



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Ronimara Aparecida Santos

**Atividade Antitumoral do Extrato de Chá Verde (*Camellia sinensis*) em
Células de Câncer de Mama Cultivadas em Modelo Tridimensional**

Rio de Janeiro

2022

Ronimara Aparecida Santos

**Atividade Antitumoral do Extrato de Chá Verde (*Camellia sinensis*) em Células de
Câncer de Mama Cultivadas em Modelo Tridimensional**



Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor(a), ao Programa de
Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e
Saúde, da Universidade do Estado do Rio de
Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Danielly C. Ferraz da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

S237 Santos, Ronimara Aparecida
Atividade Antitumoral do Extrato de Chá Verde (*Camellia sinensis*) em Células de Câncer de Mama Cultivadas em Modelo Tridimensional / Ronimara Aparecida Santos. – 2022.
83 f.

Orientadora: Danielly C. Ferraz da Costa
Coorientador: Julio Beltrame Daleprane
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição.

1. Nutrição – Teses. 2. Câncer de mama – Teses. 3. Chá verde – Teses. I. Costa, Danielly C. Ferraz da. II. Daleprane, Julio Beltrame. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. III. Título.

es CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ronimara Aparecida Santos

Atividade Antitumoral do Extrato de Chá Verde (*Camellia sinensis*) em Células de Câncer de Mama Cultivadas em Modelo Tridimensional

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor(a), ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em: 29 de julho de 2022

Banca examinadora:

Profª. Dra. Danielly C. Ferraz da Costa
Instituto de Nutrição - UERJ

Profª. Dra. Flávia Fioruci Bezerra
Instituto de Nutrição - UERJ

Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profª. Dra. Luciana Pereira Rangel
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profª. Dra. Julia Quarti Cardoso
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha amiga Sâmara Marques que além de tudo que me ensina na vida, me mostrou como manter a energia, a força, o otimismo e a fé lutando contra um triplo negativo.

AGRADECIMENTOS

Em quantos anos uma tese é produzida? A resposta mais óbvia é: em 4 anos, em média. Eu discordo. Essa aqui começou a ser moldada há pelo menos 12.

Em 2011 eu entrei pela primeira vez em um laboratório com uma mala pequena e sem nenhuma ferramenta dentro. Com o passar dos anos e à medida que observava, interagia e aprendia com pessoas tão diferentes, fui montando meu canivete suíço. Foi com ele que pude construir o documento que está aqui hoje. Cada pessoa com quem estive me deu uma ferramenta e é para cada uma delas que gostaria de dedicar duas dessas 98 páginas.

Vou começar pela origem, a casa da vó, sabe? Aquele lugar que a gente sempre volta quando precisa de uma receita, uma marmita, ou só de um abraço mesmo. O LTPV/LABEV (UFRJ) é a minha. É para Giulia e para o Antônio que eu ligava com a boa e velha “Será que você não tem um pouco de TRITON X-100 aí para me dar? Preciso de pouquinho, 5 mL dá!” ou ainda “Esse protocolo aqui está certo? Não sei, tem alguma coisa estranha acontecendo. Como é que você faz?”. Claro que por trás desses dois tem professores que mantiveram as portas abertas para mim: a Prof^a. Andrea Cheble, o Prof. André Gomes e o Prof. Jerson Silva. Obrigada por tudo!

Também tem a casa da nossa mãe, né? Não tem jeito, a gente cresce, mas sempre vai lá para pedir ajuda. Obrigada Prof. Rafael Braga pela disponibilidade de sempre com o “Rafa, sua estufa está funcionando? Estamos sem luz aqui, posso levar minhas células para a UNIRIO?”. Eu também contava muito com o Henrique na corrida de 100m rasos que foi liofilizar 20L de chá verde enquanto tocávamos o ensaio com os animais. Eu acho que se ele me cobrar 1 real por cada “Henrique, tem vaga semana que vem no liofilizador? O chá está acabando!”, faz uma caixinha boa! Henrique, sou muito grata pela sua paciência e ajuda com esse processo. Também preciso agradecer à Prof^a. Mariana Ferreira que nos abriu a porta do Laboratório de Preparo de Amostras, na Escola de Nutrição de UNIRIO.

Claro, tem a minha casa nova, a UERJ, e quem coloca tudo nos trilhos por lá é a Prof^a. Danielly Ferraz. Ela vai ficar brava comigo se eu falar o sobrenome todo. A Dani é aquela orientadora que lê o arquivo que você mandou às 20h de um domingo; que sai de férias, mas responde ao e-mail da cotação daquele anticorpo que já está atrasado há 2 meses; que vai na UERJ para receber e carregar material descartável com você no meio da pandemia; que repete pacientemente coisas que já havia me dito e eu esqueço... A Dani acima de tudo organiza, dá direção e sentido às minhas ideias agitadas, ela coloca a casa e a minha cabeça em ordem. Obrigada por esses 6 anos de aprendizado, Dani!

Sou grata ainda ao conjunto de técnicos e servidores da UERJ que deram suporte desde a parte burocrática até a execução de experimentos: Adriana, Daniele Valois, Michele,

Ricardinho e Yan são as pessoas que costumam ficar escondidinhas nos bastidores, mas que seguram todo o meio de campo. Aos alunos de mestrado e doutorado do nosso grupo de pesquisa que compartilham as alegrias e desafios do dia a dia, em especial aos que estiveram diretamente envolvidos com esse projeto: Manu e Felipe. À Beatriz, nossa aluna de IC que foi quem ajudou a dar o pontapé no estabelecimento da cultura 3D no laboratório. Aos professores Julio Beltrame e Kim Inada pelo suporte e pela disponibilidade de sempre em conversar sobre os experimentos e pensar em estratégias.

Também quero agradecer muito aos nossos vizinhos e parceiros do INCA. No DPq à Prof^a. Etel Gimba e à aluna de doutorado Mariana Concentino por todo o apoio com os experimentos com os animais e no DIPAT a toda equipe de análise, em especial à Nina e à Patrícia pela agilidade com que nos ajudaram (e ajudam ainda) com a tarefa nada fácil que é emblocar e cortar esses esferoides.

Tem mais uma pessoa chave nesse processo todo, a Prof^a. Giselle Lopes. Eu que estou sempre pedindo alguma coisa, fui atendida tão gentilmente por ela quando procurava APH para um ensaio que eu ainda nem fazia ideia de como fazer. O ensaio não deu muito certo, mas isso não importa porque o meu maior achado foi ela. A Prof^a. Giselle Lopes se tornou a minha referência no trabalho com esferoides, uma área que eu não dominava muito bem. O tanto que ela me ajudou não cabe aqui: de mensagens de apoio, suporte com experimentos, ideias novas, motivação e presença também, mesmo estando a alguns quilômetros de distância. A Gi saiu de Arraial do Cabo no furacão da pandemia para me ensinar o tal do *Molde Array*. Ele é uma técnica chinesa milenar passada de geração em geração ... (mentira! Bom, é quase isso!). Gi, você sabe que eu te admito daqui até Arraial indo e voltando a pé, né? Obrigada!

Também quero agradecer à torcida que sempre esteve na minha arquibancada da vida. Aos meus amigos Diana, Iza, Sâmara, Juliano, Juliana Santana, Juliana Schuller, Carol, Chardson, Janaína, Fábio, Vera e Landi. À minha namorada, Babi, por ser abrigo nos dias em que tive certeza que não conseguiria.

Finalmente, agradeço antecipadamente a todos os membros que escolhemos com tanto carinho para compor a banca, na certeza que agregarão muito a esse trabalho.

A especialização é óbvia: continue em frente. A amplitude é mais difícil de cultivar.

David Epstein

RESUMO

SANTOS, Ronimara Aparecida. **Atividade Antitumoral do Extrato de Chá Verde (*Camellia sinensis*) em Células de Câncer de Mama Cultivadas em Modelo Tridimensional**. 2022. 83 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Apesar dos avanços na medicina diagnóstica e de tratamento, o câncer de mama segue líder das causas de morte em mais de 100 países, incluindo o Brasil. A redução do risco de câncer de mama por meio de uma dieta rica em alimentos *in natura* vem sendo referida, com destaque para o potencial quimiopreventivo das catequinas do chá verde. Entretanto, estudos conduzidos com esses compostos bioativos partem, em maioria, de formulações comerciais contendo catequinas isoladas, havendo o interesse pela investigação dos efeitos anticâncer a partir da matriz alimentar, que guarda vantagens em relação aos compostos isolados. Estudos na literatura mostraram que algumas proteínas de vias importantes ao controle tumoral como, por exemplo, o ciclo celular e migração são alvos das catequinas do chá verde, contudo, há uma lacuna na investigação de tais processos em modelos de cultura tridimensional (3D), que melhor mimetizam o tumor *in vivo*. Portanto, esse estudo teve como objetivo investigar a atividade antitumoral extrato de chá verde (ECV) sobre esferoides de células tumorais de mama MCF-7. Uma infusão de folhas de chá verde (1 g: 40 mL/ 80 °C: 5 min) foi obtida e liofilizada e o ECV foi caracterizado quanto às suas principais catequinas. Esferoides de MCF-7 (5×10^3 céls/mL) foram expostos ao ECV (162, 324, 648, 1296 e 2592 µg/mL) e as consequências sobre a formação, a morfologia, o tamanho, a viabilidade celular, a migração e a expressão da proteína p21 foram estudadas. Apesar da ação sutil sobre a viabilidade, o tratamento com ECV reduziu o tamanho dos esferoides e inibiu completamente a migração das células em 24h. Foi observado, ainda, aumento na expressão de p21, o que pode indicar uma relação com o controle do ciclo celular. Além disso, a formação dos esferoides na presença do ECV resultou em estruturas anômalas. Os dados mostraram ainda efeitos mais expressivos do ECV sobre a morfologia e o tamanho dos esferoides quando comparados a exposição à EGCG (7,8, 16,6, 31,2 e 62,5 µg/mL), demonstrando a vantagem da matriz alimentar. Não foram observados efeitos citotóxicos em esferoides não tumorais MCF-10A, confirmando a seletividade do ECV para a linhagem tumoral. Comparados a ensaios de viabilidade em cultura 2D, os dados mostram menor sensibilidade dos esferoides ao ECV, expondo assim a relevância do uso dessa cultura no estudo de compostos bioativos com fins terapêuticos. Ensaios preliminares *in vivo* sugeriram que o tratamento com o ECV promoveu atraso na formação de tumores de xenoinxertos de MCF-7 e outros ensaios devem ser conduzidos para confirmar esses achados.

Palavras-chave: Catequinas. Câncer de mama. Cultura 3D. Chá verde.

ABSTRACT

SANTOS, Ronimara Aparecida. **Antitumor Activity of Green Tea Extract (*Camellia sinensis*) in Breast Cancer Cells Cultivated in a Three-Dimensional Model**. 2022. 83 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Despite advances in diagnostic and treatment, breast cancer remains the leading cause of death in more than 100 countries, including Brazil. Reducing the risk of breast cancer through a diet rich in *in natura* foods has been reported, with emphasis on the chemopreventive potential of green tea catechins. However, studies conducted with these bioactive compounds are mostly based on commercial formulations containing isolated catechins, and there is an interest in investigating the anticancer effects from the food matrix, which has advantages over isolated compounds. Studies in the literature have shown that some proteins of important pathways for tumor control, such as cell cycle and migration, are targets of green tea catechins, however, there is a gap in the investigation of such processes in three-dimensional (3D) culture models, that best mimic the tumor *in vivo*. Therefore, this study aimed to investigate the antitumor activity of green tea extract (GTE) on MCF-7 breast tumor cell spheroids. An infusion of green tea leaves (1 g: 40 mL/ 80 °C: 5 min) was obtained and lyophilized and the GTE was characterized for its main catechins. MCF-7 spheroids (5×10^3 cells/mL) were exposed to GTE (162, 324, 648, 1296 and 2592 µg/mL) and the consequences on formation, morphology, size, cell viability, migration and p21 protein expression were studied. Despite the subtle action on viability, GTE treatment reduced the size of the spheroids and completely inhibited cell migration within 24 h. An increase in p21 expression was also observed, which may indicate a relationship with cell cycle control. Furthermore, the formation of spheroids in the presence of GTE resulted in anomalous structures. The data also showed more expressive effects of GTE on the morphology and size of the spheroids when compared to exposure to EGCG (7.8, 16.6, 31.2 and 62.5 µg/mL), demonstrating the advantage of the food matrix. No cytotoxic effects were observed on MCF-10A non-tumor spheroids, confirming the selectivity of GTE for the tumor lineage. Compared to viability assays in 2D culture, the data show lower sensitivity of spheroids to GTE, thus exposing the relevance of using this cell culture model in the study of bioactive compounds for therapeutic purposes. Preliminary *in vivo* studies suggested that GTE treatment promoted latency of MCF-7 xenografts and further trials should be conducted to confirm these findings.

Keywords: Catechins. Breast cancer. 3D Culture. Green tea.

RESUMEN

SANTOS, Ronimara Aparecida. **Actividad Antitumoral del Extracto de Té Verde (*Camellia sinensis*) en Células de Cáncer de Mama Cultivadas en un Modelo Tridimensional**. 2022. 83 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A pesar de los avances en la medicina de diagnóstico y tratamiento, el cáncer de mama sigue siendo la principal causa de muerte en más de 100 países, incluido Brasil. Se ha informado sobre la reducción del riesgo de cáncer de mama a través de una dieta rica en alimentos *in natura*, con énfasis en el potencial quimiopreventivo de las catequinas del té verde. Sin embargo, los estudios realizados con estos compuestos bioactivos se basan principalmente en formulaciones comerciales que contienen catequinas aisladas, y existe interés en investigar los efectos anticancerígenos de la matriz alimentaria, que tiene ventajas sobre los compuestos aislados. Los estudios en la literatura han demostrado que algunas proteínas de vías importantes para el control de tumores, como el ciclo celular y la migración, son objetivos de las catequinas del té verde, sin embargo, existe una brecha en la investigación de tales procesos en cultivos tridimensionales (3D). modelos, que mejor imitan el tumor *in vivo*. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo investigar la actividad antitumoral del extracto de té verde (ETV) en esferoides de células tumorales de mama MCF-7. Se obtuvo una infusión de hojas de té verde (1 g: 40 mL/ 80 °C: 5 min) y se liofilizó y se caracterizó la ETV por sus principales catequinas. Se expusieron esferoides MCF-7 (5×10^3 células/mL) a ETV (162, 324, 648, 1296 y 2592 µg/mL) y se estudiaron las consecuencias sobre la formación, morfología, tamaño, viabilidad celular, migración y expresión de la proteína p21. A pesar de la sutil acción sobre la viabilidad, el tratamiento con ETV redujo el tamaño de los esferoides e inhibió por completo la migración celular en 24 horas. También se observó un aumento en la expresión de p21, lo que puede indicar una relación con el control del ciclo celular. Además, la formación de esferoides en presencia de ETV resultó en estructuras anómalas. Los datos también mostraron efectos más expresivos de ETV en la morfología y el tamaño de los esferoides en comparación con la exposición a EGCG (7,8, 16,6, 31,2 y 62,5 µg/ml), lo que demuestra la ventaja de la matriz alimentaria. No se observaron efectos citotóxicos en esferoides no tumorales MCF-10A, lo que confirma la selectividad de ETV para el linaje tumoral. En comparación con los ensayos de viabilidad en cultivo 2D, los datos muestran una menor sensibilidad de los esferoides a ETV, lo que expone la relevancia del uso de este cultivo en el estudio de compuestos bioactivos con fines terapéuticos. Los ensayos preliminares *in vivo* sugirieron que el tratamiento con ETV promovió la latencia de los xenoinjertos de MCF-7 y se deben realizar más ensayos para confirmar estos hallazgos.

Palabras clave: Catequinas. Cáncer de mama. Cultura 3D. Té verde.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais tipos de câncer incidente em mulheres por países do mundo.	18
Figura 2 -	Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020-2022 por sexo no Brasil.	19
Figura 3 -	As principais características adquiridas pelas células tumorais.	20
Figura 4 -	Os tipos de câncer com maior mortalidade em mulheres por países do mundo.....	22
Figura 5 -	Principais catequinas do chá verde.....	25
Figura 6 -	Efeitos celulares das catequinas do chá verde na carcinogênese.	28
Figura 7 -	Representação esquemática da cultura tridimensional.....	34
Figura 8 -	Esquema de inclusão de esferoides em agarose.	42
Figura 9 -	Desenho experimental	44
Figura 10 -	Morfologia da célula MCF-7 em cultura 2D e 3D.	46
Figura 11 -	Perfil de crescimento dos esferoides de MCF-7.....	47
Figura 12 -	Cinética de crescimento dos esferoides da linhagem MCF-7.	48
Figura 13 -	Expressão de Ki-67 nos esferoides de MCF-7 com 4 dias de cultivo.....	49
Figura 14 -	Aspecto do extrato seco obtido.	50
Figura 15 -	Efeitos do ECV sobre a morfologia dos esferoides.....	52
Figura 16 -	Efeito do ECV na morfologia dos esferoides de MCF-7.	53
Figura 17 -	Área dos esferoides tratados com diferentes concentrações de ECV.....	54
Figura 18 -	Viabilidade celular dos esferoides expostos ao ECV.....	54
Figura 19 -	Efeitos do ECV sobre a migração das células dos esferoides.	56
Figura 20 -	Expressão de p21 nos esferoides de MCF-7 após 24h de exposição ao ECV.....	58
Figura 21 -	Expressão de p21 nos esferoides de MCF-7 após 48h de exposição ao ECV.....	59
Figura 22-	Cinética de crescimento dos esferoides em meio enriquecido com ECV.....	61
Figura 23 -	Efeitos do EGCG nos esferoides de MCF-7.	62
Figura 24 -	Área dos esferoides tratados com diferentes concentrações de EGCG.....	63
Figura 25 -	Viabilidade celular dos esferoides expostos ao ECV.....	63
Figura 26 -	Morfologia da linhagem celular MCF-10A em cultura 2D e 3D.....	64
Figura 27 -	Efeitos do ECV sobre a morfologia dos esferoides não tumorais.....	65
Figura 28 -	Efeitos do ECV sobre o crescimento e viabilidade dos esferoides não tumorais.....	65
Figura 29 -	Crescimento dos xenoinxertos de MDA-MB-231.....	67
Figura 30 -	Desenvolvimento dos xenoinxertos de MCF-7.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do chá verde.....	26
Tabela 2 - Composição química do ECV.....	51
Tabela 3 - Volume dos tumores de xenoenxerto de MCF-7	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bax	Proteína Bax (do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl2	Proteína Bcl-2 (do inglês <i>B-cell lymphoma-2</i>)
BRCA1	Gene BRCA1 (do inglês <i>Breast Cancer 1</i>)
BRCA2	Gene BRCA 2 (do inglês <i>Breast Cancer 2</i>)
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
CDK	Quinases dependentes de ciclina (do inglês <i>Cyclin-dependent kinases</i>)
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DMBA	7,12- dimetilbenzantraceno
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EC	Epicatequina
ECG	Galato de epicatequina
ECV	Extrato de chá verde
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Galato de 3-epigallocatequina
ER	Receptor de Estrogênio (do inglês <i>Estrogen Receptor</i>)
G1	Fase 1 do ciclo celular (do inglês <i>Gap 1</i>)
GTP	Polifenóis do Chá Verde (do inglês <i>Green tea powder</i> – produto comercial)
HER2	Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
M4	(-)-5-(3',4',5'-trihidroxifenil)- γ -valerolactona
M6	(-)-5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona
M6'	(-)-5-(3',5'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona
MEGS	Suplemento para Crescimento de Células Epiteliais (do inglês <i>Mammary Epithelial Growth Supplement</i>)
MMP	Metaloproteinases
p21	Proteína p21
p53	Proteína supressora de tumores p53
PBS	Tampão Fosfato-Salino (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
RE	Receptor de Estrogênio (do inglês, <i>Estrogen Receptor</i>)

RP	Receptor de Progesterona (do inglês, <i>Prosgesterone Receptor</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
TIMP-3	Inibidor de metaloproteinase-3 (do inglês <i>TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3</i>)
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Fator</i>)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1	Câncer de mama: aspectos epidemiológicos, etiologia e tratamento	18
1.2	A dieta como estratégia para a prevenção do câncer: o papel do chá verde e seus compostos bioativos	23
1.3	O papel dos compostos bioativos do chá verde no câncer de mama	28
1.4	O papel da matriz alimentar na atividade biológica dos compostos bioativos	31
1.5	Cultura tridimensional de células como modelo para o estudo do câncer de mama.....	33
2	JUSTIFICATIVA	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Reagentes.....	38
4.2	Obtenção do extrato de chá verde.....	38
4.3	Caracterização das catequinas do ECV.....	39
4.4	Cultura de células	39
4.5	Cultura tridimensional de células	39
4.6	Curvas de crescimento dos esferoides.....	40
4.7	Tratamento dos esferoides com o ECV ou EGCG	40
4.8	Ensaio de viabilidade celular	40
4.9	Ensaio de migração celular	41
4.10	Inclusão dos esferoides em agarose e parafina.....	41
4.11	Hematoxilina-eosina	42
4.12	Investigação de proteínas de interesse	43
4.12.1	<u>Imunofluorescência</u>.....	43
4.12.2	<u>Imunohistoquímica</u>	43
4.13	Investigação dos efeitos do ECV <i>in vivo</i>.....	44
4.14	Análise estatística.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

5.1	PARTE I: Atividade antitumoral do ECV em cultura tridimensional de câncer de mama	46
5.1.1	<u>Estabelecimento e caracterização da cultura tridimensional de câncer de mama....</u>	46
5.1.2	<u>Seleção, obtenção e caracterização do ECV.....</u>	49
5.1.3	<u>O ECV promove mudanças na morfologia e padrão de crescimento dos esferoides</u>	51
5.1.4	<u>São necessárias concentrações maiores de ECV para redução na viabilidade dos esferoides.....</u>	54
5.1.5	<u>O ECV inibe a migração das células tumorais em ambiente 3D.....</u>	55
5.1.6	<u>O ECV modula a expressão da proteína p21</u>	58
5.1.7	<u>A formação dos esferoides é prejudicada pelo tratamento com ECV</u>	60
5.1.8	<u>O tratamento com EGCG não promove os mesmos efeitos do ECV</u>	62
5.1.9	<u>Estabelecimento e caracterização da cultura 3D de MCF-10A</u>	64
5.1.10	<u>O ECV não tem efeitos citotóxicos em esferoides de células não tumorais.....</u>	65
5.2	PARTE II – Investigação do efeito quimiopreventivo do ECV <i>in vivo</i>.....	66
5.2.1	<u>Estabelecimento dos xenoenxertos de células de câncer de mama em modelo animal</u>	66
5.2.2	<u>O ECV parece atrasar o aparecimento dos tumores <i>in vivo</i>.....</u>	69
	CONCLUSÕES.....	70
	PERSPECTIVAS	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	ANEXO A - Parecer de avaliação do projeto submetido ao CEUA-INCA	80
	ANEXO B - Resumo dos principais achados e contribuições da pesquisa para divulgação nos meios de comunicação.....	82

INTRODUÇÃO

O câncer é uma Doença Crônica Não Transmissível (DCNT) em ascensão na sociedade moderna. Na saúde da mulher, o câncer de mama tem especial impacto: a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, em seu estudo epidemiológico mais recente, destacou o câncer de mama à frente de todos os outros tipos de câncer no mundo com 2.3 milhões de novos casos em 2020 (SUNG et al., 2021). No Brasil, a última estimativa divulgada pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) previu 66.280 novos casos de câncer de mama por ano até 2022 (BRASIL, 2019). Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, o câncer de mama foi responsável por 1 em cada 6 mortes por câncer em mulheres em 2020, quando ocupava o primeiro lugar em mortalidade em 110 países do globo, incluindo o Brasil (SUNG et al., 2021).

A busca por meios terapêuticos para controle e prevenção da doença encontra expectativas no potencial quimiopreventivo de alimentos *in natura* de origem vegetal (SHIRAKAMI; SHIMIZU, 2018). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer Americano, são considerados quimioprotetores os agentes empregados para reduzir o risco de câncer ou ainda para postergar/atrasar o desenvolvimento ou recorrência dos tumores (NCI, 2022). O efeito quimioprotetor dos alimentos tem sido atribuído a compostos bioativos naturalmente presentes na matriz alimentar, como os compostos fenólicos, que têm capacidade moduladora sobre vários processos biológicos (KOTECHEA; TAKAMI; ESPINOZA, 2016).

O chá verde (*Camellia sinensis*) é um alimento rico em compostos fenólicos, com predomínio das seguintes catequinas: epicatequina (EC), galato de epicatequina (ECG), epigallocatequina (EGC) e galato de 3-epigallocatequina (EGCG) (GRAHAM, 1992). Esses compostos têm capacidade de bloqueio e/ou supressão dos processos de proliferação e morte celular que são vias importantes à contenção do desenvolvimento tumoral (SHIRAKAMI; SHIMIZU, 2018).

Hipotetiza-se que esses mecanismos podem estar atrelados à modulação de proteínas envolvidas no crescimento celular, apoptose, sinalização proliferativa, senescência, estabilidade genética, inflamação, angiogênese, entre outros (HUANG et al., 2017; ZENG; HOLLY; PERKS, 2014). No entanto, são necessários estudos que priorizem a investigação do efeito quimiopreventivo de catequinas e outros compostos fenólicos a partir de matrizes alimentares, uma vez evidenciadas as vantagens na bioacessibilidade e biodisponibilidade de tais compostos quando presentes em um meio que promove múltiplas interações entre

nutrientes e outros constituintes (ARFAOUI, 2021; OLIVEIRA; AMARO; PINTADO, 2018).

Um estudo anterior do nosso grupo investigou os efeitos do extrato de chá verde (ECV) sobre células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) cultivadas em monocamada e nossos achados evidenciaram o potencial do ECV na redução da migração e viabilidade em ambas as linhagens. Além disso, o ECV aumentou os níveis de p53 nas células MCF-7, que expressam a proteína na forma selvagem. Um efeito oposto foi observado para a linhagem MDA-MB-231, na qual os achados sugerem uma redução nos níveis da p53 mutante (SANTOS et al., 2021). Todavia, a investigação dos mecanismos envolvidos nos processos mediados pelo ECV demanda mais estudos em modelos que melhor mimetizem o a arquitetura tumoral, como é o caso do cultivo tridimensional de células (cultura 3D).

As vantagens da investigação do efeito de compostos com potencial quimiopreventivo em modelo 3D é que essa cultura contempla: (i) a formação de gradientes de oxigênio e nutrientes, (ii) o aumento das interações célula-célula na arquitetura 3D, (iii) a exposição não uniforme do composto às células do esferoide, (iv) a sinalização via matriz extracelular, e (v) a presença de camadas de células com diferente perfil proliferativo (LOVITT; SHELPER; AVERY, 2014). Todas essas características do esferoide ajudam a explicar achados divergentes na literatura ao investigar efeitos de um mesmo composto a partir de ensaios em culturas 2D e 3D. Por esse motivo, tivemos interesse em investigar os efeitos do ECV em modelo de cultura tridimensional (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2016; IMAMURA et al., 2015).

Além disso, precisamos considerar que a absorção de compostos bioativos depende da biotransformação realizada pelas bactérias da microbiota intestinal (GUO et al., 2019; YONG FENG, 2006a). Há registros de mais de 31 metabólitos das catequinas do CV, em especial os derivados do EGCG (M4, M6 e M6') descritos para humanos, ratos e camundongos (MENG et al., 2002; YONG FENG, 2006a). Desta forma, o melhor entendimento dos efeitos do ECV a partir de seus metabólitos exige modelos experimentais que contemplem essa etapa e, nesse sentido, ensaios em modelo animal podem complementar os achados *in vitro*.

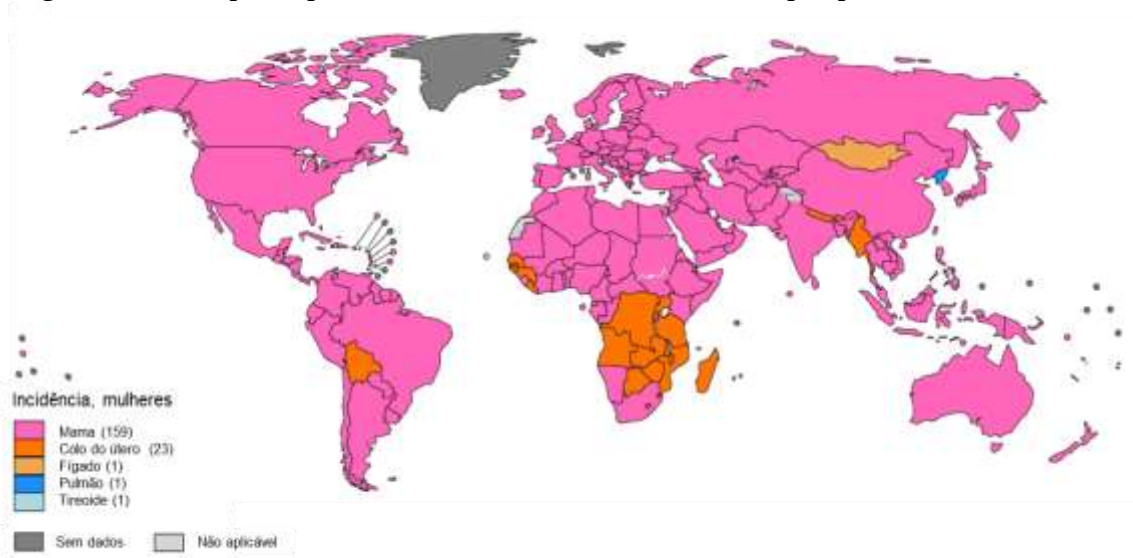
1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Câncer de mama: aspectos epidemiológicos, etiologia e tratamento

O câncer é uma DCNT que acumula casos ano a ano. Os estudos epidemiológicos mais recentes da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) (2021) ranquearam a incidência do câncer de mama à frente de todos os outros tipos de câncer no mundo em 2020, uma fatia de 11.7%, responsável por 2.3 milhões de novos casos. As razões para explicar esse fenômeno são complexas, contudo, ressaltam-se as mudanças no estilo de vida e na alimentação, potencializadas pelo aumento da expectativa de vida e crescimento populacional, além dos avanços na medicina diagnóstica (SUNG et al., 2021).

No público feminino, há uma dimensão ainda maior do impacto da doença: nessa população, o câncer de mama é o responsável por 1 em cada 4 novos casos de câncer, ocupando o primeiro lugar em incidência em 159 de 185 países no mundo (**Figura 1**) (SUNG et al., 2021).

Figura 1 – Principais tipos de câncer incidente em mulheres por países do mundo.



Legenda: Na população feminina, o câncer de mama é o mais frequente em termos de novos casos em 159 países no mundo, seguido pelo câncer de colo do útero, fígado, pulmão e tireoide. Adaptado de GLOBOCAN, 2021.

As taxas de incidência de câncer de mama aumentaram rapidamente em países da América do Sul, África e Ásia, bem como em países asiáticos de alta renda (Japão e República da Coreia), onde as taxas são historicamente baixas, devido, principalmente à mudanças socioculturais e de estilo de vida nessas populações (SUNG et al., 2021).

Nosso país acompanha as tendências mundiais e aqui, o câncer de mama ocupa o primeiro lugar no ranking de incidência na população feminina. Corroborando com as estatísticas da IARC, no triênio 2020-2022, são esperados 66.280 novos casos de câncer de mama em cada ano, segundo o levantamento epidemiológico divulgado pelo INCA. Desde a última estimativa, o número de novos casos aumentou 11%, o equivalente a mais 6.580 novos diagnósticos por ano em relação ao biênio 2018-2019 (**Figura 2**) (BRASIL, 2019).

Figura 2 - Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020-2022 por sexo no Brasil.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Legenda: O câncer de mama feminino responde por 29,7% dos novos casos de câncer no país em mulheres. Extraído de INCA, 2020.

Em face da pandemia do Sars-Cov-2, as Sociedades Brasileiras de Patologia e de Cirurgia Oncológica estimaram que pelo menos 50 mil brasileiros deixaram de ser diagnosticados com câncer, e outros, já com o tumor detectado, tiveram os tratamentos suspensos. Estima-se também que a COVID-19 promova um impacto nas estatísticas de novos casos de câncer em função da subnotificação (INSTITUTO ONCOGUIA, 2020).

A preocupação com as estatísticas atuais está refletida em estratégias de políticas públicas na Agenda de 2030 para o Desenvolvimento Sustentável da organização Mundial da Saúde, que inclui como objetivo específico a redução da mortalidade prematura por DCNTs em um terço até 2030 (JOHNSTON, 2016). No Brasil, essa demanda também está documentada no Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento de DCNTs de 2021-2030 que tem como uma das metas a redução da mortalidade prematura (30 a 69 anos) por câncer de mama em 10% (BRASIL, 2021).

O câncer é descrito como conjunto de mais de 100 doenças que compartilham duas características essenciais: a instabilidade genética e proliferação celular desordenada, podendo ainda, apresentar potencial de invasão para outros tecidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Recentemente, com a evolução da pesquisa na área, entendeu-se que a complexidade do processo da carcinogênese não pode ser explicada unicamente pelas características

supracitadas e que os tumores são mais do que massas insulares de células cancerígenas em proliferação.

Nesse cenário, o trabalho de Hanahan & Weinberg (2011) consolidou as principais capacidades biológicas adquiridas pelas células durante o desenvolvimento de tumores, sendo elas a sustentação da sinalização de proliferação, a resistência à morte celular, a evasão de supressores de crescimento, a aquisição de imortalidade replicativa, a indução de angiogênese, a ativação de invasão e metástase, instabilidade genética e mutação, a promoção de inflamação, a reprogramação do metabolismo energético e por fim, a evasão do sistema imune (**Figura 3**).

Figura 3 - As principais características adquiridas pelas células tumorais.



Legenda: Muitos fatores contribuem para a manutenção do microambiente e sobrevivência da célula tumoral. Os mecanismos mais estudados e consolidados atualmente permeiam as características descritas na figura. Adaptado de Hanahan, 2011.

Neste ano, Hanahan incorporou quatro novos marcadores ao processo tumorigênico: (1) o desbloqueio da plasticidade fenotípica, (2) a reprogramação genética não mutacional, (3) os microbiomas polimórficos e (4) as células senescentes (HANAHAN, 2022).

A etiologia do câncer de mama está bem descrita e contempla fatores biológicos, endócrinos, a história de vida reprodutiva e de estilo de vida. Já está claro que fatores como história familiar de câncer de mama, história pessoal de doença proliferativa benigna da mama, identificação de mamas densas à mamografia, exposição à radiação, consumo de álcool, sedentarismo, excesso de peso ou obesidade pós-menopausa, uso de terapia hormonal, menarca precoce, idade avançada na menopausa e primeiro parto, uso de contraceptivos orais e nuliparidade estão associados ao aumento do risco geral de câncer de mama (BERNARD; CHRISTOPHER, 2020). Em parte, os fatores reprodutivos e hormonais explicam as altas

taxas de incidência vistas mesmo em países com alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) (SUNG et al., 2021). O envelhecimento também se consolidou como um fator de risco importante à luz do aumento nas taxas de incidência após os 50 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em contrapartida, são também os fatores reprodutivos as condições conhecidas de proteção contra a doença, incluindo a idade avançada para a menarca, a menopausa precoce, o maior número de gestações, a idade precoce da gestação do primeiro filho e a amamentação (BERNARD; CHRISTOPHER, 2020).

Ainda que causas genéticas sejam consideradas, especialmente para mutações em genes críticos para o reparo do DNA (*BRCA1/2*), apenas 5-10% dos casos de câncer de mama tem nessa condição sua causa fundamental. Uma prevalência excepcionalmente alta de mutações desses genes é encontrada entre mulheres de herança judaica Ashkenazi (1%-2,5%), e explica, em parte, a alta incidência em Israel e em certas subpopulações europeias (SUNG et al., 2021).

A patologia do câncer de mama revela uma doença heterogênea tanto no aspecto histológico e molecular, quanto do ponto de vista clínico. Publicações da Organização Mundial da Saúde têm catalogadas mais de 20 subtipos da doença (BERNARD W. STEWART; WILD, 2014).

O diagnóstico e estadiamento precedem de avaliação do histórico clínico, exame físico, mamografia diagnóstica bilateral e/ou ressonância magnética e biópsia para determinação do padrão molecular do tumor. Em função do tipo de achado, outros exames complementares, como determinação da expressão do marcador de proliferação celular Ki-67, testes genéticos e PET-SCAN também podem ser recomendados (MACDONALD; ONCOLOGY; GENERAL, 2022).

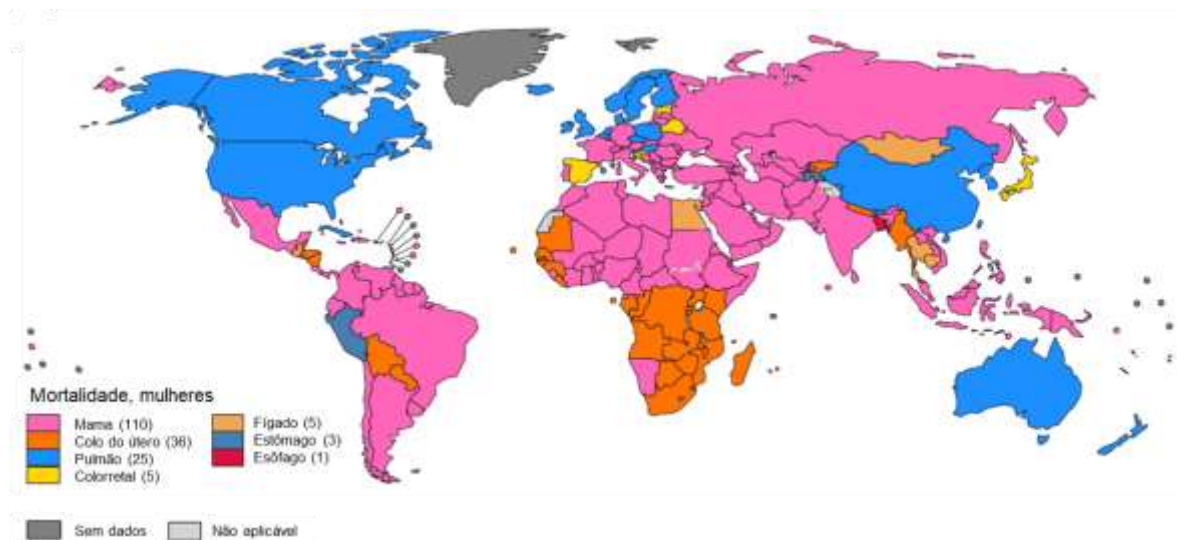
A avaliação do padrão molecular do tumor por meio da identificação da expressão dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) tem sido utilizada para prever a sobrevida e a tomada de decisão quanto ao tratamento clínico (BERNARD; CHRISTOPHER, 2020; MACDONALD; ONCOLOGY; GENERAL, 2022). Os tumores RE e/ou RP positivos e HER2 negativos são considerados os de melhor prognóstico e são os mais frequentemente encontrados na clínica. Novos estudos epidemiológicos apontam para um aumento da incidência de tumores RE positivos, provavelmente em função da epidemia da obesidade, dada a associação mais forte e consistente de excesso de peso corporal com esse tipo de câncer (SUNG et al., 2021). Os subtipos HER2 positivos, independente da expressão de RE e RP têm um prognóstico intermediário. Finalmente, os subtipos que têm RE, RP e HER2 negativos, conhecidos como

triplo-negativos, são considerados, até o momento, de pior prognóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A definição da estratégia de tratamento é tão complexa quanto a doença e é finalmente acertada pela equipe médica em função dos achados clínicos, moleculares e de estadiamento do paciente, como pode ser visto nas Diretrizes de Prática Clínica da *National Comprehensive Cancer Network* em Oncologia. De maneira resumida, elas abrangem um coquetel personalizado de drogas para quimioterapia, das quais podemos citar a doxorubicina e o tamoxifeno, por exemplo, hormonioterapia e/ou terapia-alvo molecular, cirurgia (mastectomia parcial ou total com possível abordagem em linfonodos sentinelas e axilares) e radioterapia (MACDONALD; ONCOLOGY; GENERAL, 2022).

Apesar dos avanços na medicina na área de diagnóstico e tratamento, a doença ainda é responsável por um número importante de mortes. Os dados de mortalidade em ambos os sexos destacam o câncer de mama como a quinta causa de mortes em escala mundial, atrás do câncer de pulmão, cólon, fígado e estômago, com 685.000 mortes em 2020. Entre mulheres, o câncer de mama é o responsável por 1 em cada 6 mortes por câncer e ocupa o primeiro lugar em mortalidade em 110 países do globo, incluindo o Brasil (**Figura 4**) (SUNG et al., 2021).

Figura 4 – Os tipos de câncer com maior mortalidade em mulheres por países do mundo



Legenda: Em mulheres, as principais causas de morte por câncer no mundo são o câncer de mama e o de colo do útero, seguidos pelo câncer de pulmão. Adaptado de GLOBOCAN, 2021.

Múltiplas evidências apontam que a prevenção é um caminho a ser explorado. Achados na literatura indicam que um terço a dois quintos dos casos de câncer poderiam ser evitados por mudanças no estilo de vida e redução da exposição aos fatores de risco (ROCK et al., 2020), e uma das ferramentas chave para a prevenção do câncer é a alimentação adequada.

1.2 A dieta como estratégia para a prevenção do câncer: o papel do chá verde e seus compostos bioativos

A dieta vem se consolidando como fundamental na etiologia e manejo do câncer. Estudos populacionais indicam que o consumo de pelo menos cinco porções diárias de frutas e hortaliças reduziria pela metade o risco de desenvolvimento da doença (BOIVIN et al., 2009). A importância da alimentação adequada é reforçada em muitos manuais como a Diretriz para Dieta e Atividade Física para Prevenção do Câncer da Sociedade Americana do Câncer e o Guia Alimentar para a População Brasileira, do Ministério da Saúde. Em ambos, a adoção de uma alimentação que inclua frutas, vegetais, grãos integrais e fibras, em detrimento das carnes processadas, bebidas açucaradas, álcool e alimentos ultraprocessados, está recomendada (BRASIL, 2014; ROCK et al., 2020).

A dieta saudável parece exercer um papel importante no câncer de mama. Shaiikh e colaboradores (2019) propuseram-se a revisar 147 artigos da literatura para investigar a associação da dieta mediterrânea no risco e progressão da doença. A alimentação mediterrânea é caracterizada pelo consumo de alimentos frescos e naturais como azeite, frutas, legumes, cereais, leite e queijo e segundo os autores, esse padrão alimentar pode ser benéfico tanto para a saúde em geral, quanto para proteção contra o risco e a recorrência do câncer de mama. Esse efeito foi atribuído a compostos presentes nessa dieta, com impacto positivo em biomarcadores inflamatórios, mecanismos de reparo e proteção do DNA e controle do estresse oxidativo. Dentre esses compostos, estão ácidos graxos, zinco, selênio e polifenóis como catequinas, resveratrol, compostos organosulfurados, quercetina, kaempferol e apigenina (SHAIKH; BRAAKHUIS; BISHOP, 2019).

O Instituto Nacional do Câncer Americano (NCI) já identificou mais de mil compostos bioativos em alimentos e estima que pode haver pelo menos uma centena de compostos diferentes com capacidade protetora em apenas uma porção de vegetais (BERNARD W. STEWART; WILD, 2014).

Os compostos fenólicos, por exemplo, integram uma classe de mais de 8.000 metabólitos secundários presentes em alimentos de origem vegetal como frutas, vegetais, pimentas, café, chá, chocolate e vinho (KOCH, 2019). A ocorrência dos compostos fenólicos em alimentos pode ser consultada *online* na base de dados *Phenol Explorer* e no banco de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (NEVEU et al., 2010). Harborne (1991) classificou esses compostos de acordo com sua estrutura química em dois grandes grupos: os flavonoides - grupo mais representativo e que responde por 60% da classe (no qual incluem-se flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas, catequinas,

entre outros) e os não flavonoides (ácidos fenólicos, taninos, curcumina, estilbenos, gingerol, entre outros) (HARBORNE, 1991).

Recentemente, uma nova classificação foi proposta na tentativa de incluir compostos recém-descobertos que não correspondiam aos critérios pré-existentes, com a pretensão de hierarquizá-los em seis novas classes. As cinco primeiras são caracterizadas pela complexidade da estrutura molecular em função do número de anéis benzeno e do número de carbonos associados a ele, e a sexta classe contempla os chamados fenólicos híbridos e inclui compostos fenólicos com base estrutural distinta dos outros grupos (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2019).

A esses compostos já foram atribuídos efeitos antioxidantes, antitumorais, antibacterianos, cardioprotetores, anti-inflamatórios, moduladores do sistema imunológico, protetores da pele contra a radiação UV, entre outros (TUNG MUNNITHUM et al., 2018). Dentre os alimentos fonte de compostos bioativos, o chá verde tem despertado interesse de grupos de pesquisa (LUO et al., 2021; SAFARI et al., 2021; SANTOS et al., 2021).

Os chás são as bebidas mais largamente consumidas no mundo, em proporções menores apenas que a água e, dentre todos, os chás obtidos da *Camellia sinensis* têm destaque nas esferas econômica e medicinal. A *Camellia sinensis* é uma planta que teve origem no sudoeste da China e está presente na cultura oriental há cerca de 3.000-5.000 anos. Atualmente é cultivada para fins comerciais no mundo todo, mas alguns países detêm uma fatia maior da produção como a China (40%), a Índia (21%), o Quênia (7%) e o Sri Lanka (6%) (ZHANG et al., 2019). No Brasil, a produção encontra-se em São Paulo e no Paraná, em localidades situadas em regiões serranas do litoral, com altitude aproximada de 700m do nível do mar, onde o clima é similar ao do Japão e características do solo, pluviosidade e temperatura favorecem o cultivo da planta (YAMAMOTOYAMA, 2022).

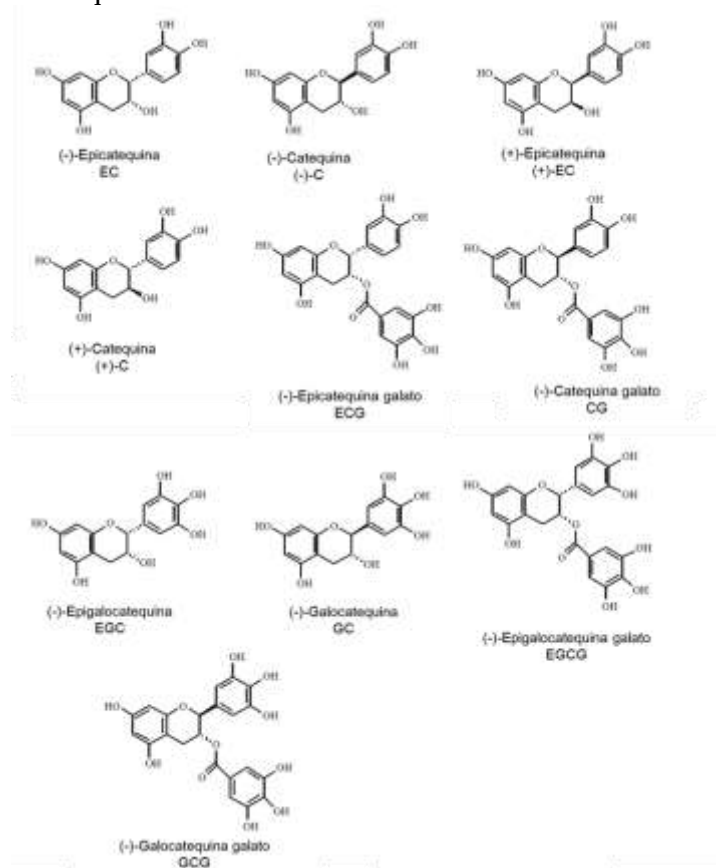
O mercado mundial de chás está avaliado em 15 bilhões de dólares (KUMARI et al., 2021). Apesar da sua popularidade centenária na Ásia, a bebida é hoje consumida mundialmente em mais de 160 países (CHENG, 2019; NISHIYAMA et al., 2010). O mundo consumiu 2,9 milhões de toneladas de chá em 2016 e a expectativa para 2021 era de 3,3 milhões de toneladas (BALAPPANAVAR, 2019).

O beneficiamento da *Camellia sinensis* dá origem a uma grande variedade de chás como, por exemplo, chá verde, chá branco, chá amarelo, oolong e chá preto. Resumidamente, os principais passos do processamento podem incluir secagem natural ou artificial, desidratação, enrolamento das folhas, fixação, fermentação e torra. Na China, a proporção entre os principais tipos de chás produzidos em 2017 para chá verde, preto, oolong, branco e amarelo foi de, respectivamente, 67,3%, 20,7%, 10,9%, 1,0% e 0,2%. Como visto, o chá verde tem predominância na produção (ZHANG et al., 2019).

Para a produção do chá verde, as folhas recém-colhidas são submetidas a uma etapa de fixação em calor, que pode ser realizada por cozimento a vapor, direto ao fogo em toneis de metal ou ao forno. As folhas precisam ser submetidas ao calor antes do início do processo natural de oxidação pós-colheita, a fim de inativar enzimas oxidantes, processo que conserva tanto a cor da clorofila, como também os componentes ativos contidos no chá. Após a fixação, as folhas podem ser enroladas sobre si mesmas e, por fim, secas (ZHANG et al., 2019).

A composição química das folhas de chá verde sofre influência de fatores geográficos e de condições climáticas de cultivo e o interesse por sua caracterização é visto desde o começo do século 20 (BRADFIELD; BATE-SMITH, 1950; BRADFIELD, 1947). Em 1992, o livro publicado por Graham e colaboradores demonstrou a predominância dos compostos fenólicos na sua composição, com cerca de 30 a 42% do extrato seco da planta composto pelas catequinas. Dentre elas, a galato de 3-epigalocatequina (EGCG) consolidou-se como a catequina majoritária, representando aproximadamente 10% do peso seco das folhas (GRAHAM, 1992) (**Figura 5**).

Figura 5 - Principais catequinas do chá verde.



Legenda: O chá verde tem muitas isoformas de catequinas, sendo as mais prevalentes o galato de 3--epigalocatequina (EGCG), epigalocatequina (EGC) e epicatequina galato (ECG). Adaptado de Yong Feng (2006a).

Anos mais tarde, com o desenvolvimento de técnicas analíticas, novos compostos do chá verde puderam ser isolados e identificados e deram ênfase à complexidade e riqueza dessa matriz alimentar. Até mesmo flavonóis como kaempferol, quercetina e miricetina, apesar de não serem os principais compostos em chás com pouca fermentação, puderam ser identificados. Centenas de formas de compostos bioativos vêm sendo descritos nas variedades da *C. sinensis* e a **Tabela 1**, extraída da revisão de Zhang e colaboradores (2019), resume o perfil químico do chá verde com alguns dos principais compostos identificados até então.

Tabela 1 - Composição química do chá verde.

Composto químico	Concentração (mg/g)	Referência
Cafeína	34.86 ± 4.32	Yi et al., 2015
Teobromina	1.29 ± 0.60	Yi et al., 2015
Ácido Gálico	2.01 ± 0.92	Yi et al., 2015
Σ catequinas	105.85 ± 35.69	Wang et al., 2011
	112.72	Yi et al., 2015
Galato de 3-epigallocatequina (EGCG)	18.10	Lee & Ong, 2000
	54.06 ± 6.83	Yi et al., 2015
	50.29 ± 13.88	Wang et al., 2011
Epigallocatequina (EGC)	21.06–36.53	Lee & Ong, 2000
	13.44 ± 10.58	Wang et al., 2011
Epicatequina (EC)	4.90–7.27	Lee & Ong, 2000
	7.25 ± 2.26	Yi et al., 2015
Galato de epicatequina (ECG)	5.78 ± 4.18	Wang et al., 2011
	5.34–9.97	Lee & Ong, 2000
	17.10 • ± 3.34	Yi et al., 2015
Galato de galatocatequina (GCG)	12.67 • ± 15.14	Wang et al., 2011
	17.16 • ± 6.73	Wang et al., 2011
Galocatequina (GC)	9.44 ± 1.97	Yi et al., 2015
	4.02 ± 2.19	Yi et al., 2015
Catequina (C)	6.51 ± 4.47	Wang et al., 2011
	5.37 ± 1.73	Yi et al., 2015
Σ Teaflavinas	0.88–5.56	Lee & Ong, 2000
L-teanina*	0.91–1.57	Ning et al., 2016
Quercetina	1.79–4.05	Wang & Helliwell, 2001
Kaempferol	1.56–3.31	Wang & Helliwell, 2001
Miricetina	0.93–1.59	Wang & Helliwell, 2001

Legenda: *Todos os dados foram apresentados com unidade de mg/g, exceto a unidade de L-teanina, que está representada em % em peso. Adaptada de Zhang, 2019.

A base *Phenol Explorer* estima que uma xícara de chá verde (240 mL) ofereça, em média, 158 mg de catequinas totais e 65 mg de EGCG (ROTHWELL; KNAZE; ZAMORAS, 2017). No entanto, como o chá é preparado de forma diferente entre as culturas, variações nessa concentração são esperadas. No Japão e na China, por exemplo, é comum a infusão de 2-3 g do chá verde para cada 100-150 mL de água quente, em infusões que podem ser repetidas de 4 a 7 vezes. Já nas culturas ocidentais, o chá é consumido na forma de sachês

em infusões com maiores volumes de água, como já foi descrito entre os britânicos (3 g: 235 mL) e americanos (2,25 g: 180-240 mL) (PETERSON et al., 2004). A forma como o chá é preparado influencia não somente no sabor e na aceitação da bebida, como também na quantidade de compostos bioativos extraídos, uma vez que o tempo e a temperatura de extração têm potencial efeito na degradação dessas substâncias (BANCIROVA, 2010). Ensaios anteriores do nosso grupo mostraram que o binômio 80 °C/5min foi suficiente para a obtenção de uma infusão de chá verde rica em compostos fenólicos (SANTOS et al., 2021).

Após a ingestão, os compostos fenólicos do chá verde são rapidamente absorvidos na porção superior do intestino delgado (GAN et al., 2018). Já foi demonstrado que a biodisponibilidade das catequinas é inversamente proporcional à sua massa molecular. De fato, embora o conteúdo de EGCG (458 Da) presente no chá verde seja 60-80% maior do que as outras catequinas, seus níveis plasmáticos máximos detectados após o consumo de 200 mg de EGCG isolada são da ordem de 0,26 μ M. Em contrapartida, a partir da ingestão da mesma dose de catequinas menos abundantes e com menor peso molecular, puderam ser detectados maiores níveis plasmáticos para EGC (306 Da) e EC (290 Da): 0,48 e 0,19 μ M, respectivamente (MENG et al., 2002). O nível máximo das concentrações plasmáticas das catequinas parece ser atingido após 1-2,5h da sua ingestão, e em contrapartida à baixa biodisponibilidade, o EGCG apresenta uma vantagem em relação à sua meia-vida (~5h) quando comparada à EGC e EC (ambas ~3h) (LEE et al., 2002).

A biotransformação das catequinas acontece diretamente na fase II do metabolismo, uma vez que a estrutura dos compostos fenólicos fazem deles substratos desfavoráveis às enzimas do complexo do citocromo P450. Já foram identificadas versões metiladas, glucoronizadas e sulfatadas das catequinas no plasma, produtos das enzimas catecol-O-metiltransferase, UDP-glucuronotransferase e sulfotransferase, respectivamente (YANG et al., 2008). Esses metabólitos podem retornar ao trato gastrointestinal através da bile ou, uma vez ganhando a circulação sanguínea, atingir diferentes órgãos-alvo. [4-3H] EGCG pode ser detectado no cérebro, olho, timo, pulmão, coração, baço, fígado, pâncreas, rim, testículo, próstata e adrenal de ratos alimentados com essa catequina radioativa, porém a não preservação da radioatividade nos tecidos parece sugerir que os metabólitos não se acumulam no organismo (KOHRI et al., 2001). Finalmente, as catequinas podem ser secretadas na urina, ao passo que aquelas não absorvidas são eliminadas nas fezes (YONG FENG, 2006b).

Além da detecção das catequinas no plasma, já se sabe que a microbiota intestinal desempenha um importante papel para a biodisponibilidade desses compostos, principalmente para as catequinas de maior peso molecular, através da fermentação e produção dos metabólitos M4, M6 e M6' (GUO et al., 2019). Além disso, os compostos fenólicos

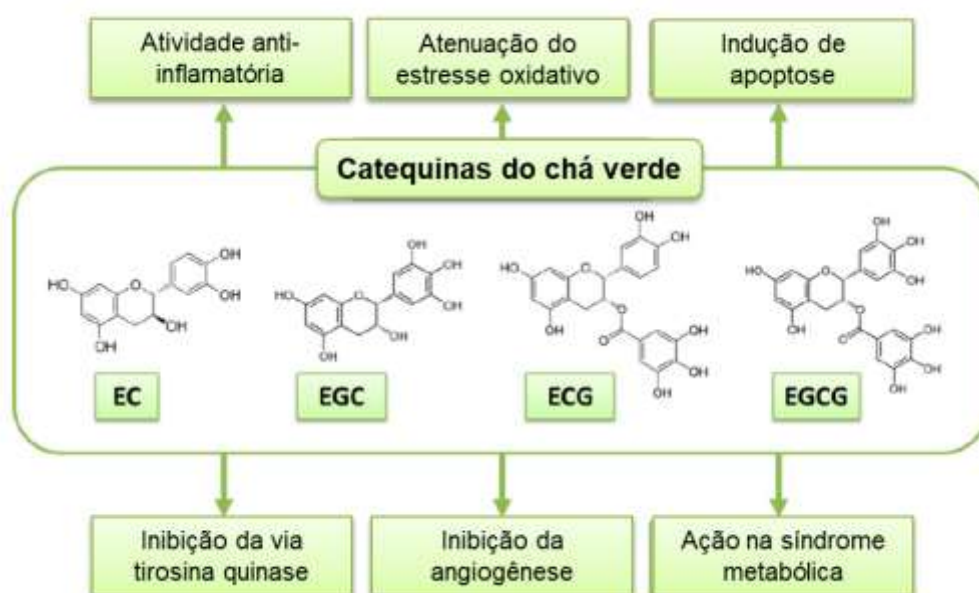
contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal por meio da estimulação do crescimento de bactérias benéficas e inibição de bactérias patogênicas, exercendo efeitos semelhantes aos prebióticos e modulando, assim, todo o ecossistema intestinal (CARDONA et al., 2013).

Uma vez entregues aos tecidos, essas substâncias podem exercer funções biológicas com potencial efeito benéfico para a saúde, o que fomenta o interesse e a busca por um meio terapêutico que envolva o chá verde. A literatura coleciona uma variedade artigos originais que emergem na tentativa de investigar e demonstrar os mecanismos pelos quais os compostos bioativos do chá verde impactam na fisiopatologia do câncer, em especial o câncer mama (MHATRE et al., 2021; SCHULZE et al., 2017).

1.3 O papel dos compostos bioativos do chá verde no câncer de mama

A comunidade científica se dedica a caracterizar os principais alvos biológicos do chá verde de forma a dar suporte ao seu uso como agente terapêutico no futuro (MOCANU et al., 2015). As atividades biológicas dos compostos fenólicos do chá verde, que exercem efeito sobre o câncer de mama, foram demonstradas em uma variedade de trabalhos na literatura, incluindo estudos *in vitro* e *in vivo* e parecem estar envolvidos na modulação de etapas importantes ao desenvolvimento, manutenção e progressão tumoral. Estão disponíveis ensaios com as catequinas isoladas, combinadas ou não, extratos do chá verde de origem comercial ou obtidos em laboratório e um apanhado das principais vias de modulação da carcinogênese desses compostos estão descritos na **Figura 6** (SHIRAKAMI; SHIMIZU, 2018).

Figura 6 - Efeitos celulares das catequinas do chá verde na carcinogênese.



Legenda: Possíveis mecanismos de ação do chá verde contra o câncer. Adaptado de Shirakami, 2018.

Um dos mecanismos de ação mais descritos dos compostos fenólicos do chá verde está relacionado à sua capacidade antioxidante, que protege o DNA de danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (SANDOVAL-ACUÑA; FERREIRA & SPEISKY, 2014). Para promover tal efeito, as catequinas aumentam a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, que eliminam os ROS diretamente e, ainda, previnem a formação de radicais livres de hidroxila (XIANG et al., 2016). Por outro lado, já foi descrito que o extrato alcoólico de polifenóis obtidos do chá verde foi capaz de aumentar a produção de ROS em células tumorais MCF-7, um mecanismo que pode estar associado à indução de apoptose (LI et al., 2016b).

As catequinas do chá verde estão envolvidas ainda em processos de diferenciação, parada do ciclo celular e apoptose. A exposição a 80 μ M de EGCG foi suficiente para reduzir a viabilidade de células tumorais de mama T47D, um processo que parece envolver tanto o aumento da expressão de genes pro-apoptóticos como p21, p53, caspase-3 e caspase-9, quanto a modulação da função mitocondrial que regula a morte celular vista pelo aumento da razão Bax/Bcl-2 (MORADZADEH et al., 2017). O EGCG isolado também foi capaz de induzir apoptose em células MCF-7 por um processo provavelmente mediado pela sinalização de p53/Bcl-2 (HUANG et al., 2017). Em nível molecular, a ativação da p53 é regulada por múltiplas ligações covalentes, como metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação. A estabilização da p53 por fosforilação é um alvo interessante para terapia anticâncer e diversas evidências mostraram que os compostos fenólicos podem exercer essa função. Foi demonstrado em células de câncer de próstata LNCaP que o tratamento com GTP (2,5-10 μ g/mL) e EGCG (5–20 μ M) ativam a p53 através da acetilação de resíduos de lisina (Lys373 e Lys382). Esse mecanismo foi associado à inibição dose-dependente de enzimas da família histona deacetilases da classe I. Esse fenômeno foi dependente da exposição constante ao chá verde, uma vez que a descontinuação do tratamento resultou na perda de acetilação da p53 em ambos os resíduos nessas células (THAKUR; GUPTA & GUPTA, 2012). Em células humanas de fibrossarcoma HT-1080, o EGCG (40 e 80 μ M) levou a apoptose mediada por indução de p53 e caspases 7 e 9, bem como pelo aumento da razão Bax/Bcl-2 e inibição do fator de transcrição NF- κ B (LEE et al., 2011). Em células de hepatocarcinoma HepG2 (p53 funcional), o EGCG (80 μ M) levou a parada do ciclo celular na fase G1, com aumento da expressão p21 (HUANG et al., 2009).

Outro desafio ao prognóstico e tratamento dos tumores envolve o processo metastático do câncer que engloba etapas como migração, adesão e invasão de células transformadas. O remodelamento da matriz extracelular influenciado pela expressão de

metaloproteinases (MMPs) é uma etapa crítica nesse processo e seu controle parece um alvo promissor. EGCG e GTP (do inglês *Green tea powder*) foram associados à indução do mRNA do inibidor de metaloproteinase-3 (TIMP-3) em células MCF-7 e MDA-MB-231. A indução epigenética de TIMP-3 pode ser um dos principais mecanismos pelos quais as catequinas do chá verde inibem a expressão de MMPs (DEB et al., 2015).

Os compostos fenólicos do chá verde interferem também na sinalização hormonal esteroide, uma etapa importante ao controle do tumor nas células positivas para os receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR) que têm neles, estímulo ao crescimento. Um grupo de pesquisadores associados a Damianaki (2000) descreveu a competição da catequina e epicatequina pelos sítios de ligação desses esteroides, o que pode explicar a inibição da proliferação celular nas duas linhagens de câncer de mama sensíveis a hormônios (MCF-7 e T47D).

Estratégias com vistas à redução da toxicidade e resistência a quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer de mama têm sido abordadas através do uso de compostos fenólicos do chá verde como adjuvante terapêutico. Já foi demonstrado que concentrações fisiológicas do EGCG (1 μ M) aumentam a expressão de ER α em células tumorais de mama MDA-MB-231, tornando-as mais sensíveis ao tamoxifeno (ZENG; HOLLY & PERKS, 2014). Dados como esse podem suportar, no futuro, a aplicação de doses menores de fármacos, contribuindo para o sucesso do tratamento com redução de efeitos adversos indesejáveis.

Em animais, a ação quimiopreventiva dos compostos fenólicos do chá verde também está descrita. Baliga e seu grupo (2005) mostraram um aumento na razão Bax/Bcl2, proteínas apoptóticas envolvidas na via mitocondrial, após o consumo de 0,2-0,5% de GTP por animais com câncer de mama (células 4T1). O EGCG também reduziu a angiogênese em modelo murino de camundongos C57BL/6J enxertados com células tumorais de mama E0771 através da diminuição da expressão do fator endotelial de crescimento vascular (VEGF) no tumor. A inibição da angiogênese nesse modelo pareceu específico uma vez que o EGCG não exerceu esses efeitos no tecido muscular ou cardíaco dos animais (GU et al., 2013).

Em humanos, ensaios clínicos foram conduzidos com o objetivo de confirmar os achados na pesquisa básica. Um estudo com 12 mulheres com biópsia positiva para câncer de mama elegíveis à mastectomia investigou os efeitos do consumo de 300 mg do ECV (13% de EGCG) em sachê. Após quatro semanas, uma correlação positiva entre o EGCG livre no plasma e a redução da expressão de Ki-67 foi notada (LAZZERONI et al., 2017). Li e colaboradores (2016) destacaram a necessidade de considerar a influência de fatores

individuais como o *status* menopausal na avaliação dos efeitos do chá verde. O consumo de chá parece estar associado à redução do risco de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa e aumento de risco na pós-menopausa. Esse achado parece estar relacionado ao tempo de início da exposição ao chá, sendo o risco menor em mulheres que iniciaram o consumo aos 20 anos e maior para aquelas que começaram após os 50 anos. Os autores hipotetizam que os efeitos já descritos para o chá verde na redução da proliferação celular podem ser importantes na juventude, quando as células epiteliais experimentam esse fenômeno de forma mais ativa. Samavat e seu grupo (2017) investigaram o efeito de 12 meses de suplementação diária com ECV em cápsula (800 mg de EGCG) em 1075 mulheres pós-menopausadas com alto risco para câncer de mama vista pela avaliação da heterogeneidade e densidade dos tecidos mamários. Após um ano de suplementação, não foi detectada diferença na densidade mamária do grupo de mulheres tratadas em relação ao placebo. Efeitos significativos só puderam ser vistos quando a amostra foi estratificada por idade, em mulheres consideradas jovens (50-55 anos).

Conforme exposto, é grande o conjunto de mecanismos de ação dos polifenóis do chá verde no contexto do efeito terapêutico no câncer de mama. Contudo, a maioria dos trabalhos que se debruçaram em estudar os efeitos biológicos dos compostos do chá verde parte de extratos padronizados ou de compostos isolados. No entanto, no alimento esses compostos não são encontrados homogeneamente dispersos de forma livre, mas como parte de microestruturas complexas que interferem nos processos de digestão, absorção e biodisponibilidade (AGUILERA, 2019). Por isso, a atividade biológica dos compostos fenólicos do chá verde requer estudos adicionais, principalmente a partir do uso de matrizes alimentares.

1.4 O papel da matriz alimentar na atividade biológica dos compostos bioativos

O interesse recente em explorar as características da matriz alimentar deriva do fato de que as interações entre os componentes presentes nos alimentos modificam as propriedades dos compostos que se comportam de forma diferente da forma isolada (em solução, por exemplo) (PARADA; AGUILERA, 2007).

O termo “matriz alimentar” tem sido descrito como um conjunto complexo de nutrientes e não nutrientes interagindo física e quimicamente, que influenciam na liberação, digestibilidade e estabilidade de muitos compostos alimentares (OLIVEIRA; AMARO; PINTADO, 2018). A matriz alimentar também tem impacto na digestão e absorção de

compostos, e por isso, a bioacessibilidade de nutrientes (fração liberada durante a digestão) e a biodisponibilidade (fração efetivamente absorvida) são diretamente influenciadas por ela (MELSE-BOONSTRA, 2020). Por exemplo, a composição da matriz alimentar e a interação entre compostos fenólicos e outros componentes da própria dieta (proteínas, gorduras, carboidrato e fibra), bem como a tendência dos compostos fenólicos em construir complexos com proteínas, interferem em sua biodisponibilidade (ARFAOUI, 2021).

A literatura da ciência de alimentos e nutrição vem tentando classificar as matrizes alimentares e descrever suas principais características. Alguns exemplos incluem as matrizes líquidas, matrizes de emulsão, em gel, matrizes celulares, viscoelásticas, densas, porosas, entre outras. As diferenças entre as matrizes alimentares são as grandes responsáveis pelo desempenho e potencial de saúde de produtos alimentícios com composição química semelhante. Esse fenômeno foi genericamente chamado de “efeito da matriz alimentar” (AGUILERA, 2019).

São essas evidências que explicam porque nenhum composto isolado pode substituir a combinação de fitoquímicos naturais em frutas e vegetais para alcançar os benefícios para a saúde e propõem que os compostos bioativos são mais bem adquiridos através do consumo de alimentos (KAPINOVA et al., 2017a; LIU, 2004; WANG et al., 2011).

Por outro lado, o processamento a que o alimento é submetido promove mudanças importantes nas estruturas das matrizes alimentares, particularmente em seu estado físico, químico, estado de agregação ou dispersão, entre outros. Quanto mais o alimento *in natura* é processado, mais ele perde sua coesão com a matriz original e ao mesmo tempo, seu potencial terapêutico (FARDET, 2015; IFIE; MARSHALL, 2018).

Um estudo anterior do nosso grupo pretendeu estudar a atividade antitumoral do chá verde a partir da sua matriz alimentar, através da exposição de duas linhagens de câncer de mama a um extrato produzido em nosso laboratório. O ECV demonstrou eficiência seletiva na redução da migração e viabilidade celular de células tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Especula-se que um dos mecanismos pelos quais o ECV exerce os efeitos nessas células seja por meio da modulação da p53, tendo em vista o aumento na expressão dessa proteína e de em um de seus alvos, a p21, na linhagem MCF-7. De forma interessante, um efeito oposto foi provocado nas células MDA-MB-231 tratadas, nas quais os níveis de p53, neste caso em sua forma mutante, estavam reduzidos (SANTOS et al., 2021).

Todavia, é necessária uma investigação criteriosa dos mecanismos pelos quais o ECV influencia no processo tumoral do câncer de mama em modelos mais robustos. Na cultura de monocamada ou cultura de células bidimensional (2D), as interações célula-célula e

célula-matriz extracelular são limitadas. Por outro lado, os modelos *in vivo* que têm uma clara vantagem sobre os modelos *in vitro*, podem não representar as condições encontradas em humanos. A lacuna deixada por esses dois modelos experimentais levou ao desenvolvimento da cultura de células tridimensionais (3D), que integra a reprodutibilidade dos modelos 2D com parte das condições encontradas nos tumores *in vivo* (HOARAU-VÉCHOT et al., 2018)

1.5 Cultura tridimensional de células como modelo para o estudo do câncer de mama

Desde sua descoberta, no início do século XX, quando Harrisson (1906) demonstrou sucesso em estabelecer uma cultura de nervos a partir do isolamento de fragmentos de tecidos de embriões de sapos, a cultura de células em monocamada (modelo bidimensional, 2D) sustenta a pesquisa básica em oncologia.

Todavia, tecidos e órgãos são tridimensionais, e por isso, as desvantagens em relação ao uso de culturas 2D começaram a ser questionadas. As células cultivadas dessa forma perdem sua polaridade, fenômeno que altera a resposta de processos biológicos como a apoptose, por exemplo. Outras desvantagens incluem o acesso ilimitado a oxigênio, nutrientes, metabólitos e moléculas de sinalização celular e alterações na expressão gênica nas células. O ambiente 2D não representa a estrutura nativa dos tumores, em especial as interações célula-célula e célula-ambiente extracelular. Há que ser levada em consideração que essas interações são necessárias em processos importantes à carcinogênese, em especial a diferenciação, proliferação, expressão de genes e resposta a compostos com finalidade terapêutica (KAPALCZYŃSKA et al., 2018). Todos esses achados incentivaram nosso interesse pelo estudo do cultivo tridimensional (3D).

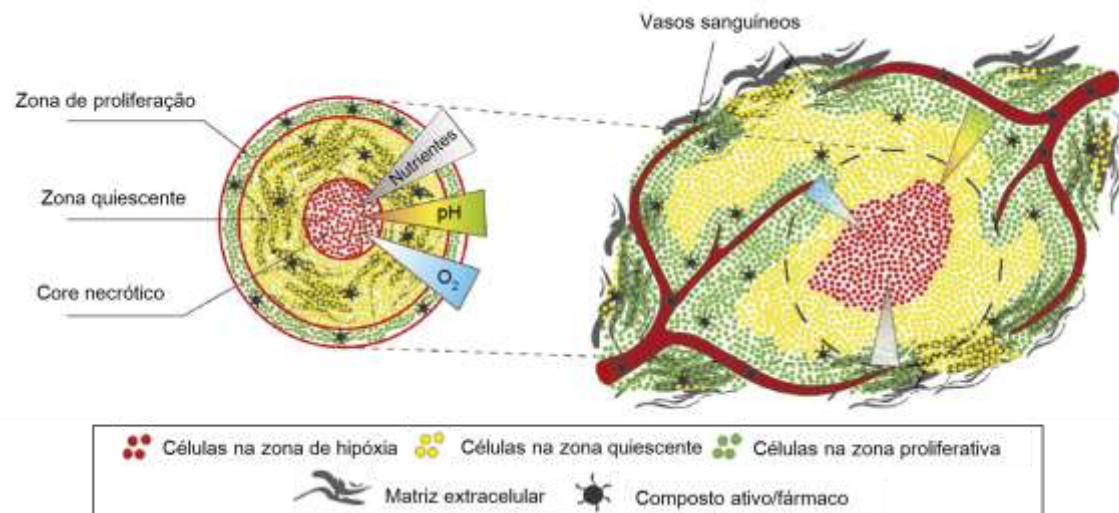
Atualmente, a cultura 3D tem sido utilizada principalmente em pesquisas para triagem de compostos com potencial anticâncer e diferentes abordagens podem ser empregadas para a geração de culturas 3D a partir de uma suspensão de células tumorais (MILLARD et al., 2017). Métodos que envolvem a agregação de células em superfícies não aderentes, como acontece, por exemplo, com revestimento de metacrilato de poli-hidroxietila (poli-HEMA) ou agarose são consideradas opções de baixo custo e fácil estabelecimento em laboratório. Outra abordagem utilizada é o método de *hanging drop*, no qual as células são dispensadas em uma gota de meio suspensa e a formação das interações célula-célula é favorecida pela ação gravitacional. As culturas 3D também podem ser geradas pela cultura de células com ágar, com kits comerciais com base em esferas magnéticas, com base em materiais porosos para suportar o crescimento de estruturas 3D, ou ainda, como resultado de

procedimentos de agitação em meio específico. De acordo com a característica morfológica da célula, pode ser necessária adição de proteínas da matriz extracelular para a iniciação da cultura (LOVITT; SHELPER & AVERY, 2014).

Grande parte dos modelos de cultura de células 3D tem forma esférica e a palavra "esferoide" é comumente usada para nomear o agregado celular. Sua conformação espacial permite a reprodução mais adequada de processos físicos e bioquímicos ocorridos no ambiente tumoral *in vivo*, quando comparado ao cultivo celular em monocamada (KAUSHIK; PONNUSAMY & BATRA, 2018).

A cultura 3D exhibe três características fundamentais dos tumores *in vivo*: 1) um crescimento celular heterogêneo com a presença de células em proliferação na periferia, em torno de um anel de células quiescentes e um núcleo de necrose (core necrótico); 2) gradientes de pH, nutrientes, metabólitos e de oxigênio da periferia para o centro e 3) a presença de uma matriz extracelular (que pode ser mais ou menos complexa de acordo com a técnica utilizada para a produção da cultura) (**Figura 8**) (COSTA et al., 2016; MILLARD et al., 2017; NYGA; CHEEMA & LOIZIDOU, 2011).

Figura 7 - Representação esquemática da cultura tridimensional.



Legenda: A camada mais superficial é marcada por células em alta proliferação celular (zona proliferativa), enquanto a camada média apresenta células em estado de quiescência. Na camada central do esferoide, também denominada core necrótico, encontramos células mortas por hipóxia. Adaptado de Millard, 2017.

Além disso, em culturas tridimensionais, características da morfologia e a polaridade celular de células previamente cultivadas em 2D podem ser restauradas. Outro atributo importante da cultura 3D é a sua semelhança com células que crescem *in vivo* em termos de topologia celular, expressão gênica, sinalização e metabolismo. Sendo assim, os modelos tridimensionais são ferramentas eficientes na predição de respostas *in vivo*, na

possibilidade de rastreamento simultâneo de parâmetros muitas vezes inaplicável *in vivo* e na investigação do papel da matriz na carcinogênese. O aumento da pesquisa em ambiente tridimensional deve promover avanços na engenharia de tecidos, além de facilitar o desenvolvimento e a triagem de novas terapias anticâncer (YAMADA & CUKIERMAN, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

As neoplasias, incluindo o câncer de mama, são um desafio à saúde pública em escala global. As estatísticas epidemiológicas para câncer traduzem a dimensão da doença: a Organização Mundial da Saúde, em seu último levantamento apontou para a ocorrência de 2,3 milhões de novos casos em todo o mundo em 2020. De forma surpreendente, o câncer de mama já ocupa o primeiro lugar no ranking de mortalidade em mulheres apesar dos avanços no tratamento e diagnóstico da doença.

Em paralelo, já está claro que o consumo regular de alimentos de origem vegetal como o chá verde, fonte de compostos fenólicos, está associado à redução do risco de desenvolvimento da doença. Contudo, há ainda a necessidade de estabelecer um consenso científico que dê suporte à utilização desses compostos, não somente de maneira isolada, mas também na forma como se apresentam na matriz alimentar uma vez que nesse estado seus componentes experimentam interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas que podem alterar suas propriedades fisiológicas.

Nesse cenário, é necessária a investigação do papel da matriz do chá verde na carcinogênese em modelos que melhor mimetizem a arquitetura tumoral em termos de topologia celular, expressão gênica, sinalização e metabolismo como é o caso das culturas tridimensionais.

O chá é uma bebida largamente consumida no mundo, possui baixo custo de produção e é de fácil acesso. Portanto, a investigação do potencial antitumoral do chá verde em modelo tridimensional de câncer de mama permitirá uma ampliação do conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos e possivelmente trará expectativas para as terapias anticâncer.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antitumoral do extrato de chá verde (ECV) sobre células tumorais de mama humana MCF-7 cultivadas em modelo tridimensional.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do ECV sobre os parâmetros de morfologia, crescimento, viabilidade e migração celular dos esferoides de MCF-7;
- Avaliar efeitos do galato de 3-epigallocatequina (EGCG) sobre os esferoides e compará-los aos efeitos do ECV;
- Explorar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos promovidos pelo ECV, com foco na proteína p21;
- Verificar a citotoxicidade do ECV em esferoides de uma linhagem não-tumoral de mama (MCF-10A);
- Estabelecer um xenoenxerto das células MCF-7 em modelo *in vivo* para investigação futura dos efeitos do ECV no câncer de mama.
- Avaliar os efeitos do ECV na progressão de tumores de xenoenxerto de células MCF-7 em modelo murino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico e a água foi obtida com um sistema Milli-Q Millipore (Bedford, MA, EUA). O reagente de Alamar Blue[®] foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Da Thermo-Fisher Cientific (Saint Louis, MO, EUA) foram adquiridos a tripsina, antibióticos (penicilina e estreptomicina), soro fetal bovino, suplemento de crescimento epitelial mamário (MEGS), meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e Prolong Diamond. Os anticorpos anti-p21 (12D1), e os conjugados Alexa Fluor[®] 488 e Alexa Fluor[®] 647 foram adquirido da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). Os padrões de catequinas foram adquiridos da Indofine Chemical Co (Hillsborough, NJ, EUA). A agarose foi adquirida da KASVI (São José dos Pinhais, PR, BR). O meio de montagem Ver-Mount foi adquirido da EasyPath Diagnósticos (Indaiatuba, SP, BR). O kit de imunocitoquímica Novolink foi adquirido da Leica Biosystems[™] (Buffalo Grove, IL, USA). A solução Trilogy[™] foi adquirida da Cell Marque Tissue Diagnostics, Merk (Rocklin, CA, USA). O Matrigel Matrix[®] e a Mitomicina C foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co (Saint Louis, MO, EUA).

4.2 Obtenção do extrato de chá verde

Uma marca comercial de chá verde (*Camellia sinensis*) torrado no forno, cultivado em duas regiões montanhosas da costa brasileira, onde o clima é semelhante ao do Japão e cujo processamento emprega tecnologia japonesa foi adquirida no mercado local do Rio de Janeiro. Para a obtenção do extrato aquoso, as folhas secas foram submetidas à infusão em água destilada em recipiente de vidro, na proporção de 1 g:40 mL, a 80 °C ± 2 °C durante 5 minutos. A temperatura foi aferida com termômetro (Incoterm[®]) posicionado na parte mediana do recipiente. A mistura foi mantida sob agitação constante com vista ao aumento da eficiência de extração dos compostos fenólicos (NISHIYAMA et al., 2010). O extrato foi resfriado à temperatura ambiente, filtrado em papel de filtro, centrifugado e o sobrenadante armazenado a -80 °C. Em seguida, foi procedida liofilização no liofilizador de bancada Terroni LD 3000. O extrato seco obtido foi triturado e armazenado a -20 °C ao abrigo da luz.

4.3 Caracterização das catequinas do ECV

A determinação dos teores das catequinas no extrato de chá verde foi realizada através de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Foi usada uma coluna C18 (Kromasil). A fase móvel adotada para este estudo foi ácido fórmico 0,3%, acetonitrila 1% em água e o fluxo foi de 0,3 mL/min. Foram utilizados como padrões amostras de catequina (C), epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), galato de 3-epigallocatequina (EGCG) e epicatequina galato (ECG). O comprimento de onda de absorção foi 280 nm e o volume de injeção da amostra foi de 10 µL. Os picos na amostra foram identificados comparando seu tempo de retenção e espectro ultravioleta com aqueles dos padrões de referência. A quantificação das catequinas foi realizada a partir da área sob a curva do pico.

4.4 Cultura de células

As linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contendo 4,5 g/L de glicose, suplementado com 2,0 g/L de HEPES, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). A cultura foi submetida a no máximo, 20 passagens. O cultivo da linhagem não tumoral MCF-10A foi realizado no meio previamente descrito adicionado de 1% do suplemento *Mammalian Epithelial Growth Supplement* (MEGS) Gibco®. As culturas foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

4.5 Cultura tridimensional de células

As linhagens MCF-7 e MCF-10A produzem esferoides espontaneamente quando cultivadas em ambiente adequado. Para a formação desses esferoides, foi adotado o protocolo descrito por Friedrich e colaboradores (2009) com pequenas adaptações. As células cultivadas em monocamada foram enzimaticamente destacadas com tripsina e plaqueadas em uma concentração de $5,0 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^5$ células/mL respectivamente, para MCF-7 e MCF-10A. Para impedir a adesão das células, as placas foram previamente revestidas com 1% de agarose em no máximo 24h antes do uso. Em seguida, as células foram sedimentadas no fundo dos poços por centrifugação a temperatura ambiente por 10 minutos a 1.000 RPM. As placas

foram incubadas em condição padrão de cultura de células (37 °C, 5% de CO₂ em ambiente umidificado) durante 72h. Para os experimentos, esferoides com diâmetro médio de aproximadamente 300 a 450 µm foram utilizados.

4.6 Curvas de crescimento dos esferoides

Os esferoides obtidos foram acompanhados durante quinze dias a partir do dia do plaqueamento. Metade do meio de cultura era substituído a cada 3 ou 4 dias. As imagens foram capturadas a cada 24h com ampliação de 10x, utilizando o software Lumenera[®]. As áreas das imagens foram quantificadas pelo software ImageJ[®] versão 1.43p. As análises foram feitas em triplicata.

4.7 Tratamento dos esferoides com o ECV ou EGCG

Os esferoides das linhagens MCF-7 e MFC-10A foram expostos ao ECV no quarto dia da iniciação, substituindo metade do volume final de cada poço. A solução de ECV foi preparada no próprio meio de cultura e filtrada em filtro 0,22 µm para garantir a esterilidade. As concentrações de escolha partiram de ensaios prévios do grupo em cultura 2D, nos quais foram determinados os valores IC₅₀24h do ECV. Foram adotados os valores que representam o IC₅₀ ± 2 desvios padrões do ECV para linhagem MCF-7, a saber: 162 µg/mL, 324 µg/mL, 648 µg/mL, 1296 µg/mL e 2592 µg/mL. Os esferoides foram expostos a estas concentrações durante 24h e 48h. Para o tratamento com a EGCG, uma solução estoque de EGCG (10mg/mL) foi preparada em água deionizada e esterilizada por filtração em filtro 0.22 µm. Para as concentrações do estudo (62,5 µg/mL, 31,2 µg/mL, 16,6 µg/mL e 7,8 µg/mL), o EGCG estoque foi diluído no próprio meio de cultura.

Para o pré-tratamento, os esferoides foram expostos às concentrações do ECV desde o primeiro dia de iniciação.

4.8 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade por redução de Alamar Blue[®] baseia-se na capacidade metabólica das enzimas mitocondriais das células viáveis de reduzir a resazurina, principal componente do reagente, a resorufina, um composto de alta fluorescência que pode ser quantificado (BONNIER et al., 2015). Para as análises em cultura 3D, o protocolo foi

adaptado de EILENBERGER et al., (2018). Assim que decorrido o tempo de tratamento com ECV ou EGCG, os esferoides foram transferidos para uma nova placa não revestida que foi centrifugada a 400 RCF durante 10 minutos a 24 °C. O meio foi então descartado e os esferoides, agora aderidos ao fundo do poço, lavados com Tampão Fosfato-Salino (PBS). Os esferoides foram então expostos a uma solução de 10% do reagente de alamar diluído no meio DMEM suplementado com 2% de SFB pelo período de 24h a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Posteriormente, transferiu-se 200 uL do sobrenadante para uma nova placa e procedeu-se à leitura no equipamento Biochrom[®] Asys UVM340 a 570 nm e 600 nm, sendo os dados expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle.

4.9 Ensaio de migração celular

Os esferoides foram obtidos conforme descrito previamente. Para o ensaio de migração foi adotado o protocolo descrito por Vinci e colaboradores (2013) com adaptações. Com 4 dias de idade, as esferas foram individualmente transferidas para uma placa de 24 poços contendo diferentes concentrações de ECV (162 µg/mL, 324 µg/mL, 648 µg/mL). Como medida para conter a proliferação celular, a proporção de SFB foi reduzida a 2% e o meio foi adicionado de 0,5 µg/mL de mitomicina C. Foi feita captura de imagens nos tempos (t) 0 h, 24h, 48h e 72 h com ampliação de 10x, utilizando o software Lumenera[®].

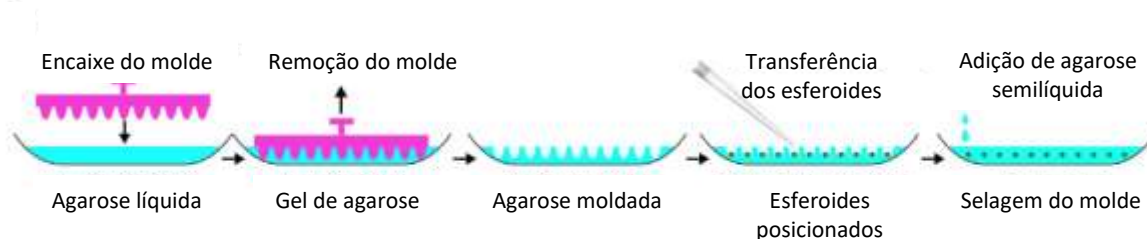
4.10 Inclusão dos esferoides em agarose e parafina

Os esferoides íntegros foram corados com azul de toluidina 1% diluído em PBS durante 5 minutos. Em seguida, foi feita fixação em solução de paraformaldeído a 10% em PBS por 1 h.

A inclusão desses esferoides em agarose foi feita de acordo com o protocolo estabelecido por Ivanov e colaboradores (2017). O processo está ilustrado na **Figura 8**. Um molde foi construído em impressora 3D com filamento do tipo PLA (ácido poliático) a partir do arquivo Mold-maker disponibilizado pelos autores. Inicialmente uma solução de agarose a 2% foi acomodada em um molde de inclusão de aço inox de 30x25x5 mm. O molde 3D embebido em óleo mineral foi encaixado sobre a agarose. Após solidificação completa da agarose, o molde foi retirado e os esferoides acomodados na forma de acordo com a orientação dos poços. Para selar a estrutura, uma camada de agarose líquida foi adicionada e mantida por 2 minutos a temperatura ambiente para solidificação. As placas obtidas foram

recortadas com bisturi para melhor acomodação no cassete histológico e mantidas completamente imersas água destilada até a inclusão em parafina.

Figura 8 - Esquema de inclusão de esferoides em agarose.



Legenda: A inclusão dos esferoides em agarose é feita a partir da deposição de agarose líquida em formas de aço para histologia e encaixe do molde 3D. Uma vez que a agarose esfria e gelifica, o molde é removido e os esferoides são carregados nos poços formados na agarose. O molde é selado com agarose semilíquida. Adaptado de IVANOV, 2016.

A inclusão em parafina foi realizada em colaboração com a equipe de suporte à pesquisa básica e clínica da divisão de patologia (DIPAT) do Instituto Nacional do Câncer (INCA). Os cassetes contendo as placas de agarose com os esferoides foram submetidos à desidratação, ficando submersos por 2 horas em uma bateria de álcool em diferentes concentrações (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%). Em seguida, foram feitos dois banhos de 1 h em xilol para remoção do álcool.. A inclusão em parafina foi feita em três banhos de 6 horas à 60°C. Os cassetes foram então deixados à temperatura ambiente para solidificação da parafina. Todo o processamento de inclusão em parafina foi automatizado. Após o emblocamento, cortes de 3 micras de espessura foram montados sobre uma gota de bálsamo em lâminas de vidro silanizadas.

4.11 Hematoxilina-eosina

Para visualização das características estruturais gerais do tecido a coloração de hematoxilina-eosina foi realizada em colaboração com a equipe de suporte à pesquisa básica e clínica da divisão de patologia (DIPAT) do Instituto Nacional do Câncer (INCA).

As lâminas foram desparafinadas e hidratadas em submetidas a quatro banhos em xilol e álcool por 3 minutos cada. Após uma lavagem em água destilada, as lâminas foram expostas ao corante hematoxilina por 4 minutos. Uma lavagem de 10 minutos em água destilada foi realizada para retirada do primeiro corante e em seguida foi feita exposição a eosina alcoólica por 3 minutos. Após lavagem em água corrente, os cortes foram submetidos a um novo ciclo de desidratação (seis banhos em álcool etílico) e clarificação (seis banhos em xilol) e montados em lâmina com bálsamo do Canadá.

4.12 Investigação de proteínas de interesse

4.12.1 Imunofluorescência

As lâminas previamente desparafinadas foram reidratadas em água destilada por 10 min e em seguida foi executado o protocolo adaptado de Ghosh et al., 2017. A exposição antigênica foi feita em estufa a 37°C por 2 min com tripsina (0,05%). Após lavagem com TBS-T (TBS + 0,1% de tween-20 pH 7,4), as lâminas foram tratadas com triton x-100 (0,2%) por 10 min. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado por 20 min em solução a 2% de albumina. Seguiu-se a marcação com o anticorpo primário anti-p21 em solução de bloqueio por 1h, a 37°C. Após três lavagens de 5 min com TBS-T foi feita incubação com os anticorpos secundários Alexa Fluor® 647 em solução de bloqueio por 30 min, a 37 °C, sob proteção da luz. Um novo ciclo de 3 lavagens foi feito e as lâminas foram incubadas com marcador Hoechst 1 mg/mL (1:1000) por 10 minutos a temperatura ambiente sob proteção da luz. As lâminas foram novamente lavadas e montadas sobre uma gota de Prolong Diamond para análise. Para aquisição das imagens, foi utilizado microscópio de fluorescência EVOS® Fl com um aumento de 20x.

4.12.2 Imunohistoquímica

A investigação da expressão da proteína Ki-67 por imunohistoquímica foi realizada em colaboração com a equipe de suporte à pesquisa básica e clínica da divisão de patologia (DIPAT) do Instituto Nacional do Câncer (INCA).

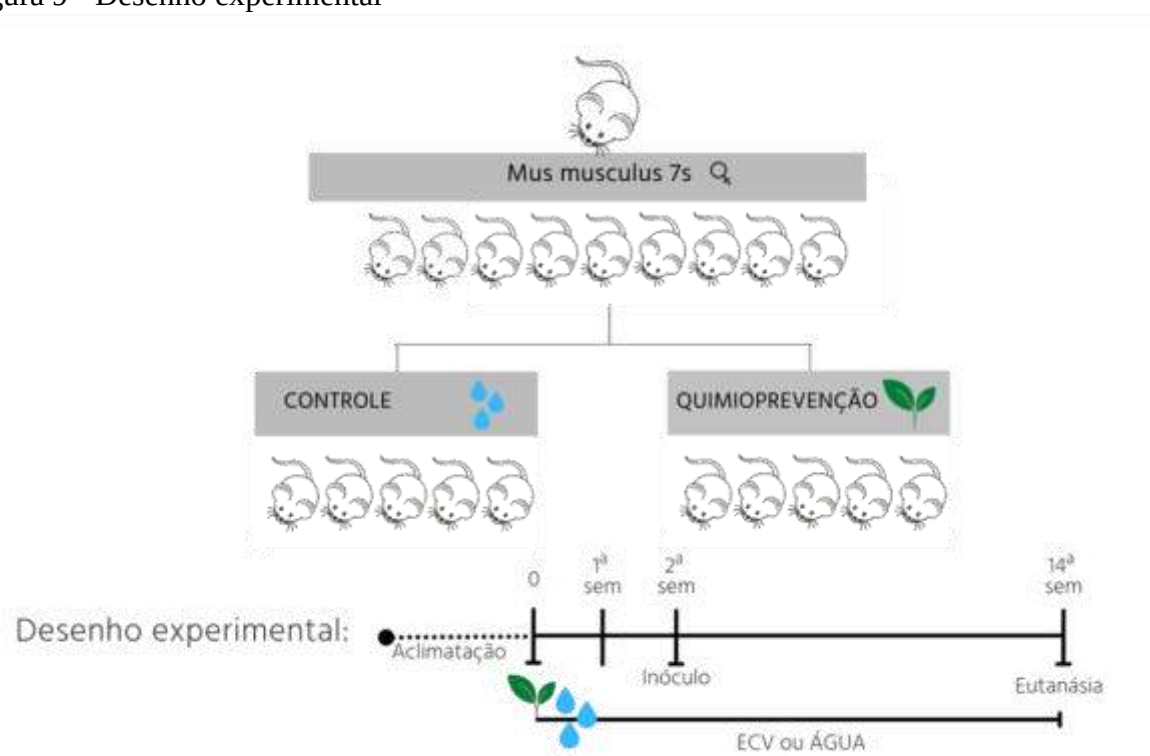
Os cortes foram desparafinados em uma sequência de seis banhos de xilol e álcool etílico e reidratados em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão dos cortes em Solução de Trilogy™ 1% por 30 minutos a 98°C. Após o resfriamento, as lâminas foram submetidas a três ciclos de lavagem com TBS por 5 minutos. Foi feito bloqueio da peroxidase endógena, seguida do bloqueio de ligações inespecíficas utilizando os reagentes do kit Novolink™ de acordo com as recomendações do fabricante. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário ki-67 overnight a 4°C, seguido de incubação com as soluções pós-primário e polímero do mesmo fabricante. A reação foi revelada com a solução 3-3-diaminobenzidina (DAB) e contracoradas com coloração de hematoxilina-eosina seguindo os protocolos convencionais. Após lavagem em água corrente,

os cortes foram submetidos a um novo ciclo de desidratação (seis banhos em álcool etílico) e clarificação (seis banhos em xilol) e montados em lâmina com bálsamo do Canadá.

4.13 Investigação dos efeitos do ECV *in vivo*

Os efeitos do ECV foram testados em fêmeas de camundongos Balb/c nude mantidas no biotério do INCA. A escolha desses animais foi baseada na sua capacidade de desenvolver tumores enxertados, dada sua supressão imunológica. Após ambientação, 10 animais foram divididos em dois grupos: (1) grupo *quimioprevenção* (receberam 0,5% de ECV ofertado na água de beber 15 dias antes da iniciação do tumor) (n=5) e grupo *controle* (receberam água durante todo o tempo do experimento) (n=5) conforme indica a **Figura 9**.

Figura 9 - Desenho experimental



Para estabelecimento dos xenotransplantes, os animais receberam 200µL de uma solução contendo 2,5 ou 5,0 x 10⁶ células/mL (MDA-MB-231 ou MCF-7) em suspensão em Matrigel[®] Matrix (1:1), através de injeção subcutânea com seringa de 1 mL em um dos flancos. O volume dos tumores foi medido semanalmente com paquímetro digital Digimess (300 mm, escala de 0,01 mm). O peso dos animais foi monitorado semanalmente com balança digital (123Útil, 10 kg, escala de 1 grama) e os animais foram acompanhados por 7-10 semanas. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados. Os experimentos foram

conduzidos de acordo com as normas brasileiras de proteção e bem-estar dos animais e o pré-projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais Comitê do INCA tendo sido aprovado conforme parecer nº 04/2020 (Anexo A).

4.14 Análise estatística

As diferentes condições experimentais foram comparadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. Em todos os casos, o valor de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo e os dados foram analisados usando o GraphPad Prism Software v6.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE I: Atividade antitumoral do ECV em cultura tridimensional de câncer de mama

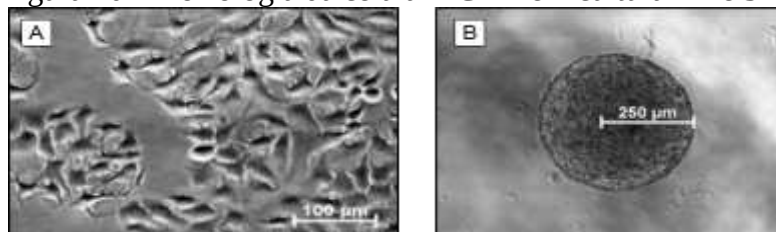
5.1.1 Estabelecimento e caracterização da cultura tridimensional de câncer de mama

Para os ensaios em cultura 3D, a linhagem tumoral de mama MCF-7 foi selecionada pela sua capacidade espontânea de geração de esferoides, facilitada pela presença de fortes interações célula-célula. Essa capacidade de crescer de forma independente de ancoragem é, inclusive, considerada como um preditor clássico de tumorigenicidade (SACHINIDIS et al., 2000). A MCF-7 foi uma das primeiras linhagens estabelecidas de câncer de mama e nela a proteína p53 é expressa em seu estado selvagem, possibilitando o estudo de suas funções e alvos na célula. A MCF-7 foi inicialmente isolada de metástase de derrame pleural que possui característica luminal, RE⁺ e RP⁺ (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; KENNY et al., 2007).

O método escolhido para estabelecimento da cultura 3D baseou-se no revestimento das placas de cultivo com agarose, um polímero natural que impede a fixação celular à superfície do material, incentivando assim, a aglomeração e adesão das células umas às outras e a formação das estruturas esféricas (FRIEDRICH; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2007). Apesar de laborioso, é um método simples, de baixo custo e adaptável à maioria das configurações de laboratórios. O estabelecimento dessa cultura em nosso laboratório foi inicialmente desenvolvido em um estudo anterior do nosso grupo (THEMÍSTOCLES; THOMAZ-SILVA, 2020).

A morfologia das células cultivadas usando esta técnica é substancialmente diferente em comparação com o tradicional método de monocamada. Na cultura 2D, as células MCF-7 crescem em formato de cachos enquanto se espalham pela superfície até a confluência completa. Já no arranjo tridimensional, observa-se a agregação das células em forma de um esferoide uniforme e homogêneo, firmemente compactado (**Figura 10**).

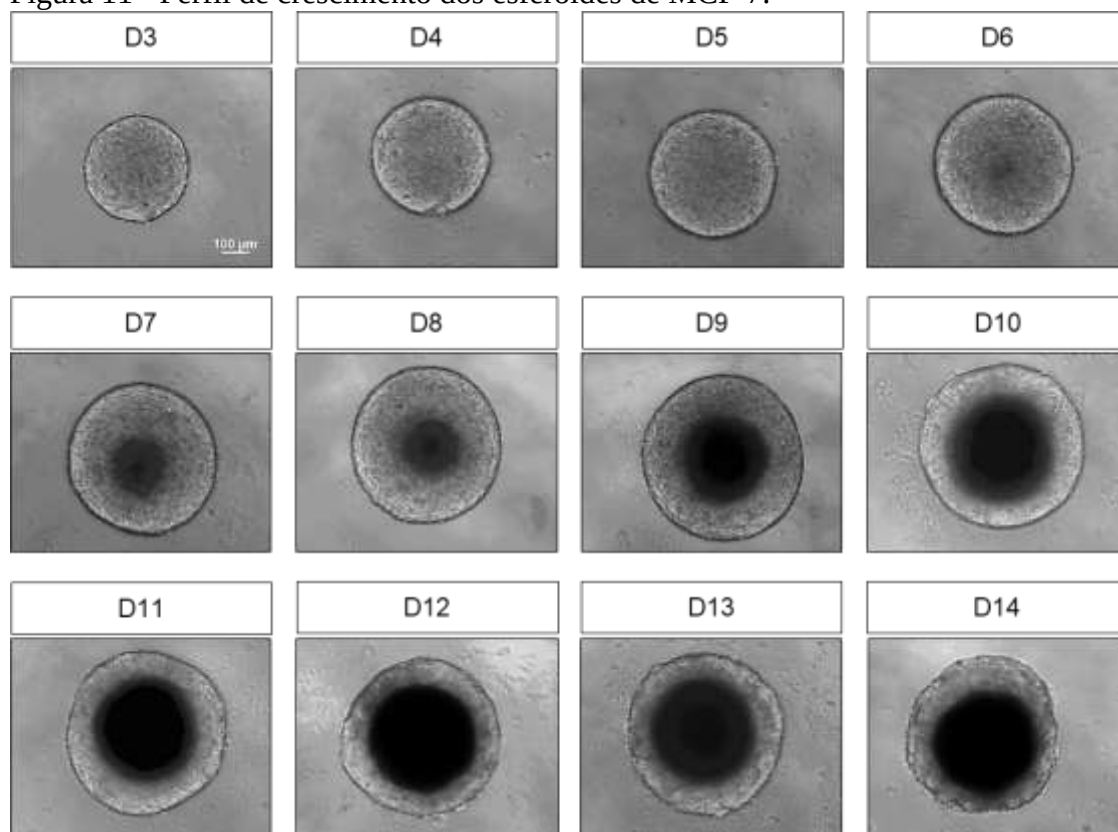
Figura 10 - Morfologia da célula MCF-7 em cultura 2D e 3D.



Legenda: As imagens de microscopia óptica capturadas em nosso laboratório mostram como a morfologia das células MCF-7 difere substancialmente quando cultivadas em ambiente 2D (A) e 3D (B). As imagens foram obtidas com um aumento de 20x (A) e 10x (B) e as barras de escala estão mostradas em cada figura.

As células cultivadas em 2D normalmente crescem continuamente, conquanto haja nutrientes e espaço para fazê-lo, mas as culturas 3D não seguem o mesmo padrão. Por esse motivo, inicialmente foram conduzidos experimentos para caracterizar a cinética de crescimento e a densidade ideal de células necessárias à iniciação de um esferoide compatível com a literatura. A sedimentação de 5×10^3 células/mL foi suficiente para a obtenção de esferoides típicos, observados ao terceiro dia de iniciação, como mostra a **Figura 11**.

Figura 11 - Perfil de crescimento dos esferoides de MCF-7.



Legenda: $5,0 \times 10^3$ células/mL foram sedimentadas por centrifugação em placas previamente revestidas com 1% de agarose. As células foram mantidas a 37 °C, 5% de CO₂ em ambiente umidificado. Os esferoides foram acompanhados durante 3 semanas a partir do dia de iniciação e as imagens foram capturadas a cada 24h com ampliação de 10x, utilizando o software Lumenera® (n=3).

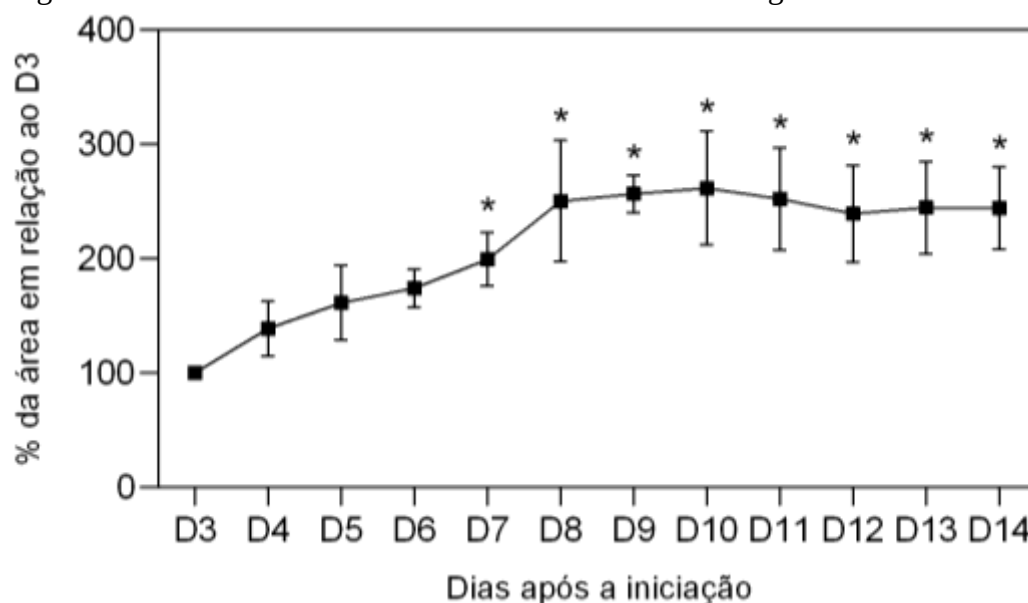
A análise da figura acima mostra como a morfologia esférica mudou ao longo do período de cultivo. Entre os dias 6 e 7 de idade, com diâmetro médio de 300µm, os esferoides começaram a apresentar uma área central escurecida vista à microscopia óptica. Com o tempo, essa região aumentou e, a partir do décimo dia de cultivo tornou-se estável em tamanho. Simultaneamente, com o aumento da área escura da região medular, a região cortical apresentou brotamento celular. A presença dessas estruturas notada entre os dias 10 a 14 fizeram com que os esferoides assumissem um arranjo menos esférico, com bordas

heterogêneas. Um fenômeno semelhante foi visto por com cultivo 3D de células MCF-7 em placas hidrofóbicas (DO AMARAL et al., 2011).

A classificação da morfologia das colônias de células mamárias em cultura 3D se divide em quatro grupos distintos. A linhagem MCF-7 está incluída na classe de massa, a qual forma colônias com núcleos desorganizados e fortes interações célula-célula (KENNY et al., 2007).

A análise da área dos esferoides está exposta na **Figura 12**. Nota-se que durante os primeiros 7 dias em cultura os esferoides exibiram características de crescimento exponencial atingindo um platô no dia 8 da iniciação.

Figura 12 - Cinética de crescimento dos esferoides da linhagem MCF-7.

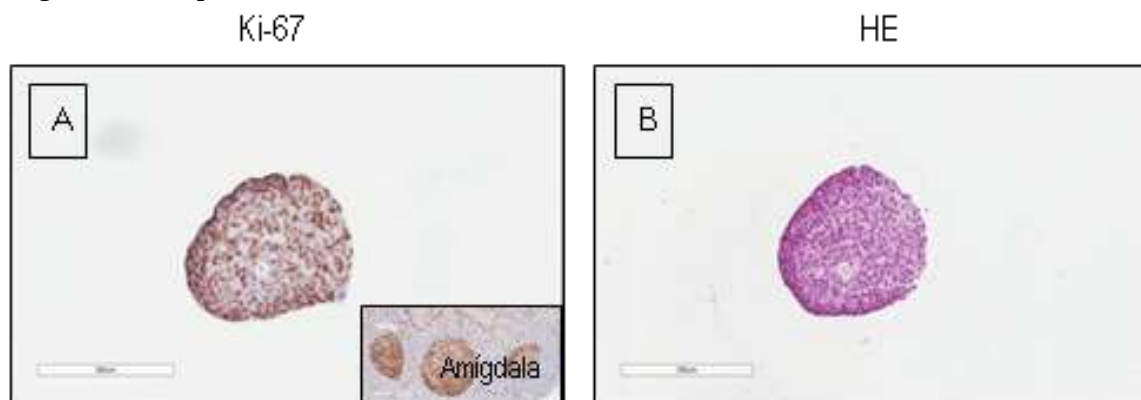


Legenda: As áreas das imagens foram quantificadas pelo software ImageJ[®]. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão, comparando cada área em relação ao D3 (n=3). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$ segundo o teste One Way ANOVA.

As culturas tridimensionais de células possuem características que as tornam semelhantes aos tumores *in vivo* e a idade ideal para início dos experimentos levou em conta o momento em que esses esferoides passassem a exibi-las.

Com 4 dias de idade e um tamanho médio de 300 a 400µm, já foi possível observar o início de uma das primeiras características da cultura 3D: a presença de células com diferente perfil proliferativo. Na **Figura 13** está caracterizada a expressão de Ki-67, uma das principais proteínas marcadoras de proliferação celular. Nota-se a presença de uma área medular com menor atividade proliferativa, cercada por células com maior expressão de Ki-67. A formação do core com células com menor atividade proliferativa fica mais evidente à medida que a idade do esferoide avança (dados não mostrados).

Figura 13 - Expressão de Ki-67 nos esferoides de MCF-7 com 4 dias de cultivo.



Legenda: A expressão da proteína ki-67 foi investigada por iminohistoquímica nos esferoides com quatro dias após o início da cultura tridimensional (A). No destaque, a expressão da mesma proteína em amígdalas foi usada como controle positivo. Os esferoides também foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina para melhor visualização das características estruturais gerais do tecido (B) (n=1).

Devido à logística de crescimento em uma conformação tridimensional, as células do centro do esferoide não recebem oxigênio e nutrientes na mesma extensão que as da periferia e por isso morrem como consequência da hipóxia e subnutrição, o que culmina na formação de um core necrótico, fenômeno semelhante ao ambiente tumoral *in vivo* (DECARLI et al., 2021). Estudos anteriores mostraram que em células de hepatócitos a limitação de oxigênio já pode ser vista em esferoides a partir de 100µm de tamanho (GLICKLIS; MERCHUK; COHEN, 2004). A partir da medição do gradiente de oxigênio em cultura de esferoides de células RTG-2 (células não malignas de uma espécie de peixe) notou-se início da morte celular por aumento da hipóxia e redução de nutrientes com esferoides de 300µm de tamanho (LANGAN et al., 2016). Sabe-se ainda que as células MCF-7 mantidas em condições de cultura 3D por longos períodos de tempo (mais que duas semanas) e sem suplementação de Matrigel podem produzir esferóides incomuns (DO AMARAL et al., 2011). Com base no exposto, e nos protocolos estabelecidos por IVANOV e colaboradores (2017), optamos pelo início da exposição ao ECV a partir do quarto dia de idade dos esferoides, quando então atingem 300-400 µm de tamanho.

5.1.2 Seleção, obtenção e caracterização do ECV

Estão documentados os efeitos benéficos das catequinas sobre o câncer em diferentes modelos experimentais. Já se sabe que a exposição a esses compostos conforme ocorrem naturalmente no alimento é um fator importante para seu poder antioxidante, biodisponibilidade e segurança (KAPINOVA et al., 2017b; YOUNES et al., 2018). A complexidade dos componentes da matriz influencia na liberação, digestibilidade e

estabilidade de muitos compostos alimentares, incluindo os compostos fenólicos (IFIE; MARSHALL, 2018). Por esse motivo, trabalhos que aplicam a matriz do alimento como alternativa às catequinas isoladas são necessários.

Para esse fim, foi necessária a obtenção e caracterização de um ECV que pudesse ser utilizado em cultura de células. As propriedades funcionais atribuídas ao chá verde estão associadas, principalmente, ao seu conteúdo de compostos fenólicos (BERNATONIENE; KOPUSTINSKIENE, 2018), dentre os quais estão incluídos as catequinas. Tratam-se de compostos incolores, adstringentes, solúveis em água e sensíveis a diferentes formas de degradação (GRAHAM, 1992). Portanto, a forma como o chá é preparado tem influência não somente sobre o sabor e aceitação da bebida, como também sobre a quantidade de compostos bioativos que serão extraídos da planta (BANCIROVA, 2010; PERVA-UZUNALIĆ et al., 2006).

É correto supor que as condições de extração (tempo, temperatura, agitação, proporção erva: água) exerçam influência na composição da infusão. Achados de um estudo prévio do nosso grupo mostraram que o binômio 80 °C/5 min é suficiente para obtenção de um ECV rico em catequinas e por esse motivo, as mesmas condições foram reproduzidas (SANTOS et al., 2021).

Para os ensaios *in vitro*, a obtenção de um extrato seco que viabilizasse sua aplicação em cultura de células era fundamental e por isso a infusão foi liofilizada e armazenada a -20 °C (**Figura 14**).

Figura 14 - Aspecto do extrato seco obtido.



Legenda: Imagem da amostra liofilizada (A, B) e do extrato seco final após trituração (C).

Além da técnica de infusão é preciso considerar ainda a variação da composição entre os cultivares do chá verde, fazendo-se necessária a caracterização dos componentes da amostra. É comum observar que o conteúdo de fenólicos oscila de 2-3 vezes em diferentes

chás da mesma variedade. Essa variância existe em função de diversos fatores que alteram a composição da planta, como as diferentes regiões geográficas e condições climáticas de cultivo (VUONG et al., 2010). Com essa finalidade, o conteúdo de catequinas do ECV liofilizado foi submetido à análise por HPLC e as principais catequinas presentes na amostra foram caracterizadas (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Composição química do ECV.

Composto	Concentração (mg/g)
Epigallocatequina (EGC)	28.6 ± 0.02
Catequina (C)	4.7 ± 0.08
Galato-de-3epigallocatequina (EGCG)	28.4 ± 0.1
Epicatequina galato (ECG)	7.8 ± 0.03
Σ catequinas	69.5 ± 0.08

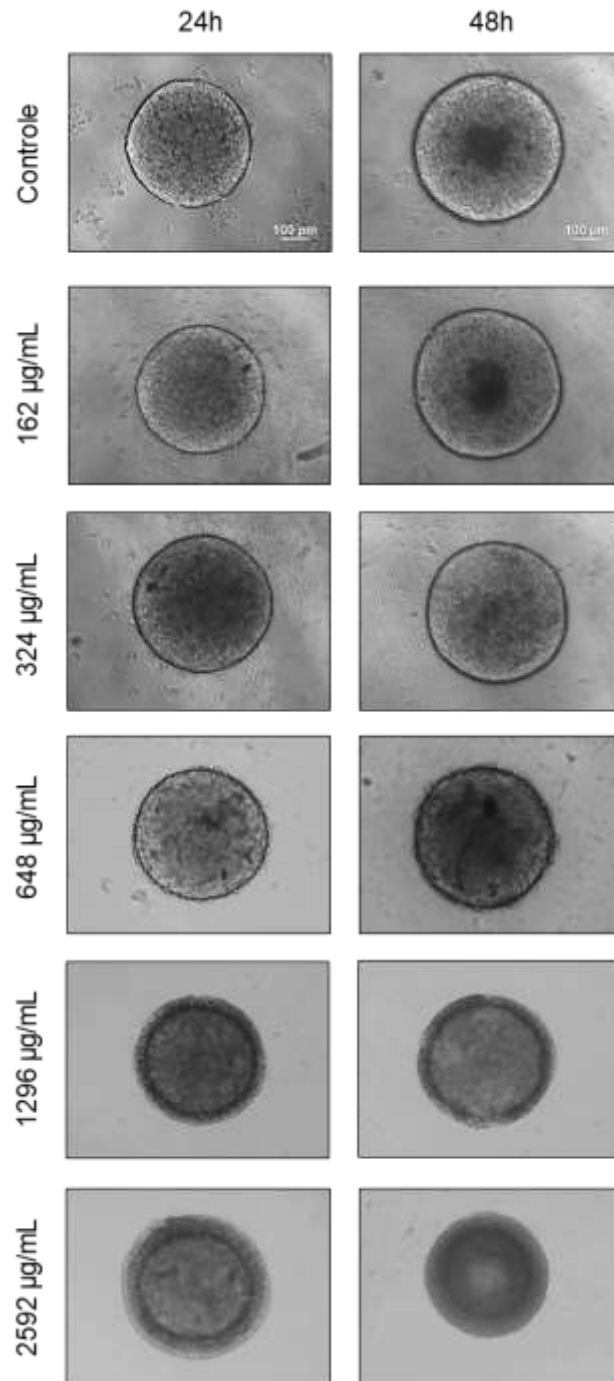
Legenda: Os valores foram expressos em média ± desvio padrão (n=2).

A análise cromatográfica revelou a presença de 4 principais catequinas do chá verde, com predominância do EGCG (41%) e EGC (41%), seguido pela ECG (11%) e C (7%) em quantidades compatíveis com os dados da base *Phenol Explorer*.

5.1.3 O ECV promove mudanças na morfologia e padrão de crescimento dos esferoides

Com o estabelecimento da cultura 3D e a obtenção do ECV, seus efeitos no crescimento e viabilidade celular puderam ser experimentados. A escolha das concentrações de ECV utilizadas foi pautada em ensaios prévios do grupo, nos quais foram determinados os valores IC₅₀ para as células MCF-7 cultivadas em monocamada. Para a exposição, o ECV foi diluído no próprio meio de cultura e depois filtrado para garantir a esterilidade. Os esferoides foram expostos a concentrações seriadas de ECV (162 µg/mL, 324 µg/mL, 648 µg/mL, 1296 µg/mL, 2592 µg/mL) a partir do 4º dia da iniciação, durante 24h e 48h (**Figura 15**).

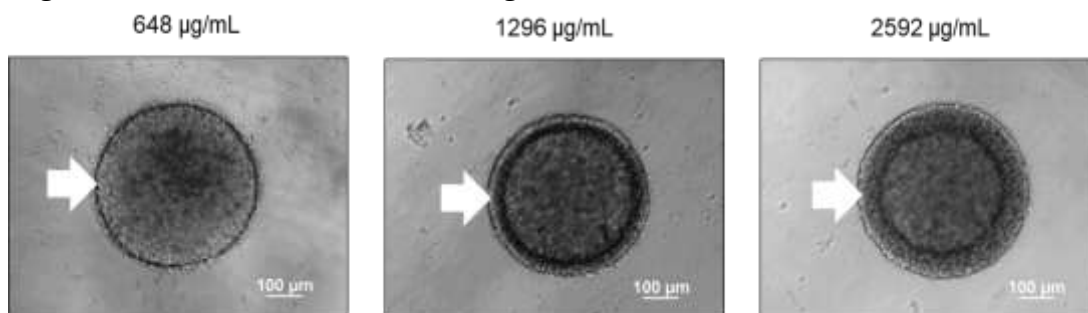
Figura 15 - Efeitos do ECV sobre a morfologia dos esferoides.



Legenda: Os esferoides com quatro dias de plaqueamento foram expostos às concentrações de ECV durante 24h (n=3) e 48h (n=3) e as imagens foram capturadas com ampliação de 10x, utilizando o software Lumenera®.

A exposição ao ECV causou efeito notório na estrutura do esferoide em concentrações a partir de 648 µg/mL. Após 24h de exposição, há diferenças na região proliferativa, que pareceu menos compactada, adquiriu aspecto granular e se expandiu em direção à medula do esferoide conforme a concentração do ECV era aumentada (**Figura 16**).

Figura 16 - Efeito do ECV na morfologia dos esferoides de MCF-7.



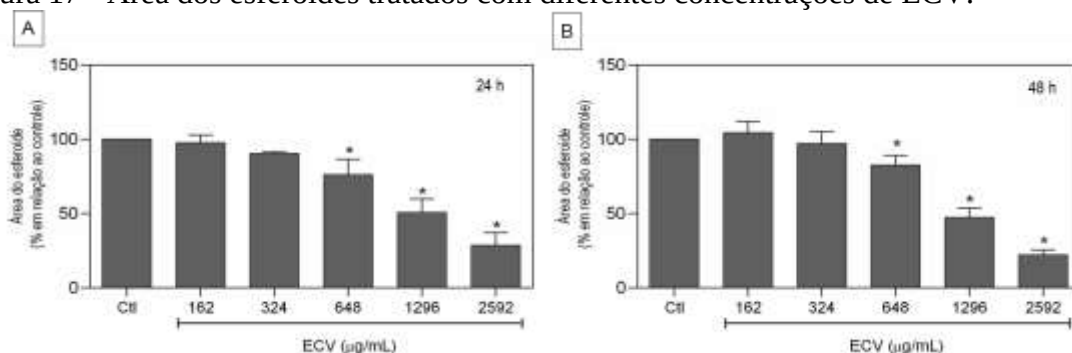
Legenda: Há mudança no aspecto morfológico dos esferoides expostos à concentrações iguais ou superiores a 648 µg/mL de ECV. A região cortical das esferas assumiu uma aparência granular e friável já em 24h de ensaio. As imagens foram capturadas com ampliação de 10x, utilizando o software Lumenera® (n=3).

Mudanças na compactação das esferas também foram notadas. Em concentrações acima de 648 µg/mL de ECV, os esferoides tornaram-se mais friáveis. Durante a rotina de experimentação percebemos que alguns esferoides tratados com essa concentração de ECV se desfaziam com facilidade à simples ação mecânica da manipulação. Esse efeito foi visto com mais frequência conforme a concentração do ECV era aumentada. A exposição a 2592 µg/mL mostrou efeito muito pronunciado na compactação do esferoide, e a simples manipulação desfazia completamente a estrutura (dados não mostrados).

Com o objetivo de avaliar os efeitos de um ECV comercial (EFLA942) no crescimento, viabilidade e metabolismo das células de câncer de cólon WiDr, Mueller e colaboradores (2002) encontraram efeito semelhante ao observado no nosso trabalho. Nas maiores concentrações testadas (100 µg/mL) o ECV fragilizou a estrutura dos esferoides (100-200 µm de tamanho), que puderam ser separados pela simples agitação do meio. O mesmo autor também relatou mudanças no comportamento de adesão dessas células tratadas em monocamada, com redução da formação das colônias características desse tipo celular.

O tratamento com ECV também promoveu efeito no tamanho dos esferoides (**Figura 17**). Esse fenômeno foi notado em 24h de exposição a 648 µg/mL de ECV, tendo sido observada uma redução de 18% da área total em relação ao grupo controle. Em 48h de exposição na mesma concentração, a redução observada subiu para 24%.

Figura 17 - Área dos esferoides tratados com diferentes concentrações de ECV.



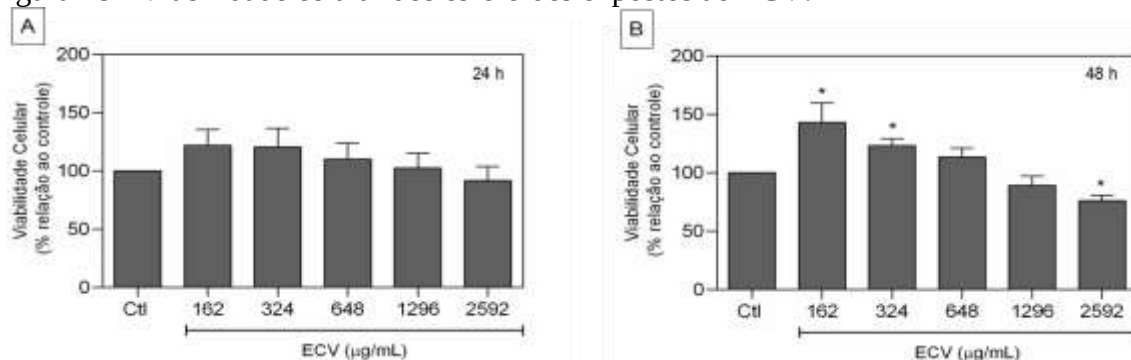
Legenda: Os esferoides foram tratados por 24h (A) e 48h (B) e as áreas das imagens obtidas foram quantificadas pelo software ImageJ[®]. Os dados foram expressos em percentual de tamanho em relação ao controle (n=3). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$ segundo o teste One Way ANOVA.

Na literatura, o efeito do chá verde na redução do crescimento de esferoides foi demonstrado em culturas 3D de células de carcinoma mamário murino 4T1 (GÜNTHER et al., 2007), cólon WiDr (MUELLER-KLIESER et al., 2002) e próstata LNCaP (SAFARI et al., 2021). Em ensaios futuros, pretendemos quantificar a expressão do marcador de proliferação Ki-67 como medida para explorar uma das vias principais de inibição do crescimento tumoral.

5.1.4 São necessárias concentrações maiores de ECV para redução na viabilidade dos esferoides

Os ensaios de viabilidade celular mostraram pouca sensibilidade ao ECV nas concentrações experimentadas. Apesar da tendência à redução da viabilidade celular, diferenças significativas na atividade enzimática das células só foram significativas após 48h de exposição e em concentrações muito altas do extrato (**Figura 18**).

Figura 18 - Viabilidade celular dos esferoides expostos ao ECV.



Legenda: A viabilidade celular foi mensurada por redução de Alamar Blue[®] em 24h (A) e 48h (B) após exposição ao ECV. Os dados foram expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle (n=3). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$ segundo o teste One Way ANOVA.

Em conjunto, os achados do tamanho e morfologia dos esferoides mostraram um efeito significativo do ECV nessas células, fenômeno que não é reforçado pelas análises de

viabilidade celular. Esses dados diferem de um estudo anterior do grupo em cultura 2D, no qual os efeitos sobre a viabilidade da MCF-7 puderam ser vistos em concentrações a partir de 250 µg/mL em 24h de exposição (SANTOS et al., 2021). Tradicionalmente, culturas 3D demonstram resistência à ação de compostos em comparação a culturas em monocamada, o que pode explicar os resultados obtidos. Grantab e colaboradores (2006) descreveram que a densidade de empacotamento representa uma barreira para a penetração de compostos ao testar os efeitos da doxorubicina em cultura de camadas multicelulares de câncer de cólon, o que, por sua vez, diminui a ação do fármaco. Nesse contexto, o tempo seria um fator importante para a penetração do ECV nos esferoides. Esse efeito está associado, em parte, às interações célula-célula e célula-matriz extracelular no esferoide que dificultam a penetração das substâncias, o que não ocorre no modelo bidimensional no qual a exposição uniforme pode refletir uma maior eficácia (IMAMURA et al., 2015).

Além disso, as diferenças inerentes à expressão gênica em cultura 3D/2D também ajudam a entender esse fenômeno. Esferoides de câncer de mama (BT474, HCC1954, EFM192A) foram mais resistentes às drogas neratinib e docetaxel, em face ao aumento tanto da atividade de CYP3A4 quanto da expressão de dois transportadores de membrana associados à resistência (PGP e BCRP). Entende-se que as respostas aos compostos no modelo 3D são menos sensíveis, tal como acontece no tumor *in vivo* (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2016).

Outra consideração importante é o método utilizado. Apesar do método de Alamar Blue[®] ter sido validado em culturas tridimensionais para avaliação da viabilidade celular (EILENBERGER et al., 2018), a arquitetura tridimensional dos esferoides já foi associada à dificuldade de acesso à própria resazurina (WALZL et al., 2014). Nesse contexto, a adição de um novo método de análise de viabilidade ou ainda, o uso de substâncias que levem ao afrouxamento (EDTA) ou ruptura (tripsina) das interações célula-célula e célula-matriz pode ser uma forma de confirmar os resultados encontrados.

5.1.5 O ECV inibe a migração das células tumorais em ambiente 3D

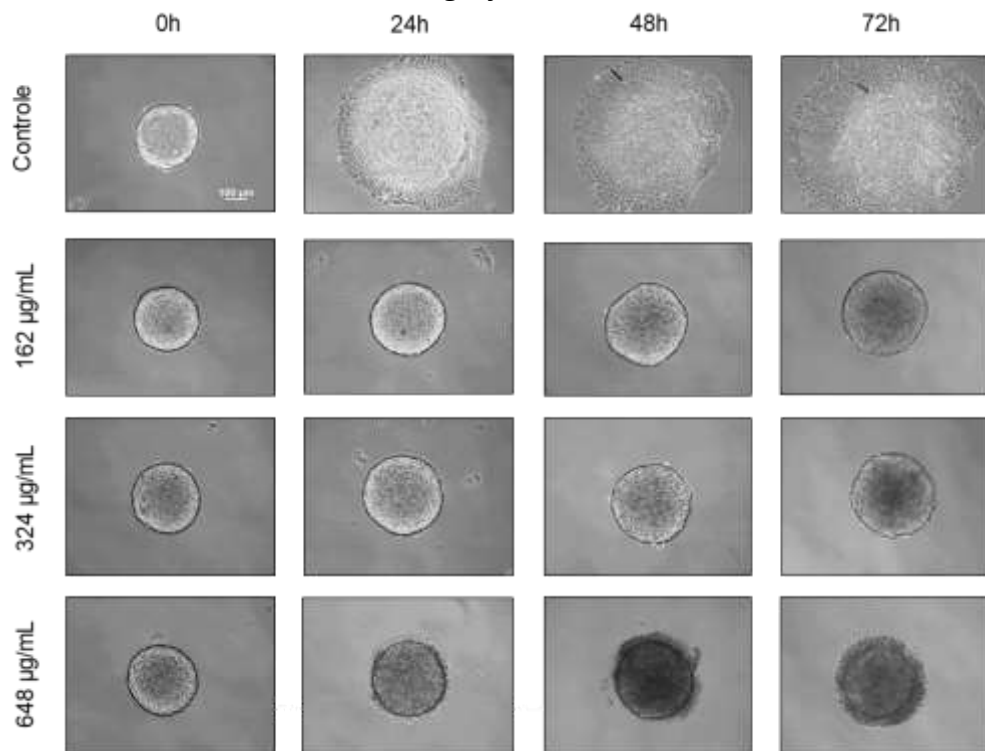
O prognóstico do câncer é agravado pelo escape de células do tumor primário para corrente sanguínea, que semeiam metástases em locais distantes no corpo. A inibição ou controle desse processo poderiam ser explorados com o objetivo de retardar a progressão da doença (VINCI et al., 2013). Por esse motivo, decidimos investigar os efeitos do ECV na migração das células dos esferoides de MCF-7.

Ao quarto dia de cultivo, os esferoides foram individualmente transferidos para uma placa de 24 poços e expostos a diferentes concentrações de ECV (162 µg/mL, 324 µg/mL,

648 $\mu\text{g/mL}$). Para conter a proliferação, o percentual de SFB foi reduzido a 2% na presença de mitomicina C.

Como pode ser observado na **Figura 19**, o ECV inibiu a migração das células nas concentrações experimentadas. De forma interessante, notamos que apesar da exposição à concentração de 162 $\mu\text{g/mL}$ de ECV não influenciar na morfologia ou crescimento do esferoide, é suficiente para inibir completamente a migração. Notamos ainda que os esferoides perderam a capacidade de aderir à placa para iniciar a migração, como acontece com o grupo controle.

Figura 19 - Efeitos do ECV sobre a migração das células dos esferoides.



Legenda: Os esferoides foram obtidos conforme descrito previamente. Com 4 dias de idade, as esferas foram individualmente transferidas para uma placa de 24 poços contendo diferentes concentrações de ECV diluído em meio com 2% de SFB e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de mitomicina C ($n=2$). Foi feita captura de imagens nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h com ampliação de 10x, utilizando o software Lumenera®.

Um dos processos biológicos que controla a migração celular é a transição epitelial-mesenquimal (TEM). A marca registrada da TEM é a regulação positiva da N-caderina seguida pela regulação negativa da E-caderina, um processo mediado por uma rede complexa de vias de sinalização e fatores de transcrição. A perda de E-caderina em células tumorais leva à disseminação metastática e ativação de vários fatores de transcrição para a TEM e essas alterações parecem favorecer a iniciação e progressão do tumor (LOH et al., 2019).

A regulação negativa da E-caderina é frequentemente encontrada em cânceres epiteliais (ROSSO et al., 2017). Já foi demonstrado em diferentes células tumorais de mama, incluindo a MCF-7, que a E-caderina é a principal molécula de adesão célula-célula, tendo

sido relatado o aumento de quase duas vezes da expressão de E-caderina em esferoides de MCF-7 em comparação à cultura em monocamada (IVASCU; KUBBIES, 2007).

Nesse contexto, o chá verde e seus compostos fenólicos são alvo de estudo como promissor alvo terapêutico. O tratamento com EGCG (10-50µg/mL) resultou em uma diminuição dose-dependente de até 66.5% na migração de células SW480 (câncer colorretal) e esse efeito estava associado à redução significativa de vimentina e aumento de E-caderina (LUO et al., 2021). Panji e colaboradores (2021) investigaram os efeitos do ECV e EGCG na TEM induzida por TGF-β em células Hela e SiHa e demonstraram que a pré-incubação com ECV (80 µg/mL) e EGCG (60 µmol/L) reverteram significativamente os impactos de TGF-β, diminuindo a expressão de vimentina e aumentando a expressão da E-caderina. É possível que a modulação da expressão de E-caderina pelo ECV explique, pelo menos em parte, o fenômeno de inibição da migração vista nos esferoides de MCF-7 desse estudo.

Outra hipótese na literatura sugere o envolvimento do ECV e seus compostos fenólicos na expressão de metaloproteinases (MMPs). As MMPs estão envolvidas na degradação de membranas basais intratumorais, afrouxando assim o contato célula-célula que facilita a migração para o sangue ou sistema linfático. A concentração plasmática e atividade elevada de MMP-2 e -9, por exemplo, já foi vista em pacientes com câncer de mama e está associada ao maior risco de desenvolvimento da doença (SOMIARI et al., 2006).

A entrada de um tumor primário em um estado metastático pode também ser regulada pela produção de ROS, que em células tumorais em crescimento acelerado são gerados de forma robusta. Uma correlação positiva entre a produção de ROS e aumento de expressão MMPs já foi relatada (SPALLAROSSA et al., 2006). A regulação da produção de ROS pelos compostos fenólicos do chá verde é uma capacidade conhecida (BAG et al., 2022). Gunther e colaboradores (2007) investigaram os efeitos de 10µM de alguns polifenóis (resveratrol, baicaleína, EC, EGC) ou de um mix de polifenóis do chá verde sobre esferoides de carcinoma de mama murino 4T1. A incubação com os polifenóis promoveu, além da redução do crescimento, a inibição significativa da migração celular. Esse efeito foi associado à capacidade antioxidante dos polifenóis vista pela redução da geração de ROS e da redução da expressão de MMP-9. O efeito do ECV (20 µg/mL) e do EGCG (7,8 - 125µg/mL) na redução de MMP-3, -8 e -9 também foi visto em uma co-cultura tridimensional de fibroblastos e monócitos U937 e nesse trabalho os autores destacaram efeito superior ECV em relação ao EGCG (MORIN; GRENIER, 2017). A ação do chá verde em MMPs também pode ser vista através do controle da sua tradução e nesse campo a modulação de microRNAs pode ser uma alternativa terapêutica. A exposição de esferoides de câncer de próstata LNCaP a 100-1000 µg/mL de ECV por 48h promoveu, entre outros desfechos, o aumento da expressão do miR-181a (SAFARI et al., 2021). As isoformas desse microRNA são conhecidas por inibir

a migração e angiogênese através da regulação de MMP-14 em células de câncer de mama SK-3 (LI et al., 2016c).

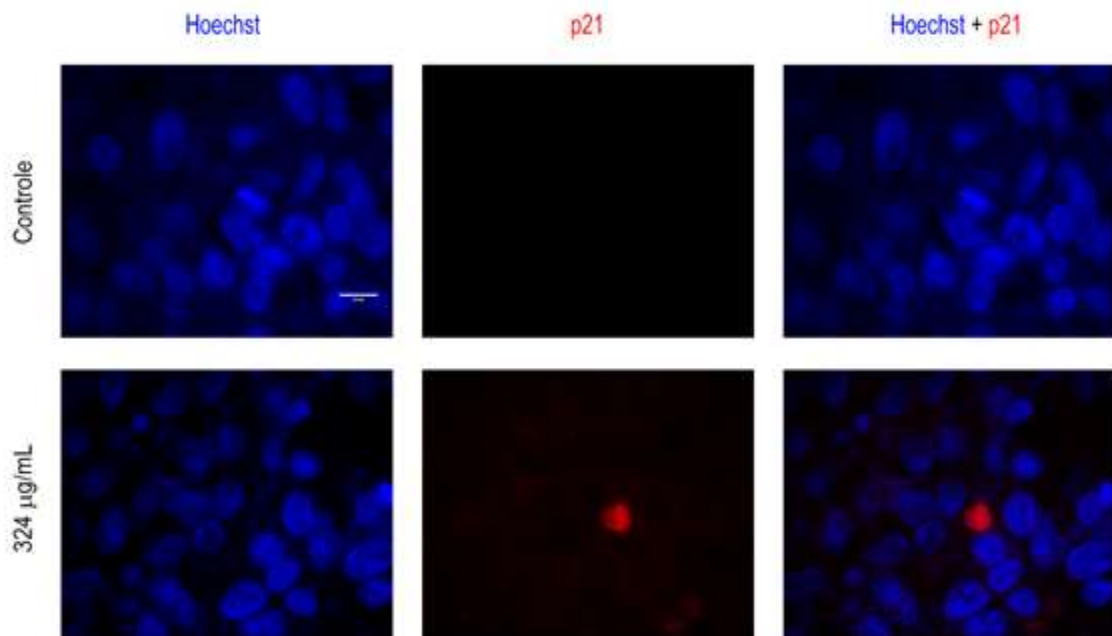
Nesse contexto, o estudo de proteínas associadas aos processos de adesão celular e de transição epitélio-mesenquimal (ex. E-caderina, N-caderina e vimentina) estão previstos e poderão trazer pistas sobre os mecanismos de ação do chá verde nesses esferoides.

5.1.6 O ECV modula a expressão da proteína p21

Tendo sido demonstrados os efeitos do ECV sobre o crescimento, compactação e migração dos esferoides de câncer de mama, investigamos um dos mecanismos moleculares que possivelmente estariam envolvidos. O controle da carcinogênese passa por vias de regulação do ciclo e morte celular no qual há o envolvimento de uma família de proteínas reguladas pela proteína supressora de tumores p53, incluindo a p21 (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000).

Para investigar a expressão da p21, os esferoides foram expostos ao ECV durante 24-48h e um ensaio de imunofluorescência foi executado. Apesar de preliminares, os dados sugeriram aumento da expressão de p21 nos esferoides tratados com 234 µg/mL com ECV já nas primeiras 24h de exposição, como pode ser visto na **Figura 20**.

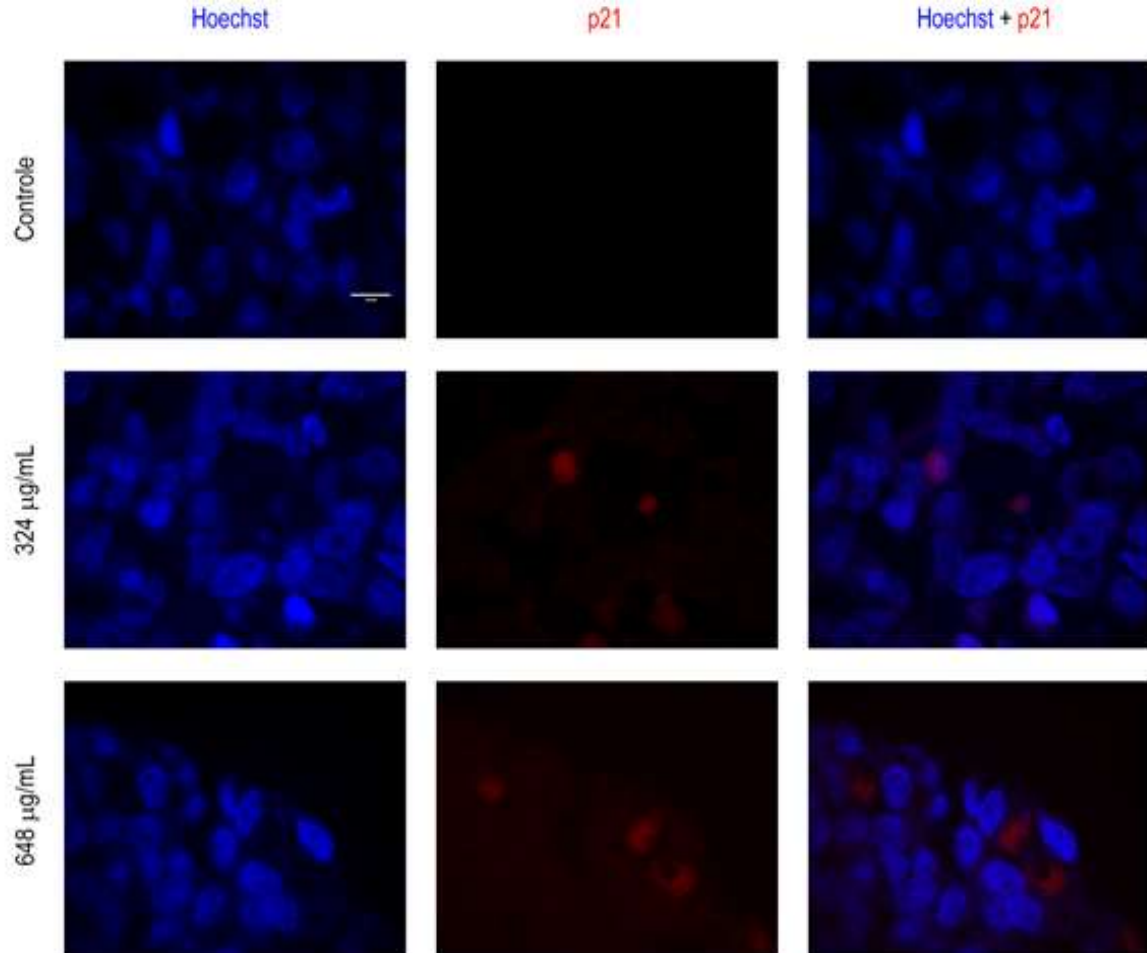
Figura 20 - Expressão de p21 nos esferoides de MCF-7 após 24h de exposição ao ECV.



Legenda: Os esferoides tratados com diferentes concentrações de ECV por 24h foram incluídos em agarose e parafina. Cortes de 3 micras foram montados em lâmina própria. Após a exposição antigênica, foi realizado bloqueio de ligações inespecíficas e a marcação com o anticorpo primário (p21), secundário (Alexa Fluor® 647) e de núcleo (Hoechst). As lâminas foram preservadas sobre uma gota de Prolong Diamond para análise. Para aquisição das imagens, foi utilizado microscópio de fluorescência EVOS® F1 com um aumento de 20x (n = 1). As barras de escala mostradas na figura correspondem a 10 µm.

O mesmo fenômeno parece ocorrer em maior escala quando os esferoides são expostos por tempo prolongado (48h) como mostra a **Figura 21**.

Figura 21 - Expressão de p21 nos esferoides de MCF-7 após 48h de exposição ao ECV.



Legenda: Os esferoides tratados com diferentes concentrações de ECV por 48h foram incluídos em agarose e parafina. Cortes de 3 micras foram montados em lâmina própria. Após a exposição antigênica, foi realizado bloqueio de ligações inespecíficas e a marcação com o anticorpo primário (p21), secundário (Alexa Fluor® 647) e de núcleo (Hoechst). As lâminas foram preservadas sobre uma gota de Prolong Diamond para análise. Para aquisição das imagens, foi utilizado microscópio de fluorescência EVOS® F1 com um aumento de 20x (n = 1). As barras de escala mostradas na figura correspondem a 10 µm.

A p21 é uma proteína inibidora de quinases dependentes de ciclina (CDK's) que atua na regulação do ciclo celular. Seu gene apresenta sítios de ligação para a proteína p53, indicando que a transcrição de p21 é diretamente regulada por p53. Em resposta a um dano no DNA, a p53 induz a expressão de p21 que interrompe o avanço do ciclo celular na transição da fase G1 para a fase S, através da inibição das CDK's (EL-DEIRY et al., 1993; WADE HARPER et al., 1993).

Já está descrito que compostos fenólicos têm como alvo proteínas que controlam o ciclo celular e apoptose e a investigação dessas vias é uma estratégia promissora para o

controle do tumor, fornecendo pistas sobre seus mecanismos de ação (KHAN et al., 2020; QIN et al., 2018). Apesar de preliminares, nossos achados mostram uma tendência o aumento da expressão da proteína p21 após o tratamento dos esferoides com o ECV, muito embora novas replicatas precisem ser realizadas de modo a confirmar esse fenômeno de forma significativa.

Os efeitos das catequinas do chá verde sobre proteínas envolvidas no ciclo celular e apoptose já foram demonstrados em culturas de células 2D. O ECV (324 µg/ml) parece capaz de aumentar a expressão de p21 e p53 em células MCF-7 cultivadas em monocamada (SANTOS et al., 2021), no entanto em culturas tridimensionais, há poucos trabalhos com esse alvo na literatura dos polifenóis.

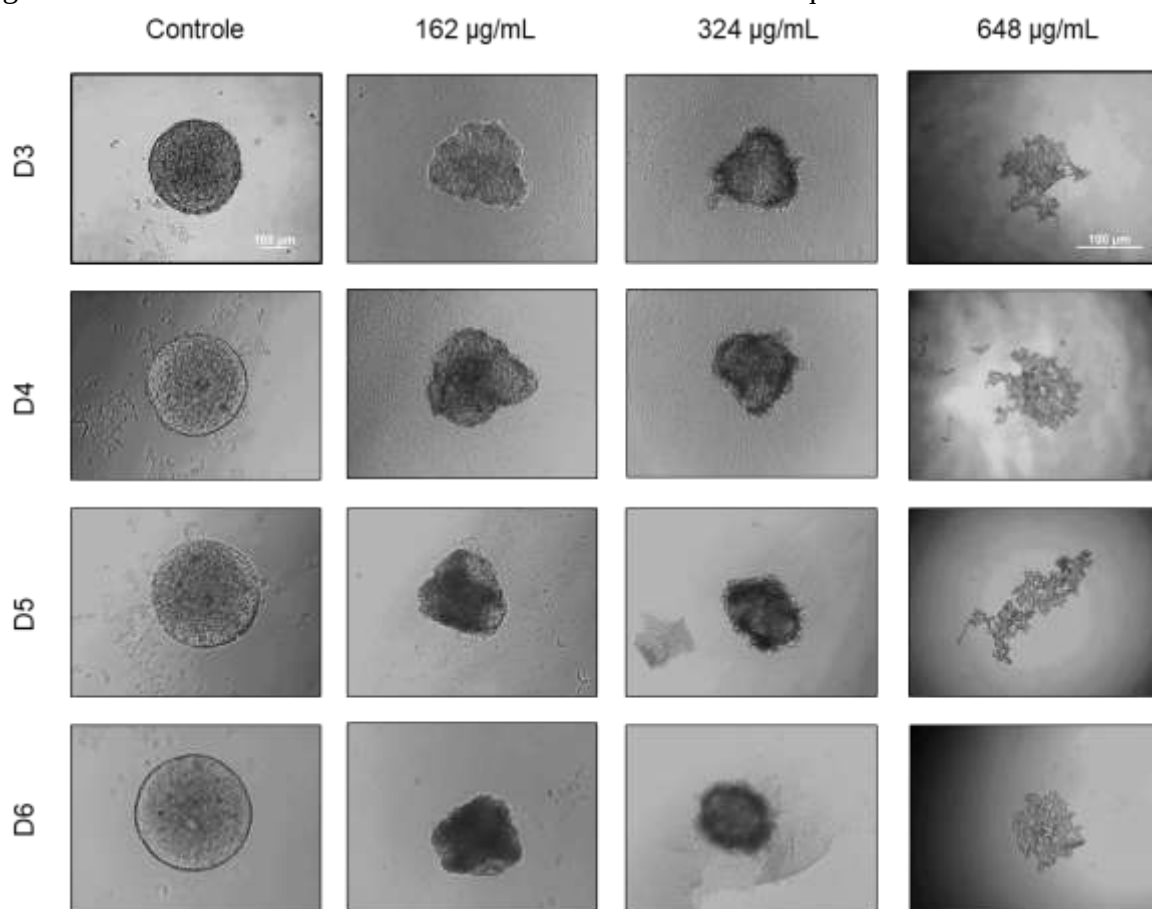
Parece haver uma dificuldade no estudo da expressão proteica em modelo tridimensional. É comum que, ao encontrar efeitos de compostos em culturas 3D, os autores investiguem as vias envolvidas a partir da expressão de proteínas obtidas das células em cultura 2D através de *Western Blotting*, por exemplo (ZHANG; YAN; CHEN, 2011). Apesar da utilidade desses achados na formulação de hipóteses sobre a ação dos compostos, sabemos que a expressão gênica em células cultivadas em 2D e 3D é distinta (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2016; KAPALCZYŃSKA et al., 2018). Supomos que, na cultura 3D pode haver dificuldade na produção de material biológico suficiente para obtenção de extratos celulares.

Ensaios futuros pretendem confirmar os achados supracitados e incluirão ainda outras proteínas envolvidas no ciclo celular e apoptose.

5.1.7 A formação dos esferoides é prejudicada pelo tratamento com ECV

Tendo em vista os efeitos do ECV sobre os esferoides formados, nos perguntamos se o extrato seria capaz de inibir sua formação. Como esse fim, um novo experimento foi desenhado e novos esferoides foram iniciados na presença de 162 µg/mL, 234 µg/mL ou 648 µg/mL do ECV. Como mostra a **Figura 22**, a exposição ao ECV produziu esferoides anômalos.

Figura 22 - Cinética de crescimento dos esferoides em meio enriquecido com ECV.



Legenda: **Um total de** $5,0 \times 10^3$ células/mL foram sedimentadas por centrifugação em placas previamente revestidas com 1% de agarose na presença de diferentes concentrações do ECV. As células foram mantidas a 37 °C, 5% de CO₂ em ambiente umidificado e acompanhadas durante 6 dias (D) (n=2). Foram capturadas a cada 24h com ampliação de 10x ou 20x, utilizando o software Lumenera®.

A formação de esferoides na presença de ECV produziu agregados menos compactados, com bordas irregulares e de menor tamanho em relação ao controle. Na concentração de 648 µg/mL de ECV a formação do esferoide é 100% inibida, muito provavelmente pelo efeito citotóxico do ECV nas células, como foi visto por estudos anteriores do nosso grupo em 2D (SANTOS et al., 2021).

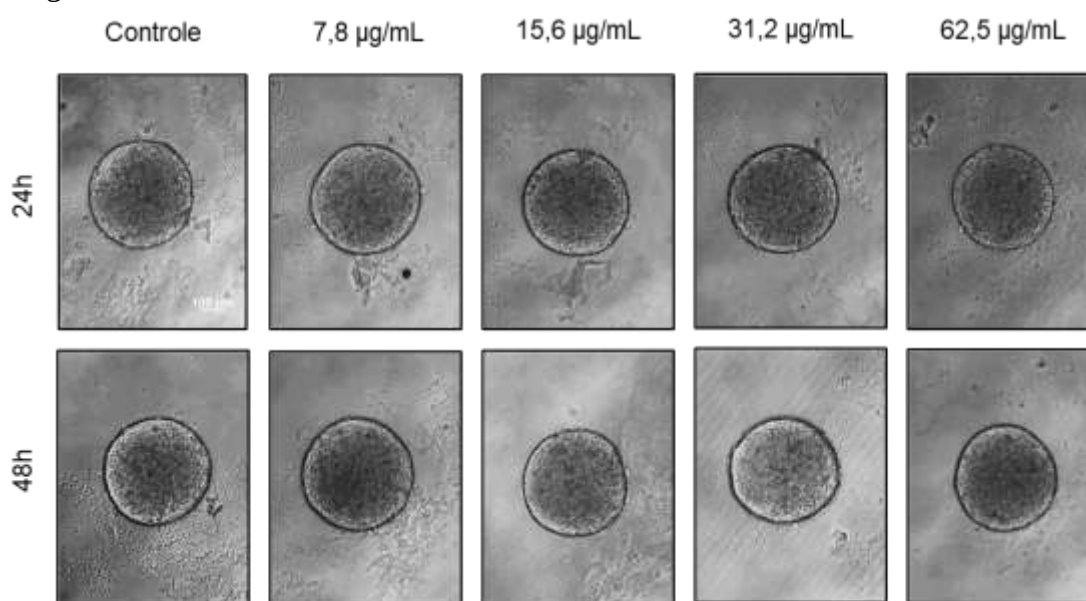
É possível que o chá verde tenha ação moduladora em proteínas quinases. A formação de esferoides A172 (glioblastoma) em ágar foi inibida na presença de 50 µM de cada uma das catequinas com o grupamento galato (CG, ECG, EGCG) e esse efeito foi atribuído à supressão da atividade da tirosina quinase de PDGF-R β , receptor envolvido na sinalização de processos de angiogênese, proliferação e migração celular (SACHINIDIS et al., 2000).

5.1.8 O tratamento com EGCG não promove os mesmos efeitos do ECV

À luz dos estudos experimentais e clínicos envolvendo fitoquímicos, a forma de administração de compostos bioativos com finalidade antitumoral vem sendo questionada por pesquisadores. Especula-se que compostos naturalmente presentes em alimentos podem aumentar a eficácia, a bioacessibilidade e a biodisponibilidade um do outro, ou ainda, que a combinação das atividades biológicas desses compostos tenham efeitos aditivos ou sinérgicos sobre um alvo específico (AGUILERA, 2019; KAPINOVA et al., 2017b; WANG et al., 2011).

Tendo sido demonstrados os impactos do ECV no crescimento, migração e expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular nos esferoides de MCF-7, indagamos se esses efeitos seriam reproduzidos pelo uso das catequinas isoladas. Para tanto, ensaios com o EGCG foram executados. Uma solução aquosa estéril de EGCG (10 mg/mL) foi diluída no próprio meio de cultura em concentrações seriadas (7,8 µg/mL, 15,6 µg/mL, 31,2 µg/mL, 62,5 µg/mL). As concentrações de EGCG são proporcionais à sua quantidade presente em cada condição experimentada anteriormente com o extrato de chá verde. Os esferoides com 4 dias de idade foram expostos durante 24h e 48h e os efeitos na morfologia dessa cultura estão representados na **Figura 23**.

Figura 23 – Efeitos do EGCG nos esferoides de MCF-7.

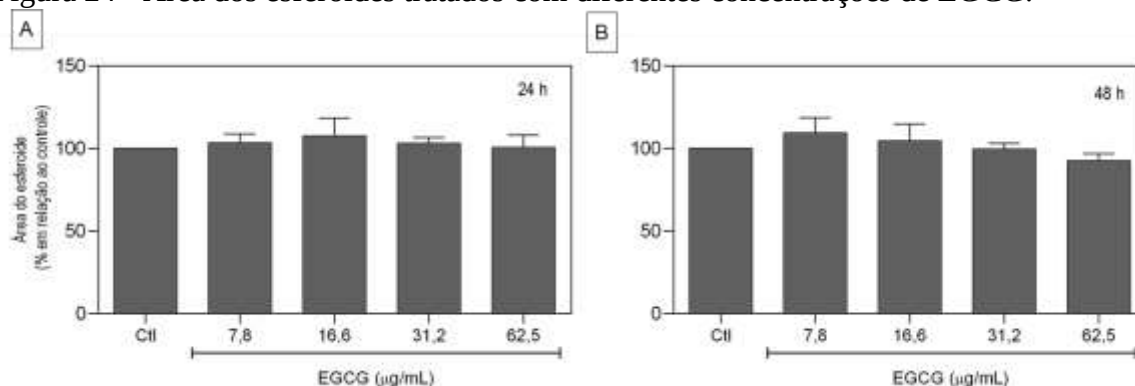


Legenda: Os esferoides foram expostos às concentrações de EGCG durante 24h (n=3) e 48h (n=3) e as imagens foram capturadas com ampliação de 10x, utilizando o software Lumenera®.

As concentrações de EGCG escolhidas foram fundamentadas em estudos em culturas tridimensionais disponíveis na literatura (MORIN; GRENIER, 2017). Em comparação ao

ECV, o EGCG parece não exercer efeitos na morfologia dessas células e não foram encontradas diferenças significativas na área dos esferoides tratados em relação ao controle (**Figura 24**).

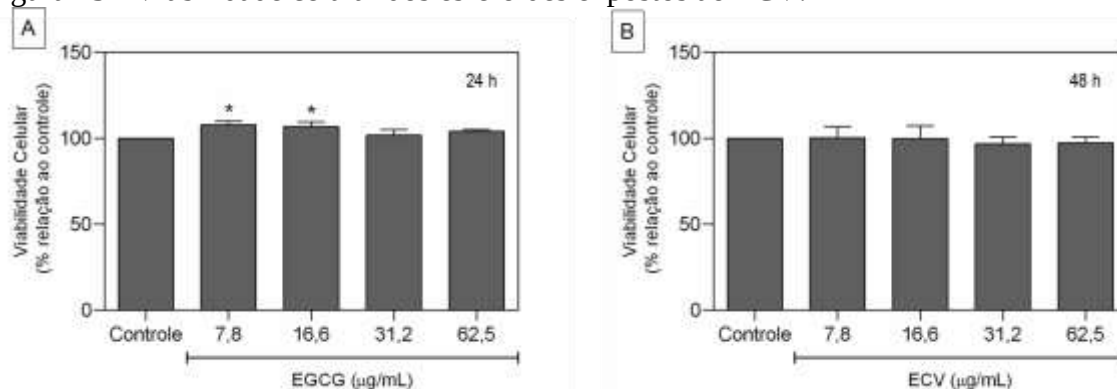
Figura 24 - Área dos esferoides tratados com diferentes concentrações de EGCG.



Legenda: Os esferoides foram expostos ao EGCG por 24h (A) e 48h (B) e as áreas das imagens obtidas foram quantificadas pelo software ImageJ[®]. Os dados foram expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle (n=3). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$ segundo o teste One Way ANOVA.

Ensaios de viabilidade por Alamar Blue[®] também falharam em demonstrar efeitos da EGCG nas concentrações experimentadas (**Figura 25**).

Figura 25 - Viabilidade celular dos esferoides expostos ao ECV.



Legenda: A viabilidade celular foi mensurada por Alamar Blue[®] em 24h (A) e 48h (B) após exposição ao EGCG. Os dados foram expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle (n=3). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$ segundo o teste One Way ANOVA.

Os componentes da matriz alimentar do chá verde são grandes coadjuvantes na biodisponibilidade das catequinas. A cafeína, um componente natural do chá verde, por exemplo, parece influenciar positivamente na absorção do EGCG em humanos quando administrada em doses equivalentes às encontradas na bebida (NAKAGAWA et al., 2009).

A segurança também é um fator importante a ser considerado. A literatura traz evidências de que o chá verde é bem tolerado, com poucos efeitos adversos descritos (0,6%). Porém, os casos de toxicidade encontrados estão diretamente relacionados à concentração

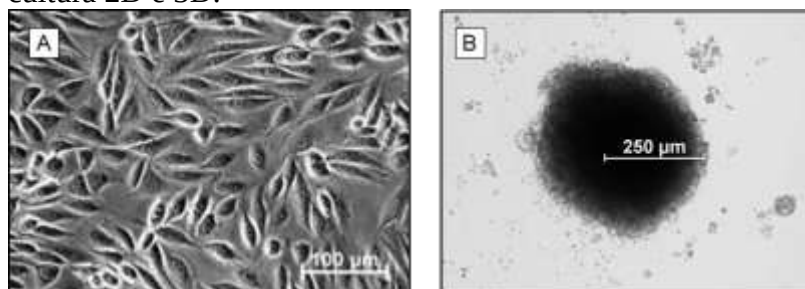
total de catequinas oferecida, e nesse contexto, o uso da matriz traz mais segurança. Estudos em animais demonstraram que menos efeitos adversos (perda de peso, irritação da mucosa do trato-gastrointestinal, ulceração, necrose) são observados em animais expostos ao ECV com menor concentração de catequinas (<40% p/p) em comparação ao uso das catequinas isoladas ou extratos com altas doses dessas substâncias. Estudos em humanos sugerem que preparações com o CV são melhor toleradas na forma de bebidas do que em cápsulas ou *bolus*, já que estes últimos aumentam a dose de catequinas livres na circulação e fígado (HU et al., 2018).

Nossos dados mostraram que os efeitos do ECV nos esferoides de MCF-7 foram mais pronunciados em relação à catequina isolada e estudos como esse reforçam a importância do uso do chá verde na sua matriz alimentar.

5.1.9 Estabelecimento e caracterização da cultura 3D de MCF-10A

Tendo em vista a importância de entender se os efeitos do ECV são específicos ou citotóxicos, iniciamos a execução das mesmas condições de tratamento em esferoides não tumorais de mama da linhagem MCF-10A. Assim como as células MCF-7, as células MCF-10A tem igual capacidade para a formação espontânea de esferoides. No entanto, por se tratar de uma linhagem não tumoral, seu crescimento é mais lento e por isso a densidade de células antes utilizada aplicada à MCF-10A não foi suficiente para gerar o esferoide (dados não mostrados). Por isso, o número de células semeadas na iniciação foi ajustada para $1,0 \times 10^5$ céls/mL. O aspecto da cultura 3D desta linhagem e seu contraste à cultura bidimensional estão ilustrada na **Figura 26**.

Figura 26 - Morfologia da linhagem celular MCF-10A em cultura 2D e 3D.



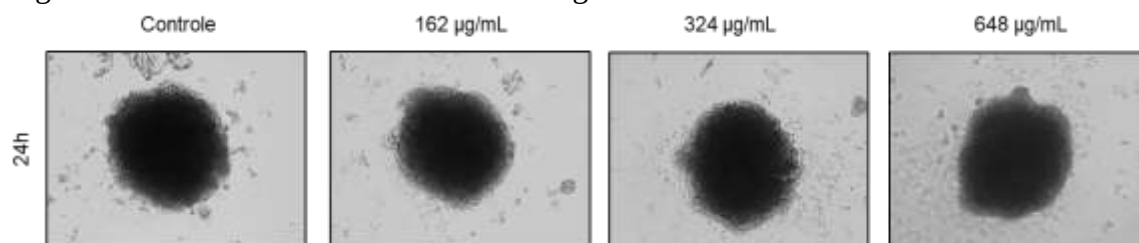
Legenda: As imagens de microscopia óptica capturadas em nosso laboratório mostram como a morfologia das células MCF-10A difere substancialmente quando cultivadas em ambiente 2D (A) e 3D (B). As imagens foram obtidas com um aumento de 20x (A) e 10x (B).

A estrutura assumida pelos esferoides gerados a partir da MCF-10A, diferente da MCF-7, forma agregados de células associadas menos compactadas, mas robustos o suficiente para preservar sua forma durante a manipulação. Essa morfologia foi vista em outros trabalhos da literatura (KELM et al., 2003; LIN & CHANG, 2008).

5.1.10 O ECV não tem efeitos citotóxicos em esferoides de células não tumorais

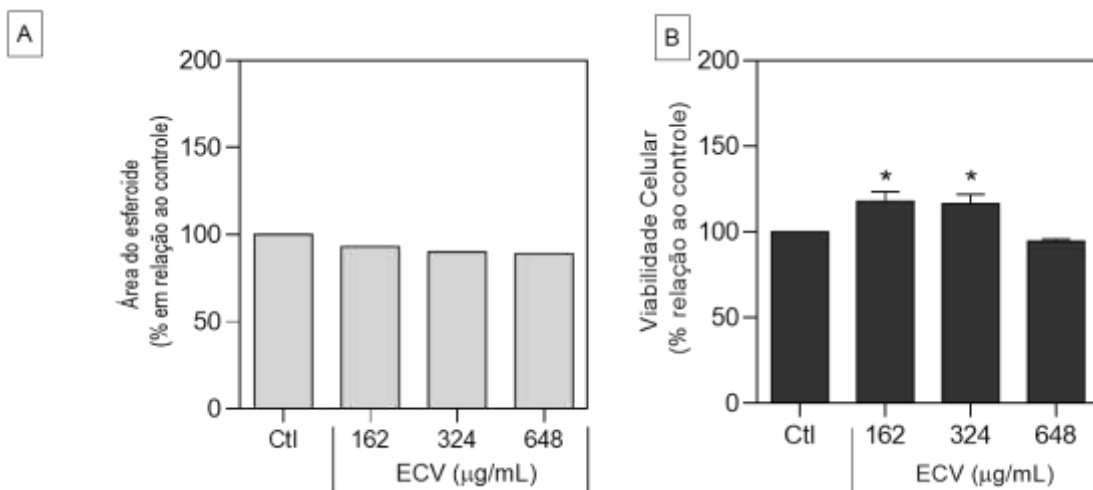
Para avaliação do efeito do ECV nesses esferoides, as mesmas concentrações e testes foram experimentados. Os dados sugerem que o ECV não exerce atividade citotóxica para esses esferoides nas concentrações utilizadas (**Figuras 27 e 28**).

Figura 27 - Efeitos do ECV sobre a morfologia dos esferoides não tumorais.



Legenda: 1×10^5 células da linhagem MCF-10A foram sedimentadas por centrifugação em placas previamente revestidas com 1% de agarose. O ECV foi adicionado diluído no próprio meio de cultura 72h após da iniciação. Os esferoides foram expostos às concentrações de ECV durante 24h e as imagens foram capturadas com ampliação de 10x, utilizando o software Lumenera® (n=1).

Figura 28 - Efeitos do ECV sobre o crescimento e viabilidade dos esferoides não tumorais.



Legenda: 1×10^5 células da linhagem MCF-10A foram sedimentadas por centrifugação em placas previamente revestidas com 1% de agarose e tratados por 24h. As áreas das imagens obtidas foram quantificadas pelo software ImageJ® e os dados foram expressos em percentual de tamanho em relação ao controle (n=1) (A). A viabilidade celular foi mensurada por Alamar Blue® e os dados foram expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle (n=2) (B). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$ segundo o teste One Way ANOVA.

Os dados mostrados até então mostraram a relevância do uso de culturas tridimensionais e da matriz do alimento na pesquisa para possíveis fins terapêuticos para o câncer. No entanto, apesar da utilidade dos modelos 3D para mimetizar determinadas condições controladas *in vitro*, uma limitação desse estudo diz respeito à exclusão de fatores que não podem ser reproduzidos neste modelo e que são encontrados em tumores *in vivo* como, por exemplo, a digestão e absorção das catequinas, o papel da microbiota e a resposta imunológica. Por esses motivos, estudos que investiguem a ação do ECV em modelos *in vivo* trariam mais informações sobre o impacto dos polifenóis na progressão e controle do câncer de mama.

5.2 PARTE II – Investigação do efeito quimiopreventivo do ECV *in vivo*

5.2.1 Estabelecimento dos xenoenxertos de células de câncer de mama em modelo animal

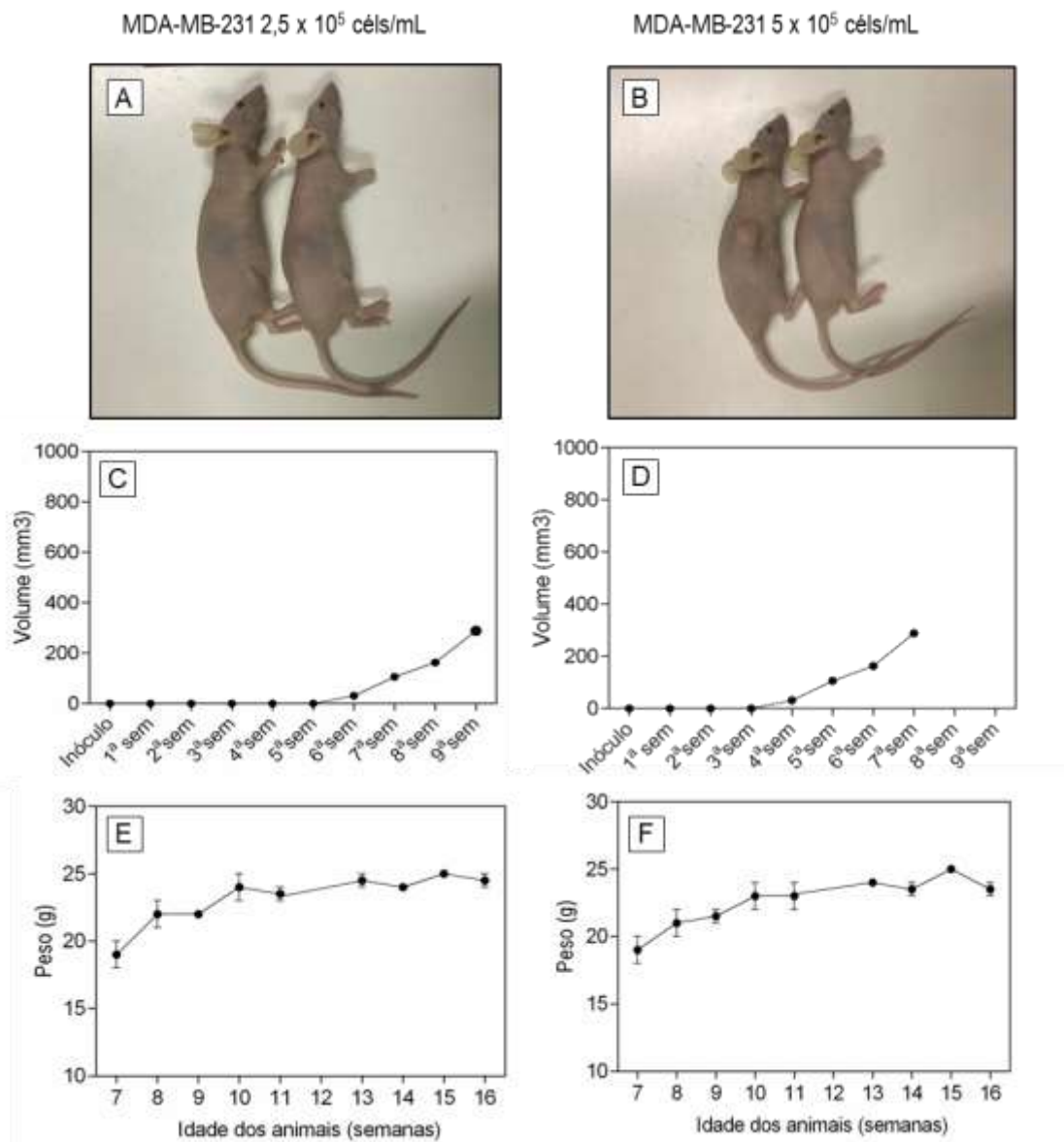
A prevenção do câncer sem dúvida é uma estratégia mais eficaz que o tratamento e especula-se em alguns estudos epidemiológicos que o consumo de chá verde exerça efeito quimiopreventivo (ROY; BALIGA; KATIYAR, 2005). O posicionamento da Academia de Nutrição e Dietética dos Estados Unidos já postulava em 2004 com grau de evidência moderado uma associação entre o consumo de 4-6 xícaras de chá verde e a redução de alguns tipos de câncer (HASLER; BLOCH; THOMSON, 2004).

Um outro braço deste projeto pretende entender o impacto do ECV sobre o desenvolvimento e progressão de tumores de mama *in vivo*. Precisamos considerar que a absorção de compostos bioativos depende da biotransformação realizada pelas bactérias da microbiota intestinal (GUO et al., 2019; YONG FENG, 2006a). Há registros de mais de 31 metabólitos das catequinas do chá verde, em especial os derivados de EGCG (denominadas M4, M6 e M6') descritos para humanos, ratos e camundongos (MENG et al., 2002; YONG FENG, 2006a). Desta forma, o melhor entendimento dos efeitos das catequinas a partir de seus metabólitos exige modelos experimentais que contemplem essa etapa e, nesse sentido, os estudos em modelo animal podem complementar os achados *in vitro*.

Um estudo piloto foi conduzido com o objetivo de estabelecer a melhor densidade celular do enxerto e o tempo médio de duração do experimento. Após ambientação, 8 fêmeas de camundongos B6C/c nude foram divididas em quatro grupos. Nessa etapa, foram utilizadas as linhagens de células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, que foram injetadas por via subcutânea em um dos flancos de cada animal, nas densidades de $2,5 \times 10^6$ céls/mL.

Os tumores obtidos da linhagem MDA-MB-231 apresentaram características heterogêneas em relação a tamanho e formato. Foi possível notá-los primeiramente no grupo que recebeu maior densidade de células, na 4ª semana pós inóculo e mediam 265 mm^3 (± 306). No grupo inoculado com $2,5 \times 10^6$ céls/mL os tumores só puderam ser medidos duas semanas depois. Neste, apenas um animal desenvolveu o tumor que tinha um volume de 289 mm^3 (Figura 29).

Figura 29 - Crescimento dos xenoenxertos de MDA-MB-231

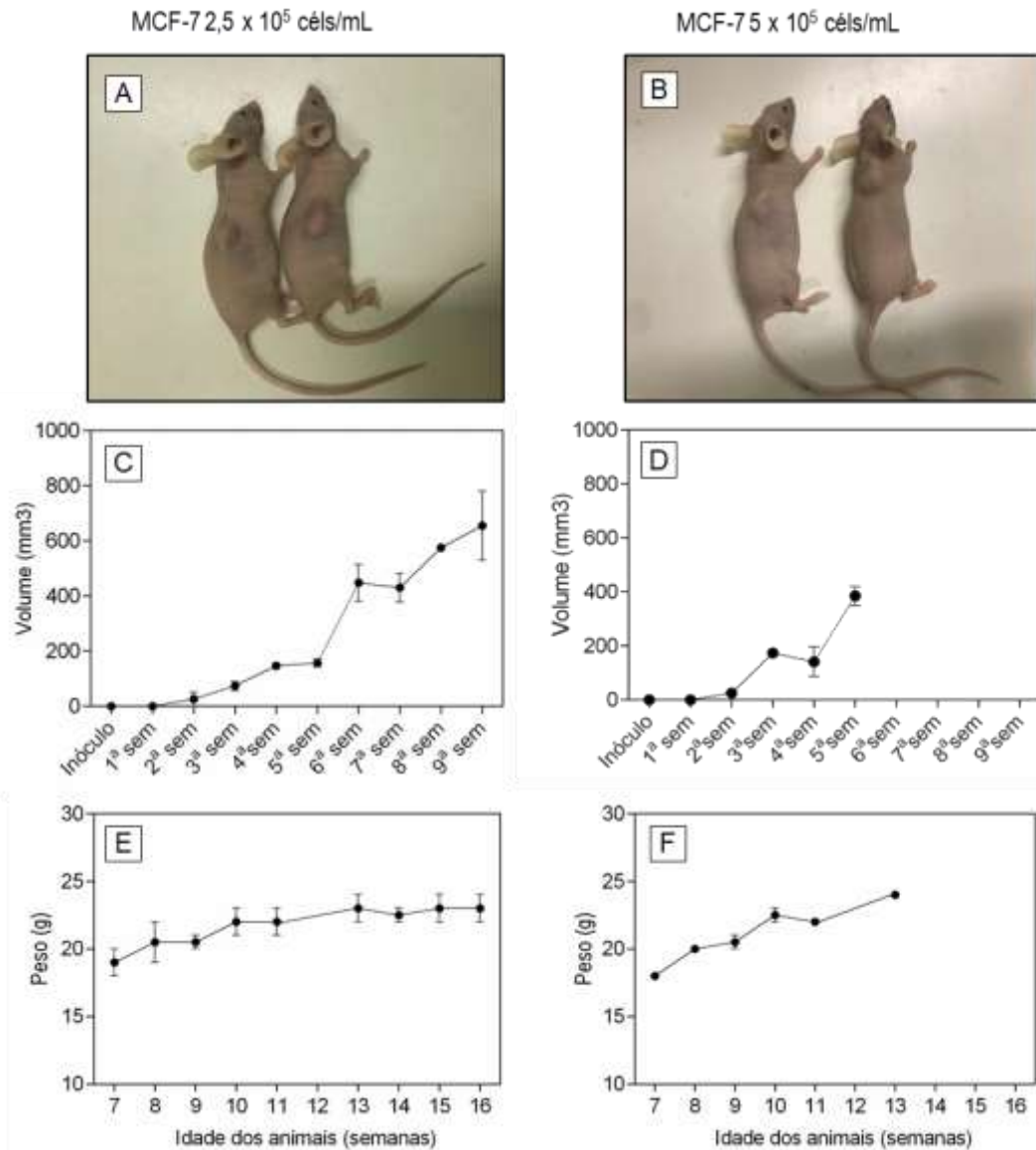


Legenda: os tumores da linhagem MDA-MB-231 puderam ser observados em ambos os grupos enxertados (A,B). Os gráficos mostram a evolução do tamanho dos tumores (C, D) (n=2) e a evolução do peso dos animais (E,F) (n=2).

Os tumores obtidos da linhagem MCF-7 possuíam características mais homogêneas e puderam ser observados ao fim da segunda semana pós inóculo em ambos os grupos. Nos

animais inoculados com $2,5 \times 10^6$ céls/mL os tumores atingiram em média 655 mm^3 (± 177). Nos animais que receberam uma densidade de 5×10^6 céls/mL, os tumores cresceram mais rapidamente e na quinta semana já mediam 385 mm^3 (± 49) (**Figura 30**).

Figura 30 - Desenvolvimento dos xenoenxertos de MCF-7.



Legenda: os tumores da linhagem MCF-7 puderam ser observados em ambos os grupos enxertados (A,B). Os gráficos mostram a evolução do tamanho dos tumores (C, D) (n=2) e a evolução do peso dos animais (E,F) (n=2).

Em virtude do perfil de crescimento das linhagens, uniformidade dos tumores e tempo de acompanhamento ideal previsto para o tratamento com o chá verde, a linhagem MCF-7 na densidade de $2,5 \times 10^6$ céls/mL foi escolhida para os próximos ensaios.

5.2.2 O ECV parece atrasar o aparecimento dos tumores *in vivo*

Com a finalidade de estudar o efeito do ECV no crescimento dos tumores, um novo ensaio foi executado. Para isso, 10 fêmeas da mesma espécie foram aleatoriamente divididas em dois grupos: (1) grupo quimioprevenção (n=5) que recebeu 0.5% de ECV na água de beber duas semanas antes do xenoenxerto até o fim do experimento e o (2) grupo controle (n=5), que recebeu apenas água.

Pelo fato de os tumores não terem se desenvolvido adequadamente, o experimento foi encerrado na oitava semana pós-enxerto. Contudo, pudemos notar que os tumores do grupo que recebeu ECV apareceram com 4 dias de atraso em relação ao grupo controle (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Volume dos tumores de xenoenxerto de MCF-7

		Volume dos tumores (mm ³)												
Data/ID		18/04	21/04	25/04	29/04	02/05	06/05	09/05	13/05	16/05	20/05	23/05	27/05	30/05
Controle	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	27.9	29.2	30.2	50.9	82.2	74.0	73.6
	3	0.0	0.0	33.7	22.5	42.7	45.4	45.6	46.0	36.7	48.1	49.4	50.4	52.4
	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	5	0.0	0.0	47.1	57.6	41.3	45.1	41.5	37.8	72.6	88.1	80.6	85.7	62.9
Quimioprevenção	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.9	44.4
	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	35.4	40.7	41.1	33.4	31.7	29.6	56.9
	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	54.0	45.9	54.5	53.3	62.5	62.8
	4	0.0	0.0	0.0	14.8	39.1	39.7	43.1	43.4	60.1	56.8	54.2	51.1	66.3
	5	0.0	0.0	0.0	26.5	39.1	39.1	35.8	36.8	36.5	32.8	27.8	25.6	32.7

Legenda: ID = identificação do animal. Para o cálculo do volume, foi utilizada a fórmula $v = 0,52 \times \text{comprimento}^2 \times \text{largura}$.

Achados na literatura mostraram que a oferta de 0,3% do ECV na água de beber de ratos Sprague-Dawley prévia à indução de câncer de mama por 7,12- dimetilbenzantraceno (DMBA) estava relacionada ao aumento da latência e redução da incidência e do tamanho dos tumores (KAVANAGH et al., 2001). Baliga e seu grupo (2005), ao avaliar o efeito de 0,2-0,5% de GTP no câncer de mama induzido por xenoenxerto de células de carcinoma mamário murino 4T1, reportaram um atraso de 3 dias no aparecimento dos tumores nos grupos tratados, além da redução da taxa de crescimento da ordem de 24% e 53% respectivamente para as doses utilizadas, o que pode explicar o aumento de sobrevivência dos animais. Com essa expectativa, um novo ensaio deverá ser conduzido para confirmar os achados preliminares.

CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho, levantadas a partir da investigação da atividade antitumoral do extrato do chá verde (*Camellia sinensis*) sobre células tumorais de mama, podem ser pontuadas a seguir:

- O ECV obtido não foi capaz de reduzir a viabilidade celular dos esferoides MCF-7, que parecem mais resistentes ao ECV em relação a estudos anteriores em cultura 2D;
- O ECV inibiu a migração *in vitro* das células do esferoide;
- Parece haver aumento da expressão de p21 nos esferoides de MCF-7 expostos ao ECV e é possível que esse o resultado esteja associado ao controle do ciclo celular;
- O padrão de crescimento, tamanho e morfologia dos esferoides é alterado pelo tratamento com ECV;
- A exposição prévia ao ECV produz estruturas anômalas de esferoides MCF-7;
- Os impactos do ECV no tamanho e morfologia dos esferoides foram superiores aos do EGCG, demonstrando a vantagem no uso da matriz alimentar;
- Os dados do tratamento com ECV na linhagem MCF-10A não sugerem efeito citotóxico nesses esferoides, o que reforça a seletividade do extrato para a linhagem de câncer.
- Foi possível estabelecer os xenoinxertos de células MCF-7 em modelo *in vivo* e a oferta de ECV para os animais parece promover atraso no aparecimento dos tumores em comparação ao grupo controle.

Juntos, esses achados mostram o potencial do chá verde na modulação de fenômenos importantes ao controle tumoral como a formação, o crescimento, a migração e a expressão de uma proteína envolvida no controle do ciclo celular. Em algumas análises, inclusive, o efeito do extrato de chá verde ocorreu de forma mais eficiente que sua principal catequina isolada (EGCG). Esses dados reforçam a importância e a necessidade do estudo dos efeitos antitumorais de compostos bioativos a partir do uso de matrizes alimentares. A investigação de outras proteínas envolvidas no processo de apoptose, ciclo celular e transição epitélio-mesenquimal ajudarão a explicar os mecanismos pelos quais o chá verde exerce seu potencial quimiopreventivo.

PERSPECTIVAS

Devido à crise sanitária e ao isolamento social imposto pela pandemia da COVID-19, com consequente limitação ao acesso às instalações da Universidade e de Laboratórios parceiros como o INCA, tivemos uma redução expressiva das atividades presenciais de pesquisa em nosso grupo, além de atrasos logísticos na aquisição de insumos durante os anos de 2020 e 2021. Desta forma, alguns dos experimentos descritos não puderam ser realizados em totalidade e precisam de replicatas adicionais, que estão previstas. Outros que não puderam ser iniciados estão incluídos nas perspectivas deste trabalho, como:

- Investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos promovidos pelo ECV nos esferoides com foco em proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e apoptose (ex. p53, caspases efetoras, como caspase-3 e caspase-7; PARP; BAX; PUMA, entre outras) e proteínas associadas aos processos de adesão celular e de transição epitélio-mesenquimal (ex. E-caderina, N-caderina e vimentina);
- Avaliar a influência do consumo de ECV sobre o crescimento de tumores xenográficos de células MCF-7, estabelecidos em camundongos nude.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, J. M. The food matrix: implications in processing, nutrition and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 22, p. 3612–3629, 2019.
- ARFAOUI, L. Dietary plant polyphenols: Effects of food processing on their content and bioavailability. **Molecules**, v. 26, n. 10, 2021.
- BAG, S. et al. Tea and its phytochemicals: Hidden health benefits & modulation of signaling cascade by phytochemicals. **Food Chemistry**, v. 371, n. September 2021, p. 131098, 2022.
- BALAPPANAVAR, A. Y. Tea and Oral Health. In: **Tea - From Chemistry to Pharmacology**. p. 1–14, 2019.
- BALIGA, M. S.; MELETH, S.; KATIYAR, S. K. Growth Inhibitory and Antimetastatic Effect of Green Tea Polyphenols on Metastasis-Specific Mouse Mammary Carcinoma 4T1 Cells In vitro and In vivo Systems. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 1918–1927, 2005.
- BANCIROVA, M. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1379–1382, 2010.
- BERNARD, W. S.; CHRISTOPHER, P. W. World cancer report. **World Health Organization**, 2020.
- BERNARD W. STEWART; WILD, C. P. World Cancer Report. **World Health Organization**, 2014.
- BERNATONIENE, J.; KOPUSTINSKIENE, D. M. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 965, 2018.
- BOIVIN, D. et al. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 374–380, 2009.
- BONNIER, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 124–131, 2015.
- BRADFELD, A. E.; BATE-SMITH, E. C. Chromatographic behaviour and chemical structure II. The tea catechins. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 4, n. C, p. 441–444, 1950.
- BRADFELD, P. 7. The catechins of green tea. Part I. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 32–36, 1947.
- BRASIL. Guia Alimentar para a População Brasileira. **Ministério da Saúde**, 2014.
- BRASIL. Estimativa | 2020 Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, 2019.
- BRASIL. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil 2021-2030. **Ministério da Saúde**, v. 1, 2021.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 45745–45756, 2016.

CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013.

CHENG, W. H. Green Tea: An Ancient Antioxidant Drink for Optimal Health? **Journal of Nutrition**, v. 149, n. 11, p. 1877–1879, 2019.

COSTA, E. C. et al. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1427–1441, 2016.

DAMIANAKI, A. et al. Potent Inhibitory Action of Red Wine Polyphenols on Human Breast Cancer Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 441, p. 429–441, 2000.

DEB, G. et al. Epigenetic induction of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 by green tea polyphenols in breast cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 6, p. 485–499, 2015.

DECARLI, M. C. et al. Cell spheroids as a versatile research platform: Formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications. **Biofabrication**, v. 13, n. 3, 2021.

DO AMARAL, J. B. et al. MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 17, n. 11, p. 1097–1107, 2011.

EILENBERGER, C. et al. Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids. **MethodsX**, v. 5, p. 781–787, 2018.

EL-DEIRY, W. S. et al. WAF1, a Potential Mediator of P53 Tumor Suppression. **Cell Press**, v. 75, n. 4, p. 817–825, 1993.

FARDET, A. A shift toward a new holistic paradigm will help to preserve and better process grain products' food structure for improving their health effects. **Food and Function**, v. 6, n. 2, p. 363–382, 2015.

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nat. Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

FRIEDRICH, J.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D : Spheroids – old hat or new challenge ? **Informa Healthcare**, v. 83, n. December, p. 849–871, 2007.

GAN, R.-Y. et al. Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 6, p. 924–941, 2018.

GLICKLIS, R.; MERCHUK, J. C.; COHEN, S. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 6, p. 672–680, 2004.

GHOSH, S. et al. P53 amyloid formation leading to its loss of function: Implications in cancer pathogenesis. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, n. 10, p. 1784–1798, 2017.

GRAHAM, H. N. Green Tea Composition, Consumption and Polyphenol Chemistry. **Preventive Medicine**, v. 21, n. 3, p. 334–350, 1992.

GRANTAB, R.; SIVANANTHAN, S.; TANNOCK, I. F. The penetration of anticancer drugs

through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 1033–1039, 2006.

GU, J. W. et al. EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression. **Vascular Cell**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2013.

GÜNTHER, S. et al. Polyphenols prevent cell shedding from mouse mammary cancer spheroids and inhibit cancer cell invasion in confrontation cultures derived from embryonic stem cells. **Cancer Letters**, v. 250, n. 1, p. 25–35, 2007.

GUO, T. et al. Interactions of tea catechins with intestinal microbiota and their implication for human health. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 1617–1625, 2019.

HANAHAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARBORNE, J. B. Methods in Plant Biochemistry: Plant Phenolics. **Phytochemical Analysis**, v. 4, p. 48, 1991.

HARRISSON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 98, p. 140–143, 1906.

HASLER, C. M.; BLOCH, A. S.; THOMSON, C. A. Position of the American Dietetic Association: Functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 5, p. 814–826, 2004.

HOARAU-VÉCHOT, J. et al. Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, p. 1–7, 2011.

HU, J. et al. The safety of green tea and green tea extracts consumption in adults – Results of a systematic review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 412–433, 2018.

HUANG, C. H. et al. EGCG inhibits protein synthesis, lipogenesis, and cell cycle progression through activation of AMPK in p53 positive and negative human hepatoma cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 9, p. 1156–1165, 2009.

HUANG, C. Y. et al. Mechanism of egcg promoting apoptosis of MCF-7 cell line in human breast cancer. **Oncology Letters**, v. 14, n. 3, p. 3623–3627, 2017.

IFIE, I.; MARSHALL, L. J. Food processing and its impact on phenolic constituents in food. **Cogent Food and Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2018.

IMAMURA, Y. et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1837–1843, 2015.

INSTITUTO ONCOGUIA. Covid-19 deixa ao menos 50 mil sem diagnóstico de câncer. Acesso em maio de 2020. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/covid19->

[deixa-ao-menos-50-mil-sem-diagnostico-de-cancer/13619/7/](#)

IVANOV, D. P.; GRABOWSKA, A. M. Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 1–12, 2017.

IVASCU, A.; KUBBIES, M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 6, p. 1403–1413, 2007.

JOHNSTON, R. B. Arsenic and the 2030 Agenda for sustainable development. **Arsenic Research and Global Sustainability - Proceedings of the 6th International Congress on Arsenic in the Environment, AS 2016**, p. 12–14, 2016.

KAPALCZYŃSKA, M. et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of Medical Science**, v. 14, n. 4, p. 910–919, 2018.

KAPINOVA, A. et al. Are plant-based functional foods better choice against cancer than single phytochemicals? A critical review of current breast cancer research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, n. November, p. 1465–1477, 2017a.

KAPINOVA, A. et al. Are plant-based functional foods better choice against cancer than single phytochemicals? A critical review of current breast cancer research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1465–1477, 2017b.

KAUSHIK, G.; PONNUSAMY, M. P.; BATRA, S. K. Concise Review: Current Status of Three-Dimensional Organoids as Preclinical Models. **Stem Cells**, v. 36, n. 9, p. 1329–1340, 2018.

KAVANAGH, K. T. et al. Green Tea Extracts Decrease Carcinogen-Induced Mammary Tumor Burden in Rats and Rate of Breast Cancer Cell Proliferation in Culture. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, p. 387–398, 2001.

KELM, J. M. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 2, p. 173–180, 2003.

KENNY, P. A. et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Molecular Oncology**, v. 1, n. 1, p. 84–96, 2007.

KHAN, H. et al. Anti-cancer effects of polyphenols via targeting p53 signaling pathway: updates and future directions. **Biotechnology Advances**, v. 38, p. 107385, 2020.

KOCH, W. Dietary polyphenols-important non-nutrients in the prevention of chronic noncommunicable diseases. A systematic review. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1039, 2019.

KOHRI, T. et al. Metabolic Fate of (–)-[4- ³H]Epigallocatechin Gallate in Rats after Oral Administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4102–4112, 2001.

KOTECHA, R.; TAKAMI, A.; ESPINOZA, J. L. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 52517–52529, 2016.

- KUMARI, V. et al. Feasibility study on renewable energy system in tea (*Camellia sinensis*) estates of North-East India. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 91, n. 11, p. 1631–1635, 2021.
- LANGAN, L. M. et al. Direct measurements of oxygen gradients in spheroid culture system using electron parametric resonance oximetry. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–13, 2016.
- LAZZERONI, M. et al. A presurgical study of lecithin formulation of green tea extract in women with early breast cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 10, n. 6, p. 363–369, 2017.
- LEE, M. et al. Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of Green Tea and (–)-Epigallocatechin-3-gallate by Humans — Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. **Cancer Epidemiology**, v. 11, n. 10, p. 1025–1032, 2002.
- LEE, M. H. et al. Apoptosis of human fibrosarcoma HT-1080 cells by epigallocatechin-3-O-gallate via induction of p53 and caspases as well as suppression of Bcl-2 and phosphorylated nuclear factor- κ B. **Apoptosis**, v. 16, n. 1, p. 75–85, 2011.
- LI, M. et al. Evaluation of breast cancer risk associated with tea consumption by menopausal and estrogen receptor status among Chinese women in Hong Kong. **Cancer Epidemiology**, v. 40, p. 73–78, 2016a.
- LI, W. et al. Inhibitory effects of polyphenol-enriched extract from Ziyang tea against human breast cancer MCF-7 cells through reactive oxygen species-dependent mitochondria molecular mechanism. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 3, p. 527–538, 2016b.
- LI, Y. et al. microRNA-181a-5p Inhibits Cancer Cell Migration and Angiogenesis via Downregulation of Matrix Metalloproteinase-14. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016c.
- LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 9–10, p. 1172–1184, 2008.
- LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12 SUPPL., p. 3479–3485, 2004.
- LOH, C. Y. et al. The e-cadherin and n-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: Signaling, therapeutic implications, and challenges. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1118, 2019.
- LOVITT, C.; SHELPER, T.; AVERY, V. Advanced Cell Culture Techniques for Cancer Drug Discovery. **Biology**, v. 3, n. 2, p. 345–367, 2014.
- LUO, K. W. et al. Tea polyphenol EGCG inhibited colorectal-cancer-cell proliferation and migration via downregulation of STAT3. **Gastroenterology Report**, v. 9, n. 1, p. 59–70, 2021.
- MACDONALD, S.; ONCOLOGY, R.; GENERAL, M. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 70, n. 8, 2022.
- MELSE-BOONSTRA, A. Bioavailability of Micronutrients From Nutrient-Dense Whole Foods: Zooming in on Dairy, Vegetables, and Fruits. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, n. July, p. 1–12, 2020.

- MENG, X. et al. Identification and Characterization of Methylated and Ring-Fission Metabolites of Tea Catechins Formed in Humans , Mice , and Rats. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 15, p. 1042–1050, 2002.
- MHATRE, S. et al. Antiviral activity of green tea and black tea polyphenols in prophylaxis and treatment of COVID-19: A review. **Phytomedicine**, v. 85, n. July 2020, p. 153286, 2021.
- MILLARD, M. et al. Drug delivery to solid tumors: The predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 7993–8007, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, 2019.
- MOCANU, M. M. et al. Chemoprevention of breast cancer by dietary polyphenols. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22578–22620, 2015.
- MORADZADEH, M. et al. Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis in human breast cancer T47D cells through down-regulation of PI3K/AKT and Telomerase. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 5, p. 924–928, 2017.
- MORIN, M. P.; GRENIER, D. Regulation of matrix metalloproteinase secretion by green tea catechins in a three-dimensional co-culture model of macrophages and gingival fibroblasts. **Archives of Oral Biology**, v. 75, p. 89–99, 2017.
- MUELLER-KLIESER, W. et al. Bioactivity of well-defined green tea extracts in multicellular tumor spheroids. **International journal of oncology**, v. 21, n. 6, p. 1307–1315, 2002.
- NAKAGAWA, K. et al. Effects of co-administration of tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and caffeine on absorption and metabolism of EGCG in humans. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 73, n. 9, p. 2014–2017, 2009.
- NCI. National Cancer Institute. Publications. NCI Dictionaries. Chemoprevention. Acesso em maio de 2022. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/chemoprevention>
- NEVEU, V. et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. **Database : the journal of biological databases and curation**, v. 2010, n. May 2014, 2010.
- NISHIYAMA, M. F. et al. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 003582, p. 191–196, 2010.
- NYGA, A.; CHEEMA, U.; LOIZIDOU, M. 3D tumour models: Novel in vitro approaches to cancer studies. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 5, n. 3, p. 239–248, 2011.
- OLIVEIRA, A.; AMARO, A. L.; PINTADO, M. Impact of food matrix components on nutritional and functional properties of fruit-based products. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 153–159, 2018.
- OU, K.; GU, L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. **Journal of Functional Foods**, p. 1–11, 2013.

PANJI, M. et al. Suppressing effects of green tea extract and Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on TGF- β -induced Epithelial-to-mesenchymal transition via ROS/Smad signaling in human cervical cancer cells. **Gene**, v. 794, n. June, 2021.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 21–32, 2007.

PERVA-UZUNALIĆ, A. et al. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. **Food Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 597–605, 2006.

PETERSON, J. et al. Tea variety and brewing techniques influence flavonoid content of black tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3–4, p. 397–405, 2004.

QIN, J. J. et al. Natural products targeting the p53-MDM2 pathway and mutant p53: Recent advances and implications in cancer medicine. **Genes and Diseases**, v. 5, n. 3, p. 204–219, 2018.

ROCK, C. L. et al. American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 4, p. 245–271, 2020.

ROSSO, M. et al. E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–25, 2017.

ROTHWELL, J. A.; KNAZE, V.; ZAMORA-ROS, R. Polyphenols: Dietary assessment and role in the prevention of cancers. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 20, n. 6, p. 512–521, 2017.

ROY, A. M.; BALIGA, M. S.; KATIHAR, S. K. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. **Molecular cancer therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 81–90, 2005.

SACHINIDIS, A. et al. Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF β -receptor and transformation of A172 human glioblastoma. **FEBS Letters**, v. 471, n. 1, p. 51–55, 2000.

SAFARI, F. et al. Antitumor Activities of Green Tea by Up-regulation of miR-181a Expression in LNCaP Cells Using 3D Cell Culture Model. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 89–94, 2021.

SAMAVAT, H. et al. A randomized controlled trial of green tea extract supplementation and mammographic density in postmenopausal women at increased risk of breast cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 10, n. 12, p. 710–718, 2017.

SANDOVAL-ACUÑA, C.; FERREIRA, J.; SPEISKY, H. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, n. May, p. 75–90, 2014.

SANTOS, R. A. et al. Green tea (*Camellia sinensis*) extract induces p53-mediated cytotoxicity and inhibits migration of breast cancer cells. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 1–15, 2021.

SCHULZE, J. et al. Green Tea and Its Extracts in Cancer Prevention and Treatment. **Beverages**, v. 3, n. 4, p. 17, 2017.

SHAIKH, A. AL; BRAAKHUIS, A. J.; BISHOP, K. S. The mediterranean diet and breast cancer: A personalised approach. **Healthcare (Switzerland)**, v. 7, n. 3, p. 1–20, 2019.

SHIRAKAMI, Y.; SHIMIZU, M. Possible mechanisms of green tea and its constituents against cancer. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2284, 2018.

SOMIARI, S. B. et al. Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer. **Cancer Letters**, v. 233, n. 1, p. 98–107, 2006.

SPALLAROSSA, P. et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 736–745, 2006.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

THAKUR, V. S.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Green tea polyphenols increase p53 transcriptional activity and acetylation by suppressing class I histone deacetylases. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 1, p. 353–361, 2012.

THEMÍSTOCLES, B. L. C.; THOMAZ-SILVA, B. G. Avaliação do efeito do extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) sobre células de câncer de mama cultivadas em ambiente tridimensional. 2020. 60 f. Monografia (Graduação em Nutrição) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020

TSIMOGIANNIS, D.; OREOPOULOU, V. Classification of Phenolic Compounds in Plants. **Polyphenols in Plants**, p. 263–284, 2019.

TUNG MUNNITHUM, D. et al. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.

VINCI, M. et al. Tumor Spheroid-Based Migration Assays for Evaluation of Therapeutic Agents. In: **Target Identification and Validation in Drug Discovery: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. p. 253–266, 2013.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307–310, 2000.

VUONG, Q. V. et al. Extraction and isolation of catechins from tea. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 21, p. 3415–3428, 2010.

WADE HARPER, J. et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 805–816, 1993.

WALZL, A. et al. The resazurin reduction assay can distinguish cytotoxic from cytostatic compounds in spheroid screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 19, n. 7, p. 1047–1059, 2014.

WANG, S. et al. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 960–968, 2011.

XIANG, L. et al. Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 458, 2016.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. **Cell**, v. 130, n. 4, p. 601–610, 2007.

YAMAMOTOYAMA. Produção Própria. Acesso em maio de 2022. Disponível em: <http://www.yamamotoyama.com.br/empresa/>

YANG, C. S. et al. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. SUPPL. 1, p. 139–151, 2008.

YONG FENG, W. Metabolism of Green Tea Catechins: An Overview. **Current Drug Metabolism**, v. 7, n. 7, p. 755–809, 2006a.

YONG FENG, W. Metabolism of Green Tea Catechins: An Overview. **Current Drug Metabolism**, v. 7, n. 7, p. 755–809, 2006b.

YOUNES, M. et al. Scientific opinion on the safety of green tea catechins. **EFSA Journal**, v. 16, n. 4, 2018.

ZENG, L.; HOLLY, J. M. P.; PERKS, C. M. Effects of physiological levels of the green tea extract epigallocatechin-3-gallate on breast cancer cells. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. MAY, p. 1–10, 2014.

ZHANG, L. et al. Chemistry and Biological Activities of Processed Camellia sinensis Teas: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1474–1495, 2019.

ZHANG, Y.; YAN, W.; CHEN, X. Mutant p53 disrupts MCF-10A cell polarity in three-dimensional culture via epithelial-to-mesenchymal transitions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 16218–16228, 2011.

.

ANEXO A - Parecer de avaliação do projeto submetido ao CEUA-INCA

MINISTÉRIO DA SAÚDE

www.inca.gov.br

INCA
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

PARECER DE AVALIAÇÃO DE PROJETO SUBMETIDO À CEUA – INCA

Protocolo CEUA - INCA nº 004/19 Parecer nº 004/20

Pesquisador: Etel Rodrigues Pereira Gimba	
Título do projeto: Investigação do potencial antitumoral do extrato de chá verde (<i>Camellia sinensis</i>) em modelo murino	
Data de entrada: 23/10/2019	Data da reunião: 04/12/2019
Situação do Projeto: <u>APROVADO</u>	Validade: 28/02/2021
Número de animais aprovado: 60	Linhagem: Balb/c Nude
Idade / Peso: 4 semanas	Sexo: fêmea
Instituição de origem dos animais	INCA
Considerações e Parecer:	
Ao analisar a reapresentação do projeto de pesquisa "Investigação do potencial antitumoral do extrato de chá verde (<i>Camellia sinensis</i>) em modelo murino", tendo como pesquisador responsável Etel Rodrigues Pereira Gimba, verificou-se que o mesmo encontra-se em conformidade com o Regimento Interno desta Comissão e os requisitos éticos na experimentação animal. Desta forma, classifico o protocolo como: APROVADO. Informo que o solicitante possui o prazo de 180 dias a contar da data de hoje para apresentar o relatório parcial de atividades relacionadas ao projeto aprovado e, após o término de validade do mesmo, o prazo de 30 dias para apresentar o relatório final, ambos em modelo aprovado pela CEUA-INCA. A não apresentação do relatório pode resultar na suspensão ou cancelamento da aprovação do projeto.	

Rio de Janeiro, 23 de março de 2020.



Renata Batista da Silva
Coordenadora da CEUA-INCA

ANEXO B - Resumo dos principais achados e contribuições da pesquisa para divulgação nos meios de comunicação

O presente estudo experimental foi desenvolvido no Laboratório para Estudos de Interação entre Nutrição e Genética na Universidade do Estado do Rio de Janeiro e pretendeu avaliar os impactos do tratamento com chá verde em uma cultura tridimensional (3D) de células de câncer de mama. Esse tipo de cultura é uma alternativa ao uso de animais na pesquisa básica e tem a característica de representar de forma mais fidedigna o arranjo espacial e as características dos tumores *in vivo* quando comparado à tradicional forma de cultivo de células em monocamada (2D).

A escolha do extrato de chá verde produzido em nosso laboratório, ao invés de um extrato comercial, foi baseada na vantagem no uso da matriz do alimento no que se refere à forma como os componentes nela presentes interagem uns com os outros e como alcançam seus alvos no organismo.

O tratamento com o extrato de chá verde promoveu efeitos antitumorais como redução do crescimento, interferência na formação, alterações na morfologia das células e inibição da migração celular. Além disso, quando os mesmos experimentos foram executados utilizando apenas um dos compostos bioativos do chá verde (o epigallocatequina-3-galato) na forma isolada, a eficácia foi inferior à obtida com o extrato completo. Em outras palavras, não foram encontradas mudanças no padrão de crescimento, viabilidade e morfologia da cultura 3D, mostrando a vantagem no uso do alimento em relação aos seus compostos isolados. Vimos ainda que doses maiores de extrato foram necessárias para promover os efeitos na cultura 3D em comparação à cultura 2D, provavelmente pela dificuldade de penetração dos compostos imposta pelo arranjo espacial da cultura. Nosso estudo também buscou investigar o impacto do chá verde sobre uma das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, a p21. Ela e outras proteínas são responsáveis, entre outras funções, pela parada do ciclo que controla o crescimento e a proliferação celular, contendo o desenvolvimento do tumor. Nosso trabalho mostrou que o tratamento com o chá verde aumentou a produção intracelular dessa proteína, o que pode ajudar a explicar um dos mecanismos requeridos para promover os efeitos encontrados. Também investigamos se o chá verde possuía efeito tóxico em uma cultura 3D de células não tumorais e vimos que o tratamento não promoveu mudanças na sua morfologia ou viabilidade, o que mostra sua seletividade para linhagens tumorais. Por fim, investigamos o impacto do mesmo extrato no crescimento de tumores da mesma célula tumoral em animais

e os resultados iniciais mostraram um atraso de 4 dias no aparecimento dos tumores no grupo que consumiu chá verde na água de beber.

Concluimos que o chá verde possui a capacidade de promover mudanças no crescimento, formação, migração e na expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular em modelo de cultivo 3D de câncer de mama de forma mais eficiente que a epigallocatequina-3-galato isolada e que promove ainda, atraso no crescimento desses tumores em animais. Todos esses achados mostram a importância do estudo dos efeitos antitumorais de compostos a partir do uso de matrizes alimentares e ainda, como a resposta a eles pode ser diferente partindo do modelo de cultura de células utilizado.