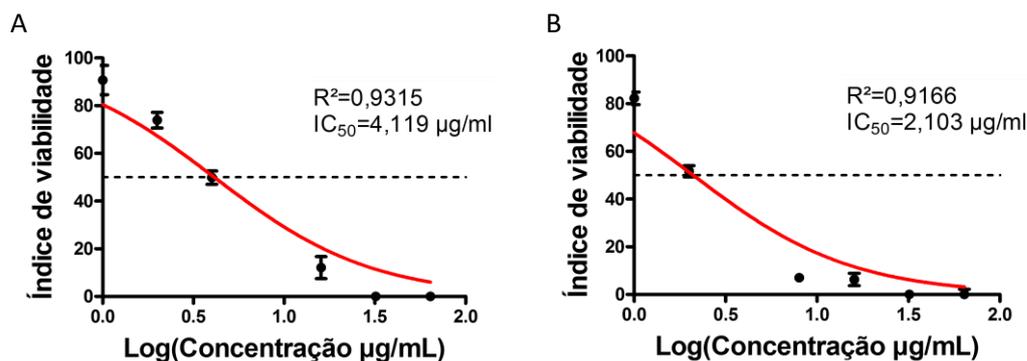


Figura 18 - Avaliação da citotoxicidade da fração 4.2 sobre o fibroblasto GM637 e adenocarcinoma mamário MDA-MB-231.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada utilizando o método de MTT. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com diversas concentrações do extrato e incubadas por 48 h. Ao fim do período de incubamento, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados para controle de morte e sobrevivências, respectivamente. Painel A: células GM637; painel B: células MDA-MB-231.

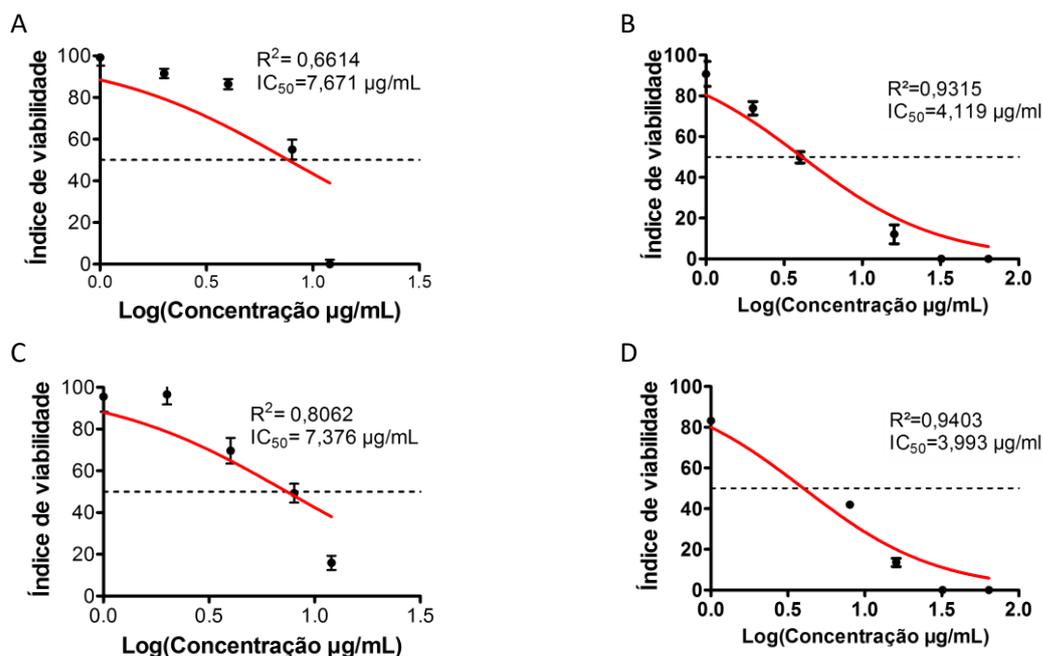


Figura 19 - Avaliação da citotoxicidade da fração 5.1 sobre o fibroblasto GM637 e o adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada em duplicata biológica, utilizando o método de MTT. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com diversas concentrações do extrato e incubadas por 48 h. Ao fim do período de incubamento, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados para controle de morte e sobrevivências, respectivamente. Painéis A-B: duplicatas experimentais independentes realizadas com as células GM637; painéis C-D: duplicatas experimentais independentes realizadas com as células MDA-MB-231.

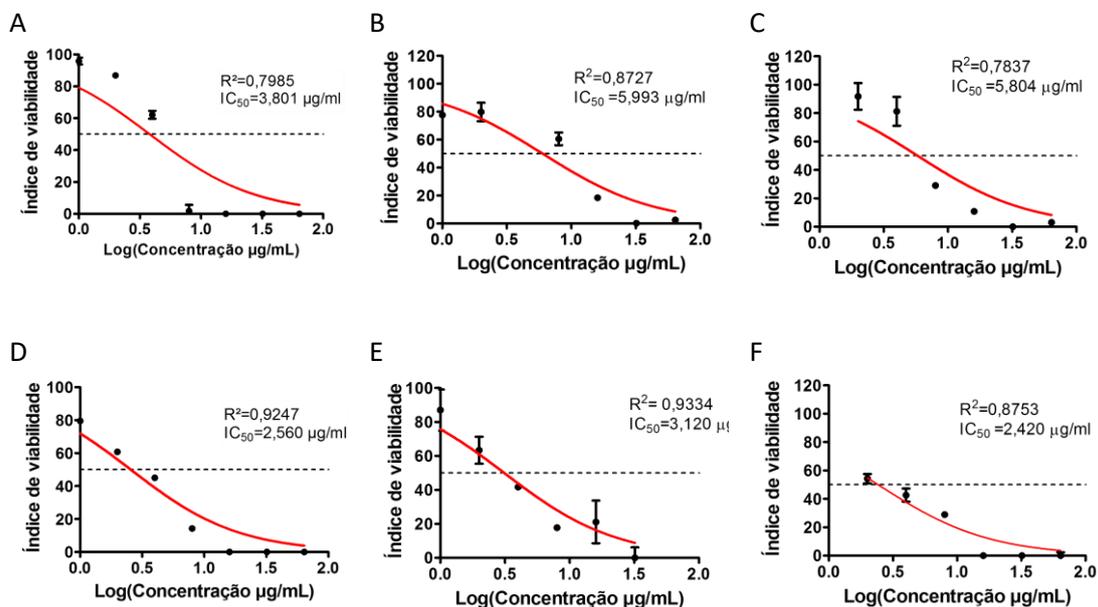


Figura 20 - Avaliação da citotoxicidade da fração 5.2 sobre o fibroblasto GM637 (A-C) e o adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada em triplicata biológica, utilizando o método de MTT. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com diversas concentrações do extrato e incubadas por 48 h. Ao fim do período de incubamento, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados para controle de morte e sobrevivências, respectivamente. Painéis A-C: triplicatas experimentais independentes realizadas com as células GM637; painéis D-F: triplicatas experimentais independentes realizadas com as células MDA-MB-231.

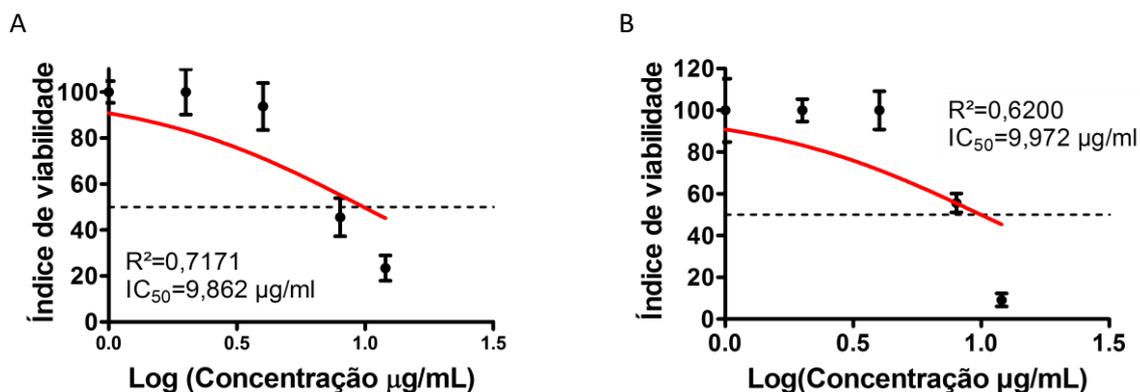


Figura 21 - Avaliação da citotoxicidade da fração 6.1 sobre o fibroblasto GM637 e adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada utilizando o método de MTT. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com diversas concentrações do extrato e incubadas por 48 h. Ao fim do período de incubamento, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados para controle de morte e sobrevivências, respectivamente. Painéis A:GM637; painéis B: MDA-MB-231.

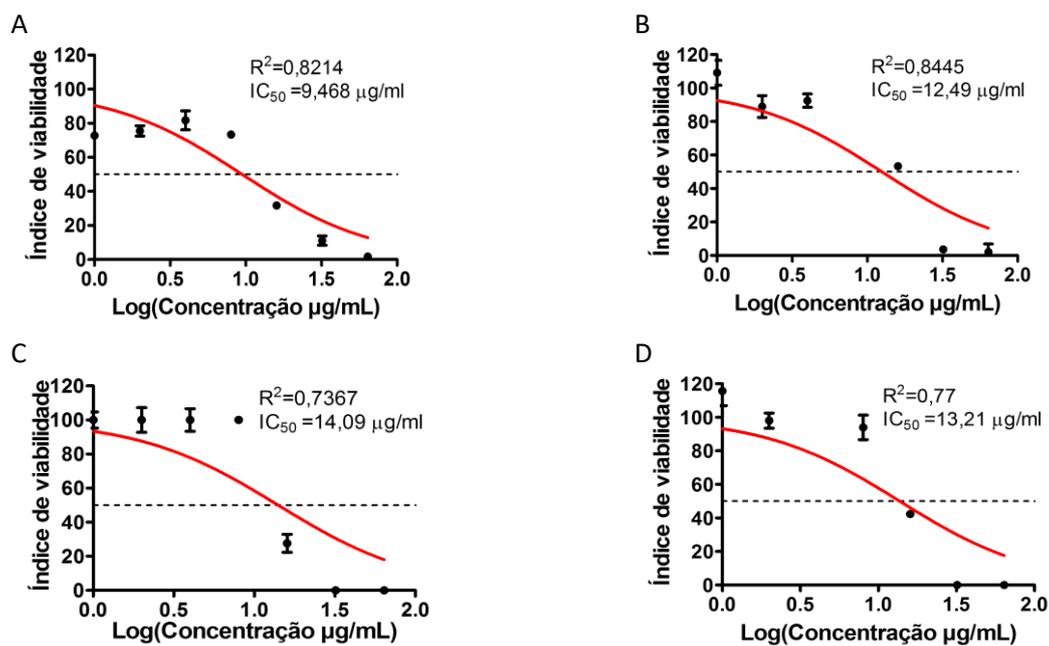


Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade da fração 6.2 sobre o fibroblasto GM637 e o adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada em duplicata biológica, utilizando o método de MTT. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com diversas concentrações do extrato e incubadas por 48 h. Ao fim do período de incubamento, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados para controle de morte e sobrevivências, respectivamente. Painéis A-B: duplicatas experimentais independentes realizadas com as células GM637; painéis C-D: duplicatas experimentais independentes realizadas com as células MDA-MB-231.

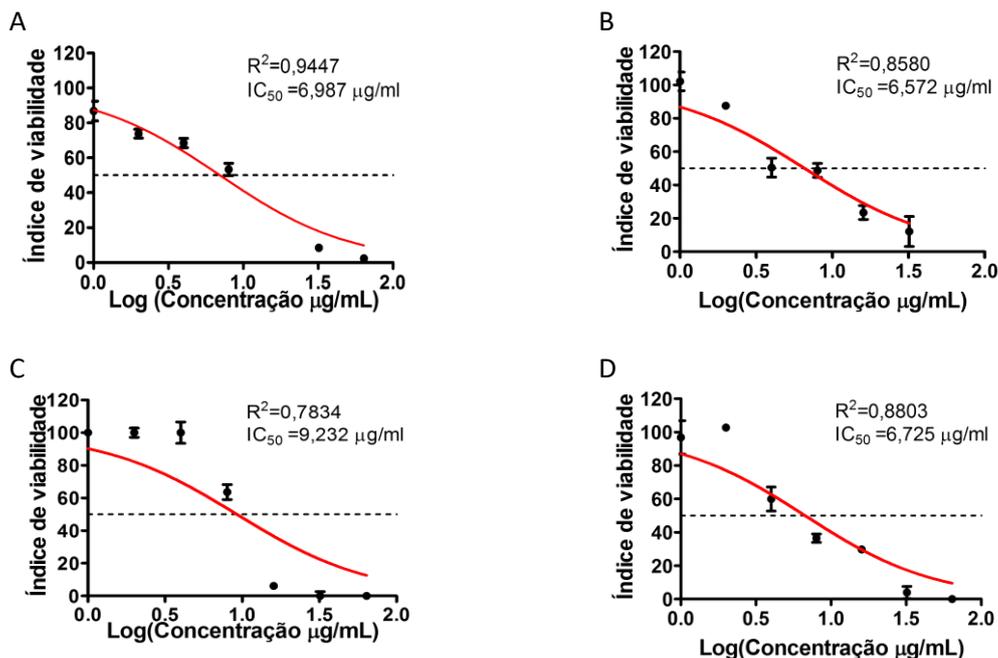


Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade da fração 7.2 sobre o fibroblasto GM637 e o adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

A citotoxicidade do extrato foi avaliada em duplicata biológica, utilizando o método de MTT. As linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com diversas concentrações do extrato e incubadas por 48 h. Ao fim do período de incubação, o MTT foi adicionado e foi realizada nova incubação por mais 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO 100% e a leitura da absorbância a 570 nm realizada em espectrofotômetro. DMSO 20% e meio RPMI-1640 + 10% do SFB foram utilizados para controle de morte e sobrevivências, respectivamente. Painéis A-B: duplicatas experimentais independentes realizadas com as células GM637; painéis C-D: duplicatas experimentais independentes realizadas com as células MDA-MB-231.

Tabela 9 - IC50 para as linhagens GM637 e MDA-MB-231 e IS para ExtTa 1 e 2 e respectivas frações.

Amostra	IC50 GM637	IC50		IS
		MDA-MB-231		
ExtTa 1	40,31*	30,65*		1,60
ExtTa 2	25,15**	16,57**		1,52
Fração 4.1	1,14*	1,16*		0,99
Fração 4.2	4,12	2,10		1,96
Fração 5.1	7,47*	5,68*		1,32
Fração 5.2	5,19**	2,70**		1,92
Fração 6.2	10,98*	13,65*		0,80
Fração 7.2	6,78*	8,02*		0,85

*Média das duplicatas biológicas

** Média das triplicatas biológicas

5.4 Avaliação de efeitos biológicos produzidos por ExtTa 1

Com o objetivo de iniciar uma avaliação sobre quais outros possíveis efeitos biológicos, além da citotoxicidade, os extratos etanólicos de *T. asperelloides* e suas frações exerceriam sobre as células, o ExtTa 1, por apresentar maior quantidade disponível, e a linhagem MDA-MB-231, que se mostrou mais sensível aos efeitos citotóxicos do ExtTa, foram selecionados para os estudos preliminares. A linhagem de fibroblasto humano GM637 foi usada como referência de célula não-tumorigênica. Para a realização dos ensaios foi usada a concentração de 30,65 µg/ml do ExtTa 1 que corresponde ao IC50 médio do extrato para a linhagem MDA-MB-231.

5.4.1 Avaliação do efeito no estresse oxidativo

A avaliação da indução do estresse oxidativo pelo ExtTa 1 foi realizada através da verificação da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio). Neste ensaio, as linhagens MDA-MB-231 e GM637 foram submetidas ao tratamento com o extrato (dose calculada com base no IC50 para a linhagem MDA-MB-231, 30,65 µg/ml) durante o período de 3 e 24h (Figura 24). Foi utilizada a sonda DFCH-DA e peróxido de hidrogênio como controle positivo para produção de ROS. Como é possível visualizar nas figuras 25, não houve diferença na produção de ROS entre as células tratadas e não tratadas, de ambas as linhagens, e em ambos os tempos após o tratamento. Ainda foi realizado outro ensaio para avaliar a produção de ROS utilizando concentrações de 3 e 6 vezes maiores que a dose de IC50 (90,95 e 183,9 µg/ml, respectivamente), porém, ainda assim, não houve diferença significativa entre os níveis de ROS encontradas nas células tratadas com o extrato e as células controle (Figura 25). Esses resultados indicam que o extrato não promove aumento na produção de ROS e, conseqüentemente, não há indução do estresse oxidativo pelo ExtTa 1 para as linhagens MDA-MB-231 e GM637, nos tempos analisados.

Contudo, é possível observar que há uma diferença significativa na produção de ROS entre as duas linhagens celulares, no período de 24h, havendo uma maior produção pela linhagem GM637.

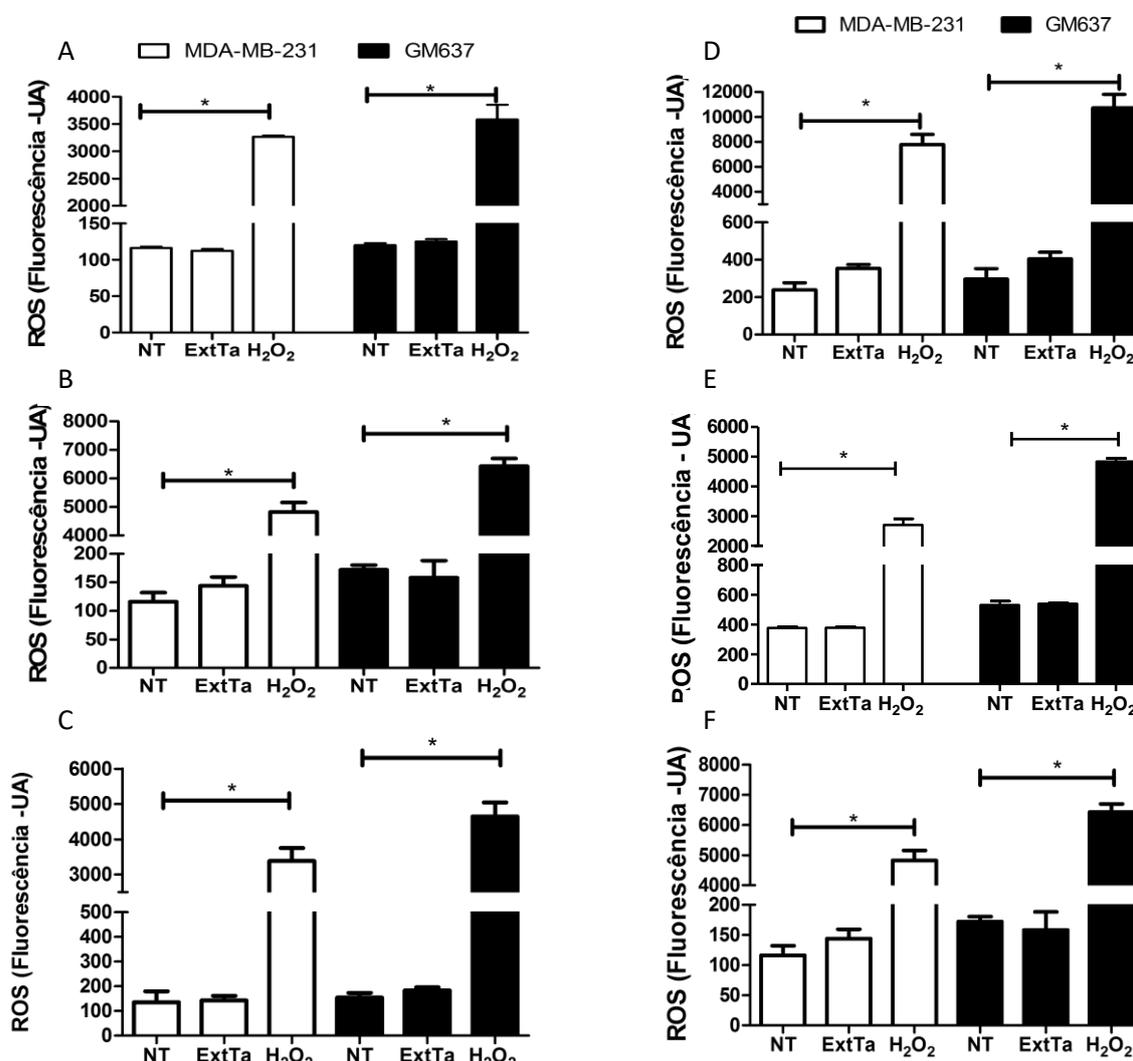


Figura 24 - Avaliação do efeito do extrato de *T. asperelloides* sobre o estresse oxidativo nas linhagens GM637 e MDA-MB-231

As linhagens MDA-MB-231 (branco) e GM637 (preto) foram plaqueadas em placa de 96 poços e tratadas com o extrato na concentração de 30,65 µg/ml durante os períodos de 3 e 24h, foi adicionada a sonda DFCH-DA e realizada a leitura em fluorímetro a 500 nm. Painéis A-C: triplicatas biológicas para período de tratamento de 3 horas de tratamento; Painéis D-F: triplicatas biológicas para o período de 24 h de tratamento. NT: não tratado; ExtTa: extrato de *T. asperelloides*; H₂O₂: controle com peróxido de hidrogênio. * p < 0,05 (1-way ANOVA, pós-teste de Turkey) em relação ao controle

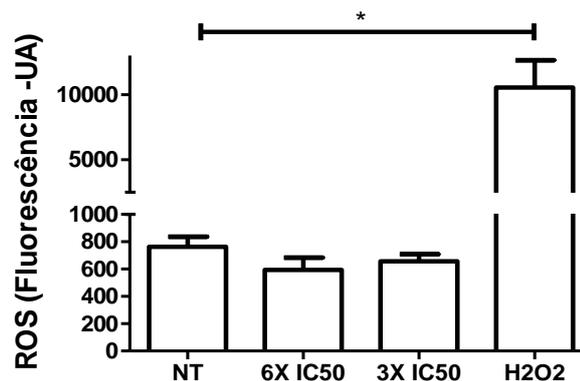


Figura 25 - Avaliação da indução de estresse oxidativo através da produção de ROS do ExtTa 1 para a linhagem MDA-MB-231.

A linhagem foi plaqueada em placa de 96 poços e tratada com o extrato nas concentrações de 3x IC50 (91,95 µg/ml) e 6x (183,9 µg/ml) durante o período de 24 h, foi adicionada a sonda DFCH-DA e realizada a leitura em fluorímetro a 500 nm. NT: não tratado; ExtTa: extrato de *T. asperelloides*; H₂O₂: controle com peróxido de hidrogênio. * p<0,05 (1-way ANOVA, pós-teste de Turkey) em relação ao controle

5.4.2 Avaliação do efeito do tratamento com o extrato de *T. asperelloides* sobre o ciclo celular

A influência do tratamento com o extrato de *T. asperelloides* sobre o ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo e a estatística foi calculada utilizando a metodologia 2-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. A avaliação foi realizada nos tempos de 3 e 24h, em triplicata, nas células das linhagens MDA-MB-231 e GM637. Foi observado que o tratamento com o ExtTa 1 pelo período de 3h produziu efeito significativo observado em apenas uma das replicatas dos experimentos com as células MDA-MB-231. O efeito observado foi a redução do número de células em G0-G1 (p<0,05), enquanto o controle apresentava cerca de 32,23 % das suas células em G0-G1, o tratado apresentava apenas 29,8% das células em G0-G1, não havendo diferença significativa da porcentagem de células entre controle e tratado em nenhuma das outras fases do ciclo (Figura 26 C). No entanto, após o período de 24h foi observada diferença significativa entre o grupo de células MDA-MB-231 tratadas com o extrato e as células controle nas duplicatas realizadas (Figura 27 A e B). Neste caso foi observado um aumento significativo de células em G0-G1 (p<0,001 - replicata 1,2), e uma redução de células na fase S do ciclo (p<0,001 – replicara 2 e 3). A replicata 1 mostra uma diminuição na fase G2-M não significativa (Figura 27 A), enquanto a replicata 2 mostra uma diminuição significativa nessa mesma fase (p<0,01) (Figura 27 B), e a terceira replicata mostra um aumento significativo também na fase G2-M (p<0,001). Desta forma, faz-se necessário a repetição dos experimentos para que resultados mais robustos possam ser obtidos.

Já para a linhagem GM637 no tempo de 3 h (Figura 28), foi observada uma diminuição significativas da quantidade de células na fase G0-G1 em ambas as replicatas biológicas ($p < 0,05$ - replicata 1; $p < 0,01$ – replicata 2), e um aumento da fase S, no entanto, esse aumento só foi significativo na segunda replicata biológica ($p < 0,001$)(Figura 28 B). Não houve diferença significativa entre controle e tratado na fase G2-M para nenhuma das replicatas. Novamente, a repetição dos experimentos se faz necessária para confirmação dos resultados. Após o tratamento com o ExtTa 1 pelo tempo de 24h, não foi observado nenhuma alteração significativa em relação ao controle para a linhagem GM637(Figura 29).

Os resultados desses ensaios parecem indicar que o ExtTa 1 está afetando o ciclo celular da linhagem MDA-MB-231 no tempo de 24h, através da parada do ciclo celular em G0-G1, e aumentando a quantidade de células em S e diminuição em G0-G1 na linhagem GM637 no tempo de 3h.

Um outro ensaio foi realizado para avaliar o efeito do ExtTa1 e da fração 5.2 sobre o ciclo celular da linhagem MDA-MB-231. Neste ensaio foram utilizadas as concentrações de 3 e 6 vezes a dose de IC50 de ExtTa 1 para a linhagem MDA-B-231 (91,95 e 183,9 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) e 3 vezes a dose do IC50 da fração 5.2 (8,1 $\mu\text{g/ml}$). Foi observado um aumento significativo na fase SubG0 com 6 vezes a dose de IC50 do ExtTa 1($p < 0,05$) e 3 vezes a dose de IC50 da fração 5.2 ($p < 0,001$). Também foi observada uma redução significativa de células na fase G0-G1 utilizando esses mesmos tratamentos ($p < 0,05$ para 6x IC50 de ExtTa1 e $p < 0,001$ para 3x IC50 da fração 5.2). A diminuição de células em G0-G1 e o aumento em subG0 pode estar relacionado a fragmentação do DNA, sendo possível que esta fragmentação tenha sido causada pelo desencadeamento de um processo de morte celular (Figura 30).

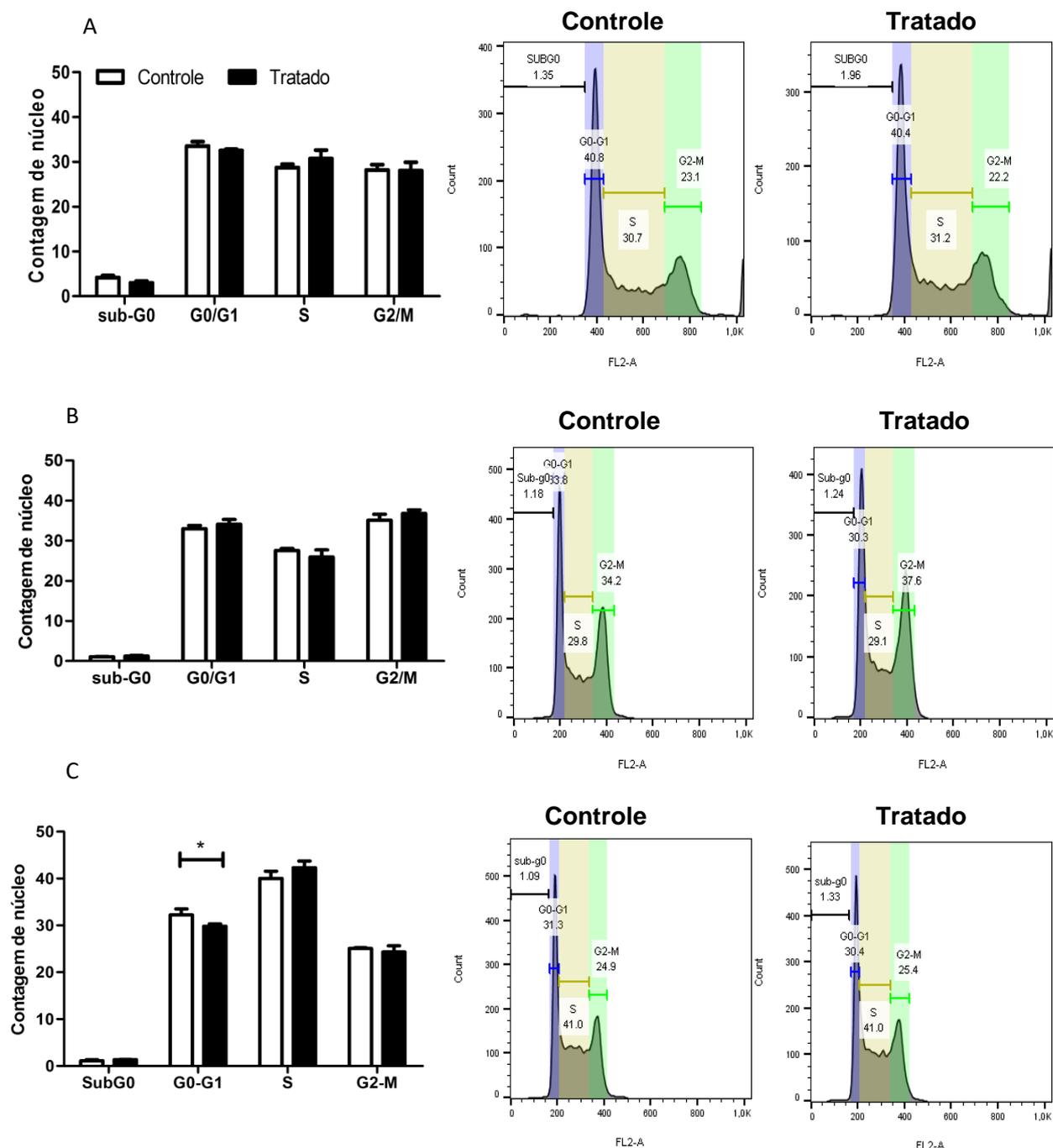


Figura 26 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular em adenocarcinoma mamário MDA-MB-231.

A linhagem foi plaqueada em placa de 6 poços e tratada com ExtTa1 (30,65 µg/ml) (preto) ou não tratada (branco) no tempo de 3 horas. Após tratamento, as células foram tripsinizadas, foi adicionado de RNase A (100 µg/ml) e HFS, e após incubação por 1-4 h a 4°C, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo. Painéis A-C: triplicatas biológicas para MDA-MB-231 no tempo de 3h. * $p < 0,05$ (2-way ANOVA, Bonferroni pós-teste) em relação ao

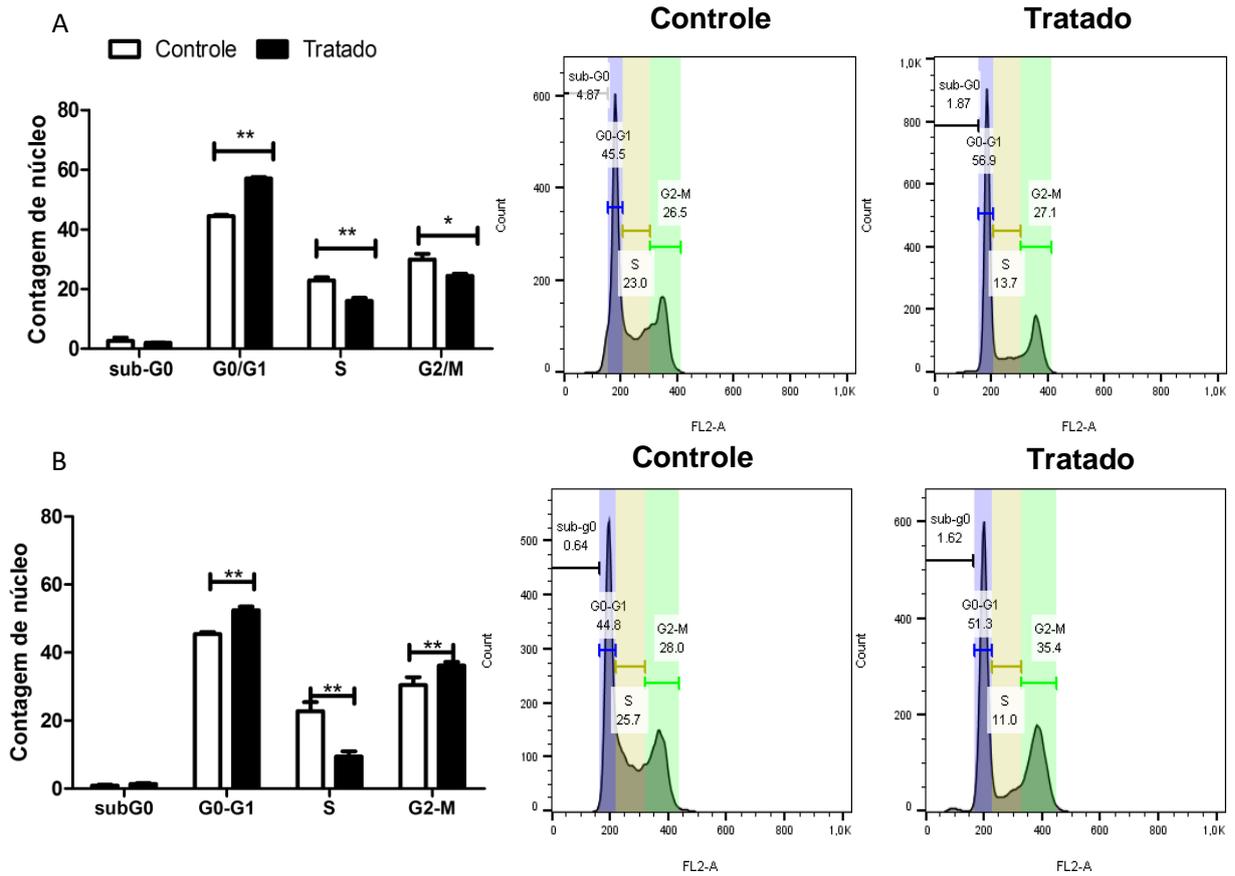


Figura 27 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular da linhagem MDA-MB-231.

A linhagem foi plaqueada em placa de 6 poços e tratada com ExtTa1 (30,65 µg/ml) (preto) ou não tratada (branco) no tempo de 24 horas. Após tratamento, as células foram tripsinizadas, foi adicionado de RNase A (100 µg/ml) e HFS, e após incubação por 1-4 h a 4°C, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo. A-B: replicatas biológicas. *p<0,01; **p<0,001 (2-way ANOVA, Bonferroni pós-teste) em relação ao controle.

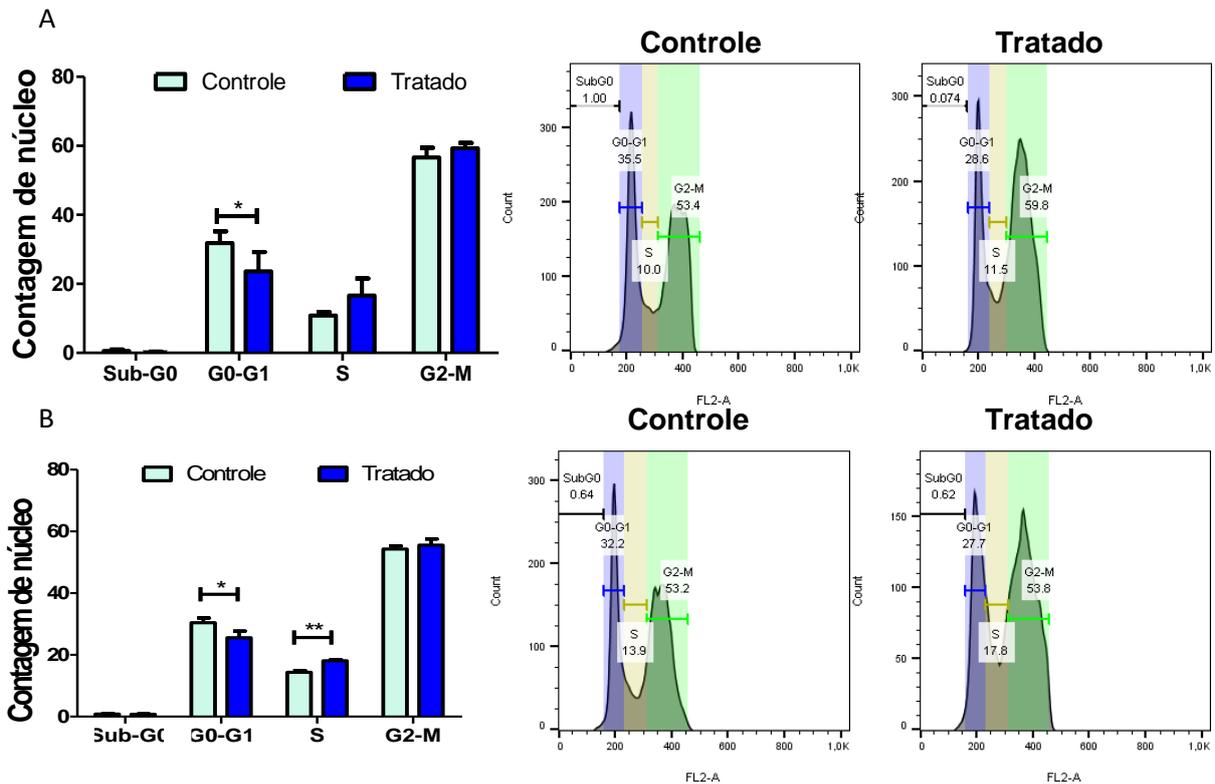


Figura 28 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular do fibroblasto GM637.

A linhagem foi plaqueada em placa de 6 poços e tratada com ExtTa1 (30,65 µg/ml) (azul escuro) ou não tratada (azul claro) no tempo de 3 horas. Após tratamento, as células foram tripsinizadas e foi adicionado de RNase A (100 µg/ml) + HFS. Após incubação por 1-4 h a 4°C, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo. A-B: duplicatas biológicas para a linhagem GM637 no tempo de 3h. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (2-way ANOVA, Bonferroni pós-teste) em relação ao controle.

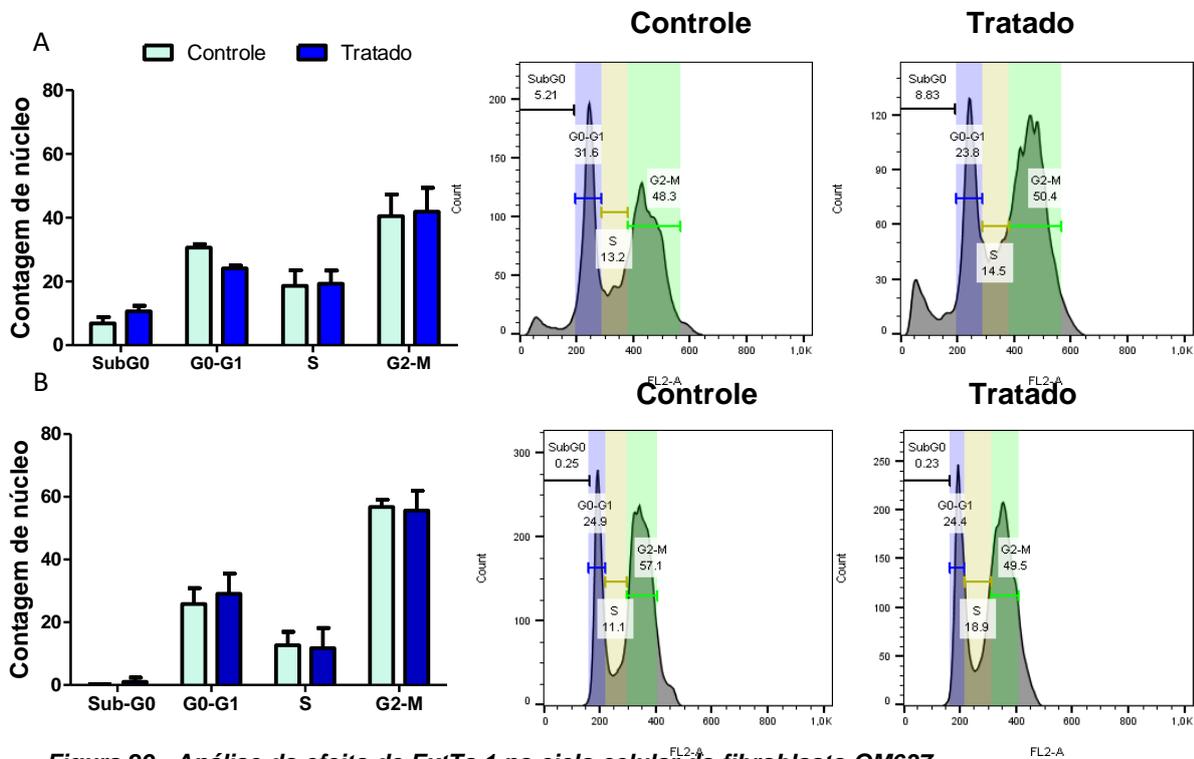


Figura 29 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular do fibroblasto GM637.

A linhagem foi plaqueada em placa de 6 poços e tratada com ExtTa1 (30,65 µg/ml) (azul escuro) ou não tratada (azul claro) no tempo de 24 horas. Após tratamento, as células foram tripsinizadas e foi adicionado de RNase A (100 µg/ml) + HFS. Após incubação por 1-4 h a 4°C, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo. A-B: replicatas biológicas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (2-way ANOVA, Bonferroni pós-teste) em relação ao controle.

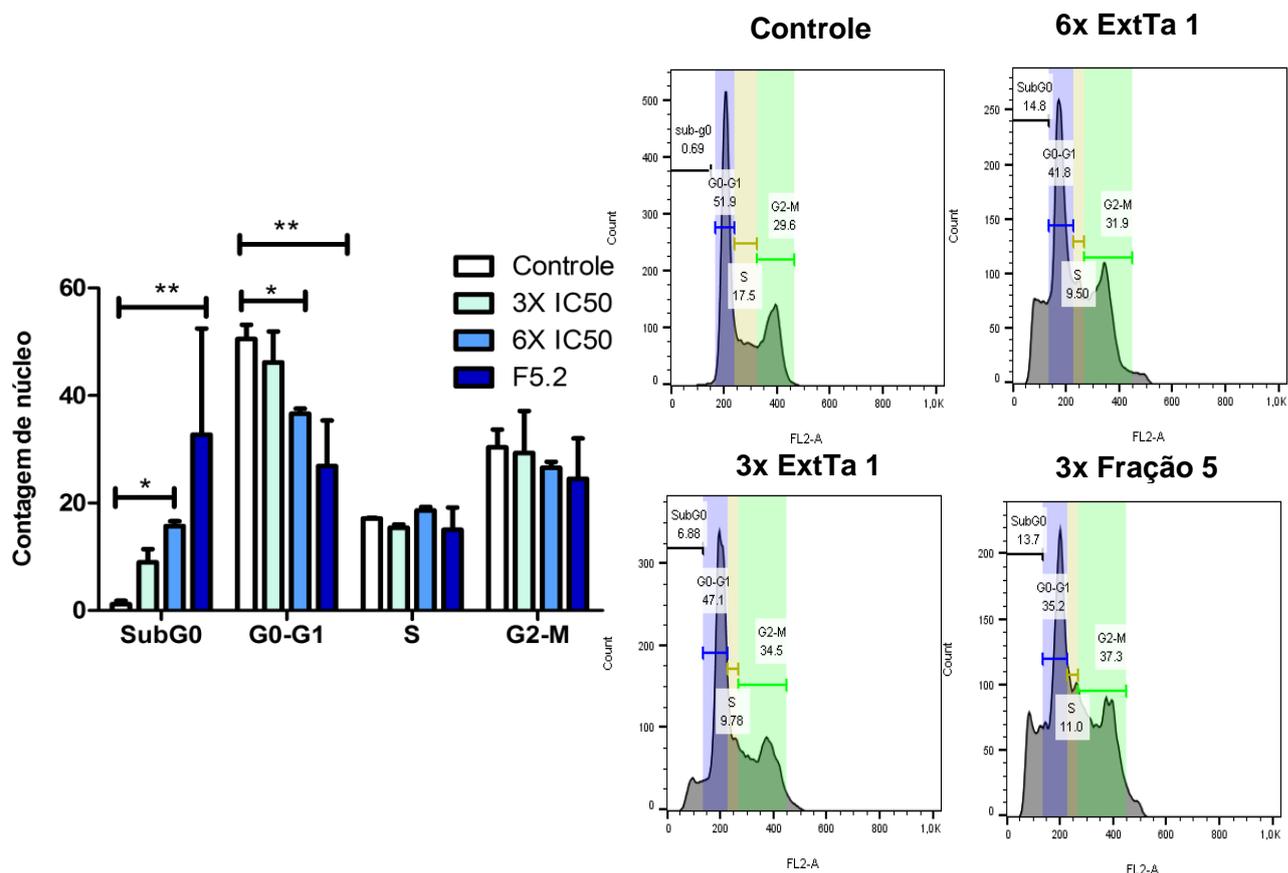


Figura 30 - Análise do efeito de ExtTa 1 no ciclo celular do adenocarcinoma mamário MDA-MB-231.

A linhagem foi plaqueada em placa de 6 poços e tratada com ExtTa1, utilizando 3x e 6x a dose de IC50(90,95 e 183,9 µg/ml, respectivamente), assim como 3x a dose de IC50 da fração 5.2(8,1 µg/ml), no tempo de 24 horas. Após tratamento, as células foram tripsinizadas e foi adicionado RNase A (100 µg/ml) + HFS. Após incubação por 1-4 h a 4°C, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo. A-B: replicatas biológicas. *p<0,05; **p<0,001 (2-way ANOVA, Bonferroni pós-teste) em relação ao controle.

5.4.3 Avaliação da indução de vacúolos autofágicos por MET

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizada para avaliar o efeito do extrato na indução de vacúolos autofágicos em células das linhagens MDA-MB-231 e GM637. As células foram submetidas ao tratamento com ExtTa1 na dose de 30,65 µg/ml por 24h (Figuras 31 e 32). Também foram utilizados como controle LPS e Rapamicina que são sabidamente indutores de autofagia nestas células, pelo mesmo tempo de tratamento. Após os tratamentos, as amostras foram fixadas e preparadas para avaliação por MET, onde foram fotografadas com câmera digital. Através das imagens geradas, foi possível ver que tanto o tratamento com LPS e Rapamicina bem como o tratamento com ExtTa1 induziram a formação de vacúolos característicos de autofagossomos ambas as linhagens quando comparado ao controle. Os vacúolos autofágicos podem apresentar membrana dupla, e conteúdo citoplasmático dentro da vesícula. Estes resultados obtidos são considerados preliminares, uma vez que o

experimento ainda se encontra em andamento, sendo necessário a finalização da captura de imagens para análise e quantificação dos vacúolos autofágicos.

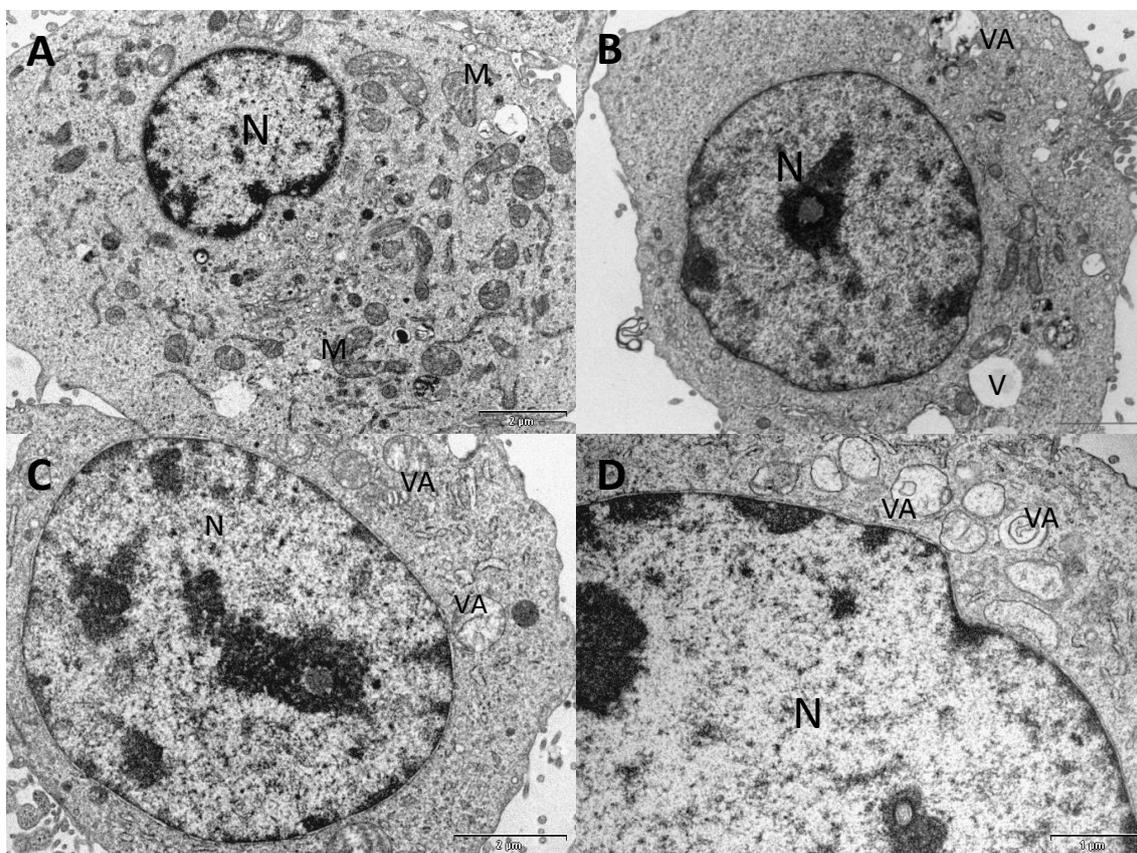


Figura 31 - Microscopia eletrônica de transmissão de células da linhagem MDA-MB 231.

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas pelo períodos de 24 horas com ExtTa 1, LPS ou Rapamicina, após período de tratamento, as células foram tripsinizadas e fixadas em glutaraldeído 2,5% + cacodilato de sódio 0,1 M, pós fixadas com tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8%, cloreto de cálcio 5Mm, e desidratadas em concentrações crescentes de acetona e infiltradas em resina, e após cortes ultrafinos e contrates com citrato de chumbo 2% e acetato de uranila 7%, foram observadas utilizando MET. Painéis (A) Controle célula sem alteração aparente; (B) Células incubadas com LPS na (1 µg/ml). (C) Rapamicina (10 µM); (D) ExtTa 1 na concentração de 30,65 µg/ml. (B, C e D) Presença de vacúolos autofágicos. V- vacúolo; VA- vacúolo autofágico; N- núcleo; M-mitocôndria

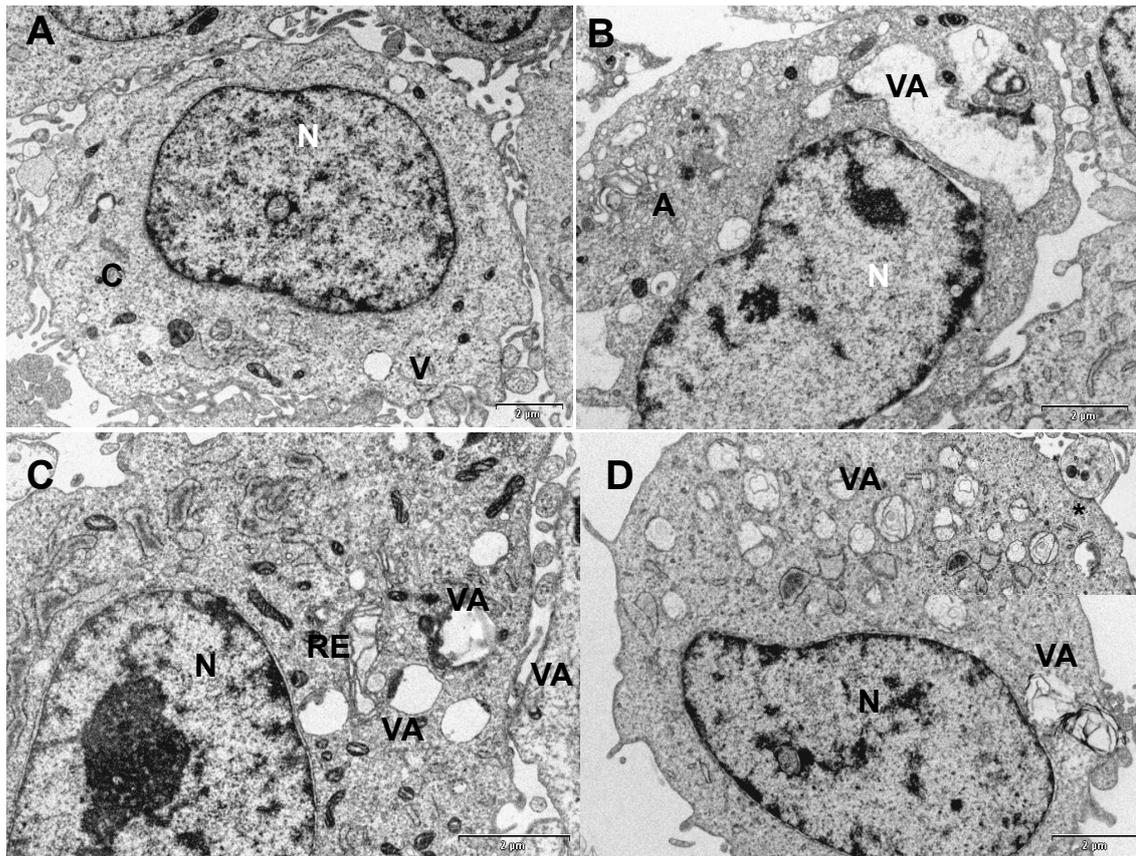


Figura 32 - Microscopia eletrônica de transmissão do fibroblasto GM637.

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas pelo períodos de 24 horas com ExtTa 1, LPS ou Rapamicina, após período de tratamento, as células foram tripsinizadas e fixadas em glutaraldeído 2,5% + cacodilato de sódio 0,1 M, pós fixadas com tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8%, cloreto de cálcio 5Mm, e desidratadas em concentrações crescentes de acetona e infiltradas em resina, e após cortes ultrafinos e contrates com citrato de chumbo 2% e acetato de uranila 7%, foram observadas utilizando MET. Painéis (A) Controle célula sem alteração aparente; (B) Células incubadas com LPS na (1 µg/ml). (C) Rapamicina (10 µM); (D) ExtTa 1 na concentração de 30,65 µg/ml. (B, C e D) Presença de vacúolos autofágicos. V- vacúolo; VA- vacúolo autofágico; N- núcleo; RE- reticulo endoplasmático.

5.5 Avaliação do conteúdo proteico por SDS-PAGE das frações do extrato de *T. asperelloides*

A fim de avaliarmos o conteúdo proteico existente no que se refere a massa molecular, as frações dos ExtTa 1 e ExtTa 2 foram fracionadas eletroforéticamente em géis SDS-PAGE. Primeiramente as amostras foram fracionadas em gel na concentração de 10% de poliacrilamida o qual foi corado, posteriormente, com o corante azul brilhante de coomassie que possibilita a visualização de concentração na ordem de 10 ng. Infelizmente, nenhuma banda foi visualizada após a coloração. O gel foi, então, descorado e, desta vez, corado com a prata, que é uma coloração mais sensível que permite a visualização de proteínas em amostras com até 0,1 ng. As frações avaliadas foram: 4.1,4.2,5.1,5.2,6.1,6.2,7.1,7.2 e 12.2 (20 µg de proteína de cada). É possível observar, de acordo com a Figura 34 que as frações não apresentam grande conteúdo proteico de alto peso molecular (250 a 20 kDa), apresentando apenas algumas bandas na altura de 30 e 20 kDa. Não foram visualizadas bandas na canaleta onde foi fracionada a amostra correspondente à fração 12.2, apesar do resultado da dosagem por BCA ter apresentado um conteúdo proteico de 4,96 mg totais, não apresentou banda proteica.

Como as dosagens anteriores apontavam para um conteúdo grande de proteínas nas amostras, foi realizado um segundo fracionamento eletroforético em gel mais concentrado (15%) e com uma quantidade maior das amostras (Figura 34) de modo a favorecer a visualização de bandas correspondentes a proteínas de menor massa molecular. Este gel foi também corado pela prata. Para tal, 30 µg de proteína de cada uma das frações 4.1,5.1,5.2,6.1,6.2,7.2 e 12.2 foram avaliadas. As frações 4.2 e 7.1 foram excluídas da análise por não termos disponibilidade de 30 µg de proteína destas frações. Observamos nesse gel (Figura 34), a presença de uma banda entre 20 e 30 kDa na amostra correspondente à fração 4.1. Uma banda de aproximadamente 15kDa e outra de 10 kDa foram observadas em todas as amostras, com exceção, novamente, da fração 12.2, em que não foram visualizadas bandas de proteína.

A aparência das bandas de baixo peso molecular observadas era sugestiva de que se tratavam de glicoproteínas e, para avaliar esta suspeita, as amostras foram fracionadas novamente em gel SDS-PAGE 15% que foi posteriormente corado com corante de Schiff, um corante específico par a marcação de glico proteínas(Figura 35). Foram observadas, bandas de glicoproteína na altura de 17 kDa (Amersham™ECL™ Rainbow™ Marker - Low Range #RPN755E) nas frações 5.1, 6.1, 6.2 e 7.2 (Figura 35- canaletas 7,8,9 e 10). Também foram observadas bandas na altura entre 12 e 8.5 kDa nas frações 4.1, 5.1, 5.2, 6.1 e 6.2 (Figura 35 – canaletas 5,6,7,8 e 9). Aparentemente, essas bandas observadas se encontram na mesma

altura das bandas encontradas no gel corado pela prata (Figura 34), indicando que provavelmente se trata das mesmas proteínas em ambos os géis. Todas as frações, a exceção da fração 12.2, também apresentaram uma banda com peso molecular inferior a 3,5 kDa (Figura 35).

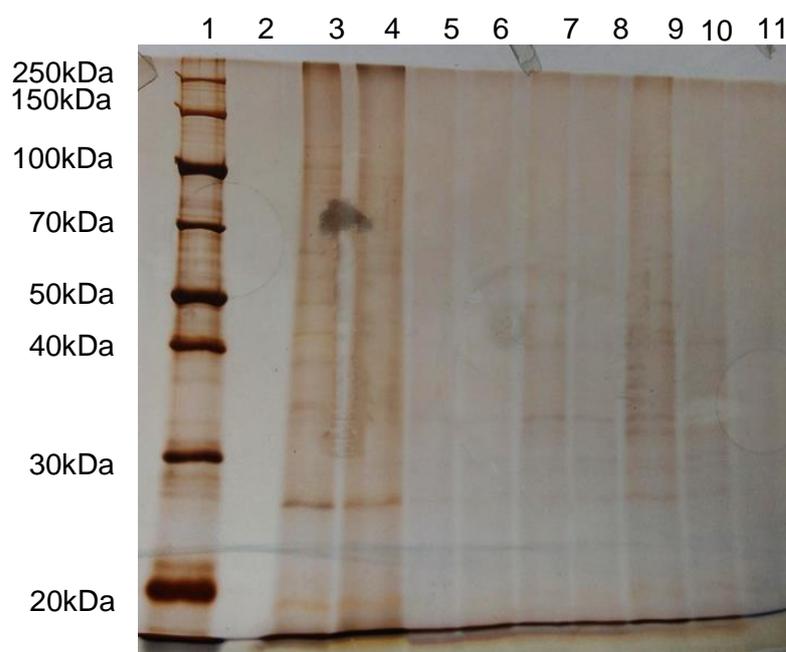


Figura 33- Perfil eletroforético em gel SDS-Page das frações dos extratos de *T. asperelloides*.

SDS-Page (10%; gel de 1 mm) corado com coomassie de azul brilhante, descorada e corada com prata para avaliação do conteúdo proteico das frações (158-6,5 kDa) do extrato etanólico de *T. asperelloides* (FPLC - coluna de filtração molecular superose TM 12 10/300). Condições da corrida: 180v durante 3h e 10 min. Ao todo, 20 ug de cada fração foi liofilizado e ressuspendido em 20 ul de tampão da amostra. Canaleta 1: ThermoScientific Protein Ladder # 26630 (5ul); Can 2: Vazia; Can 3: Fração 4.1; Can 4: Fração 4.2; Can 5: Fração 5.1; Can 6: Fração 5.2; Canaleta 7: Fração 6.1; Can 8: Fração 6.2; Can 9: Fração 7.1; Can 10: Fração 7.2; Can 11: Fração 12.2

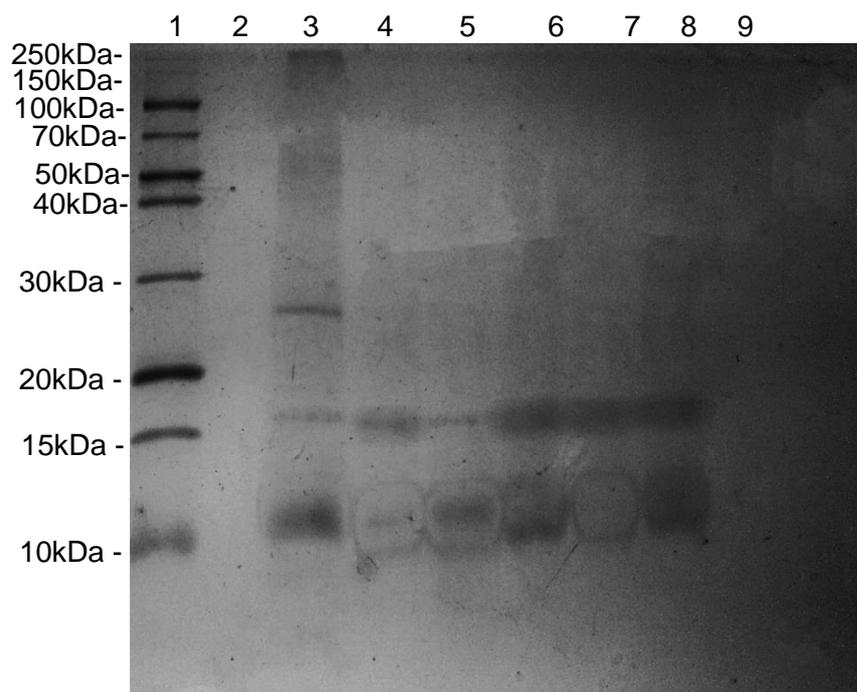


Figura 34 – Perfil eletroforético em SDS-Page das frações do extrato de *T. asperelloides*

SDS-Page (15%; gel de 1 mm) corado com prata para avaliação do conteúdo proteico das frações (158-6,5 kDa) do extrato etanólico de *T. asperelloides* (FPLC - coluna de filtração molecular superose TM 12 10/300). Condições da corrida: 120v. Ao todo, 30 ug de cada fração foi liofilizado e ressuspenso em 20 ul de tampão da amostra. Canaleta 1: ThermoScientific Protein Ladder # 26630 ; Can 2: Vazia; Can 3: Fração 4.1; Can 4: Fração 5.1; Canaleta 5: Fração 5.2; Can 6: Fração 6.1; Can 7: Fração 6.2; Can 8: Fração 7.2; Can 9: Fração 12.2

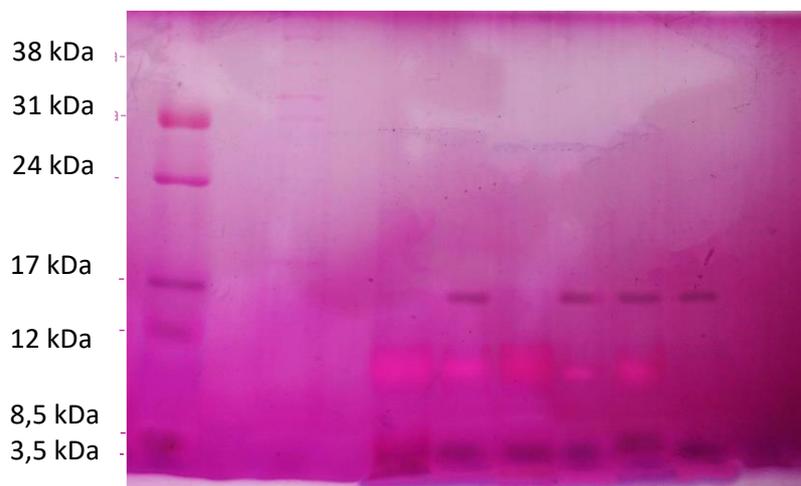


Figura 35 – Perfil eletroforético em SDS-Page das frações do extrato de *T. asperelloides*

SDS-Page (15%; gel de 1 mm) corado com Schiff para avaliação do conteúdo proteico das frações (158-6,5 kDa) do extrato etanólico de *T. asperelloides* (FPLC - coluna de filtração molecular superose TM 12 10/300). Condições da corrida: 120v. Ao todo, 30 ug de cada fração foi liofilizado e ressuspenso em 20 ul de tampão da amostra. Canaleta 1: Amersham™ECL™ Rainbow™ Marker - Low Range #RPN755E (5ul); Can 2: Vazia; Can 3: ThermoScientific Protein Ladder # 26630 ; Can 4: Vazia; Can 5: Fração 4.1; Can 6: Fração 5.1; Canaleta 7: Fração 5.2; Can 8: Fração 6.1; Can 9: Fração 6.2; Can 10: Fração 7.2; Can 11: Fração 12.2

6. DISCUSSÃO

O câncer é uma doença de grande importância para a saúde pública mundial, especialmente de países em desenvolvimento, como o Brasil, onde são previstos que ocorram 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2015 (INCA, World Cancer Report, 2014). Ao longo dos últimos anos, foi realizado um grande progresso no entendimento da biologia e dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão dessa doença (Hanahan e Weinberg, 2011; Parsa *et al.*, 2016) em parte devido ao avanço das técnicas moleculares que possibilitaram entender as vias de sinalização e a descoberta de marcadores específicos para vários tipos diferentes de câncer. O carcinoma de mama é o câncer que mais mata mulheres no mundo (INCA, World Cancer Report, 2014; Guarneri e Conte, 2004; Hassan *et al.*, 2010), e apesar dos avanços no entendimento dessa doença que levaram a elaboração de estratégias terapêuticas específicas (Hassan *et al.*, 2010) (Henson *et al.*, 2006; Parsa *et al.*, 2016) e, conseqüentemente, a uma queda na sua mortalidade, a sua incidência continua a crescer, e o progresso realizado não é ainda suficiente para encontrar uma cura para tipos mais agressivos e metastáticos desse câncer (Hassan *et al.*, 2010).

A terapia multimodal, a adjuvância da quimio e radioterapia foram de grande importância para o aprimoramento dos tratamentos de câncer, aumentando a qualidade de vida e prolongando a expectativa de vida de pacientes. A multimodalidade de quimioterápicos representa um grande progresso para terapias antitumorais, principalmente em casos como os de carcinoma de mama, em que a combinação de mais de um tipo de quimioterápico aumenta a eficiência no combate as células cancerígenas, reduzindo os efeitos adversos causados pelo tratamento no paciente. A quimioterapia ainda hoje é uma das principais formas de tratamento para cânceres que não são facilmente removidos por cirurgia, e também no tratamento paliativo de cânceres metastáticos, reduzindo seus sintomas e prolongando a vida do paciente (Hassan *et al.*, 2010).

O melhor entendimento da carcinogênese e biologia tumoral possibilita um aumento das oportunidades de inovação no tratamento do câncer, uma vez que permite o desenvolvimento de abordagens específicas a cada tipo de câncer e personalizadas ao tumor de cada paciente (Lheureux *et al.*, 2017; Hanahan e Weinberg, 2011). Apesar de todo o progresso realizado na área da quimioterapia, principalmente proporcionado pela terapia multimodal, ainda existem vários obstáculos a serem enfrentados: os quimioterápicos utilizados em tratamentos atualmente ainda apresentam muitas vezes efeitos adversos nocivos ao organismo dos pacientes; baixa eficiência; desenvolvimento de resistência; dificuldade de gerenciamento de associações de drogas devido aos efeitos adversos cumulativos que podem ser mais prejudiciais à saúde do paciente do que a própria doença em si; dificuldade de encontrar a

droga ideal para o tratamento de um tumor específico em determinado paciente de modo a propiciar uma abordagem de tratamento personalizada. Além disso, a instabilidade genética das células cancerígenas que leva a uma heterogeneidade muito grande entre as células de um mesmo tumor é um desafio a mais a ser transposto e exige a busca constante de novos fármacos e desenvolvimento de nova abordagens terapêuticas (Corona *et al.*, 2017).

Há um crescente número de possibilidades de abordagens terapêuticas que não existiam há 20 anos atrás. A identificação de várias desregulações de biologia, fisiologia e morfologia nos tumores e seu respectivo microambiente ajudou a direcionar o desenvolvimento de drogas (Lheureux *et al.*, 2017). Há muitos estudos interessantes visando o uso de terapias alvo através do desenvolvimento de biomarcadores que inibem vias de sinalização desreguladas no câncer, além do promissoras abordagens na imunoterapia, com o objetivo, por exemplo, de fortalecer a resposta imune inata contra as massas tumorais utilizando várias ferramentas, inclusive vacinas virais, sem esquecer as combinações entre as novas terapias e as terapias convencionais, como por exemplo a associação de radio e imunoterapia no tratamento de carcinoma mamário (Lheureux *et al.*, 2017; Vanneman e Dranoff, 2012; Baudino, 2015). Contudo, outra vertente no tratamento antitumoral, que não pode ser deixada de lado, é o tratamento a partir de compostos com princípios ativos isolados de produtos naturais. O uso de produtos naturais no tratamento de doenças não é algo novo, sendo usado por orientais há mais de 1000 anos (Wasser, 2014). De fato, vários antitumorais já foram isolados de plantas e microrganismos, e atualmente são utilizados em tratamentos, inclusive tratamentos multimodais. Esta é uma área que, apesar de antiga, tem possibilitado sempre que novas descobertas sejam feitas, devido a diversidade dos seres vivos presentes em nosso planeta, e o avanço tecnológico que possibilitou o isolamento mais eficiente de compostos de interesse. (Wasser, 2002; Mueller *et al.*, 2008; Wasser, 2014) (Alberts Mw, 1993).

Há um número crescente de estudos, mostrando que fungos do gênero *Trichoderma* produzem compostos de grande interesse em diversas áreas, tanto como controle biológico de patógenos em plantações, quanto na área clínica em que extratos e compostos isolados desses fungos apresentaram atividade microbicida, imunomodulatória e antitumoral (Kusakabe *et al.*, 1980; Abd El-Rahman *et al.*, 2014). O composto L-lisina-alfa-oxidase, é um dos compostos mais conhecidos isolados desse gênero e seu uso na clínica como antitumoral tem sido avaliado (Kusakabe *et al.*, 1980; Lukasheva e Berezov, 2002; Pokrovsky *et al.*, 2013).

Trichoderma asperelloides é um fungo do gênero *Trichoderma* que ainda não foi devidamente estudado como outros membros deste gênero. Apesar de sua importância econômica como biocontrole de fitopatógenos em vários tipos de cultivares (Watanabe *et al.*, 2005; Chaparro

et al., 2011), sua importância na área clínica não foi propriamente estabelecida, por isso a relevância de estudos que visem o aprofundamento de conhecimentos nesta área.

Uma das dificuldades na disponibilidade de dados na literatura sobre esta espécie de *Trichoderma* pode ser relacionada à dificuldade para identificação correta da espécie. Por muitos anos *T. asperelloides* foi confundido com outras espécies de *Trichoderma*, entre elas *T. asperellum* e *T. viride*, até que em 2010, Samuels e colaboradores observaram, através de técnicas de identificação morfológicas e moleculares, que dentro de *T. asperellum* se encaixavam duas espécies irmãs: *T. asperellum* e *T. asperelloides*. Dessa forma, é possível que muitos estudos relacionados a *T. asperellum* podem, na verdade se referir a *T. asperelloides*. Já foi visto que o extrato de *T. asperellum* apresenta propriedades citotóxicas em linhagens de adenocarcinoma de cólon (HeLa) e de mama (MCF7) (Abd El-Rahman *et al.*, 2014)

T. asperelloides é um fungo presente no solo e é uma espécie cosmopolita com distribuição geográfica por todo o globo (Samuels *et al.*, 2010). Apresenta um bom crescimento em meio de cultura em temperaturas variando entre 25 a 30 °C, sendo facilmente manipulável em laboratório.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a existência de novas substâncias com potencial antitumoral produzidas por este fungo. O estudo foi realizado analisando-se o efeito biológico do extrato etanólico de *T. asperelloides* e frações deste extrato em linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma mamário tanto humanas quanto de camundongo.

O uso de extratos com fins medicinais não é algo novo (Farnsworth, 1994; Wasser, 2002; Duraipandiyani *et al.*, 2006), e de fato há várias formas de se obter extratos de plantas e microrganismos, usando uma infinidade de substâncias, como, por exemplo, acetato de etila, água, etanol e metanol. O etanol é uma ótima substância para obtenção de extratos por ser considerado um bom solvente de compostos iônicos, ser polar, ser miscível em água e em muitos compostos orgânicos, incluindo ácido acético e acetona, e, por possuir uma extremidade apolar, também interage com substâncias apolares. Em estudos previamente realizados por colaboradores de nosso grupo (Lopes e Santos, 2017), foi mostrado que o extrato etanólico de *T. asperelloides* apresentou uma ação leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Desta forma, optamos por, primeiramente, prepararmos também um extrato etanólico para o *screening* inicial. O extrato obtido com etanol apresentou um conteúdo rico de proteínas, principalmente de glicoproteínas de baixo peso molecular, 30-3,5 kDa, e carboidratos.

A avaliação dos efeitos biológicos das preparações de extrato e suas frações indicaram uma ação citotóxica para duas linhagens de células derivadas de adenocarcinoma mamário

humano e uma murina. A incubação das células em presença do extrato ou de algumas de suas frações em um período de 48h, compromete consideravelmente a viabilidade celular dessas linhagens, o que demonstra que ExtTa e frações possui promissora atividade antitumoral.

A linhagem MCF-7, foi a menos sensível à exposição ao ExtTa. Esta linhagem é derivada de câncer do subtipo luminal, que é uma forma menos agressiva e não-metastática (Subik et al. 2010; (Dai *et al.*, 2015). O câncer do tipo luminal geralmente é removível por cirurgia e apresenta resposta a tratamentos hormonais (Subik et al. 2010; Dai *et al.*, 2015).

A linhagem que apresentou maior sensibilidade aos efeitos citotóxicos do extrato foi a MDA-MB-231 que é derivada de um subtipo de carcinoma mamário denominado de triplo-negativo. O câncer desse subtipo é considerado extremamente agressivo e metastático, há uma grande dificuldade em seu tratamento, uma vez que ele não é responsivo a tratamentos hormonais, por não possuir os receptores ER, PR e HER-2, apresentando um prognóstico insatisfatório (Bianchini *et al.*, 2016; Perou *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2015). Apesar do tumor de mama metastático triplo-negativo ser bem responsivo a tratamentos quimioterápicos (Hassan *et al.*, 2010) , o uso exagerado de quimioterápicos pode levar a desenvolvimento de resistência do tumor a droga (Corona *et al.*, 2017) pois este subtipo agrupa uma variedade heterogênea de tumores, Há vários estudos que mostram possíveis formas alternativas de tratamento para esse tipo de câncer, com marcadores para terapia alvo bem promissores, como por exemplo inibidores de PARP (Bianchini *et al.*, 2010) ou da via PIK3/AKT/MTOR (Chandarlapaty *et al.*, 2016) sendo sugerido que uma terapia baseada na combinação de quimioterápicos, imunoterapia e terapia-alvo possa ser interessante no tratamento desse subtipo de tumor (Corona *et al.*, 2017). De acordo com Chavez *et al.* (2010), o uso de linhagens tumorais para o estudo da biologia e abordagens terapêuticas dos subtipos de carcinoma mamário é um modelo válido e bem útil, apesar de algumas desvantagens, como a impossibilidade do ambiente *in vitro* não conseguir mimetizar acuradamente o ambiente *in vivo*.

O Índice de seletividade (IS) é um parâmetro muito utilizado durante ensaios de citotoxicidade pré-clínicos, *in vitro*, para que se saiba qual é a resposta a droga em um determinado alvo, podendo este ser um vírus, bactéria, protozoários ou até mesmo células tumorais em relação ao organismo. Inicialmente, esse dado é obtido *in vitro*, o que já ajuda a inferir uma possível resposta real do organismo, para posteriormente dar seguimento a ensaios *in vivo* e, posteriormente, a ensaios clínicos utilizando a droga. O IS calculado neste estudo tomando como referência a célula GM637 mostrou que as células da linhagem MDA-MB-231 necessita de uma dose 1,6 vezes menor de extrato de *T. asperelloides* do que a linhagem não-tumorigênica GM637. O *screening* inicial com as frações de ExtTa1, mostrou que um mesmo

extrato pode apresentar frações contendo substâncias com os mais variados tipos de respostas: enquanto há frações citotóxicas para ambas as linhagens (4.1, 5.1, 15.1), há frações que são citotóxicas só para a linhagem tumoral (6.1, 7.1, 12.1) e frações citotóxicas apenas para a linhagem não-tumoral (10.1, 11.1). O IS das frações 4.2, 5.1 e 5.2 também mostrou que elas são mais citotóxicas para a linhagem tumoral do que para o fibroblasto. A fração 4.2 foi a que apresentou maior IS (1,96), apesar de ter apresentado uma pequena quantidade de proteína. Como o critério para elaboração de dose utilizado neste estudo foi a concentração de proteína, não foi possível realizar mais replicatas biológicas ou dar segmento aos estudos com essa fração. A fração 5.2 apresentou o segundo maior IS, (1,92), por apresentar um grande conteúdo proteico, foi possível prosseguir os estudos com essa fração.

O fracionamento do extrato e purificação do composto com princípio ativo é extremamente importante, uma vez que este composto diluído no extrato total pode estar interagindo com outras substâncias e tendo seu efeito mascarado ou exacerbado. Além disso, o isolamento e purificação do princípio ativo elimina as variações na preparação farmacológica característica de extratos brutos. Neste sentido, pretendemos utilizar espectrometria de massas para identificar os princípios ativos presentes nas frações do extrato etanólico de *T. asperelloides*. Apesar do fracionamento por FPLC ser enriquecido para proteínas e termos dosado em nosso estudo o conteúdo de proteínas e polissacarídeos tanto no extrato quanto nas frações pode ser que as moléculas com atividade biológica sejam de outra natureza bioquímica tais como lipídios e metabólitos secundários, no entanto, as grandes quantidade de proteínas e carboidratos presentes no extrato e frações, aumenta a probabilidade do composto ser uma proteína, um carboidrato ou até mesmo uma glicoproteína.

Inicialmente, o IS apresentado pelos ExtTa e frações pode não aparentar ser muito impressionante quando comparado ao IS encontrado para drogas usadas no tratamento de doenças, causadas por parasitas, como, por exemplo, protozoários, como a leishmania, em que o IS pode variar entre 887 e 11 (Loiseau *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2013; Kaiser *et al.*, 2015). No entanto, é preciso levar em consideração que células tumorais surgem através de modificações no fenótipo de células normais como consequência do acúmulo de mutações, e por conta disso a biologia, morfologia, fisiologia e genética dessas células é extremamente parecida com as células normais, o que se configura em um dos principais desafios no *screening* de drogas seletivas para células tumorais e que não lesem as células saudáveis. De fato, diversos estudos avaliando a citotoxicidade de compostos antitumorais apresentam IS que poderiam ser considerados baixos quando comparados a IS em outras patogenicias, como é o caso do estudo de Oliveria, PF e colaborades (2015), que avaliou a citotoxicidade de óleos essenciais em linhagens de melanoma murino (B16F10), carcinoma de cólon humano (HT29), adenocarcinoma de mama (MCF7), adenocarcinoma cervical (HeLa) e hepatocarcinoma

humano (HepG2), obtendo IS que variou entre 3,97 e 0. Utilizando o fibroblasto de pulmão de hamster chinês (V79) como referência de célula normal. Ou o estudo de Musa, MA e colaboradores (2010) que avaliaram compostos de benzopiranos a base de cumarina no qual o IS variou entre 4,08 e 1,01 para o carcinoma humano (A549), utilizando a linhagem normal derivada de pulmão (LL47) como referência. No estudo de Badisa et al 2009, foi utilizada a droga Tamoxifeno, atualmente utilizada na clínica, para controle de estudo. Assim como as drogas mais promissoras estudadas por Badisa, O tamoxifeno, no estudo de Badisa, apresentou IS de 1,29 quando da comparação da IC50 da linhagem MCF7 em relação ao IC50 de uma linhagem normal de fígado de rato. As drogas mais promissoras estudadas por Badisa apresentaram IS DE 1,78 (Pipeidimyl-DES) e 2,84 (Pyrrolidiny-DES), aproximadamente.

A baixa seletividade das drogas antitumorais é uma das razões para emprego de terapias multimodais na tentativa de encontrar combinações de medicamentos que apresentem uma seletividade maior para a célula tumoral do que para a célula saudável, além de ser uma forma de lidar com a heterogeneidade do tumor.

De acordo com López-Lazaro (2015) a melhor maneira de se avaliar o potencial de uma droga antitumoral em testes pre-clínicos *in vitro* é através da comparação da citotoxicidade deste composto entre uma célula tumoral e uma célula normal do mesmo tecido de origem do tumor em questão, e o ideal seria o uso de culturas primárias para melhor aproximar os resultados aos possíveis resultados dos testes clínicos, uma vez que essas culturas não foram expostas há tantas variáveis que poderiam mudar sua biologia. Contudo, este mesmo autor ressalta a dificuldade inerente à aquisição de culturas primárias humanas devido a questões éticas, especialmente de certos tipos específicos de tecidos e órgãos. No nosso estudo inicialmente pretendíamos utilizar para o cálculo do IS a linhagem de células MCF-10. Estas células são células não tumorigênicas derivadas de tecido de glândula mamária humana, portanto há um grande interesse em resultados comparativos a ela, já que o IS poderia ser mais comparável ao que pode ser encontrado de fato para o organismo. Entretanto, células não tumorigênicas não se adaptam tão facilmente a cultura *in vitro* como é o caso de linhagens tumorigênicas, por isso precisam de uma metodologia de cultura mais complexa, com um determinado meio de cultura, além de alguns suplementos específicos. No caso da linhagem MCF10, o seu crescimento é viável *in vitro* na presença do meio DMEM suplementado de soro de cavalo (5%), EGF (20 ng/ml), hidrocortisona (0,5 mg/ml) toxina de cólera (100 ng/ml) e insulina (10 µg/ml) (Soule et al 1990) Infelizmente, são reagentes que não se encontravam disponíveis na realização desse estudo. Pretende-se retomar os estudos utilizando a linhagem MCF10 posteriormente.

A outra alternativa, muito aceita no cálculo do IS é a utilização de células da linhagem hematopoiética uma vez que estas células por apresentarem uma alta taxa de proliferação são alvos muito sensíveis aos quimioterápicos. De fato, dentre os efeitos adversos mais comuns da quimioterapia está a imunossupressão, através de morte de células do sistema imune, já que essas células também são conhecidas por apresentarem divisão celular rápida (Harris *et al.*, 1976). Desta forma, pretendemos utilizar futuramente outros tipos celulares para o cálculo do IS tais como células mononucleares de sangue periférico (PBMC), que são todas as células existentes que possuem um núcleo arredondado, consistindo em linfócitos (células T, células B e células NK) ou monócitos.

Diante das dificuldades enfrentadas, procedemos os estudos iniciais empregando as células fibroblasto não tumorigênico GM637. As células GM637 constituem uma linhagem imortalizada, portanto não constituem uma cultura primária. Além disso, embora fibroblastos sejam células constituintes do microambiente tumoral, tais células são responsáveis por manter a integridade estrutural de tecidos conectivos através de secreção de precursores da matriz extracelular. Os fibroblastos são derivados do mesênquima, enquanto a origem das células de adenocarcinoma mamário é epitelial. Todos estes fatos podem contribuir para que os IS encontrados não sejam mais expressivos. Todavia, os resultados desse estudo não deixam de ser relevantes e promissores, e abrem novas perspectivas para um aprofundamento do estudo das frações do extrato de *T. asperelloides*, com experimentos utilizando as células MCF10 de mama, culturas primárias, células de linhagem hematopoiética e ensaios *in vivo*.

Os resultados de citotoxicidade das frações de ExtTa 1 e ExtTa 2 em conjunto com o exposto pelo fracionamento das mesmas em gel SDS-Page, mostraram que as frações selecionadas para avaliação da citotoxicidade apresentam perfil semelhante entre si, tanto na questão da citotoxicidade apresentada contra as linhagens MDA-MB-231 e GM637, quanto na disposição do conteúdo proteico, apresentando bandas de mesmo tamanho tanto em alto peso molecular quanto em baixo peso molecular, além de todas apresentarem uma maior quantidade de proteínas de baixo peso molecular. Isso se deve ao fato de essas frações provavelmente compartilharem em seu conteúdo as mesmas proteínas, uma vez que são frações coletadas muito próximas umas às outras, como pode ser visto nos perfis cromatográficos gerados pelo FPLC, inclusive compartilhando o mesmo pico do perfil cromatográfico. Essa proximidade entre as frações também pode justificar uma possível diferença encontrada na citotoxicidade das frações de mesmo número de ExtTa 1 e ExtTa 2, como é possível ver que o IS de seletividade da fração 4.1 (0,985) foi inferior ao apresentado pela fração 4.2 (1,959), possivelmente o princípio ativo observado na fração 4.2 poderia estar concentrado na fração 5.1 ao invés de estar na fração 4.1, uma vez que as duas são próximas uma da outra e a

separação de frações realizada através de FPLC e baseada no tempo de gotejamento do extrato.

Foi realizado um *screening* inicial de possíveis mecanismos de ação de ExtTa 1 sobre a linhagem MDA-MB-231, tomando como referência de célula não tumoral o fibroblasto não tumorigênico GM637.

O estresse oxidativo ocorre devido a um desbalanceamento entre a produção de ROS na célula e a compensação com antioxidantes. O excesso de ROS na célula pode levar a oxidação de ácidos nucleicos e proteínas, podendo desencadear processo de morte celular programada, ou em última instância, o processo de necrose celular. A avaliação da produção de ROS pelas linhagens celulares em resposta ao tratamento com ExtTa 1 nos tempos de 3 e 24h não mostrou uma diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle para ambas as linhagens, indicando que não há alteração na produção de ROS em células em tratamento nesses tempos. Outro ensaio foi realizado utilizando uma dose do ExtTa 1 3 vezes (91,95 ug/ml) e (183.9 ug/ml) 6 vezes maior no tempo de 24h, para a linhagem MDA-MB-231, mostrou que ainda assim não houve alteração na produção de ROS em relação ao controle. Esses resultados indicam que provavelmente o mecanismo de ação do extrato de *T. asperelloides* não se relaciona ao aumento da produção de ROS. O que difere do mecanismo de ação do composto L-lisina-a-oxidase, isolada de outros fungos do mesmo gênero, onde foi demonstrado que o tratamento com esse composto leva a um aumento na produção de ROS (Lukasheva e Berezov, 2002). Essa divergência de resultados pode indicar que, talvez, esse não seja o composto cujo efeito está sendo observado no extrato do presente estudo.

A função mais básica do ciclo celular é de duplicar de maneira acurada a grande quantidade de DNA presente nos cromossomos e segregar cópias de maneira precisa em células-filha geneticamente idênticas. Tal processo define duas grandes fases do ciclo celular. A duplicação do DNA ocorre durante a fase S, e a segregação dos cromossomos e divisão celular ocorre na fase M. Nas fases G1 e G2 a célula requer um tempo para crescer e duplicar suas organelas. A fase G1 ocorre entre a fase M e a fase S, enquanto a fase G2 está entre a fase S e a fase M. Sendo assim, o ciclo celular eucariótico é dividido em 4 fases sequenciais: G1, S, G2 e M. A intérfase é o nome dado para o conjunto das fases G1, S e G2 (Alberts *et al.*, 2002). Durante as fases de gap, G1 e G2, a célula monitora o ambiente interno e externo para garantir que as condições são favoráveis para que a célula se comprometa com as fases S e M. A fase G1 é especialmente importante nessa situação: se as condições não forem as melhores, as células podem atrasar o progresso no ciclo a partir de G1, e até podem entrar em um estado de quiescência conhecido como G0, em que elas podem permanecer por dias, semanas ou até mesmo anos até voltarem a proliferar. Os caminhos bioquímicos que

restringem a transição no ciclo celular e/ou induzem morte celular são conhecidos como checkpoints do ciclo celular (Hartwell e Weinert, 1989). Esses checkpoints mantêm a fidelidade na replicação do DNA, reparo e divisão. As células podem parar em checkpoints do ciclo celular temporariamente para permitir: 1) que seja reparado qualquer dano celular; 2) a dissipação de um sinal de estresse celular exógeno ou 3) disponibilidade de fatores de crescimento essenciais, hormônios ou nutrientes. A sinalização de checkpoints também pode resultar na ativação de vias que levam à morte celular programada, caso o dano causado a célula não possa ser reparado. Defeitos nos checkpoints de ciclo celular podem resultar em mutações genéticas, danos a cromossomos e aneuploidia, o que pode contribuir com a carcinogênese. Inibidores, como aqueles da família INK4 atuam em Cdk4 e Cdk6 (checkpoints de ciclo celular), especialmente durante a fase G1 do ciclo celular. Os genes da família INK4 são importantes genes supressores de tumor, e mutações de perda de função nesses genes pode desencadear carcinogênese (Pietenpol e Stewart, 2002).

A avaliação do efeito do ExtTa 1 (30,35 µg/ml) sobre o ciclo celular na linhagem MDA-MB-231 mostrou que, provavelmente, o extrato afeta o ciclo celular, levando a um aumento de células na fase G0-G1 e redução na fase S em relação ao controle, no tempo de 24h, o que pode sugerir uma tendência de parada do ciclo celular na fase G0-G1. O resultado utilizando doses mais elevadas do ExtTa 1 no tempo de 24h corrobora essa suposição, uma vez que é observado o aumento significativo de DNA fragmentando. Esse aumento de DNA fragmentado pode indicar morte celular, além de ser observada uma diminuição de células na fase G0-G1, o que pode significar que ocorreu uma parada na fase G0-G1 para verificação dos checkpoints, induzindo a uma sinalização para a via de morte celular programada, levando as células a apoptose. No entanto, mais experimentos são necessários para elucidar este ponto. Primeiro, verificar se de fato ocorre a parada no ciclo celular, através da observação desse mesmo ensaio utilizando a concentração de IC50 em tempos prolongados, como por exemplo 36 e 48 horas. Também seria necessária uma verificação se essa morte celular seria por apoptose ou por outro processo de morte celular, para isso avaliar nas doses que deram diferença significativa (6x IC50 ExtTa 1 e 3x IC50 fração 5.2) através de citometria de fluxo, utilizando os marcadores de apoptose, Iodeto de Propídeo e Anexina V.

O extrato ExtTa 1 parece surtir efeito no ciclo celular da célula GM637 no tempo de 3 horas, mas, ao contrário do observado na MDA-MB-231, há uma diminuição de células na fase G0-G1 e um possível aumento na fase S, sendo necessário um terceiro experimento para confirmação. E após 24h do tratamento com o extrato, não há mais qualquer tipo de efeito aparente nessa linhagem celular, o que pode sugerir que a concentração utilizada não foi suficiente para causar grandes efeitos no ciclo celular dessa linhagem.

Esses resultados corroboram aqueles observados dos ensaios de citotoxicidade, em que a dose de 30,65 µg/ml, é mais citotóxica para a linhagem tumoral do que para a linhagem não-tumoral. E provavelmente o efeito citotóxico observado é causado por um mecanismo que interfere diretamente com o ciclo celular, levando a sua parada no checkpoint da fase G0-G1, e, devido a não-resolução do dano causado, levando a morte celular.

Evidências sugerem que autofagia representa a maior via para degradação de proteínas citoplasmáticas e organelas na célula (Shimizu *et al.*, 2014; Nakatogawa *et al.*, 2009). O processo autofágico é um dos responsáveis por manter a homeostase através do equilíbrio entre os processos de síntese e degradação no meio intracelular. Há vários processos que podem ser relacionados ao termo autofagia (Klionsky, 2004), o elemento comum entre eles é a importação de componentes do citoplasma para lisossomos.

Um ponto crítico é que autofagia é um processo altamente dinâmico e de múltiplas etapas, podendo ser modulada tanto positivamente, quanto negativamente (Klionsky, 2015). Algumas etapas chave são: a) controle da formação do fagoforo por Beclin-1/VPS34 no retículo endoplasmático e outras membranas em resposta a sinalização de estresse; b) Conjugação de Atg5-Atg12, interação de Atg16L e multimerização no fagoforo; c) processamento de LC3 e inserção na membrana estendida do fagoforo; d) captura aleatória ou de alvos selecionados para degradação, finalização do autofagossomo acompanhado da reciclagem de LC3-II por ATG4, seguido por; e) fusão do autofagossomo com o lisossomo e degradação proteolítica por proteases lisossomais de moléculas capturadas.(Xie *et al.*, 2008; Glick *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2011).

A interrupção desse processo pode resultar em crescimento celular anormal ou morte celular, podendo levar a vários estados patogênicos (Klionsky e Emr, 2000). A autofagia já foi associada a um grande número de doenças, incluindo câncer, neurodegeneração e miopatias, além da remoção de certos vírus e bactérias. Dependendo de diferentes contextos celulares ou estímulos, autofagia pode levar a sobrevivência celular ou morte, contudo, os mecanismos acerca desse papel dual, em que a autofagia decide o destino celular permanece sem esclarecimento (Rubinsztein *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2011). O papel da autofagia na morte celular parece estar ligado a degradação de fatores essenciais a sobrevivência celular (Yu *et al.*, 2006), ou seu efeito na manutenção da energia, uma vez que ATPs são requeridos durante processos de morte celular, como apoptose (Qu *et al.*, 2007).

A formação de vacúolos autofágicos foi avaliada neste estudo através de MET. As imagens resultantes do tratamento das linhagens MDA-MB-231 e GM637 com o extrato de *T. asperelloides* indicam a presença de vários tipos de vacúolos, inclusive vacúolos com dupla membrana e conteúdo citoplasmático, sugerindo que o tratamento com extrato pode induzir

autofagia nessas linhagens celulares. Esses resultados encontrados, juntamente com os resultados observados através de citometria de fluxo, indicam que a citotoxicidade causada pelo extrato nessas linhagens celulares pode estar associada a autofagia, que por sua vez se correlaciona a uma possível parada no ciclo celular e o desencadeamento de um processo de morte celular.

A morte celular em células de mamíferos pode ocorrer a partir de múltiplos mecanismos, entre os quais, alguns são uma forma programada de “suicídio” deliberado, e outros parecem ser acidentais ou o resultado de danos celulares (Green e Victor, 2012; Yonekawa e Thorburn, 2013). Já foi proposto que a morte celular mediada por autofagia também pode ser considerada um outro tipo de morte celular programada (Galluzzi *et al.*, 2012). Essa sugestão foi baseada no fato de que é frequentemente observado que a morte celular muitas vezes está acompanhada de grandes quantidades de autofagossomos e características de autofagia ativa. Há algumas publicações na literatura que concluem que o estímulo para morte em células de mamíferos e não-mamíferos é causado por autofagia (Denton *et al.*, 2012), apesar de que não está claro se essas situações são casos em que a autofagia apenas antecede a apoptose ou casos em que a autofagia de fato leva a morte celular. Em casos que a via normal de morte celular por apoptose se encontra bloqueada, como é o caso de células com knockout duplo de BAX e BAK, a célula ainda pode morrer em resposta a agentes que causam danos ao DNA (Shimizu *et al.*, 2004), essa morte não apoptótica é dependente dos reguladores autofágicos ATG5 e BECLIN1, e o knockdown desses genes foi o suficiente para proteger as células por um longo tempo de tratamentos com estímulos de morte. Foi observado que a expressão forçada de Ras induziu altos níveis de autofagia que levaram a morte dependente de autofagia e perda de capacidade proliferativa em uma linhagem celular de câncer de ovário (Elgendy *et al.*, 2011).

Há uma grande polêmica a respeito do uso do termo “morte celular autofágica”, pois muitas vezes a presença de autofagia em células em processo de morte não significa que essa morte foi induzida por autofagia, afinal a autofagia também é um processo celular muito utilizado na sobrevivência celular, principalmente em situações que a célula está sofrendo estresse por privação de nutrientes (Yonekawa e Thorburn, 2013; Shimizu *et al.*, 2014), sendo muitas vezes considerada morte celular autofágica, aquela que quando se inibe a autofagia, também previne o processo de morte celular (Shimizu *et al.*, 2014).

Uma vez que uma das principais marcas do câncer é o escape ao processo de apoptose (Hanahan e Weinberg, 2011), foi sugerido que o processo de eliminação de células cancerígenas pode ser mediado através de morte celular associada a autofagia, e há evidência da redução da atividade autofágica no processo de tumorigênese. Por exemplo, os

níveis de BECLIN 1 estão diminuídos em câncer de ovário, próstata e mama (Qu *et al.*, 2007), e mutações de perda de função de Atg5 e LC3 promovem mieloma e glioblastoma, respectivamente (Iqbal *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010), o que sugere que uma falha na capacidade das células de entrarem em autofagia pode levar a progressão tumoral. A autofagia ainda pode ter um papel dual no câncer, já que pode suprir células cancerígenas de nutrientes em situações de privação dos mesmos (Mathew *et al.*, 2009).

Uma das vias de ação do extrato de *T. asperelloides* poderia ser através do estímulo de formação de vacúolos autofágicos, como uma tentativa de sobrevivência da célula antecedendo a apoptose, ou seja, através do agravamento do processo de autofagia mediando o processo de morte celular. No entanto, não é possível distinguir, por microscopia eletrônica se de fato, todos os vacúolos observados são autofágicos, pois estes podem estar em estágios finais do processo de autofagia, não apresentando a característica típica de um vacúolo autofágico, que é a presença de membrana dupla e material citoplasmático. Dessa maneira, se faz necessária uma confirmação desses dados através de novos ensaios. Existe uma grande variedade de ensaios que podem ser utilizados para avaliação da autofagia, como os propostos por Mizushima *et al.* 2004, 2010 e por Klionsky e colaboradores, 2015. Entre eles, um ensaio bem utilizado é a marcação dos vacúolos autofágicos utilizando um marcador específico para autofagia, como por exemplo, GFP-LC3, sendo visualizado por microscopia fluorescente. A utilização de laranja de acridina combinada com microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo, também pode ser utilizada como um auxiliar na quantificação de vacúolos ácidos, sendo esses presentes nas etapas mais avançadas de autofagia (Thomé *et al.*, 2016). A combinação de laranja de acridina com brometo de etídeo pode também ser utilizada para a verificação de apoptose em vários estágios assim como necrose (Ribble *et al.*, 2005). Por fim, as formas LC3-I e LC3-II da proteína LC3 são facilmente visualizadas por western blot possuindo de 16-18 e 14-16 kDa, respectivamente (Klionsky, 2015). O uso de um inibidor de autofagia, como Wortmannin, é fundamental para verificar se a autofagia estaria associada aos efeitos citotóxicos e comprometimento da viabilidade celular observada em nosso estudo (Klionsky, 2015).

A via PI3K/AKT/mTOR é uma via extensivamente estudada por se encontrar desregulada em células tumorais, e entender seu funcionamento ajuda a elaboração de abordagens terapêuticas, como por exemplo, o uso das terapias-alvo através de inibidores de componentes dessa via, como é o caso das drogas Everolimo e Temozolomida que atuam como inibidores de mTOR (Lheureux *et al.*, 2017). Essa via é muito importante para entendimento do comportamento de um tumor, pois ela está intrinsecamente ligada a regulação da proliferação celular, sobrevivência, síntese de novas proteínas e ciclo celular (Engelman *et al.*, 2006; Mabuchi *et al.*, 2015). A partir da estimulação do receptor tirosina-quinase, PIK3 fosforila

fosfatidilinositol-4,5-bis-fosfato 2 (PIP2) transformando em PIP3, o que resulta na ativação de AKT. AKT controla, entre outros, ativação de mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos), que ativa dois substratos-chave: 4EBP1 e p70s6k (Lheureux *et al.*, 2017). O resultado disso é o aumento da expressão gênica de genes envolvidos na angiogênese (VEGF, e na progressão do ciclo celular (ciclina D1, c-Myc) (Engelman *et al.*, 2006; Lheureux *et al.*, 2017).

Um dado interessante é que a autofagia também é regulada negativamente por mTOR apesar de como ocorre essa regulação ainda não ser elucidado (Rubinsztein *et al.*, 2007). A Rapamicina é um conhecido inibidor de mTOR, proveniente de *Streptomyces hygroscopicus*, e por possuir efeito inibidor em mTOR, possui efeito antitumoral para uma variedade de cânceres, como foi visto por Dai *et al.* em 2013 em um linhagem de câncer pancreático (PC-2). A Rapamicina também é capaz de induzir autofagia através da inibição de mTOR (Rubinsztein *et al.*, 2007).

Os resultados desse estudo mostram que o extrato de *T. asperelloides*, como a Rapamicina, é capaz de induzir autofagia em células tumorais, e talvez o mecanismo de ação possa ser o mesmo pelo qual a Rapamicina atua, ou seja, através da inibição de mTOR. A inibição de mTOR acarretará em sérias consequências para a biologia celular, uma vez que a inibição de mTOR pode acarretar na inibição do aumento da expressão de genes envolvidos na angiogênese, proliferação celular, inclusive envolvidos no ciclo celular, como a ciclina-D1. Sabe-se que a diminuição da expressão ou degradação da ciclina-D1 possui efeito de parada no ciclo celular na fase G1 (Donjerkovic e Scott, 2000; Masamha e Benbrook, 2009; Rezaei *et al.*, 2012). Foi visto, durante este estudo que o extrato de *T. asperelloides* provavelmente causa uma parada no ciclo celular em G0-G1. Esses resultados corroboram a hipótese de que a ação do extrato pode ser através da inibição da via de mTOR. No entanto, experimentos avaliando o efeito desse extrato na expressão de mTOR, assim como de genes envolvidos na angiogênese (VEGF), no ciclo celular (Ciclina D1; c-Myc), autofagia (Atg5 e LC3) através de RT-QPCR são de extrema importância para dar suporte a essa hipótese.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho apontam que o extrato etanólico de *T. asperelloides* e suas frações apresentam princípio ativo com atividade citotóxica para linhagens de células derivadas de adenocarcinoma mamário humano e murino e que, pelo menos em parte, seu efeito biológico está relacionado à promoção de parada no ciclo celular na fase G0-G1 e indução de formação de vâcuolos autofágicos.

Os resultados que embasam esta conclusão são:

- Os extratos etanólicos de *T. asperelloides* obtidos durante este estudo apresentaram um grande conteúdo proteico e de carboidratos, sendo que ExtTa1 apresentou 40 mg/ml e 7 mg/ml respectivamente, e ExtTa 2 apresentou 139 mg/ml e 10,2 mg/ml respectivamente;
- No fracionamento das duas preparações de extratos etanólicos por FPLC, foram identificadas 39 e 40 frações (ExtTa1 e ExtTa2, respectivamente), cujos conteúdos proteicos variaram entre 12,700 - 0,004 mg/ml e de carboidratos entre 3,21- 0,02 mg/ml;
- O fracionamento eletroforético em SDS PAGE e o emprego das colorações de prata e Schiff das frações indicou que a maior parte das proteínas presentes nas frações apresentam massa molecular entre 30 e 3,5 kDa e que as moléculas mais abundantes são de glicoproteínas de massas moleculares estimadas em 17, 12 e 3,5 kDa;
- O extrato etanólico do fungo *T. asperelloides* apresentou citotoxicidade para as linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231, MCF7 e murino 4T1 bem como para as células de fibroblasto humano GM637;
- O índice de seletividade da fração 5.2 para a célula MDA-MB-231 de tumor de mama humano, em comparação com o fibroblasto não tumorigênico GM5637 foi estimado em aproximadamente 1,92;
- O extrato etanólico de *T. asperelloides* parece não alterar os níveis de estresse oxidativo nas células MDA-MB-231 e GM637, avaliados pela produção ROS;
- Foi observado um aumento da formação de vácuolos autofágicos nas células MDA-MB-231 e GM637 e também uma alteração no ciclo celular de MDA-MB-231, possivelmente através de uma parada em G0-G1 e redução de células em S, em resposta ao tratamento com o extrato etanólico de *T. asperelloides*.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados aqui apresentados indicam, de forma promissora, a existência de uma ação citotóxica relacionada ao extrato etanólico bruto de *T. asperelloides* e algumas de suas frações em células derivadas de tumor de mama e fibroblasto humano. Abrindo, por esta razão, perspectivas de estudos relevantes, buscando aumentar a acurácia da avaliação do IS; identificar e isolar o(s) princípio(s) ativo(s) responsável (ies) pela ação citotóxica contra células tumorais; identificar novos tipos tumorais susceptíveis; caracterizar os mecanismos da

citotoxicidade e as vias de sinalização envolvidas nos efeitos biológicos observados bem como avaliar o potencial antitumoral *in vivo*.

Neste sentido, as novas abordagens experimentais que propomos são:

- 1- Isolamento e identificação dos princípios ativos, através da avaliação por espectrometria de massas. Nesse sentido, amostras das frações 4.1,4.2,5.1,5.2,6.1,6.2,7.1,7.2 e 12.2 foram inicialmente separadas para serem avaliadas por um grupo de colaboradores na UESC, e aguardamos os resultados. Também será realizado o recorte das bandas de interesse visualizadas por SDS-Page com o objetivo de obter uma identificação mais acurada das proteínas presentes nessas bandas.

- 2- Sondagem de outros tipos tumorais susceptíveis à ação citotóxica. Utilizando a técnica de MTT, utilizada neste estudo, será realizado um *screening* para avaliação do efeito do extrato e frações de *T. asperelloides* em linhagens tumorais previamente selecionadas do banco de células do LGEX. Entre as células avaliadas, encontram-se as linhagens derivadas de linfócito leucêmico Jukart, de adenocarcinoma de colon (HeLa, HCT116), de melanoma (SK-MEL-37, SK-MEL-188), monócito leucêmico (THP-1). Atualmente já se encontra disponível um aluno de Iniciação Científica do laboratório para a realização desses ensaios.

- 3- Avaliação do IS do extrato e da fração 5.2 será realizada comparando o IC50 das linhagens tumorais selecionadas com o IC50 de células de sangue periférico ou linhagem de mama MCF10 ou culturas primárias, através do ensaio de MTT.

A continuidade dos estudos se faz necessária para melhor compreensão dos mecanismos de ação do extrato e para identificação do(s) princípio(s) ativo(s) que desencadeiam os efeitos citotóxicos. Desta forma, faz-se necessário avaliar a citotoxicidade do extrato bruto e da fração 5.2 utilizando uma linhagem de cultura primária afim de obter resultados que podem melhor representar o que de fato ocorre *in vivo*, sendo preferencial o uso da linhagem PBMC devido a facilidade de sua coleta, uma vez que obtivermos a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP).

- 4- Avaliação de possíveis efeitos teratogênicos do extrato e suas frações

A avaliação da citotoxicidade do extrato e frações *in vivo* e da existência de possíveis efeitos teratogênicos será feita em colaboração com o Prof Luis Davi Solis Murgas na Universidade Federal de Lavras (UFLA). O protocolo já foi submetido ao comitê de ética da UFMG, e aguarda-se o julgamento para que os ensaios sejam realizados. Para isso, pretende-se realizar um novo estudo, através da obtenção de embriões de *zebrafish* e seu plaqueamento, seguido de tratamento com extrato de *T. asperelloides* e fração 5.2, afim de observar a viabilidade de tais embriões e se ocorrerão diferenças morfológicas durante o desenvolvimento, quando comparado com embriões sem tratamento, nos intervalos de 6, 12 e 18h serão coletados embriões para serem fotografados utilizando câmera fotográfica digital e um estereomicroscópio.

5- Avaliação da atividade antitumoral do extrato etanólico de *T. asperelloides* e fração 5.1 *in vivo*

Tumores de mama serão experimentalmente induzidos em fêmeas de camundongos C57BL/6 pela injeção de células tumorais de mama murina da linhagem 4T1, que já demonstramos serem sensíveis ao tratamento com o extrato. Estas células apresentam várias características em comum com o subtipo de tumor Triplo Negativo (mesmo subtipo da linhagem MDA-MB-231), para avaliar o efeito do tratamento com o extrato e frações no crescimento do tumor *in vivo*.

6- Identificação do mecanismo relacionado à citotoxicidade do extrato, tendo como enfoque a via de sinalização PIK3/AKT/MTOR que talvez possa ter uma relação com os resultados observados.

6.1- Análise de todas as imagens de MET das linhagens MDA-MB-231 e GM637, em resposta ao tratamento com extrato de *T. asperelloides*, em colaboração com Danielle dos Anjos avaliando o volume e quantidade de vacúolos formados em relação ao volume total celular.

6.2- Avaliação da expressão de marcadores como mTOR, marcadores de autofagia (LC3, ATG5), angiogênese (VEGF) e ciclo celular (CCND1 e MYC) por western blot e RT-PCR em tempo real.

6.3- Confirmação da ação via autofagia e cell cycle arrest pelo uso de inibidores tais como o P7056K.

9. REFERÊNCIAS

A.C.S. **The history of cancer**. CANCER?, W. I.: American Cancer Society 2014.

ABD EL-RAHMAN, A. A. et al. Cytotoxicity of Trichoderma spp. cultural filtrate against human cervical and breast cancer cell lines. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 17, p. 7229-34, 2014. ISSN 1513-7368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25227819> >.

ABD EL-REHIM, D. M. et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. **Int J Cancer**, v. 116, n. 3, p. 340-50, Sep 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15818618> >.

ALBERTS et al. **Molecular Biology of the Cell. An Overview of the Cell Cycle.** Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/> 2002.

ALBERTS MW, W. R., BROWN EJ, ET AL. KBP-Rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. 1993. Disponível em: < https://www.broadinstitute.org/chembio/lab_schreiber/pubs/pdffiles/156.pdf >.

ALMEIDA, V. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. LEITÃO, A.;REINA, L. C., et al. Química Nova. 28: 118-129 p. 2005.

ATANASOVA, L. et al. Comparative transcriptomics reveals different strategies of Trichoderma mycoparasitism. **BMC Genomics**, v. 14, p. 121, Feb 2013. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432824> >.

BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Res**, v. 29, n. 8, p. 2993-6, Aug 2009. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661306> >.

BAILAR, J. C.; GORNIK, H. L. Cancer undefeated. **N Engl J Med**, v. 336, n. 22, p. 1569-74, May 1997. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164814> >.

BALDUCCI, L. Epidemiology of cancer and aging. **J Oncol Manag**, v. 14, n. 2, p. 47-50, 2005. ISSN 1061-9364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16018199> >.

BASELGA, J. et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. **N Engl J Med**, v. 366, n. 6, p. 520-9, Feb 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149876> >.

BAUDINO, T. A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. **Curr Drug Discov Technol**, v. 12, n. 1, p. 3-20, 2015. ISSN 1875-6220. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26033233> >.

BENZ, C. C. et al. Understanding the age dependency of breast cancer biomarkers. **Adv Gerontol**, v. 11, p. 117-20, 2003. ISSN 1561-9125. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820531> >.

BERRY, D. A. et al. Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, n. 3, p. 227-38, Feb 1997. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9017003> >.

BHANOT, A.; SHARMA, R.; NOOLVI, M. N. **Natural sources as potential anti-cancer agents: A review**: International Journal of Phytomedicine. 3: 09-26 p. 2011.

BIANCHINI, G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 13, n. 11, p. 674-690, Nov 2016. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184417> >.

_____. Molecular anatomy of breast cancer stroma and its prognostic value in estrogen receptor-positive and -negative cancers. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 28, p. 4316-23, Oct 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805453> >.

BLOWS, F. M. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Med**, v. 7, n. 5, p. e1000279, May 2010. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20520800> >.

BRENTON, J. D. et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **J Clin Oncol**, v. 23, n. 29, p. 7350-60, Oct 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16145060> >.

BROTMAN, Y. et al. Trichoderma-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 3, p. e1003221, Mar 2013. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516362> >.

BURKE, W. et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. Cancer Genetics Studies Consortium. **JAMA**, v. 277, n. 12, p. 997-1003, Mar 1997. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9091675> >.

CHAGAS, L. et al. **Evaluation of the phosphate solubilization potencial of *Trichoderma* strain (Trichoplus JCO) and effects on rice biomass**: Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 15: 794-804 p. 2015.

CHANDARLAPATY, S. et al. Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial. **JAMA Oncol**, v. 2, n. 10, p. 1310-1315, Oct 2016. ISSN 2374-2445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27532364> >.

CHAPARRO, A. P.; HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. **Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T.***

***harzianum* strains.** The Dynamical Processes of Biodiversity – Case Studies of Evolution and Spatial Distribution. GRILLO, O. e VENORA, G.: *Intech*: 303-320 p. 2011.

CHAVEZ, K. J.; GARIMELLA, S. V.; LIPKOWITZ, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast Dis**, v. 32, n. 1-2, p. 35-48, 2010. ISSN 1558-1551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778573> >.

CHEANG, M. C. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 10, p. 736-50, May 2009. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436038> >.

CORONA, S. P. et al. Advances in systemic therapy for metastatic breast cancer: future perspectives. **Med Oncol**, v. 34, n. 7, p. 119, Jul 2017. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28526922> >.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 72-9, Aug 2005. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009521> >.

CRISTOFANILLI, M. et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. **Lancet Oncol**, v. 17, n. 4, p. 425-39, Apr 2016. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26947331> >.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **Am J Cancer Res**, v. 5, n. 10, p. 2929-43, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26693050> >.

DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nat Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, Jul 2012. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847109> >.

DE CARVALHO, A. C. **Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromaticum* para controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro**. Dissertação, Mestrado em Genética e Biologia Molecular: Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus 2006.

DELANEY, G. et al. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. **Cancer**, v. 104, n. 6, p. 1129-37, Sep 2005. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080176> >.

DENTON, D.; NICOLSON, S.; KUMAR, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 87-95, Jan 2012. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052193> >.

DESMEDT, C.; SOTIRIOU, C.; PICCART-GEBHART, M. J. Development and validation of gene expression profile signatures in early-stage breast cancer. **Cancer Invest**, v. 27, n. 1, p. 1-10, Jan 2009. ISSN 1532-4192. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19191098> >.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. **Preservação de fungos em água destilada**. Anais Brasileiros de Dermatologia. 80: 591-594 p. 2005.

DOLEY, K. et al. **EFFECTS OF GLOMUS FASCICULATUM AND TRICHODERMA ASPERELLOIDES IN**

ROOTS OF GROUNDNUT (CV. WESTERN-51) AGAINST PATHOGEN SCLEROTIUM ROLFSII: International Journal of Phytopathology. 3 2014.

DONJERKOVIC, D.; SCOTT, D. W. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. **Cell Res**, v. 10, n. 1, p. 1-16, Mar 2000. ISSN 1001-0602. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10765979> >.

DURAI PANDIYAN, V.; AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complement Altern Med**, v. 6, p. 35, 2006. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17042964> >.

ELGENDY, M. et al. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. **Mol Cell**, v. 42, n. 1, p. 23-35, Apr 2011. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353614> >.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 8, p. 606-19, Aug 2006. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847462> >.

ESPOSITO, E.; DA SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus Trichoderma. **Crit Rev Microbiol**, v. 24, n. 2, p. 89-98, 1998. ISSN 1040-841X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675511> >.

ESTEVA, F. J.; HORTOBAGYI, G. N. Prognostic molecular markers in early breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 6, n. 3, p. 109-18, 2004. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084231> >.

EVIDENTE, A. et al. Fungal metabolites with anticancer activity. **Nat Prod Rep**, v. 31, n. 5, p. 617-27, May 2014. ISSN 1460-4752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24651312> >.

FARKONA, S.; DIAMANDIS, E. P.; BLASUTIG, I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? **BMC Med**, v. 14, p. 73, May 2016. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27151159> >.

FARNSWORTH, N. R. Ethnopharmacology and drug development. **Ciba Found Symp**, v. 185, p. 42-51; discussion 51-9, 1994. ISSN 0300-5208. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7736861> >.

FIGUERAS, J. et al. Surgical resection of colorectal liver metastases in patients with expanded indications: a single-center experience with 501 patients. **Dis Colon Rectum**, v. 50, n. 4, p. 478-88, Apr 2007. ISSN 0012-3706. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17279302> >.

FISCHER, T. et al. Clathrin-coated vesicles bearing GAIIP possess GTPase-activating protein activity in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 12, p. 6722-7, Jun 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359779> >.

FREEMAN, G. J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med**, v. 192, n. 7, p. 1027-34, Oct 2000. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015443> >.

FU, X.; OSBORNE, C. K.; SCHIFF, R. Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/HER2-negative breast cancer. **Breast**, v. 22 Suppl 2, p. S12-8, Aug 2013. ISSN 1532-3080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011769> >.

FUKUZAWA, M. et al. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *Ganoderma lucidum* (Reishi Houshi) to its anti-tumor activity. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 10, p. 1933-7, Oct 2008. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827358> >.

GALLUCCI, B. B. Selected concepts of cancer as a disease: from 1900 to oncogenes. **Oncol Nurs Forum**, v. 12, n. 5, p. 69-78, 1985 Sep-Oct 1985. ISSN 0190-535X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3898032> >.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 107-20, Jan 2012. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760595> >.

GENERALI, D. et al. Down-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT/molecular target of rapamycin metabolic pathway by primary letrozole-based therapy in human breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 9, p. 2673-80, May 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451231> >.

GERGER, A. et al. A multigenic approach to predict breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat**, v. 104, n. 2, p. 159-64, Aug 2007. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17058024> >.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**, v. 221, n. 1, p. 3-12, May 2010. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225336> >.

GREEN, D. R.; VICTOR, B. The pantheon of the fallen: why are there so many forms of cell death? **Trends Cell Biol**, v. 22, n. 11, p. 555-6, Nov 2012. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995729> >.

GUARNERI, V.; CONTE, P. F. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 31 Suppl 1, p. S149-61, Jun 2004. ISSN 1619-7070. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15107948> >.

GUPTA, K. J.; MUR, L. A.; BROTMAN, Y. *Trichoderma asperelloides* suppresses nitric oxide generation elicited by *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis* roots. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 27, n. 4, p. 307-14, Apr 2014. ISSN 0894-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283937> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HARRIS, J. et al. **The effect of immunosuppressive chemotherapy on immune function in patients with malignant disease**: *Cancer*. 37: 1058-1069 p. 1976.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 629-34, Nov 1989. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2683079> >.

HASSAN, M. S. et al. Chemotherapy for breast cancer (Review). **Oncol Rep**, v. 24, n. 5, p. 1121-31, Nov 2010. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20878101> >.

HENSON, E. S.; HU, X.; GIBSON, S. B. Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 3 Pt 1, p. 845-53, Feb 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467098> >.

HOYOS-CARVAJAL, L.; BISSETT, J. **Diversity of *Trichoderma* in Neotropics**. The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution: InTech 2011.

HU, Z. et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics**, v. 7, p. 96, Apr 2006. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16643655> >.

HUANG, X. et al. Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors. **J Clin Neurosci**, v. 17, n. 12, p. 1515-9, Dec 2010. ISSN 1532-2653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863706> >.

IARC. World Cancer Report 2014. http://www.who.int/cancer/publications/WRC_2014/en/, 2014. Disponível em: < http://www.who.int/cancer/publications/WRC_2014/en/ >.

INCA. O que é o câncer? , http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322, 2014. Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 >.

INGVARSSON, S. FHIT alterations in breast cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 11, n. 5, p. 361-6, Oct 2001. ISSN 1044-579X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562178> >.

IQBAL, J. et al. Genomic analyses reveal global functional alterations that promote tumor growth and novel tumor suppressor genes in natural killer-cell malignancies. **Leukemia**, v. 23, n. 6, p. 1139-51, Jun 2009. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194464> >.

ISSA-NUMMER, Y. et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer--a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e79775, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312450> >.

IWAMOTO, T.; PUSZTAI, L. Predicting prognosis of breast cancer with gene signatures: are we lost in a sea of data? **Genome Med**, v. 2, n. 11, p. 81, Nov 2010. ISSN 1756-994X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21092148> >.

J, F. et al. Cancer Incidence in Five Continents. IARC CancerBase No. 9, 2014. Disponível em: < <http://ci5.iarc.fr> >. Acesso em: 04/07/2017.

JAKLITSCH, W. M. European species of Hypocrea Part I. The green-spored species. **Stud Mycol**, v. 63, p. 1-91, 2009. ISSN 0166-0616. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19826500> >.

JIN, C. Y.; KIM, G. Y.; CHOI, Y. H. Induction of apoptosis by aqueous extract of Cordyceps militaris through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 Cells. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 12, p. 1997-2003, Dec 2008. ISSN 1017-7825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131705> >.

JING, K. et al. Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53. **Autophagy**, v. 7, n. 11, p. 1348-58, Nov 2011. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811093> >.

KAISER, M. et al. Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135556, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26270335> >.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 4, p. 772-80, Apr 2013. ISSN 1537-1719. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329690> >.

KERBEL, R. S.; KAMEN, B. A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 6, p. 423-36, Jun 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170445> >.

KLIONSKY, D. J. Cell biology: regulated self-cannibalism. **Nature**, v. 431, n. 7004, p. 31-2, Sep 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15343317> >.

_____. Autophagy: research topic, painting, poem, dance...: The combination of art and information can enhance the enjoyment and effectiveness of learning. **EMBO Rep**, v. 16, n. 5, p. 547-52, May 2015. ISSN 1469-3178. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838538> >.

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1717-21, Dec 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099404> >.

KUSAKABE, H. et al. A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. **J Biol Chem**, v. 255, n. 3, p. 976-81, Feb 1980. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6101334> >.

LEE, Y. et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. **Blood**, v. 114, n. 3, p. 589-95, Jul 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349616> >.

LHEUREUX, S. et al. Molecularly targeted therapies in cancer: a guide for the nuclear medicine physician. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, Apr 2017. ISSN 1619-7089. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28396911> >.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H.; JÜLICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, n. 3, p. 285-99, Sep 2005. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16136207> >.

LOI, S. et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 7, p. 860-7, Mar 2013. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341518> >.

LOISEAU, P. M. et al. In vitro activities of new 2-substituted quinolines against *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 4, p. 1777-80, Apr 2011. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220526> >.

LOPES, D.; SANTOS, J. os efeitos do extrato do fungo *Trichoderma asperelloides* no controle de protozoários da espécie *Leishmania amazonensis*. os efeitos do extrato do fungo *Trichoderma asperelloides* no controle de protozoários da espécie *Leishmania amazonensis*.: A. 2: 301-307 p. 2017.

LUGADE, A. A. et al. Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. **J Immunol**, v. 174, n. 12, p. 7516-23, Jun 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944250> >.

LUKASHEVA, E. V.; BEREZOV, T. T. L-Lysine alpha-oxidase: physicochemical and biological properties. **Biochemistry (Mosc)**, v. 67, n. 10, p. 1152-8, Oct 2002. ISSN 0006-2979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460113> >.

LYNCH, H. T. et al. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. **Breast J**, v. 14, n. 1, p. 3-13, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 1524-4741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18086272> >.

LÓPEZ-LÁZARO, M. A simple and reliable approach for assessing anticancer activity in vitro. **Curr Med Chem**, v. 22, n. 11, p. 1324-34, 2015. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25666807> >.

LØNNING, P. E. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? **Ann Oncol**, v. 18 Suppl 8, p. viii3-7, Sep 2007. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890212> >.

MABUCHI, S. et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 137, n. 1, p. 173-9, Apr 2015. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677064> >.

MASAMHA, C. P.; BENBROOK, D. M. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin E2 in ovarian cancer cells. **Cancer Res**, v. 69, n. 16, p. 6565-72, Aug 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19638577> >.

MASSARI, L. P.; KASTELAN, M.; GRUBER, F. Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. **Coll Antropol**, v. 31 Suppl 1, p. 83-5, Jan 2007. ISSN 0350-6134. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17469758> >.

MATHEW, R. et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1062-75, Jun 2009. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524509> >.

MELO, I. S. **Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas**. Controle biológico de doenças de plantas (BETTIO, W.): EMBRAPA-CNPDA - Jaguariúna. 9: 388 p. 1991.

MIKI, Y. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 66-71, Oct 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545954> >.

MILLER, T. W. et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. **J Clin Invest**, v. 120, n. 7, p. 2406-13, Jul 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530877> >.

MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 12, p. 2491-502, Dec 2004. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325587> >.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. Methods in mammalian autophagy research. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 313-26, Feb 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144757> >.

MONTOYA, Q. V. et al. **Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa.**: Antonie van Leeuwenhoek, : 351-356 p. 2016.

MUELLER, C. M. et al. Complementary and alternative medicine use among women at increased genetic risk of breast and ovarian cancer. **BMC Complement Altern Med**, v. 8, p. 17, 2008. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18447953> >.

MUSA, M. A. et al. In vitro cytotoxicity of benzopyranone derivatives with basic side chain against human lung cell lines. **Anticancer Res**, v. 30, n. 11, p. 4613-7, Nov 2010. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115914> >.

NAKATOGAWA, H. et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 7, p. 458-67, Jul 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19491929> >.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-9, Jun 1991. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710634> >.

NIESSEN, W. M.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrom Rev**, v. 25, n. 6, p. 881-99,

2006 Nov-Dec 2006. ISSN 0277-7037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16783795> >.

O'BRIEN, K. M. et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 24, p. 6100-10, Dec 2010. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169259> >.

OHLSSON, B.; STENRAM, U.; TRANBERG, K. G. Resection of colorectal liver metastases: 25-year experience. **World J Surg**, v. 22, n. 3, p. 268-76; discussion 276-7, Mar 1998. ISSN 0364-2313. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9494419> >.

PARATO, K. A. et al. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 12, p. 965-76, Dec 2005. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16294217> >.

PARSA, Y. et al. A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology. **Electron Physician**, v. 8, n. 5, p. 2416-24, May 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27382453> >.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602> >.

PICCART, M. et al. Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2†. **Ann Oncol**, v. 25, n. 12, p. 2357-62, Dec 2014. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25231953> >.

PIETENPOL, J. A.; STEWART, Z. A. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, v. 181-182, p. 475-81, Dec 2002. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505356> >.

PISTOLLATO, F. **The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment.** GIAMPIERI, F. e BATTINO, M. Food and Chemical Toxicology. 75: 58-70 p. 2015.

POKROVSKY, V. S. et al. Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D. **Anticancer Drugs**, v. 24, n. 8, p. 846-51, Sep 2013. ISSN 1473-5741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23777857> >.

POLIVKA, J.; JANKU, F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Pharmacol Ther**, v. 142, n. 2, p. 164-75, May 2014. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24333502> >.

PRAKASH, O. et al. **Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review:** American Journal of Pharmacological Sciences,. 1: 104-115 p. 2013.

PROZIALECK, W. C. et al. Chlamydia trachomatis disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequesters beta-catenin in human cervical epithelial cells. **Infect Immun**, v. 70, n. 5, p. 2605-13, May 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953402> >.

PUSZTAI, L. et al. New Strategies in Breast Cancer: Immunotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 22, n. 9, p. 2105-10, May 2016. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26867935> >.

QU, X. et al. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. **Cell**, v. 128, n. 5, p. 931-46, Mar 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350577> >.

RAGHAVAN, S. et al. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. **Oncotarget**, v. 7, n. 13, p. 16948-61, Mar 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918944> >.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol Ther**, v. 99, n. 1, p. 1-13, Jul 2003. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12804695> >.

REZAEI, P. F. et al. Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1 down-regulation in response to pericarp extract of Baneh in human breast cancer T47D cells. **Daru**, v. 20, n. 1, p. 101, Dec 2012. ISSN 1560-8115. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23351343> >.

RIBBLE, D. et al. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnol**, v. 5, p. 12, May 2005. ISSN 1472-6750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885144> >.

ROBINSON, D. R. et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. **Nat Genet**, v. 45, n. 12, p. 1446-51, Dec 2013. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24185510> >.

ROCHA, M. N. et al. Cytotoxicity and In Vitro Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol. **Bioinorg Chem Appl**, v. 2013, p. 961783, 2013. ISSN 1565-3633. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23781165> >.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Syst Biol**, v. 61, n. 3, p. 539-42, May 2012. ISSN 1076-836X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357727> >.

RUBINSZTEIN, D. C. et al. Potential therapeutic applications of autophagy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 4, p. 304-12, Apr 2007. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396135> >.

SAMUELS, G. J. **Trichoderma, a review of biology and sistematics of the genus.**: Mycological Research. 100: 923-35 p. 1996.

SAMUELS, G. J. et al. Trichoderma asperellum sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 944-66, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 0027-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20648760> >.

SCHMIDT, M. et al. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. **Cancer Res**, v. 68, n. 13, p. 5405-13, Jul 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593943> >.

SHAO, W.; BROWN, M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. **Breast Cancer Res**, v. 6, n. 1, p. 39-52, 2004. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14680484> >.

SHARABI, A. B. et al. Stereotactic radiation therapy combined with immunotherapy: augmenting the role of radiation in local and systemic treatment. **Oncology (Williston Park)**, v. 29, n. 5, p. 331-40, May 2015. ISSN 0890-9091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979541> >.

SHIMIZU, S. et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 12, p. 1221-8, Dec 2004. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558033> >.

_____. Autophagic cell death and cancer. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 2, p. 3145-53, Feb 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24566140> >.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998> >.

SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 5, p. 372-7, Oct 2008. ISSN 1096-3650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472276> >.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-expression signatures in breast cancer. **N Engl J Med**, v. 360, n. 8, p. 790-800, Feb 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228622> >.

SPITALE, A. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. **Ann Oncol**, v. 20, n. 4, p. 628-35, Apr 2009. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074747> >.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, Sep 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553815> >.

TANAKA, T. Chemical-induced carcinogenesis. v. 5, p. 203-209, 2013.

TANG, P.; WANG, J.; BOURNE, P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same? **Hum Pathol**, v. 39, n. 4, p. 506-13, Apr 2008. ISSN 0046-8177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18289638> >.

THOMÉ, M. P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **J Cell Sci**, v. 129, n. 24, p. 4622-4632, Dec 2016. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27875278> >.

TOLCHER, A. W. Antibody drug conjugates: lessons from 20 years of clinical experience. **Ann Oncol**, v. 27, n. 12, p. 2168-2172, Dec 2016. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27733376> >.

TOMASETTI, C.; LI, L.; VOGELSTEIN, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330-1334, Mar 2017. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28336671> >.

URRUTICOECHEA, A. et al. Recent advances in cancer therapy: an overview. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 1, p. 3-10, Jan 2010. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214614> >.

VALLEJOS, C. S. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. **Clin Breast Cancer**, v. 10, n. 4, p. 294-300, Aug 2010. ISSN 1938-0666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705562> >.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 4, p. 237-51, Mar 2012. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437869> >.

VEGLIA, F. et al. Occupational exposures, environmental tobacco smoke, and lung cancer. **Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 769-75, Nov 2007. ISSN 1044-3983. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18062064> >.

VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World J Clin Oncol**, v. 2, n. 2, p. 115-9, Feb 2011. ISSN 2218-4333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603320> >.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 3, p. 258-74, Nov 2002. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12436306> >.

_____. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. **Biomed J**, v. 37, n. 6, p. 345-56, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 2320-2890. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25179726> >.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Crit Rev Immunol**, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999. ISSN 1040-8401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987601> >.

WATANABE, S. et al. **Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum***: Journal General Plant Pathology. 71: 351-356 p. 2005.

WEICHSELBAUM, R. R. et al. Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison? **Nat Rev Clin Oncol**, v. 14, n. 6, p. 365-379, Jun 2017. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28094262> >.

WELLING, G. W.; WELLING-WESTER. **S.Size-exclusion HPLC proteins**. Oliver, R.W.A. HPLC of macromolecules: a practical approach: Ed. Oxford, Inglaterra: 77-89 p. 1989.

WEST, N. R. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 6, p. R126, 2011. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22151962> >.

WIMBERLY, H. et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. **Cancer Immunol Res**, v. 3, n. 4, p. 326-32, Apr 2015. ISSN 2326-6074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25527356> >.

WOOSTER, R. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2088-90, Sep 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8091231> >.

WOOSTER, R.; WEBER, B. L. Breast and ovarian cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 23, p. 2339-47, Jun 2003. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788999> >.

WU, W. C. et al. The apoptotic effect of cordycepin on human OEC-M1 oral cancer cell line. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 60, n. 1, p. 103-11, Jun 2007. ISSN 0344-5704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17031645> >.

XIA, H. et al. Porous ceramic/agarose composite adsorbents for fast protein liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1223, p. 126-30, Feb 2012. ISSN 1873-3778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226554> >.

XIE, Z.; NAIR, U.; KLIONSKY, D. J. Dissecting autophagosome formation: the missing pieces. **Autophagy**, v. 4, n. 7, p. 920-2, Oct 2008. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719358> >.

YONEKAWA, T.; THORBURN, A. Autophagy and cell death. **Essays Biochem**, v. 55, p. 105-17, 2013. ISSN 1744-1358. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24070475> >.

YU, L. et al. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 13, p. 4952-7, Mar 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547133> >.

ZHANG, B. et al. Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. **J Exp Med**, v. 204, n. 1, p. 49-55, Jan 2007. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210731> >.

ZHANG, M. et al. Dietary intakes of mushrooms and green tea combine to reduce the risk of breast cancer in Chinese women. **Int J Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1404-8, Mar 2009. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19048616> >.