

REBEKA TOMASIN

**" ESTUDO DA EVOLUÇÃO TUMORAL, CAQUEXIA E
METÁSTASE EM DIFERENTES MODELOS
ANIMAIS *in vivo* e *in vitro*"**

**"TUMOUR GROWTH, CACHEXIA AND
METASTASIS *in vivo* and *in vitro*"**

Campinas, 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

REBEKA TOMASIN

**"Estudo da evolução tumoral, caquexia e metástase em
diferentes modelos animais *in vivo* e *in vitro*"**

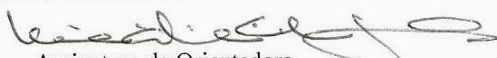
Orientadora: Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

"Tumour growth, cachexia and metastasis *in vivo* and *in vitro*"

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Doctorate thesis presented to the State University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Cellular and Structural Biology, Postgraduate Program in Cellular and Structural Biology, in the Biology Institute, in the area of Cellular Biology.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna **Rebeka Tomasin** e orientada pela Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.



Assinatura da Orientadora

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
 Universidade Estadual de Campinas
 Biblioteca do Instituto de Biologia
 Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

T591e Tomasin, Rebeka, 1985-
 Estudo da evolução tumoral, caquexia e metástase em diferentes modelos animais *in vivo* e *in vitro* / Rebeka Tomasin. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Mamas - Câncer. 2. Carcinoma 256 de Walker. 3. RNA interferente pequeno. 4. *Aloe vera*. 5. Mel. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Tumour growth, cachexia and metastasis *in vivo* and *in vitro*

Palavras-chave em inglês:

Breast - Cancer

Carcinoma 256, Walker

RNA, Small Interfering

Aloe vera

Honey

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador]

Márcia Regina Cominetti

Estela Maria Gonçalves

Clelia Akiko Hiruma Lima

Miguel Arcando Areas

Data de defesa: 29-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 29 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

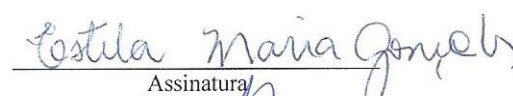
Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes (Orientadora)


Assinatura

Dra. Márcia Regina Cominetti


Assinatura

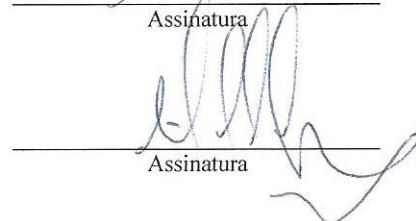
Dra. Estela Maria Gonçalves


Assinatura

Dra. Clelia Akiko Hiruma Lima


Assinatura

Dr. Miguel Arcanjo Areas


Assinatura

Dra. Patricia da Silva Melo

Assinatura

Dra. Emilianne Miguel Salomão

Assinatura

Dra. Dora Maria Grassi Kassisse

Assinatura

Meus mais profundos agradecimentos...

Primeiramente, à minha extraordinária família, que me compreende, batalha e está sempre comigo. Aos meus pais Geraldo e Ana, que sempre trabalharam muito para que nós pudéssemos estudar. Bem, aqui estou eu, com o apoio de vocês, estudando há mais de vinte anos, acabando o doutorado. Ao Samuel, que é um irmão muito melhor do que eu poderia sonhar, meu cúmplice desde a infância, que pensa mais em nós do que nele mesmo. À minha irmã Fabíola, tão inteligente, independente e que me deixa tão orgulhosa. Ao meu tio Dimas, que é o anjo da guarda da nossa família. Aos meus primos, Raíssa, Mariah, Mariana, Felipe e Paulinho, com quem eu me divirto tanto... Vocês são parte de tudo que eu sou, de que eu amo e no que eu acredito. Todos os dias quando eu deito a cabeça no travesseiro eu me pergunto o que eu fiz para merecer a vida maravilhosa que tenho com vocês ao meu lado como minha família. Como eu não acho a resposta, eu apenas agradeço e tento cada dia ser uma filha, irmã, sobrinha, prima, melhor.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural;

Às agencias financiadoras que tornaram possível a execução deste trabalho: Capes, CNPq, e, sobretudo à FAPESP, por ter concedido a mim tanto a Bolsa Regular no Brasil quanto a Bolsa de Estágio Pesquisa no Exterior;

À profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes, que é muito mais do que uma orientadora: é minha mãe laboratorial. Obrigada por ser psicóloga, conselheira, revisora de paper, dicionário, referi de projeto, biblioteca, enciclopédia, etc... Obrigada por me valorizar e elogiar tanto (mãe mesmo, eu falo...) e por acreditar no meu talento e potencial quando muitas vezes eu mesma os ponho em cheque. Obrigada ainda por ser uma boa professora, uma boa pesquisadora, uma boa mãe, uma boa pessoa. Eu sempre digo que tenho muita sorte com as pessoas que compõe a minha história, está aqui a senhora para comprovar isso mais uma vez;

À Dra. Robin Anderson, que ao receber sem restrições essa desconhecida em seu laboratório e grupo de pesquisa na Austrália, proporcionou a melhor coisa que aconteceu em minha vida acadêmica;

Ao Dr. Richard Redvers, meu supervisor no exterior. Não tenho dúvidas de que o meu caminho passava pela Austrália, por Melbourne, pelo Peter Mac, por você. Como eu

adorava ser sua primeira e única aluna na época (tudo MEU!), as longas conversas técnicas não planejadas na sua sala, as horas de cirurgia que passávamos na “animal house”... Ai que saudade!!! Obrigada pela paciência (mesmo quando meu inglês me matava rs), obrigada pelo respeito e pela confiança, obrigada pelo seu jeitinho de dizer as coisas – que outro orientador diria a uma aluna megalomaniaca “Eu sei que você vai sobreviver, mas eu não quero que você sofra”??? Nada do que eu escreva aqui fará jus ao supervisor que você foi para mim. Me esforcei a cada dia para ser o tipo de aluno e de ser humano que você merece ao seu lado... E foi assim que, nós que antes éramos apenas nomes um para o outro, um ano depois, nos tornamos tudo que poderíamos desejar numa equipe de trabalho. Engraçado como eu tive de atravessar oceanos e continentes, ir para o outro lado do mundo, para encontrar meu pai laboratorial. Juntos vocês dois, Rick e Cristina, me fizeram nascer e me moldaram como cientista;

À Dra. Kaylene Simpson, nossa “guru” da tecnologia de screens de alta complexidade!

À Ana Carolina Baptista Moreno Martin, a Carol! Poderíamos ter estudado na mesma faculdade, no mesmo curso, na mesma sala... Mas não aconteceu assim: o “destino” fez com que nossos caminhos se cruzassem por “acaso” do outro lado do mundo – literalmente. E foi assim que eu recebi mais um dos grandes presentes que a Austrália trouxe: conheci, trabalhei e morei com uma das minhas “almas gêmeas profissionais”! Obrigada Carol por compartilhar comigo do mesmo tipo de paixão e entusiasmo pela ciência, estudo, laboratórios, nuvens de DNA, câmaras escuras, tanques gigantes de nitrogênio líquido, supermercados de reagentes, repipetadores, “wound clippers” hahaha... Obrigada pela ajuda braçal e mental, pelo karaokê na sala de cultura (e fora dela), por assistir todo e qualquer reality show onde eu ria e você chorava, pelas horinhas encafofadas, pelos emocionantes passeios, ao supermercado que fosse! O estágio acabou, mas nossa amizade transcendeu o tempo e atravessou continentes – e que continue assim =)

Aos meus adoráveis colegas de trabalho no Metastasis lab: Agi (nossa polonesa favorita), Ryan (nosso “ogrinho”), Tonje (a norueguesa mais legal e mais animada ever!), Fabian (o nosso alemão com um “quê” de brasileiro), Judy (quero ser como você quando crescer!), Kathryn (um raio de luz e energia), Normand (sempre bom ter “Normstorm” por perto!), Gen (dedicada e criativa), Kara (apaixonadíssima pelo que faz), Allan (me buscou

no aeroporto!), Cameron (sabia TUDO!), Jess (um grande coração), Ashleigh (tão doce), Kelly (sensível e divertida), Lara (eita “kiwi” frenética!), Phoebe (conversas descompromissadas), Soo (coreana fofinha), Selda (leu minha sorte na borra do café!), Anannya (boas gargalhadas), Jay (sarrista no último)... Obrigada por toda a ajuda e por terem feito o “recheio” do meu doutorado sanduíche tão deliciosamente fantástico!!! As memórias destes dias estarão dobradinhas à salvo em uma gaveta, e sempre que eu precisar, elas estarão lá, perfeitas e intocáveis, meu “conto de fadas”... Não teria sido tão especial e rendido tanto sem vocês =)

Aos meus colegas no laboratório de Nutrição e Câncer IB/UNICAMP – Emilianne, Aline, Laís, Natália, Tati, Bread, André, João, Marcella, Rafael IC e Rafael técnico. Emi, obrigada pelo carinho, pelos incentivos e pelos conselhos (“Rebeka, que isso, você está com medo de ser feliz...”). Aline, obrigada de verdade pelas longas conversas onde dividimos nossas alegrias e aflições com uma compreensão muito acima da média – para onde quer que a vida nos leve eu sei que isso vai durar. Marcella, como eu já disse, eu tenho minhas dúvidas se a primeira parte da frase “As pessoas entram na nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas continuam” é verdade, mas você está aqui para provar que a segunda parte é verdadeira. Obrigada por ter reaparecido na minha vida e por saber separar tão bem o imutável, do mutável; os fatos, das pessoas; o triste, da alegria.

À profa. Dra. Heloísa Selistre e profa. Dra. Márcia Cominetti, da Ufscar, pela receptividade em seus laboratórios, pelos gostosos encontros informais, e pelas conversas sobre vida acadêmica.

Aos professores Dr. Marcos José Salvador e Dra. Alexandra Sawaya, assim como a doutoranda Aislan Fagundes, do Depto. De Fisiologia Vegetal/Unicamp, por me auxiliarem na extração e caracterização dos meus compostos.

Às pessoas legais do Depto, que de um modo ou de outro, me ajudaram: Luiz, Fernando, Priscila, Felipe, Eduardo, Elayne, Aline Arouca, Larissa, e profs. Dora, Miguel, Cristina Vicente e Parada.

Ao Cido, técnico da Anatomia Patológica/HC, por confeccionar minhas lâminas histológicas.

À profa. Dra. Maria Cláudia Fusaro de Oliveira e aos alunos do primeiro ano dos cursos de Nutrição e Ciência do Esporte/2012, por me proporcionarem mais uma experiência acadêmica.

Às pessoas que dividiram não apenas uma casa, mas a vida comigo nesses últimos quatro anos e meio: meus colegas de república – são vocês: Fernanda Bergamin, Marcela Dinelli, Pizani, Ana, Wagner, Jamal, Lara, Hugo, Iasmini, Débora, Xandele, Dú, Vicky, Alê, Tefa, Lucia, Mari, Marcela Campos, Ivan, Tropeço, Rafa... Como seria triste se após intermináveis horas no laboratório eu não voltasse para um movimentado e caloroso lar, onde sempre havia alguém com uma história para contar, ou com ânimo para me ouvir. Meninas obrigada (e Ivan desculpe) pelas noites assistindo “O vestido ideal”; Débora, você sempre será a rainha das pérolas da parede, e foi uma divertida aventura ser sua colega de quarto (também, com mais de quarenta “episódios” de gritos dormindo rs); Má e Pizani, que bom que eu tirei uma folga do meu ofício de “vela oficial” para que a Júlia e a Isabela, suas filhas gêmeas tão lindas, surgissem. Nossa, como eu me divirto com vocês!!! É difícil condensar meia década de cumplicidade e emoção, mas escreverei o que um dia ouvi, de um visitante, sobre a nossa casa: “Isso aqui? Se vocês colocassem uma câmera aqui... Isso é MUITO melhor do que o Big Brother... Todo mundo sabe da vida de todo mundo... Todo mundo dá palpite na vida de todo mundo... E vocês se entendem e se dão bem!!! Fazem isso por que querem e por que gostam!!! Na sala, ao mesmo tempo, tem gente comendo, dormindo, jogando, dançando, estudando, fazendo guerra de travesseiro... Eu nunca tinha visto uma coisa assim” – É, nem eu...

Aos meus amigos mais especiais: Luciana, Aline, Rodrigo, Fofinho, Erika, Lélia e Davi. Luciana e Aline, quantas pessoas podem dizer que tem amigos que vão para o outro lado do mundo atrás de você? EU posso! Lucy, obrigada por me mostrar um nível de amizade mais alto a cada dia, pela conversa e companhia para todas as horas e lugares, pela sua família que há tempos está no meu círculo de amizade, enfim, por ser a personificação da palavra “amigo” na minha vida. Aline, obrigada por ser esse raio de luz na vida de todos que te cercam, pelas sessões de cinema, maratonas, eventos envolvendo comida rs. Rods, obrigada por ser alguém em quem eu posso confiar, e por saber que você sempre dará um jeito de me socorrer e de estar lá quando eu precisar! Fofinho (meu amigo quaaase médico) e Érika (minha amiga mãezona): não é uma questão de frequência e quantidade, mas sim de

qualidade né? Nem que eu fique anos sem vê-los, como eu já fiquei, quando nos encontramos é sempre como quando éramos adolescentes e nos víamos todos os dias... Lélia e Davi: quem diria que um curso intensivo de 10 dias de Inglês me traria grandes amigos como vocês, e mais, que um ano e meio depois seríamos “vizinhos” na Austrália! De novo: todos vocês dizem que eu sou especial, mas o que me torna o que sou é a dádiva de ter vocês na minha jornada!!!

Aos meus amigos do tatame: em Limeira, na Unicamp, em Campinas, no Brasil e no mundo! Diego e equipe de Itu: voltar a competir foi a coisa mais importante que eu alcancei em 2010, ganhar medalhas então foi um brinde!

Aos animais de laboratório: ratos e camundongas. Sem eles nossas pesquisas e os avanços aos quais elas levam não seriam possíveis.

Finalmente, aos pacientes dos hospitais onde eu fui voluntária: o Centro Infantil Boldrini e o Peter MacCallum Cancer Centre, por manterem sempre viva a razão pela qual realizamos essas pesquisas.

Agradeço muito por todos esses anos em laboratórios fazendo com alegria e entusiasmo isso tudo que eu adoro. Experimentos bem sucedidos e bons resultados são muito legais, são ótimos. Mas, no final, o que realmente importa são as pessoas: que significado teriam o sucesso e a conquista se não houvesse ninguém lá para te abraçar e aplaudir? Sendo assim, obrigada a todos vocês que fazem da minha vida muito, muito mais do que PCR =)



Eu posso não ter ido onde eu pretendia ir,





mas acho que eu acabei onde precisava estar.

*Douglas Adams - The Long Dark
Tea-Time of the Soul*



SUMÁRIO

RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO.....	23
APRESENTAÇÃO GERAL DO TRABALHO, OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA:.....	23
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO 1: “<i>ALOE VERA</i> E MEL, ESTRESSE OXIDATIVO, PROTEÓLISE E CÂNCER-CAQUEXIA.”	57
APRESENTAÇÃO:.....	59
ABSTRACT	63
INTRODUCTION	63
MATERIALS AND METHODS.....	64
RESULTS.....	67
DISCUSSION.....	73
ACKNOWLEDGMENTS	77
REFERENCES	78
CAPÍTULO 2: “<i>ALOE VERA</i> E MEL E MODULAÇÃO DO POTENCIAL METASTÁTICO”	81
APRESENTAÇÃO:.....	83
ABSTRACT	87
INTRODUCTION	87
MATERIALS AND METHODS.....	88
RESULTS AND DISCUSSION	91
ACKNOWLEDGEMENTS.....	95
CONFLICTS OF INTEREST.....	96
REFERENCES	96
CAPÍTULO 3: “<i>ALOE VERA</i> E MEL E AÇÃO ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>: IMPORTÂNCIA DA IMUNOMODULAÇÃO”	99
APRESENTAÇÃO:.....	101
ABSTRACT	105
INTRODUCTION	106
METHODS AND MATERIALS.....	107
RESULTS AND DISCUSSION	111
CONCLUSIONS	123
ACKNOWLEDGEMENTS.....	123
REFERENCES	124
CAPÍTULO 4: “SCREEN <i>IN VIVO</i> PARA IDENTIFICAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE METÁSTASE”	129
APRESENTAÇÃO.....	131
RESUMO	135
INTRODUÇÃO.....	136
MATERIAIS E MÉTODOS	138
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	155
CONCLUSÕES PARCIAIS	199
REFERÊNCIAS	199
DADOS SUPLEMENTARES	203
CONCLUSÕES:	207
ANEXOS.....	209

RESUMO

Câncer é um nome genérico para um grupo de mais de cem doenças que compartilham algumas características. Talvez a característica mais marcante das neoplasias malignas seja a rápida proliferação de células anormais para além de suas fronteiras usuais, invasão de tecidos adjacentes e finalmente dispersão para órgãos distantes. Anualmente, cerca de oito milhões de pessoas morrem devido ao câncer e outros doze milhões de novos casos são diagnosticados. Dentre os eventos associados à progressão neoplásica, destacam-se as metástases e a caquexia. Metástases são tumores em sítios secundários, sendo responsáveis por cerca de 90% do total de mortes por câncer. Já a caquexia, uma síndrome paraneoplásica, é caracterizada por extensa espoliação de gordura e massa magra, fadiga e alterações metabólicas, prejudicando a qualidade de vida e a sobrevida de cerca de 50-85% dos pacientes, dependendo do tipo de tumor. Com relação às terapias, o grande desafio ainda é combater o tumor sem prejudicar o hospedeiro, o que acredita-se ser possível através de terapias-alvo para genes específicos e/ou tratamentos coadjuvantes, incluindo aqueles que empregam suplementação e/ou drogas derivadas de produtos naturais, que muitas vezes tem menor efeito tóxico ao hospedeiro. Desse modo, este trabalho teve dois objetivos: (1) avaliar a ação da administração oral de *Aloe vera* e mel sobre o tecido tumoral e o hospedeiro portador de carcinosarcoma de Walker 256; e (2) identificação de genes supressores de metástase através de *screen* funcional *in vivo* empregando-se biblioteca de shRNA em modelo de câncer de mama triplo negativo. Em relação ao primeiro objetivo, os resultados sugerem que a associação entre *Aloe vera* e mel pode modular a proteólise e o estresse oxidativo de maneira diferencial preservando o hospedeiro em detrimento do tecido tumoral. Ainda, o tratamento com *Aloe vera* e mel parece ser capaz de diminuir a propensão metastática das células tumorais *in vivo*, através de aumento na expressão de caderina-E e redução na expressão de caderina-N, bem como inibição da angiogênese. Outros experimentos sugerem que os efeitos antitumorais observados *in vivo* estão, em parte, relacionados à ação imunomodulatória de alguns componentes da *Aloe vera*. Com relação ao segundo objetivo, foram identificados dezenas de candidatos a genes supressores de metástase. Dentre esses genes, que estão sendo validados, Mnat1, Snd1, Cul5, Gabbr1, Rorb, Adk, Ccnd3, Gdnf, Nr1d1, Ptpns e Ltah4 são os genes-candidatos de maior confiabilidade por cumprirem um ou mais dos seguintes requisitos: (a) diminuição significativa do nível de DNA e RNA em cânceres de mama humanos agressivos, sendo assim relacionados à pior prognóstico, (b) papel biológico sugestivo, (c) fenótipo marcante durante o *screen* ou ainda (d) decréscimo significativo na expressão em linhagens de câncer de mama mais agressivas.

ABSTRACT

Cancer is a generic name for a group of over a hundred diseases which share some features. The most remarkable feature in cancer disease is the fast proliferation of abnormal cells beyond their usual boundaries, invasion of surrounding tissues and finally spread to distant organs. Every year, cancer is responsible for over eight million deaths and twelve million new cases are diagnosed. Among all the events associated with the neoplastic progression, metastasis and cachexia are major issues. Metastases, which are tumours growing in secondary sites, account for 90% of all cancer deaths. Cachexia, a paraneoplastic syndrome, is characterized by severe fat and lean mass waste, fatigue and metabolic alterations, jeopardizing the quality of life and reducing the survival of about 50-85% of the cancer patients, depending on the tumour type. Regarding to the therapies, the biggest challenge is still fighting the tumour without harming the host, which is believed to be possible by targeted therapies to specific genes and/or adjuvant treatments, including supplementation and drugs derived from natural compounds, which usually have lower side effects in the host. Knowing these points, this work had two aims: (1) evaluate the effects of *Aloe vera* and honey in both tumour and host tissues in Walker 256-tumour bearing rats; and, (2) identification of metastasis suppressor genes using a functional *in vivo* shRNA screen in a triple negative breast cancer syngeneic model. Regarding to the first aim, the results suggested that the combination of *Aloe vera* and honey selectively modulate proteolysis and oxidative stress, damaging the tumour tissue while protected the host. Moreover, the *Aloe vera* and honey treatment apparently decreases the metastatic potential *in vivo*, by simultaneous increase in E-cadherin and decrease in N-cadherin expression, while decreased tumour vascularization. Finally, our results suggested the antitumoral effects observed *in vivo* are, at least partially, related to the immunomodulatory activity of some *Aloe vera*'s compounds. Regarding to the second aim, dozens of putative metastasis suppressor genes were identified. High confidence candidates, which would be further analysed are Mnat1, Snd1, Cul5, Gabbr1, Rorb, Adk, Ccnd3, Gdnf, Nr1d1, Ptprs e Ltah4. Their selection was based on meeting the following requirements: (a) significant decrease at DNA or RNA level in highly aggressive human breast cancer carcinomas and thus, worse prognosis, (b) suggestive biological role, (c) occurrence of a remarkable phenotype during the screen, and (d) significant decrease in expression in more aggressive cancer cell lines.

INTRODUÇÃO

Apresentação geral do trabalho, objetivos e justificativa:

O câncer é uma doença que afeta todas as faixas etárias, raças e classes sociais. Globalmente, é a segunda maior causa de morte por doença, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares. As células neoplásicas multiplicam-se rápida e desordenadamente, invadem e comprometem os tecidos adjacentes e, subsequentemente, órgãos distantes.

As metástases, que são tumores em sítios secundários, respondem pela grande maioria das mortes por câncer. Isso ocorre, entre outros fatores, devido ao conhecimento limitado acerca dos genes e mecanismos envolvidos nesse processo. Deste modo, torna-se difícil prever os pacientes cuja doença é mais propensa a evoluir para o estágio metastático, bem como o desenvolvimento de terapias que sejam eficazes para esta fase.

Ainda, durante a evolução tumoral, alguns fatores prejudicam muito a qualidade de vida dos pacientes. Dentre eles, a caquexia, que é caracterizada como síndrome paraneoplásica, envolve a perda involuntária de peso devido à espoliação de massa muscular esquelética, prejudicando não apenas a qualidade de vida, mas também podendo contribuir para a redução do tempo de sobrevida desses pacientes. Pacientes caquéticos tem menor resiliência frente à quimioterapia e estão mais sujeitos a seus efeitos colaterais.

Visando a melhoria da qualidade de vida, a potencialização dos resultados das terapias tradicionais e a redução dos efeitos colaterais, uma das abordagens amplamente utilizadas pelos pacientes, e que recentemente ganhou campo na pesquisa em câncer, é o uso da medicina complementar e alternativa, que frequentemente envolve o uso de produtos naturais ou seus derivados.

A *Aloe vera* e o mel são utilizados na medicina popular há milênios, e mais recentemente, têm-se obtido resultados promissores acerca do potencial anticâncer, imunomodulador, antiproliferativo, antioxidante e antiangiogênico dos diversos compostos ativos presentes tanto na *Aloe vera*, quanto no mel. Embora a associação *Aloe vera* e o mel para o tratamento do câncer seja bastante difundida entre os pacientes, poucos estudos

avaliaram os reais benefícios oriundos de sua utilização e os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos observados.

Sendo assim, este trabalho teve, dentro do campo de pesquisa em câncer, dois objetivos distintos, para os quais foram utilizados modelos e abordagens diferentes:

O primeiro objetivo, contemplado em três capítulos deste trabalho, visou inicialmente analisar a eficácia do tratamento com *Aloe vera* e mel, amplamente utilizado na medicina popular, sobre os tecidos do hospedeiro e o tecido tumoral em ratos portadores do carcinossarcoma de Walker 256.

O carcinossarcoma de Walker 256 vem sendo utilizado em nosso laboratório há muitos anos. Derivado de adenocarcinoma mamário espontâneo em rata o tumor de Walker 256 é amplamente utilizado na pesquisa, por ser considerado um dos melhores modelos experimentais para o estudo do quadro de câncer-caquexia humana (Emery, 1999).

Análises subsequentes, também abordadas nestes capítulos, objetivaram elucidar os mecanismos e substâncias envolvidas na ação antitumoral exibida pela *Aloe vera* e mel *in vivo*.

O segundo objetivo, explorado no último capítulo, propôs identificar possíveis genes supressores de metástase atuantes em câncer de mama triplo negativo, através da utilização de linhagens murinas derivadas do modelo 4T1 e screen funcional *in vivo*. Por meio deste estudo, novos fatores prognósticos seriam identificados, e novas possibilidades para o desenvolvimento de terapias-alvo seriam criadas. O laboratório de Metástase/Peter MacCallum Cancer Centre – Melbourne, Austrália, utiliza o carcinoma mamário murino 4T1, um modelo experimental muito utilizado na avaliação e melhor compreensão da biologia dos tumores, sobretudo no fenômeno da metástase, uma vez que suas células são capazes de formar metástases espontaneamente. A partir da linhagem parental, foram isoladas diversas linhagens, com diferentes potenciais e perfis metastáticos (Pulaski & Ostrand-Rosenberg, 2000; Eckhardt *et al.*, 2005).

Assim, este trabalho faz contribuições em dois desafios chave da pesquisa em câncer: (1) compreensão e desenvolvimento de tratamentos coadjuvantes baseados em substâncias derivadas de produtos naturais, e, (2) elucidação de processos relacionados à regulação da metástase.

Revisão Bibliográfica

Câncer é um nome genérico para um grupo de mais de cem doenças que compartilham algumas características fundamentais. Dentre os atributos que definem as neoplasias destaca-se a rápida proliferação de células anormais para além de suas fronteiras usuais, invasão de tecidos adjacentes e finalmente dispersão para órgãos distantes, formando as metástases, responsáveis por aproximadamente noventa por cento das mortes devido ao câncer, cujo total soma mais de oito milhões a cada ano (OMS, 2014).

O desenvolvimento tumoral é um processo altamente complexo que envolve diversas etapas nas quais as células cancerosas adquirem capacidades biológicas fundamentais e comuns para o surgimento e progressão da maioria, senão de todos, os cânceres humanos. Conhecidas como os "*hallmarks* do câncer", estas capacidades originalmente compreendem: (1) manutenção autossuficiente dos sinais proliferativos, (2) insensibilidade aos sinais antiproliferativos, (3) resistência à morte celular programada (apoptose), (4) potencial replicativo ilimitado, (5) indução da angiogênese, e (6) ativação de mecanismos invasivos e metastáticos (Hanahan & Weinberg, 2000). Atualmente, com base no acúmulo de novas descobertas científicas, considera-se a inclusão de outros dois eventos aos "*hallmarks*": (7) reprogramação do metabolismo energético e (8) evasão da destruição pelo sistema imune (Hanahan & Weinberg, 2011).

Nos bastidores de todos estes eventos está a instabilidade genômica, geradora da variabilidade genética que acelera a aquisição cumulativa das capacidades celulares necessárias à progressão do câncer. Embora para alguns tipos de tumores exista o componente hereditário, a maioria dos cânceres humanos é resultante de mutações esporádicas. Essas mutações levam à ativação de oncogenes e/ou à inativação de genes supressores de tumor, seja por meio de regulação epigenética, regulação pós transcricional, regulação pós traducional, inserções, duplicações, deleções, entre outros (Wiedemann & Morgan, 1992; Peltomäki 2012).

Células cancerosas podem sustentar sinais proliferativos através de vários mecanismos, entre eles (a) produção de seus próprios fatores e receptores de crescimento,

gerando estimulação autócrina; (b) sinalização para que as células do estroma tumoral produzam fatores de crescimento, gerando assim estimulação parácrina; (c) superexpressão de receptores para os fatores de crescimento, conferindo hipersensibilidade aos sinais mitogênicos; e, finalmente, (d) independência da ligação de fatores de crescimento aos seus respectivos receptores, obtido através da ativação constitutiva de componentes sinalizadores para proliferação, cuja ação na cascata estimulatória é posterior à ligação fator-receptor (Hanahan & Weinberg, 2011). Dentre as possíveis vias ativadas desta maneira, estão as relacionadas aos oncogenes RAS, MYC e RAF, todos envolvidos em vias de crescimento, proliferação, promoção do ciclo celular e ativação da transcrição, que tradicionalmente seriam ativadas em resposta ao acoplamento ligante-receptor para diversos fatores de crescimento, entre eles o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento vascular (VEGF) e a heregulina $\beta 1$ (HRG) (Pratilas & Solit 2010; Hanahan & Weinberg, 2011).

Contudo, a manutenção da proliferação ilimitada só torna-se possível quando, concomitantemente, a célula é capaz de evadir os sinais supressores de crescimento, que são, de maneira geral, conferidos por genes supressores de tumor, dentre os quais pode-se citar os genes RB e p53, caracteristicamente inativados em tumores humanos e animais (Meek 2009; Dick & Rubin, 2013).

Da mesma forma, para garantir o aumento do número de células e consequentemente da massa tumoral, as células cancerosas precisam ainda evadir os mecanismos de morte celular programada – apoptose. Notavelmente, o conceito de que a apoptose funcionaria como barreira natural ao desenvolvimento do câncer foi sedimentado a partir de estudos funcionais conduzidos nas últimas décadas (Evan & Littlewood, 1998; Lowe *et al.*, 2004; Adams & Cory, 2007). A perda do controle apoptótico em células neoplásicas se dá através de várias estratégias, das quais a mais comum é a perda de função da TP53, que ativaria proteínas pró-apoptóticas em resposta a danos no DNA e anormalidades cromossômicas (Meek, 2009). Outras estratégias compreendem aumento na expressão de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) ou de sinais pró-sobrevivência

(Igf1, Igf2), ou ainda redução na expressão de fatores pró-apoptóticos (Bax, Bim, Puma) (Djiogue *et al.*, 2013; Czabotar *et al.*, 2014).

Sendo assim, nota-se que para que uma célula tenha capacidade proliferativa ilimitada, tornando-se “imortalizada”, é necessário que a mesma supere duas barreiras: a senescência, caracterizada pela entrada normalmente irreversível em um estado não-proliferativo viável; e a tendência natural e progressiva à morte celular (apoptose). Para tanto, é essencial a atividade da telomerase, a DNA polimerase especializada na adição de seguimentos às extremidades do DNA, já que encurtamento dos telômeros resulta tanto em senescência quanto em crise (morte celular) (Blasco, 2005). Enquanto a telomerase é praticamente ausente na maioria das células não-imortalizadas, ela está amplamente expressa em células neoplásicas, o que permite sua imortalização (Shay & Bacchetti, 1997).

Uma vez atendidos todos os requisitos já mencionados, um novo evento, essencial tanto para o estabelecimento e sobrevivência do tumor primário, quanto para a posterior dispersão de células neoplásicas, é requerido: vascularização. A angiogênese é estimulada sobretudo pela presença do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), cuja expressão é aumentada em decorrência de vias de sinalização desencadeadas por oncogenes ou por condições de hipóxia (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2009; Mac Gabhann & Popel, 2008). Atualmente, já está bem estabelecido que alguns tipos de células do sistema imunológico, notavelmente macrófagos, neutrófilos, mastócitos e precursores mielóides, posicionam-se na periferia de lesões pré-malignas e de tumores estabelecidos, instalando processo inflamatório tecidual que por sua vez estimula a angiogênese (Qian & Pollard, 2010; Candido & Hagemann, 2013).

No decorrer da progressão do câncer, uma pequena parcela das células do tumor primário adquirem propriedades migratórias e invasivas. Dentre os três padrões migratórios básicos já descritos, a saber: mesenquimal, amebóide e coletivo (Reymond *et al.*, 2013), o mais comum e mais bem elucidado é o mesenquimal. Para que tal processo seja possível, é necessária a ocorrência da "transição epitélio mesenquimal", pela qual uma célula epitelial, imóvel e polarizada torna-se não-polarizada, móvel e invasiva (De Craene & Berx, 2013). Vários fatores transcricionais amplamente expressos durante eventos migratórios na

embriogênese, são novamente ativados durante a transcrição epitélio-mesenquimal. Alguns exemplos de fatores de transcrição, cujo papel na promoção da metástase já foi demonstrado em experimentos funcionais envolvendo superexpressão, incluem Snail, Slug, Twist, Zeb1 e Zeb2 (Yang & Weinberg, 2008; Schmalhofer *et al.*, 2009; Micalizzi *et al.*, 2010; Taube *et al.*, 2010).

Um pré-requisito para a migração é a perda das junções aderentes célula-célula, que está intimamente ligado à diminuição na expressão da caderina-E, que participa da organização e manutenção das camadas de células epiteliais. Reduções na expressão e inativações da caderina-E são bastante frequentes em carcinomas humanos, e o aumento ou restauração de sua expressão estão bem estabelecidos como antagonistas da invasão e da metástase, o que suporta seu papel como gene supressor de tumor (Cavallaro & Christofori, 2004; Berx & van Roy, 2009). Durante a transição epitélio-mesenquimal, ocorre a chamada “troca de caderinas”, com a progressiva substituição de caderinas-E por caderinas-N. O aumento da expressão de caderina-N já foi associado ao acréscimo da incidência de metástases em modelos animais (Hazan *et al.*, 2004; Hazan *et al.*, 2010; Gheldof & Berx G, 2013).

É crescente o número de estudos que mostra o papel de células não-tumorais, presentes no microambiente tumoral, na facilitação do processo de metástase. O tumor é formado por células neoplásicas – o parênquima, e por uma gama de outras células – o estroma associado ao tumor, embebidos na complexa rede de proteínas fibrilares e glicoproteínas que forma a matriz extracelular. Incluídas entre as células do estroma estão células endoteliais (vasculares e linfáticas), fibroblastos, neurônios e células do sistema imunológico. As células tumorais podem ativar componentes do estroma, resultando em inflamação crônica, liberação de citocinas e proteases, processos que auxiliam no escape de células neoplásicas do sítio primário (Eckhardt *et al.*, 2012).

O processo de entrada de uma célula, ou de um grupo de células malignas, em um vaso é denominado intravasão, e o processo de saída, rumo ao novo sítio a ser colonizado, é denominado extravasamento. Embora os dois envolvam a migração transendotelial, caracterizada pela ruptura das junções célula-célula endoteliais para que a célula neoplásica atravessasse a parede do vaso, a intravasão e o extravasamento são processos distintos

(Reymond *et al.*, 2013). Para atingir o vaso e então intravasas, a célula tumoral precisa invadir os tecidos, o que se dá frequentemente pela degradação da matriz extracelular através da intensa atividade proteolítica exercida por metaloproteases, catépsinas e outras proteases, liberadas no meio extracelular ou presentes em estruturas celulares especializadas, tais como pseudopódios e invadopódios (Wolf & Friedl, 2009). Se a célula sobreviver ao cisalhamento e à ação protetora do sistema imunológico no vaso, ela poderá eventualmente aderir à parede de uma célula endotelial para então realizar o extravasamento. Esse processo tipicamente ocorre em pequenos capilares, onde inicialmente ocorre restrição física do movimento, seguida pela adesão estável por meio de interações moleculares, e finalmente pela migração transendotelial propriamente dita (Kienast *et al.*, 2010; Reymond *et al.*, 2013). Uma vez no estroma, as células tumorais podem iniciar o processo de proliferação, formando as chamadas micrometástases, que por sua vez precisam sobreviver e crescer neste novo ambiente para então dar origem às macrometástases, que são clinicamente detectáveis (Sahai 2007; Reymond *et al.*, 2013).

Há muito já se tem conhecimento de que o local de estabelecimento das metástases não é aleatório. Em 1889, o cirurgião inglês Stephen Paget propôs a hipótese "*Seed and Soil*" ("semente e solo") para explicar o padrão não randômico do surgimento de metástases. Suas constatações a cerca da discrepância entre o suprimento de sangue e a incidência de metástases em determinados órgãos, levaram-no a propor que determinados tipos de células tumorais, as "sementes", teriam afinidade específica pelo ambiente de determinados órgãos, o "solo", sendo então as metástases formadas apenas quando a "semente" e o "solo" fossem compatíveis (Paget, 1889; Fidler, 2003).

Como exemplos dessa disseminação direcionada podem-se citar (a) o câncer de mama, que metastiza preferencialmente para os pulmões, fígado, ossos e cérebro; (b) o câncer de pulmão, que metastiza especialmente para os ossos, fígado e cérebro; (c) o câncer de próstata, que metastiza sobretudo para os ossos; e ainda melanomas que metastizam para o fígado, cérebro e pele (Nguyen *et al.*, 2009).

Sendo assim, quase cento e trinta anos mais tarde, a hipótese de Paget continua amplamente aceita. Muitos progressos foram alcançados na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no fato de que cânceres específicos formam metástases em órgãos

específicos. Vários estudos recentes demonstram que, em resposta a fatores secretados pelo tumor primário, alguns tipos de células do hospedeiro são direcionadas para potenciais locais de metástase, onde criam um microambiente receptivo para as células tumorais disseminadas, que são aquelas que já atingiram um órgão secundário, mas que ainda não desenvolveram metástases (Eckhardt *et al.*, 2012).

Um número crescente de evidências aponta para papel de células derivadas da medula óssea na promoção da metástase via estabelecimento do chamado "nicho pré-metastático" (Kaplan *et al.*, 2005; Hiratsuka *et al.*, 2006; Hiratsuka *et al.*, 2008; Eckhardt *et al.*, 2012). Tomando como exemplo o câncer de mama, as células neoplásicas ativam a expressão das quimiocinas CCL17 e CCL21 nos pulmões, promovendo quimioatração de células tumorais e de células do sistema imune através do receptor CCR4, presente nestas células (Olkhanud *et al.*, 2009). Paralelamente, fatores derivados do tumor, incluindo VEGFA, fator de crescimento placentário, TNF, TGF β 70 e a enzima lisil-oxidase (LOX), estimulam a expressão das proteínas ligantes de cálcio S100A8 e S100A9, metaloproteinase-9 e fibronectina em tecidos distantes, atraindo progenitores hematopoiéticos e células mielóides (Kaplan *et al.*, 2005; Hiratsuka *et al.*, 2006; Erler *et al.*, 2009). O acúmulo destas células imunológicas e a posterior secreção de quimioatraentes e moléculas de adesão auxiliam na posterior promoção da metástase sítio-específica (Lyden & Welch, 2011).

Com base no mencionado, o sucesso da metastização é dependente tanto das propriedades intrínsecas das células tumorais quanto das respostas do hospedeiro. Por se tratar de vários eventos sequenciais e inter-relacionados, onde cada etapa é limitante, e que falhas em qualquer uma dessas etapas resultam na interrupção e fracasso do processo como um todo, a metástase, como processo, é altamente ineficiente: assim pacientes podem apresentar células neoplásicas circulantes e não necessariamente desenvolver metástases, o que pode ser explicado pelo fato de que, em modelos animais apenas $\leq 0,01\%$ das células cancerosas que deixam o tumor primário acabam por desenvolver nódulos em sítios secundários (Fidler 2002; Fidler 2003; Joyce & Pollard 2009; Nguyen *et al.*, 2009; Reymond *et al.*, 2013).

As alternativas terapêuticas para a doença em fase metastática são bastante limitadas, havendo de fato carência de terapias eficazes. Com base nas estatísticas relativas ao câncer, nota-se que as diferenças observadas em pouco mais de trinta anos (entre 1975 e 2008), referentes ao aumento no tempo de sobrevida e a relativa redução na mortalidade dos pacientes com câncer, são especialmente resultado do aumento e maior precisão em tecnologias diagnósticas, o que possibilita o diagnóstico na fase inicial da doença, onde os tratamentos atuam com maior eficiência (Siegel *et al.*, 2012). Esta constatação ressalta a necessidade da identificação de genes associados à progressão metastática: os genes supressores de metástase e os genes promotores de metástase, cujo status de expressão no tumor, além de apresentar valor prognóstico e influenciar a tomada de decisão com relação ao tratamento mais adequado, criaria a oportunidade para o desenvolvimento de terapias-alvo.

Além de todos os eventos descritos, a maioria deles ocorrida no tecido tumoral, também há várias alterações no organismo hospedeiro. Durante o desenvolvimento tumoral, uma parcela dos pacientes sofre com a síndrome paraneoplásica, a caquexia, termo derivado das palavras gregas *kakòs* (ruim) e *hexis* (condição, aparência). A caquexia é uma síndrome multifatorial caracterizada por severa perda de peso e de massa muscular esquelética (associadas ou não à perda de gordura), levando progressivamente a prejuízos funcionais, fadiga, e em última instância, à redução do tempo de sobrevivência (Ryan *et al.*, 2007; Lucia *et al.*, 2012; Fearon *et al.*, 2013). Outra característica marcante da caquexia é que seus efeitos sobre o hospedeiro não podem ser completamente abolidos através de suporte nutricional tradicional, uma vez que sua patofisiologia não está ligada apenas à redução da ingestão de alimentos (anorexia), mas também ao metabolismo anormal (hipercatabolismo e hipoanabolismo) (Lucia *et al.*, 2012; Fearon *et al.*, 2013). Aproximadamente 50% do total de pacientes com câncer são afetados pela caquexia. Este valor sobe para 85% para certos tipos de câncer, tais como gástrico e pancreático (De Wys *et al.*, 1980; Tisdale, 1999, 2009).

A etiologia da caquexia associada ao câncer é complexa. As alterações metabólicas e a mobilização de reservas são induzidas tanto por fatores liberados pelo tumor, que agem diretamente nos tecidos-alvo ou via sistema nervoso central, quanto em resposta a

processos inflamatórios sistêmicos (Rebeca *et al.*, 2008; Fearon *et al.*, 2013). A mobilização de reservas devido à inflamação é um processo conservado evolutivamente, e sua regulação é feita através do sistema nervoso central (Straub *et al.*, 2010). No caso do câncer-caquexia, a inflamação é gerada em resposta a estímulos oriundos do tumor (células tumorais e do microambiente tumoral) e ainda de várias células do hospedeiro incluindo células musculares esqueléticas, do tecido adiposo, do fígado e do próprio sistema imune (Straub *et al.*, 2010). Os fatores mediadores do catabolismo tecidual, que muitas vezes envolvem processos de estresse oxidativo, ainda não foram completamente elucidados, mas já é conhecida a participação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (Tisdale 1997, 2005, 2008, 2009, 2010; Argiles *et al.*, 2006) e de produtos catabólicos do tumor, tais como o fator de mobilização de lipídios e o fator de indução de proteólise - PIF (Tisdale, 1997, 2008, 2009, 2010). Ainda, foi relatado que inoculação de IL-1 no cérebro induziu rapidamente catabolismo muscular e expressão de genes associados à atrofia, e que citocinas pró-inflamatórias também podem induzir a liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que tem poderoso efeito anorexígeno (Connan *et al.*, 2007; Braun *et al.*, 2011).

Corroborando com todos os eventos descritos, existe ainda o consumo de macronutrientes exercido diretamente pelas células tumorais. Especialmente nos estágios finais da doença, quando a massa tumoral totaliza mais de 750g, seu consumo energético é quantitativamente bastante importante (Fearon *et al.*, 2013). Tomando como exemplo um estudo feito com câncer colorretal em estágio metastático, nos três meses finais, o aumento cumulativo do consumo energético basal, considerando-se apenas o fígado, apresentou acréscimo de aproximadamente 17.700 kcal em comparação ao gasto normal em fígados de indivíduos saudáveis (Lieffers *et al.*, 2009; Fearon *et al.*, 2013). Sendo assim, a demanda energética e nutricional exigida pelo tumor poderia contribuir substancialmente para a perda de peso associada à caquexia (Ryan *et al.*, 2007; Lieffers *et al.*, 2009).

O tratamento da caquexia associada ao câncer é essencial para a melhoria tanto da qualidade de vida quanto da sobrevida dos pacientes, uma vez que há mais de trinta anos vem sendo documentado que a perda de peso é fator independente de prognóstico ruim, e que pacientes caquéticos respondem pior aos tratamentos e sofrem mais com os seus efeitos

colaterais (Dewys, *et al.*, 1980; Andreyev *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2011).

As estratégias terapêuticas convencionais para o tratamento do câncer incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Embora tenham ocorrido grandes avanços com relação às drogas anticâncer nas últimas décadas, infelizmente tanto a quimioterapia quanto a radioterapia induzem efeitos colaterais massivos nos pacientes. Isso ocorre especialmente devido aos efeitos severos que estes tratamentos exercem sobre as células normais e saudáveis do hospedeiro, que estão em fase proliferativa, uma vez que este é o principal alvo das referidas terapias, sem mencionar os diversos efeitos colaterais tardios já associados a diversos quimioterápicos (Knijnenburg *et al.*, 2013; Agrawal 2014).

O desenvolvimento de terapias que afetem eficientemente as células neoplásicas, sem trazer prejuízos ao paciente portador de tumor, é encarado como o maior desafio nas pesquisas para elaboração de novos tratamentos para o câncer.

Uma abordagem terapêutica que vem sendo amplamente investigada é a imunoterapia. Embora muitos estudos enfoquem terapias baseadas no papel dos linfócitos-T, novas descobertas acerca das células *natural-killer* (NK) sugerem que as mesmas poderiam ser bons alvos para terapias celulares no câncer, uma vez que, além de sua atividade citotóxica direta, as células NK produzem diversas citocinas imunoativas, tais como interferons e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, o que posiciona as células NK na intersecção entre imunidade inata e adaptativa (Klingemann, 2013; Davies *et al.*, 2014).

No entanto, durante a progressão tumoral, as células tumorais adquirem a capacidade de evadir da destruição pelo sistema imune. Durante a chamada imunoedição, as células cancerosas induzem a diminuição da expressão de receptores ativadores e aumentam a expressão de receptores inibitórios na superfície das células NK, ocorrendo ainda, por parte da célula tumoral, diminuição na expressão de ligantes a estes receptores estimulatórios e aumento na expressão de ligantes a receptores inibitórios (Huergo-Zapico *et al.*, 2014; Marcus *et al.*, 2014). Sendo assim, esforços têm sido feitos visando o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que restaurem a habilidade das células NK reconhecerem e lisarem células tumorais (Chretien *et al.*, 2014), e os primeiros ensaios

clínicos envolvendo transplantes de células NK em pacientes com câncer mostraram benefícios (Klingemann, 2013; Ames & Murphy, 2014).

Outra estratégia anticâncer que vem sendo pesquisada, é a chamada “Terapia de Oxidação”, que consiste em aumentar o estresse oxidativo nas células tumorais, elevando as espécies reativas de oxigênio (ROS) até níveis letais para estas células (Fang *et al.*, 2007; 2009). A obtenção desse resultado ocorre através de dois mecanismos principais: (a) aumento da produção de ROS através da administração de enzimas oxidantes para as células-alvo (Sawa *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2002; Ben-Yoseph & Ross, 1994; Yoshikawa *et al.*, 1995; Stegman *et al.*, 1998), ou (b) inibição das enzimas antioxidantes que atuam no tecido tumoral, entre elas a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione-S-transferase (GST) (Brenner & Grimm, 2006; Huang *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2003).

Em busca de terapias que possam contribuir com o tratamento, e que apresentem menos efeitos colaterais, uma porção crescente da população faz uso da chamada "Medicina Complementar e Alternativa" (CAM), que faz referência a diversas abordagens de tratamento, que não fazem parte integral do procedimento médico padrão, e que podem incluir componentes da dieta, suplementos, preparações à base de plantas, produtos de origem natural e até mesmo mudanças no estilo de vida (Varker *et al.*, 2012).

Meta-análises sobre o uso de tratamentos complementares e alternativos demonstraram que o percentual de pacientes com câncer que fazem uso de algum desses tipos de abordagem praticamente dobrou (de 25% para 49%) nos últimos trinta anos (Horneber *et al.*, 2012). Em geral, a pesquisa aborda o uso de terapias complementares e alternativas de maneira desconstrucionista: embora haja certo interesse nos extratos vegetais complexos, seus possíveis componentes ativos são explorados individualmente, o que compromete a observação de qualquer possível efeito sinérgico ou aditivo entre eles (Fonfa, 2007).

Dentre formas mais frequentes de CAM está o uso dos produtos naturais, e entre eles, o uso da *Aloe vera* e do mel (Boudreau & Beland, 2006; Miller *et al.*, 2008; Erejuwa *et al.*, 2014), cuja combinação é muito popular no Brasil.

Aloe vera (Linne), também comumente referida como *Aloe barbadensis* Miller, é uma dentre aproximadamente 420 espécies do gênero *Aloe*, que compreende plantas

xerófitas suculentas perenes (Boudreau *et al.*, 2006). Acredita-se que a origem geográfica da *Aloe vera* tenha ocorrido no Sudão, com posterior introdução no mediterrâneo e, posteriormente, em outras áreas de clima tropical do planeta (Grindlay & Reynolds 1986).

A *Aloe* tem sido extensivamente usada pelos egípcios, assírios e civilizações do mediterrâneo desde tempos bíblicos. O primeiro relato autêntico de que a *Aloe* possui propriedades cicatrizantes é atribuído a uma tabuleta mesopotâmica de argila datada em aproximadamente 2100 anos A.C.. No entanto, o primeiro relato detalhado de seu valor medicinal está no "Papius Ebers", documento egípcio datado de cerca de 1550 anos A.C., que contém várias preparações à base de *Aloe* para males internos e externos. Outra descrição antiga e detalhada do emprego da *Aloe vera* na medicina está no "Herbário Grego" de Dioscorides (cerca de 70 anos D.C.), onde a mesma é referência para o tratamento de feridas, perda de cabelo, úlceras genitais e hemorroidas (Davis, 1997).

Contemporaneamente, a *Aloe* é importante na medicina tradicional de diversos países, entre eles China, Índia, Índias ocidentais (Antilhas e Caribe), África do sul e Japão (Grindlay and Reynolds 1986), e é uma das poucas plantas medicinais amplamente utilizadas na sociedade ocidental (Boudreau & Beland, 2006). Nas últimas décadas, pesquisas começaram a estender as possibilidades terapêuticas do uso da *Aloe vera*, particularmente contra o câncer (Harlev *et al.*, 2012).

Dentro do gênero *Aloe*, a *Aloe vera* é a mais amplamente estudada e considerada a mais biologicamente ativa, tendo sido identificados mais de 75 componentes com potencial ação farmacêutica (Tabela 1) (Foster *et al.*, 2011). Avaliações clínicas têm revelado que os ingredientes farmacologicamente ativos estão concentrados tanto no gel, quanto na casca da folha de *Aloe vera* (Rajasekaran *et al.*, 2005). Porém, ainda não se conhece bem a correlação entre todos os componentes e os efeitos farmacológicos provocados pela *Aloe vera*.

Tabela 1. Classes e exemplos de substâncias potencialmente ativas da *Aloe vera*

<i>Classe</i>	<i>Componente</i>
Antraquinonas/ antronas	Aloe-emodina, aloetic-ácido, anthranol, aloína A e B (ou colectivamente conhecido como barbaloina), isobarbaloina, emodina, e éster do ácido cinâmico
Carboidratos	Mananas, mananas acetiladas, glicomananas acetiladas, glicogalactomananas, galactano, galactogalacturano, arabinogalactana, galactoglicoarabinomananas, substância pécica, xilana, celulose, manose, glicose, L-ramnose e aldopentose
Cromonas	8-C-glucosil-(2'-O-cinamoil)-7-O-methylaloediol A, 8-C-glucosil-(S)-aloesol, 8-C-glucosil-7-O-metil-(S) - aloesol, 8-C-glucosil-7-O-methylaloediol, 8-C-glucosylnoreugenin, isoaloeresina D, isorabaicromona, e neoaloesina A
Enzimas	Fosfatase alcalina, amilase, carboxipeptidase, catalase, cicloxidase, cicloxigenase, lipase, oxidase, carboxilase fosfoenolpiruvato e superóxido dismutase
Minerais inorgânicos	Cálcio, cloro, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, potássio, fósforo, sódio, e zinco
Vitaminas	B1, B2, B6, C, E, e ácido fólico
Diversos, incluindo compostos orgânicos e lípidios	Ácido araquidônico, ácido γ -linolenico, esteroides: campesterol, colesterol, β -sitosterol, triglicéridos, triterpenóides, giberelina, ligninas, sorbato de potássio, ácido salicílico, ácido úrico, β -caroteno, e colina
Amino ácidos	Alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina, e valina
Proteínas	Lectinas

Fonte: Foster *et al.*, 2011.

Os experimentos de Ikeno e colaboradores (2002) indicaram que a administração oral de *Aloe vera*, a longo prazo, não apresenta traços de toxicidade, nem tampouco efeitos prejudiciais ou deletérios, mas sim mostra que poderia ser capaz de prevenir doenças ligadas à idade.

Singh e colaboradores (2000) observaram possível ação antioxidante da *Aloe vera*, protegendo contra pró-oxidação induzida da membrana e dano celular, comandando nos órgãos a detoxificação de metabólitos reativos, incluindo carcinogênicos e drogas. Outros experimentos demonstraram ainda que administração oral das substâncias aloína, aloe-emodina e aloesina aumentam a sobrevivência de camundongos implantados com tumor de

Erlich ascite, enquanto paralelamente aumentam a expressão de enzimas antioxidantes chave no plasma destes animais (El-Shemy *et al.*, 2010).

Pesquisas *in vivo* desenvolvidas por Gribel' & Pashinskii (1986) mostraram importantes resultados à cerca do combate ao câncer pelo uso de *Aloe vera*, como redução da massa tumoral, dos focos e da frequência de metástases, além de potencializar os efeitos anti-tumor de componentes da combinação quimioterápica (5-fluoracil e ciclofosfamida). Estudos subsequentes também sugeriram que a administração oral de *Aloe*, associada ou à melatonina ou ao mel, e ainda à quimioterapia, aumenta a sobrevida de pacientes com câncer metastático avançado (Lissoni *et al.*, 1998; Lissoni *et al.*, 2009).

Embora os efeitos antitumorais dos extratos de *Aloe vera* sejam geralmente atribuídos ao *acemannan*, à aloe emodina, e à fração glicoproteica em geral, estudos demonstram que esses efeitos também são gerados por outras substâncias presentes na folha como outros polissacarídeos, aloína, emodina, dietilhexilftalato, lectinas entre muitos outros (Reynolds & Dweck, 1999; Choi & Chung, 2003; Akev *et. al.*, 2007; Pugh *et al.*, 2001; Im *et al.*, 2005; Harlev *et al.*, 2012).

A maior fração polissacarídica contida no gel da *Aloe vera* consiste em longos polímeros de tamanho variável formados por cadeia polidispersa beta-(1,4)-manana acetilada, coletivamente chamados de *acemannan* (Figura 1), apontado como estimulador imunológico (Fogleman *et al.*, 1992; Manna & McAnalley, 1993; Reynolds & Dweck, 1999; Choi & Chung, 2003).

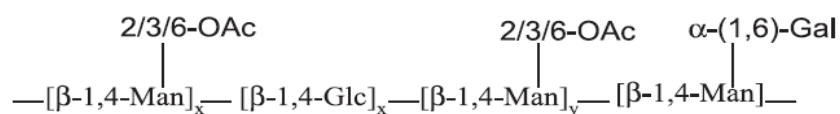


Figura 1. Estrutura molecular básica do *Acemannan*. (Talmadge *et al.*, 2004).

Várias são as evidências de que a ação antitumoral do *acemannan* é oriunda de ativação de respostas imunológicas no hospedeiro. Observações clínicas de animais tratados com *acemannan* sugerem que sarcomas de tecidos moles inicialmente aumentam de tamanho, mas que isso é seguido por encapsulação fibrosa, invasão por linfócitos e necrose do tumor (Harris *et al.*, 1991). Paralelamente, experimentos conduzidos por Peng e

colaboradores (1991) demonstraram que camundongos portadores de sarcoma tratados com *acemannan* apresentaram regressão do tumor, provavelmente devido à ativação de macrófagos e ativação do sistema imune inato.

Já os experimentos de Merriam e colaboradores (1996) mostraram os efeitos preventivos do *acemannan* sobre a implantação de tumores *in vivo*, uma vez que o tratamento anterior à indução de sarcoma em camundongos inibiu o seu desenvolvimento do tumor, diminuindo a mortalidade em cerca de 40%.

Contribuindo para elucidação de outro mecanismo, Lee e colaboradores (2001) demonstraram que o *acemannan* é capaz de induzir a maturação de células dendríticas *in vitro*, o que levaria à ativação do sistema imune inato, importante, entre outros, para o combate a tumores.

Além disso, algumas pesquisas mostraram que o *acemannan* potencializa a ação de vários quimioterápicos, incluindo ciclofosfamida, 5-fluoracil, cisplatina e adrenomedulina em modelos animais (Harlev *et al.*, 2012).

A aloína (Figura 2), também chamada de barbalóina, é uma antraquinona glicosilada, encontrada na forma de dois isômeros (aloína-A e aloína-B), sendo composto bioativo presente na *Aloe vera*, e em várias outras plantas do gênero *Aloe*.

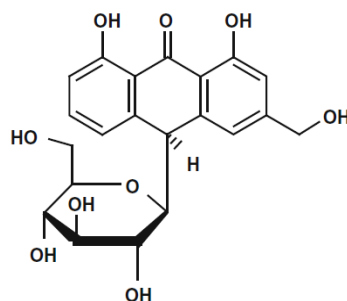


Figura 2. Estrutura Molecular da Aloína (10-glucopiranosil-1,8-di-hidroxi-3-hidroximetil-9(10H)-antraquinona - Harlev *et al.*, 2012).

Pesquisas demonstram que a aloína possui ações tanto preventivas quanto terapêuticas no tratamento de neoplasias (Boudreau & Belland, 2010; Harlev *et al.*, 2012). Estudos recentes realizados por Hamiza e colaboradores (2014) demonstraram que o pré-tratamento com aloína previne o surgimento de lesões pré-neoplásicas induzidas por 1,2-

dimetil-hidrazina (DMH) no colon intestinal de ratos, através de modulação do estresse oxidativo e da inflamação.

Em relação à ação terapêutica, os estudos conduzidos por Nićiforović e colaboradores (2007) mostraram que a aloína apresenta atividade antiproliferativa e citotóxica sobre células de carcinoma uterino humano (HeLaS3) em concentrações fisiológicas, o que se dá, entre outros mecanismos, através de aumento do estresse oxidativo devido ao acúmulo de H_2O_2 , uma vez que em células tratadas ocorreu aumento na atividade da enzima superóxido dismutase, sem aumento concomitante da catalase.

Pan e colaboradores, em 2013 propuseram que a inibição da angiogênese seria mais uma via pela qual a aloína poderia exercer atividade antitumoral; sendo observada tanto em células endoteliais *in vitro* quanto em tumores colorretais humanos em modelos xenógrafos.

Foi ainda relatado que a aloína potencializa a ação da cisplatina em modelos de melanoma, e que ainda poderia induzir a diferenciação celular (Tabolacci *et al.*, 2013).

Evidências salientam ainda que os componentes de *Aloe vera* podem, de fato, agir sinergicamente, de modo que seus efeitos podem não aparecer caso seu extrato seja fracionado bioquimicamente (Reynolds & Dweck, 1999; Dagne *et al.*, 2000; Akev *et al.*, 2007; Kametani *et al.*, 2007).

Um dos possíveis mecanismos que corroboram para que os efeitos obtidos a partir de extratos brutos de *Aloe vera* sejam mais proeminentes do que o de componentes individuais, quando estes são administrados oralmente, pode estar associado ao fato de que polissacarídeos de origem natural são capazes de aumentar a absorção intestinal de drogas co-administradas através de abertura transitória das junções aderentes entre as células epiteliais adjacentes permitindo transporte paracelular através do epitélio intestinal (Junginger & Verhoef, 1998), o que, no caso da *Aloe vera*, permitiria a melhor absorção de seus próprios princípios ativos.

Paralelamente, o mel também tem sido usado medicinalmente há alguns milênios: existem registros de seu uso pelos Egípcios, Gregos e Romanos na Bíblia, Corão, Torá e Talmude (Bardy *et al.*, 2008). O mel era tão apreciado pelos antigos egípcios que era

oferecido como alimento aos deuses, além de utilizarem-no para embalsamar os corpos, uma vez que já conheciam suas propriedades preservativas (Sharquie & Najim 2004).

Embora alguns afirmem que o mel é comparado ao açúcar em seus valores nutritivos e que proteínas, minerais e vitaminas estão em baixa quantidade, tendo portanto, pouca importância nutricional (Heitkamp & Busch-Stockfisch, 1986), há cada vez mais evidências de que o mel é um agente antitumoral, inclusive com efeitos anti-metástase (Gribel' & Pashinskii, 1990; Bardy *et al.*, 2008; Jaganathan & Mandal, 2009; Erejuwa *et al.*, 2014).

O mel é uma solução supersaturada de açúcares, onde os principais são glicose e frutose, representando cerca de 38% e 31%, respectivamente. Entretanto, o mel ainda contém outras 181 substâncias distintas, entre elas ácidos fenólicos e flavonóides, que possuem propriedades anti-oxidantes (Figura 3). O mel contém ainda outras substâncias potencialmente ativas, tais como enzimas, ácido ascórbico, carotenóides, ácidos orgânicos, aminoácidos e proteínas (Gheldof *et al.*, 2002; Jaganathan & Mandal, 2009). A composição exata do mel varia grandemente com sua fonte botânica, mas independente disso, já foi observado que seu conteúdo de flavonoides e ácidos fenólicos é maior nos tipos de mel que são escuros, como o silvestre, por exemplo (Jaganathan & Mandal, 2009; Othman 2012).

O mel exibe várias propriedades terapêuticas incluindo atividade antibacteriana, antifúngica, citostática, anti-inflamatória, antioxidante e anti-hipertensiva (Jeddar *et al.*, 1985; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Erejuwa *et al.*, 2014). No cenário de câncer, o mel já demonstrou eficiência contra mucosite oral induzida por radiação, estomatite, doença da gengiva periodontal, reações cutâneas induzidas por radioterapia, úlceras malignas e lesões infectadas (Bardy *et al.*, 2008). Othman (2012) propõe que poderia haver correlação inversa entre consumo de mel e câncer, uma vez que o mel apresenta propriedades imunoestimulatórias, anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas e cicatrizantes, modulando assim eventos importantes na gênese do câncer.

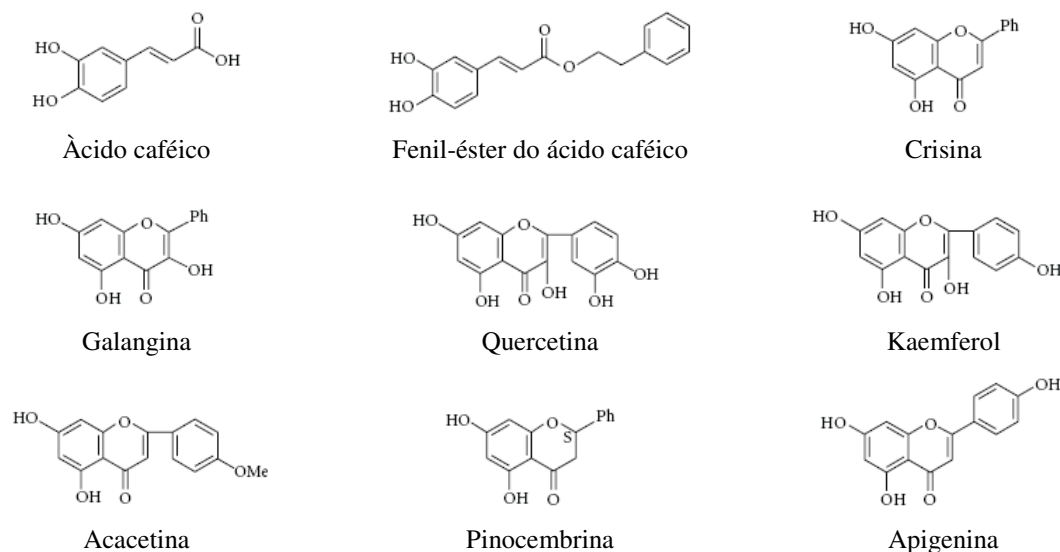


Figura 3. Principais flavonoides e ácidos fenólicos contidos no mel. Ph = fenil, Me = metil. (Jaganathan & Mandal, 2009).

Baseando-se nas diversas evidências sobre o papel do mel no câncer, acredita-se que ele possua atividade antimetastática, antiproliferativa e anticâncer sobre vários tipos de tumor. O maior número de estudos e também o maior número de evidências são para os cânceres de mama, fígado e colorretal (Fauzi *et al.*, 2011; Jubri *et al.*, 2012; Erejuwa *et al.*, 2014). Para outros tipos de tumor, tais como os de próstata, bexiga, endometrial, renal, cutâneo e ósseo, existem evidências promissoras, mas em menor número (Swellam *et al.*, 2003; Tsiapara *et al.*, 2009; Erejuwa *et al.*, 2014).

Os possíveis mecanismos de ação pelos quais o mel inibe o crescimento ou a proliferação de tumores ou células neoplásicas incluiriam regulação do ciclo celular (Pichichero *et al.*, 2010), permeabilização da membrana mitocondrial e ativação de mecanismos apoptóticos (Jaganathan & Mandal 2010; Fauzi *et al.*, 2011; El-kott *et al.*, 2012), modulação do estresse oxidativo (Erejuwa *et al.*, 2012) e do sistema imunológico (Hussein *et al.*, 2012) e inibição da angiogênese (Abdel Aziz *et al.*, 2009; Erejuwa *et al.*, 2014). A maioria desses mecanismos parece ser desencadeada especialmente pela ação dos flavonoides e dos compostos fenólicos, que estão biodisponíveis no mel, como já demonstrado em experimentos conduzidos em humanos saudáveis, que após a ingestão de

mel apresentaram quantidades detectáveis desses compostos no plasma sanguíneo, o que aumentou sua capacidade antioxidante (Schramm *et al.*, 2003).

Componentes como ácido caféico, éster fenetil do ácido caféico, e flavonóides glicosilados contidos no mel possuem efeito inibitório na proliferação e transformação de células tumorais por hiporregulação das vias enzimáticas da proteína tirosina quinase, ciclooxigenase e ornitina descarboxilase (Chinthalapally *et al.*, 1993).

Experimentos de Swellam e colaboradores (2003) mostraram que o mel inibiu o crescimento das linhagens celulares de câncer de bexiga T24, RT4, 253J (humanas) e MBT-2 (murina) *in vitro*. Além disso, quando administrado por via oral ou intralesional em camundongos implantados com a linhagem MBT-2, o mel diminuiu a velocidade de crescimento e o tamanho tumoral.

Ainda, o mel aparenta ter atividade citotóxica específica contra células cancerosas, não danificando as células normais, como foi mostrado em estudos envolvendo linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e hepático (HepG2) humano (Fauzi *et al.*, 2011; Jubri *et al.*, 2012).

Além disso, já há algum tempo sugeriu-se que o mel auxiliou no combate ao câncer potencializando a atividade anti-tumor dos quimioterápicos 5-fluoracil e ciclofosfamida (Wattenberg, 1986; Gribel' & Pashinskii, 1990).

Recentemente, mais ensaios mostraram atividade anticâncer do mel *in vivo* e *in vitro*, isolado ou em combinação com quimioterápicos. O trabalho de Fernandez-Cabezudo e colaboradores (2013) mostrou que o mel apresentou atividade antiproliferativa em linhagens de melanoma e carcinoma colorretal murino, além de linhagem de câncer de mama humano, via ativação de caspases e apoptose. Ainda, foi observado que o tratamento concomitante com mel potencializou a ação do quimioterápico paclitaxel nos três tipos de célula tumoral. Ação antitumoral, aumento da sobrevida e potencialização dos efeitos do paclitaxel também foram observados em camundongos implantados com melanoma, quando administrado intravenosamente.

Poucos estudos tratam do popular tratamento conjunto com *Aloe vera* e mel. Experimentos anteriores realizados pelo nosso grupo mostraram que a associação da *Aloe vera* e mel no tratamento de ratos portadores de carcinossarcoma de Walker 256 diminuiu a

proliferação e aumentou a tendência à apoptose nas células tumorais (Tomasin & Gomes-Marcondes 2011). Ainda, Lissoni e colaboradores, em 2009, demonstraram que a administração oral de *Aloe vera* e mel à pacientes com doença metastática avançada potencializou os efeitos da quimioterapia, aumentou a atividade do sistema imunológico e melhorou a sobrevida.

Desse modo, o investimento em pesquisa básica e o maior conhecimento dos mecanismos anticâncer dos tratamentos complementares e alternativos, conjuntamente com os tratamentos clínicos convencionais, são extremamente importantes, para que se possa aplicar e ir de encontro ao intenso aumento do uso da medicina popular. Como mencionado anteriormente, no Brasil, os tratamentos complementares vêm crescendo significativamente e o uso de *Aloe vera* e mel é um dos métodos mais populares. A medicina oriental valoriza imensamente os produtos naturais; o mesmo é observado em alguns países do ocidente. Assim, a investigação proposta em modelo experimental de caquexia dos efeitos modulatórios do composto *Aloe vera* e mel é extremamente importante para o conhecimento da biologia tumoral, bem como das consequências de sua evolução como as metástases, sendo de suma importância para extrapolar para a clínica médica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel Aziz, A.; Rady, H.; Amer, M.; Kiwan, H. Effect of some honey bee extracts on the proliferation, proteolytic and gelatinolytic activities of the hepatocellular carcinoma Hepg2 cell line. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3, 2754–2769, 2009.

Adams, J.M.; Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 26, 1324–1337, 2007.

Akev, N.; Turkay, G.; Can, A.; Gurel, A.; Yildiz, F.; Yardibi, H.; Ekiz, E.E.; Uzun, H. Tumour Preventive Effect of *Aloe vera* Leaf Pulp Lectin (Aloctin I) on Ehrlich ascites Tumours in Mice. *Phytother. Res.* 21, 1070–1075, 2007.

Agrawal, S. Late effects of cancer treatment in breast cancer survivors. *South Asian J Cancer*. 3(2), 112-115, 2014.

Ames, E.; Murphy W.J. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 63(1), 21-28, 2014.

Andreyev, H.J.; Norman, A.R.; Oates, J.; Cunningham, D. Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies? *Eur. J. Cancer*. 34, 503–509, 1998.

Argiles, J.M.; Busquets, S.; Lopez-Soriano, F.J. Cytokines as mediators and targets for cancer cachexia. *Cancer Treat Res.* 130, 199–217, 2006.

Ben-Yoseph, O.; Ross, B.D. Oxidation therapy: the use of a reactive oxygen species generating enzyme system for tumour treatment. *Br. J. Cancer* 70, 1131–1135, 1994.

Berx, G.; van Roy, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003129, 2009.

Blasco, M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622, 2005.

Boudreau, M.D., Beland, F.A. An Evaluation of the Biological and Toxicological Properties of *Aloe Barbadensis* (Miller), *Aloe Vera*. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 24: 1, 103-154, 2006.

Braun, T.P.; Zhu, X.; Szumowski, M.; Scott, G.D.; Grossberg, A.J.; Levasseur, P.R.; Graham, K.; Khan, S.; Damaraju, S.; Colmers, W.F.; Baracos, V.E.; Marks, D.L. Central nervous system inflammation induces muscle atrophy via activation of the hypothalamic- pituitary- adrenal axis. *J. Exp. Med.* 208, 2449–2463, 2011.

- Brenner, C.; Grimm, S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene*. 25, 4744-4756, 2006.
- Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 69 (Suppl 3), 4–10, 2005.
- Candido, J.; Hagemann, T. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol*. 33(Suppl 1), S79-84, 2013.
- Cavallaro, U.; Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 4, 118–132, 2004.
- Chinthalapally, V.; Dhimant, D.; Barbara, S.; Nalini, K.; Shantu, A.; Bandaru, R. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res*. 53: 4182–8, 1993.
- Choi, S.; Chung, M-H. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*. Volume 1, Issue 1, Pages 53-62, 2003.
- Chretien, A.S.; Le Roy, A.; Vey, N.; Prebet, T.; Blaise, D.; Fauriat, C.; Olive, D. Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity. *Front Immunol*. 5, 122, eCollection 2014.
- Connan, F.; Lightman, S.L.; Landau, S.; Wheeler, M.; Treasure, J.; Campbell, I.C. An investigation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis hyperactivity in anorexia nervosa: The role of CRH and AVP. *J Psychiatr Res*. 41, 131–143, 2007.
- Czabotar, PE.; Lessene, G.; Strasser, A.; Adams, J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(1), 49-63, 2014.
- Dagne, E.; Bisrat, D.; Viljoen, A.; Van Wyk, B-E. Chemistry of Aloe species. *Curr. Org. Chem*. 4, 1055-1078, 2000.
- Davies, J.O.; Stringaris, K.; Barrett, J.A.; Rezvani, K. Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. *Cytotherapy*. pii: S1465-3249(14)00560-X, 2014.
- Davis R.H. *Aloe vera: A Scientific Approach*. Vantage Press, New York, 1997.

De Wys, W.D. Weight loss and nutritional abnormalities in cancer patients: incidence, severity and significance. Calman K, Fearon KCH, eds. *Clinics in oncology*, Vol. 5. Londres: W.B. Saunders, 251, 1986.

Dewys, W.D.; Begg, C.; Lavin, P.T.; Band, P.R.; Bennett, J.M.; Bertino, J.R.; Cohen, M.H.; Douglass, H.O. Jr; Engstrom, P.F.; Ezdinli, E.Z.; Horton, J.; Johnson, G.J.; Moertel, C.G.; Oken. M.M.; Perlia, C.; Rosenbaum, C.; Silverstein, M.N.; Skeel, R.T.; Sponzo, R.W.; Tormey, D.C. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am. J. Med.* 69, 491–497, 1980.

Dick, F.A.; Rubin, S.M. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(5), 297-306, 2013.

Djiogue, S.; Nwabo Kamdje, A.H.; Vecchio, L.; Kipanyula, M.J.; Farahna, M.; Aldebasi, Y.; Seke Etet, P.F. Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs. *Endocr Relat Cancer.* 20(1), R1-R17, 2013.

Eckhardt, B.L.; Francis, P.A.; Parker, B.S.; Anderson, R.L. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nature Reviews Drug Discovery.* 11, 479-497, 2012.

Eckhardt, B.L.; Parker, B.S.; van Laar, R.K.; Restall, C.M.; Natoli, A.L.; Tavarria, M.D.; Stanley, K.L.; Sloan, E.K.; Moseley, J.M.; Anderson, R.L. Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res.* 3(1):1-13, 2005.

El-kott, A.F.; Kandeel, A.A.; El-Aziz, S.F.A.; Ribea, H.M. Anti-tumor effects of bee honey on PCNA and P53 expression in the rat epatocarcinogenesis. *Int. J. Cancer Res.* 8, 130–139, 2012.

El-Shemy, H.A.; Aboul-Soud, M.A.M.; Nassr-Allah, A.A.; Aboul-Enein, K.M.; Kabash, A.; Yagi, A. Antitumor Properties and Modulation of Antioxidant Enzymes' Activity by *Aloe vera* Leaf Active Principles Isolated via Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Current Medicinal Chemistry.* 17, 129-138, 2010.

Emery, P.W. Cachexia in experimental models. *Nutrition.* Jul-Aug;15(7-8):600-3, 1999.

Erejuwa, O.O.; Sulaiman, S.A.; Ab Wahab, M.S.; Sirajudeen, K.N.; Salleh, S.; Gurtu, S. Honey supplementation in spontaneously hypertensive rats elicits antihypertensive effect via amelioration of renal oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 374037, 2012.

Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS. Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules.* 19(2), 2497-522, 2014.

- Erler, J.T.; Bennewith, K.L.; Cox, T.R.; Lang, G.; Bird, D.; Koong, A.; Le, Q.T.; Giaccia, A.J. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*. 15, 35–44, 2009.
- Evan, G.; Littlewood, T. A matter of life and cell death. *Science*. 281, 1317–1322, 1998.
- Fang, J.; Nakamura, H.; Iyer, A.K. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *Journal of drug targeting*. 15(7–8), 475–486, 2007.
- Fang, J.; Sawa, T.; Akaike, T.; Akuta, T.; Sahoo, S.K.; Greish, K.; Hamada, A.; Maeda, H. *In vivo* antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res*. 63, 3567–3674, 2003.
- Fang, J.; Sawa, T.; Akaike, T.; Maeda, H. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycolconjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res*. 62, 3138–3143, 2002.
- Fang, J.; Seki, T.; Maeda, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61, 290–302, 2009.
- Fauzi, A.N.; Norazmi, M.N.; Yaacob, N.S. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food Chem.Toxicol*. 49, 871–878, 2011.
- Fearon, K.; Arends, J.; Baracos, V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 10, 90–99, 2013.
- Fernandez-Cabezudo, M.J.; El-Kharrag, R.; Torab, F.; Bashir, G.; George, J.A.; El-Taji, H.; al-Ramadi, B.K. Intravenous administration of manuka honey inhibits tumor growth and improves host survival when used in combination with chemotherapy in a melanoma mouse model. *PLoS One*. 8(2):e55993, 2013
- Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 29, 789–791, 2009.
- Fidler, I.J. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*. 70, 498–505, 2002.
- Fidler, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 3(6), 453–8, 2003.
- Fonfa, A.E. Patient perspectives: barriers to complementary and alternative medicine therapies create problems for patients and survivors. *Integr Cancer Ther*. 6(3), 297–300, 2007.

Foster, M., Hunter, D., Samman, S. Evaluation of the Nutritional and Metabolic Effects of *Aloe vera*, in: Benzie IFF, Wachtel-Galor S (Eds), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press, Capítulo 3, 2011.

Gheldof, A.; Berx, G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 116:317-36, 2013.

Gribel', N.V.; Pashinskii, V.G. The antitumor properties of honey. *Vopr Onkol*. 36(6), 704-9, 1990.

Gribel', N.V.; Pashinskii, V.G. Antimetastatic properties of aloe juice. *Vopr Onkol*. 32(12), 38-40, 1986.

Grindlay, D.; Reynolds, T. The *Aloe vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *J Ethnopharmacol*. 16, 117–151, 1986.

Hamiza, O.O.; Rehman, M.U.; Khan, R.; Tahir, M.; Khan, A.Q.; Lateef, A.; Sultana, S. Chemopreventive effects of aloin against 1,2-dimethylhydrazineinduced preneoplastic lesions in the colon of Wistar rats. *Human and Experimental Toxicology*. 33(2), 148–163, 2014.

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57–70, 2000.

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144, 646-674, 2011.

Harlev, E., Nevo, E., Lansky, E.P., Ofir, R., Bishayee, A. Anticancer Potential of Aloes: Antioxidant, Antiproliferative, and Immunostimulatory Attributes. *Planta Med*. 78, 843–852, 2012.

Harris, C.; Pierce, K.; King, G.; Yates, K.M.; Hall, J.; Tizard, I. Efficacy of *acemannan* in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Mol Biother*. 3(4), 207-13, 1991.

Hazan, R.B.; Phillips, G.R.; Qiao, R.F.; Norton, L.; Aaronson, S.A. Exogenous expression of N⁺ cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell Biol*. 148, 779–790, 2000.

Hazan, R.B.; Qiao, R.; Keren, R.; Badano, I.; Suyama, K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*. 1014, 155–163, 2004.

Heitkamp K, Busch-Stockfisch M. The pros and cons of honey--are statements about the effects of honey "scientifically verified"? *Z Lebensm Unters Forsch*. 182(4), 279-86, 1986.

Hiratsuka, S.; Watanabe, A.; Aburatani, H.; Maru, Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nature Cell Biol*. 8, 1369–1375, 2006.

Hiratsuka, S.; Watanabe, A.; Sakurai, Y.; Akashi-Takamura, S.; Ishibashi, S.; Miyake, K.; Shibuya, M.; Akira, S.; Aburatani, H.; Maru, Y. The S100A8⁺ serum amyloid A3⁺ TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nature Cell Biol.* 10, 1349–1355, 2008.

Horneber, M.; Bueschel, G.; Dennert, G.; Less, D.; Ritter, E.; Zwahlen, M. How many cancer patients use complementary and alternative medicine: a systematic review and metaanalysis. *Integr Cancer Ther.* 11(3), 187–203, 2012.

Huang, P.; Feng, L.; Oldham, E.A.; Keating, M.L.; Plunkett, W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature.* 407, 390–395, 2000.

Huergo-Zapico, L.; Acebes-Huerta, A.; López-Soto, A.; Villa-Álvarez, M.; Gonzalez-Rodriguez, A.P.; Gonzalez, S. Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer. *Front Immunol.* 5, 106, eCollection, 2014.

Hussein, S.Z.; Mohd Yusoff, K.; Makpol, S.; Mohd Yusof, Y.A. Gelam honey inhibits the production of proinflammatory mediators NO, PGE(2), TNF-alpha, and IL-6 in carrageenan-induced acute paw edema in rats. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 109636, 2012.

Ikeno, Y.; Hubbard, G.B.; Lee, S.; Yu, B.P.; Herlihy, J.T. The influence of long-term *Aloe vera* ingestion on age-related disease in male Fischer 344 rats. *Phytother Res.* 16(8), 712–718, 2002.

Im, S-A., Oh, S-T., Song, S., Kim, M-R., Kim, D-S., Woo, S-S., Jo, T.H., Park, Y.I., Lee, C.K. Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *International Immunopharmacology.* 5, 271–279, 2005.

Jaganathan, S.K., Mandal, M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Article ID 830616, 2009.

Jaganathan, S.K.; Mandal, M. Involvement of non-protein thiols, mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species and p53 in honey-induced apoptosis. *Investig. N. Drugs.* 28, 624–633, 2010.

Jeddar, A.; Khassany, A.; Ramsaroop, V.G.; Bhamjei, I.E.; Moosa, A. The antibacterial action of honey: an *in vitro* study. *S. Afr. Med. J.* 67, 257–259, 1985.

Joshi, B., Wang, X.; Banerjee, S.; Tian, H.; Matzavinos, A.; Chaplain, M.A.J. On immunotherapies and cancer vaccination protocols: a mathematical modeling approach. *J. Theor. Biol.* 259, 820, 2009.

Joyce, J.A.; Pollard, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Rev. Cancer*. 9, 239–252, 2009.

Jubri, Z.; Narayanan, N.N.N.; Karim, N.A.; Ngah, W.Z.W. Antiproliferative activity and apoptosis induction by gelam honey on liver cancer cell line. *Int. J. Appl. Sci. Technol.* 2, 135–141, 2012.

Junginger, H.E.; Verhoef, J.C. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs: a fiction? *Pharm. Sci. Technol. Today*. 1, 370–376, 1998.

Kametani, S.; Kojima-Yuasa, A.; Kikuzaki, H.; Kennedy, D.O.; Honzawa, M.; Matsui-Yuasa, I. Chemical Constituents of *Cape Aloe* and Their Synergistic Growth-Inhibiting Effect on Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1220–1229, 2007.

Kaplan, R.N.; Riba, R.D.; Zacharoulis, S.; Bramley, A.H.; Vincent, L.; Costa, C.; MacDonald, D.D.; Jin, D.K.; Shido, K.; Kerns, S.A.; Zhu, Z.; Hicklin, D.; Wu, Y.; Port, J.L.; Altorki, N.; Port, E.R.; Ruggero, D.; Shmelkov, S.V.; Jensen, K.K.; Rafii, S.; Lyden, D. VEGFR1- positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 438, 820–827, 2005.

Kienast, Y.; von Baumgarten, L.; Fuhrmann, M.; Klinkert, W.E.; Goldbrunner, R.; Herms, J.; Winkler, F. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nature Med.* 16, 116–122, 2010.

Klingemann, H.G. Cellular therapy of cancer with natural killer cells-where do we stand? *Cytotherapy*. 15(10), 1185–1194, 2013.

Knijnenburg, S.L.; Mulder, R.L.; Schouten-Van Meeteren, A.Y.; Bökenkamp, A.; Blufpand, H.; van Dulmen-den Broeder, E.; Veening, M.A.; Kremer, L.C.; Jaspers, M.W. Early and late renal adverse effects after potentially nephrotoxic treatment for childhood cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 10, CD008944, 2013.

Lee, J.K.; Lee, M.K.; Yun, Y.P.; Kim, Y.; Kim, J.S.; Kim, Y.S.; Kim, K.; Han, S.S.; Lee, C.K. *Acemannan* purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 1(7), 1275–84, 2001.

Lieffers, J.R.; Mourtzakis, M.; Hall, K.D.; McCargar, L.J.; Prado, C.M.; Baracos, V.E. A viscera-driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to whole body energy demands. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1173–1179, 2009.

Lissoni, P.; Giani, L.; Zerbini, S.; Trabattini, P.; Rovelli, F. Biotherapy with the pineal immunomodulating hormone melatonin versus melatonin plus *Aloe vera* in untreatable advanced solid neoplasms. *Nat Immun.* 16, 27–33, 1998.

- Lissoni, P., Rovelli, F., Brivio, F., Zago, R., Colciago, M., Messina, G., Mora, A., Porro, G. A randomized study of chemotherapy versus biochemotherapy with chemotherapy plus *Aloe arborescens* in patients with metastatic cancer. *In Vivo*. 23, 171-176, 2009.
- Lowe, S.W.; Cepero, E.; Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432, 307–315, 2004.
- Lucia, S.; Esposito, M.; Fanelli, FR.; Muscaritoli, M. Cancer Cachexia: From Molecular Mechanisms to Patient's Care. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*. 17(3), 315–322, 2012.
- Lyden, D.; Welch, D.R.; Psaila, B. (eds) Cancer Metastasis: Biologic Basis and Therapeutics. *Cambridge University Press*, 2011.
- Mac Gabhann, F.; Popel, A.S. Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation*. 15, 715–738, 2008.
- Manna, S., McAnalley, B.H. Determination of the position of the O-acetyl group in a β -(1,4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydr Res*. 241, 317–9, 1993.
- Marcus, A.; Gowen, B.G.; Thompson, T.W.; Iannello, A.; Ardolino, M.; Deng, W.; Wang, L.; Shifrin, N.; Raulet, D.H. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol*. 122, 91-128, 2014.
- Meek, D.W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer*. 9(10), 714-23, 2009.
- Merriam, E.A.; Campbell, B.D.; Flood, L.P.; Welsh, C.J.R.; McDaniel, H.R.; Busbee, D.L. Enhancement of immune function in rodents using a complex plant carbohydrate which stimulates macrophage secretion of immunoreactive cytokines. *Advances in Anti-Aging Medicine*. 1, 181–203, 1996.
- Micalizzi, D.S.; Farabaugh, S.M.; Ford, H.L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 15, 117–134, 2010.
- Miller, S.; Stagl, J.; Wallerstedt, D.B.; Ryan, M.; Mansky, P.J. Botanicals used in complementary and alternative medicine treatment of cancer: clinical science and future perspectives. *Expert Opin Investig Drugs*. 17(9), 1353-64, 2008.
- Nićiforović, A., Adžić, M., Spasić, S.D., Radojčić, M.B. Antitumor Effects of a Natural Anthracycline Analog (Aloin) Involve Altered Activity of Antioxidant Enzymes in HeLaS3 Cells. *Cancer Biology & Therapy*. 6(8), 1-e6, 2007.
- Nguyen, D.X.; Bos, P.D.; Massague, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Rev. Cancer* 9, 274–284, 2009.

Olkhanud, P.B.; Baatar, D.; Bodogai, M.; Hakim, F.; Gress, R.; Anderson, R.L.; Deng, J.; Xu, M.; Briest, S.; Biragyn, A. Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. *Cancer Res.* 69, 5996–6004, 2009.

Othman, N.H. Honey and Cancer: Sustainable Inverse Relationship Particularly for Developing Nations—A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 410406, 2012.

Organização Mundial da Saúde. Cancer. <http://www.who.int/cancer/en>. Acessado em 06/05/2014.

Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 571–573, 1889.

Pan, Q., Pan, H., Lou, H., Xu, Y., Tian, L. Inhibition of the angiogenesis and growth of Aloin in human colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Cell Int.* 13(1), 69, 2013.

Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res.* 318(4), 299–310, 2012.

Peng, S.Y.; Norman, J.; Curtin, G.; Corrier, D.; McDaniel, H.R.; Busbee, D. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, *Acemannan*. *Mol Biother.* 3(2), 79–87, 1991.

Pichichero, E.; Cicconi, R.; Mattei, M.; Muzi, M.G.; Canini, A. Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. *Int. J. Oncol.* 37, 973–981, 2010.

Prado, C. M., Antoun, S., Sawyer, M. B. & Baracos, V. E. Two faces of drug therapy in cancer: drug-related lean tissue loss and its adverse consequences to survival and toxicity. *Curr. Opin. Nutr. Metab. Care.* 14, 250–254, 2011.

Pratilas, C.A; Solit, D.B. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res.* 16(13), 3329–3334, 2010.

Pugh, N., Ross, S.A., ElSohly, M.A., Pasco, D.S. Characterization of Aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. *J Agric Food Chem.* 49, 1030–1034, 2001.

Pulaski, B.A.; Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 20: Unit 20.2, 20.2.1–20.2.16, 2000.

Qian, B.Z.; Pollard, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 141, 39–51, 2010.

Rebeca, R.; Bracht, L.; Noleto, G.R.; Martinez, G.R.; Cadena, S.M.S.C.; Carnieri, E.G.S.; Rocha, M.E.M.; Oliveira, M.B.M. Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochem Funct.* 26(6), 731–738, 2008.

- Rajasekaran, S.; Sivagnanam, K.; Subramanian, S. Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacological Reports*, 57, 90-96, 2005.
- Reymond, N.; d'Água, B.B.; Ridley, A.J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*. 13(12), 858-870, 2013.
- Reynolds, T.; Dweck, A.C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol*. 68(1-3), 3-37, 1999.
- Ross, P.J.; Ashley, S.; Norton, A.; Priest, K.; Waters, J.S.; Eisen, T.; Smith, I.E.; O'Brien, M.E. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancer? *Br. J. Cancer*. 90, 1905–1911, 2004.
- Ryan, J.L.; Carroll, J.K.; Ryan, E.P.; Mustian, K.M.; Fiscella, K.; Morrow, G.R. Mechanisms of cancer-related fatigue. *Oncologist*. 12, Suppl 1, 22-34, 2007.
- Sawa, T.; Wu, J.; Akaike, T.; Maeda, H. Tumor-targeting chemotherapy by a xanthine oxidase–polymer conjugate that generates oxygen-free radicals in tumor tissue. *Cancer Res*. 60, 666–671, 2000.
- Sahai, E. Illuminating the metastatic process. *Nature Rev. Cancer* 7, 737–749, 2007.
- Schmalhofer, O.; Brabletz, S.; Brabletz, T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 28, 151–166, 2009.
- Schramm, D.D.; Karim, M.; Schrader, H.R.; Holt, R.R.; Cardetti, M.; Keen, C.L. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J Agric Food Chem*. 51(6), 1732-5, 2003.
- Sharquie, K.E.; Najim, R.A. Embalming with honey. *Saudi Medical Journal*. 25, 1755–1756, 2004.
- Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 62(1), 10-29, 2012.
- Singh, R.P.; Dhanalakshmi, S.; Rao, A.R. Chemomodulatory action of *Aloe vera* on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice. *Phytomedicine*. 7(3), 209-219, 2000.
- Stegman, L.D.; Zheng, H.; Neal, E.R.; Ben-Yoseph, O.; Pollegioni, L.; Pilone, M.S.; Ross, B.D. Induction of Cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: a cancer gene therapy strategy. *Hum. Gene Ther*. 9, 185–193, 1998.
- Straub, R.H.; Cutolo, M.; Buttgerit, F.; Pongratz, G. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *J. Intern. Med*. 267, 543–560, 2010.

- Swellam, T.; Miyanaga, N.; Onozawa, M.; Hattori, K.; Kawai, K.; Shimazui, T.; Akaza, H. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: *in vivo* and *in vitro* studies. *Int J Urol.* 10(4), 213-219, 2003.
- Tabolacci, C., Rossi, S., Lentini, A., Provenzano, B., Turcano, L., Facchiano, F., Beninati, S. Aloin enhances cisplatin antineoplastic activity in B16-F10 melanoma cells by transglutaminase-induced differentiation. *Amino Acids.* 44, 293–300, 2013.
- Taube, J.H.; Herschkowitz, J.I.; Komurov, K.; Zhou, A.Y.; Gupta, S.; Yang, J.; Hartwell, K.; Onder, T.T.; Gupta, P.B.; Evans, K.W.; Hollier, B.G.; Ram, P.T.; Lander, E.S.; Rosen, J.M.; Weinberg, R.A.; Mani, S.A. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 15449–15454, 2010.
- Tisdale, M.J.. Biology of cachexia. *J Natl Cancer Inst.* 89, 1763–1773, 1997.
- Tisdale, M.J.. Cancer cachexia. *Curr Opin Gastroenterol.* 26(2), 146-51, 2010.
- Tisdale, M.J.. Catabolic mediators of cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2(4), 256-61, 2008.
- Tisdale, M.J.. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* 89(2), 381-410, 2009.
- Tisdale, M.J.. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology (Bethesda)*; 20, 340–348, 2005.
- Tisdale, M.J. Wasting in cancer. *J Nutr.* 129(suppl 1S), 243S–246S, 1999.
- Tomasin, R., Gomes-Marcondes, M.C., 2011. Oral administration of *Aloe vera* and honey reduces Walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. *Phytother Res.* 25(4), 619-623.
- Tsiapara, A.V.; Jaakkola, M.; Chinou, I.; Graikou, K.; Tolonen, T.; Virtanen, V.; Moutsatsou, P. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chem.* 116, 702–708, 2009.
- Varker, K.A., Ansel, A., Aukerman, G., Carson, W.E. 3rd. Review of complementary and alternative medicine and selected nutraceuticals: background for a pilot study on nutrigenomic intervention in patients with advanced cancer. *Altern Ther Health Med.* 18(2), 26-34, 2012.
- Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y; Fernández-López, J.; Pérez-Alvarez, J.A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci.* 73(9), R117-124, 2008.
- Yang, J.; Weinberg, R.A. Epithelial-mesenchymal transition: At the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell.* 14, 818–829, 2008.

Yoshikawa, T.; Kokura, S.; Tanaka, K.; Naito, Y.; Kondo, M. A novel cancer therapy based on oxygen radicals. *Cancer Res.* 55, 1617–1620, 1995.

Wattenberg, L.W. Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. In: Wattenberg LW, Lipkin M, Boone GJ, Kellof (eds). *Cancer Chemoprevention* CRC Press, Boca Ranton; 19–40, 1986.

Wiedemann, L.M.; Morgan, G.J. How are cancer associated genes activated or inactivated? *Eur J Cancer.* 28(1), 248-51, 1992.

Wolf, K.; Friedl, P. Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clin Exp Metastasis.* 26(4), 289-98, 2009.

CAPÍTULO 1:

“Aloe vera e mel, estresse oxidativo, proteólise e câncer-caquexia.”

Apresentação:

O presente capítulo compreende os resultados acerca dos efeitos modulatórios da administração oral de *Aloe vera* e mel sobre parâmetros corporais, estresse oxidativo e proteólise em ratos Wistar portadores de carcinossarcoma de Walker 256. Foram enfatizados neste artigo: (1) a possível ação do tratamento com *Aloe vera* e mel no quadro de câncer-caquexia, empregando-se análises nos tecidos do hospedeiro (músculo, fígado e coração), (2) efeitos antitumorais desse tratamento e (3) a correlação entre os efeitos desse tratamento observados no hospedeiro e no tecido tumoral.

A dose do homogeneizado de *Aloe vera* e mel administrada aos animais (670ul/kg de peso corporal/dia), utilizada no trabalho publicado anteriormente (Tomasin & Gomes-Marcondes 2011), bem como neste capítulo e nos três subsequentes, foi calculada de acordo com Sistema Alométrico (ou Cálculo de Dosagem por Taxa Metabólica do Animal), através do qual é possível realizar a conversão de doses de medicamentos entre espécies de acordo com suas respectivas taxas metabólicas (Sedgwick, 1993, adaptado pelo Médico Veterinário Paulo Anselmo Nunes Felipe - Responsável pelo Zoológico de Campinas, SP e membro da CEEA/UNICAMP). O cálculo da dosagem para os animais corresponde a 12,5 mL em humanos (homem com peso médio de 70Kg).

O estresse oxidativo tem duplo papel no câncer, estando relacionado tanto a eventos tumorigênicos e a processos de espoliação do hospedeiro, quanto à senescência e apoptose de células cancerosas. Alega-se que tanto a *Aloe vera* quanto o mel possuem propriedades antioxidantes e anticâncer, sendo muitas vezes sugerida sua aplicação como terapia complementar. Assim, avaliamos os efeitos preventivos e terapêuticos da popular associação entre *Aloe vera* e mel sobre a progressão tumoral e espoliação do hospedeiro em ratos portadores de carcinossarcoma de Walker 256. As análises relativas à proteólise, à ação de enzimas antioxidantes e ao estresse oxidativo sugeriram que o tratamento com *Aloe vera* e mel, especialmente na forma terapêutica (administração apenas após a indução do tumor), afetou de maneira diferencial os tecidos hospedeiros e tumoral, reduzindo eventos espoliativos e o quadro de caquexia e, paralelamente, promovendo estresse oxidativo e danos ao tecido tumoral.

Esses resultados foram apresentados a seguir e no manuscrito intitulado “**Oral administration of *Aloe vera* and honey improves the host’s body composition and modulates proteolysis via reduction of tumour progression and oxidative stress in rats.**”, submetido a periódico internacional indexado para publicação.

“Oral administration of *Aloe vera* and honey improves the host’s body composition and modulates proteolysis via reduction of tumour progression and oxidative stress in rats.”

Rebeka Tomasin¹, Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes^{1*}

¹Laboratory of Nutrition and Cancer, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP.

Av. Bertrand Russel, s/no, PO Box 6109, Campinas, 13083970, São Paulo, Brazil

*Corresponding author: Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes

Telephone number: +55-19-3521-6194 / Fax number: +55-19-3521-6185

E-mail address: cintgoma@unicamp.br

KEY WORDS: natural compounds, cancer, cachexia.

ABSTRACT

Oxidative stress has dual role in cancer; it is linked with tumourigenic events and host wasting as well as senescence and apoptosis. Researches have demonstrated the importance of co-adjuvant therapies in cancer treatment, and *Aloe vera* and honey have immunomodulatory, anticancer and antioxidant properties. The preventive and therapeutic effects of *Aloe vera* and honey in tumour progression and host wasting were analysed in Walker 256 carcinoma-bearing rats. The animals were distributed into the following groups: C=control-untreated, W=tumour-untreated, WA=treated after tumour induction, A=control-treated, AW=treated before tumour induction and AWA=treated before and after tumour induction. Proteolysis and oxidative stress were analysed in the tumour, liver, muscle and myocardial tissues. The results suggest that the *Aloe vera* and honey treatment affect the tumour and host by different mechanisms; the treatment modulated host wasting and cachexia, whereas it promoted oxidative stress and damage in tumour tissues, particularly in a therapeutic context (WA).

INTRODUCTION

Oxidative stress has a dual role in cancer; it is linked to several tumourigenic and host wasting events (Mantovani *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006; Toykuni, 2008; Tisdale, 2009) as well as senescence and cell death, the major mechanisms involved in cancer control (Fang *et al.*, 2009). While moderate levels of oxidative stress contribute to DNA mutation as well as increased proliferation and metastatic capacity (Halliwell & Gutteridge, 1999; Sosa *et al.*, 2013), numerous conventional anticancer drugs, including vinblastine, doxorubicin, camptothecin, cisplatin and inotamycin, exhibit antitumor activity via reactive oxygen species generation, thereby promoting excessive oxidative stress, senescence and cell death in cancer cells (Fang *et al.*, 2009).

Cancer patients may show progressive weight loss, oedema, muscle and adipose tissue atrophy and fatigue as a result of host-catabolic processes, involving oxidative stress and proteolysis, driven by the tumour. These events characterise a syndrome known as cachexia

that affects approximately 30-80% of the patients depending on tumour type, jeopardising quality of life and survival (Tisdale, 2009).

Over the last decades, researches have demonstrated that the use of complementary and co-adjuvant therapies can improve the prognosis and quality of life for cancer patients (Montbriand, 2004; Feng *et al.*, 2011). *Aloe vera* (Linne, family Liliaceae) possesses some pharmacological activities, including immunomodulatory, antioxidant and anticancer properties (Eshun & He, 2004). *Aloe vera* increases the hepatic levels of antioxidant and drug-metabolising enzymes and decreases oxidative stress in mice (Singh *et al.*, 2000). In contrast, numerous *Aloe vera* compounds have been reported to generate oxidative stress and apoptosis in cancer cells *in vitro* (Lu *et al.*, 2007; Nićiforović *et al.*, 2007). Concurrently, studies have demonstrated that honey and its phenolic compounds may possess anticancer and antioxidant activities. Indeed, a sustained inverse relationship between honey consumption and cancer development has been reported (Othman, 2012).

Despite the fact that cancer patients commonly use the combination of *Aloe vera* and honey as a complementary therapy, few studies demonstrating real benefits of this association have been reported (Lissoni *et al.*, 2009; Tomasin & Gomes-Marcondes, 2011). Therefore, this study aims to evaluate the effects of *Aloe vera* and honey treatment on oxidative stress and proteolysis in the host and tumour tissues of Walker 256 tumour-bearing rats.

MATERIALS AND METHODS

Aloe vera and honey solution:

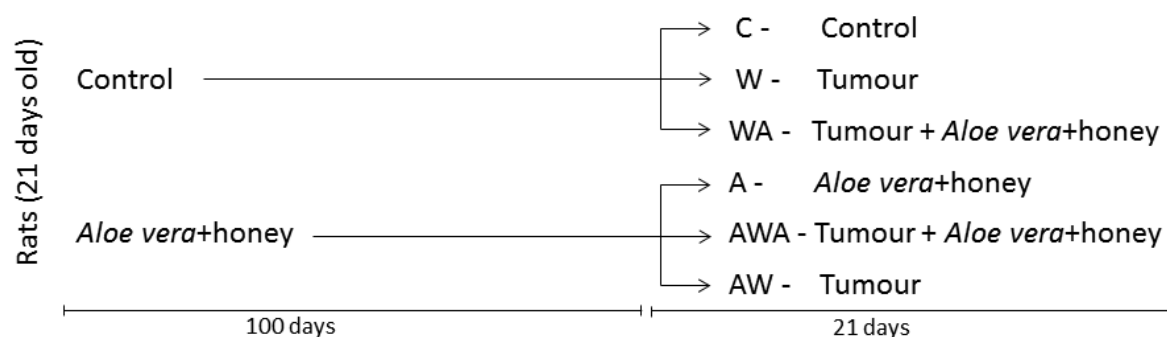
The *Aloe vera* and honey solution was prepared using mature and healthy *Aloe vera* leaves (500 g) collected from the greenhouse at the State University of Campinas/SP Brazil. Whole leaves were homogenised with wildflower honey (500 g, Lambertucci Ltda, Rio Claro, Brazil) in aseptic conditions and maintained in dark vials at 4°C (Zago, 2004).

Experimental protocol:

Adult male Wistar rats (21-days-old, approximately 50 g body weight) were initially divided into two groups: (1) The control (C) (n=30) group received 670 µL/kg of 0.9%

NaCl solution daily by gavage, and (2) the *Aloe vera* and honey-treated group (A) (n=30) was gavaged with a 670 $\mu\text{L/kg}$ dose of the *Aloe vera* and honey solution daily. At the age of 100 days, the rats were redistributed according to the Walker 256 carcinoma subcutaneous implantation (2×10^6 viable tumour cells/rat in 0.5 mL inoculum) and treatment.

The control group was divided into three subsets: the control (C, n=10) and tumour-control (W, n=10) groups continued to receive 670 $\mu\text{L/kg}$ of 0.9% NaCl solution daily, while the tumour-*Aloe vera* + honey group (WA, n=10) received 670 $\mu\text{L/kg}$ of the *Aloe vera* and honey solution after the tumour induction. Concurrently, the *Aloe vera* and honey-treated group was also divided into three subsets: the control-*Aloe vera* + honey (A, n=10) and *Aloe vera* + honey-tumour-*Aloe vera* + honey (AWA, n=10) groups continued to receive 670 $\mu\text{L/kg}$ of the *Aloe vera* and honey solution daily, while the *Aloe vera* + honey-tumour (AW, n=10) group received the 0.9% NaCl solution daily after the tumour implant. The groups are outlined in the scheme below.



During the entire experimental protocol, the animals were kept in an air-conditioned room with a 12-hour light–12-hour dark cycle, with free access to water and commercially available food. They were monitored for weight gain weekly and sacrificed 21 days after tumour induction. The tumours, livers, gastrocnemius muscles, hearts and carcasses were collected for further analysis.

The general guidelines of the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research for animal welfare were followed (Vale *et al.*, 2005), and the experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (CEEA.IB/UNICAMP, protocol # 1400-1 and #2537-1).

Body composition analysis:

The carcass (body without the tumour and gastrointestinal tract) was weighed and dried at 55°C until a constant weight was obtained. The carcass water was determined as the difference between the dry and wet weights. The carcass was homogenised, and a 10 g sample was used for fat extraction by petroleum ether; the total body fat was calculated as the difference between the initial sample weight (10 g) and the final sample weight (without fat) in proportion to the whole body weight. Additionally, aliquots of the carcass after water and fat extraction were analysed for total and collagen nitrogen content using a colorimetric micro-Kjeldahl method (Albanese & Orto, 1963). The non-collagen nitrogen was calculated by subtracting the collagen nitrogen from the total nitrogen content.

Oxidative stress and proteolysis evaluation:

Tissue samples from the liver, heart, gastrocnemius muscle and tumour were weighed, homogenised in PBS, and centrifuged for 15 min at 10000 rpm. The supernatant was collected for biochemical analysis. The samples were maintained on ice and assayed in duplicate.

The total protein content of the samples, used to normalise the enzymatic activities, was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Superoxide dismutase (SOD) activity was assessed by measuring the degradation of horseradish peroxide and dimethylaniline in the presence of 4-aminofenazon and riboflavin following the method described by Tang and colleagues (Tang *et al.*, 2002), and the data are expressed as arbitrary units* $\mu\text{g protein}^{-1}$. Catalase activity was measured in the presence of hydrogen peroxide (final concentration 6 mM) as described by Cohen and colleagues (Cohen *et al.*, 1970), and the results are expressed in $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g protein}^{-1}$. Glutathione-S-transferase (GST) activity ($\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g protein}^{-1}$) was determined following the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) with glutathione (Habig *et al.*, 1974). The malondialdehyde (MDA) content ($\eta\text{mol}\cdot\mu\text{g protein}^{-1}$) was determined using the substrate n-methyl-2-phenylindole (MPO) (Gomes-Marcondes & Tisdale, 2002).

Once the GST activity and MDA content were determined, the MDA/GST ratio was calculated.

The chymotrypsin-like activity was determined using the fluorogenic substrate succinyl-Leu-Leu-Val-Try-7-amino-4-methylcoumarin (Suc LLVY-AMC; Calbiochem, Boston, MA, USA) in Tris-HCl, pH 7.4). The fluorescence (excitation: 360 nm, emission: 460 nm) was measured, and the results are expressed as arbitrary units* $\mu\text{g protein}^{-1}$.

Calpain activity was measured by incubating the samples in 50 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.5) containing 10 mM β -mercaptoethanol, 1.0 mM NaN_3 and 4 mg/mL casein. Next, 5 mM CaCl_2 was added to activate calpain and initiate the hydrolysis reaction and the absorbance (540nm) was measured. The results are expressed as arbitrary units* $\mu\text{g protein}^{-1}$ (Jiang *et al.*, 1997).

Alkaline phosphatase activity was measured using 37 mM 4-nitrophenyl disodium phosphate (p-NPP) and expressed as $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ug protein}^{-1}$ (Martins *et al.*, 2001).

Statistical analysis:

The results are expressed as the mean $\pm$ SEM (Standard Error of Mean). The comparisons among all groups were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. When necessary, further analyses between selected groups were performed using an unpaired *t*-test. The *p* values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the Graph Pad Prism software (v3.00 for Windows 98, USA) (Gad & Weil, 1994).

RESULTS

The body parameter data are presented in Table 1. Positive weight gain was observed in the healthy rats (groups C and A), while the Walker 256 tumour-bearing groups displayed some degree of weight loss during tumour development (21 days). Remarkably, only rats from the W and AWA groups experienced significant weight reductions. Additionally, significantly reduced tumour sizes were exclusively observed in the WA group.

Table 1. Body parameters in the tumour-bearing rats that were either untreated or treated with the *Aloe vera* and honey solution.

Parameter \ Group		C	W	WA	A	AW	AWA
Tumour weight (%) §		-	12.60±1.48	4.63±2.41*	-	8.69±1.40	14.18±1.39
Body weight at injection time		431.4±15.99	430.6±10.53	434.5±9.057	434.7±12.72	426.2±7.275	428.9±9.822
Final body weight (g)		468.2±15.97	426.3±10.62	456.6±11.85	469.2±13.00	435.9±13.70	435.5±11.70
Weight gain (%) §§		7.97±2.964	-11.64±3.92*	-3.93±4.21	6.45±0.87	-6.68±4.48*	-10.81±2.53*
Carcass (%) §§§		83.72±0.60	70.93±1.45*	73.21±3.07*	81.60±0.49	73.77±1.09*	70.21±1.28*
Water (%)		62.89±0.41	65.54±0.36	64.68±0.46	62.35±0.31	64.34±1.30	65.80±0.76
Fat Content (%)		8.70±0.50	6.62±0.62*	8.54±1.14	9.71±0.83	6.98±0.56*	7.65±0.68
Albumin content (g/dL)		4.53±0.07	3.65±0.14*	3.96±0.24	4.91±0.15	3.97±0.28	3.42±0.23*
Nitrogen Content (µg/mg tissue)	Total	18.46±0.73	17.23±0.75	19.38±0.58	18.70±0.33	19.39±0.77	18.88±0.31
	Collagen	6.432±0.69	5.034±0.69	7.125±0.72	6.509±0.70	7.483±0.70	6.653±0.24
	Non-Collagen	12.03±0.28	12.20±0.26	12.25±0.27	12.19±0.44	11.91±0.20	12.23±0.38

Legend: AH - *Aloe vera* and honey solution. C, Control rats; W, tumour-bearing rats; WA, tumour-bearing rats administered AH after tumour injection; A, control treated with AH; AW, tumour-bearing rats administered AH before tumour injection; AWA, tumour-bearing rats administered AH before and after tumour injection.

* $p < 0.05$ in comparison with the C group (one-way ANOVA and Bonferroni test)

§ Relative tumour weight (%) was calculated as [tumour weight (g) / final body weight (g)] *100.

§§ Weight gain (%) was calculated as {[final body weight (g) – tumour weight (g)] – body weight before tumour injection (g) / body weight before tumour injection (g)}*100.

§§§ Carcass relative weight (%) was calculated as [fresh carcass weight (body without the gastrointestinal tract and tumour) (g) / final body weight (g)]*100.

In the assessment of body composition parameters (Table 1), the carcass water content increased in all of the Walker 256-tumour bearing groups, whereas the fat content significantly decreased exclusively in the groups not treated with the *Aloe vera* and honey solution during the tumour development (W and AW). In addition, the total body nitrogen content also tended to be decreased exclusively in untreated rats (W, $P=0.1344$). The plasma albumin levels decreased in all tumour-bearing groups, but the reduction is only significant in W and AWA groups (Table 1).

The analyses of the proteolytic enzymes calpain and chymotrypsin in the tumour and host tissues (gastrocnemius muscle, liver and heart) are presented in Figure 1. Chymotrypsin activity significantly increased in the liver and tended to be increased

($P=0.0988$) in the myocardial tissues of the untreated rats (W), while is maintained in the groups treated with the *Aloe vera* and honey solution during the tumour development (WA and AWA) (Figure 1 A-D). Moreover, calpain activity tended to be increased in the liver ($P=0.0735$), gastrocnemius muscle ($P=0.0780$) and tumour tissues ($P=0.0897$) only in the untreated group (W) (Figure 1 E-H). In addition, alkaline phosphatase activity, decreased in the cardiac tissues of the W, A, AW and AWA rats as well as the tumour tissues of the WA group (Figure 1, I-L).

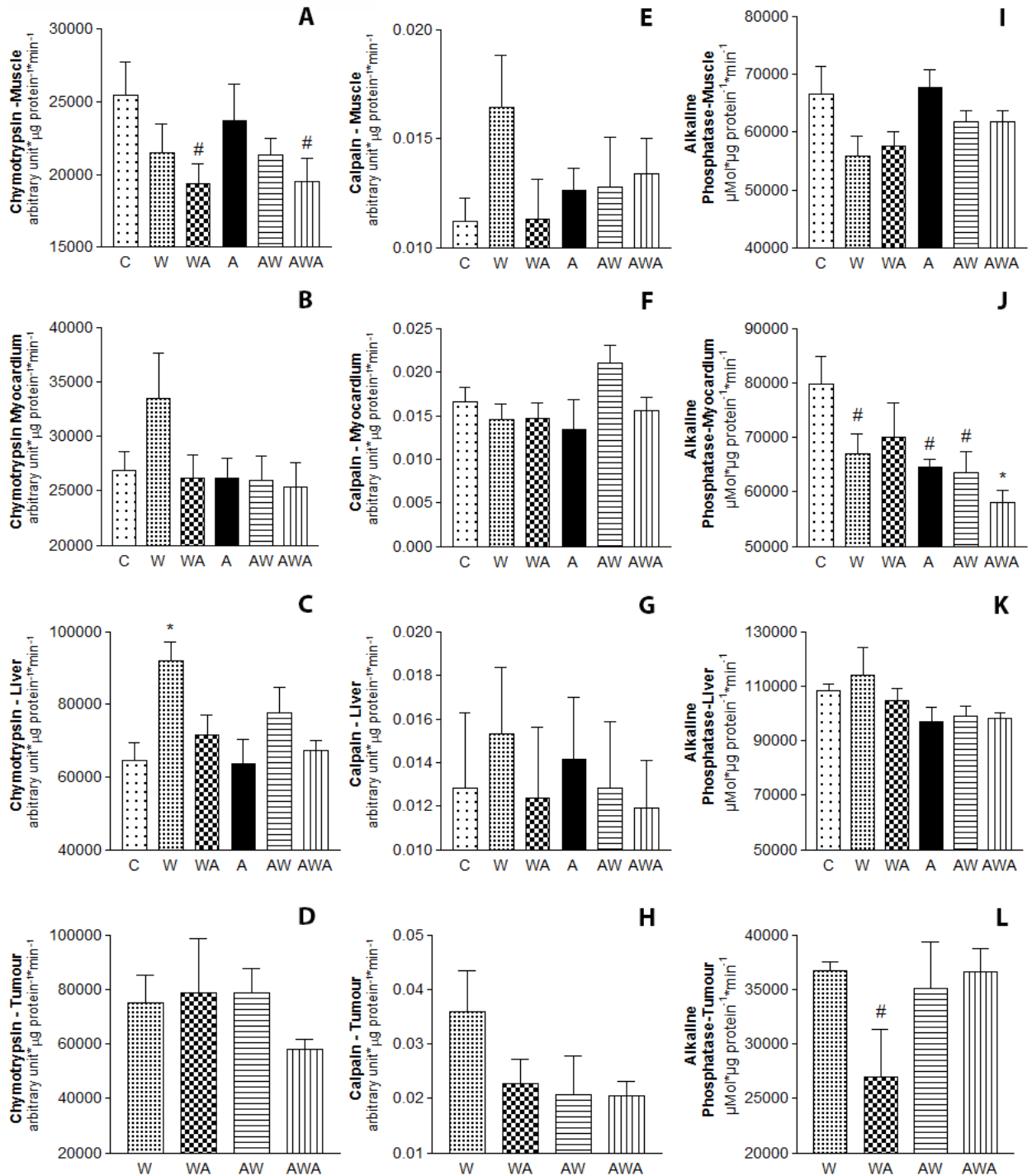


Figure 1. Chymotrypsin-like (A-D), calpain (E-H) and alkaline phosphatase (I-L) activities in the muscle, myocardium, liver and tumour tissues of the tumour-bearing animals treated with or without the *Aloe vera* and honey solution. C=Control, W=Tumour-Control WA=Tumour-Aloe vera+honey, A=Control-Aloe vera+honey, WA=Aloe vera+honey-Tumour and AWA=Aloe vera+honey-Tumour-Aloe vera+honey. The minimum number of animals per group was 10. *P<0.05 in comparison with the C group (one-way ANOVA and Bonferroni test); #P<0.05 in comparison with the C group (unpaired T-test).

The activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (Cat) as well as the MDA/GST ratios are presented in Figure 2. SOD activity decreased in liver tissues of the W, AW and AWA groups as well as the muscles of the AWA group. Increased SOD activity was observed in the WA tumours (Figure 2, A-D). Catalase activity decreased in the myocardial tissues of the W and AWA rats and tended to progressively decrease in the tumours through the groups treated with the *Aloe vera* and honey solution (WA, AW and AWA; respectively; Figure 2, E-H).

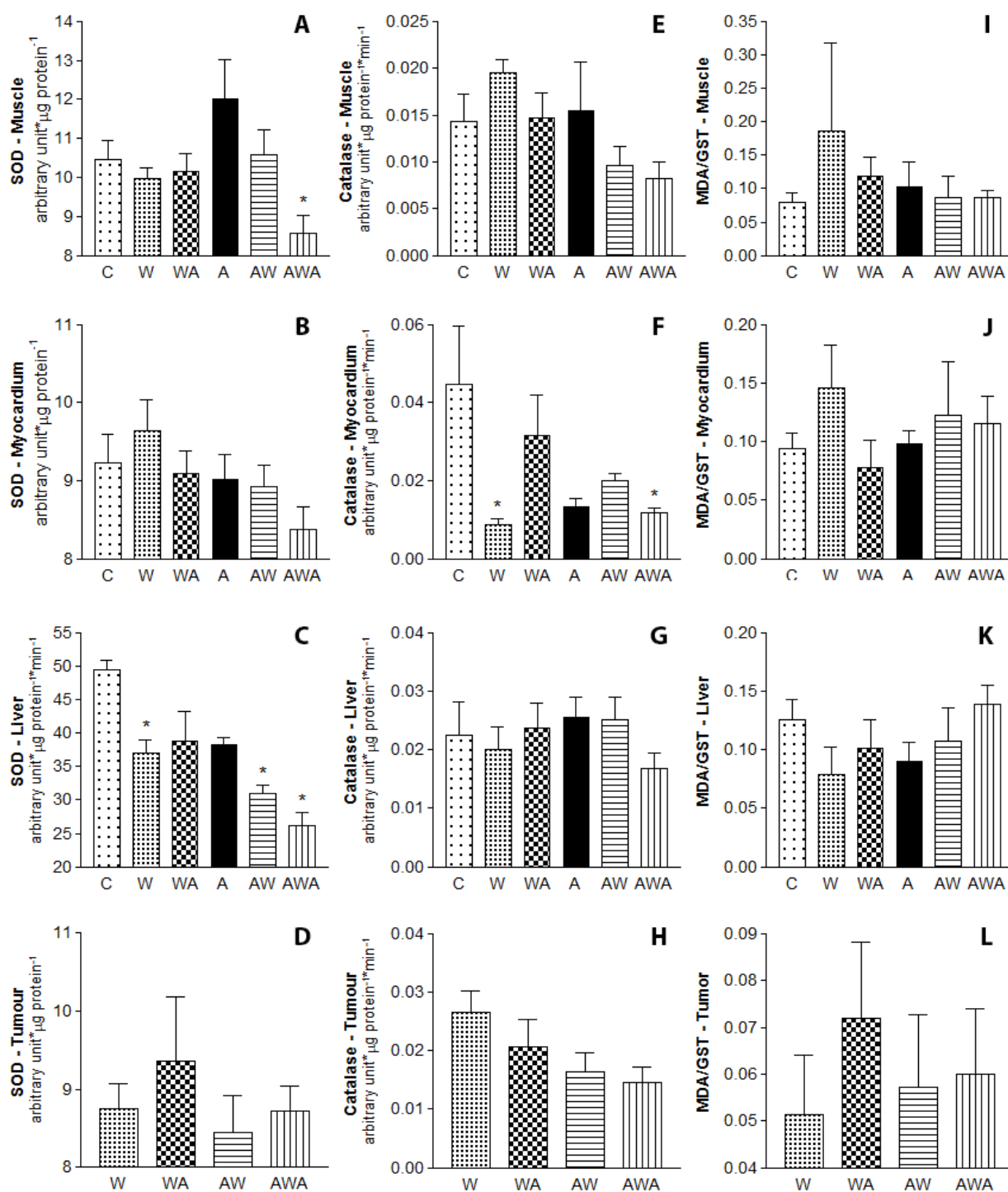


Figure 2. Superoxide dismutase (A-D) and catalase (E-H) activities as well as the MDA/GST ratios (I-L) in the muscle, myocardium, liver and tumour tissues of the tumour-bearing rats treated with or without the *Aloe vera* and honey solution. C=Control, W=Tumour-Control WA=Tumour-*Aloe vera*+honey, A=Control-*Aloe vera*+honey, WA=*Aloe vera*+honey-Tumour and AWA=*Aloe vera*+honey-Tumour-*Aloe vera*+honey. The minimum number of animals per group was 10. *P<0.05 in comparison with the C group (one-way ANOVA and Bonferroni test).

Finally, the MDA/GST ratio, an indicator of oxidative stress, tended to increase in the muscles ($P=0.0591$) and hearts ($P=0.0752$) of the untreated rats (W). In addition, this ratio tended to increase in tumours of the rats treated with the *Aloe vera* and honey solution after the tumour induction (WA; $P=0.0698$; Figure 2, I-L).

DISCUSSION

One of the greatest challenges in cancer therapy is inducing tumour cell death without inflicting harm to the host. Complementary therapy studies are now being conducted, and this work shows that phytotherapies, such as *Aloe vera* and honey, have the potential to affect the tumour development while minimising cachectic processes in the host.

The Walker 256 carcinoma is a widely used cancer-cachexia model that mimics the human syndrome. According to data presented here, indeed the tumour development leads to a significant decrease in weight gain, fat content and carcass mass. These decreases were attenuated by the *Aloe vera* and honey solution, particularly when the solution was administered exclusively after tumour induction (WA group). During cancer-induced cachexia, albumin production is decreased and its degradation is enhanced. In fact, in this work, the albumin content decreased in all tumour-bearing groups, but this depletion was significant only in the W and AWA groups. In parallel, the water content also tended to be increased in all tumour bearing groups, accompanying the decreased plasma albumin content, which is consistent with the fact that albumin maintains the colloid osmotic pressure.

Cachexia is also known to induce additional protein catabolism processes that first target the extracellular compartment, and then, extend to skeletal muscle cells, promoting atrophy and apoptosis. (Tisdale, 2009; Suzuki *et al.*, 2013). Evidence for extracellular protein mobilisation is observed in the tendency of decreased body collagen nitrogen content in the untreated Walker-256-bearing rats (W), not in the other treatment groups. This finding suggests that the *Aloe vera* and honey solution might be beneficial to the host.

The host wasting process observed during cancer-induced cachexia is complexly regulated by tumour cell release of proteolysis and lipolysis factors and specific immune

system activation that results in chronic inflammation and increased reactive oxygen species in host tissues (Mantovani *et al.*, 2004; Tisdale, 2009). This process, mediated by tumour factors and cytokines, is capable of regulating not only the proteolysis/lipolysis machinery but also the cellular antioxidant system (Mantovani *et al.*, 2004; Tisdale, 2009).

Aloe vera has been reported to contain various immunomodulatory compounds (Eshun & He, 2004, Lissoni *et al.*, 2009). Therefore, we hypothesise the *Aloe vera* and honey therapy reduces chronic inflammation and oxidative stress and catabolism via modulation of the activities of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase. SOD characterises the first defence against oxidative stress and catalyses the dismutation of the superoxide anion (O_2^-) into oxygen and hydrogen peroxide (H_2O_2), which is subsequently converted into water and oxygen by catalase (Winterbourn, 2008).

In this work, numerous observations suggest that the *Aloe vera* and honey treatment may attenuate cancer-induced cachexia associated with skeletal muscle wasting. One example is the trend of increase in calpain activity and MDA/GST levels which were particularly apparent in untreated tumour-bearing rats (W), but not in *Aloe vera* and honey treated rats (especially those of the WA group). Given that the cysteine protease calpain integrates the calcium-dependent protein degradation pathway, which is known to be activated in muscles during cancer-induced cachexia (Costelli *et al.*, 2005; Tisdale, 2009) and involved in cell death (Lopatiniuk & Witkowski, 2011), the *Aloe vera* and honey solution potentially decreased host-wasting processes via modulation of this pathway. In addition, the rats treated with *Aloe vera* and honey after tumour induction (WA and AWA) displayed a significant decrease in the chymotrypsin-like activity in the gastrocnemius muscle. The chymotrypsin-like activity corresponds to the catalytic core of the 20S subunit of the ubiquitin–proteasome pathway, which is considered to be the most important pathway for intracellular protein degradation under catabolic conditions (Lecker *et al.*, 1999). Although we observed no increase in chymotrypsin-like activities in the muscle tissues of untreated tumour-bearing rats (W), these animals had alterations in other parameters consistent with a cachectic status, such as decreased body weight, body fat and trend of a decrease in nitrogen content, increased chymotrypsin-like activity in the myocardial and liver tissues and increased MDA/GST ratio in the gastrocnemius muscles.

Malondialdehyde (MDA) is a product from membrane phospholipid peroxidation. In high levels, MDA can bind to nucleic acids to form adducts, resulting in DNA mutations (Volgaridou *et al.*, 2011). In contrast, glutathione-S-transferase is a phase II detoxification enzyme that is responsible for the conjugation of glutathione to MDA, promoting MDA removal, thus, high MDA/GST ratio is an indicative of oxidative stress (Board & Menon, 2013). Our data suggest that *Aloe vera* and honey might modulate muscle wasting by reducing the chymotrypsin-like activity in the WA and AWA groups as well as simultaneously modulating antioxidant enzymes to lower the MDA/GST ratio, as observed in WA, AW and AWA groups relative to the untreated group (W).

Recently, cancer-induced cachexia has been reported to cause cardiac alterations and atrophy in mouse models (Tian *et al.*, 2010; 2011). Our experiments in rats also suggest that heart damage occurs, as we observed a tendency toward an increase in chymotrypsin-like activity and oxidative stress in the untreated Walker-256 bearing rats (W group). The observed tendency of increase in MDA/GST levels, which was particularly apparent in the W group, could result from an imbalance in superoxide dismutase and catalase activities. The combination of increased SOD activity and significantly decreased catalase activity may result in hydrogen peroxide accumulation and MDA production (Fang *et al.*, 2009). The SOD and catalase activities in cardiac tissues of the rats treated with the *Aloe vera* and honey solution after tumour induction (WA) were maintained, leading to a balanced MDA/GST ratio.

In addition to muscular, adipose and cardiac tissues, cachexia also severely affects the liver by disrupting of the homeostatic balance between anabolism and catabolism to promote persistent catabolic status corroborating to the cachectic process and/or by promoting the same alterations observed in other host tissues (e.g., oxidative stress, catabolism and cell death) (Jones *et al.*, 2013). In the present study, chymotrypsin-like activity increased and calpain activity tended to increase in the livers of the untreated tumour-bearing rats (W); however, these changes were not present or significant in the *Aloe vera* and honey treated rats (WA, AW and AWA). Altogether, these results suggest a protective role for *Aloe vera* and honey treatment in hepatic tissues, particularly in the WA

group. Indeed, *Aloe vera* has been reported to have hepatoprotective activity (Gbadegesin *et al.*, 2009).

Several studies have demonstrated both *Aloe vera* and honey possess antioxidant properties, and synergism of some of their compounds cannot be discounted (Eshun & He, 2004). *Aloe vera* specifically activates SOD, catalase and phase II enzymes (including GST) in organs such as the liver, lungs, kidney and forestomach (Singh *et al.*, 2000). Honey flavonoids and phenolic compounds increase the serum antioxidant capacity in health human subjects (Schramm, 2003) and increase antioxidant enzyme activities in mice (Fernandez-Cabezudo *et al.*, 2013).

Although several data suggest that the *Aloe vera* and honey solution is beneficial to the host, the observed results are likely indirect. The majority of the benefits were observed in the WA group, and this group presented the smallest tumours. The production of tumour factors that promote the development of cancer cachexia syndrome would be compromised in tumours of reduced volume, thereby resulting in a reduction in the general host wasting process.

In fact, analysing the tumour tissue itself, we noticed a tendency of decrease in calpain activity in the tumours of the *Aloe vera* and honey treated groups (WA, AW and AWA) compared with the untreated group (W), suggesting that the *Aloe vera* and honey solution modulates calpain's pro-tumourigenic activities. Calpain expression is often increased in aggressive tumours and it is linked to cell migration and survival (Storr *et al.*, 2011). In addition, reduced alkaline phosphatase activity is observed in the WA tumours, suggesting decreased cell activity. In this case, reduced cell activity could be indicative of cell death or senescence, both of which were previously reported to occur in response to *Aloe vera* or honey compounds (Tomasin & Gomes-Marcondes, 2011; Jaganathan & Mandal, 2009). Importantly, the WA tumours, which were the smallest on average among the groups, displayed tendency of increase in SOD activity and no alterations in catalase activity. The subsequent increase in oxidative stress (MDA/GST ratio) is consistent with the notion that the *Aloe vera* and honey treatment leads to oxidative stress and cell death in cancer cells. A previous study reported that an increase in SOD activity without a concomitant increase in catalase activity in cancer cells (as observed in the WA tumours)

results in oxidative stress via hydrogen peroxide accumulation (Fang *et al.*, 2009). These observed effects are in agreement with a study that treated lymphoma-bearing mice with emodin, an active compound found in *Aloe vera* (Singh & Trigun, 2013).

Indeed, the effects observed in the WA-treated tumours are similar to those proposed by the “oxidative therapy,” which comprises various strategies to increase oxidative stress to lethal levels in tumour cells (Fang *et al.*, 2009; Trachootham *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2012). These strategies include the inhibition of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione-S-transferase, to promote the accumulation of reactive oxygen species, which lead to cell damage and cell death (Huang *et al.*, 2000). Such approaches appear to be very promising in cancer therapy, and their application has recently increased (Gupta *et al.*, 2012).

Thus, the achievements of this work provide evidence that the *Aloe vera* and honey solution decreased host wasting and also increased oxidative stress in tumour cells, particularly when administered therapeutically (immediately after tumour induction, group WA), by differentially modulating antioxidant and proteolysis enzymes in the host and tumour tissues. The mechanisms responsible for these effects might include the deleterious actions of various *Aloe vera* and honey compounds (aloin, aloe-emodin, acemannan and flavonoids) on tumour cells, which might result in indirect effects on the host tissues. These mechanisms may also include immune system modulation as well as altering the chronic proinflammatory status of cancer-induced cachexia. Certainly, several compounds in *Aloe vera* and honey synergised to generate the observed effects in this model, and our group is still working to elucidate both the compounds and the mechanisms involved in *Aloe vera* and honey-mediated modulation of the cancer-cachexia syndrome and tumour growth.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the financial support of FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, #2010/00209-9) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; #304604/2010-0). R. Tomasin, MSc was supported by a scholarship sponsored by FAPESP (Grant #2007/05788-4 and #2010/00714-5). The manuscript was edited for correct English language, by native English

speaking editors at American Journal Experts (Certificate number 8EF3-A3CE-B828-1C26-82F8).

REFERENCES

- Albanese AA, Orto LA. (1963). Protein and amino acids. In: Albanese AA, ed. *Newer methods of nutritional biochemistry*. New York: Academic Press 84.
- Board PG, Menon D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta* 1830(5):3267-88.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248e54.
- Cohen G, Dembiec D, Marcus J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 34:30e8.
- Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, Baccino FM. (2005). Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 37(10):2134-46.
- Eshun K, He Q. (2004) *Aloe vera*: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries--a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44(2):91-6.
- Fang J, Seki T, Maeda H. (2009). Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:290–302.
- Feng Y, Wang N, Zhu M, Feng Y, Li H, Tsao S. (2011) Recent progress on anticancer candidates in patents of herbal medicinal products. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 3(1):30-48.
- Fernandez-Cabezudo MJ, El-Kharrag R, Torab F, Bashir G, George JA, El-Taji H, al-Ramadi BK. (2013). Intravenous administration of manuka honey inhibits tumor growth and improves host survival when used in combination with chemotherapy in a melanoma mouse model. *PLoS One* 8(2):e55993.
- Gad SC, Weil CS. (1994). Statistic for toxicologists. In *Principles and Methods of Toxicology*, Wallace H (ed.). Raven Press: New York, 221–274.
- Gbadegesin MA, Odunola OA, Akinwumi KA, Osifeso OO. (2009). Comparative hepatotoxicity and clastogenicity of sodium arsenite and three petroleum products in experimental Swiss Albino Mice: The modulatory effects of *Aloe vera* gel. *Food and Chemical Toxicology* 47:2454–2457.
- Gomes-Marcondes MC, Tisdale MJ. (2002). Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett* 180:69e74.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakobi WB. (1974). Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130e9.
- Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal* 16(11):1295-322.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (Eds.). (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, NJ, USA, pp. 617–859.

- Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating ML, Plunkett W. (2000). Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* 407; 390–395.
- Jaganathan SK, Mandal M. (2009). Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *J Biomed Biotechnol.* 2009:830616.
- Jiang ST, Wang JH, Chang T, Chen CS. (1997). A continuous method for measuring calpain activity. *Anal Biochem* 244:233–238.
- Jones A, Friedrich K, Rohm M, Schäfer M, Algire C, Kulozik P, Seibert O, Müller-Decker K, Sijmonsma T, Strzoda D, Sticht C, Gretz N, Dallinga-Thie GM, Leuchs B, Kögl M, Stremmel W, Diaz MB, Herzig S. (2013). TSC22D4 is a molecular output of hepatic wasting metabolism. *EMBO Mol Med.* 5(2):294-308.
- Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. (1999). Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitinproteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr* 129:227–237.
- Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Zago R, Colciago M, Messina G, Mora A, Porro G. (2009). A Randomized Study of Chemotherapy Versus Biochemotherapy with Chemotherapy plus *Aloe arborescens* in Patients with Metastatic Cancer. *In vivo* 23:171-176.
- Lopatniuk P, Witkowski JM. (2011). Conventional calpains and programmed cell death. *Acta Biochim Pol* 58(3):287-96.
- Lu GD, Shen H-M, Chung MCM, Ong CN. (2007). Critical role of oxidative stress and sustained JNK activation in aloe-emodin-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells. *Carcinogenesis* 28(9): 1937–1945.
- Mantovani G, Madeddu C, Maccio A, Gramignano G, Lusso MR, Massa E, Astara G, Serpe R. (2004). Cancer-Related Anorexia/Cachexia Syndrome and Oxidative Stress: An Innovative Approach beyond Current Treatment. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(10) 1651-59.
- Martins MJ, Negrao MR, Hipolito-Reis C. (2001). Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. *Clin Biochem* 34:463e8.
- Montbriand MJ. (2004). Herbs or Natural Products that Decrease Cancer Growth. Part One of a Four-Part Series. *Oncology Nursing Forum* – Vol 31, No 4, pp E75-E90.
- Nićiforović A, Adžić M, Spasić SD, Radojčić MB. (2007). Antitumor Effects of a Natural Anthracycline Analog (Aloin) Involve Altered Activity of Antioxidant Enzymes in HeLaS3 Cells. *Cancer Biology & Therapy* 6:8, 1-e6.
- Othman NH. (2012). Honey and Cancer: Sustainable Inverse Relationship Particularly for Developing Nations—A Review. *e-CAM* 2012:410406.
- Schramm DD, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Cardetti M, Keen CL. (2003). Honey with High Levels of Antioxidants Can Provide Protection to Healthy Human Subjects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1732-1735.
- Sedgwick, C.J. Allometric scaling and emergency care: the importance of body size. *In: Fowler, M.E. Zoo & wild animal medicine.* 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p.34-37. Shay, J.W.; Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 33, 787–791, 1997.

- Singh KB, Trigun SK. (2013). Apoptosis of Dalton's lymphoma due to in vivo treatment with emodin is associated with modulations of hydrogen peroxide metabolizing antioxidant enzymes. *Cell Biochem Biophys* 67(2):439-49.
- Singh RP, Dhanalakshmi S, Rao AR. (2000). Chemomodulatory action of *Aloe vera* on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice. *Phytomedicine*. 7(3):209-19.
- Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Leonart ME. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev*. 12(1):376-90.
- Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, Martin SG. (2011). The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer* 11(5):364-74.
- Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Nakamura N, Inui A. (2013). Cancer cachexia - pathophysiology and management. *J Gastroenterol*. 48(5): 574–594.
- Tang B, Wang Y, Chen ZZ. (2002). Catalytic spectrofluorimetric determination of superoxide anion radical and superoxide dismutase activity using N,N-dimethylaniline as the substrate for horseradish peroxidase (HRP). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 58(12):2557-62.
- Tian M, Asp ML, Nishijima Y, Belury MA. (2011). Evidence for cardiac atrophic remodeling in cancer-induced cachexia in mice. *International Journal of Oncology* 39: 1321-1326.
- Tian M, Nishijima Y, Asp ML, Stout MB, Reiser PJ, Belury MA. (2010). Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. *International Journal of Oncology* 37: 347-353.
- Tisdale MJ. (2009). Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev*. 89(2):381-410.
- Tomasin R, Gomes-Marcondes MC. (2011). Oral administration of Aloe vera and honey reduces Walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. *Phytother Res* 25(4):619-23.
- Toyokuni S. (2008). Molecular Mechanisms of Oxidative Stress-induced Carcinogenesis: From Epidemiology to Oxygenomics. *Life* 60(7): 441–447.
- Trachootham D, Alexandre J, Huang P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8(7):579-91.
- Vale C, Stewart L, Tierney J. (2005). UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer. Trends in UK cancer trials: results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials. *Br J Cancer* 92: 811–814.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160:1–40.
- Voulgaridou GP, Anestopoulos I, Franco R, Panayiotidis MI, Pappa A. (2011). DNA damage induced by endogenous aldehydes: current state of knowledge. *Mutat Res*. 3;711(1-2):13-27.
- Winterbourn CC. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4(5):278-86.
- Zago R. (2004). *Babosa Não é Remédio Mas Cura!.* 3rd Edition. Sao Paulo, Editora Vozes, pp 1–128.

CAPÍTULO 2:

“*Aloe vera* e mel e modulação do potencial metastático”

Apresentação:

Este capítulo abrange os possíveis efeitos do homogeneizado de *Aloe vera* e mel e de seu extrato etanólico sobre o tecido tumoral primário, no que diz respeito a características relacionadas à propensão ao surgimento de metástases. Entre elas está o *switch* de caderinas, a degradação de matriz extracelular e a vascularização. As análises dos tumores primários demonstraram que houve diminuição da expressão da caderina-N, com concomitante aumento da expressão de caderina-E em animais tratados com o extrato etanólico, mais pronunciadamente com o tratamento com homogeneizado de *Aloe vera* e mel do que com o extrato etanólico. Da mesma maneira, o número e o diâmetro dos vasos sanguíneos, assim como a atividade da catepsina-D diminuíram nos dois grupos tratados, sobretudo no grupo tratado com *Aloe vera* e mel, em comparação ao controle-tumor não tratado. Esses dados sugerem que a *Aloe vera* e o mel podem diminuir a propensão à metástase, modulando as etapas iniciais deste processo que ocorrem ainda no tumor primário, tais como transição epitélio-mesenquimal e angiogênese. Ainda, o processo de extração diminuiu as substâncias responsáveis por esses efeitos, uma vez que os efeitos observados sobre os tumores de animais tratados com o extrato etanólico, embora presentes, foram menos proeminentes do que aqueles observados nos animais tratados com o homogeneizado bruto de *Aloe vera* e mel.

Esses resultados também foram apresentados na forma de manuscrito intitulado “**A solution of *Aloe vera* and honey and its ethanolic extract impair the metastatic ability of Walker 256 tumour tissues *in vivo*.**”, submetido a periódico internacional indexado para publicação, como apresentado a seguir.

A solution of *Aloe vera* and honey and its ethanolic extract impair the metastatic ability of Walker 256 tumour tissues *in vivo*.

A solution of *Aloe vera* and honey reduces metastatic potential

**Rebeka Tomasin^a, Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal^b, Marcos José Salvador^b
and Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes^{a,*}**

^a*Laboratory of Nutrition and Cancer, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, 13083-970, São Paulo, Brazil*

^b*Graduate Program in Biosciences and Technology of Bioactive Products, Pharmacy course, State University of Campinas, Campinas, 6109, São Paulo 13083-970, Brazil*

***Corresponding author: Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes**
Telephone number: 55-19-3521-6194
Fax number: 55-19-3521-6185
E-mail address: cintgoma@unicamp.br

ABSTRACT

The ability of cancer cells to detach from the primary tumour depends on several cellular processes, including the degradation of the extracellular matrix and an epithelial-to-mesenchymal transition, and some features of the tumour microenvironment, such as vascularisation. Research has shown that both *Aloe vera* and honey have anticancer properties, including the inhibition of metastasis. In order to evaluate the effect of a solution of *Aloe vera* and honey (A) and its ethanolic extract (E) on metastasis-regulating processes in primary tumours, Wistar rats were subcutaneously implanted with Walker 256 tumours and distributed into the following groups: W=untreated, WA=treated with A (670 μ L/kg *Aloe vera* and honey solution by gavage daily), WE=treated with E (670 μ L/kg ethanolic extract and 0.9% NaCl, 1:1 v/v solution, daily). After 21 days, the rats were sacrificed. An analysis of the primary tumour tissues of these animals showed a decrease in N-cadherin expression in groups WA and WE, with a concomitant increase in E-cadherin expression in group WA compared to the control group (W). Cathepsin D activity was also decreased in the tumour tissues from groups WA and WE. In addition, the number of blood vessels and their diameter significantly decreased in tumour tissues from groups WA and WE compared to those from group W. These data suggest that treatment with A and E could reduce the metastatic propensity of tumours by modulating neoangiogenesis and the process of epithelial-to-mesenchymal transition.

INTRODUCTION

Metastasis is a complex process that is characterised as the spread of cancer cells from their original site to distant organs. To initially escape from the primary tumour, a cancer cell must have certain specific abilities such as motility and the capacity to degrade the extracellular matrix, and the tumour microenvironment must also have some characteristics such as an appropriate vascular network (Oppenheimer, 2006; Furuya *et al.*, 2009).

Briefly, for the early steps of metastasis, the cell undergoes a process called “epithelial-to-mesenchymal transition” (EMT), where a non-motile, polarised epithelial cell becomes a non-polarised, motile and invasive mesenchymal cell (De Craene & Berx, 2013). EMT is particularly marked by the "cadherin switch," the replacement of E-cadherin by N-cadherin in cell-cell junctions, which leads to the instability of cell-cell adhesion (Hazan *et al.*, 2004; Gheldof & Berx G, 2013).

Furthermore, a tumour must be supplied by an adequate network of blood vessels, which will supply the nutrients required for tumour growth and allows the detached cells to reach distant organs (Benazzi *et al.*, 2014). The aspartic protease cathepsin-D takes part in both the matrix degradation processes and angiogenesis promotion; cathepsin-D has been linked to poorer outcomes and metastasis in several cancer types (Liaudet-Coopman *et al.*, 2006; Benes *et al.*, 2008; Dian *et al.*, 2013).

The treatments for metastatic stage disease are limited, and the prognosis is very poor; metastases are responsible for over 90% of all cancer deaths (Mehlen & Puisieux, 2006). The identification of therapies that can modulate the steps in the development of metastasis without side effects to the patient represents a challenge in current cancer therapy.

Studies have shown that both *Aloe vera* and honey have anticancer properties, including the ability to inhibit metastasis, but little is known about the mechanisms of action that lead to this phenotype (Akev *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Swellam *et al.*, 2003). The combination of *Aloe vera* (Linne) (Liliaceae) and honey is very common in popular medicine, and recent studies conducted by us and others have shown promising effects of this solution in the treatment of cancer (Lissoni *et al.*, 2009; Tomasin & Gomes-Marcondes, 2011).

For these reasons, this work aimed to evaluate whether a solution of *Aloe vera* and honey and its ethanolic extract can modulate some metastasis-regulating processes such as EMT and angiogenesis in primary tumours.

MATERIALS AND METHODS

Aloe vera and honey solution and extract:

The solution of *Aloe vera* and honey (A) was prepared using mature and healthy *Aloe vera* leaves (500 g) collected from the greenhouse at the State University of Campinas, SP, Brazil. The leaves were homogenised with wildflower honey (500 g, Lambertucci Ltd., Rio Claro, Brazil) under aseptic conditions, and the solution was maintained in dark vials at 4°C (Zago, 2004).

The ethanolic extract (E) was obtained from the *Aloe vera* and honey solution mentioned above (A). Briefly, the *Aloe vera* and honey solution was submitted to liquid-liquid extraction with 100% ethanol, followed by rotaevaporation, resulting in a 50% w/w yield (BARROS *et al.*, 2009).

Experimental protocol:

Adult male Wistar rats (n=30) received subcutaneous tumour implants (5×10^6 viable tumour cells/inoculation) and were distributed into groups as follows, according to the treatment received: W (n=10), 670 μ L/kg of a 0.9% NaCl solution daily; WA (n=10), 670 μ L/kg of the solution of *Aloe vera* and honey (A) by gavage daily; WE (n=10), 670 μ L/kg of the ethanolic extract (E) of the above solution, diluted 1:1 v/v with a 0.9% NaCl solution, by gavage daily.

The animals were kept in an acclimatised room with a 12-hour light and 12-hour dark cycle with free access to drinking water and commercially available chow. After 21 days, the rats were sacrificed, and the primary tumour tissues were resected, weighted, and collected for further analysis.

The general guidelines of the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research for animal welfare were followed (Vale *et al.*, 2005), and all experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (CEE.A.IB/UNICAMP, protocol # 1400-1 and #2537-1).

RT-qPCR:

RT-qPCRs followed the MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) guidelines (Bustin *et al.*, 2009).

Total RNA was isolated from tumour tissue samples using TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and the integrity of the RNA was assessed by resolution on a 1.5% agarose gel with ethidium bromide. cDNA synthesis was performed starting with 3 µg of total RNA via the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturers' instructions. RT-qPCR was performed in triplicate; 5 ng of cDNA per reaction was amplified using Fast SYBR Green Technology (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) on an ABI Prism 7000 Thermocycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and standard cycling methods.

The primers used in this study were KiCqStart® SYBR® Green Predesigned Primers (Sigma Aldrich, St. Louis, MO): mE-cadherin (Fwd: 5'-CGAGAGAGTTACCCTACATATAC-3', Rev: 5'-GGAGCGTTGTCATTAATATCC-3'), mN-cadherin (Fwd: 5'-CGACATGAATGATAACAGACC-3', Rev: 5'-GTAAACATGTTGGGAGAAGG-3') and mβ-actin (Fwd: 5'-AAGACCTCTATGCCAACAC-3', Rev: 5'-TGATCTTCATGGTGCTAGG-3') (endogenous control).

The expression of genes of interest was assessed by the $\Delta\Delta C_t$ method, and are expressed as the fold change compared to the control group (W).

Cathepsin D activity:

Cathepsin D activity was assessed by incubating the tumour homogenate samples with cathepsin D substrate (Calbiochem, Boston, MA, USA), then incubating with diaminopeptidase IV (kindly donated by Prof. S. Hyslop, State University of Campinas) and measuring fluorescence (emission: 345 nm, excitation: 425 nm) according to the method described by Takahashi & Tang (1981).

Vascularisation analysis:

The tumour tissue samples were fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 24 h and then embedded in paraffin blocks according to routine procedures. Cross-sections (5 µm) taken from these blocks were mounted on poly-l-lysine-coated slides, de-paraffinised,

rehydrated through a series of incubations from alcohol to distilled water and stained with Harris' haematoxylin.

Visualisation and documentation were carried out with a LEICA microscope fitted with a video camera; analyses were performed using Image Pro-Plus software (1.0 version, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). For each tissue section, the number and diameter of blood vessels were determined in three random fields ($1.2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ each).

Statistical analysis:

The results are expressed as the mean $\pm$ the standard error of the mean (SEM). The comparisons between the groups were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. When necessary, further analyses between selected groups were performed using unpaired T-tests. P-values < 0.05 were considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software (v3.00 for Windows 98, USA) (Gad & Weil, 1994).

RESULTS AND DISCUSSION

The size of tumours (relative weight, %) significantly decreased in group WA animals compared to group W animals; animals in group WE had tumours with intermediary values that were not significantly different from those observed in group W ($W=18.01 \pm 1.49$; $WA=10.46 \pm 2.06$; $F=13.96 \pm 1.81$).

Our previous results have shown that a solution of *Aloe vera* and honey decreases primary tumour growth by increasing the Bax/Bcl-2 ratio and decreasing proliferation (Tomasin & Gomes Marcondes 2011). The current data reaffirms this inhibitory effect of the *Aloe vera*-honey solution on tumour development. Furthermore, because the tumours from group WE were smaller than those from group W but bigger than those from group WA, these data suggest that during the ethanolic extraction, some compounds involved on this modulatory activity were lost or their levels were reduced.

EMT is an initial requirement for invasion and metastasis. During EMT, a non-motile, polarised epithelial cell breaks down its cell-cell contacts, becoming an individual, non-polarised, motile and invasive mesenchymal cell; this transition confers the ability to

migrate and invade the surrounding tissues, ultimately reaching the blood or lymphatic vessels to spread to distant organs (De Craene & Berx, 2013). Among the multiple molecular changes that characterise EMT, the switch from E-cadherin expression to N-cadherin expression in the tumour cells is perhaps the most evident (Hazan *et al.*, 2004; Gheldof & Berx G, 2013). E-cadherin has long been described as a tumour suppressor gene, and low levels of E-cadherin are observed in the majority of epithelial cancers, leading to tumour invasiveness and poor prognosis (Christofori & Semb, 1999; Gall & Frampton, 2013).

In this work, we observed that the expression levels of E-cadherin mRNA in tumour tissues from rats treated with the *Aloe vera*-honey solution (group WA) were significantly higher than those of the tumours from untreated rats (group W) (Figure 1, A). On the other hand, the expression levels of N-cadherin mRNA in the tumours from groups WA or WE were significantly lower than those in tumours from untreated rats (group W) (Figure 1, B). These data suggest that treatment with the *Aloe vera* and honey solution or the *Aloe vera*-honey ethanolic extract may modulate the expression of genes related to early metastatic steps; in particular, treatment with the *Aloe vera*-honey solution seemed to revert the typical cadherin switch and thus may prevent EMT. Several studies have shown that the reversion of the epithelial to mesenchymal transition is marked by decreases in N-cadherin and increases in E-cadherin levels, and these changes may be a response to treatment with natural compounds (Chao *et al.*, 2010; Prasad & Katiyar, 2012; Chu *et al.*, 2013).

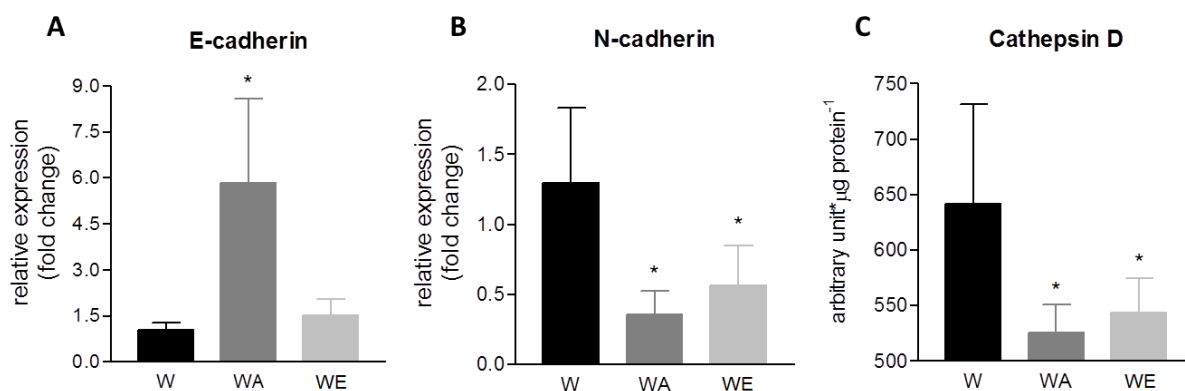


Figure 1: *Aloe vera* and honey solution and ethanolic extract modulate the mRNA expression levels of E-cadherin (A) and N-cadherin (B) and the activity of cathepsin-D (C) in primary tumour tissues from rats. Legend: W, Walker-256 tumour-bearing rats; WA, tumour-bearing rats treated daily with a solution of *Aloe vera* and honey for 21 days after tumour implantation; WE, tumour-bearing rats treated daily with the ethanolic extract of the *Aloe vera* and honey solution. * $P < 0.05$ indicates significant differences within each column compared to group W.

Some prior studies had shown that *Aloe vera*, honey or some of their compounds inhibit the motility of cancer cells *in vitro* or that these products have antimetastatic effects *in vivo* (Orsolić *et al.*, 2003; He *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Suboj *et al.*, 2012). Although these studies have suggested some mechanisms of action involving a decrease in metalloproteinase activity or the down-regulation of FAK, none of them have reported the restoration of E-cadherin expression or the suppression of N-cadherin expression; based on our results, this may be another pathway underlying in the antimetastatic activities of *Aloe vera* and honey.

The significant decrease in cathepsin-D activity in the tumour samples from groups WA and WE compared to the untreated group (Figure 1C) also suggests that the compounds contained in the *Aloe vera* and honey solution and its ethanolic extract may play a role in the control of the early stages of metastasis.

The aspartic protease cathepsin-D is traditionally located inside lysosomes, where it is involved in the acid digestion of proteins and peptides (Benes *et al.*, 2008). During cancer progression, especially in solid tumours, cathepsin-D is commonly overexpressed and secreted by both cancer and stromal cells; it is believed to promote matrix remodelling, mitosis, angiogenesis and metastasis (Liaudet-Coopman *et al.*, 2006; Benes *et al.*, 2008). Indeed, it has been extensively reported that high levels of cathepsin-D are linked to the occurrence of metastasis and poorer outcome in cancer patients, and these effects are believed to be due to the proangiogenic role of cathepsin-D in solid tumours (Leto *et al.*, 2004; Dian *et al.*, 2013). Moreover, several studies have shown that lower levels of cathepsin-D lead to a reduction in the migration and invasion of several cancer cell lines *in vitro*, as well as a reduction in metastatic burden in animal models (Glondou *et al.*, 2002). Thus, the observed decrease in the cathepsin-D activity in tumour samples from treated rats may be linked to a decrease in the aggressiveness of these tumours. Several independent clinical studies have shown that the cathepsin-D level of primary tumours is an independent prognostic parameter that is correlated with the incidence of metastasis and shorter survival times (Rocheffort, 1992; Ferrandina *et al.*, 1997; Westley & May, 1999; Foekens *et al.*, 1999, Dian *et al.*, 2013).

Finally, the findings of this work also suggest that treatment with the *Aloe vera*-honey solution and its ethanolic extract are effective in inhibiting tumour vascularisation (Figure 2). Both groups WA and WE presented tumours with a significantly lower number of blood vessels, which were also significantly smaller in diameter than those in the untreated group (W). These results are consistent with the lower levels of cathepsin-D and the smaller primary tumours observed in these groups (i.e., groups WA and WE compared to group W).

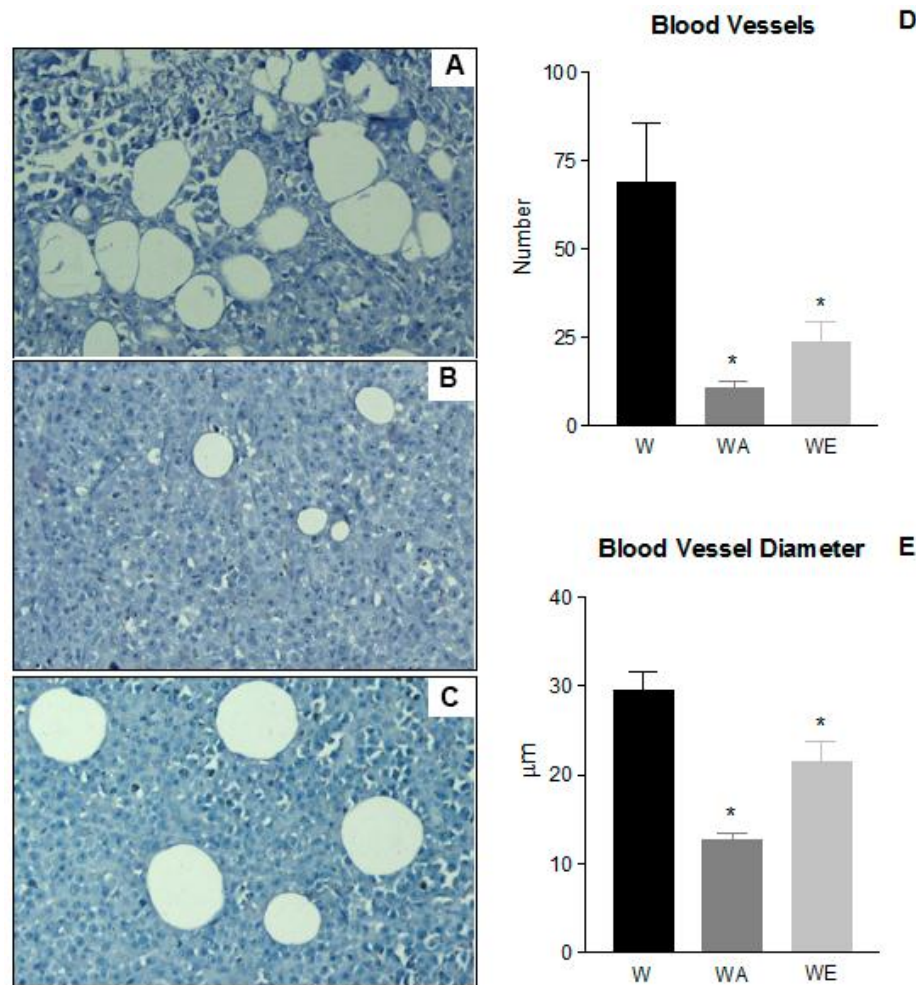


Figure 2: The *Aloe vera* and honey solution and its ethanolic extract inhibit tumour vascularisation. (A) Tumour histology of tumour-bearing rats, group W; (B) tumour histology of *Aloe vera* and honey solution-treated group WA; (C) tumour-bearing rats treated with the ethanolic extract of the *Aloe vera* and honey solution, group WE. A representative image from each group is shown at 200x magnification. (D) Number of blood vessels number; (E) Diameter of blood vessels in tumour tissues from the three different groups. Legend: W, Walker-256 tumour-bearing rats; WA, tumour-bearing rats treated daily with a solution of *Aloe vera* and honey for 21 days after tumour implantation; WE, tumour-bearing rats treated daily with the ethanolic extract of the *Aloe vera* and honey solution. * $P < 0.05$ indicates significant differences within each column compared to group W.

It has been proposed *Aloe vera*, honey and some of their compounds have antiangiogenic properties in cancer models *in vitro* and *in vivo* (Suboj *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2013; Erejuwa *et al.*, 2014). The tumour microenvironment is as important in metastasis as the cancer cell itself. Blood vessels, which are initially required for the establishment and growth of a primary tumour, subsequently deliver individual cells from this primary tumour tissue to distant organs, an essential step in the development of metastasis (Benazzi *et al.*, 2014). In addition to this role of tumour blood vessels in metastasis, another implication of decreasing tumour vascularisation is that an insufficient nutrient supply may impair tumour growth, which is the basis of the antiangiogenic therapies (Folkman, 1971; Al-Husein *et al.*, 2012). This may explain the smaller tumour size observed in the *Aloe vera*-honey/ethanolic extract-treated rats to some extent.

Because the most prominent effects regarding to the EMT reversion, the decline in cathepsin-D activity and the reduction in tumour vascularisation were observed in *Aloe vera* and honey-treated rats (group WA), it is likely some antiangiogenic or antimetastatic compounds were lost or their levels were decreased during the ethanolic extraction process. Furthermore, a synergy between substances contained in *Aloe vera* and/or honey cannot be discarded (Kametani *et al.*, 2007).

Further assays to elucidate the main differences in composition between the *Aloe vera* and honey solution and its ethanolic extract as well as functional *in vitro* and *in vivo* experiments are underway to better elucidate the mechanisms of action of these solutions and compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support of FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, #2010/00209-9) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; #304604/2010-0, #302863/2013-3). R. Tomasin, MSc was supported by a scholarship sponsored by FAPESP (Grant #2010/00714-5). The language of this manuscript was edited by native English-speaking editors (American Journal Experts, Certificate number DF19-A8B1-BB53-9516-8102).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Akev N, Turkay G, Can A, Gurel A, Yildiz F, Yardibi H, Ekiz EE, Uzun H. 2007. Effect of *Aloe vera* leaf pulp extract on Ehrlich ascites tumours in mice. *Eur J Cancer Prev.* 16(2):151-7.
- Al-Husein B, Abdalla M, Trepte M, Deremer DL, Somanath PR. 2012. Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Pharmacotherapy.* 32(12):1095-111.
- Barros LF, Barison A, Salvador MJ, Mellosilva R, Cabral EC, Eberlin MN, Stefanello ME. 2009. Constituents from the Leaves of *Magnolia ovata*. *Journal of Natural Products*, 72: 1529-1532.
- Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, Figg WD, Sarli G, de Oliveira JT, Gärtner F. 2014. Angiogenesis in Spontaneous Tumors and Implications for Comparative Tumor Biology. *ScientificWorldJournal.* 19;2014:919570.
- Benes P, Vetvicka V, Fusek M. 2008. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 68(1):12-28.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry.* 55(4): p.611–622.
- Chao YL, Shepard CR, Wells A. 2010. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol Cancer.* 9:179.
- Chen YY, Chiang SY, Lin JG, Ma YS, Liao CL, Weng SW, Lai TY, Chung JG. 2010. Emodin, aloe-emodin and rhein inhibit migration and invasion in human tongue cancer SCC-4 cells through the inhibition of gene expression of matrix metalloproteinase-9. *Int J Oncol.* 36(5):1113-20.
- Christofori G, Semb H. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 24(2):73-6.
- Chu SC, Hsieh YS, Hsu LS, Chen KS, Chiang CC, Chen PN. 2013. *Rubus idaeus* L Inhibits Invasion Potential of Human A549 Lung Cancer Cells by Suppression Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Akt Pathway In Vitro and Reduces Tumor Growth In Vivo. *Integr Cancer Ther.* 10, 1534735413510559.
- De Craene B, Berx G. 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 13(2):97-110.
- Dian D, Heublein S, Wiest I, Barthell L, Friese K, Jeschke U. 2013. Significance of the tumor protease Cathepsin D for the biology of breast cancer. *Histol Histopathol.* Nov 22.

- Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS. 2014. Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules*. 21;19(2):2497-522.
- Ferrandina, G, Scambia g, Bardelli F, Panici B, Mancuso S, Messori A. 1997. Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* 76:661–666.
- Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder M, van Putten WLJ, Klijn JGM. 1999. Cathepsin D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br. J. Cancer* 79:300–307.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. 1971. *N Engl J Med*. 285:1182–6.
- Furuya M, Yonemitsu Y, Aoki I. 2009. III. Angiogenesis: complexity of tumor vasculature and microenvironment. *Curr Pharm Des*. 15(16):1854-67.
- Gad SC, Weil CS. 1994. Statistic for toxicologists. In *Principles and Methods of Toxicology*, Wallace H (ed.). Raven Press: New York, 221–274.
- Gall TM, Frampton AE. 2013. Gene of the month: E-cadherin (CDH1). *J Clin Pathol*. 66(11):928-32.
- Gheldof A, Berx G. 2013. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 116:317-36.
- Glondou M, Liaudet-Coopman E, Derocq D, Platet N, Rochefort H, Garcia M. 2002. Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene*. 1;21(33):5127-34.
- Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, and Suyama K. 2004. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 155–163.
- He TP, Yan WH, Mo LE, Liang NC. 2008. Inhibitory effect of aloe-emodin on metastasis potential in HO-8910PM cell line. *J Asian Nat Prod Res*. 10(5-6):383-90.
- Kametani S, Kojima-Yuasa A, Kikuzaki H, Kennedy DO, Honzawa M, Matsui-Yuasa I. 2007. Chemical constituents of cape aloe and their synergistic growth-inhibiting effect on Ehrlich ascites tumor cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71(5):1220-9.
- Leto G, Tumminello FM, Crescimanno M, Flandina C, Gebbia N. 2004. Cathepsin D expression levels in nongynecological solid tumors: clinical and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis*. 21(2):91-106.
- Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D, Garcia M, Glondou-Lassis M, Laurent-Matha V, Prébois C, Rochefort H, Vignon F. 2006. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett*. 18;237(2):167-79.
- Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Zago R, Colciago M, Messina G, Mora A, Porro G. 2009. A randomized study of chemotherapy versus biochemotherapy with chemotherapy plus Aloe arborescens in patients with metastatic cancer. *In Vivo* 23: 171-176.

- Mehlen P, Puisieux A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer* 6, 449-458.
- Oppenheimer SB. 2006. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem.* 108(5):327-34.
- Orsolić N, Knezević A, Sver L, Terzić S, Hackenberger BK, Basić I. 2003. Influence of honey bee products on transplantable murine tumours. *Vet Comp Oncol.* 2003 Dec;1(4):216-26.
- Pan Q, Pan H, Lou H, Xu Y, Tian L. 2013. Inhibition of the angiogenesis and growth of Aloin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Cell Int.* 12;13(1):69.
- Prasad R, Katiyar SK. 2012. Grape seed proanthocyanidins inhibit migration potential of pancreatic cancer cells by promoting mesenchymal-to-epithelial transition and targeting NF- κ B. *Cancer Lett.* 16. pii: S0304-3835(12)00474-0.
- Rocheffort H. 1992. Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur. J. Cancer* 28A:1780–1783.
- Suboj P, Babykutty S, Valiyaparambil Gopi DR, Nair RS, Srinivas P, Gopala S. 2012. Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF- κ B. *Eur J Pharm Sci.* 45(5):581-91.
- Swellam T, Miyanaga N, Onozawa M, Hattori K, Kawai K, Shimazui T, Akaza H. 2003. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. *Int J Urol.* 10(4):213-9, 2003.
- Takahashi T, Tang J. 1981. Cathepsin D from porcine and bovine spleen. *Methods Enzymol.*;80 Pt C:565-81.
- Tomasin R, Gomes-Marcondes MC. 2011. Oral administration of *Aloe vera* and honey reduces Walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. *Phytother Res* 25(4):619-23.
- Westley BR, May FE. 1999. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer, *Br. J. Cancer* 79 189–190.
- Zago R. 2004. *Babosa Não é Remédio. Mas Cura!* 3a Edição. Editora Vozes: Brazil; 1–128.

CAPÍTULO 3:

**“*Aloe vera* e mel e ação antitumoral *in vitro* e *in vivo*:
importância da imunomodulação”**

Apresentação:

Este terceiro capítulo traz avaliações a cerca dos possíveis mecanismos de ação e de algumas das substâncias envolvidas na atividade antitumoral exibida pelo homogeneizado de *Aloe vera* e mel e pelo extrato etanólico, através de comparações entre experimentos *in vivo* e *in vitro*, além de análises quantitativas do extrato de *Aloe vera* e mel através de UPLC. O fato aparentemente paradoxal de que, *in vitro*, a atividade citotóxica do extrato etanólico sobre as células tumorais é maior do que a provocada pelo homogeneizado de *Aloe vera* e mel bruto, enquanto, os animais tratados com *Aloe vera* e mel apresentam aumento do tempo de sobrevida e redução do tamanho tumoral mais proeminente do que o observado para os animais tratados com o extrato etanólico, que apresentou valores intermediários, pode ser devido à ação diferencial do sistema imunológico. Análises subsequentes revelaram que tumores de animais tratados com o homogeneizado bruto de *Aloe vera* e mel apresentavam aumento na infiltração de linfócitos Natural Killer, em relação aos controles não tratados, e que os tumores de animais tratados com o extrato etanólico apresentavam níveis de infiltração de células NK intermediários aos outros dois grupos (não-tratado e tratado com *Aloe vera* e mel). Foi observado então, que durante o processo de extração, houve queda na concentração de substâncias imunomodulatórias (mananas), o que resultou nas diferenças observadas em relação ao nível de ativação da resposta imune; e que os níveis de aloína, substância com aclamada atividade antiangiogênica, também descaíram devido à extração, o que explica o fato de que tumores de animais tratados com *Aloe vera* e mel são menos vascularizados do que os tratados com a fração, que por sua vez são menos vascularizados do que os de animais não-tratados, como relatado no capítulo anterior.

Esses resultadosapresentados como manuscrito intitulado “***Aloe vera* and honey solution increases surveillance and decreases tumour size *in vivo* especially via immunostimulatory effects**”, também foram submetidos a periódico internacional indexado para publicação.

“*Aloe vera* and honey solution increases surveillance and decreases tumour size *in vivo* especially via immunostimulatory effects”

Rebeka Tomasin^a, Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya^c, Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal^c, Marcos Jose Salvador^c, Paulo Mazzafera^b and Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes^a.

^a*Laboratory of Nutrition and Cancer, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, 13083-970, São Paulo, Brazil*

^b*Department of Plant Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, 13083-970, São Paulo, Brazil*

^c*Graduate Program in Biosciences and Technology of Bioactive Products, Pharmacy course, State University of Campinas, Campinas, 6109, São Paulo 13083-970, Brazil*

***Corresponding author: Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes**

Telephone number: 55-19-3521-6194

Fax number: 55-19-3521-6185

E-mail address: cintgoma@unicamp.br

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Aloe vera* and honey have been used in popular medicine since ancient times, and both have demonstrated antitumour and cytotoxic properties, which make them good candidates for complementary and alternative medicine approaches. **Materials and Methods:** This work evaluated the benefit of *Aloe vera* and honey solution and its ethanolic extract *in vitro* and *in vivo*. Three different cell lines (Vero, Walker-256 and MCF-7) were treated with 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 and 50 $\mu\text{L/mL}$ of *Aloe vera* and honey solution or with ethanolic extract for 24, 48 and 72hs to assess the cell viability. In parallel, Walker-256 tumour-bearing rats were gavaged daily with 670 $\mu\text{L/Kg}$ of *Aloe vera* and honey solution (WA group) or with ethanolic extract diluted 1:1 in NaCl 0.9% solution (WE group) and compared with the group which received NaCl 0.9% solution (W) for surveillance and NK cells infiltration in tumour tissue. Additionally, the *Aloe vera* and honey solution and its ethanolic extract were both evaluated and compared by UPLC-ESI-MS. **Results:** *Aloe vera* and honey solution reduced the cell viability at the highest dose (50 $\mu\text{L/mL}$) after 48 or 72h, especially in Walker 256 tumour cells, but has no effect in Vero cells. On the other hand, the ethanolic extract presented a more effective cytotoxic/antiproliferative effect in tumour cells (MCF-7 and Walker-256), and a mild effect in control cells (Vero). The *in vivo* results showed a significant increase in survival rate in WA group, and, a tendency towards an increase in WE group. In addition, NK cells infiltration in the tumour tissue was mostly absent in untreated rats (W), but quite high in WA and moderate in WE group. These results are possibly due to the observed decrease in the content of mannose-based immunomodulatory polysaccharides in the ethanolic extract in comparison to the *Aloe vera* and honey solution. Aloin-a content also decreased during the extraction process, which corroborates with previous findings showing WA tumours were less vascularized than WE, and both less vascularized than the W ones. **Conclusions:** *Aloe vera* and honey solution and the ethanolic extract were selectively cytotoxic for tumour cells, and although the ethanolic extraction concentrated cytotoxic/antiproliferative compounds, it decreased the immunomodulatory ones, as shown by greater survival rates and NK infiltration in tumour tissue observed *in vivo*.

Introduction

Cancer is a generic name for a group of over a hundred diseases defined by the presence of highly proliferative abnormal cells that grow beyond their usual boundaries and can invade adjacent tissues and spread to other organs, forming metastases (WHO, 2014). Cancer is a result of a multistep process where the cells acquire some abilities summarized as the cancer hallmarks: self-sufficiency in growth signals, apoptosis evasion, limitless replication potential, sustained angiogenesis, tissue invasion and metastasis (Hanahan & Weinberg, 2000). More recently, two additional hallmarks have been proposed: energy metabolism reprogramming and immune evasion (Hanahan & Weinberg, 2011). Evidence that the immune system could work as a significant barrier to tumour formation and progression are increasing, so are the studies suggesting mechanisms by which cancer cells can evade immune system attack (Hanahan & Weinberg, 2011). Supporting the idea of antitumoral immune responses, it has been reported for certain types of cancer that patients whose tumours are heavily infiltrated with Natural killer cells or CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes have a better prognosis than those who lack such characteristics (Pagès *et al.*, 2010).

Regarding to therapeutic strategies, although enormous progression has been achieved in the last few decades, the occurrence of side effects still a big issue. Looking for therapies with lower side effects, a crescent proportion of the population patronizes the called "complementary and alternative medicine", which refers to diverse treatment approaches, not an integral part of standard medicine, and that may include dietary components, supplements, herbal preparations, naturally-derived products and even lifestyle changes (Varker *et al.*, 2012).

Both *Aloe vera* (Linne), and honey have a long history of popular and traditional use. Aloe was represented as the "plant of Immortality" in 6000-year-old Egyptian stone carvings, and notes of therapeutical use of Aloe can be found in the ancient Egyptian Book of Remedies (Ulbricht *et al.*, 2008). Registers of the millenary therapeutical application of honey by Egyptians, Greeks and Romans can be found in the Bible, Koran, Torah and Talmud (Bardy *et al.*, 2008).

Aloe vera is one among approximately 420 species of the genus *Aloe*, believed to be original from Sudan, it was subsequently disseminated in the Mediterranean area and other warm regions worldwide, being introduced in Americas by the Spanish in the 16th Century (Ulbricht *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2011).

Even though the medical use of *Aloe vera* and honey date back to ancient times, the last decade has witnessed an expressive increase in the research regarding to their role in the treatment of numerous diseases, due to their acclaimed antioxidant, immunomodulatory, antiproliferative, antiangiogenic and anticancer properties (Harlev *et al.*, 2012; Othman 2012).

The association between *Aloe vera* and honey as a complementary treatment for cancer is largely used in popular medicine. Although there are few studies investigating the real benefits of this combination, promising results have emerged, but the exact compounds and mechanisms involved in these anticancer responses still need to be elucidated (Lissoni *et al.*, 2009; Tomasin & Gomes-Marcondes 2011).

For these reasons, this work aimed to elucidate some mechanisms involved in *Aloe vera* and honey combined anticancer activity, using *in vitro* and *in vivo* approaches.

Methods and materials

***Aloe vera* and honey solution and ethanolic extraction**

The solution of *Aloe vera* and honey (A) was prepared using mature and healthy *Aloe vera* leaves (500 g) collected from the greenhouse at the State University of Campinas, SP, Brazil. The leaves were homogenised with wildflower honey (500 g, Lambertucci Ltd., Rio Claro, Brazil) under aseptic conditions and the solution was maintained in amber vials at 4°C (Zago, 2004).

The ethanolic extract (E) was obtained from the *Aloe vera* and honey solution mentioned above (A) by suspending the *Aloe vera* and honey solution in 100% ethanol and then filtering. The ethanol was subsequently removed in a rotaevaporator, resulting in a 50%yield in relation to the original solution (A).

***In vitro* assays**

In order to evaluate antiproliferative and cytotoxic effects of the *Aloe vera* and honey solution (A) and ethanolic extract (E), this study utilized three cell lines: (1) Vero cells, a fibroblastic lineage, were used as a control (non-malignant), (2) Walker-256 carcinosarcoma cells, originally a rat breast cancer cell line, and (3) MCF-7 cells, a human breast cancer cell line.

Vero and MCF-7 cells, obtained from the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil), were maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma) supplemented with 5% of foetal bovine serum (Sigma Aldrich, St Louis, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma Aldrich, St Louis, USA). Walker 256 cells were isolated from ascitic tumours, and grown in 199 medium supplemented with 10% of foetal bovine serum (Sigma Aldrich, St Louis, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma Aldrich, St Louis, USA). All the cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Vero, MCF-7 and Walker-256 cells were seeded in 96-well plates (1.5×10^4 cells/well). In the following day, the cells were treated either with the *Aloe vera* and honey solution or with the ethanolic extract (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 and 50 µL/mL). The cells were maintained under treatment for 24, 48 or 72h. Cell viability was assessed using the crystal violet method described by Murakami *et al.* (1998). The absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (Luminometer Fluorimeter Photometer Fusion™, Universal Microplate Analyser, Packard Bioscience Company, Meriden, USA). All assays were performed in quintuplicates in three independent experiments.

Animal experimental procedures

Adult male Wistar rats received subcutaneous tumour implants (5×10^6 viable Walker-256 tumour cells/inoculation) and were distributed into groups as follows, according to the treatment received: W, tumour-bearing rats gavaged daily with 670 µL/kg of a 0.9% NaCl solution; WA, tumour-bearing rats treated with 670 µL/kg of the solution of *Aloe vera* and honey (A) by gavage daily; WE, tumour-bearing rats treated with 670 µL/kg of the *Aloe vera* and honey solution's ethanolic fraction (E), diluted 1:1 v/v with a 0.9% NaCl solution, by gavage daily.

The animals were kept in an acclimatized room with a 12-hour light and 12-hour dark cycle with free access to drinking water and commercially available chow.

A surveillance experiment was conducted with at least 10 rats of each group (W, WA and WE). The animals were treated as described above and the deaths were recorded in a period of 50 days.

In another experiment, non-treated (W, n=10), *Aloe vera* and honey solution treated (WA, n=10) and ethanolic extract treated rats (WE, n=10) were sacrificed 21 days after tumour implant, the primary tumour were resected, weighted, and collected for further analysis.

The general guidelines of the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research for animal welfare were followed (Vale *et al.*, 2005), and all experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (CEEAB/UNICAMP, protocol # 1400-1 and #2537-1).

Polysaccharides hydrolysis

In order to compare the mannan content in the *Aloe vera* and honey solution (A) and in its ethanolic extract (E), the samples were subjected to an acid hydrolysis, for further mannose quantification (modified from Ni *et al.*, 2004). Briefly, the samples (A and E) were hydrolysed with 2N trifluoroacetic acid (dilution 1:10) at 100°C for 5h and then, these samples were used for mannose quantification by UPLC as described below.

UPLC-ESI-MS analysis

The chromatographic analysis of the samples (1mg/mL) was performed on an Acquity UPLC coupled with an Acquity TQD mass spectrometer (Micromass-Waters Manchester, England), with ESI source.

For mannose identification and quantification, we used the hydrolysed samples (as described in the section above), while for aloin-A and aloe-emodin, the samples used were the *Aloe vera* and honey solution (A) or the ethanolic extract of the *Aloe vera* and honey solution (E) without prior treatment.

The mannose contents were identified and quantified using an Acquity Amide BEH column (2.1mm x 50 mm x 1.7 μ m particle size). Solvent A was deionized water with 0.1% NH_4OH and solvent B was acetonitrile with 0.1% NH_4OH . The flow rate was 0.170 ml/min and a volume of 5 μ l of the samples was injected. The elution gradient began with 80% solvent B changing to 65% B by 5 min, this was maintained until 5.5 min, then returned to the initial condition and stabilized up to 10 min. ESI negative mode detection with the following conditions: Capillary- 3.00 kV, Cone -30.00 V, Source temperature 135°C, desolvation Temperature 350°C, the range of mass analyzed was between 100 and 400 m/z . Mannose contents were quantified against an external calibration curve of concentrations between 0.5 and 50 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.993$).

The aloin A contents were analyzed using an Acquity C18 BEH column (2.1mm x 50 mm x 1.7 μ m particle size). Solvent A was mili-Q and solvent B was methanol. The flow rate was 0.200 ml/min and a volume of 5 μ l of the samples were injected. The elution gradient began with 5% solvent B changing to 100% B by 9 min, this was maintained until 9.5 min, then returned to the initial condition and stabilized up to 12 min. ESI negative mode detection with the following conditions: Capillary -3.00 kV, Cone -30.00 V, Source temperature 135°C, desolvation Temperature 350°C, the range of mass analyzed was between 100 and 700 m/z . MS/MS of selected ions was carried out using a collision energy of -25V. Aloin A was identified by comparison with a standard ($R^2=0.9931$).

Immunofluorescence

Once the tumour weights were determined, appropriately-sized samples were fixed in a 4% para-formaldehyde solution for 24 hours and then buried in paraffin blocks following routine procedures. Tissue cross sections (5 μ m) taken from these blocks were mounted on poly-L-lysine-coated slides, de-paraffinised, rehydrated through a series of incubations from alcohol to distilled water and microwaved on high for 10 min in 0.01N sodium citrate buffer, pH 6.4. Following incubation with blocking buffer (Bovine Serum Albumin 1% PBS-T), the NK cell marker primary antibody (sc59340, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) was applied at Manufacture's recommended dilution (1:10, in blocking buffer). In parallel, negative controls for each section were

incubated with anti-rabbit IgG (1:2000, in blocking buffer). The slices were incubated at 4°C in a humidified chamber overnight. Following multiple washes in PBS, the sections were incubated with appropriated Texas-Red conjugated secondary antibody (sc2781, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) at a dilution of 1:100 in PBS, for 60 minutes at room temperature. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1µg/mL) was used as counterstaining. Visualisation and documentation were accomplished with a LEICA microscope supporting a video camera (LEICA DMI6000B, software LAS (Leica Application Suite) for Windows). For each tumour section, three random fields (approximately $7.2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ each) were scored for NK cells presence: (-) no infiltration, (+) low infiltration, (++) moderate infiltration, (+++) high infiltration and (+++++) very high infiltration.

Statistics

The results are expressed as the mean $\pm$ the standard error of the mean (SEM). The comparisons between the groups were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. When necessary, further analyses between selected groups were performed using unpaired T-tests. P-values < 0.05 were considered to be statistically significant. For the survival test, analysis between the WA versus W group, and WE versus W group were performed by using the Kaplan-Meier method and statistically evaluated by the log-rank test. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software (v3.00 for Windows 98, USA) (Gad & Weil, 1994).

Results and discussion

The survival experiment results are compiled and presented in Figure 1. Walker 256 tumour bearing rats treated with the *Aloe vera* and honey solution (WA) survived significantly longer than untreated rats (W). Concurrently, rats treated with the ethanolic extract (WE) tended to survive longer than untreated rats (W), but the difference was not significant (Figure 1A). After 43 days of tumour growth, when the surveillance for untreated rats (W) reached to zero, the percentage of animals which stilled alive were 48% for the WA group and 30% for the WE group.

Moreover, some of our previous experiments, where all tumour-bearing rats were culled at the same time point after tumour induction (21 days), had shown WA tumours were significantly smaller than tumours from untreated rats (W), and that WE tumours generally were bigger than WA tumours, and smaller than W ones, but the difference was not significant (Tomasin *et al.*, 2014).

Based on these two results (surveillance and tumour growth), we suggested that WA rats had significant benefits when compared to W rats, and WE rats had moderated effects between those two groups.

It is possible the combination of *Aloe vera* and honey led a synergic action of some compounds. In fact, an independent *in vivo* surveillance experiment revealed that Walker 256 tumour-bearing rats treated only with *Aloe vera* or with honey have no improvement in survival time (Figure 1B), suggesting either a cooperative activity of *Aloe vera* and honey substances, or a more effective absorption of the active principles when *Aloe vera* and honey are administered in combination.

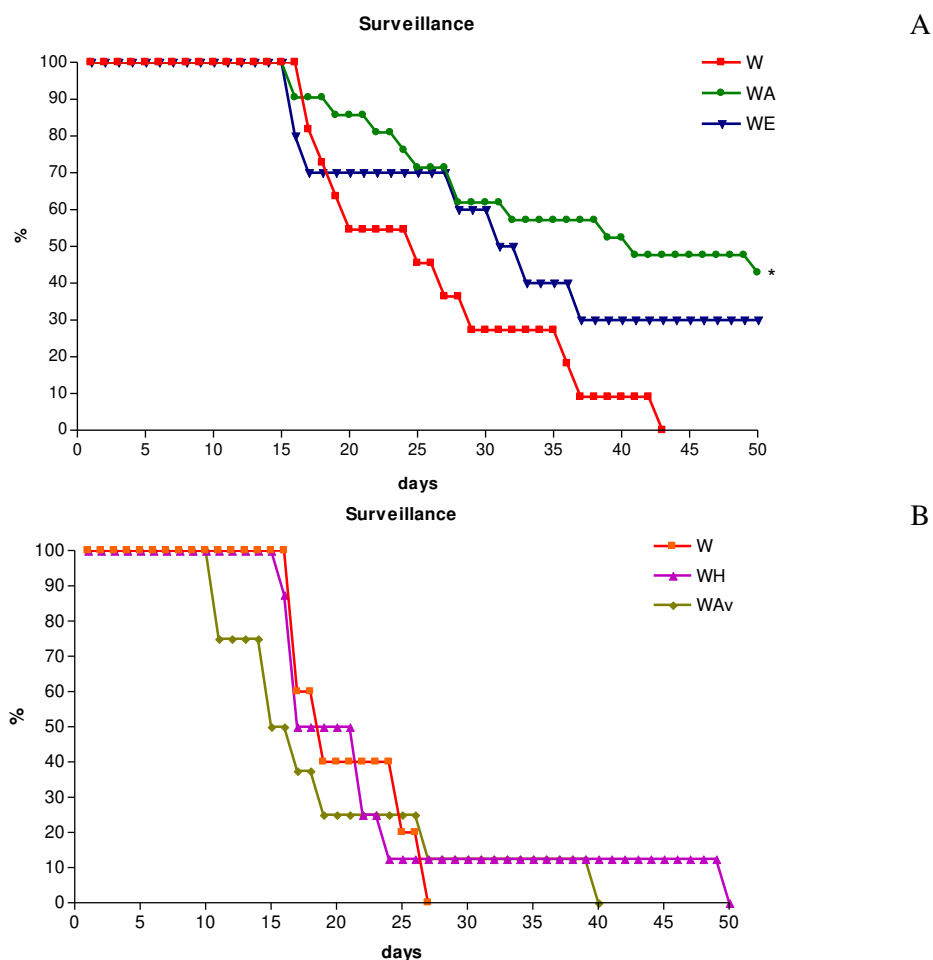


Figure 1. Survival Curve of Walker 256 tumour-bearing rats under different treatments (%). A. W=untreated rats, WA=rats treated with *Aloe vera* and honey solution, WE=rats treated with ethanolic extract of the *Aloe vera* and honey solution. B. W=untreated rats, WH=rats treated with 335 μ L/kg honey, WAv= rats treated with 335 μ L/kg *Aloe vera* * $p < 0,05$ in comparison to untreated rats (W).

Prior experiments conducted by us and by others have demonstrated *Aloe vera*, honey and some of their compounds decrease tumour growth (Swellam *et al.*, 2003; Tomasin & Gomes Marcondes, 2011) and improve survival *in vivo* for animal models (Singh & Surendra, 2013) and for humans in combination with conventional chemotherapy (Lissoni *et al.*, 2009).

Paradoxically, the *in vitro* cell viability assays (Figure 2) have shown that the treatment with *Aloe vera* and honey solution had a mild effect on cell viability only at the highest dose (50 μ L/mL) after 48 or 72h, especially in Walker 256 tumour cells, but never in Vero cells (fibroblasts), whose viability was always about 100% (Figure 2: A, C and E).

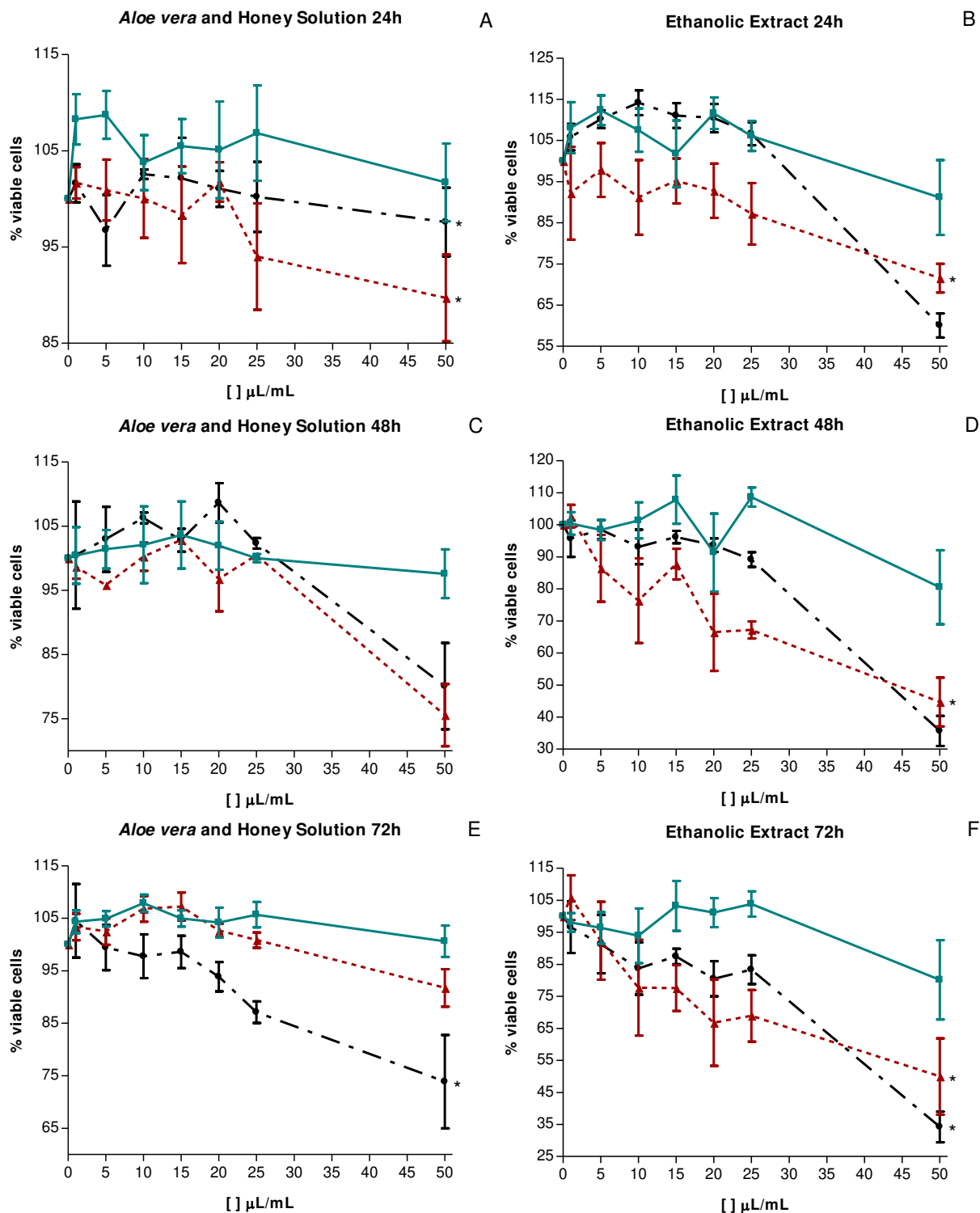


Figure 2. Cell viability after treatment with *Aloe vera* and honey solution (A) or Ethanolic extract (E) in three different cell lines, at three different time points. A: Cells treated with A for 24h, B: Cells treated with E for 24h, C: Cells treated with A for 48h, D: Cells treated with E for 48h, E: Cells treated with A for 72h, F: Cells treated with E for 72h. Legend: —■— = Vero cells; - - -▲- - - = MCF-7 cells; - - -●- - - = Walker 265 cells. * $p < 0,05$ in comparison to Vero cells.

On the other hand, the treatment with the ethanolic extract of the *Aloe vera* and honey solution presented a more effective cytotoxic/antiproliferative effect in tumour cells (MCF-7 and Walker-256), and a very mild effect in fibroblastic cells (Vero), particularly after 48 and 72h of treatment (Figure 2: B, D and F). At these times, while both tumour cells lineages presented an average of 50-35% of viable cells for the highest dose; for Vero cells, the cell viability was never lower than 85% at the same times and doses.

Considering that one of the greatest challenges in cancer therapy is inducing tumour cell death without causing any harm to the host's normal cells, the difference in cytotoxicity observed between fibroblastic and tumour cells under *Aloe vera* and honey solution treatment, and especially under treatment with *Aloe vera* and honey solution ethanolic extract, are promising. Selective effects in cancer and normal cells have been reported before for honey and some *Aloe vera* compounds (Lin *et al.*, 2010; Jubri *et al.*, 2012).

Based on the *in vitro* and *in vivo* results, a question remains: how could something which was not active or showed low activity *in vitro* present such a dramatic result *in vivo*?

The first hypothesis was that some of the results observed for the *Aloe vera* and honey solution *in vivo* were indirect, possibly due to stimulation of the immune system. Thus, the difference observed between WA and WE tumours would be, at least partially, due to a decrease in immunostimulatory substances due to the extraction process. This effect could not be observed in our *in vitro* cell viability assay, once there were no immune cells involved.

Aloe vera is known to contain substances exhibiting immunomodulatory activity (Reynolds & Dweck, 1999; Choi & Chung, 2003). Among these substances, the most abundant is a mixture of β -(1,4)-linked acetylated mannan polymers of variable length, collectively named *acemannan*, present in the gel (Manna & McAnalley, 1993).

Regarding cytotoxicity, most of the studies involving *Aloe* compounds focuses on the anthraquinones, aloe-emodin, and its glycosilated forms aloin A and B. However, several other substances have been reported to have cytotoxic anticancer properties and there are evidences of a synergic action of some of these compounds (Reynolds & Dweck, 1999; Akev *et al.*, 2007; Kametani *et al.*, 2007).

Concurrently, honey consumption is also linked to immune system boosting (Othman, 2012), anticancer and antitumor effects in breast, cervical, oral and bone cancer cell lines *in vitro* (Ghashm *et al.*, 2010; Fauzi *et al.*, 2011) and in bladder cancer *in vitro* and *in vivo* (Swellam *et al.*, 2003). These effects are attributed to the flavonoids and phenolic acids contained in honey, known to have antioxidant and antiproliferative effects (Jaganathan & Mandal, 2009; Othman, 2012).

Aiming to elucidate the major differences on the composition of the *Aloe vera* and honey solution and its ethanolic extract, to better understand the observed results *in vitro* and *in vivo*, we performed a UPLC analysis, focusing in some immunomodulatory and cytotoxic substances.

In both the *Aloe vera* and honey solution and ethanolic extract, the aglycone anthraquinone, aloe-emodin was not detected. However its glycosilated form, aloin A, was found in both (Figure 3). Furthermore aloin A levels decreased during the ethanolic extraction; the ethanolic extract presented just about a third of the total aloin-a found in the crude *Aloe vera* and honey solution (A).

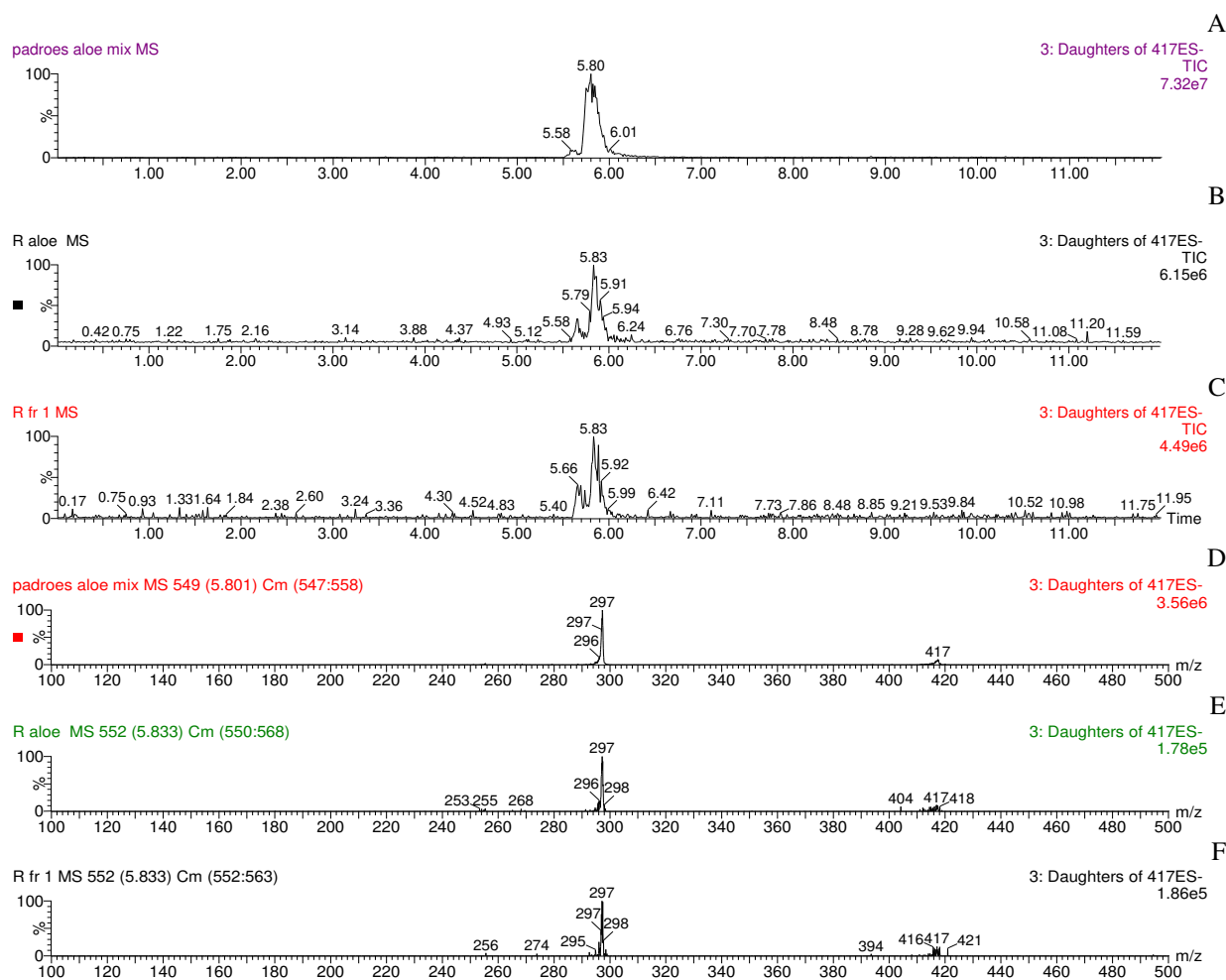


Figure 3. UPLC-ESI-MS analysis for Aloin-A (ACN 50%). A-C: Retention time for Aloin-A. A: Standard (Aloin-A), B: *Aloe vera* and honey solution, C: Ethanol Extract. C-E: m/z Fragmentation. C: Standard (Aloin-A), D: *Aloe vera* and honey solution, E: Ethanol Extract.

The analysis revealed the aloin-a content in the *Aloe vera* and honey solution was 282,69ug/mL, while in the ethanol extract was decrease to 97,32ug/mL. In this way, the highest dose of aloin used for our *in vitro* assays was around 14µg/mL, corresponding to 34µM (treatment with 50µL/mL of the *Aloe vera* and honey solution). This dose is at least five times lower than the aloin needed for moderate cytotoxic effects reported in several cancer cell lines, such as colorectal, breast, melanoma and uterine lineages (Esmat *et al.*, 2006; Nićiforović *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2013; Tabolacci *et al.*, 2013).

All together, aloin A was not the only compound responsible for the cytotoxic effects of the treatments with *Aloe vera* and honey solution (A) and ethanolic fraction (E)

on MCF-7 and Walker-256 tumour cells in our *in vitro* assays. Both *Aloe vera* and honey are reported to contain several other substances, not evaluated in the present work, which have antiproliferative and cytotoxic effects (Jaganathan & Mandal 2009; Harlev *et al.*, 2012). Besides, as mentioned previously, a synergic action cannot be discarded (Swellan *et al.*, 2003; Kametani *et al.*, 2007; Hamman 2008). Additionally, these active substances might be twice as concentrated in the ethanolic extract in comparison to the crude *Aloe vera* and honey solution, as we have obtained 50% ethanolic extract yield from crude solution, resulting in higher cytotoxic effect, especially at high extract doses (25-50 μ L) in 48 and 72h exposure (Figure 2: B, D and F).

It was also reported aloin has antiangiogenic effects on endothelial cells *in vitro*, and decreased tumour size and angiogenesis in mice (Pan *et al.*, 2013). This data supports our previous findings regarding to tumour vascularization, which revealed that WA tumours were less vascularized than WE tumours, which were less vascularized than the W tumour (Tomasin *et al.*, 2014). Once the WE group received the ethanolic extract diluted 1:1 in saline solution, these animals received around six times less aloin than the WA group received, which could be, at least in part, a reason for a most prominent inhibition of tumour vascularization in WA group in comparison to WE group.

In this work, the mannose levels were used as an indicative of the mannan polysaccharides content in the samples. Once *acemannan* is the major carbohydrate fraction of *Aloe* plants (Lee *et al.*, 2001; Harlev *et al.*, 2012) and that mannose corresponds to higher than 90% of its composition (Lee *et al.*, 2001; Talmadge *et al.*, 2004), presumably, the observed amounts of mannose are closely related to the *acemannan* content. The obtained results for the mannose content revealed although it is present in both samples (Figure 4), the *Aloe vera* and honey solution (A) presented a total of 128,39mg/mL, while the ethanolic extract analysis revealed a total of 98,77mg/mL, thus, a decrease of about 25%.

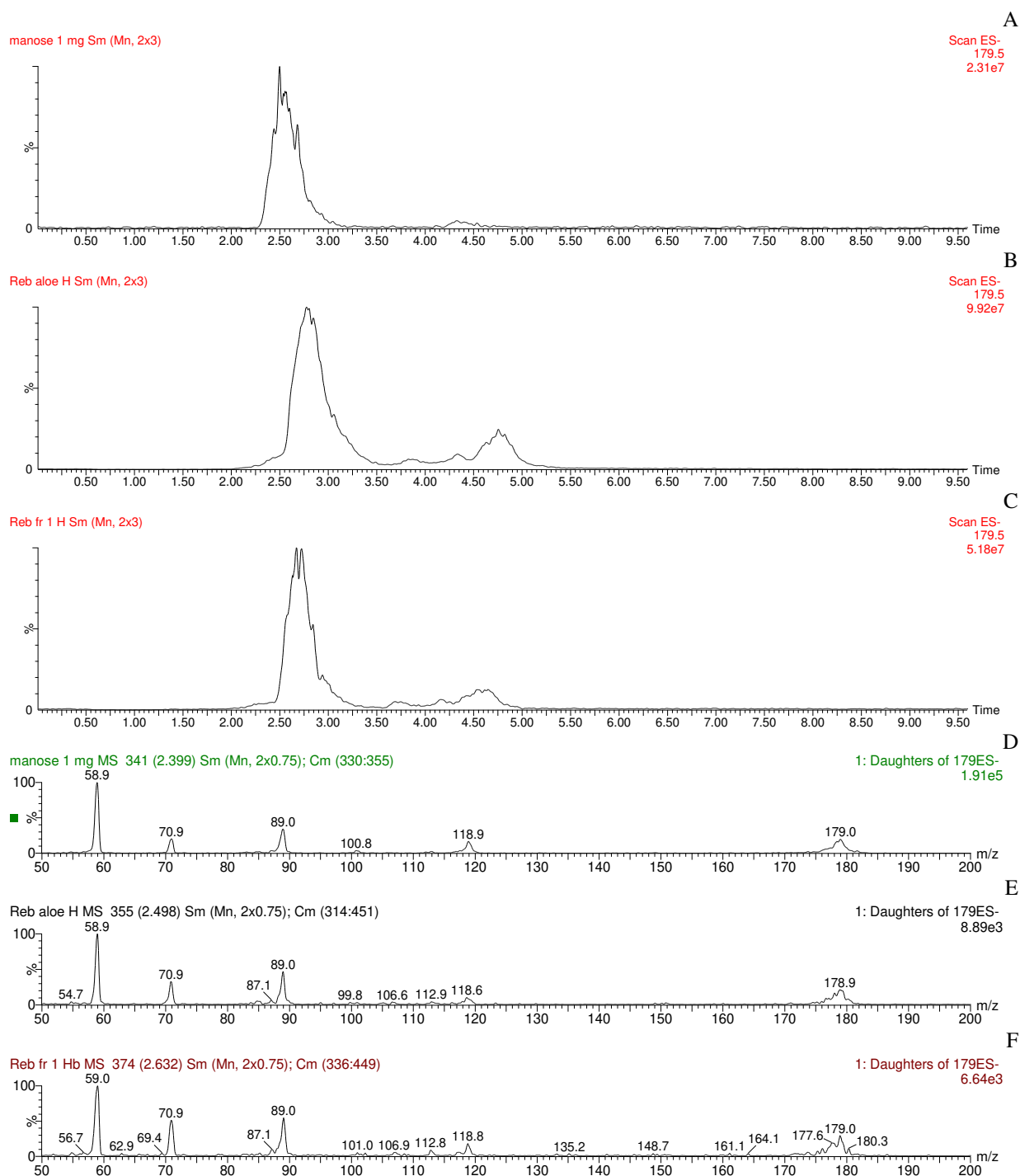


Figure 4. UPLC-ESI-MS analysis for mannose (ACN 50%). A-C: Retention time for mannose. A: Standard (mannose 1mg), B: Hydrolysed *Aloe vera* and honey solution, C: Hydrolysed Ethanolic Extract. C-E: m/z Fragmentation. C: Standard (mannose 1mg), D: Hydrolysed *Aloe vera* and honey solution, E: Hydrolysed Ethanolic Extract.

The lower mannose levels observed in the hydrolysed ethanolic extract (measured by UPLC-MS) in comparison to the hydrolysed *Aloe vera* and honey solution are consistent with the fact that mannan precipitates in ethanol (Ni *et al.*, 2004).

Experiments have demonstrated *acemannan* can reduce tumour size and burden and prolong the survival in experimental models (Harris *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 1991; King *et al.*, 1995; Harlev *et al.*, 2012), which has been associated with its immunestimulatory attributes, including macrophages and dendritic cells activation, as observed *in vitro* (Zhang & Tizard, 1996; Lee *et al.*, 2001; Boudreau & Beland, 2006).

The contribution of additional immunomodulatory polysaccharides (other than *acemannan*) reported to be found in much lower amounts in *Aloe* plants, which also have mannose in their chains (Pugh *et al.*, 2001; Im *et al.*, 2005), cannot be discarded as contributors for the effects (increased survival rate and decreased tumour mass) observed in this work *in vivo*.

Thus, the presence of *acemannan* and other mannose-based immunomodulatory polysaccharides in the *Aloe vera* and honey solution (A), and, in lower amounts in the ethanolic extract (E), might be a key contributor for the antitumour activity observed *in vivo*. The mannose content received by *Aloe vera* and honey solution treated rats (WA group) was about 2.5-fold higher than the amount received by the ethanolic extract treated rats (WE group,). As mentioned previously, the mannose content was used as an indicative of the relative amounts of known immunomodulatory polysaccharides contained in *Aloe vera*. Therefore, the higher levels of these substances administered for the WA group in comparison to the WE group could evoke a greater activation of immune responses in the host, leading to the difference in tumour size ($W > WE > WA$) and survival ($W < WE < WA$) observed (data presented by Tomasin *et al.*, 2014).

To address whether rats from the three different groups were, in fact, under distinct antitumor immunological response, we evaluated the levels of natural-killer (NK) cells infiltration in the tumour tissue of W, WA and WE groups (Figure 5).

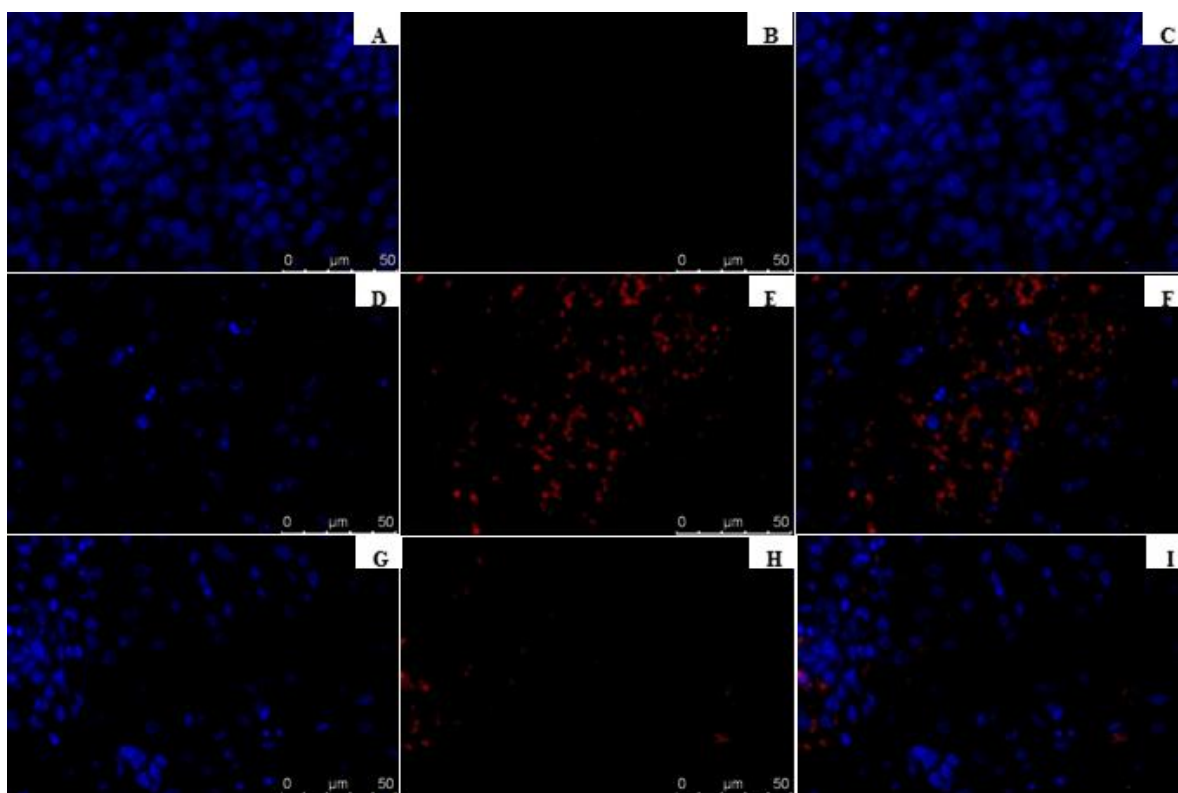


Figure 5. Infiltration of Natural killer (NK) cells in tumour tissue. A, B and C: Untreated rats (W); A=DAPI, B=NK cell marker primary antibody + Texas Red secondary antibody, C=Merge. D, E and F: *Aloe vera* and honey solution treated rats (WA); D= DAPI, E=NK cell marker primary antibody + Texas Red secondary antibody, F=Merge; G, H and I: Ethanol extract treated rats (WE); G= DAPI, H= NK cell marker primary antibody + Texas Red secondary antibody, I=Merge. Magnification=400x.

The role of natural killer cells in cancer therapy has been extensively studied, once NK cells promote tumour cells lysis, and also trigger an adaptive T cell-mediated antitumor immunity (Wallace & Smyth, 2005).

Indeed, the NK cells infiltration in the tumour tissue of untreated rats (W) was mostly absent (80% of the fields) or, when present, was very low (20% of the fields). A representative example is shown in Figure 5 A-C.

On the other hand, for WA tumours, 70% of the fields were scored as highly or very highly infiltrated by NK cells, and the remaining 30% were scored as moderately infiltrated. No fields were found presenting very low or no NK cell infiltration. A representative example is shown in Figure 5 D-F.

As expected, WE tumours had a higher percentage of NK cell infiltration than W tumours, but lower than WA tumours. All fields analysed for WE tumours were scored

between low to high infiltration. These data are consistent with the fact that the ethanolic extract of *Aloe vera* and honey solution contained less immunomodulatory substances (*acemannan*) than the crude *Aloe vera* and honey solution. A representative example is shown in Figure 5 G-I.

The greater infiltration of NK cells observed in WA tumours tissues, in comparison to both WE and W groups, is consistent with the fact these animals received a higher amount of immunomodulatory polysaccharides (WE group received about 40% of the amount received by WA, and W group received none). At this point should be necessary more studies to clarify whether the higher NK cells presence in the tumour, triggered by immunoestimulatory substances contained in the *Aloe vera* and honey solution and in its ethanolic extract, is a result of direct NK cells stimulation and/or recruitment or whether is due to activation of other immune cells that can activate NK lymphocytes.

As mentioned earlier, *acemannan* and other polysaccharides from *Aloe vera* are claimed to induce macrophages and dendritic cells activation (Zhang & Tizard, 1996; Lee *et al.*, 2001; Pugh *et al.*, 2001; Boudreau & Beland, 2006). Both macrophages and dendritic cells are antigen-presenting cells, so, they can activate the innate immune system, which later can lead to adaptive immunity (Fearon & Locksley, 1996; Stein-Streilein *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2008). Crosstalk between macrophages/dendritic cells and NK cells, involving both direct cell-to-cell contact and soluble cytokines, resulting in NK cell activation, has been extensively documented (Stein-Streilein *et al.*, 2000; Degli-Esposti & Smyth 2005; Moretta 2005; Walzer *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008).

A study in which patients with metastatic cancer were treated with conventional chemotherapy plus *Aloe* and honey oral administration revealed an improvement in survival, tumour regression rate and circulating lymphocytes than those patients who received no complementary therapy, giving further evidence that this treatment could bring benefits for cancer patients by immunomodulatory antitumor effects (Lissoni *et al.*, 2009).

Altogether, our data regarding to the *in vitro* and *in vivo* experiments, as well as the analyses of the *Aloe vera* and honey solution and its ethanolic fraction composition suggests that, in this experimental cachexia tumour model, the antitumoral effects observed

were a result of several events, including cytotoxic/anti-angiogenic activity, immunomodulation and synergism among *Aloe vera* and honey components.

Conclusions

Summarizing, both *Aloe vera* and honey solution and especially its ethanolic extract were in general more cytotoxic for tumour cells in comparison to fibroblastic cells *in vitro*. These results are probably generated by the concentration and synergic action of some *Aloe* and honey substances, other than aloin A and aloe-emodin, which still have to be determined. Regarding to the results *in vivo*, the increased survival rates and decreased primary tumour size observed in *Aloe vera* and honey solution treated rats (WA) in comparison to untreated rats (W), were, at least partially, due to *Aloe* polysaccharides' immunostimulatory activity. This fact was evidenced by the greater NK cell infiltration in WA group, also supported by the fact that the ethanolic extract treated group (WE), which presented intermediate values for survival, tumour size and NK cells infiltration, received a lower amount of mannose-rich polysaccharides, depleted during the extraction process. The elucidation of the major cytotoxic compounds concentrated in the ethanolic extract of the *Aloe vera* and honey solution, as well as, a therapeutic combination of these compounds with the *Aloe vera* immunomodulatory polysaccharides are key points for the optimization of the *Aloe vera* and honey anticancer potential.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, #2010/00209-9) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; #304604/2010-0, #302863/2013-3). R. Tomasin, MSc was supported by a scholarship sponsored by FAPESP (Grant #2010/00714-5).

References

- Akev, N., Turkay, G., Can, A., Gurel, A., Yildiz, F., Yardibi, H., Ekiz, E.E., Uzun, H., 2007. Tumour Preventive Effect of Aloe vera Leaf Pulp Lectin (Aloctin I) on Ehrlich ascites Tumours in Mice. *Phytother. Res.* 21, 1070–1075.
- Bardy, J., Slevin, N.J., Mais, K.L., Molassiotis, A., 2008. A systematic review of honey uses and its potential value within oncology care. *J Clin Nurs.* 17(19), 2604-23.
- Barros, L.F., Barison, A., Salvador, M.J., Mellosilva, R., Cabral, E.C., Eberlin, M.N., Stefanello, M.E., 2009. Constituents from the Leaves of *Magnolia ovata*. *Journal of Natural Products.* 72, 1529-1532.
- Boudreau, M.D., Beland, F.A., 2006. An Evaluation of the Biological and Toxicological Properties of *Aloe Barbadosensis* (Miller), *Aloe Vera*. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 24: 1, 103-154.
- Choi, S., Chung, M-H., 2003. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine.* 1(1), 53-62.
- Degli-Esposti, M.A., Smyth, M.J., 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 112–124.
- Esmat, A.Y., Tomasetto, C., Rio, M-C., 2006. Cytotoxicity of a Natural Anthraquinone (Aloin) Against Human Breast Cancer Cell Lines with and without ErbB-2-Topoisomerase IIa Coamplification. *Cancer Biology & Therapy.* 5(1), 97-103.
- Fearon, D.T., Locksley, R.M., 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 272, 50–54.
- Fauzi, A.N., Norazmi, M.N., Yaacob, N.S., 2011. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology.* 49(4), 871–878.
- Foster, M., Hunter, D., Samman, S., 2011. Evaluation of the Nutritional and Metabolic Effects of *Aloe vera*, in: Benzie IFF, Wachtel-Galor S (Eds), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press, Chapter 3.
- Gad, S.C., Weil, C.S. 1994. Statistic for toxicologists. In *Principles and Methods of Toxicology*, Wallace H (ed.). Raven Press: New York, 221–274.
- Ghashm, A.A., Othman, N.H., Khattak, M.N., Ismail, N.M., Saini, R., 2010. Antiproliferative effect of Tualang honey on oral squamous cell carcinoma and osteosarcoma cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 10, article 49.
- Hamman, J.H., 2008. Composition and Applications of *Aloe vera* Leaf Gel. *Molecules.* 13, 1599-1616.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100, 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144, 646-674.
- Harlev, E., Nevo, E., Lansky, E.P., Ofir, R., Bishayee, A., 2012. Anticancer Potential of Aloes: Antioxidant, Antiproliferative, and Immunostimulatory Attributes. *Planta Med.* 78, 843–852
- Harris, C., Pierce, K., King, G., Yates, K.M., Hall, J., Tizard, I., 1991. Efficacy of *acemannan* in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Mol Biother.* 3, 207–213.

- Im, S-A., Oh, S-T., Song, S., Kim, M-R., Kim, D-S., Woo, S-S., Jo, T.H., Park, Y.I., Lee, C.K., 2005. Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *International Immunopharmacology*. 5, 271–279.
- Jaganathan, S.K., Mandal, M., 2009. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID 830616.
- Jubri, Z., Narayanan, N.N.N., Karim, N.A., Ngah, W.Z.W., 2012. Antiproliferative activity and apoptosis induction by gelam honey on liver cancer cell line. *Int. J. Appl. Sci. Technol.* 2, 135–141.
- Kametani, S., Kojima-Yuasa, A., Kikuzaki, H., Kennedy, D.O., Honzawa, M., Matsui-Yuasa, I., 2007. Chemical Constituents of *Cape Aloe* and Their Synergistic Growth-Inhibiting Effect on Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1220-1229.
- King, G.K., Yates, K.M., Greenlee, P.G., Pierce, K.R., Ford, C.R., McAnalley, B.H., Tizard, I.R., 1995. The effect of *Acemannan Immunostimulant* in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. *J Am Anim Hosp Assoc.* 31, 439–447.
- Lee, J.K., Lee, M.K., Yun, Y-P., Kim, Y., Kim, J.S., Kim, Y.S., Kim, K., Han, S.S., Lee, C-K., 2001. *Acemannan* purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *International Immunopharmacology*. 1, 1275–1284.
- Lin, M-L., Lu, Y-C., Chung, J-C., Li, Y-C., Wang, S-G., Ng, S-H., Wub, C-Y., Su, H-L., Chen, S-S., 2010. Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway. *Cancer Letters* 291(1), 46-58.
- Lissoni, P., Rovelli, F., Brivio, F., Zago, R., Colciago, M., Messina, G., Mora, A., Porro, G., 2009. A randomized study of chemotherapy versus biochemotherapy with chemotherapy plus *Aloe arborescens* in patients with metastatic cancer. *In Vivo*. 23, 171-176.
- Liu, C., Lou, Y., Lizée, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G.J., Wang, Y-H., Ye, Y., Sikora, A.G., Overwijk, W.W., Liu, Y-J., Wang, G., Hwu, P., 2008. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 118(3), 1165-1175.
- Manna, S., McAnalley, B.H., 1993. Determination of the position of the O-acetyl group in a β -(1,4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydr Res.* 241, 317–9.
- Moretta, A., 2005. The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 306–311.
- Murakami, N., Fukuchi, S., Takeuchi, K., Hori, T., Shibamoto, S., Ito, F., 1998. Antagonistic regulation of cell migration by epidermal growth factor and glucocorticoid in human gastric carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 176, 127–136.
- Ni, Y., Turner, D., Yates, K.M., Tizard, I., 2004. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *Int Immunopharmacol.* 4(14), 1745-55.
- Nićiforović, A., Adžić, M., Spasić, S.D., Radojčić, M.B., 2007. Antitumor Effects of a Natural Anthracycline Analog (Aloin) Involve Altered Activity of Antioxidant Enzymes in HeLaS3 Cells. *Cancer Biology & Therapy*. 6(8), 1-e6.
- Othman, N.H., 2012. Honey and Cancer: Sustainable Inverse Relationship Particularly for Developing Nations—A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 410406.

- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartour, E., Saute` s-Fridman, C., Fridman, W.H., 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 29, 1093–1102.
- Pan, Q., Pan, H., Lou, H., Xu, Y., Tian, L., 2013. Inhibition of the angiogenesis and growth of Aloin in human colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Cell Int*. 13(1): 69.
- Peng, S.Y., Norman, J., Curtin, G., Corrier, D., McDaniel, H.R., Busbee, D., 1991. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, *Acemannan*. *Mol Biother*. 3, 79–87.
- Pugh, N., Ross, S.A., ElSohly, M.A., Pasco, D.S., 2001. Characterization of Aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. *J Agric Food Chem*. 49, 1030–1034.
- Reynolds, T., Dweck, A.C., 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol*. 68(1-3), 3-37.
- Singh, K.B., Surendra, K.T., 2013. Apoptosis of Dalton's lymphoma due to *in vivo* treatment with emodin is associated with modulations of hydrogen peroxide metabolizing antioxidant enzymes. *Cell Biochem Biophys*. 67, 439–449.
- Stein-Streilein, J., Sonoda, K.H., Faunce, D., Zhang-Hoover, J., 2000. Regulation of adaptive immune responses by innate cells expressing NK markers and antigen-transporting macrophages. *J Leukoc Biol*. 67(4), 488-94.
- Swellam, T., Miyanaga, N., Onozawa, M., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T., Akaza, H., 2003. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: *in vivo* and *in vitro* studies. *Int J Urol*. 10(4), 213-219.
- Tabolacci, C., Rossi, S., Lentini, A., Provenzano, B., Turcano, L., Facchiano, F., Beninati, S., 2013. Aloin enhances cisplatin antineoplastic activity in B16-F10 melanoma cells by transglutaminase-induced differentiation. *Amino Acids*. 44, 293–300.
- Talmadge, J., Chavez, J., Jacobs, L., Munger, C., Chinnah, T., Chow, J.T., Williamson, D., Yates, K., 2004. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. *International Immunopharmacology*. 4, 1757–1773.
- Tomasin, R., Gomes-Marcondes, M.C., 2011. Oral administration of *Aloe vera* and honey reduces Walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. *Phytother Res* 25(4), 619-623.
- Tomasin, R., Pascoal, A.C.R.F., Salvador, M.J., Gomes-Marcondes, M.C.C. 2014. A solution of *Aloe vera* and honey and its ethanolic fraction impair the metastatic ability of Walker 256 tumour tissues *in vivo*. *Natural Product Communications*. (manuscript submitted for publication).
- Ulbricht, C., Armstrong, J., Basch, E., Basch, S., Bent, S., Dacey, C., Dalton, S., Foppa, I., Giese, N., Hammerness, P., Kirkwood, C., Sollars, D., Tanguay-Colucci, S., Weissner, W. 2008. An Evidence-Based Systematic Review of *Aloe vera* by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal Of Herbal Pharmacotherapy*, 7(3), 279-323.
- Vale, C., Stewart, L., Tierney, J., 2005. UK Coordinating Committee For Cancer Research National Register Of Cancer. Trends in UK cancer trials: results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials. *Br. J. Cancer* 92, 811-814.

- Varker, K.A., Ansel, A., Aukerman, G., Carson, W.E. 3rd., 2012. Review of complementary and alternative medicine and selected nutraceuticals: background for a pilot study on nutrigenomic intervention in patients with advanced cancer. *Altern Ther Health Med.* 18(2), 26-34.
- Wallace, M.E., Smyth, M.J., 2005. The role of natural killer cells in tumor control — effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 27, 49–64.
- Walzer, T., Dalod, M., Vivier, E., Zitvogel, L., 2005. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, S49–S59.
- World Health Organization. 2014. Cancer. <http://www.who.int/cancer/en>. Accessed in May 6th, 2014.
- Zago, R., 2004. *Babosa Não é Remédio. Mas Cura!* 3a Edição. Editora Vozes: Brazil. 1–128.
- Zhang, L., Tizard, I.R., 1996. Activation of a mouse macrophage cell line by *acemannan*: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacology.* 35, 119–128.

CAPÍTULO 4:

“Screen *in vivo* para Identificação de Genes Supressores de Metástase”

Apresentação

Esse quarto capítulo compreende o trabalho desenvolvido no Laboratório de Metástase – Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Austrália. Trata-se de um *screen in vivo*, utilizando-se shRNAs para identificação de genes reguladores de metástase em câncer de mama. Foram empregadas técnicas de biologia molecular, genética e modelos animais, criando um dos únicos trabalhos onde a procura por genes reguladores de metástase é feita *in vivo* e não *in vitro*, sendo bastante interessante, uma vez que o ambiente *in vivo* é muito mais complexo e completo do que o ambiente *in vitro* para o estudo do processo metastático como um todo.

Como já mencionado, as metástases constituem a maior ameaça à vida do paciente com câncer e os conhecimentos acerca da regulação deste processo ainda são pouco elucidados, dificultando tanto a eficiência prognóstica, quanto o surgimento de terapias eficientes.

Neste trabalho, identificação de possíveis genes supressores de metástase foi feita através de *screen* funcional *in vivo* empregando-se biblioteca lentiviral de shRNA em câncer de mama triplo negativo derivado do modelo 4T1. A partir desta abordagem, foram identificados dezenas de candidatos a genes supressores de metástase. Dentre eles, Mnat1, Snd1, Cul5, Gabbr1, Rorb, Adk, Ccnd3, Gdnf, Nr1d1, Ptprs e Ltah4 são os genes-candidatos de maior confiabilidade por cumprirem um ou mais dos seguintes requisitos: (a) diminuição significativa do nível de DNA e RNA em cânceres de mama humanos agressivos, sendo assim relacionados à pior prognóstico, (b) papel biológico sugestivo, (c) fenótipo marcante durante o *screen* ou ainda (d) decréscimo significativo na expressão em linhagens de câncer de mama mais agressivas. Estes genes-candidatos devem ainda ser submetidos a experimentos de validação.

“An *in vivo* shRNA screen for Breast Cancer Metastasis Suppressor Genes”

Rebeka Tomasin^{a,b}, Kaylene Simpson^b, Richard Redvers^b, Robin Lesley Anderson^b.

^aLaboratory of Nutrition and Cancer, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, 13083-970, São Paulo, Brazil.

^bMetastasis lab, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Austrália.

RESUMO

Quando diagnosticado precocemente, o câncer de mama pode ser tratado com alto grau de sucesso. Entretanto, uma vez que a doença atinge o estágio metastático, e o câncer atinge órgãos distantes, tais como pulmões e ossos, os tratamentos são extremamente limitados e o prognóstico é muito ruim. Através da identificação de genes que controlam a metástase, seria possível prever os pacientes cuja doença é mais provável de espalhar, bem como criaria a oportunidade para o desenvolvimento de terapias mais eficientes. Usando uma biblioteca lentiviral de shRNA, nós iniciamos um *screen* funcional *in vivo* para identificar genes cuja redução nos níveis de expressão, em linhagens celulares pouco ou não metastáticas de câncer mamário murino (66cl4ch14 e 67NRch1, respectivamente), levaria a formação de metástases espontâneas. Após cinco screens usando quatro de dez *subpools* contidos nesta biblioteca, nós encontramos 90 metástases não usuais em órgãos como ossos, cérebro, pulmões, fígado, ovário, coração músculo esquelético, rim, linfonodos, glândula mamária contralateral e glândula adrenal. Dúzias de potenciais candidatos a genes supressores de metástase foram identificados através de sequenciamento convencional e de próxima geração. Entre eles, Stambpl1, Mnat1, Snd1, Cul5, Gabbr1, Rorb, Adk, Ccnd3, Gdnf, Nr1d1, Ptpr e Ltah4 são os principais candidatos para investigações adicionais. Os candidatos a genes supressores de metástase mencionados: (1) estão significativamente diminuídos ao nível de DNA ou RNA em carcinomas mamários agressivos *versus* tecido mamário normal (em humanos), e/ou sua subexpressão está associada a pior prognóstico em câncer de mama (Oncomine) ou (2) têm papel biológico sugestivo, apresentaram fenótipo marcante durante o *screen*, ou ainda estão menos expressos em linhagens de câncer de mama mais agressivas. Estes candidatos estão agora sob análises adicionais para validação como genes supressores de metástase *bona fide*.

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços em diagnóstico, técnicas cirúrgicas, terapias sistêmicas e cuidados com o paciente, a maior causa de morte em pacientes com câncer de mama são as metástases resistentes à terapia.

Aproximadamente 20% das pessoas diagnosticadas com câncer de mama, o que soma cerca de 280 mil mulheres por ano (WHO [1]), evoluirão para doença metastática, para a qual poucas terapias curativas existem. Isto é especialmente verdade para o subtipo de câncer de mama triplo-negativo (ER-/PR-/Her2-), onde existe uma falta de terapias eficazes.

Uma fração significativa dos pacientes com câncer tem tumores disseminados ocultos na ocasião do diagnóstico primário, e estes eventualmente progridem para lesões clinicamente detectáveis. Metástases de câncer de mama apresentam forte atração por ossos, levando a uma série de complicações que incluem dor intratável, compressão da medula espinhal, fraturas e hipercalemia [2]. Metástases em linfonodos, pulmões e fígado também são comuns, sendo as metástases cerebrais eventos tardios. Pesquisadores têm estudado o fenômeno da metástase por mais de 100 anos, no entanto, os mecanismos pelos quais células metastáticas deixam o tumor primário, e as razões pelas quais determinados tipos de tumor tendem a metastizar para órgãos distintos, continuam pouco compreendidos.

Projetos Genoma do câncer têm revelado várias alterações genéticas e epigenéticas correlacionadas ao crescimento e progressão tumoral. Embora um número considerável de genes reguladores de metástase já tenha sido identificado, apenas poucos deles são genes supressores de metástase, uma vez que estes são mais difíceis de identificar do que genes promotores de metástase [3]. Contudo, existem relatos de que a restauração do padrão de expressão de um único gene supressor de metástase reduz significativamente a carga metastática em modelos pré-clínicos. Alguns exemplos incluem BRMS1 [4], RKIP [5], KiSS-1 [6], Irf7 (Slaney, Anderson, Parker, Nature Medicine, sob revisão) e BMP4 (Eckhardt, Anderson, manuscrito em preparação). Sob esta perspectiva, a identificação e compreensão da biologia de genes supressores de metástase relevantes pode criar importantes oportunidades terapêuticas.

Screens através de RNA interferência

Extensivos estudos genéticos e epigenéticos já conduzidos geraram listas de genes alterados no câncer e na metástase. Estas análises têm sido extremamente valiosas, contribuindo para a identificação de vias e de genes que são atípicos no câncer, no entanto, não implicam na caracterização dos genes individualmente responsáveis pelo comportamento aberrante. A identificação de genes que regulam a metástase é requerida para o desenvolvimento de terapias mais efetivas contra o câncer de mama em estágio avançado.

Através da introdução de *pools* de RNAs em grampo (shRNAs) nas células, algumas espécies de shRNA, que tem como alvo genes essenciais para o processo sob estudo, tornar-se-ão aumentadas ou diminuídas. A partir da amplificação por PCR e sequenciamento de próxima geração, alterações na representação de sequencias de shRNA relevantes, entre a população inicial e a recuperada, revelaria genes essenciais para o processo em questão. Exemplos incluem *screens* para genes envolvidos na proliferação de células tumorais [7], células de câncer de mama CD44⁺CD24⁻ com características de células-tronco [8], reguladores da telomerase [9] ou do p53 [10]. Um *screen* com RNAs de interferência pequenos (siRNA) *in vitro*, conduzido por Simpson e colaboradores identificou novos reguladores positivos e negativos da motilidade celular, que foram validados utilizando-se shRNAs em ensaios de invasão 3D [11].

De fato, a maioria dos *screens* com shRNA reportados até a presente data utilizaram células cancerosas em cultura. Embora estes estudos tenham agregado informações importantes [12], *screens* utilizando células em seu contexto apropriado *in vivo*, tem probabilidades muito maiores de identificar genes envolvidos em processos como crescimento tumoral e metástase, que tem forte dependência do microambiente tumoral.

Alguns *screens in vivo* para avaliação do crescimento tumoral foram publicados, incluindo a identificação da fosfoglicerato desidrogenase (PHGDH) como promotor do crescimento de tumores de mama da linhagem MCF10DCIS [13] e a identificação de diversos genes supressores de tumor em linfoma murino [14]. Com relação à metástase, Gobeil e colaboradores infectaram células de melanoma murino B16-F0 com *subpools* de uma biblioteca de shRNA e selecionaram os genes que conduziram a formação de colônias satélites em matriz 3D [15]. O sequenciamento dos insertos de shRNA, isolados do DNA

oriundo destas colônias satélites, levou à identificação de 22 genes, os quais subsequentemente demonstraram capacidade de suprimir o desenvolvimento de metástases sem influenciar o crescimento do tumor primário. Em outro estudo, Gumireddy e colaboradores utilizaram uma biblioteca de shRNA para infectar células da linhagem de câncer mamário murino 168FARN, e procuraram por metástases pulmonares após o implante destas células, normalmente não metastáticas, na glândula mamária de cinco camundongas [16]. Os autores identificaram o regulador de transcrição KLF17 como sendo um regulador negativo da transição epitélio-mesenquimal e um inibidor de metástases pulmonares.

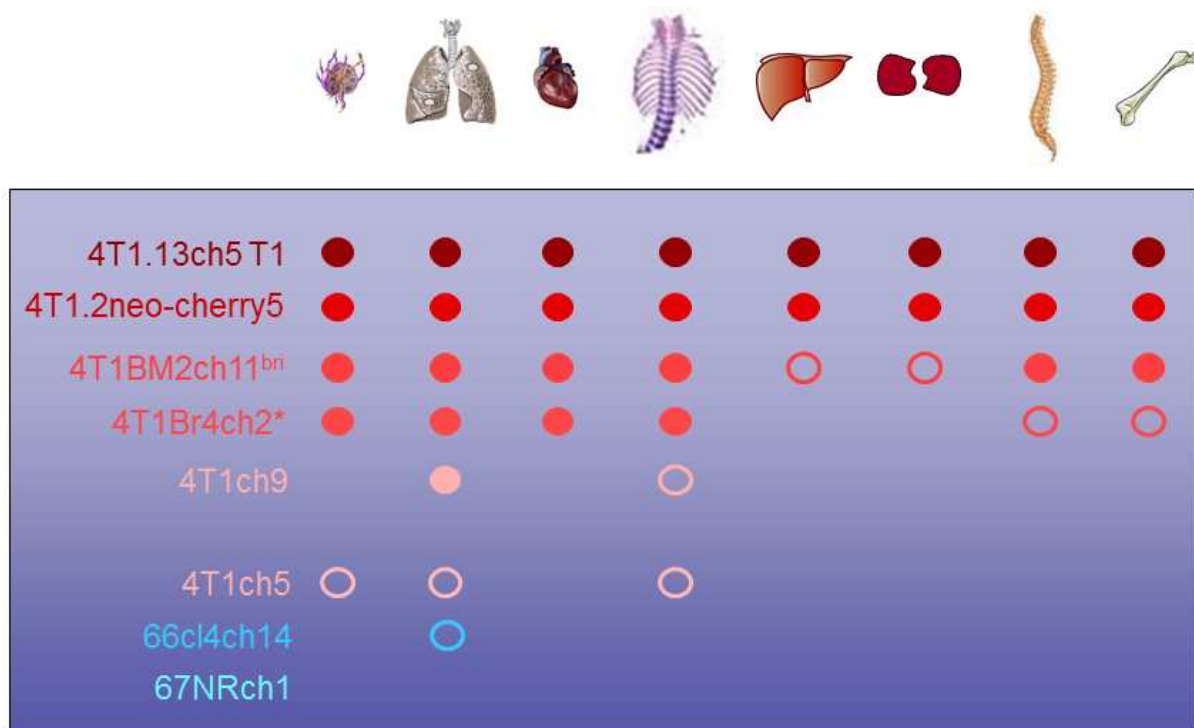
Neste trabalho, as análises foram estendidas para metástases de múltiplos órgãos além dos pulmões. Utilizando o modelo de câncer mamário triplo negativo desenvolvido pelo grupo de pesquisa em Metástase - Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne/Austrália, nós conduzimos um *screen* com shRNA que permite que a identificação do gene e a elucidação de sua função na metástase sejam determinadas no mesmo experimento. Assim, o maior propósito deste trabalho foi identificar genes supressores de metástase em câncer de mama, cuja redução levaria à metástase, através de um *screen* funcional *in vivo* utilizando uma biblioteca de shRNA lentiviral. A identificação de proteínas que regulam a metástase em câncer de mama, especialmente no subtipo triplo negativo, oferece potencial para o desenvolvimento de novas terapias-alvo para pacientes com câncer de mama avançado, que atualmente tem prognóstico muito ruim.

MATERIAIS E MÉTODOS

A biblioteca lentiviral

Nós utilizamos uma biblioteca lentiviral de shRNA disponível comercialmente: *Sigma MISSION TRC LentiPlex shRNA library* [17]. Esta biblioteca, criada através de algoritmos desenvolvidos pelo *Broad Institute* do Massachusetts Institute of Technology (MIT) e pela Universidade de Harvard, contém mais de 80.000 tipos de shRNAs em partículas lentivirais, que tem como alvo mais de 15.000 genes de camundongo. Em média, existem cinco sequências de shRNA diferentes para cada gene-alvo. A biblioteca é subdividida em dez *subpools* para reduzir a complexidade, sendo assim, cada um dos

fluorescência *ex-vivo* (para macrometástases) ou através da detecção das sequências de mCherry, presentes no DNA genômico apenas das células tumorais, através de qPCR (para macro e micrometástases).



* *Metástases cerebrais*

Figure 2. Organotropismo dos clones singênicos com mCherry. Os nódulos metastáticos observados (linfonodos, pulmões, coração, costelas, fígado, rim, coluna vertebral e fêmur) foram encontradas em fêmeas Balb/C injetadas com 10^5 células tumorais na glândula mamária, que tiveram seus tumores primários cirurgicamente removidos com 0.5g, e que foram sacrificadas entre 12-14 dias após a cirurgia. Círculos vazios simbolizam baixo potencial metastático, enquanto círculos preenchidos, e a coloração progressivamente mais escura, significam alto potencial metastático.

Para a realização dos *screens in vivo*, com a biblioteca Sigma MISSION TRC LentiPlex shRNA, tendo como objetivo a identificação de genes supressores de metástase, nós utilizamos uma linhagem pouco metastática ou a linhagem não-metastática (66cl4ch14 e 67NRch1, respectivamente). Através desta estratégia, se um gene supressor de metástase for nocauteado, nós poderíamos observar um aumento na carga metastática do animal.

Todos os clones celulares singênicos cresceram em Alpha-MEM 5% SFB e 1% Penicillina/Streptomicina à 37°C em 5% CO₂.

Plano de Pesquisa

Nós utilizamos a biblioteca de shRNA lentiviral mencionada (Sigma MISSION TRC LentiPlex shRNA library) para reduzir a expressão individual de genes em células 67NRch1 ou 66cl4ch14 – linhagens celulares tumorais com nenhuma ou com pouquíssima capacidade metastática em camundongos. Assumindo que o potencial metastático total destas células está bloqueado pela expressão de genes supressores de metástase, e que através do silenciamento destes genes, usando RNA de interferência, a célula seria então capaz de estabelecer tumores em sítios secundários em camundongas Balb/C, seria possível realizar um *screen in vivo* em busca de genes supressores de metástase.

Basicamente, as células foram infectadas com *subpools* da biblioteca (Tabela 1), de modo que, idealmente, cada célula tumoral carregasse um único inserto lentiviral, e assim, tivesse um único gene-alvo com a expressão suprimida. Células transfectadas (2.5×10^5) foram inoculadas em 40 camundongas por vez, e os tumores foram removidos cirurgicamente quando atingiram cerca de 0.5g. As camundongas foram sacrificadas 21 dias após a cirurgia, e examinadas minuciosamente em busca de nódulos metastáticos. Os nódulos foram removidos, o DNA genômico isolado, o shRNA contida no inserto foi amplificado e sequenciado para identificação do gene-alvo, revelando o candidato a supressor de metástase (Figura 3). Concomitantemente, 10 animais controle receberam células infectadas com um shRNA “sem alvo” (-pLKO.1-NT) foram submetidos ao mesmo protocolo experimental.

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas nos *screens* com os *subpools* da biblioteca Sigma MISSION TRC LentiPlex shRNA.

<i>Subpool</i>	Linhagem celular
pLKO.1-pool1	66cl4ch14
pLKO.1-pool2	66cl4ch14
<i>pLKO.1-pool2</i>	<i>67NRch1</i>
pLKO.1-pool3	66cl4ch14
pLKO.1-pool4	66cl4ch14

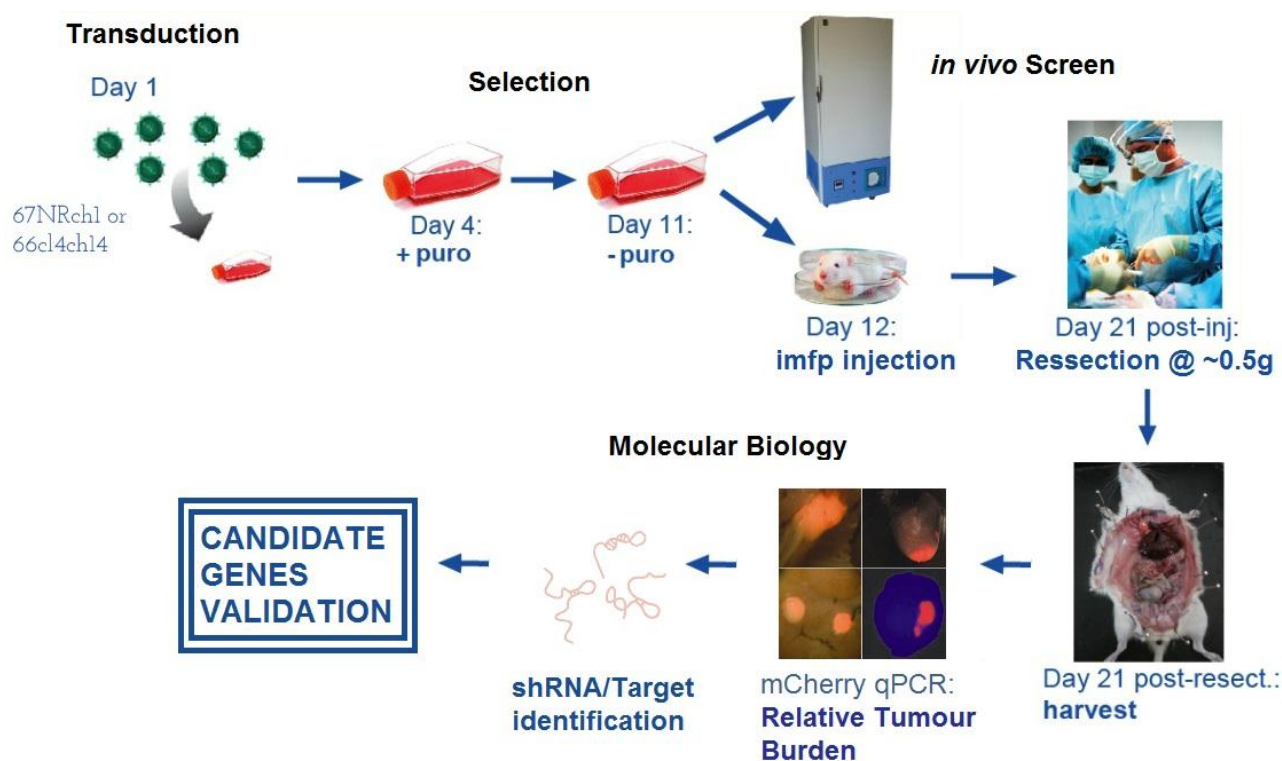


Figura 3. Plano de trabalho experimental (*Screens*)

O primeiro experimento foi conduzido pelo Dr. Richard Redvers, utilizando 66cl4ch14 e o pLKO.1-pool2, foi realizado antes da minha participação no grupo e seguiu um protocolo ligeiramente diferente: ao invés de identificar os tecidos mCherry-positivos através de qPCR, os órgãos eram dissecados e cultivados *in vitro* em meio com puromicina, de modo que apenas células infectadas, no caso tumorais, fossem capazes de crescer. A razão pela qual a metodologia foi alterada para os *screens* subsequentes envolveu diversos aspectos, entre eles, o número de animais utilizados por experimento e a possível perda de complexidade das metástases, como será discutido posteriormente nesse capítulo.

O passo seguinte no plano de trabalho é denominado “Validação” e verifica se o gene alvo encontrado no *screen* é realmente um gene supressor de metástase. Para tanto, primeiramente deve-se confirmar se os genes-candidato são expressos nas células parentais transfectadas com o vetor-controle 67NRch1-pLKO.1-NT ou 66cl4ch14-pLKO.1-NT (de acordo com as células durante o *screen* no qual o candidato foi identificado – Tabela 1), bem como se o shRNA é efetivo para atenuar a expressão do gene-alvo. Praticamente todos

os candidatos identificados ao longo dos cinco *screens* realizados foi submetido a estes dois passos.

Para os candidatos que forem aprovados nos estágios descritos acima, diferentes sequencias de shRNA, alvejando o gene de interesse, serão inseridas nas células tumorais e o experimento repetido, comparando-se a extensão metastática à dos tumores de células parentais (67NRch1-pLKO.1-NT ou 66cl4ch14-pLKO.1-NT). Até o momento, 3 genes-candidato (HSD17 β 13, Ndufa4 e STAMBPL1) foram submetidos a este passo, com o objetivo de se confirmar o fenótipo metastático observado durante o *screen*.

Ainda, para cada candidato bem sucedido na etapa mencionada, experimentos adicionais, objetivando avaliar o crescimento do tumor primário *in vivo* (uma vez que genes supressores de metástase não deveriam afetá-lo), além de outros ensaios *in vitro* para elucidar o papel que o gene exerce no processo metastático e seu mecanismo de ação, seriam realizados. Finalmente, a expressão do gene em um largo grupo amostral de câncer de mama humano (mais de mil amostras em chips de microarray do Australian Breast Cancer Family Study) será acessado. Infelizmente, nenhuma destas análises adicionais foi realizada nos candidatos obtidos, até o momento.

Transdução & Seleção (Screens)

As transduções das células 66cl4ch14 e 67NRch1 com as partículas lentivirais pLKO.1 foram feitas em frascos T25, quando as células atingiam 25-50% de confluência, utilizando-se um MOI (multiplicity of infection – número de partículas virais por célula) de 3. As células foram repicadas no dia seguinte, e 72h após a transdução iniciou-se a seleção, com o tratamento com puromicina por 7 dias (7 μ g/mL em células 66cl4ch14, ou 3 μ g/mL em células 67NRch1). O tratamento com puromicina foi interrompido 24h antes da inoculação das células (20 μ L contendo 2.5×10^5 células) na glândula mamária de cada camundonga. Após a injeção, as células foram recontadas para viabilidade, centrifugadas (4 min, 1400 rpm) e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração de DNA.

Transdução, Seleção e Clone de única célula (Genes-candidato)

Para cada gene-candidato encontrado no *screen* que foi analisado mais aprofundadamente, células 67NRch1 ou 66cl4ch14 foram transduzidas (M.O.I. segundo a Tabela 2), e, a fim de selecionar os melhores *knockdowns*, entre 3 e 4 dias após o início da seleção com puromicina, através de FACS, uma única célula foi semeada em cada um dos poços de placas de 96-poços pré-carregadas com meio de cultura com puromicina. As células foram monitoradas quanto ao crescimento de colônias, e 12 clones (para cada sequência de shRNA) foram expandidos e tiveram o nível de mRNA-alvo checado através de RT-qPCR. Se a queda na expressão (*knockdown*) fosse superior a 60%, seria realizado Western blotting com anticorpo apropriado para confirmar a redução a nível de proteína. Apenas clones com *knockdown* superior a 80% foram utilizados em experimentos *in vivo*, onde 20µL contendo 1×10^5 células/inóculo foram injetadas na glândula mamaria das camundongas. Após a injeção, as células foram recontadas para viabilidade, centrifugadas (4 min, 1400 rpm) e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração de DNA.

Tabela 2. M.O.I aplicado para cada um dos pLKO.1 shRNA contra HSD17β13, Ndufa4 e STAMBPL1.

Identificação da sequência	RNA-alvo	M.O.I. utilizado
TRCN0000041333	HSD17β13	~3
TRCN0000041334	HSD17β13	~3
TRCN0000041335	HSD17β13	~3
TRCN0000041336	HSD17β13	~3
TRCN0000041337	HSD17β13	~3
TRCN0000041833	Ndufa4	~10
TRCN0000041834	Ndufa4	~16
TRCN0000041835	Ndufa4	~17
TRCN0000041836	Ndufa4	~13
TRCN0000041837	Ndufa4	~10
TRCN0000033060	STAMBPL1	~3

Animais

Mais de 200 Balb/C fêmeas, com idade entre 6-8 semanas, foram utilizadas para realização dos *screens* e experimentos de validação (Tabela 3). Os animais foram obtidos

do Walter and Eliza Hall Institute (WEHI – Melbourne/Victoria/Austrália) e mantidos na Animal House Facility do Peter MacCallum Cancer Centre Institute, sob temperatura e luz controlada (25°C e 12h/12h de ciclo claro/escuro) e água e alimento *ad libitum*.

Após as injeções de células tumorais, as camundongas eram checadas diariamente e sacrificadas a qualquer sinal de prejuízo à condição de saúde (perdade peso, alteração na pelagem, respiração acelerada, etc). A manipulação dos animais foi aprovada pelo Animal Experimentation Ethics Committee (AEEC/Austrália) sob o número de ética E480.

Table 3. Sumário dos experimentos *in vivo* realizados.

Número do Exp.	Tratamento	Número de Animais
659	2.5x10 ⁵ 66cl4ch14-NT imfp	10
	2.5x10 ⁵ 66cl4ch14-pool2 imfp	10
860	2.5x10 ⁵ 67NRch1-NT imfp	10
	2.5x10 ⁵ 67NRch1-pool2 imfp	40
872	2.5x10 ⁵ 66cl4ch14-pool1 imfp	40
881	1x10 ⁵ 66cl4ch14-Ndufa4kd (TRCN0000041833, cl8) imfp	20
	1x10 ⁵ 66cl4ch14-Ndufa4kd (TRCN0000041837, cl8) imfp	20
889	2.5x10 ⁵ 66cl4ch14-pool3 imfp	40
892	2.5x10 ⁵ 66cl4ch14-pool4 imfp	40
927	1x10 ⁵ 67NRch1-NT imfp	20
	1x10 ⁵ 67NRch1-STAMBPL1kd (TRCN0000033060) imfp	20

Todos os experimentos *in vivo* seguiram o procedimento descrito abaixo:

- 1) As camundongas foram rapidamente anestesiadas com isoflurano (inalação) e receberam injeção de 20µL contendo células tumorais transfectadas (Table 3) na 4ª glândula mamária inguinal (imfp).
- 2) Cada camundonga foi monitorada diariamente, assim, quando o tumor primário alcançava ~0.5g, o animal era anestesiado com quetamina (40 µg/g) e xilasina (16 µg/g) intraperitoneal, e o tumor primário era removido, pesado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido. A incisão era fechada utilizando-se clips metálicos, uma pomada oftálmica era aplicada nos olhos para evitar ressecamento, o animal recebia 40mg/kg de carprofeno subcutâneo para analgesia e era colocado em

caixa sobre aquecimento para recuperação (Figura 5). O tempo experimental decorrido até a remoção cirúrgica variou de camundonga para camundonga, mas em geral, está entre 18-23 dias após a injeção imfp.

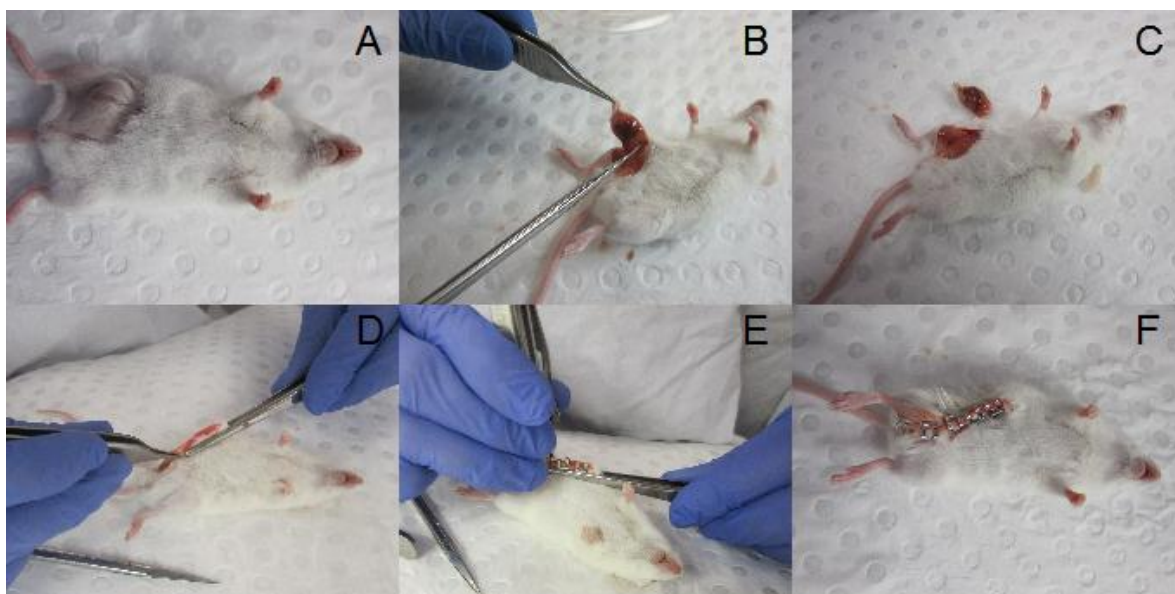


Figura 5. Procedimentos para ressecção do tumor primário (PT). A. camundonga anestesiada antes da ressecção do PT. B-C Ressecção do PT. D. Posicionamento das bordas da incisão para grampeamento. E. Grampeamento. F. Camundonga imediatamente após a ressecção, antes de ir para a recuperação.

- 3) Baseando-se em experimentos prévios conduzidos pelo grupo, foi estabelecido que as camundongas deveriam ser sacrificadas após 21 dias da ressecção do tumor primário. Contudo, como já mencionado, se o animal apresentasse qualquer sinal de decaimento na condição de saúde, ele seria sacrificado. O sacrifício ocorria por overdose de isoflurano. Fêmures, coluna vertebral, pulmões e qualquer nódulo metastático encontrado era coletado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido.

Extração de DNA Genômico

Os fêmures, colunas vertebrais, pulmões e nódulos metastáticos das camundongas foram homogeneizados com 1mL de tampão de lise de DNA (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM EDTA, pH 8.0) com auxílio do equipamento Fast Prep-24 MP (6.0 m/s, 4 x 1 min.), seguindo-se digestão *overnight* com tampão de lise de DNA completo (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM EDTA, pH 8.0, acrescido de 0.5% SDS

(peso/vol.), Proteinase K e RNase para 0.1mg/mL de concentração final) a 55°C sob rotação. No dia subsequente, o DNA foi extraído utilizando Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1), seguido por precipitação por etanol/sal e ressuspensão em 200µL de água livre de nucleases.

Quantificação da carga tumoral relativa através de qPCR

O sistema de rastreamento baseado na expressão de mCherry pelas células tumorais permite detecção altamente sensível de metástases em qualquer órgão ou tecido através de qPCR para amplificação de sequências de mCherry, presente apenas no DNA genômico das células tumorais [18].

A carga tumoral relativa (*Relative Tumour Burden*, RTB) de cada amostra foi medida através de Taqman qPCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). O DNA genômico foi submetido a PCR em tempo real para detecção do Ct (*cycle threshold*) para Vimentina (presente em todas as células, tumorais e do hospedeiro) e mCherry (apenas nas células tumorais). Comparando os valores de Ct para Vimentina e mCherry em uma determinada amostra (ΔCt), contra o ΔCt do controle positivo (células tumorais usadas no experimento) obtêm-se o $\Delta\Delta Ct$, e a partir dele calcula-se a carga tumoral relativa de acordo com a seguinte fórmula: $RTB = 10,000/2^{\Delta\Delta Ct}$. Através desta fórmula, uma amostra sem tumor corresponde ao valor zero, enquanto uma amostra constituída exclusivamente por células tumorais corresponde ao valor 10.000, sendo todos os valores expressos em porcentagem (controle positivo = 100%). A PCR em tempo real foi realizada no termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) usando método de ciclagem padrão. Todos os reagentes para PCR foram obtidos da Applied Biosystems, com exceção dos primers (GeneWorks, Adelaide, South Australia, Australia). As sequências dos primers e probes utilizados estão listadas a seguir:

mVim fwd: 5' AGC TGC TAA CTA CCA GGA CAC TAT TG 3'

mVim rev: 5' CGA AGG TGA CGA GCC ATC TC 3'

mCherry fwd: 5' GAC CAC CTA CAA GGC CAA GAA G 3'

mCherry rev: 5' AGG TGA TGT CCA ACT TGA TGT TGA 3'

mVim probe: VIC-CCT TCA TGT TTT GGA TCT CAT CCT GCA GG – TAMRA

mCherry probe: FAM-CAG CTG CCC GGC GCC TAC A - TAMRA

As reações foram feitas em triplicatas e cada reação conteve 1µM de cada um dos primers (forward e reverse) e probes, para mCherry e Vimentin, além de 40ng of gDNA.

Identificação do shRNA e do gene alvo

Uma vez que uma metástase é encontrada no *screen*, tanto em um nódulo visível, quanto em uma micrometástase detectada por qPCR, o próximo passo seria identificar o shRNA contido naquela metástase em particular, e seu gene-alvo, que a partir de então torna-se um candidato a supressor de metástase.

Em cada um dos *screens* realizados, a identificação do shRNA foi feita através de sequenciamento convencional (Sanger [19]), mas, adicionalmente, 30 amostras do *screen* 66cl4ch14-pool1 foram enviadas para sequenciamento de próxima geração (*Next Generation Sequencing*, NGS). Ambos estão descritos abaixo.

Método Convencional

O método convencional compreende um procedimento onde, basicamente, a sequência do grampo de RNA (shRNA) é amplificada, isolada e sequenciada através de sequenciamento Sanger. Os protocolos empregados neste caso estão descritos nas próximas sessões.

Amplificação do Inseto através de “touch down” (TD) PCR

A fim de amplificar os insertos de shRNA contidos nas metástases encontradas durante os *screens*, nós utilizamos 100ng de gDNA de cada metástase como molde, reagentes do kit GoTaq DNApol de acordo com instruções do fabricante (Promega), e primers das regiões do vetor vizinhas ao shRNA (presentes em todo e qualquer inserto desta biblioteca), gerando um amplicom de 355pb:

RPR LAP1 Fwd: GATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAAT

RPR LAP2 Rev: GTAATTTGTTTTTGTAATTCTTTAGTTTGTATGTC

Amostras, combinadas aos reagentes, foram dispostas em tubos para PCR no termociclador ABI GeneAmp 2700, aplicando-se o seguinte programa para PCR *touch-down*:

Termociclador pré-aquecido.

30s à 94°C

(15s à 94°C, 30s à 65°C, 30s à 72°C) x 15, -1°C a cada ciclo

(15s à 94°C, 30s à 50°C, 30s à 72°C) x 25 ciclos

1min. à 72°C.

Mantido à 4°C.

Paralelamente, um controle positivo, SHC009 (shRNA sem alvo), fornecido pela Sigma (fabricante da biblioteca empregada) foi amplificado nas mesmas condições descritas, para ser aplicado no gel de agarose junto às amostras, permitindo saber o sucesso e especificidade da reação.

Purificação

A fim de garantir que apenas o produto específico da amplificação por PCR (não o DNA genômico ou dímeros de primers) seriam submetidos ao sequenciamento, os produtos de PCR (amostras e controle positivo) foram aplicados em gel de agarose 1.8%, acrescido de 0.5µg/mL de brometo de etídio, em tampão TBE 0.5X (90V por 90 min.). As bandas correspondentes aos amplicons (mesmo tamanho do controle positivo), visualizadas sob luz ultravioleta em sala escura, foram recortadas e submetidas à purificação com o kit *QIAGEN Gel purification protocol clean-up of PCR products*, de acordo com instruções do fabricante (QIAGEN).

Sequenciamento e Identificação do shRNA/Gene-Alvo

Os produtos de PCR gel-purificados foram enviados para o Gandel Charitable Trust Sequencing Centre, localizado no Monash Health Translation Precinct (MHTP), Melbourne/Victoria/Austrália, para sequenciamento convencional. Cada amostra continha 25ng de produto de PCR purificado, 5pmol de Moffat reverse primer (CCTTTTCTTTTAAAATTGTGGATGAATACTGCCATTTG) e água suficiente para totalizar um volume de 16µL. Empregando-se o referido primer para sequenciamento, o produto detectado tinha 268pb.

A sequência mostrando a posição dos primers RPR LAP1 forward, RPR LAP2 reverse (usados na amplificação do inserto através de TD-PCR) e Moffat forward e reverse, no controle-positivo SHC009 (Vetor + shRNA sem-alvo) está representado em Dados suplementares 1.

A razão pela qual foram utilizados primers diferentes para a amplificação e para o sequenciamento é que enquanto RPR LAP1 Fwd e RPR LAP2 Rev demonstraram maior especificidade na amplificação do inserto contido no gDNA, os primers Moffat geram um produto menor, aumentando a eficiência do sequenciamento e facilitando a análise, uma vez que suas extremidades 3' acabam exatamente onde a sequência única do shRNA se inicia.

Uma vez recebidos os resultados do sequenciamento, os dados foram analisados através do Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems).

Sequenciamento de Próxima Geração (Next Generation Sequencing, NGS)

O sequenciamento de próxima geração permite sequenciamento paralelo de DNA, o que permite que milhares de sequências diferentes sejam processadas simultaneamente. Este método baseia-se em um denso *array* de DNA que é sequenciado através de ciclos iterativos que envolvem manipulação enzimática e coleta de dados baseados em imagens [20].

Até a presente data, nós selecionamos e sequenciamos 30 amostras do *screen* com 66cl4ch14-pLKO.1-pool1, incluindo células transduzidas, sete tumores primários e suas respectivas metástases associadas. O DNA genômico destas amostras foi enviado à Sigma-Aldrich (San Diego/CA) para amplificação e sequenciamento empregando-se o Sistema Illumina HiSeq 2500 em uma reação 30-plex.

Validação de Genes Supressores de Metástase

Selecionando os Melhores Genes-Candidato

Quando um shRNA é identificado a partir de uma metástase recuperada de um *screen*, seu alvo é um potencial candidato a gene supressor de metástase. Entretanto, o gene tem que atender a algumas exigências para ser considerado um candidato real. Alguns

destes requerimentos e questões para seleção dos melhores candidatos estão listados no diagrama abaixo (Figura 6).

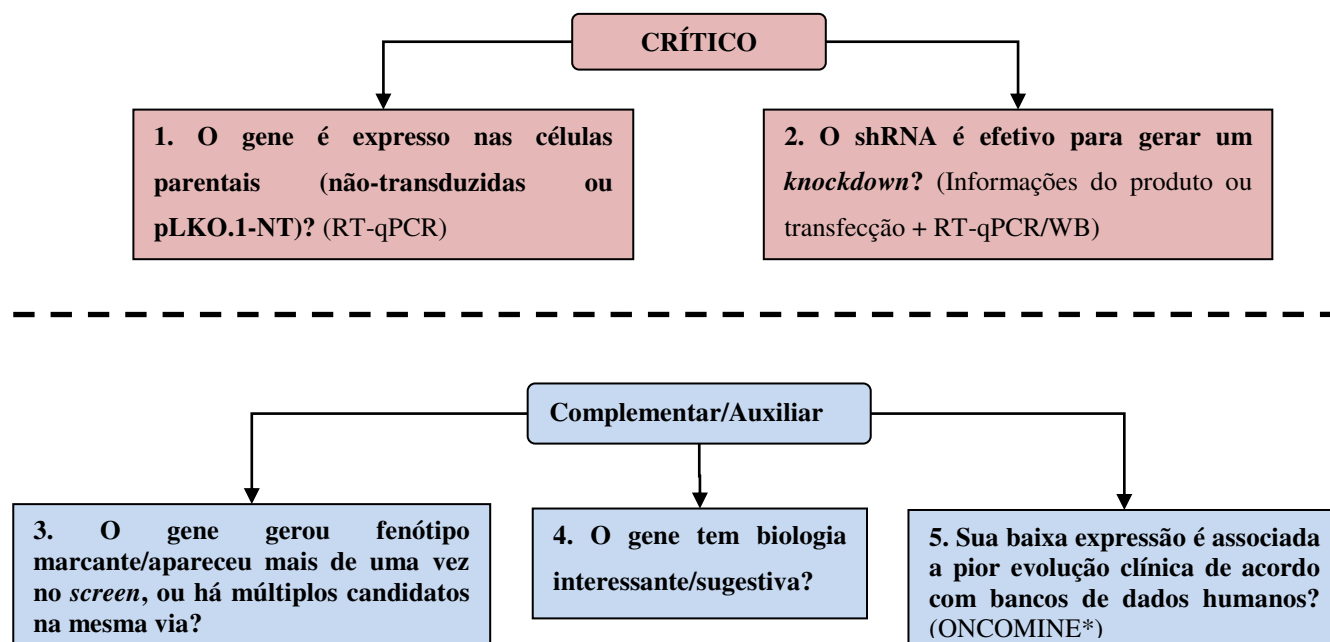


Figura 6. Características críticas (vermelho claro) e complementares (azul claro) para selecionar candidatos a genes supressores de metástase.

* ONCOMINE é uma base de dados com objetivo de coletar, padronizar, analisar e disponibilizar dados transcriptômicos sobre o câncer à comunidade de pesquisa biomédica. Este banco de dados inclui mais de 73.000 amostras, cobrindo a vasta maioria dos tipos e subtipos de câncer. Genes, vias e redes desreguladas em diferentes tipos/subtipos podem ser analisadas e combinadas com dados a cerca da evolução clínica e resposta a drogas [21, 22].

Extração de RNA e Síntese de cDNA

Uma vez que a análise da expressão do gene-alvo é essencial para a seleção e validação dos candidatos como legítimos genes supressores de metástase, linhagens celulares de potencial metastático variado (não/pouco/altamente metastática: 67NRch1, 66cl4ch14, 4T1ch5, 4T1ch9, 4T1Br4ch2, 4T1BM2ch11bri, 4T1.2Neo-mCherry, 4T1.13ch5T1) e as células transduzidas (66cl4ch14-pLKO.1-HSD17 β 13, 66cl4ch14-

pLKO.1-Ndufa4, 66cl4ch14-pLKO.1-STAMBPL1) foram submetidas a isolamento de RNA através do RNeasy Mini kit (QIAGEN), seguido de síntese de cDNA com o kit First Strand Oligo(dT)₁₅-primed cDNA e a enzima transcriptase reversa Superscript III (Promega), de acordo com instruções do fabricante.

Paralelamente, e seguindo o mesmo protocolo, foram sintetizadas as chamadas “amostras sem RT”, que consistem em uma reação de “síntese de cDNA” sem a presença da enzima transcriptase reversa (Superscript III). Neste caso, não ocorre a síntese do cDNA e as amostras são utilizadas como controle a fim de se verificar se os subsequentes RT-qPCRs para os genes-alvo não amplificarão devido à contaminação por DNA genômico. Apenas as amostras cujo respectivo –RT não amplificou no RT-qPCR foram utilizadas. Adicionalmente, foi sintetizado cDNA de embrião e placenta de Balb/C para serem utilizados como controle positivo nas RT-qPCR.

Avaliação da expressão dos genes-candidato através de RT-qPCR

RT-qPCR foi um dos métodos utilizados para verificar se o candidato era ou não expresso nas células parentais utilizadas nos *screens* (67NRch1 e 66cl4ch14). Mais tarde, empregou-se RT-qPCR para avaliar a expressão do gene candidato na série de linhagens com diferentes potenciais metastáticos, bem como nas células transduzidas com o shRNA para o gene-alvo, a fim de se avaliar a eficiência do *knockdown*. Os primers utilizados, e suas respectivas sequências estão listados na Tabela 4.

Com exceção dos ensaios TaqMan (nos quais seguimos instruções do fabricante), todas as concentrações de primers foram otimizadas utilizando-se 5 η g/reação de cDNA controle-positivo (embrião ou placenta Balb/C), através de uma série de diluições de primers (F+R = 100 η M, 200 η M, 400 η M e 800 η M).

Os primers obtidos da Geneworks foram desenhados utilizando-se a ferramenta de design de primers do NCBI, e testados para estruturas secundárias através do software ABI Primer Express Primer Probe Test Tool.

Por outro lado, uma vez que os KiCqStart® SYBR® Green Predesigned Primers já são validados, os pares de primers listados na Tabela 4 foram solicitados diretamente através do website do fornecedor (Sigma Aldrich).

Tabela 4. Primers utilizados para seleção de candidatos a genes supressores de metástase e para análises adicionais.

Alvo	Fwd. Primer (SYBR Green)	Rev. Primer (SYBR Green)	Obs.
mRps27a (hk)	5'-CGGGTGTCTCGGATCTAAT	5'-GTTCAACCTCGAGCGTGATGG	GeneWorks
	<i>TaqMan Gene Expression Assays - Mm01180369_g1</i>		Life Technologies
mHSD17 β 13	5'-ACCCGAGTACAAGGTTATGGCCTG	5'- ACTCCTTGCAACTTCTTCCGGCT	GeneWorks
	<i>TaqMan Gene Expression Assays - Mm01203271_m1</i>		Life Technologies
mPdlim1	5'-TAGTGACCGAGGAGGGGAAA	5'-GGACTTCTTGGGGTTCCGAC	GeneWorks
mMuc15	<i>TaqMan Gene Expression Assays - Mm00662032_m1</i>		Life Technologies
mNdufa4	5'-TCCCAGCTTGATTCTCTCTT	5'-GGGTTGTTCTTTCTGTCCCAG	GeneWorks
mStambpl1	5'-CGACCGACCAAGAGCAAAGA	5'-GCTTGTGTGGGATGACGACT	
mMnat1	5'-AGCATTGGAGGTAGAACGCC	5'-TCGGAGCTCTCCAGTCTCATC	
mSnd1	5'-CTGCACATGGATGGGGCTAA	5'-GGCCAGACCTTCTCTTTCC	
mRgs5	5'-GGCCCTAAAGAGGTGAACA	5'-AATTCAGAGCGCACAAAGCG	
mMid1	5'-GATGGGGAAGCCGATAGCTG	5'-CAGCTCCGACTCCAGTGTTT	
mBmi1	5'-TTACGATGCCAGCAGCAAT	5'-AGTGGGCCATTTCTTCTCCAG	
mCul5	5'-ATCACTACTGACTCTGAGAAG	5'-ATCTCTTGCAAGTAAGGAAAC	
mDiablo	5'-CTCTGTACCGACAATATACAAG	5'-ATCTGCTCCAGTTTGATAGG	KiCqStart® SYBR® Green Primers Predesigned
mCcr4	5'-GATCACTTTCAGAAGAGCAAG	5'-ATTCATCTTTTGAATCGTCG	
mC1qC	5'-AAACAGTATGTTCTGTCTG	5'-CCATCCTGAGGGGTGTAAG	
mEpor	5'-GAGTCACGAAAGTCATGTAG	5'-GAGCACTACTTCATTGATATGG	
mGdf5	5'-ATTGACAAAGGGCAAGATG	5'-TTCTTCCGTAAGATCCGC	
mGdnf	5'-TGACCAGTGACTCCAATATG	5'-GTTTATCTGGTGACCTTTTCAG	
mCd40	5'-ATAATGAGATCTTACCCCTG	5'-CTCTCTTTACCATCCTCCTG	
mAbi3	5'-TCTTCGAATGCTGGATTAC	5'-CTTCTCCATATGCATGTTTACC	
mDmrct2	5'-TGTCCTCTACATCCTTTTC	5'-TACAGAGTTGAACATGTGTG	
mMapre3	5'-ACTAGAACACGAGTACATCC	5'-TTCATAACTTCTCTACGGG	
mDmrt2	5'-CTTTTACCTACCTGCCTTG	5'-ATATTGCTGGTAGGAAGGG	
mI17d	5'-GGATTCCTACGACCCTG	5'-GATGGTGATGTAGTGTTTCG	

As reações foram feitas com as amostras em triplicatas no termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) empregando-se métodos de ciclagem padrão.

Os dados da RT-qPCR foram analisados inicialmente no Applied Biosystems StepOne Software, e em seguida nos softwares LinRegPCR [23] and REST 2009 (QIAGEN).

Todas as RT-qPCRs realizadas neste trabalho seguiram as normas das MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) [24].

Avaliação da expressão dos genes candidatos através de RNA-seq

Com o intuito de otimizar a validação dos candidatos, células tumorais das linhagens 67NRch1, 66cl4ch14, 4T1ch5 e 4T1.13ch5T1, foram submetidas ao sequenciamento de RNA (RNA-seq).

Estas células foram obtidas a partir tumores imfp, que foram dissecados, digeridos a 37°C por aproximadamente 4-5 horas, e cujas células foram separadas de acordo com a fluorescência mCherry através de FACS.

O sequenciamento de transcriptoma (RNA-seq) foi realizado através do equipamento Illumina HiSeq 2500 na Molecular Genomics Facility - Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne/Victoria/Austrália.

Avaliação da Expressão de Proteína através de Western blotting

Para aqueles candidatos onde decidiu-se prosseguir com experimentos adicionais de validação, quando havia um anticorpo disponível, o nível de expressão de proteína foi acessado através de Western Blotting, utilizando-se o lisado celular de células parentais não-transduzidas (67NRch1, 66cl4ch14, 4T1ch5, 4T1ch9, 4T1Br4ch2, 4T1BM2ch11bri, 4T1.2Neo-mCherry5, 4T1.13ch5T1) bem como de células 66cl4ch14-pLKO.1-HSD17 β 13shRNA (encontradas no Exp. 659), 66cl4ch14-pLKO.1-Ndufa4shRNA (encontradas no Exp. 659, além de 5 diferentes shRNAs x 3 clones de célula única para cada), 67NRch1-pLKO.1-Stambp1shRNA (encontradas no Exp. 860). Lisados de proteína, para controle positivo, foram obtidos a partir de coração, fígado, rim e testículo de Balb/C. As células e tecidos foram lisados em RIPA Buffer + 1% coquetel inibidor de protease (Sigma), a concentração total de proteína foi determinada através do BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce), de acordo com instruções do fabricante.

Os anticorpos primários e secundários empregados, bem como a diluição de trabalho utilizada para cada um deles (obtidas após otimização) estão na Tabela 5.

Tabela 5. Anticorpos primários e secundários utilizados para Western Blotting.

Anticorpos Primários		
<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição</i>	<i>Tamanho previsto da proteína</i>
Mouse IgG1 anti-actin (Clone C4)	(1:25,000, MP Biomedicals)	43 kDa
Mouse anti-mouse-GAPDH	(1:20,000, Abcam)	36 kDa
Mouse IgG1 anti-alpha tubulin	(1:10,000, Sigma)	50 kDa
Rabbit anti-human/mouse-Hsd17b13	(1:250, Abgent)	33 kDa
Rabbit anti-human/mouse-Ndufa4	(1:1000, Abcam)	9 kDa
Rabbit anti-human/mouse-Stambpl1	(1:100, Abgent)	50 kDa
Anticorpos Secundários		
<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição</i>	
Goat anti-rabbit-Alexafluor-680	(1:20,000; Invitrogen)	
Goat anti-mouse-Alexafluor-488	(1:20,000; Invitrogen)	
Goat anti-mouse-Alexafluor-680	(1:20,000, Invitrogen)	
Anti-rabbit HRP	(1:5,000)	
Anti-mouse HRP	(1:5,000)	

A eletroforese foi realizada em géis comercialmente preparados Bolt Bis-Tris 4-12% de 1,5mm e 15 poços, carregados com 40µg de proteína em Bolt Novex MES Running Buffer, por 35min a 165V e temperatura ambiente. As proteínas foram então transferidas para membrana de PVDF (100V, 120min em 1X Bolt Transfer Buffer), que foi então bloqueada em 5% (peso/vol) de leite desnatado/PBS-T(0.05%vol/vol). As membranas foram incubadas com anticorpos primários *overnight* à 4°C, na diluição apresentada na Tabela 5, em 4mL de 5% (peso/vol) de leite desnatado/PBS-T (0.05%vol/vol). Seguiram-se então uma série de lavagens (PBS-T 0.1% vol/vol) e incubação com anticorpos secundários por 1h à temperatura ambiente, para serem então submetidas ao método de detecção apropriado (fluorescência ou ECL) no equipamento ChemiDoc™ MP Imaging System.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Screen com Subpool-2 em 66cl4ch14

A vantagem de se detectar a presença de metástases através da cultura dos órgãos dissecados em meio acrescido de puromicina, sobre a extração de DNA genômico e qPCR para mCherry, é que, no primeiro caso, obtém-se a linhagem celular transduzida que gerou aquela metástase em particular. No entanto, as limitações desta técnica incluem:

- Uso de menor número de animais: é inviável a execução de um experimento, onde seriam dissecados e cultivados cada fêmur, coluna vertebral, pulmão e

demais nódulos, empregando-se números em torno de 40 animais por *screen*. O uso de um maior número de animais no *screen* é extremamente importante, uma vez que aumentaria a abundância de metástases obtidas no experimento;

- Perda de informações acerca da carga tumoral: não é possível conhecer o quão extenso o evento metastático era, uma vez que não há quantificação do número de células tumorais presentes naquele órgão em particular;
- Perda de complexidade: além da possibilidade de que algumas das células tumorais não cresça em cultura, órgãos maiores (tais como a coluna vertebral) são passíveis de conter mais de um clone, e diferentes clones provavelmente teriam diferentes representações no órgão, assim, tanto um clone com um número menor de células pode não crescer, ou, clones que geraram cargas tumorais distintas no órgão seriam igualados numericamente no período de cultivo, de qualquer modo, estas informações seriam perdidas.

Incidência de Metastases

Em suma, sete de um total de dez camundongas apresentou ao menos uma metástase não-usual, incluindo coração, costelas, fígado, ovário, fêmures e coluna vertebral (Figura 7). “Não-usuais” aqui compreendem quaisquer metástases que não pulmonares, uma vez que esta linhagem é considerada levemente metastática para este órgão em particular.

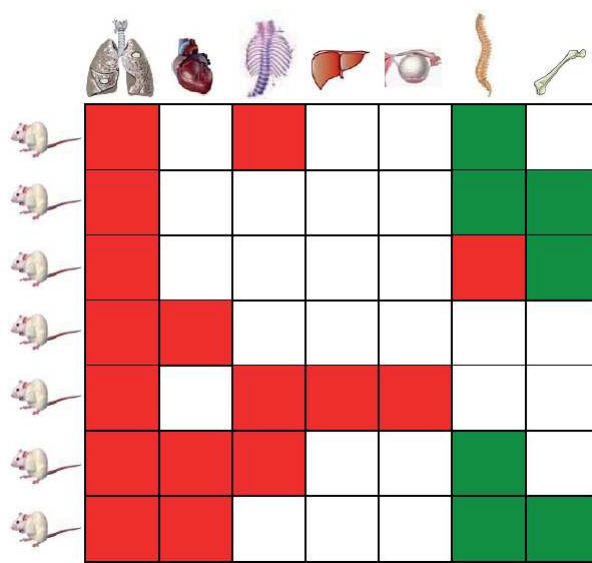


Figura 7. Distribuição de metástases visíveis (vermelho) e micrometastases (verde) após injeção de 66cl4ch14-pLKO.1-pool2 imfp.

Candidatos a Supressores de Metástase

Quatro potenciais genes-candidato foram identificados em metástases deste *screen*, como apresentado na Tabela 6.

Table 6. Genes-alvo dos shRNAs detectados no *screen* com 66cl4ch14-pool2 e a localização das metástases nas quais eles foram detectados.

Alvo do shRNA	Órgão onde a metástase foi encontrada
HSD17 β 13	Coluna vertebral
Muc15	Coluna vertebral
Pdlim1	Coluna vertebral
Ndufa4	Coluna vertebral e Fêmures (mesmo animal)

Notavelmente, três destes alvos (Hsd17b13, Muc15 e Pdlim1) encontram-se significativamente decrescidos ao nível de DNA e transcrito em diversos grupos de câncer de mama humano (Oncomine, Tabela 7).

Tabela 7. Alguns dos alvos identificados encontram-se diminuídos ao nível de DNA e RNA em cânceres de mama humanos *versus* tecido mamário normal.

shRNA target	CNV	CNV pval	FC	FC pval
Hsd17b13	-2.06	4.16x10 ⁻⁸	-21.89	3.5x10 ⁻¹⁷
Muc15	-2.05*	3.80x10 ⁻²	-16.18	4.84x10 ⁻¹²
Pdlim1	-2.06	5.57x10 ⁻⁸	-4.36	1.85x10 ⁻²⁵

*Adenocarcinoma Intraductal Cribriforme, n=3; todos os outros são Carcinoma Ductal Invasivo, n=392. CNV=Copy Number Variation (DNA); FC=Fold Change (RNA).

HSD17 β 13

Uma vez que as linhagens celulares derivadas do *screen* com 66cl4ch14-pool2 estavam disponíveis, um transplante seriado utilizando 1x10⁵ células 66cl4ch14-pool2-HSD17 β 13shRNA, implantadas na glândula mamária de 20 camundongas Balb/C foi realizado, objetivando avaliar se as referidas células repetiriam o mesmo comportamento observado durante o *screen* (aumento na incidência de metástases), como um passo inicial para a validação, experimento também conduzido pelo Dr. Richard Redvers.

Diversas razões levaram à escolha da HSD17 β 13 para análises adicionais. No *screen*, o shRNA contra HSD17 β 13 foi identificado em uma metástase visível na coluna vertebral, e, dentre todos os candidatos, este é o menos expresso em câncer de mama agressivo *versus* tecido mamário normal em humanos (Tabela 7).

Ainda, a enzima codificada por este gene, 17-beta hidroxisteróide desidrogenase 13, também conhecida como SDR16C3, catalisa a conversão de testosterona à androstenediona, bem como a conversão de 17 β -estradiol à estrona [25]. Acredita-se que a HSD17 β 13 regula a atividade de andrógenos e estrógenos através da oxidação do C17 para formação de esteroides de potência reduzida, e que estes hormônios e seu balanço poderiam ter papel muito importante no câncer de mama.

Camundongas que receberam o transplante seriado apresentaram aumento na carga metastática quando comparadas àquelas implantadas com células 66cl4ch14-pLKO.1-NT, incluindo uma metástase femoral visível (Figura 8). Também trabalhamos na geração de células 66cl4ch14 transduzidas com 5 shRNA diferentes contra HSD17 β 13.

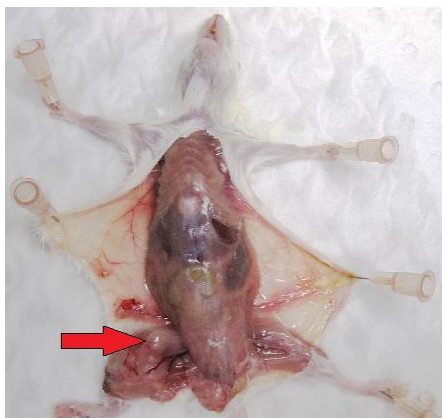


Figura 8. Metástase femoral (seta vermelha) encontrada em uma camundonga que recebeu o transplante seriado com as células 66cl4ch14-pool2-HSD17 β 13shRNA.

Contudo, a expressão da HSD17 β 13 não pôde ser confirmada em células 66cl4ch14, nem tampouco em células 66cl4ch14-pLKO.1-NT, mesmo após extensivas tentativas que incluíram análises por Western blotting (2 anticorpos diferentes, nenhum foi específico), TaqMan RT-qPCRs e SYBR Green RT-qPCRs (para os dois possíveis transcritos da HSD17 β 13 as “variantes” 1 e 2) – as reações estavam funcionando, uma vez que o controle-positivo amplificou perfeitamente. Sendo assim, infelizmente, os eventos

metastáticos observados no *screen* e no experimento de transplante seriado não ocorreram devido à diminuição nos níveis da enzima HSD17 β 13, uma vez que o gene que a codifica já é sub-expresso nas células 66cl4ch14 parentais. Possivelmente, as alterações na capacidade metastática observadas nas células 66cl4ch14-pool2-HSD17 β 13shRNA foram resultado de um efeito “*off-target*”, tal como mutação insercional.

Ndufa4

Embora dentre os quatro candidatos identificados, *Ndufa4* foi o único para o qual não havia informações disponíveis no ONCOMINE, o shRNA para este gene foi detectado em duas metástases ósseas na mesma camundonga, sugerindo que estes foram eventos não-randômicos.

Há pouca informação na literatura científica acerca do *Ndufa4*, mas sabe-se que este gene integra a cadeia IV de transporte de elétrons em mamíferos (citocromo-C oxidase IV) [26].

Verificando a expressão de mRNA para *Ndufa4* nas linhagens celulares 66cl4ch14-pLKO.1-pool2-*Ndufa4*shRNA_femur e 66cl4ch14-pLKO.1-pool2-*Ndufa4*shRNA_coluna, observou-se que, em comparação com células 66cl4ch14-pLKO.1-NT, a expressão de m*Ndufa4* foi reduzida, demonstrando assim que este gene é expresso nas células parentais, e que o shRNA foi eficiente na geração do *knockdown* (Figura 9).

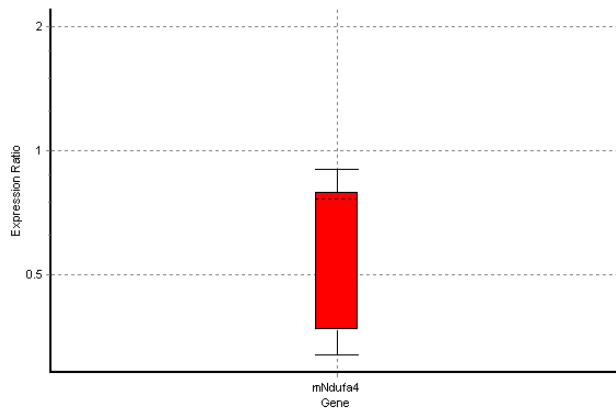
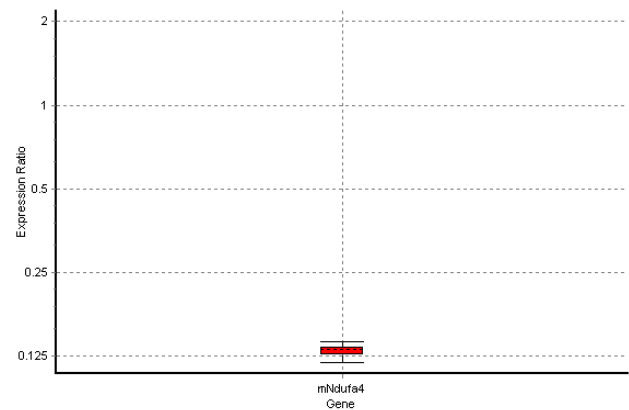
A. 66cl4ch14-pLKO.1: Ndufa4shRNA (femur) vs non-target**B. 66cl4ch14-pLKO.1: Ndufa4shRNA (spine) vs non-target**

Figura 9. mNdufa4 está menos expresso nas linhagens 66cl4ch14-pLKO.1-pool2-Ndufa4shRNA derivadas do fêmur e da coluna vertebral, em relação à células 66cl4ch14-pLKO.1-NT. A: mNdufa4 está subexpresso em 66cl4ch14-pLKO.1-pool2-Ndufa4shRNA_fêmur (em comparação ao grupo controle) com expressão média de 0.603 (variando entre 0.353 - 0.844) e $P(H1)=0.000$. B: mNdufa4 está subexpresso em 66cl4ch14-pLKO.1-pool2-Ndufa4shRNA_coluna (em comparação ao grupo controle) com expressão média de 0.130 (variando entre 0.122 - 0.137) e $P(H1)=0.000$. **P(H1) representa a probabilidade da hipótese alternativa de que a diferença observada entre a amostra e o controle seja devido à chance.*

Em um experimento subsequente, verificou-se que a expressão de mNdufa4 está pouco expressa em uma linhagem celular altamente metastática, em comparação com linhagens menos metastáticas (Figura 10).

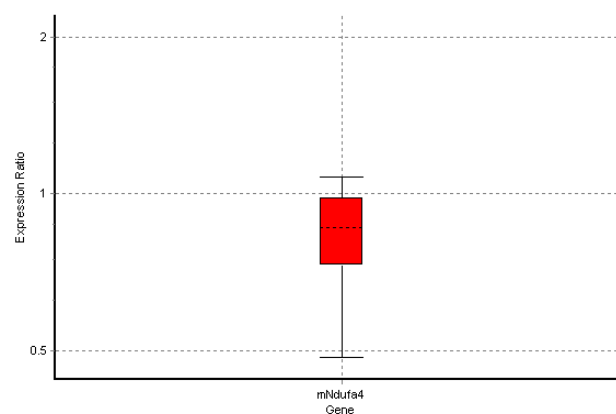
4T1.13ch5 v (67NRch1 + 4T1ch5 + 66cl4ch14-pLKO.1-non-target)

Figura 10. mNdufa4 está subregulada em células 4T1.13ch5T1 (alto potencial metastático) quando comparadas à células 67NRch1 (não-metastáticas), 4T1ch5 e 66cl4ch14-pLKO.1-NT (ambas com baixo potencial metastático). mNdufa4 está subexpresso na amostra 4T1.13ch5T1 (em comparação ao grupo controle: 67NRch1, 4T1ch5 e 66cl4ch14-pLKO.1-NT) com expressão média de 0.819 (variando entre 0.651 - 1.022). $P(H1)=0.039$. **P(H1) representa a probabilidade da hipótese alternativa de que a diferença observada entre a amostra e o controle seja devido à chance.*

Ainda mais interessante foi o fato de que, quando os níveis da expressão da proteína Ndufa4 foi acessado através de Western blotting, ambas as linhagens 66cl4ch14-pLKO.1-Ndufa4shRNA, derivadas da espinha (coluna vertebral) e do fêmur perderam totalmente a expressão de Ndufa4, e as linhagens celulares mais metastáticas apresentaram níveis mais baixos desta proteína (Figura 11).

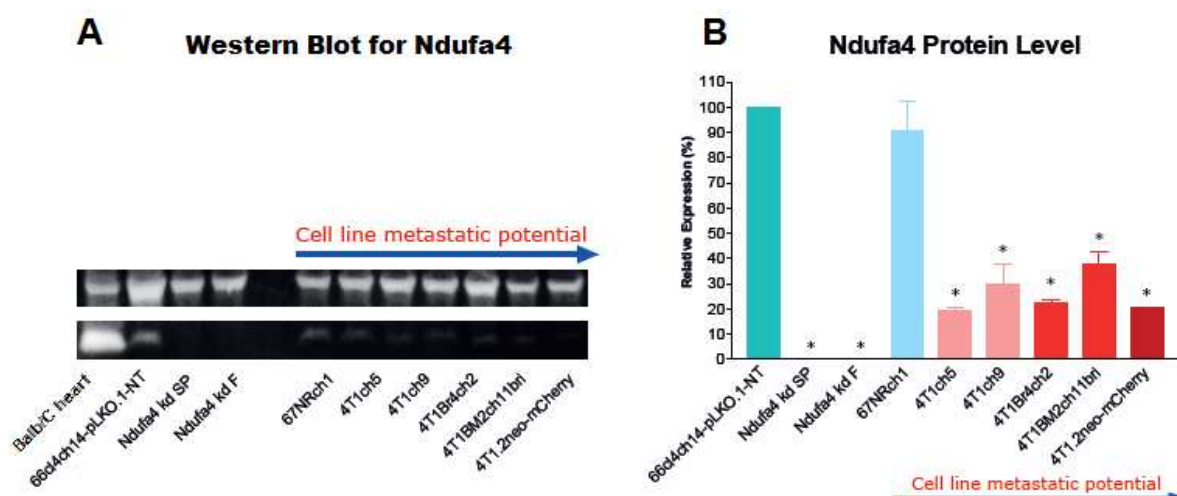


Figura 11. Linhagens celulares 66cl4ch14-pLKO.1-Ndufa4shRNA (espinha e fêmur) perdem a expressão da proteína Ndufa4, que também está menos expressa em linhagens celulares com maior capacidade metastática. A: Western Blotting contra Ndufa4 (9kDa) e alfa-tubulina (55kDa). B: Expressão normalizada da Ndufa4 nas células derivadas de metástases (66cl4ch14-pLKO.1-Ndufa4shRNA fêmur e espinha) e em linhagens celulares com diferentes potenciais metastáticos. *P<0.05 em comparação às células 66cl4ch14-pLKO.1-NT (ANOVA de uma via seguido por teste de Bonferroni).

Estes resultados promissores conduziram à execução de experimentos adicionais na tentativa de validar o gene-candidato Ndufa4 como um supressor de metástase.

Células 66cl4ch14 foram transfectadas com cinco diferentes pLKO.1-shRNA contra Ndufa4, seguiu-se a seleção com puromicina e a clonagem de uma única célula. Ao todo, mais de trinta clones (ao menos seis para cada shRNA) foram testados quanto à expressão de Ndufa4 através de western blotting. Dentre os cinco shRNAs utilizados, TRCN0000041833 e TRCN0000041837 demonstraram os melhores resultados de *knockdown* (Figura 12).

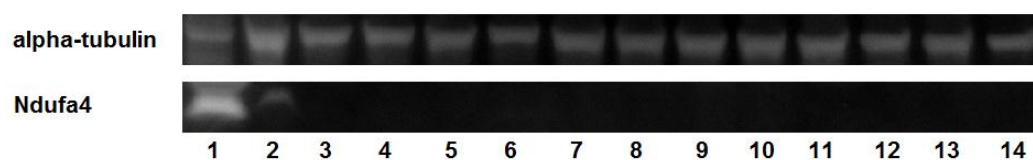


Figura 12. Western Blotting contra Ndufa4 mostrando perda de expressão em células 66cl4ch14-pLKO.1-Ndufa4shRNA. 1: Coração Balb/C (controle +), 2: 66cl4ch14-pLKO.1-NT, **3-8: 66cl4ch14-pLKO.1-TRCN0000041833**: 3: total, 4: clone 1, 5: clone 2, 6: clone 4, 7: clone 7, 8: clone 8; **9-14: 66cl4ch14-pLKO.1-TRCN0000041837**: 9: total, 10: clone 1, 11: clone 4, 12: clone 6, 13: clone 8, 14: clone 9.

Baseando-se nestes dados, 20 camundongas receberam o inóculo de 10^5 células 66cl4ch14-pLKO.1-TRCN0000041833_clone 8, e outras 20 foram implantadas com 10^5 células 66cl4ch14-pLKO.1-TRCN0000041837_clone 8. Inesperadamente, nenhum dos animais injetados com células transduzidas com o primeiro shRNA (TRCN0000041833) desenvolveram tumores primários normalmente (os tumores eram ausentes ou cresciam muito lentamente) ou apresentaram metástases. Camundongas injetadas com células contendo o segundo shRNA (TRCN0000041837), o mesmo encontrado durante o *screen*, apresentaram tumores crescendo normalmente, e seguiram o protocolo experimental padrão (cirurgias/sacrifício), contudo, não apresentaram nenhuma metástase visível ou mesmo micrometástases, nem ao menos nos pulmões, para onde células 66cl4ch14 normalmente metastizam, mesmo que em baixa frequência.

Como teste, linhagens com cada um dos outros shRNAs foram inoculadas em três camundongas. Duas delas (contendo os shRNAs TRCN0000041834 e TRCN0000041836) desenvolveram tumores, mas muito lentamente, e não foram encontradas metástases, assim como no experimento prévio.

A razão por trás destes resultados é difícil de entender. Ndufa4 atendeu aos requisitos essenciais e a alguns dos requisitos complementares para ser considerado um bom candidato a gene supressor de metástase. Ainda, alguns dos shRNAs devem ter um efeito colateral (*off-target*) uma vez que as células que os expressavam não apresentaram o mesmo comportamento *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, as células 66cl4ch14-pLKO.1-TRCN0000041836 demonstraram o crescimento mais lentos *in vitro*, enquanto as células 66cl4ch14-pLKO.1-TRCN0000041837 (mesmo grampo encontrado no *screen*) apresentaram o crescimento mais rápido. Ainda é possível desenhar um novo shRNA contra

Ndufa4, cloná-lo, inserí-lo em um vetor e repetir o experimento, contudo esta abordagem passou a não ser prioritária.

Screen com Subpool-1 em células 66cl4ch14

Com base no *screen* anterior, foi decidido reduzir a MOI. Uma vez que um MOI~3 foi eficiente para transduzir células 66cl4ch14 com pLKO.1-HSD17 β 13shRNA, sendo então este mesmo valor o usado nos próximos *screens*.

O MOI utilizado anteriormente (~25) foi estabelecido utilizando-se pLKO.1-GFP, seguido de separação por FACS para avaliar a eficiência da transfecção. Aparentemente, as células derivadas do modelo 4t1 são difíceis de transduzir, mas uma vez transduzidas, frequentemente elas apresentam mais de um inserto. Isso não tem maiores implicações quando emprega-se sequenciamento de próxima geração e análises de descomplexação para selecionar os genes candidatos. Por outro lado, se for utilizado sequenciamento convencional (como predominantemente neste trabalho), é realmente uma premissa ter apenas um inserto por célula, para que os dados do sequenciamento possam ser interpretados (Figura Suplementar 1).

Através da redução da MOI, estaríamos sujeitos a um menor número de eventos metastáticos nos *screens*, portanto aumentamos o número de camundongas utilizadas para quarenta, e como mencionado anteriormente, ao invés de cultivar os tecidos coletados no sacrifício, qPCR par mCherry foi aplicado para detectar metástases, sendo muito mais simples e preciso.

Incidência de Metástases

No total, treze de um total de quarenta camundongas apresentaram ao menos uma metástase que não fosse pulmonar (como explicado anteriormente, metástases pulmonares são eventos relativamente comuns em células 66cl4ch14). Os sítios metastáticos incluíram coração, costelas, fígado, ovário, rim, adrenal, linfonodo, músculo esquelético, mesentério, glândula mamária contralateral, coluna vertebral e fêmur (Figura 13).

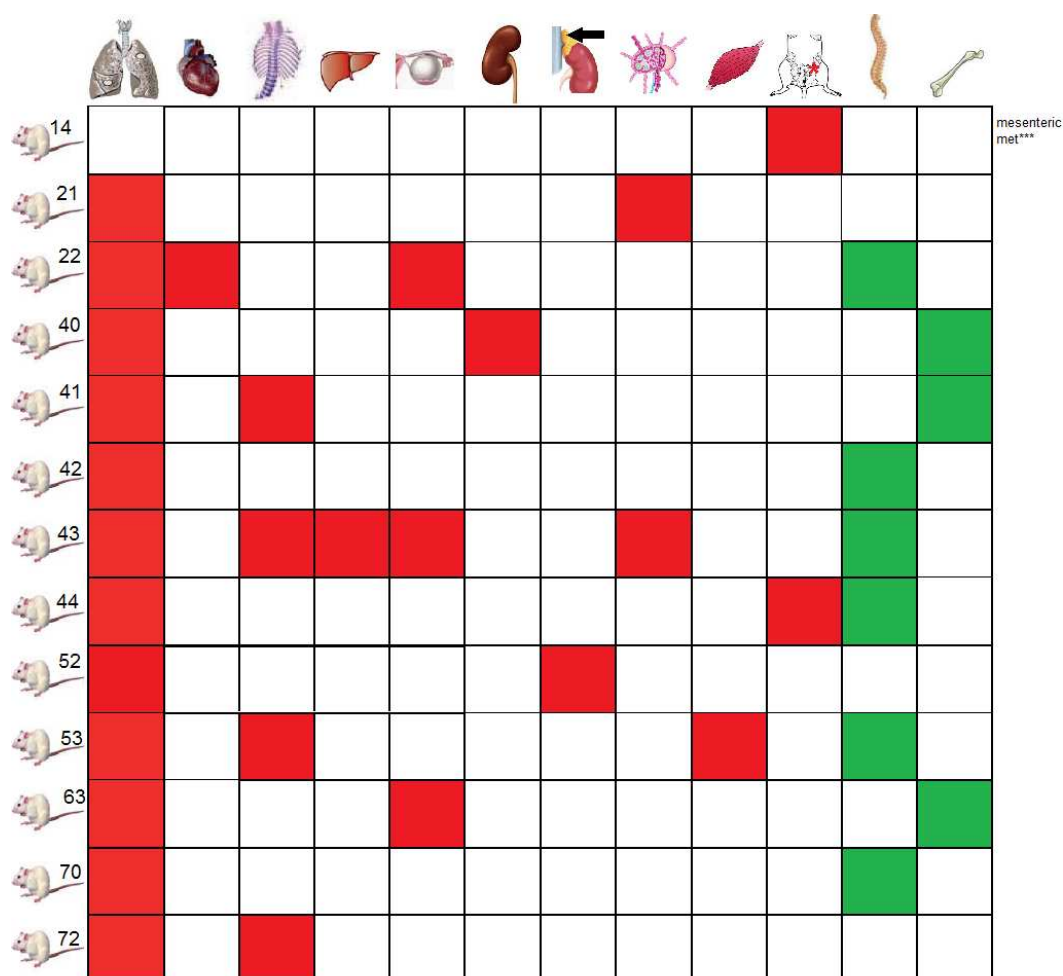


Figura 13. Distribuição de metastases visíveis (vermelho) e micrometástases (verde) após injeção de células 66cl4ch14-pLKO.1-pool1 imfp.

Embora tenha sido observada queda na incidência de metástases neste *screen* (66cl4ch14-pool1 32.5%) quando comparado ao *screen* anterior (66cl4ch14-pool2 - 70%); o número de metástases obtidas ainda é significativo, sendo assim a MOI~3 continuou a ser utilizada nos *screens* subsequentes.

shRNAs e genes-candidato a supressores de metástase identificados através de sequenciamento convencional

Apenas cinco de todas as metástases esquematizadas na Figura 13 puderam ter a sequência do shRNA identificada através de sequenciamento convencional (Tabela 7). Este número foi ligeiramente inferior do que o alcançado no *screen* anterior (20% contra 25%, respectivamente).

O *screen* 66cl4ch14-pLKO.1-pool1 foi o único enviado para NGS, e esses dados serão apresentados mais tarde neste capítulo.

Tabela 7. shRNAs identificados em metástases do *screen* 66cl4ch14-pool1 através de sequenciamento convencional.

Animal/Órgão	Identificação do grampo	Sequência do Grampo	mRNA Alvo
872.72 Costela A	TRCN0000012795	CCGGCCATCTCATGTCAAATGGAATCTCGAGATTCCATTGACATGAGATGGTTTTT	Cul5
872.72 Costela B	TRCN0000012795	CCGGCCATCTCATGTCAAATGGAATCTCGAGATTCCATTGACATGAGATGGTTTTT	Cul5
872.14 Mesentério	TRCN0000026085	CCGGCAAGTACATCACCCAACCTCTTCTCGAGAAGAGTTGGGTGATGTACTTGTTTTT	Ccr4
872.44 Glândula mamária	TRCN0000026085	CCGGCAAGTACATCACCCAACCTCTTCTCGAGAAGAGTTGGGTGATGTACTTGTTTTT	Ccr4
872.70 Linfonodo B	TRCN0000012309	CCGGCGGTTCTATTGCTCAGAAATCTCGAGATTTCTGAGCAATAGGAACCGTTTTT	Diablo

Nota: Destacados em **vermelho**: o grampo contra Cul5 foi identificado em duas metástases do mesmo animal.

Destacados em **azul**: o grampo contra Ccr4 foi identificado em duas metástases oriundas de animais distintos.

As análises acerca da expressão de mCul5, mDiablo e mCCr4 em células 66cl4ch14-pLKO.1-NT através de RT-qPCR revelaram que apenas os dois primeiros são expressos, portanto, estes foram submetidos a análises adicionais.

DIABLO (abreviação do inglês para “*Direct IAP Binding protein with Low PI*”) também conhecida como SMAC (abreviação do inglês para “*Second mitochondria-derived activator of caspases*”), é uma proteína pró-apoptótica. Quando translocada da mitocôndria para o citoplasma, esta proteína compete com as caspases -3 e -9 pela ligação com as IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), resultando na liberação de caspases, que clivarão então seus substratos, induzindo a apoptose [27].

Culinas são uma família de proteínas que interagem diretamente com Roc1, sendo o complexo Culina-Roc1 consiste no módulo central de uma série de ubiquitina-E3-ligases, conferindo assim especificidade de substrato e, portanto, regulando o processo de degradação [28]. A culina-5 (Cul5) está localizada na região cromossômica 11q22-23, associada à perda de heterogeneidade em câncer de mama [29]. Esta é uma das razões pelas quais o gene Cul5 já é considerado um potencial gene supressor de tumor. Ainda, Cul5 tem sido associada à mecanismos anti-proliferativos e anti-invasivos [30, 31].

Os dados do Oncomine são consistentes com a teoria de que Cul5 pode ter um papel na progressão e metástase do câncer de mama. Este gene está significativamente suprimido tanto ao nível de DNA, quanto ao de transcrito em câncer de mama invasivo, quando comparado a tecido mamário normal, e essa baixa expressão parece ainda relacionada à pior evolução clínica (Figura 14).

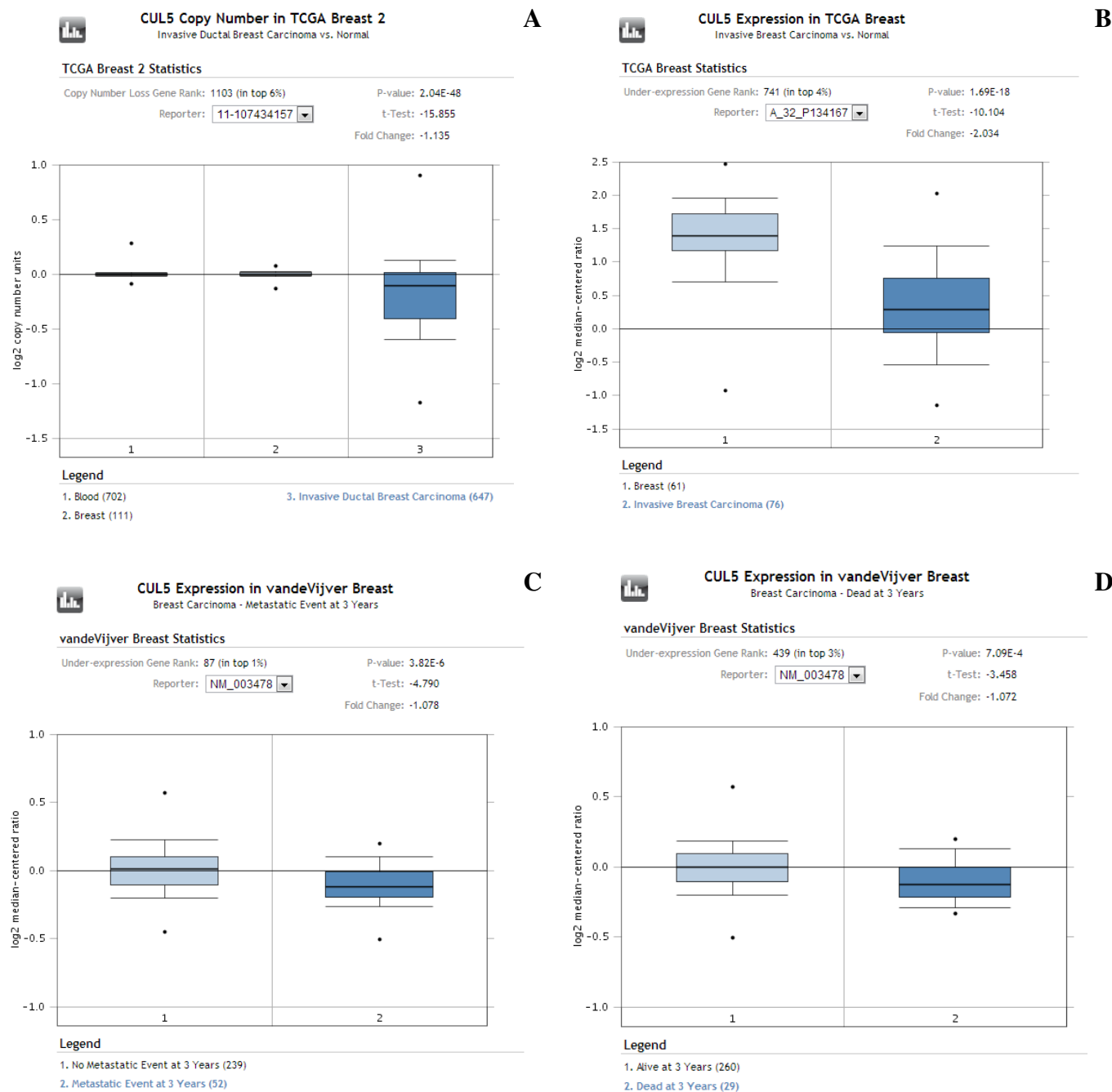


Figura 14. Cul5 está diminuído em cânceres de mama agressivos e pode estar ligado a pior evolução clínica. A. Cul5 está diminuído ao nível de DNA em amostras de carcinoma mamário ductal invasivo vs. sangue ou tecido mamário normal; B. Cul5 está diminuído ao nível de RNA em carcinoma mamário invasivo vs. tecido mamário normal. C. A expressão de Cul5 está ligeiramente diminuída em tumores de pacientes que apresentaram evento metastático após 3 anos em relação àqueles sem eventos; D. A expressão de Cul5 está ligeiramente diminuída em tumores de pacientes que morreram 3 anos após o diagnóstico em comparação àqueles que estavam vivos.

Expressão dos Candidatos em linhagens com diferentes potenciais metastáticos

Análises da expressão de mCul5 e mDiablo através de RT-qPCR em linhagens com diferentes capacidades metastáticas (não, pouco e altamente metastáticas) revelaram diminuição na expressão particularmente do mCul5 em linhagens celulares mais metastáticas, embora mDiablo também tenha exibido certo grau de subexpressão nas linhagens mais agressivas (Tabela 8).

Tabela 8. Expressão relativa (%) de mRNA dos candidatos do *screen* 66cl4ch14-pLKO.1-pool1

	Cul5	Diablo
67NRch1	75,32685047	83,12435375
66cl4ch14	100	100
4T1ch5	38,26166897	66,35308967
4T1ch9	32,32802413	60,24642756
4T1Br4ch2	35,7266332	64,94261217
4T1BM2ch11bri	34,09706756	51,40504434
4T1.2Neo m-Cherry	26,89495938	62,28610528
4T1.13ch5T1	46,2590597	81,43570866

Combinando estas evidências, tanto Cul5, quanto Diablo continuam bons candidatos para análises subsequentes.

Resultados preliminares do sequenciamento de próxima geração (NGS)

As 30 amostras enviadas para NGS, com informações referentes à sua carga tumoral relativa e concentração do DNA genômico estão listadas na Tabela 9.

Tabela 9. 66cl4ch14 pLKO.1-pool1 imfp (Exp. 872) – amostras para NGS (5µg DNA cada)

	Amostra	RTB (%)	[DNA] ng/µL	Volume para 5µg
1	66cl4ch14-pool1	100%	64,9	77,04
2	872.22 PT	100%	2232,26	2,24
3	872.40 PT	100%	2757,31	1,81
4	872.41 PT	100%	1959,47	2,55
5	872.43 PT	100%	1769,33	2,83
6	872.53 PT	100%	1451,98	3,44
7	872.63 PT	100%	1289,45	3,88
8	872.70 PT	100%	1952,36	2,56
9	872.22 L	79.3%	1454,9	3,44
10	872.40 L	6.6%	464,2	10,77
11	872.41 L	45%	954,66	5,24
12	872.43 L	6.1%	698,61	7,16
13	872.53 L	21.5%	501,71	9,97
14	872.63 L	7.3%	440,66	11,35
15	872.70 L	7.5%	500,18	10,00
16	872.22 he	77.4%	987,5	5,06
17	872.22 Th	100%	972,4	5,14
18	872.43 Th	66%	2196	2,28
19	872.53 Th	90.8%	1632	3,06
20	872.22 ov	29.7%	461,7	10,83
21	872.43 ov	94.9%	869,8	5,75
22	872.43 LN	100%	1478,8	3,38
23	872.70 LN1	74.1%	127,5	39,22
24	872.70 LN2	100%	2204,3	2,27
25	872.40 F	3.1%	137,5	36,36
26	872.63 F	3.1%	315,7	15,84
27	872.22 SP	1.45%	397,3	12,58
28	872.43 SP	0.4%	330,9	15,11
29	872.53 SP	13.2%	424,1	11,79
30	872.70 SP	0.9%	361,6	13,83

Compilações dos dados mais importantes obtidos através da NGS estão nas páginas subsequentes.

As Tabelas 10, 11, 12, 13 e a Figura 15 demonstram o número total de leituras (*reads*), o número total de shRNA detectados (shRNA>1) e o número de shRNAs para os quais houve mais do que mil *reads* (shRNA>1000) em cada amostra.

Tabela 10. Número de *reads* obtidos durante o NGS nas células transduzidas e tumores primários

Referência/Amostra	66cl4ch14_pool1	872.22_PT	872.40_PT	872.41_PT	872.43_PT	872.53_PT	872.63_PT	872.70_PT
Total de <i>reads</i>	808944	3462264	5147666	541683	1365895	5621818	5038640	2116979
shRNAs (>0)	7032	3408	3778	2410	2506	4862	3932	3280
shRNAs (>=1000)	85	284	412	77	132	314	264	251

Tabela 11. Número de *reads* obtidos durante o NGS nas amostras de pulmão

Referência/Amostra	872.22_L	872.40_L	872.41_L	872.43_L	872.53_L	872.63_L	872.70_L
Total de <i>reads</i>	889352	14313215	2413221	2431602	367479	5631482	6295154
shRNAs (>0)	2024	4340	3308	2961	1707	3372	3570
shRNAs (>=1000)	23	68	36	36	18	50	42

Tabela 12. Número de *reads* obtidos durante o NGS nas metástases (I)

Referência/Amostra	872.22_he	872.22_Th	872.43_Th	872.53_Th	872.43_LN	872.70_LN1	872.70_LN2	872.22_ov	872.43_ov
Total de <i>reads</i>	1035255	254880	3875909	6103314	7846182	8391317	7501079	4261837	589347
shRNAs (>0)	2167	1386	2943	4037	3628	3874	3798	3490	1792
shRNAs (>=1000)	25	19	32	37	36	49	38	41	18

Tabela 13. Número de *reads* obtidos durante o NGS nas metástases (II)

Referência/Amostra	872.40_F	872.63_F	872.22_SP	872.43_SP	872.53_SP	872.70_SP
Total de <i>reads</i>	7005267	1321987	13416483	6393535	9342978	9219772
shRNAs (>0)	3723	2336	4198	3628	3847	3669
shRNAs (>=1000)	38	27	60	37	44	39

N.B. O nome das amostras consiste no número do experimento . número da camundonga _ órgão. PT= tumor primário, L=Pulmões(Lungs), he=coração(heart), Th=Tórax(thorax), LN=Linfonodo(lymph node), ov=Ovário(ovary), F=Fêmur(fêmur), SP=Coluna vertebral(spine).

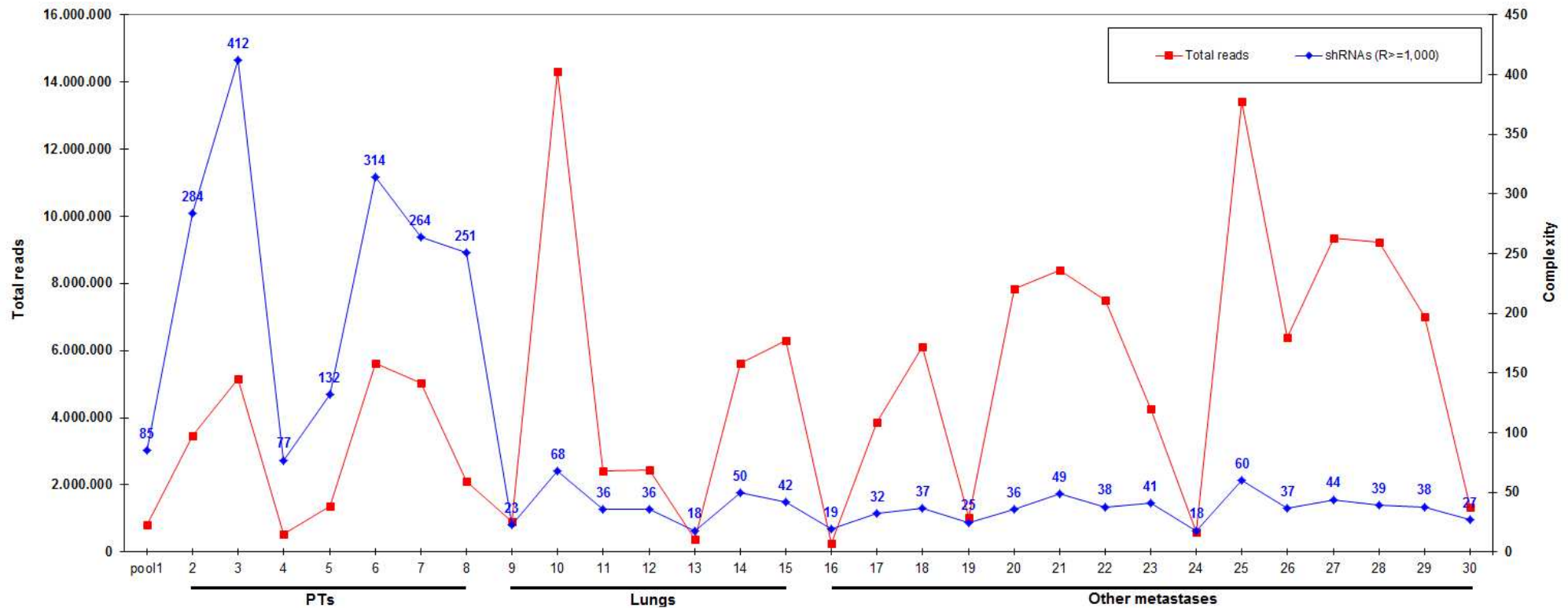


Figure 15. Dados do NGS: Número total de leituras e número de espécies de shRNAs que atingiram mais de mil leituras por amostra. Significado das legendas do eixo X: pool1=células 66cl4ch14-pLKO.1-pool1; 2-8=Tumores primários (camundongas 22, 40, 41, 43, 53, 63 e 70, respectivamente); 9-15=Pulmões (camundongas 22, 40, 41, 43, 53, 63 e 70, respectivamente); 16-30=outras metástases; 16: coração (camundonga 22), 17-19: tórax (camundongas 22, 43 e 53), 20-22: linfonodo (camundongas 43 e 70*2), 23-24: ovários (camundongas 22 e 43), 25-26: fêmur (camundongas 40 e 63), 27-30: coluna vertebral (camundongas 22, 43, 53 e 70).

A complexidade inicial nas metástases foi muito mais alta do que a esperada, e esta foi uma das razões pelas quais uma linha de corte acima de mil leituras foi estabelecida, tentando assim selecionar os genes cuja supressão não apenas fez as células migrarem para um órgão distante, mas também foi capaz de estabelecer um tumor naquele local.

A Figura 16 aponta os principais genes-alvo identificados através dos shRNAs presentes nas diferentes amostras, baseados em características como o número de leituras, multiplicidade da ocorrência de cada grampo e aumento na contagem de leituras quando comparados aos tumores primários. Genes apresentados dentro de quadrantes com bordas correspondem a grupos de genes cujos shRNAs provavelmente estavam na mesma célula, uma vez que apareceram com clusters em diferentes metástases, apresentando entre eles números de leitura sempre muito semelhantes (dentro de cada amostra).

Animal	Pulmões	Coração	Tórax	Linfonodo	Linfonodo2	Ovário	Fêmur	Coluna Vertebral
41	Fadd Bace2 Adk							
63	Ctsc Olfr1263 Nr1d1 Opn4						Olfr1263 Nr1d1 Opn4 Ptpr Mad2l2	
40	Olfr722 Rorb Ccnd3 Uchl3 Lta4h Rnf7/LOC632465						Olfr1263 Nr1d1 Opn4	
70	Rnf7/LOC632465 Olfr733 Atm			Olfr733 Rorb Olfr722 Ccnd3 Lta4h Uchl3	Diablo Atm			Olfr733 Diablo Olfr722 Rorb Atm
53	Atm Opn4 Gpr4 Gpr110 H13 Man1e1 Ptpr Smurf2		H13 Man1e1 Ptpr Smurf2 Diablo					Gpr4 Olfr722 Rorb
43	Htr2a Prps1/Prps13 Atm Lta4h Uchl3 Ptpr Pskh1 Gpr128 H13 Man1e1 Ptpr Smurf2		Prps1/Prps13 H13 Man1e1 Ptpr Smurf2	H13 Man1e1 Ptpr Smurf2		H13 Man1e1 Ptpr Smurf2 Diablo		H13 Man1e1 Ptpr Smurf2 Atm
22	Dbc1 Nr1d1 Ccr4 Htr2a Gpr110 Olfr722 Rorb	Dbc1 Nr1d1 Olfr1263 Bdkrb1 Ptpr Atm H13 Man1e1 Ptpr Smurf2 Gpr110 Mad2l2 Olfr722				Pskh1 Gpr128 Gabbr1 Capn7		Dbc1 Nr1d1 Olfr722 Rorb Pskh1 Gpr128 Mad2l2

Figura 16. Principais genes-alvo identificados nas diferentes metástases. Os quadrantes contêm os alvos para os quais acredita-se que os shRNAs estão na mesma célula.

Compilando estes dados (Figura 17), é possível selecionar os melhores candidatos baseando-se no NGS e nas análises de descomplexação, os quais deverão ser validados posteriormente, sendo o primeiro passo a avaliação de suas expressões através do sequenciamento de RNA. Os melhores candidatos, até este ponto foram: Rorb, Nr1d1, Atm, Opn4, Diablo, Ptprr, Dbc1, Mad2l2, H13, Ptprrs, Smurf2, Lta4h e Uchl3.

Diablo e Atm foram identificados na camundonga 70, em uma metástase no linfonodo. Curiosamente, Diablo já tinha sido identificado netas mesma amostra através do sequenciamento convencional. A presença de que mais de um shRNA, em níveis consideráveis (*reads*>1000), e com sequências muito distintas, e apenas um deles aparecer no sequenciamento convencional foi completamente inesperado, de fato, não acreditávamos que fosse possível. Talvez, isso seja devido à alguma vantagem de amplificação de alguns shRNAs sobre outros.

Rorb, o candidato a gene supressor de metástase de maior confiabilidade obtido neste trabalho, também emergiu como o melhor candidato em experimentos prévios do nosso grupo: um arrayCGH (Agilent Mouse 105K) para CNV (*copy number variation*, variações ao nível de DNA → deleções, duplicações, etc), associado à outro array (Affymetrix) para perfis de expressão gênica, ambos conduzidos nas células dos tumores derivados do modelo 4T1 com diferentes potenciais metastáticos *in vivo*. Rorb, altamente expresso em 67NRch1 e 66cl4ch14, está praticamente ausente nas demais linhagens, com maior capacidade metastática.

ROR β , codificado por Rorb, tem sido descrito como envolvidos na regulação do ciclo circadiano e desenvolvimento e maturação da retina. A subfamília dos receptores órfãos do ácido retinóico, que consiste nos subtipos ROR α , - β , e - γ , integram um grupo de receptores nucleares de fatores de transcrição para os quais ainda não foram identificados ligantes. Os RORs têm funções críticas na regulação de uma série de processos fisiológicos e patológicos, incluindo resposta à hipóxia, metabolismo celular, ciclo circadiano e câncer [32].

Outro candidato muito interessante e promissor é Nr1d1, uma vez que dois diferentes shRNAs contra este gene foram identificados no screen. O receptor nuclear Rev-erb α (NR1D1), também está envolvido em vias metabólicas e do relógio biológico.

Originalmente classificado como receptor nuclear órfão, NR1D1 é na verdade um receptor para heme e promove repressão da transcrição. Este gene, atuando como sensor na manutenção da homeostase da heme, influencia processos metabólicos e circadianos afetados pela concentração de heme, tais como metabolismo celular oxidativo [33]. Ainda, existem evidências de que ambos, NR1D1 e RORs, tenham papéis centrais na coordenação de processos metabólicos e circadianos [34].

>1 shRNA	4 animais	3 animais	1 animal, 5 metástases	1 animal, 3 metástases	2 animais, >= 2 metástases	2 animais	1 animal, 2 metástases	Evento único
Nr1d1	Atm Rorb	Nr1d1	H13	Nr1d1 (2 shRNAs) Atm Dbl1 Olf733	Nr1d1 Rorb	Mad2l2 Ccnd3 Gpr110 Htr2a Rnf7/LOC632465	Gpr110 Gpr4 Prps1/Prps113	Fadd Bace2 Adk Ctsc Ccr4 Bdkrb1 Gabbr1 Capn7 Htr2a
		Opn4	Man1e1					
		Diablo	Ptprs					
		H13	Smurf2					
		Man1e1						
		Ptprs						
		Smurf2						
		Ptpr						
		Lta4h						
		Uchl3						

Figura 17. Sumário dos Principais Candidatos à Supressores de Metástase com base no NGS.

Dados combinado do NGS e do RNA-seq para a seleção de genes candidatos a supressores de metástase

Os dados relativos ao RNA-seq também foram muito úteis uma vez que o número de possíveis candidatos obtidos nos screens foi superior ao esperado inicialmente, o que tornou a execução de RT-qPCRs para cada alvo individual inviável.

As células tumorais submetidas ao RNA-seq consistiram nas duas linhagens empregadas nos screens, além de outra linhagem de baixo potencial metastático (4T1ch5) e uma linhagem de alto potencial metastático (4T1.13ch5T1), cobrindo essencialmente todos os níveis metastáticos destas linhagens.

Usando os dados do RNA-seq nos candidatos obtidos através do NGS do screen 66cl4ch14-pLKO.1-pool1, resumizamos a classificação final dos genes-candidato na Tabela 14.

Tabela 14. Classificação dos Candidatos do *screen* 66cl4ch14-pLKO.1-pool1.

Classificação	A1	A2	B	C	D
Candidato	Rorb	Nr1d1 Ccnd3 Gabbr1 Adk Ptprrs Lta4h	<i>Fadd</i> <i>Diablo</i> <i>Atm</i> <i>Mad2l2</i> <i>Pskh1</i> <i>Bdkrb1</i> <i>Gpr110</i> <i>Capn7</i> <i>Uchl3</i>	Dbc1 Man1c1 Prps1 Ccr4 Htr2a Gpr4 Ptprr Bace2 H13 Ctsc	Rnf7 Opn4 Smurf2 Gpr128 Olfr722 Olfr733 Olfr1263

- Nota:
- A1 Dados do NGS, Affy Exon (Microarray) e RNA-Seq consistentes com supressão de metástase
 - A2 Dados do NGS e RNA-Seq consistentes com supressão de metástase
 - B Dados do NGS consistentes com supressão de metástase; RNA-seq = padrão de expressão pouco ou não consistente com o padrão metastático
 - C Expressão baixa ou ausente nas células parentais (66cl4sh14) OU dados do RNA-Seq/Affy exon inconsistentes com supressão de metástase
 - D Não mapeados

Sintetizando, aparentemente este *screen* revelou 01 candidato muito bom, de altíssima confiabilidade (Rorb), 06 bons candidatos (Nr1d1, Ccnd3, Gabbr1, Adk, Ptprrs e Lta4h), além de 09 outros possíveis candidatos, mas de menor confiabilidade (Fadd,

Diablo, Atm, Mad2l2, Pskh1, Bdkrb1, Gpr110, Capn7 e Uchl3) e ainda 17 possíveis falso-positivos.

A Figura 18 mostra a expressão dos candidatos classificados como “A” (Tabela 14) nas células das quatro linhagens analisadas através de RNA-seq.

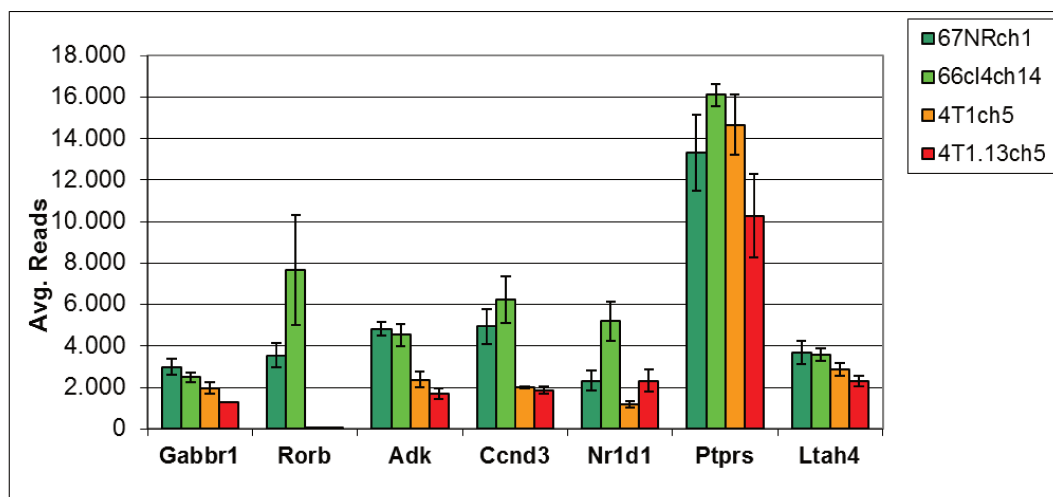


Figura 18. Número de leituras (*reads*) do mRNA dos candidatos de maior confiabilidade em células com variados graus metastáticos separadas de tumores impf através de FACS.

Uma breve revisão da literatura demonstra evidências biológicas de que, em adição à Rorb e Nr1d1 todos os demais candidatos classificados como “A” na Tabela 14 podem ter participação no processo metastático, como descrito a seguir.

Ccnd3 codifica a Ciclina D3. Ciclinas regulam o ciclo celular através da ligação e ativação de cinases ciclina-dependentes (Cdks) [35]. Ciclinas tipo D conectam sinais extracelulares à maquinaria bioquímica que governa a progressão através da fase G1. Induzidas por fatores de estimulação do crescimento, elas ligam-se às cinases dependentes de ciclina CDK4 e CDK6, formando holoenzimas que facilitam a transição da fase G1 para a fase S através da fosforilação de seus substratos-chave, incluindo a proteína RB [36]. Os níveis de expressão da ciclina D3 entre os tumores é heterogênea, e sua repressão já foi relacionada tanto à pior quanto à melhor evolução clínica, uma vez que esta ciclina tem papel duplo na proliferação e diferenciação em tecidos normais e em algumas condições neoplásicas [37]. Já foi relatado que baixa expressão de ciclina D3 está relacionada a aumento na sobrevida em câncer de laringe e mama [38].

Gabbr1 codifica a proteína GABA_{B1}, que integra o receptor metabotrópico GABA_B, um receptor heterodimérico associado à proteína G, que consiste em dois domínios protéicos: GABA_{B1} e GABA_{B2}. Enquanto o domínio extracelular GABA_{B1} é capaz de se ligar ao neurotransmissor exógeno (GABA), bem como a seus agonistas e antagonistas, GABA_{B2}, o domínio intracelular está acoplado á proteínas-G que regulam as atividades dos canais de Ca²⁺ e de K⁺, da adenilil ciclase, ou da fosfolipase C. Estudos sugeriram papel inibitório da ativação do receptor GABA_B no desenvolvimento tumoral, inibindo a proliferação e a migração em diversos tipos de células tumorais humanas [39].

Adk codifica a enzima adenosina cinase, uma fosfotransferase responsável pela conversão da adenosina em 5'-adenosina-monofosfato, controlando assim o equilíbrio de adenosina. A adenosina exerce funções essenciais, atuando como regulador metabólico e homeostático, sendo um metabólito primordial regulador de reações bioquímicas e enzimáticas que interligam mecanismos bioenergéticos a epigenéticos. Disfunções na Adk estão envolvidas em diversas doenças, incluindo diabetes, epilepsia e câncer [40]. Baixa atividade da Adk já foi relatada em modelos xenográficos de melanoma [41].

Ptprs codifica o receptor proteína tirosina fosfatase sigma (PTPsigma), membro de uma família de proteínas integrais de membrana relacionadas a antígeno de leucócito (LAR). Diversas evidências sugerem que Ptpsr poderia estar envolvido na progressão do câncer e na metástase, uma vez que Ptpsr frequentemente está deletado em câncer de cabeça e pescoço [42] e em camundongos *knockout* para PTPsigma foi observado aumento na regeneração nervosa e dos erros direcionais após injúria do nervo ciático [43].

O último candidato da lista é Lta4h – leucotrieno A4 hidrolase, que é uma enzima bifuncional, trabalhando como hidrolase e aminopeptidase. No primeiro caso, LTA4H catalisa a hidrólise de LTA4 à LTB₄, que atua na quimioatração e ativação de células inflamatórias. No segundo caso, LTA4H pode processar peptídeos relacionadas à inflamação e defesa do hospedeiro [44]. Embora a maioria dos estudos demonstre papel inibitório de Lta4h no desenvolvimento tumoral, talvez, uma vez estabelecido o tumor, quedas nos níveis de Lta4h levem ao escape imunológico, facilitando a metástase.

Screen com Subpool-3 em 66cl4ch14

Incidência de Metástases

Visando reduzir o número de células carregando múltiplos insertos, porém sem reduzir a complexidade da biblioteca, para o *screen* 66cl4ch14-pool3 também foi mantido o MOI~3, que novamente mostrou-se efetivo para promoção do aparecimento de metástases *in vivo*. Em suma, dez de quarenta camundongas apresentaram ao menos uma metástase não-pulmonar, sendo estas localizadas no coração, costelas, diafragma, rim, músculo esquelético, tecido subcutâneo, glândula mamária contralateral, coluna vertebral, e ainda, duas metástases no cérebro, um sítio muito pouco provável para o estabelecimento de lesões secundárias neste tipo de linhagem (66cl4ch14) (Figura 19).

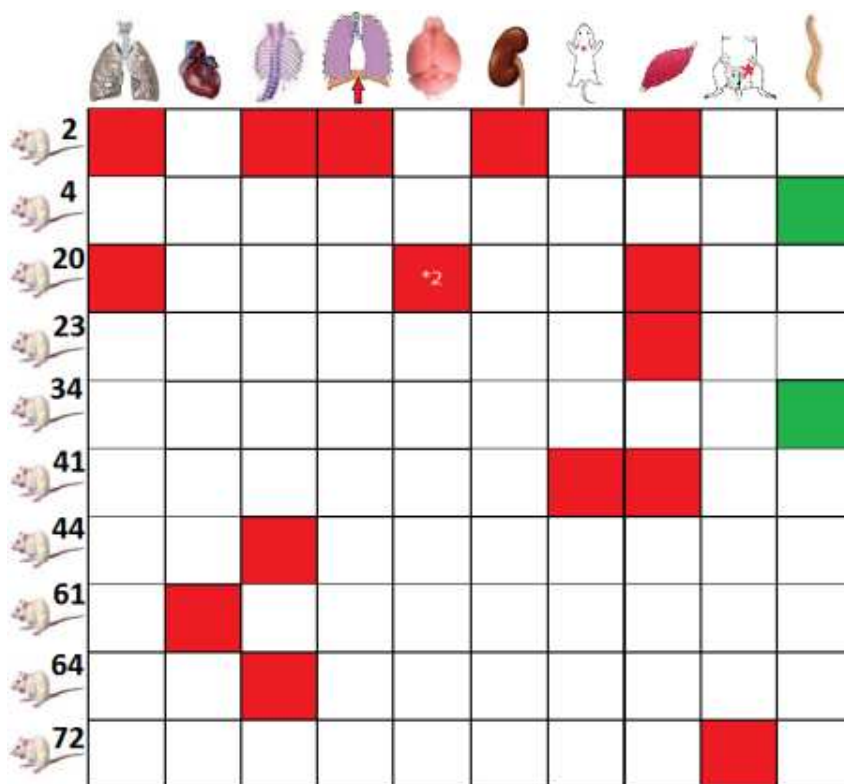


Figura 19. Distribuição de metástases visíveis (vermelho) e de micrometástases (verde) após injeção de 66cl4ch14-pLKO.1-pool3 imfp.

shRNAs identificados e candidatos à supressores de metástase

Como ocorrido anteriormente, algumas das metástases obtidas foram multiclonais/com insertos múltiplos, impossibilitando a identificação dos shRNAs presentes nestas amostras a partir de sequenciamento convencional, o único método empregado para este *screen* (66cl4ch14-pool3) até a presente data. Contudo, a quantidade de amostras cujo shRNA não pode ser sequenciado pelo método Sanger neste *screen* foi menor (53%) do que no *screen* anterior (66cl4ch14-pool1 - 80%).

A lista com todas as metástases, RNAs-alvo e sequências dos shRNAs, esclarecidas para este *screen* estão na Tabela 15.

Tabela 15. shRNAs identificados em metástases do *screen* 66cl4ch14-pool3

Animal/Órgão	Identificação do grampo	Sequência do Grampo	mRNA Alvo
889.2 rim	TRCN0000066650	CCGGACAGGGAAGTTCACCTGTGAACTCGAGTTCACAGGTGAACTCCCTGTTTTTTG	C1qc
889.2 músculo	TRCN0000078817	CCGGGTCCGAATGAATATCAACCATCTCGAGATGGTTGATATTCATTCGGACTTTTTG	4930433N12Rik
889.23 músculo	TRCN0000066245	CCGGTGGAAGATTATCCCGGTCATACTCGAGTATGACCGGGATAATCTTCCATTTTTG	Cd40
889.41 músculo	TRCN0000068265	CCGGGCCGAGACAATGTATGACAACTCGAGTTTGTACATACATTGTCTCGGCTTTTTG	Gdnf
889.44 costela	TRCN0000068120	CCGGCGTGTTTGACATCAGTGCCTTCTCGAGAAGGCACTGATGTCAAACACGTTTTTG	Gdf5
889.61 coração	TRCN0000067176	CCGGCGCATCATCCATATCAATGAACTCGAGTTCATTGATATGGATGATGCGTTTTTG	Epor
889.64 costela	TRCN0000066855	CCGGCTTTCGCAGCACACCCGTCTTCTCGAGAAGACGGGTGTGCTGCGAAAGTTTTTG	Il17d

O próximo passo foi verificar se os genes *C1qc*, *Cd40*, *Gdnf*, *Gdf5*, *Epor* and *Il17d* estão expressos em células parentais 66cl4ch14 através de RT-qPCR.

Os ensaios revelaram que todos os alvos, com exceção de *Gdnf* já seriam possivelmente não-expressos em 66cl4ch14. Os genes *Cd40* e *Il17d* precisam ser investigados mais a fundo, uma vez que os primers utilizados, embora validados, não foram específicos na amostra de embrião de Balb/C, usada como controle positivo (Figura Suplementar 2). Análises adicionais utilizando outra amostra como controle positivo e/ou ainda um par de primers diferentes, ou análises de RNA-seq serão necessárias para confirmar se estes dois genes (*Cd40* e *Il17d*) são ou não expressos em células 66cl4ch14.

Curiosamente, experimentos anteriores realizados pelo Grupo de Pesquisa em Metástase do Peter MacCallum Cancer Centre (dados ainda não publicados), envolvendo avaliação do perfil de expressão gênica em linhagens não/pouco/altamente metastáticas através de *microarrays*, revelou que enquanto *Gdnf* é altamente expresso em células não/muito pouco metastáticas (67NRch1 e 66cl4ch14, respectivamente), sua expressão cai drasticamente em todas as demais linhagens, que apresentam maior potencial metastático (Figura 20).

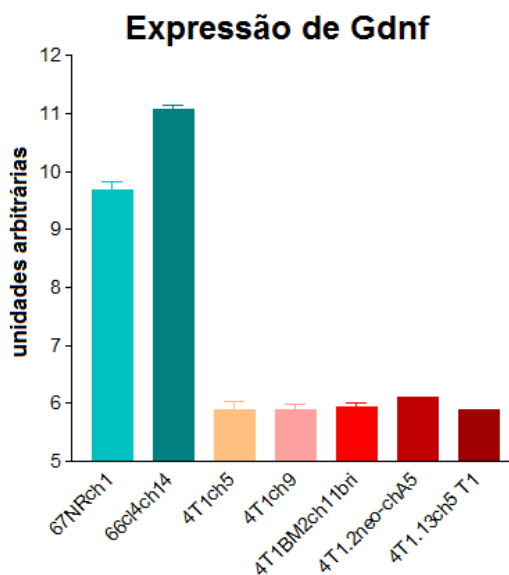


Figura 20. Dados do Perfil de Expressão de *Gdnf* (*microarrays*) demonstrando perda de expressão em linhagens metastáticas.

Gdnf, ou fator neurotrófico derivado de células gliais, foi originalmente identificado como fator de sobrevivência para neurônios dopaminérgicos cerebrais, também sendo relacionado, posteriormente à sobrevivência e regulação da diferenciação de populações neurais tanto cerebrais, quanto periféricas. Foi descrito ainda que Gdnf tem papéis críticos fora do sistema nervoso, tais como regulação da morfogênese renal e da espermatogênese, entre outras funções [45, 46].

O nódulo metastático que continha o shRNA contra Gdnf estava localizado no músculo esquelético, mais precisamente no gastrocnêmico. Dentro do contexto deste modelo de metástase, um nódulo com apresentando-se neste local tem coerência, uma vez que células de câncer de mama expressão o receptor CXCR4, cujo ligante (CXCL12) é expresso em alguns tecidos, incluindo músculo esquelético, o que pode ter atraído esta “célula recém metastática” para este tecido em particular [47].

Combinado assim os dados de *microarray* e do *screen*, Gdnf emerge como forte candidato a gene supressor de metástase e está sendo investigado em maior detalhe.

Screen com Subpool-4 em 66cl4ch14

Incidência de Metástases

Ao final deste *screen*, um total de treze em quarenta animais apresentou metástases em órgãos como coração, tecido subcutâneo, glândula adrenal, osso zigomático, esterno, músculo esquelético e quadril (Figura 21).

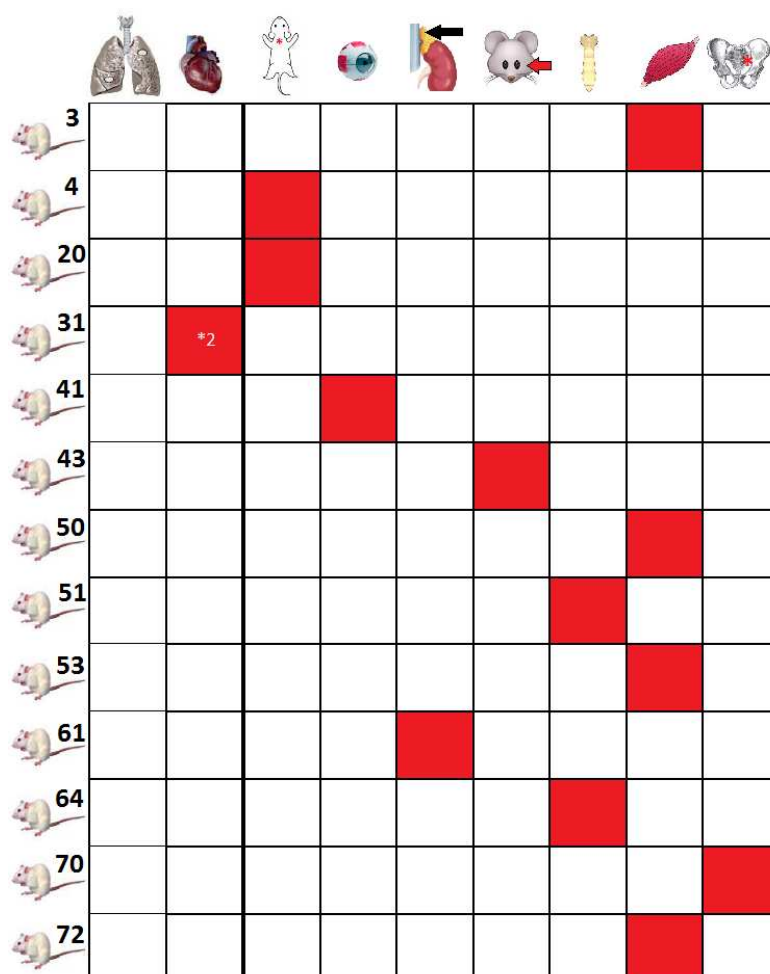


Figura 21. Distribuição de metástases visíveis após injeção de células 66cl4ch14-pLKO.1-pool4 imfp.

Inusitadamente, nenhum destes treze animais apresentaram nódulos pulmonares, ao contrário do que foi observado para todos os demais *screens* quem empregaram células 66cl4ch14. Metástases pulmonares são comuns em camundongas implantadas com células 66cl4ch14, e por essa razão, não são conduzidos qPCRs para mCherry nestes *screens*, uma vez que certamente os pulmões apresentariam eventos multiclonais, não podendo ser elucidados por sequenciamento convencional.

Então, embora metástases pulmonares não tenham sido visíveis nestes animais, provavelmente eles teriam neste estágio, micrometástases detectáveis através de qPCR, contudo as reações não foram realizadas, e assim isso não foi demonstrado.

Outra particularidade deste *screen* foi que embora diversos nódulos visíveis tenham sido identificados em diferentes órgãos e tecidos, não foram detectadas micrometástases em fêmures e colunas vertebrais.

shRNAs identificados e candidatos à supressores de metástase

Mais uma vez, a ocorrência de metástases multiclonais permitiu que cerca de 70% dos nódulos encontrados neste *screen* (66cl4ch14-pool4) tivessem o shRNA identificado através de sequenciamento convencional (Tabela 16). Este foi o *screen* com o menor número de metástases cujo grampo de RNA não pode ser identificado (30%, comparado à 80% em 66cl4ch14-pool1 e 53% em 66cl4ch14-pool3).

Tabela 16. shRNAs identificados em metástases do *screen* 66cl4ch14-pool4

Animal/Órgão	Identificação do grampo	Sequência do Grampo	mRNA Alvo
892.20 tecido subcut.	TRCN0000086380	CCGGCCTGAGTTGAACGCACCATTTCTCGAGAAATGGTGC GTTCAACTCAGGTTTTTG	Dmrt2
892.31 coração	TRCN0000082178	CCGGGCCTGCTCTTTATCAAATCTACTCGAGTAGATTTGATAAAGAGCAGGCTTTTTG	Sp6
892.43 zigomático	TRCN0000087935	CCGGCGCCTTGCTAATACCATAATTCTCGAGAATTATGGTATTAGCAAGGCGTTTTTG	Spin2
892.50 músculo	TRCN0000087787	CCGGCACCTCAATTATACCAAGATTCTCGAGAATCTTGGTATAATTGAGGTGTTTTG	Mapre3
892.51 esterno	TRCN0000086380	CCGGCCTGAGTTGAACGCACCATTTCTCGAGAAATGGTGC GTTCAACTCAGGTTTTTG	Dmrt2
892.53 músculo	TRCN0000081264	CCGGCCTCGATGTATGTGGTGATGACTCGAGTCATCACCACATACATCGAGGTTTTTG	Ppp1r16a
892.61 glând. adrenal	TRCN0000081897	CCGGCAACTCTGATACTCCAGTCCTCTCGAGAGGACTGGAGTATCAGAGTTGTTTTTG	Dmrct2
892.70 quadris	TRCN0000087969	CCGGCCTGTCTCGCAAGAGCATAAACTCGAGTTTATGCTCTTGCGAGACAGGTTTTTG	Abi3
892.72 músculo	TRCN0000082173	CCGGGCCTTAAACGACACCAGGAAACTCGAGTTTCCTGGTGTCGTTTAAGGCTTTTTG	Zfp11

Nota: Destacados em **vermelho**: o shRNA contra Dmrt2 foi identificado em duas metástases em animais distintos.

Seguindo com os experimentos de validação, a expressão de *Dmrt2*, *Mapre3*, *Dmrtc2* e *Abi3* mRNA foi acessado através de RT-qPCR em células 66cl4ch14-pLKO.1-NT.

Surpreendentemente, nenhum destes alvos é expresso pelas células parentais, mesmo *Dmrt2*, encontrado duas vezes no *screen*. Sobretudo nesse caso (*Dmrt2*), mas talvez nos outros também, o fenótipo observado pode ser devido a efeitos *off-target*. O sítio de inserção do lentivírus é aleatório, sendo assim, se este é inserido em um local – independente de qual seja a sequência do shRNA nele contido – um gene com alguma atividade relacionada ao aumento do potencial metastático pode ser perturbado (ativado ou silenciado), levando assim à formação de uma metástase. Existem de fato diversos estudos que empregam perturbação de DNA através da inserção de transposons visando identificar vias e genes ligados à tumorigênese [48, 49, 50].

Screen com Subpool-2 em 67NRch1

Os *screens* realizados empregando-se células 66cl4ch14 mostraram-se bastante efetivos em termos de obtenção de metástases para posteriores análises, no entanto ocorreram alguns falso-positivos. Por essa razão decidimos realizar outro experimento: um *screen* utilizando a linhagem não-metastática 67NRch1 transfectada com pLKO.1-pool2, para assim ver se esta interferência seria capaz de promover um aumento na incidência de metástases mesmo nesta linhagem.

Incidência de Metástases

Totalizando, nove dentre quarenta camundongas apresentaram ao menos uma metástase, localizada em órgãos como pulmões, linfonodos, costelas, fêmur e coluna vertebral (Figura 22).

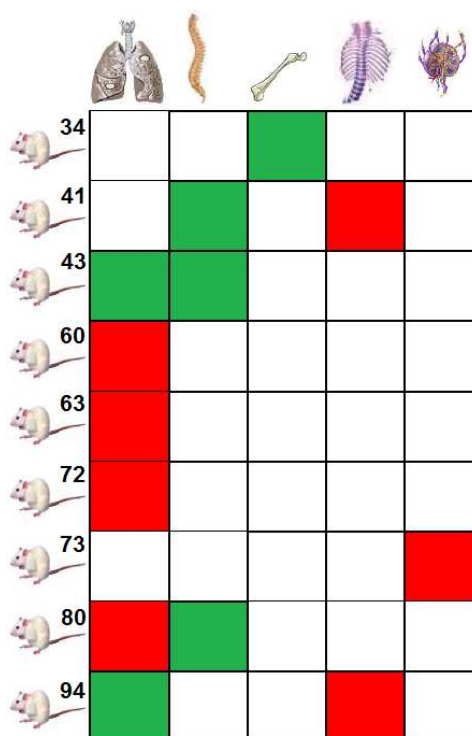


Figura 22. Distribuição de metástases visíveis (vermelho) e micrometástases (verde) após a injeção de células 67NRch1-pLKO.1-pool2 imfp.

Notavelmente, os pulmões da camundonga #80 estavam completamente tomados por metástases (Figura 23) de uma forma que nunca havia sido observada antes para este tipo de linhagem (67NRch1). Sendo assim, estes pulmões foram dissecados, tentando-se separar os nódulos principais, uma vez que era altamente provável que este fosse um evento multiclonal.

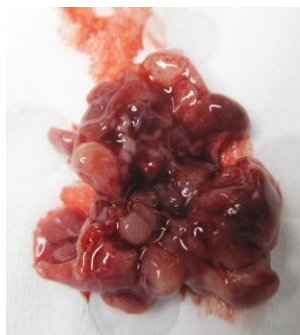


Figura 23. Pulmões severamente comprometidos por metástases: camundonga# 80 após 67NRch1-pLKO.1-pool2 imfp.

shRNAs identificados e candidatos à supressores de metástase

Oito das metástases apresentadas na Figura 22 (62%) tiveram a sequência do inserto lentiviral elucidada através de sequenciamento convencional, incluindo as seis amostras dissecadas dos pulmões do animal #80 (Tabela 17).

Tabela 17. shRNAs identificados em metástases do *screen* 66cl4ch14-pool4

Animal/Órgão	Identificação do grampo	Sequência do Grampo	mRNA Alvo
860.34 fêmures	TRCN0000039540	CCGGCGCAGCATAAAGACAGATCGACTCGAGTCGATCTGTCTTTATGCTGCGTTTTTG	Mnat1
860.41 costela	TRCN0000039520	CCGGGTCCTATTTGTCTGGAGCTTTCTCGAGAAAGCTCCAGACAAATAGGACTTTTTG	Mid1
860.41 coluna vertebral	TRCN0000012565	CCGGCCAGCAAGTATTGTCCTATTTCTCGAGAAATAGGACAATACTTGCTGGTTTTT	Bmi1
860.63 pulmões	TRCN0000054742	CCGGGCATGTCTTCTACATCGACTACTCGAGTAGTCGATGTAGAAGACATGCTTTTTG	Snd1
860.72 pulmões	TRCN0000034457	CCGGCCCGCTTTGTGCGCTCTGAATCTCGAGATTCAGAGCGCACAAAGCGGGTTTTTG	Rgs5
860.73 linfonodo	TRCN0000054831	CCGGCTACCACAAGTACAAGGCAAACCTCGAGTTTGCCTTGTACTTGTGGTAGTTTTTG	Rpl8
860.80 pulmões	TRCN0000033060	CCGGCGGACCTGCTAAGGAAATATACTCGAGTATATTTCTTAGCAGGTCCGTTTTTG	Stambpl1
860.80 coluna vertebral	TRCN0000033060	CCGGCGGACCTGCTAAGGAAATATACTCGAGTATATTTCTTAGCAGGTCCGTTTTTG	Stambpl1

Nota: Destacados em **vermelho**: o shRNA contra Dmrt2 foi identificado em duas metástases em diferentes órgãos do mesmo animal.

Como procedimento-padrão, o próximo passo envolveu RT-qPCRs para a verificação do status de expressão desses possíveis candidatos nas células parentais/transduzidas com shRNA sem alvo (67NRch1-pLKO.1-NT).

Para seleccionar os melhores candidatos, consideramos as seguintes informações:

- A expressão de mRgs5 (regulador da sinalização e proteína-G 5), bem como a de mMid1 (*midline 1*) não foi detectada nas células parentais;
- Rpl8 (Proteína Ribossomal L8) é um componente do ribossomo, sendo até mesmo utilizada, em alguns casos, como gene *housekeeping*, o que torna muito pouco provável que este seja um gene supressor de metástase;
- Bmi1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1*) está bem caracterizado como oncogene, e embora alguns genes já tenham sido apontados como tendo dois papéis, como oncogenes e supressores de metástase, esta condição é muito rara [51].

Com relação aos genes identificados submetidos à análise da expressão em linhagens com diferentes potenciais metastáticos, como apresentado na Tabela 18, a expressão de mSnd1 decaiu em linhagens mais agressivas, enquanto a expressão de mMnat1 não decaiu, permaneceu inalterada. Por outro lado, a expressão de mStambpl1 e de mBmi1 não apresentaram um padrão de expressão claro e consistente ao longo das linhagens, estando ora estáveis, ora superexpressos e ora levemente subexpressos.

Tabela 18. Expressão Relativa (%) de mRNA dos candidatos do *screen* 67NRch1-pKO.1-pool2

	Stambpl1	Mnat1	Snd1	Bmi1
67NRch1	100	100	100	100
66cl4ch14	138,6894	144,6003	99,81864	213,119
4T1ch5	207,7749	66,07166	25,84137	83,94358
4T1ch9	80,70431	51,41449	17,09557	91,62236
4T1Br4ch2	150,2408	55,61652	45,6608	92,7361
4T1BM2ch11bri	71,71201	59,58485	36,50547	103,0691
4T1.2Neo m-Cherry	99,02172	105,5806	14,29166	177,1583
4T1.13ch5T1	224,0461	83,06887	49,3304	158,0452

A proteína SN tudor (SND1) é um co-ativador da transcrição que se liga a componentes do spliceossomo, conectando assim a transcrição e o *splicing*. Ainda SND1 é um componente do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), mecanismo utilizado pelos shRNAs e microRNAs para degradação de mRNAs específicos, promovendo o *knockdown* [52, 53]. Assim, uma vez que a eficácia do *knockdown* não pode ser checada (o shRNA contra Snd1 foi encontrado em uma pequena metástase pulmonar processada para obtenção de gDNA), além da possibilidade de que ele seja um gene supressor de metástase, outras duas hipóteses podem ser levantadas: ou Snd1 seria um falso positivo; ou, devido a quedas na sua expressão, o complexo RISC não poderia ser montado em quantidades suficientes, e, genes promotores de metástase que estariam normalmente não/pouco expressos em células 67NRch1 tornar-se-iam mais expressos, possibilitando a ocorrência de metástases. Para esclarecer essas hipóteses, será necessária a transdução de células 67NRch1 com pLKO.1-Snd1shRNA, para então avaliar tanto a eficácia do grampo para geração do *knockdown*, quanto aumento da incidência de metástases *in vivo*.

Mnat1, “ménage à trois 1”, foi inicialmente identificado como um dos componentes da cinase-ativadora de cinase ciclina-dependente (CAK), controlando sua estabilidade e especificidade. MNAT1 possui três domínios que podem interagir com diversas proteínas, entre elas fatores de transcrição, tais como o fator geral de transcrição TFIIF. Sendo assim Mnat1 está envolvido tanto na regulação do ciclo celular, quanto da transcrição [54]. Estudos também mostraram que MTA1 (proteína associada à metástase 1), um correpressor, tem atividade inibitória contra ação mediada por Mnat1/CAK em células de câncer de mama [54], evidenciando que Mnat1 pode estar envolvido no processo de metástase.

STAMBPL1

Devido ao fenótipo metastático muito impressionante observado no animal no qual o shRNA contra Stambpl1 foi identificado, este gene foi escolhido como o primeiro candidato oriundo deste *screen* para ser analisado de maneira mais aprofundada.

Stambpl1, *STAM-binding protein-like 1*, é uma deubiquitinase que interage com STAM (signal transducing adaptor molecule) e está envolvida na repressão da expressão do receptor para o fator de crescimento epidérmico, dentre outras funções [55]. Stambpl1 age sobre cadeias de poliubiquitina K-63-ligadas, que exercem função importante na transdução

de sinais, reparo de DNA, tráfico e degradação de proteínas [56]. À diferentes deubiquitinases têm se atribuído tanto atividades oncogênicas, quanto supressoras de tumor, variando com o tipo de tecido e estágio tumoral [57].

Redução na expressão de Stambpl1 ao nível de DNA e RNA tem sido associada à carcinomas agressivos e pior prognóstico em humanos (ONCOMINE, Figura 24). Embora haja poucas amostras nos dados relativos à evolução clínica, juntos, os dados recuperados do ONCOMINE apoiam nossos achados e suposições.

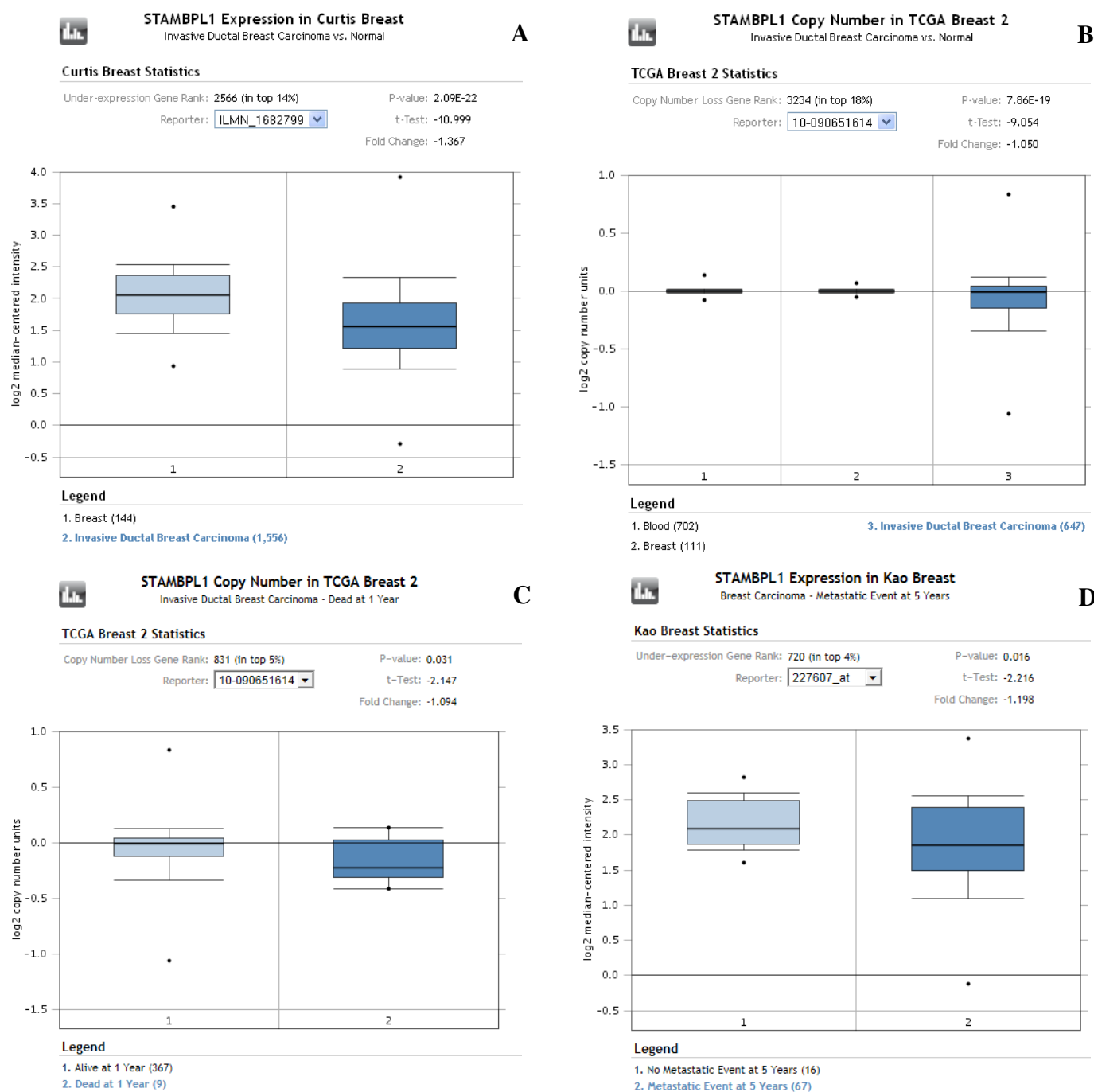


Figura 24. Stambpl1 está reduzido em amostras de câncer de mama humano. **A.** mStambpl1 está reduzido em carcinoma mamário ductal invasivo, quando comparado a tecido mamário normal. **B.** O nível de DNA para Stambpl1 está reduzido em carcinoma mamário ductal invasivo, quando comparado a tecidos normais. **C.** Pacientes com carcinoma mamário ductal invasivo que morreram 1 ano após o diagnóstico, apresentaram Stambpl1 tumoral reduzido (ao nível de DNA) em relação àqueles que continuaram vivos. **D.** Pacientes com carcinoma mamário ductal invasivo que apresentaram evento metastático 5 anos após o diagnóstico, apresentaram Stambpl1 tumoral reduzido (ao nível de DNA) em comparação àqueles que não apresentaram evento metastático.

No caso das metástases nas quais o shRNA contra Stambpl1 foi identificado, por se tratarem de nódulos grandes, foi possível processá-los tanto para obtenção de gDNA, quanto para lisado de proteína, para posterior análise do *knockdown* através de Western blotting. Contudo, o anticorpo disponível comercialmente para esta proteína não foi específico. Assim, a única opção foi a obtenção de partículas pLKO.1-Stambpl1, transdução das células e verificação da queda na expressão através de RT-qPCR.

A expressão de mStambpl1 no montante geral de células transduzidas decaiu para menos da metade, em relação às células 67NRch1-pLKO.1-NT (expressão relativa: 43.39%), prosseguiu-se então a clonagem de célula única para a seleção dos melhores *knockdowns* a serem utilizados nos ensaios *in vivo* para validação.

Quatro clones, cuja expressão está demonstrada na Figura 25, foram combinados (mesmo número de células para cada clone) e injetadas na glândula mamária de camundongos Balb/C.

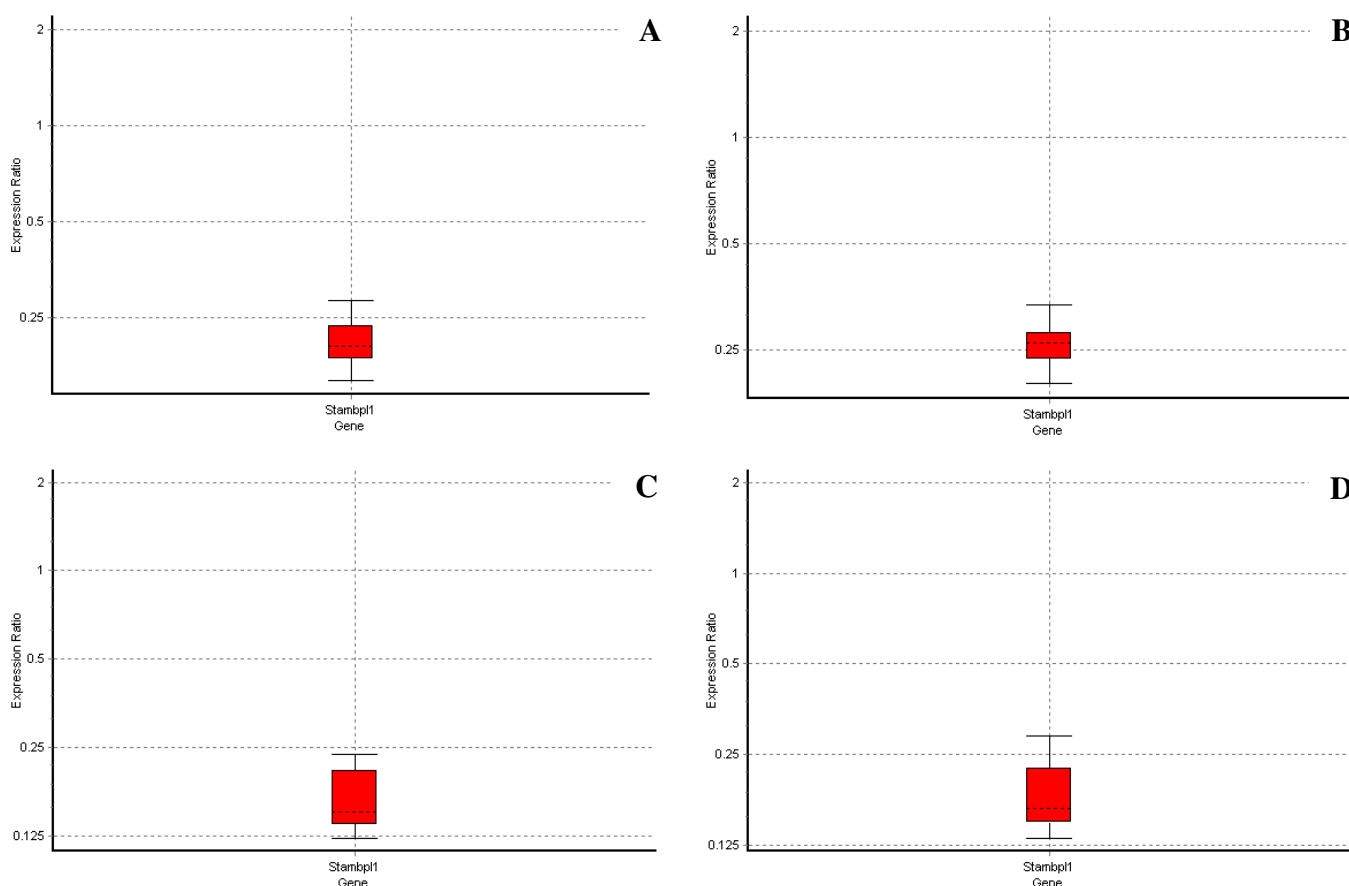


Figura 25. Expressão de mStambpl1 em clones de células individuais de 67NRch1-Stambpl1kd em comparação à células 67NRch1-NT $P(H1)=0.000$. A. Clone1: 0.208 (Erro Padrão: 0.175 - 0.238); B. Clone4: 0.261 (Erro Padrão: 0.227 - 0.303); C. Clone10: 0.163 (Erro Padrão: 0.135 - 0.226); Clone11: 0.179 (Erro Padrão: 0.139 - 0.232).

Os tumores primários cresceram e foram removidos ao atingir 0.5g, e o sacrifício foi realizado 21 dias após a cirurgia (procedimento padrão descrito em “Materiais e Métodos”). Os resultados relativos à carga tumoral, contudo, foram inconclusivos, uma vez que nenhum dos animais portadores de tumores Stambpl1-kd apresentaram metástases massivas nos pulmões (como as observadas no *screen*). Ensaio adicionais, incluindo qPCRs para mCherry nos pulmões, fêmures e colunas vertebrais, devem ser realizados para melhor avaliar se Stambpl1 continua um candidato promissor a gene supressor de metástase.

Conclusões Parciais

Embora sejam necessárias diversas mutações para conduzir uma célula normal à transformação maligna, uma vez que a célula se torna cancerosa, aparentemente o equilíbrio que mantém esta célula não-metastática é muito mais frágil; portanto, alterações em um único gene ou via poderia ser suficiente para fazer a célula metastizar.

Embora ainda não tenhamos confirmado nenhum dos candidatos identificados como sendo um gene supressor de metástase, um grande número de dados e análises integradas dos mesmos sugerem resultados promissores neste campo emergindo em breve.

Referências

- 1 World Health Organization, GLOBOCAN 2008, <http://globocan.iarc.fr/>, accessed on 24.09.13.
- 2 Coleman, R.E. and R.D. Rubens, *The clinical course of bone metastases from breast cancer*. Br J Cancer, 1987. **55**(1): p. 61-6.
- 3 Smith, S.C. and D. Theodorescu, *Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 253-64.
- 4 Seraj, M.J., et al., *Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13*. Cancer Res, 2000. **60**(11): p. 2764-9.
- 5 Beach, S., et al., *Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells*. Oncogene, 2008. **27**(15): p. 2243-8.
- 6 Lee, J.H. and D.R. Welch, *Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1*. Cancer Res, 1997. **57**(12): p. 2384-7.
- 7 Brough, R., et al., *Functional Viability Profiles of Breast Cancer*. Cancer Discov, 2011. **1**(3): p. 260-273.
- 8 Marotta, L.L., et al., *The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44CD24 stem cell-like breast cancer cells in human tumors*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2723-35.
- 9 Cerone, M.A., et al., *High-throughput RNAi screening reveals novel regulators of telomerase*. Cancer Res, 2011. **71**(9): p. 3328-40.
- 10 Berns, K., et al., *A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway*. Nature, 2004. **428**(6981): p. 431-7.
- 11 Simpson, K.J., et al., *Identification of genes that regulate epithelial cell migration using siRNA screening approach*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(9): p. 1027-38.
- 12 Prahallad, A., et al., *Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR*. Nature, 2012.

- 13 Possemato, R., et al., *Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer*. Nature, 2011. **476**(7360): p. 346-50.
- 14 Bric, A., et al., *Functional identification of tumor-suppressor genes through an in vivo RNA interference screen in a mouse lymphoma model*. Cancer Cell, 2009. **16**(4): p. 324-35.
- 15 Gobeil, S., et al., *A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene*. Genes Dev, 2008. **22**(21): p. 2932-40.
- 16 Gumireddy, K., et al., *KLF17 is a negative regulator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1297-304.
- 17 Moffat, J., et al., *A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1283-98.
- 18 Eckhardt, B.L., et al., *Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix*. Mol Cancer Res. 2005. **3**(1): p. 1-13.
- 19 Shendure J., & Ji H., Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 2008. **26**(10): p.1135-45.
- 20 Sanger, F., et al., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA. 1977. **74**(12): p. 5463–5467.
- 21 Rhodes DR, et al., *ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform*. Neoplasia. 2004; **6**(1): p. 1-6.
- 22 Rhodes D.R., et al., *Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles*. Neoplasia. 2007. **9**(2): p. 166-180.
- 23 Ruijter, J.M., et al., *Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data*, Nucleic Acids Research. 2009. **37**(6): e45.
- 24 Bustin S.A., et al., *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*. Clinical Chemistry. 2009. **55**(4): p.611–622.
- 25 Baker, M.E., *Evolution of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and their role in androgen, estrogen and retinoid action*. Mol Cell Endocrinol. 2001. **171**(1-2): p. 211-5.
- 26 Eduardo Balsa, E., et al., *NDUFA4 Is a Subunit of Complex IV of the Mammalian Electron Transport Chain*, Cell Metabolism. 2012. **16**(5): p.378–386.
- 27 Emeagi P.U., et al., *Proinflammatory characteristics of SMAC/DIABLO-induced cell death in antitumor therapy*. Cancer Res. 2012. **72**(6): p.1342-52.
- 28 Bradley S.E., et al., *Phosphorylation of VACM-1/Cul5 by Protein Kinase A Regulates Its Neddylation and Antiproliferative Effect*, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2010. **285**(7): p. 4883–4895.
- 29 Michael J Fay M.J., et al., *Analysis of CUL-5 expression in breast epithelial cells, breast cancer cell lines, normal tissues and tumor tissues*. 2003. Molecular Cancer, **2**:40.
- 30 Laszlo G.S., & Cooper J.A., *Restriction of Src activity by Cullin-5*. Curr Biol. 2009. **19**(2): p.157–162.
- 31 Xu X.M., et al., *MicroRNA-19a and -19b regulate cervical carcinoma cell proliferation and invasion by targeting CUL5*. Cancer Lett. 2012; **322**(2): p.148-58.
- 32 Jetten A.M., *Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism*. Nucl Recept Signal. 2009. **7**:e003.

- 33 Duez H. & Staels B., *Rev-erb-alpha: an integrator of circadian rhythms and metabolism*. J Appl Physiol. 2009. 107(6): p.1972-80.
- 34 Duez H. & Staels B., *The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism*. Diab Vasc Dis Res. 2008. 5(2): p.82-8.
- 35 Bloom J. & Cross F.R., *Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007. 8(2): p.149-60.
- 36 Sherr C.J., *D-type cyclins*. Trends Biochem Sci. 1995. 20(5): p.187-90.
- 37 Doglioni C., et al., *Cyclin D3 expression in normal, reactive and neoplastic tissues*. J Pathol. 1998. 185(2): p.159-66.
- 38 Györfy B., et al., *An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients*. Breast Cancer Res Treat. 2010. 123(3): p.725-31.
- 39 Jiang X., et al., *GABAB receptor complex as a potential target for tumor therapy*. J Histochem Cytochem. 2012. 60(4): p.269-79.
- 40 Boison D., *Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain*. Pharmacol Rev. 2013. 65(3): p.906-43.
- 41 Bardot V., et al., *Nucleotide-metabolism and chromosome alterations in human-malignant melanoma xenografts*. Int J Oncol. 1995. 7(3): p.547-54.
- 42 Morris L.G., et al., *Genomic dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/PI3K pathway reveals frequent deletion of the EGFR phosphatase PTPRS in head and neck cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011. 108(47): p.19024-9.
- 43 McLean J., et al., *Enhanced rate of nerve regeneration and directional errors after sciatic nerve injury in receptor protein tyrosine phosphatase sigma knock-out mice*. J Neurosci. 2002. 22(13): p.5481-91.
- 44 Chen X., et al., *Leukotriene A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy*. Curr Cancer Drug Targets. 2004. 4(3): p.267-83.
- 45 Airaksinen M.S. & Saarma M., *The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value*. Nat Rev Neurosci. 2002.3(5): p.383-94.
- 46 Sariola H. & Saarma M. *Novel functions and signalling pathways for GDNF*. J Cell Sci. 2003. 1;116(Pt 19): p.3855-62.
- 47 Scully O.J., et al., *Breast cancer metastasis*, Cancer Genomics Proteomics. 2012. 9(5): p.311-20.
- 48 Friedel R.H., et al., *Clonal Expansion Analysis of Transposon Insertions by High-Throughput Sequencing Identifies Candidate Cancer Genes in a PiggyBac Mutagenesis Screen*. PLoS One. 2013. 5;8(8): e72338.
- 49 O'Donnell K.A., et al., *A Sleeping Beauty mutagenesis screen reveals a tumor suppressor role for Ncoa2/Src-2 in liver cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. 22;109(21): p.E1377-86.
- 50 Zanesi N., et al., *A Sleeping Beauty screen reveals NF-kB activation in CLL mouse model*. Blood. 2013. 23;121(21): p.4355-8.
- 51 Aktary Z., et al., *Plakoglobin interacts with and increases the protein levels of metastasis suppressor Nm23-H2 and regulates the expression of Nm23-H1*. Oncogene. 2010. 29(14): p.2118-29.

- 52 Tsuchiya N., Nakagama H., *MicroRNA, SND1, and alterations in translational regulation in colon carcinogenesis*. Mutat Res. 2010. 693(1-2): p.94-100.
- 53 Cappellari M., et al., *The transcriptional co-activator SND1 is a novel regulator of alternative splicing in prostate cancer cells*. Oncogene. 2013. 360. [Epub ahead of print].
- 54 Talukder A.H., *MTA1 interacts with MAT1, a cyclin-dependent kinase-activating kinase complex ring finger factor, and regulates estrogen receptor transactivation functions*. J Biol Chem. 2003. 278(13): p.11676-85.
- 55 Nakamura M., et al., *Clathrin anchors deubiquitinating enzymes, AMSH and AMSH-like protein, on early endosomes*. Genes Cells. 2006. 11(6): p.593-606.
- 56 Sacco J.J., et al., *Emerging roles of deubiquitinases in cancer-associated pathways*. IUBMB Life. 2010. 62(2): p.140-57.
- 57 Lavorgna A., & Harhaj E.W., *An RNA interference screen identifies the Deubiquitinase STAMBPL1 as a critical regulator of human T-cell leukemia virus type 1 tax nuclear export and NF- κ B activation*. J Virol. 2012. 86(6): p.3357-69.

Dados Suplementares

1. Sequencia do vetor pLKO.1- SHC009 e disposição dos primers RPR LAP1 Fwd, RPR LAP2 Rev, Moffat Fwd e Moffat Rev.

>SHC009(sh-ARHGDI) (direct) 7086bp

TTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGCAGAGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAG
CGGCGCCGACCCCTGGGTCTCGCACATTCTTACGTCCGTTTCGACAGCGTCACCCGGATCTTCGCCGCTACCCCTTGTTGGGCCC
CCCGGCGACGCTTCTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGGTTCTTTCGCGTTTCGCGGCGTGCCGACGTGACAAACGGAAAG
CCGCACGTCTACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAGGGAGCAATGCGACGCGCGCCACCGCGATGGGCTGTGGCC
AATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCGGTA
GTGTGGGCGCTTCTTCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCACGTGCGCAGTCGGCTCCCTCGTT
GACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAGGGGGATCCACCGGAGCTTACCATGACCGAGTACAAGCCACGGTGCGCCTCGC
CACCCGCGACGACGTCCCCAGGGCGGTACGCACCCTCGCGCGCGGTTTCGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCG
ATCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTACCGAGCTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTG
TGGGTGCGGACGACGCGCGCGGTGGCGGTCTGGACCACGCGGAGAGCGTCGAAGCGGGGGCGGTGTTTCGCCGAGA
TCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCTCTGGCGCCGACCCG
CCCAAGGAGCCCGCTGGTTCTTGGCCACCGTCGCGCTCTCGCCGACCACAGGGCAAGGGTCTGGGCAGCGCCGTCGT
GCTCCCCGAGTGGAGGCGGGCGAGCGCGCGGGGTGCCGCCCTTCTGGAGACCTCCGCGCCCCGCAACCTCCCTCTCT
ACGAGCGGCTCGGCTTACCGTACCGCGGACGTGAGGTTGCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCC
GGTCTGACGCCCGCCCCACGACCCGACGCGCCGACCGAAAGGAGCGCACGACCCCATGCATCGGTACCTTTAAGCC
AATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCAAC
GAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAG
GGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAAGTGTGAGTGTGCGCCGCTGTTGTGTGACTCTGGTA
ACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTAGTCAGTGTGGAATACTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTT
ATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAACCTGTTTATTGACGCTTATAATGGTTACAAAATAAGCAATA
GCATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACCTGCTTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
TGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATG
GCTGACTAATTTTTTTATTTATGACAGAGCCGAGGCCGCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTT
TTGGAGGCTAGGGACGTACCCAATTTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGCTGTTTTACAACGCTG
TGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA
GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCG
CGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTC
CTTTTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCGATTAGTGTCTTACCG
CACCTCGACCCCAAAAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTG
ACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAAGTGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTTG
ATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAA
AAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTATTATTTTCTAAATACAT
TCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCA
ACATTTCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCTCTGTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAA
AAGATGCTGAAGTACAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATGCAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCTTTGAGAGTTTT
CGCCCCGCAAGACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTGCTGATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATGACGCGGG
CAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAAGCATCTTAC
GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA
CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCAACAATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATT
AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACGAGACCACTT
TGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAG
CACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTACGGCAACTATGGATGAACGAAAT
AGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT
GATTTAAAGCTTCAATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTG
AGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTG
CTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGTACCAGCGGTGGTTTGTGTCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGT
AACTGGCTTACGACAGAGCGAGATACCAAACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT
AGCACGCTACACTCGCTCTGCTAATCTGTTACAGTGTGCTGTCGAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGTT
GGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAG
CGAACGACCTACACGAACTGAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGG
ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTA
TAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTGACTTGAGCGTGCATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCTATGAAAAA
CGCCAGCAACGCGGCTTTTACGGTTCTGGCCTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGGTATCCCTGATT
CTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCGCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTG
AGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCCGCGCTTGGCCGATTATTAATGACGCTGGCACGA
CAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTATTAGGCACCCAGGCTT

TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATG
 ATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCAAGCTTAATGTAGTCTTATGCAATAC
 TCTTGTAGTCTTGGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTG
 GTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATT
 GCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTG
 GGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCCTCAAGTAGTGTGTGCCCG
 TCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC TAGAGATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTGTGGAAAACTCTAGCAGTGGCGCCCGAAC
 AGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAG
 GCGAGGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGT
 CAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATAAAATTA
 AAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCACGAAGGCTGTA
 GACAAATCTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAAGAACTTACATCATTATATAATACAGTAGCAACC
 CTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAA
 GTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAAGTGAAT
 TATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGA
 AAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTCTTGGGTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGA
 CGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA
 CAGCATCTGTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGA
 TCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTGTCTGTGAAAACTATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAA
 TAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACATAATACAGCTTAATAC
 ACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAAGAAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTG
 TGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAG
 AATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTAATCGTTTTAGACCCACCTCCCAACC
 CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTG
 AACGGATCTCGACGGTATCGATCAGGACTAGCCTCGAGCGGCCGCCCTTCACCGAGGGCCTATTCCCATGATTCTCT
 TCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAA **GATATTAGTACAA**
AATACGTGACGTAGAAAAGTAAT AATTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTAAAAATTATGTTTTAAAAATGGACTATCATATGCTT
 ACCGTAACCT **GAAAGTATTTTCGATTTCCTTGGCTTTATATCTTGTGGA** AAGGACGAAACACCGGCAAGATTGACAAGACT
 GACTA **CTCGAG** TAGTCAGTCTGTCAATCTTGTTTTTGAATTCTCGACCTCGAGA **CAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTT**
AAAAGAAAAGG GGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAAATAGTAGACATAATAGCAACA **GACATACAACTAAA**
GAATTACAAAAACAAATTAC AAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGCCGCGGCT
 CGAGGGGG

RPR LAP1 Fwd: **GATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAAT**

RPR LAP2 Rev: GTAATTTGTTTTTGTAAATCTTTAGTTTGTATGTC

Rev-comp: **ACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTAC**

Tamanho do amplicon: 355bp

Moffat Fwd: **GAAAGTATTTTCGATTTCCTTGGCTTTATATATCTTGTGGA**

Moffat Rev: CCTTTTCTTTTAAAATTGTGGATGAATACTGCCATTTG

Rev-comp: **CAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG**

Tamanho do amplicon: 164bp

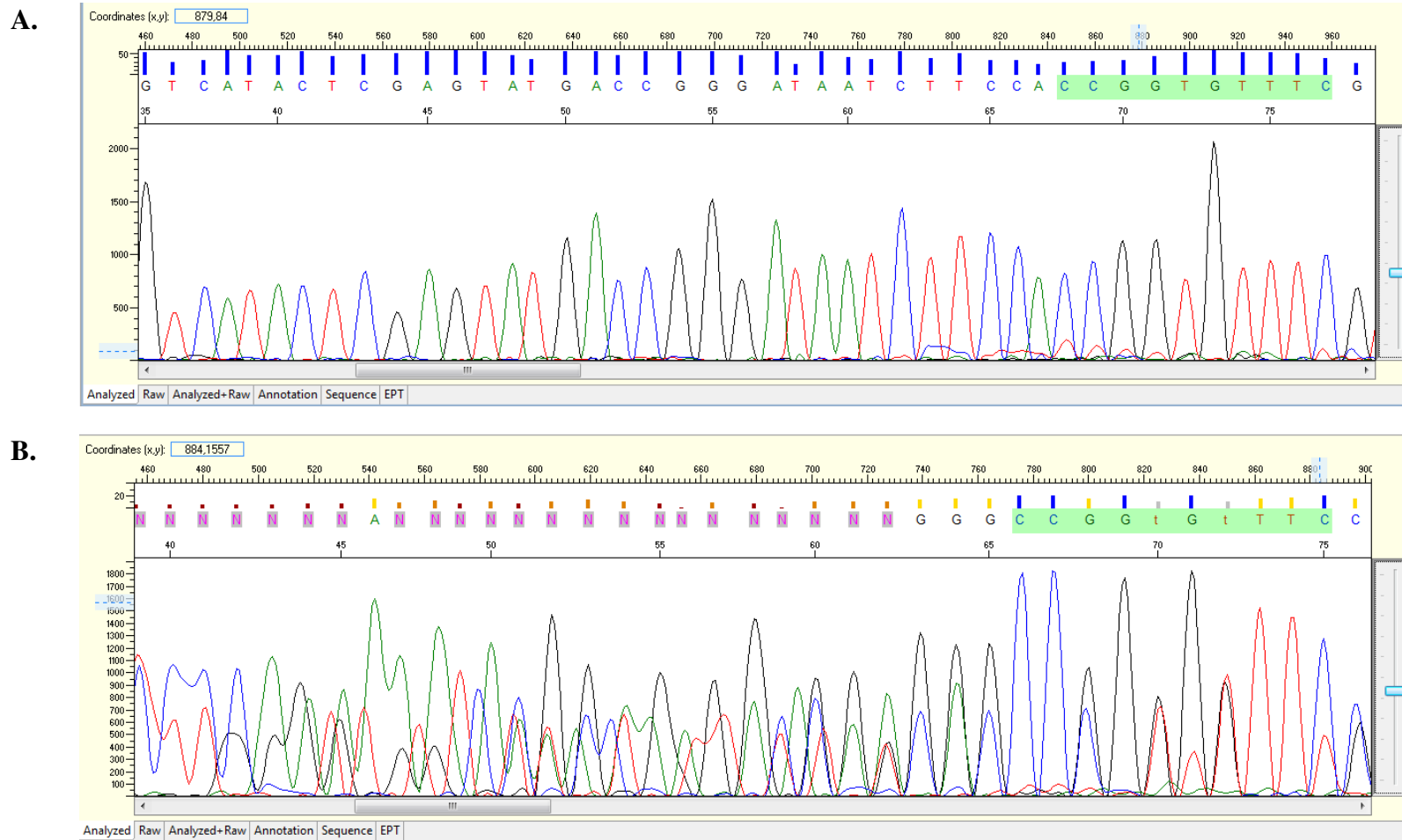


Figura Suplementar 1. Análise dos dados de sequenciamento convencional de amostras de metástase através do Sequence Scanner Software 2. A. Único inserto; B. Múltiplos insertos: neste caso, a sequência não pode ser determinada, uma vez que os picos das sequências únicas dos diferentes shRNAs se sobrepõem, pois há mais de uma base, de insertos diferentes, em cada posição. Destacada em verde está o final da sequência do vetor que é comum a todos os insertos. Este sequenciamento foi feito a partir do primer reverso, então a leitura precisa ser feita da direita para a esquerda, e convertida para sequência complementar (reverso complementar).

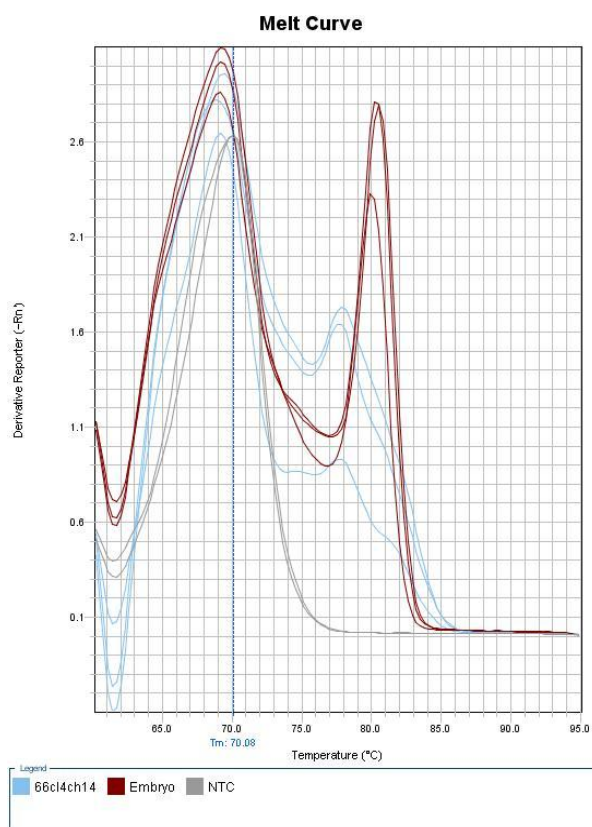
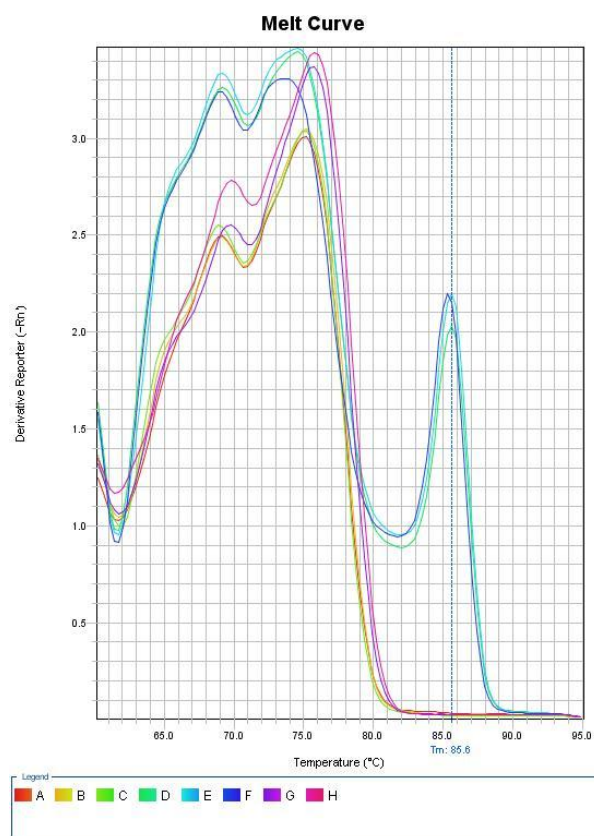
A. Cd40**B. Il17d**

Figura Suplementar 2. Amplificação inespecífica para mCd40 e mIl17d. A. Curva de *Melting* para mCd40 (66cl4ch14, amostras de embrião e NTC=água). B. Curva de *Melting* para mIl17d (66cl4ch14, amostras de embrião e NTC=água, 3 diluições de primers).

CONCLUSÕES:

A progressão tumoral e as respostas desencadeadas pelo hospedeiro são processos altamente complexos e finamente regulados. A busca por terapias mais eficientes e com menores efeitos colaterais permeia tanto a elucidação dos mecanismos regulatórios envolvidos na evolução tumoral quanto o uso de terapias baseadas em produtos naturais.

Neste trabalho, concluímos que a análise dos efeitos da aplicação de terapia com *Aloe vera* e mel sobre ratos portadores de tumor mostrou ser benéfica ao hospedeiro, sobretudo por diminuir o tamanho e a agressividade do tumor primário, através de mecanismos que envolvem ativação da resposta imunológica, estresse oxidativo e reversão da transição epitélio-mesenquimal. Também é possível afirmar que existe sinergismo entre os componentes presentes na *Aloe vera* e no mel, porém algumas das substâncias que participam deste processo ainda precisam ser identificadas.

Paralelamente, concluímos que na identificação de possíveis genes supressores de metástase através de *screen* funcional em camundongas portadoras de tumores de mama triplo-negativo foram alcançados resultados bastante promissores, pois os genes-candidatos identificados, após validação, poderão ser usados tanto para prognóstico mais preciso e eficiente, quanto para o desenvolvimento de terapias-alvo.

ANEXOS



CEE/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp**

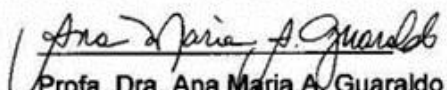
CERTIFICADO

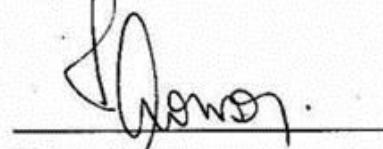
Certificamos que o Protocolo nº 1400-1, sobre "Efeitos preventivos e terapêuticos do composto de Aloe vera e mel no tratamento do carcinosarcoma de Walker 256 em ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes / Rebeka Tomasin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em 29 de novembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1400-1, entitled "Effects of Aloe vera and honey on tumor growth evaluation in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on November 29, 2007.

Campinas, 29 de novembro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Estudo dos Efeitos Modulatórios da Aloe vera e mel sobre o crescimento tumoral" (protocolo nº 2537-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes / Rebeka Tomasin, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 05 de outubro de 2011.

Campinas, 05 de outubro de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva