

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA - PPGBTOX**

Charles Elias Assmann

**EFEITO ANTITUMORAL *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Melaleuca alternifolia* NO CÂNCER DE MAMA**

Santa Maria, RS  
2017

Charles Elias Assmann

**EFEITO ANTITUMORAL *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* NO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTox), Área de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Assmann, Charles Elias

Efeito antitumoral in vitro do óleo essencial de Melaleuca alternifolia no Câncer de Mama / Charles Elias Assmann.- 2017.

94 f.; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2017

1. Melaleuca alternifolia 2. Câncer de mama 3. Atividade antitumoral 4. Apoptose 5. Ciclo celular I. Cruz , Ivana Beatrice Mânica da II. Título.

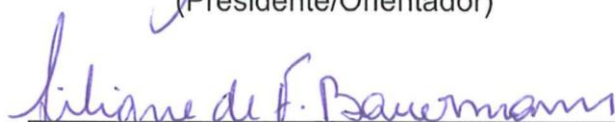
Charles Elias Assmann

**EFEITO ANTITUMORAL *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* NO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTox), Área de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

**Aprovado em 10 de fevereiro de 2017:**

  
\_\_\_\_\_  
**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Lilians de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Michele Rorato Sagrillo, Dra. (UNIFRA)**

Santa Maria, RS  
2017

## DEDICATÓRIA

*À minha família, pai (in memoriam), mãe, irmão e avó, por todo o apoio, força e confiança que sempre dedicaram a mim. Sempre estiveram e estarão ao meu lado e serei eternamente grato a vocês por hoje ter concluído mais uma etapa.*

*A vocês todo o meu amor e gratidão!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre guia os meus passos, me dá força e coragem para seguir com perseverança na caminhada.

Ao meu pai Ildo (*in memoriam*) e minha mãe Alice que sempre estiveram ao meu lado incondicionalmente e me apoiaram em todas as horas. Obrigado pelo carinho, apoio e pelos bons exemplos. Sem vocês não teria chegado aqui. Amo vocês!

Ao meu irmão Jonas, por ser um grande irmão e amigo, com quem posso contar em todos os momentos.

À minha avó Erminda, pelo imenso carinho e amor dedicados a mim.

À Profa. Ivana, minha mãe científica. Muito obrigado pela oportunidade grandiosa de trabalhar em seu Laboratório! Obrigado pela amizade, pelo carinho e, principalmente, por todo o aprendizado desses vários anos de convivência. Conte sempre comigo!

À Francine e ao Alencar, colegas e amigos inestimáveis. Obrigado pela amizade, pelos risos compartilhados e pelos ensinamentos, pois muito do que aprendi foram vocês que me ensinaram. Agradeço de coração! Podem contar sempre comigo para todas as horas!

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Biogenômica. São muitos os nomes de pessoas incríveis que fizeram parte da minha vida. Obrigado pela convivência, alegrias e aprendizados. Tenho a todos muito bem! Contem comigo!

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo ensino de qualidade e excelência na formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTox) pela formação e ensino proporcionados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa.

A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Muito obrigado!

*“A ciência nunca resolve um problema  
sem criar pelo menos outros dez”.*

*(George Bernard Shaw)*

## RESUMO

### EFEITO ANTITUMORAL *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* NO CÂNCER DE MAMA

AUTOR: Charles Elias Assmann  
ORIENTADORA: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Introdução:** O câncer de mama é a neoplasia que possui a maior incidência e a maior mortalidade entre a população feminina mundial, depois do câncer de pele não melanoma. A progressão tumoral é classificada em diferentes estágios, de 0 a IV. No estágio III, o câncer pode espalhar-se pelo tecido mamário e tecidos adjacentes, levando ao desenvolvimento do Câncer de Mama Localmente Avançado (CMLA). O CMLA pode evoluir de inchaço e vermelhidão no tecido mamário para a formação de feridas e lesões expostas. Ainda que diversas estratégias terapêuticas sejam utilizadas, a sobrevida dos pacientes é baixa e tratamentos tópicos ainda são pouco estudados. Dessa forma, a busca de novos agentes terapêuticos faz-se necessária. Nesse sentido, insere-se o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* que demonstrou ação antiproliferativa no câncer de mama em um estudo realizado previamente. Outras propriedades importantes também são relacionadas ao óleo, como atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antitumoral para linhagens de melanoma. **Objetivos:** Realizar uma revisão bibliográfica sobre aspectos epidemiológicos e fisiopatológicos do CMLA e avaliar o efeito antitumoral *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* no câncer de mama, bem como a sua toxicidade em células normais. **Materiais e Métodos:** A revisão bibliográfica realizada para averiguar parâmetros epidemiológicos, fisiopatológicos, de diagnóstico e tratamento relacionados ao CMLA baseou-se na busca bibliográfica de artigos publicados na base de dados PUBMED-MEDLINE nos últimos 10 anos. Além disso, foi realizado um estudo *in vitro* utilizando três linhagens celulares: células de câncer de mama (MCF-7), fibroblastos (HFF-1) e Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSPs). Células MCF-7 foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia* para investigação do efeito antitumoral (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL). Foram avaliados parâmetros de viabilidade e proliferação celular, modulação da via apoptótica, da expressão gênica e do ciclo celular, ensaio de formação de colônias e curva de crescimento através de análises espectrofotométricas, fluorimétricas e moleculares. Além disso, parâmetros de citotoxicidade foram mensurados em células saudáveis (HFF-1 e CMSPs) expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (100, 300, 600 e 1000 µg/mL). **Resultados:** Em relação à revisão bibliográfica conduzida, os resultados indicaram que a progressão do câncer de mama neste estágio não possui tratamento efetivo ou paliativo tópico, e que as quimioterapias convencionais não são eficazes e possuem um grande conjunto de efeitos adversos. No estudo *in vitro* foi observado que a concentração de 1000 µg/mL do óleo essencial apresentou forte atividade citotóxica e antiproliferativa em células MCF-7. Resultados da análise da regulação apoptótica e gênica indicaram que a concentração de 300 µg/mL induziu a apoptose devido à expressão de genes relacionados com a morte celular programada. Ainda, as análises para averiguação da formação de colônias e crescimento celular



mostraram uma grande capacidade antiproliferativa do óleo essencial e as análises do ciclo celular revelaram parada das células na fase S. Análises complementares de citotoxicidade realizadas utilizando linhagens de células saudáveis indicaram que a concentração de 1000 µg/mL apresentou citotoxicidade para ambas as células. Entretanto, a concentração de 300 µg/mL foi capaz de induzir a proliferação celular de fibroblastos após 72h de exposição, demonstrando algum possível mecanismo de proteção do óleo essencial. Além disso, o óleo essencial não apresentou toxicidade em ambas as células em concentrações mais baixas. **Conclusões:** Os resultados sugerem que o óleo essencial de *M. alternifolia* apresenta atividade antitumoral em células de câncer de mama da linhagem MCF-7 e não gera toxicidade em concentrações mais baixas em células saudáveis. Dessa maneira, o óleo poderia ser utilizado para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos de uso, principalmente tópico, no CMLA. Com isso, seria possível aumentar a sobrevida e/ou a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença.

**Palavras-chave:** *Melaleuca alternifolia*. Câncer de mama. Atividade antitumoral. Apoptose. Ciclo celular.

## ABSTRACT

### ANTITUMOR EFFECT *IN VITRO* OF *Melaleuca alternifolia* ESSENTIAL OIL ON BREAST CANCER

AUTHOR: Charles Elias Assmann  
ADVISOR: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Introduction:** Breast cancer is the neoplasia with the highest incidence and mortality among women in the world after non-melanoma skin cancer. Tumor progression is classified into different stages, from 0 to IV. At stage III, cancer can spread through the mammary and adjacent tissues, leading to the development of Locally Advanced Breast Cancer (LABC). LABC can evolve from swelling and redness in the mammary tissue to the formation of wounds and exposed lesions. Although several therapeutic strategies being used to treat LABC, patient's survival is low and topical treatments are not well studied. Thus, the search for new therapeutic agents is needed. In this sense, *Melaleuca alternifolia* essential oil, also known as tea tree oil (TTO), which has demonstrated antiproliferative action on breast cancer in a previous study can be mentioned. Other important properties are also related to TTO, such as anti-inflammatory, antibacterial and antifungal activity, as well as antitumor effect on melanoma cell lines. **Objectives:** The aim of this study was to perform a literature review about epidemiological and physiopathological aspects of LABC and to evaluate the antitumor effect *in vitro* of *M. alternifolia* essential oil on breast cancer, as well as its toxicity on normal cells. **Materials and Methods:** The literature review realized to assess epidemiological and physiopathological parameters, as well as diagnosis and treatment aspects related to LABC was based on the search of scientific articles published in PUBMED-MEDLINE database in the last 10 years. Further, an *in vitro* study using three cell lines: breast cancer cells (MCF-7), fibroblasts (HFF-1) and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) was performed. MCF-7 cells were exposed to different TTO concentrations to investigate antitumor capacity (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL). Several parameters were investigated: cell viability and proliferation, apoptotic pathway, gene expression and cell cycle modulation, cell growth curve and colony formation assays were also performed using spectrophotometric, fluorimetric and molecular analysis. Moreover, cytotoxicity parameters for healthy cells (HFF-1 e PBMCs) exposed to different TTO concentrations (100, 300, 600 e 1000 µg/mL) were also performed. **Results:** Regarding the literature review conducted, the results indicated that breast cancer progression at this stage does not have effective topical or palliative treatment and that conventional chemotherapies are not effective and have a large set of side effects. In the *in vitro* study, we observed that TTO concentration of 1000 µg/mL showed strong cytotoxic and antiproliferative activity in MCF-7 cells. Results of the apoptotic and gene regulatory analysis indicated that the concentration of 300 µg/mL induced apoptosis due to the expression of genes related to programmed cell death. Furthermore, colony formation and cell growth analyzes showed a great TTO antiproliferative capacity and cell cycle analyzes revealed arrestment of cells in the S phase. Complementary cytotoxicity analyzes performed using healthy cell lines indicated that TTO concentration of 1000 µg/mL showed to be cytotoxic for both

cells. However, TTO concentration of 300 µg/mL was able to induce cellular proliferation of fibroblasts after 72 hours of exposure, demonstrating some possible mechanism of protection of the essential oil. Moreover, TTO at low concentrations did not present toxicity for both cell lines. **Conclusions:** The results suggest that *M. alternifolia* essential oil has antitumor activity on the MCF-7 breast cancer cell line without cytotoxic effects at low concentrations for healthy cells. In this way, the oil could be used for the development of new therapeutic agents to the use, mainly topical, for CMLA. Thus, it would be possible to increase the survival and/or the quality of life of patients affected by the disease.

**Keywords:** *Melaleuca alternifolia*. Breast cancer. Antitumor activity. Apoptosis. Cell cycle.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CMI	Câncer de Mama Inflamatório
CMLA	Câncer de Mama Localmente Avançado
CMM	Câncer de Mama Metastático
CMSPs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1	CÂNCER: DEFINIÇÕES GERAIS .....	12
1.2	CÂNCER DE MAMA .....	15
1.2.1	<b>Anatomia da mama feminina</b> .....	15
1.2.2	<b>Epidemiologia, etiologia e fisiopatologia</b> .....	17
1.2.3	<b>Diagnóstico e tratamento</b> .....	19
1.3	CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO .....	22
1.4	<i>Melaleuca alternifolia</i> .....	24
1.5	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> : UM POTENCIAL AGENTE TERAPÊUTICO PARA O TRATAMENTO TÓPICO DO CÂNCER DE MAMA EM ESTÁGIOS AVANÇADOS.....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1	GERAL.....	29
2.2	ESPECÍFICOS.....	29
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	MANUSCRITO 1 - OVERVIEW OF LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER: A HUGE CHALLENGE TO SCIENCE.....	31
3.2	MANUSCRITO 2 - TEA TREE OIL PRESENTS <i>IN VITRO</i> ANTITUMOR ACTIVITY ON BREAST CANCER CELLS WITHOUT CYTOTOXIC EFFECTS ON FIBROBLASTS AND ON PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS.....	55
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>86</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER: DEFINIÇÕES GERAIS

As estimativas de câncer para o biênio 2016-2017 apontam a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer para o Brasil. Cerca de 420 mil novos casos de câncer ocorrerão, sem levar em consideração o câncer de pele não melanoma, que será responsável por aproximadamente 180 mil novos casos. O tipo mais frequente de câncer em homens será de próstata e nas mulheres, de mama, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2016). Os números para o cenário mundial revelam um total estimado de 20 milhões de casos novos para 2025. Somente em 2012, estimativas mundiais apontaram cerca de 14 milhões de novos casos e aproximadamente 8 milhões de óbitos, a maioria registrados em países em desenvolvimento (IARC, 2016).

A designação câncer envolve mais de 100 diferentes tipos de doenças que se assemelham quanto ao crescimento desordenado de suas células, bem como a capacidade de invasão de outros órgãos e tecidos (INCA, 2016). O câncer é uma doença de origem genética, mas que possui causas variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, ou uma combinação de ambas. Dentre os fatores externos que podem levar ao surgimento do câncer estão os fatores ambientais, como os agentes carcinogênicos (fumaça, cigarro, radiação ultra-violeta, entre outros), aos quais os indivíduos estão expostos ou os hábitos, principalmente alimentares, e costumes sócio-culturais de uma determinada população. As causas internas, em geral, são geneticamente pré-determinadas e diretamente relacionadas com o genoma de cada indivíduo e a capacidade de reverter ou minimizar os danos causados pelos agentes carcinogênicos às células (INCA, 2016).

Os agentes carcinogênicos podem atuar, principalmente, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que lesam tecidos e o material genético das células. Neste caso, dão origem à alterações estruturais no ácido desoxirribonucleico (DNA) das células, o que está fortemente associado ao desenvolvimento de neoplasias (WISEMAN; HALLIWELL, 1996; SCHUMACKER, 2015). Níveis elevados de EROs foram detectados em praticamente todos os tipos de câncer nos quais elas podem promover diversos aspectos do desenvolvimento e progressão tumoral (LIOU; STORZ, 2010; PANIERI; SANTORO, 2016). Além disso,

várias pesquisas mostraram que a grande quantidade de EROs em comparação com as defesas antioxidantes externas e internas do nosso organismo, que leva ao desbalanço conhecido como estresse oxidativo, por um tempo prolongado, pode levar à inflamação crônica, que pode mediar o desenvolvimento de cânceres. Sabe-se que o estresse oxidativo pode ativar fatores de transcrição de genes envolvidos com crescimento, produção de citocinas inflamatórias e de proteínas envolvidas com a regulação do ciclo celular o que, por sua vez, está intimamente relacionado com o processo carcinogênico, que envolve a transformação de uma célula normal em uma célula tumoral (REUTER et al., 2010). Entretanto, um aumento desproporcional nos níveis intracelulares de EROs pode ser útil no tratamento de neoplasias com o intuito de induzir à parada do ciclo celular, senescência e apoptose em células de câncer, o que pode ser alcançado com a quimioterapia e/ou radioterapia, por exemplo (LIOU; STORZ, 2010).

As células tumorais malignas originam-se devido a alterações no seu material genético. Essas alterações, também chamadas de mutações, garantem as células tumorais o ganho de estratégias de crescimento, levando a uma desregulação da sua proliferação. As células adquirem a capacidade de proliferação ilimitada ignorando as barreiras de crescimento, coesão tissular e morte celular determinadas pelo organismo. Dentre as habilidades adquiridas pelas células tumorais pode-se citar o potencial replicativo ilimitado, escape dos mecanismos de morte celular programada, estímulo para angiogênese, prevenção da destruição pelo sistema imune, desregulação da energética celular e invasão tecidual e metástase, características de células malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

A carcinogênese pode ser dividida conceitualmente em quatro estágios: iniciação tumoral, promoção tumoral, conversão maligna e progressão tumoral (WESTON; HARRIS, 2003). Na primeira etapa de iniciação do processo tumoral, agentes carcinogênicos (oncoiniciadores) provocam erros genéticos modificando a estrutura do DNA que, por sua vez, pode levar a uma mutação durante a sua síntese. Geralmente, eventos iniciadores são categorizados como ativação de proto-oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor. O estágio de promoção tumoral compreende a expansão clonal seletiva das células iniciadas. Agentes oncopromotores são caracterizados pela sua habilidade de reduzir o período de latência para a formação do tumor depois da exposição de uma célula a um agente

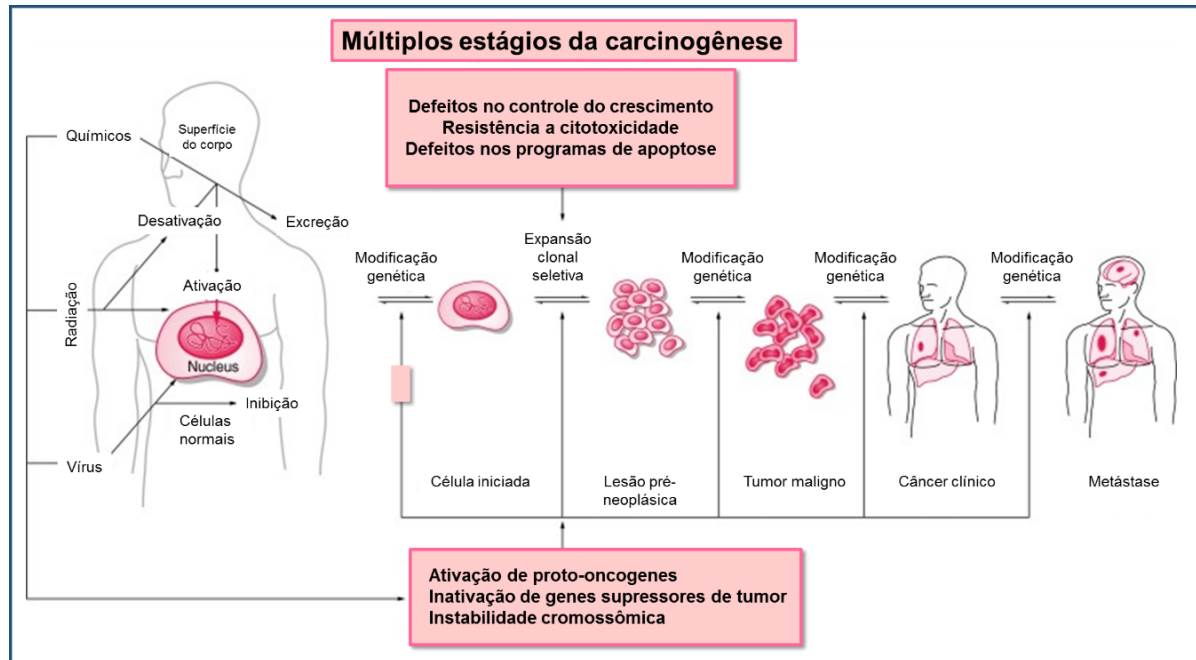
oncogênico ou por aumentar o número de tumores formados naquele tecido (DEMAN; VAN LAREBEKE, 2001; WESTON; HARRIS, 2003).

No terceiro estágio da carcinogênese, ocorre a transformação maligna de uma célula pré-neoplásica em uma que irá expressar o fenótipo maligno. Esse processo requer diversas outras modificações genéticas. A conversão maligna será diretamente influenciada pelo processo de promoção tumoral, uma vez que este contribui com a expansão da população de células iniciadas. A conversão de uma fração de células para o estágio maligno será acelerada de acordo com a taxa de divisão celular no tumor benigno ou na lesão pré-neoplásica (WESTON; HARRIS, 2003).

No estágio de progressão tumoral, as células já expressam o fenótipo maligno e podem adquirir características mais agressivas ao longo do tempo. Uma das características mais proeminentes do fenótipo maligno é a propensão para instabilidade cromossômica e crescimento descontrolado devido à grande quantidade de mutações encontradas nessas células. Dessa forma, a acumulação de mutações e não necessariamente a ordem que elas ocorrem constituem a carcinogênese de múltiplos estágios (FEARON; VOGELSTEIN, 1990). Ainda, durante o processo de progressão tumoral, diversas mudanças genéticas e epigenéticas podem ocorrer (JONES; BAYLIN, 2002). Além disso, as células, devido à secreção de proteases, podem invadir tecidos adjacentes e espalhar-se para outras regiões do corpo, processo designado como metástase (WESTON; HARRIS, 2003). A figura 1 resume as principais etapas do processo carcinogênico.



Figura 1 - Visão geral sobre os múltiplos estágios do processo carcinogênico.



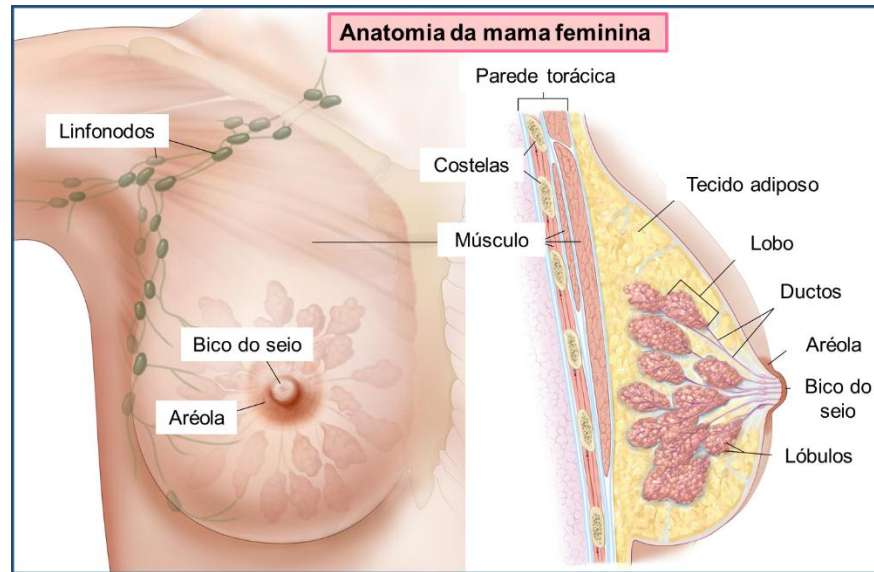
Fonte: Adaptado de Weston e Harris (2003).

## 1.2 CÂNCER DE MAMA

### 1.2.1 Anatomia da mama feminina

As mamas femininas são estruturas glandulares pares situadas na parede anterior e superior do tórax, que derivam de glândulas sudoríparas modificadas. A mama feminina é composta, principalmente, de células adiposas que constituem o tecido adiposo. Este, por sua vez, estende-se desde a clavícula até a axila, passando pelo meio da caixa torácica, como pode ser observado na figura 2 (MOORE; DALLEY, 2007; NBCF, 2016).

Figura 2 - Anatomia da mama feminina.



Fonte: Adaptado de National Cancer Institute (NCI) (2016).

A mama feminina saudável é composta de seções, em número de 12 a 20, chamadas lobos. Os lobos dividem-se em lóbulos, porções menores que são responsáveis pela produção de leite em mulheres lactantes. Lobos e lóbulos são conectados por ductos mamários, que servem como tubos para a passagem do leite até o bico do seio. Nessas estruturas, ductos e lóbulos das glândulas mamárias, que, geralmente, o câncer de mama tem a sua origem (NBCF, 2016).

No interior do tecido adiposo existe uma rede de ligamentos, nervos, vasos de linfonodos, vasos sanguíneos, fibras de tecido conectivo e linfonodos. O sistema linfático, que constitui uma parte do sistema imune, é uma rede de vasos linfáticos e linfonodos que espalham-se por todo o corpo. Este sistema transporta células de defesa e fluídos pelo corpo de forma similar ao sistema circulatório sanguíneo, que distribui elementos pelo nosso organismo. Em algumas áreas espalhadas pelo nosso corpo existem pequenos linfonodos que atuam como filtros, transportando células anormais para longe dos tecidos saudáveis. O tipo de câncer de mama é determinado, geralmente, pelo local de origem do crescimento das células tumorais, que ocorre quase sempre nos lobos, lóbulos ou ductos da mama. Se o câncer é encontrado em linfonodos adjacentes, é possível apenas identificar o quanto o câncer espalhou-se pelo organismo. Se linfonodos próximos contêm células tumorais, outros linfonodos são examinados para a determinação da presença ou ausência de células tumorais a fim de auxiliar no entendimento do estágio de progressão da doença (NBCF, 2016).

### 1.2.2 Epidemiologia, etiologia e fisiopatologia

O câncer de mama é o tipo que possui a maior incidência, depois do de pele não melanoma, e a maior mortalidade entre a população feminina em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Para o ano de 2012, foram estimados aproximadamente 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia em todo o mundo, representando cerca de 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres. Nesse mesmo ano, foram estimados aproximadamente 500 mil óbitos devidos ao câncer de mama em mulheres em todo mundo. Essas mortes correspondem a 15% de todos os óbitos por câncer em mulheres (IARC, 2016).

Dados recentes para o Brasil estimaram um número de 57.960 novos casos de câncer de mama em 2016, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Esse tipo de câncer é o mais frequente em mulheres das Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, excetuando-se os tumores de pele não melanoma. Na região Norte é o segundo tumor mais incidente. O câncer de mama também acomete homens sendo, porém, mais raro, representando apenas 1% do total de casos da doença (INCA, 2016).

A neoplasia mamária é causada pelo desenvolvimento de células tumorais no tecido mamário. As células malignas originam-se no epitélio de revestimento das glândulas mamárias ou ductos da mama. Sabe-se que a iniciação e a progressão tumoral dessas células são causadas por um conjunto de fatores, dos quais as mutações genéticas, alterações no microambiente tumoral e as alterações epigenéticas são predominantes (POLYAK, 2007; NCI, 2016). Devido a esses fatores, o câncer de mama, que inicia como uma doença local, pode espalhar-se para outras partes do corpo através do tecido, linfonodos e/ou sangue, em um processo conhecido como metástase (WEIGELT et al., 2005).

Existem diversos fatores envolvidos na etiologia do câncer de mama, sendo considerada, por esse motivo, uma doença multifatorial. Dentre os aspectos envolvidos pode-se citar fatores biológico-endócrinos, comportamento e estilo de vida, bem como vida reprodutiva. Os hormônios femininos contribuem de maneira expressiva para o desenvolvimento da doença. Além disso, o envelhecimento da população feminina e fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, como menarca precoce (primeira menstruação antes dos 12 anos), nunca ter tido filhos,

gravidez após os 30 anos e menopausa tardia (última menstruação após os 50 anos) são fatores que contribuem de forma significativa para a etiologia da doença. Ainda, fatores como tabagismo, excesso de peso e sedentarismo, consumo excessivo de álcool e histórico familiar de câncer de mama podem ser destacados (BARLOW et al., 2006). De fato, mutações herdadas em genes como *BRCA1* e *BRCA2* aumentam consideravelmente os riscos de desenvolvimento da neoplasia mamária. A contribuição dos genes *BRCA1* e *BRCA2* para o câncer de mama foi demonstrada em um estudo que envolveu a análise desses genes em 237 famílias e mostrou que a doença estava relacionada com mutações em *BRCA1* em 52% das famílias e com mutações em *BRCA2* em 32% das famílias (FORD et al., 1998).

Os fatores genéticos implicados na fisiopatologia do câncer de mama podem envolver tanto silenciamento como superexpressão gênica. Um estudo publicado por Veer et al. (2002) demonstrou que o perfil de expressão gênica de tumores de mama pode influenciar a evolução clínica dos pacientes. O gene da proteína p53, por exemplo, está diretamente relacionado com a progressão tumoral, por encontrar-se inativado em mais da metade dos tipos de câncer. A proteína codificada está envolvida em uma ampla rede de sinais, que incluem reparo de DNA, parada do ciclo celular e apoptose (OKAI et al., 2014).

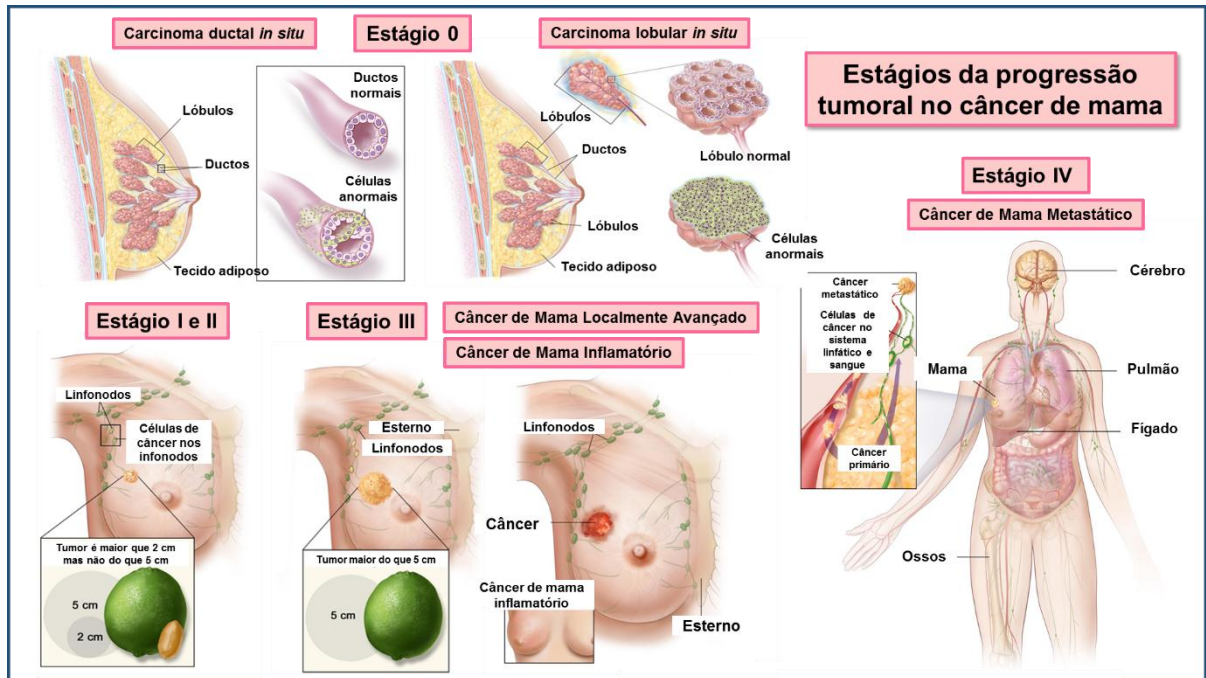
Além disso, os genes *Bax* e *Bcl-2* são outros exemplos de genes que podem ter a sua expressão desregulada em cânceres. Quando a proteína Bax está superexpressa, ela acelera a morte celular por apoptose. Em contrapartida, a proteína Bcl-2 superexpressa é capaz de frear programas de morte celular por apoptose (OLTVAL et al., 1993). Ainda, sabe-se que a proteína p53 é capaz de induzir a expressão de *Bax* e suprimir a expressão de *Bcl-2*, levando as células nesta condição à morte celular por apoptose (MIYASHITA et al., 1994). Diversas mutações no gene da proteína p53 já foram observadas em tumores de mama, conforme relatado por Lacroix et al. (2006).

### 1.2.3 Diagnóstico e tratamento

A classificação do câncer de mama é feita geralmente de acordo com o local de surgimento da neoplasia e com a sua capacidade de invasão. O câncer de mama não-invasivo configura um tipo em que as células estão confinadas aos ductos mamários e não invadem os tecidos adjacentes que compõem a mama. Dentre os tipos não invasivos, o mais frequente é o carcinoma ductal *in situ*. Em menor proporção, podemos citar o carcinoma lobular *in situ*. Por outro lado, no câncer de mama invasivo, as células possuem a capacidade de invadir os tecidos adjacentes da mama. Entretanto, este tipo de câncer pode ser invasivo sem necessariamente ser metastático, quando há a migração de células malignas para linfonodos e outros tecidos do organismo (ERBAS et al., 2006).

Após a confirmação do diagnóstico da neoplasia, a progressão tumoral é avaliada e a sua classificação é dada por diferentes estágios, que podem ser classificados de 0 a IV. No estágio 0 (carcinoma *in situ*), células anormais são encontradas nos lóbulos e ductos mamários. Nos estágios I e II, células tumorais podem ser encontradas na mama ou linfonodos. No estágio III, o câncer pode espalhar-se pelo tecido mamário e tecidos adjacentes, bem como para a parede torácica, podendo levar ao quadro clínico avançado conhecido como Câncer de Mama Localmente Avançado (CMLA) ou ao seu subtipo, conhecido como Câncer de Mama Inflamatório (CMI). Esse quadro pode evoluir de inchaço e vermelhidão no tecido mamário para a formação de feridas e lesões expostas, devido à progressão tumoral. No estágio IV, conhecido como Câncer de Mama Metastático (CMM), o câncer pode espalhar-se para outros órgãos e regiões do corpo (POLYAK, 2007; NCI, 2016). A figura 3 apresenta um quadro dos diferentes estágios encontrados na progressão da neoplasia mamária.

Figura 3 - Estágios da progressão tumoral no câncer de mama.



Fonte: Adaptado de National Cancer Institute (NCI) (2016).

Atualmente, o conceito de medicina personalizada vem ganhando destaque para o diagnóstico e tratamento do câncer de mama. Diagnósticos sofisticados, que incluem perfis de expressão genômica, possibilitam uma melhor classificação dos tumores e, quando combinados com novas técnicas cirúrgicas e terapias de radiação, vêm reduzindo a morbidade associada ao tratamento além de minimizar a recorrência da doença (DE ABREU et al., 2014; MCDONALD et al., 2016).

O diagnóstico do câncer de mama dá-se, geralmente, por exames de triagem ou pela averiguação de sintomas relacionados à doença. A técnica de triagem que mostra ser eficaz na redução da mortalidade da neoplasia mamária é a mamografia. A triagem de mulheres para o câncer de mama é associada com a detecção de tumores pequenos, com menor probabilidade de metástase e com menores chances de requerer quimioterapia. Nesses casos, há uma diminuição da mortalidade associada à doença e sobrevida alta. Além disso, técnicas de imageamento complementares são recomendadas em pacientes com alto risco de desenvolvimento da doença. Entre elas, podemos citar a técnica de imagem por ressonância magnética (IRM) e ultrassom. A IRM é recomendada como adjuvante da mamografia em casos nos quais a paciente apresenta uma chance de desenvolvimento da doença maior do que 20% durante sua vida. O ultrassom pode ser usado como adjuvante para aquelas mulheres que não podem ser submetidas à

IRM ou aquelas com densidade de tecido mamário alta. Entretanto, esta técnica apresenta diversas limitações como o alto índice de falsos positivos e dependência das habilidades do operador (MCDONALD et al., 2016).

A avaliação patológica do câncer de mama é realizada através da aspiração de tecido mamário com finas agulhas, pequenas biópsias ou excisão cirúrgica. A escolha do tratamento é realizada levando-se em consideração diversos critérios, como a extensão do tumor, metastatização e perfil molecular. As decisões críticas para o tratamento são realizadas com base em testes moleculares que averiguam a expressão de proteínas, independentemente das características morfológicas do tumor. Entre as proteínas avaliadas merecem destaque os receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e receptores HER2 (MCDONALD et al., 2016).

A proteína HER2 tem ganhado destaque nos últimos anos devido ao desenvolvimento de terapias voltadas especificamente para este receptor. Esta é uma proteína responsável pelo crescimento e desenvolvimento de células epiteliais. Entretanto, o gene *HER2* é um proto-oncogene e mutações neste gene podem transformá-lo em um oncogene. Alguns pacientes de câncer de mama e CMLA apresentam receptores HER2 positivos, o que vem sendo utilizado como um alvo terapêutico (SLAMON et al., 2011; PEREZ et al., 2014; SMITH et al., 2017).

A droga quimioterapêutica Trastuzumabe é um anticorpo carregado com a droga antitumoral. O anticorpo se liga especificamente em células que apresentam receptores HER2 positivos presentes em suas membranas celulares e, dessa forma, consegue liberar a droga no interior das células tumorais. Este tipo de tratamento apresenta menos efeitos colaterais, é mais rápido que os agentes normalmente empregados e vem melhorando o tratamento de pacientes com câncer de mama do tipo HER2 positivo. Mesmo assim, para alguns pacientes submetidos ao tratamento com Trastuzumabe a recorrência da doença é observada (VERMA et al., 2012; PEREZ et al., 2014). Nesse sentido, alguns trabalhos vêm identificando terapias adjuvantes para o tratamento de pacientes HER2 positivos, propondo o uso de Pertuzumabe associado com Trastuzumabe, indicando que uma maior porcentagem de pacientes consegue a remissão completa quando as drogas são associadas do que somente o uso de Trastuzumabe (LOIBL; GIANNI, 2016).

Diversas estratégias de tratamento são utilizadas para o câncer de mama. Dentre as técnicas mais comuns está a mastectomia, intervenção cirúrgica realizada

para a retirada de uma ou ambas as mamas. A quimioterapia também ganha destaque como tratamento para o câncer de mama, especialmente em mulheres submetidas à mastectomia. Diversas drogas estão disponíveis para o tratamento quimioterápico do câncer de mama, entre elas podemos citar o Docetaxel, Gemcitabina, Metotrexato e Paclitaxel, utilizadas individualmente ou de forma combinada (NCI, 2016). A radioterapia também é uma das técnicas mais utilizadas para o tratamento de tumores, especialmente aqueles localizados e de menor extensão. Com aparelhos modernos é possível alta precisão e, com isso, grandes chances de sucesso no tratamento. Ainda, a imunoterapia e as terapias endócrinas vêm consolidando-se como duas das principais estratégias de tratamento com base no diagnóstico molecular dos tumores (LANG et al., 2015; MCDONALD et al., 2016).

### 1.3 CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO

Estimativas recentes mostram que aproximadamente 8,5% dos pacientes americanos e 4% dos pacientes europeus com câncer de mama desenvolvem CMLA (ALLEMANI et al., 2013). Apesar desses números parecerem baixos, a grande taxa de mortalidade é explicada pelo rápido desenvolvimento da doença metastática (BALOGUN et al., 2015). A análise de dados da população feminina americana entre os anos de 1988-2000 revelou que a média de sobrevida para pacientes que desenvolvem CMLA é de 6,4 anos enquanto que a sobrevida de pacientes que desenvolvem CMI é de apenas 2,9 anos (HANCE et al., 2005).

O CMLA inclui tumores largos, geralmente com tamanho maior do que 5 centímetros em diâmetro e está relacionado com tumores invasivos que podem espalhar-se para o tecido mamário e parede torácica (BALOGUN et al., 2015). O desenvolvimento da doença é seguido por diversas consequências, como edema e ulceração da pele, formação de tumores na parede torácica, injúrias aos músculos adjacentes e aumento no tamanho de linfonodos (NEWMAN et al., 2009).

A forma mais agressiva de CMLA, câncer de mama inflamatório (CMI), pode causar inchaço, vermelhidão, podendo afetar mais de 70% do tecido mamário (CHIA et al., 2008). O edema, designado como *peau d'orange*, é provocado pela obstrução dos vasos linfáticos pelas células tumorais levando ao extravasamento de fluidos linfáticos do tecido. Um rápido aumento no tamanho da mama, sensação de inflamação, peso e queimação também são sintomas relacionados ao CMI (MERAJVER et al., 2004).



O diagnóstico do CMLA envolve essencialmente a mamografia, possibilitando a identificação de tumores com menos de 1 cm de diâmetro. Dessa maneira, a mamografia é uma ferramenta essencial para identificar tumores em estágios iniciais e elevando a sobrevivência dos pacientes, com chance de cura em cerca de 95% dos casos (CUCKLE, 1991). A biópsia é a forma mais específica de diagnosticar o desenvolvimento do tumor. Para evitar procedimentos invasivos, técnicas bastante específicas como aspiração de material biológico por meio de finas agulhas inseridas no tecido mamário são utilizadas. Técnicas de IRM também são bastante empregadas para o diagnóstico clínico do CMLA, geralmente indicado para mulheres com risco de 20-25% de desenvolver câncer de mama ao longo da vida (SASLOW et al., 2007). A IRM é mais precisa para revelar a extensão e o estadiamento de tumores do que métodos como a mamografia ou ultrassom sendo, dessa forma, comumente usada para detectar CMLA (PRICE et al., 2015). Além disso, a identificação de biomarcadores, como receptores de hormônios e moléculas inflamatórias auxiliam na decisão do tratamento mais apropriado (SASLOW et al., 2007).

O tratamento do CMLA representa um grande desafio após o seu diagnóstico, devido ao câncer de mama no estágio III apresentar grande risco de metástase. Terapias personalizadas, considerando-se as características de cada paciente, como tamanho do tumor, expressão de receptores de hormônios, extensão e invasão de linfonodos e tecidos adjacentes, mostram-se ideais para a realização do tratamento (RUSTOGI et al., 2005; AL-KHANBASHI et al., 2016).

Com o intuito de conseguir a remissão do CMLA, de controlar localmente a doença e evitar e/ou eliminar metástases, os pacientes são submetidos a diversas opções de tratamento, muitas vezes combinadas ou em diferentes fases, como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia (BRACKSTONE et al., 2015; ZHOU et al., 2016). Todavia, apesar de todos os tratamentos, muitos pacientes apresentam recidivas (SMITH et al., 2017). Além disso, a evolução clínica do CMLA é associada com sobrevivência baixa e, frequentemente, os pacientes com esta condição vão à óbito (TRYFONIDIS et al., 2015).

O desenvolvimento de intensas pesquisas nessa área vem sendo realizado, mas o prognóstico desfavorável da doença devido às altas taxas de metástases, surgimento de extensas áreas de injúrias no tecido mamário (figura 4) e resistência a drogas são problemas bastante complicados a ser enfrentados.

Figura 4 - Paciente com CMLA bilateral mostrando a invasão tumoral na pele com formação de feridas e tecido com aspecto avermelhado.



Fonte: Adaptado de Surender et al. (2007).

Nesse sentido, o CMLA vem sendo alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Uma área promissora é o uso de produtos naturais, compostos por uma matriz química bioativa que inclui diversas moléculas que podem ajudar no tratamento dos sintomas minimizando os seus efeitos e melhorando a sobrevida dos pacientes acometidos.

#### 1.4 *Melaleuca alternifolia*

A espécie *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel foi primeiramente descrita em 1905 por Joseph Maiden and Ernst Betche como *M. linariifolia* var. *alternifolia*, sendo renomeada posteriormente como *M. alternifolia* em 1925 por Edwin Cheel. A planta, pertencente à família Myrtaceae, é originária da Austrália, mas cultivada no Brasil e em outros países. É uma árvore de porte pequeno a médio, podendo alcançar de 2,5 a 14 metros em altura, como pode ser observado na figura 5 (BROPHY et al., 2013).

Figura 5 - Foto ilustrativa de uma árvore de *Melaleuca alternifolia* (cerca de 3m).



Fonte: autor.

O cultivo da planta é realizado em larga escala para a obtenção do seu óleo essencial. O óleo essencial de *M. alternifolia*, destilado a partir de suas folhas, possui aproximadamente 100 diferentes tipos de constituintes identificados. Em sua composição química, os terpenos perfazem a maior parte dos compostos presentes no óleo, além de diversos outros constituintes presentes em menor quantidade. Dentre os terpenos presentes no óleo essencial, podemos citar o  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno e o terpineno-4-ol, presentes em maiores quantidades (BROPHY et al., 1989).

Os terpenos ou terpenoides constituem o maior grupo de substâncias naturais bioativas produzidas por uma grande variedade de plantas e são os constituintes primários dos óleos essenciais de diversas plantas e flores e largamente empregados como fragrâncias em perfumaria, cosmética, na medicina e em medicinas alternativas, como na aromaterapia. Variações sintéticas e derivados de terpenos que ocorrem naturalmente aumentam a variedade de aromas usados na perfumaria e em aditivos alimentares. Além disso, vários terpenos, como o ácido retinoico (vitamina A),  $\beta$ -caroteno, luteína e licopeno, são conhecidos pelas propriedades benéficas que exercem no organismo, como atividades antioxidante e anti-inflamatória, entre outras (SINGH e SHARMA, 2015).

A matriz química do óleo essencial de *M. alternifolia*, representada principalmente pelos terpenos bem como seus demais constituintes, presentes em menor quantidade, sempre atraíram a atenção de pesquisadores na busca de potenciais benefícios para o seu uso. De fato, na medicina popular o óleo é utilizado de forma tópica para o tratamento de acne, feridas relacionadas ao vírus da herpes e também como agente antimicrobiano e antifúngico, entre outros (CARSON et al., 2006; HAMMER et al., 2006). Ainda, ao longo dos últimos anos, diversas outras propriedades biológicas vêm sendo relacionadas ao óleo essencial, como atividades antioxidante e anti-inflamatória (KOH et al., 2002; HALCÓN; MILKUS, 2004; KIM et al., 2004).

Devido à matriz química apresentada pelo óleo essencial de *M. alternifolia*, alguns estudos postularam o seu uso no tratamento de determinados tipos de tumores superficiais. De fato, uma das características apresentadas pelo óleo essencial da planta, quando aplicado topicamente, é a capacidade de inibir o crescimento tumoral devido à ação citotóxica em células tumorais por mecanismos possivelmente relacionados com a penetração na pele de seus componentes antioxidantes (GREAY et al., 2010a; GREAY et al., 2010b; IRELAND et al., 2012). Sabe-se também que o óleo é capaz de reduzir a inflamação cutânea e melhorar o processo de cicatrização da pele (KOH et al., 2002; HALCÓN; MILKUS, 2004).

Um estudo realizado com o Terpinen-4-ol, um dos principais constituintes do óleo essencial de *M. alternifolia*, descreveu a capacidade desta molécula bioativa de inibir o crescimento de células de melanoma humano *in vitro*, demonstrando mais uma vez a importância dos terpenos como constituintes da matriz química do óleo (CALCABRINI et al., 2004). Outro estudo avaliou *in vitro* o efeito do óleo essencial de *M. alternifolia* e alguns de seus principais constituintes isolados no crescimento de células de câncer de mama (MCF-7), indicando redução da proliferação celular e citotoxicidade associadas às moléculas de  $\alpha$ -terpineol e Terpinen-4-ol (NIELSEN, 2008).

## 1.5 ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*: UM POTENCIAL AGENTE TERAPÊUTICO PARA O TRATAMENTO TÓPICO DO CÂNCER DE MAMA EM ESTÁGIOS AVANÇADOS

O câncer de mama, quando diagnosticado em seus estágios iniciais, tem grande chance de cura. No entanto, com a progressão da neoplasia, os sintomas e consequências da doença tornam-se cada vez mais exacerbados e difíceis de serem tratados. No estágio III, que pode levar ao quadro clínico de CMLA ou CMI, o extravasamento de células malignas para tecidos adjacentes pode causar diversas complicações. O quadro pode iniciar com inchaço e vermelhidão na região afetada, mas com a progressão da doença, feridas e lesões expostas podem acometer os pacientes. Além disso, quadros ainda mais graves como o estágio IV, podem apresentar metástases e a probabilidade de cura é baixa (POLYAK, 2007; NCI, 2016).

Uma combinação de estratégias terapêuticas é empregada para o tratamento do CMLA e CMI, como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia (BRACKSTONE et al., 2015; ZHOU et al., 2016), com o intuito curativo ou de controlar a progressão da doença, permitindo uma maior sobrevida dos pacientes. No entanto, a probabilidade de recidivas é alta (SMITH et al., 2017) e a evolução clínica dos estágios mais avançados do câncer de mama é desfavorável, com altas taxas de óbitos, utilizando-se, muitas vezes, somente de cuidados paliativos para amenizar as complicações que originam-se devido à doença (TRYFONIDIS et al., 2015).

Pelo fato do óleo essencial de *M. alternifolia* apresentar diversas moléculas bioativas, especialmente os terpenos, a sua ação antitumoral vem sendo estudada. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a ação antitumoral em tumores cutâneos (CALCABRINI et al., 2004; GREAY et al., 2010a; IRELAND et al., 2012), devido a mecanismos relacionados, possivelmente, com a penetração na pele de seus compostos, como o Terpinen-4-ol, com ação citotóxica nas células malignas.

A avaliação inicial de que o óleo de *M. alternifolia* possui ação antiproliferativa em células de câncer de mama (NIELSEN, 2008) possibilita a realização de outros estudos que investiguem a ação do óleo essencial em linhagens de câncer de mama, já que os dados publicados até o momento não demonstram totalmente os mecanismos relacionados com a ação antitumoral. Dessa

forma, o desenvolvimento de novas terapias, como as de utilização tópica, que possam auxiliar no tratamento da neoplasia mamária poderia ser possível, especialmente nos quadros clínicos mais avançados, quando há o surgimento de feridas, lesões e metástases associadas à progressão tumoral. Como nesses estágios os cuidados são, muitas vezes, paliativos, a busca de novas alternativas terapêuticas que amenizem o quadro clínico avançado fazem-se necessárias com o intuito de melhorar a sobrevida dos pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar os mecanismos de ação do efeito antitumoral *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* em uma linhagem de células de câncer de mama (MCF-7), bem como a sua citotoxicidade em linhagens de células saudáveis, fibroblastos (HFF-1) e células mononucleares do sangue periférico (CMSPs).

### 2.2 ESPECÍFICOS

Revisar a literatura corrente sobre a epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e perspectivas futuras para o câncer de mama localmente avançado (CMLA);

Determinar a composição química do óleo essencial de *M. alternifolia*;

Na linhagem comercial de células de câncer de mama (MCF-7), avaliar os mecanismos da ação antitumoral do óleo essencial de *M. alternifolia* em relação a:

- viabilidade e proliferação celular;
- indução da apoptose;
- regulação do ciclo celular;
- formação de colônias e curva de crescimento;
- expressão gênica dos genes *p53*, *Bax* e *Bcl-2*;

Na linhagem comercial de fibroblastos (HFF-1) e em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs), investigar a possível citotoxicidade do óleo essencial de *M. alternifolia* através da análise da:

- viabilidade e proliferação celular (HFF-1);
- viabilidade celular (CMSPs).

### 3 RESULTADOS

Os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados sob a forma de dois manuscritos a seguir. Os itens Materiais e Métodos e Resultados encontram-se descritos nos próprios manuscritos.

A apresentação do primeiro manuscrito está baseada na versão submetida à revista *International Journal of Women's Health and Wellness*, intitulado “Overview of Locally Advanced Breast Cancer: A huge challenge to science”. O segundo manuscrito é referente à versão submetida à revista *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, com o título de “Tea tree oil presents *in vitro* antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells”.



### 3.1 MANUSCRITO 1 - OVERVIEW OF LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER: A HUGE CHALLENGE TO SCIENCE

**Autores:** Charles Elias Assmann, Francine Carla Cadoná, Alencar Kolinski Machado, Marco Aurélio Echart Montano, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Revista:** International Journal of Women's Health and Wellness.

**Situação:** Sob revisão.

# 1           **Overview of Locally Advanced Breast Cancer: A huge** 2                           **challenge to science**

3  
4 Charles Elias Assmann<sup>1,2,\*</sup>, Francine Carla Cadoná<sup>1\*</sup>, Alencar Kolinski Machado<sup>1,3</sup>,  
5 Marco Aurélio Echart Montano<sup>4</sup>, and Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,2,3,†</sup>  
6

7 <sup>1</sup> Biogenomics Laboratory, Department of Morphology, Health Science Center,  
8 Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

9 <sup>2</sup> Graduate Program in Biological Sciences, Toxicological Biochemistry, Federal  
10 University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

11 <sup>3</sup> Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa  
12 Maria, RS, Brazil;

13 <sup>4</sup> Graduate Program in Bioscience and Health, University of the West of Santa  
14 Catarina; SC, Brazil;

15  
16  
17  
18  
19 \* These authors contributed equally to this work.

20 † Corresponding author: Ivana Beatrice Mânica da Cruz. Address: Biogenomics  
21 Laboratory, Department of Morphology, Health Science Center, Federal University of  
22 Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. Roraima Avenue 1000, Building 19, Santa  
23 Maria-RS, Brazil. Zip code: 97105-900. Phone: 55-55-32208736, Email:  
24 ibmcruz@hotmail.com

## 25 **Abstract**

26

27 Cancer incidence and cancer-related deaths are dramatically rising worldwide. In  
28 women, current estimates show high incidence of breast cancer (BC). BC is  
29 considered the second most frequent cancer-related death causer in women  
30 worldwide, responsible for millions of deaths each year. However, BC early diagnosis  
31 improve treatment success and increase survival rates. Physical examination,  
32 mammography, ultrasound, magnetic resonance imaging are techniques that  
33 auxiliary BC diagnosis. On the other hand, BC relapse is a significant concern  
34 especially when the cancer spreads to the mammary and adjacent tissues and this  
35 leads to the development of locally advanced BC (LABC). Inflammatory BC (IBC),  
36 which is considered a subtype of LABC, is a rare and aggressive disease that causes  
37 swelling, redness, affecting third or more of the breast. Normally, chemotherapy is  
38 used in the first-line treatment of LABC, however multidrug resistance (MDR) is a  
39 severe problem found in the treatment. Studies are been performed to discover new  
40 alternative therapies, mainly in natural products, to solve this obstacle improving  
41 treatment responsiveness. In this review we will address aspects of LABC, such as  
42 pathophysiology, diagnosis, current treatments and new therapeutic perspectives as  
43 well as LABC epidemiological parameters, emphasizing the worldwide incidence  
44 scenario.

45

46

47

48 **Keywords:** Breast cancer (BC), Locally Advanced BC (LABC), Inflammatory BC  
49 (IBC), LABC epidemiology, LABC treatment, LABC future directions.

## 50 Introduction

51

52 Breast cancer (BC) is considered the main type of cancer that occurs among  
53 women and the second most frequently responsible for cancer-related deaths in this  
54 gender worldwide [1]. High incidence of BC is observed in several different countries  
55 in terms of social and financial development. Recent statistical numbers showed 1.67  
56 million estimated new BC cases in 2012 with 522.000 related deaths, corresponding  
57 to 25% of all cancer cases in women [2]. Moreover, current projections for 2050  
58 estimate approximately 3.2 million new BC cases in women worldwide [3].

59 BC development starts in the mammary glands and ducts. Tumor growth  
60 initiates through several synergistic factors that contribute to genetic mutations, such  
61 as microenvironmental and epigenetics changes [4]. Because of late detection and/or  
62 poor response to treatment, cancer cells can spread to other tissues via blood  
63 circulation, lymphatic system and/or by contiguity, developing distant tumor, in a  
64 process known as metastasis [5].

65 Different stages are observed in BC, following the classification between I to  
66 IV. In stage III, cancer has spread to the mammary and adjacent tissues, and  
67 cancers are classified as locally advanced BC (LABC). LABC is correlated with the  
68 development of architectural tissue alteration in the mammary tissue, because of the  
69 tumor growth. LABC includes advance primary tumors, frequently with lymph nodes  
70 involvement and Inflammatory BC (IBC) [6].

71 LABC is associated to poor survival and frequently patients with this condition  
72 die, despite of several treatments, such as chemotherapy and radiotherapy [7]. In this  
73 sense, LABC has been a common subset of all BC patients for the development of  
74 new therapies. In this review, we will focus on clinical trials in LABC, side effects of

75 therapies used in this setting, and quality of life of patients enrolled in these trials.  
76 Moreover, the aim of this review is address update aspects of LABC, such as  
77 epidemiological parameters, pathophysiology, diagnosis, and new therapeutic  
78 perspectives.

79

## 80 **Body**

### 81 **LABC epidemiological parameters**

82

83 Worldwide, the incidence of BC has increased by over 20% and BC-related  
84 deaths have risen by 14% since 2008. Although developed countries still have the  
85 highest incidences of breast cancer, low- to middle-income countries (LMICs) still  
86 face a huge number of deaths related to the highest cancer mortality rates [8]. Figure  
87 1 indicates the countries with the top 20 highest incidences of BC in 2012. Belgium  
88 had the highest rate of BC, followed by Denmark and France [9].

89

90

**Figure 1 here**

91

92 Moreover, current estimates show that approximately 8.5% of American and  
93 4% of European patients with BC develop LABC [10]. Although these numbers seem  
94 to be low and despite LABC is confined to the breast and regional nodes, the high  
95 mortality rate in this condition is explained by the rapid onset of metastatic disease  
96 [11]. Fortunately, since the use of mammography became more usual and common  
97 in screening tests, LABC rates are decreasing. In the United States of America (USA)  
98 the percentage of patients with LABC that realized regular screening mammography  
99 is less than 5% [12].

100 IBC, a specific type of LABC, and rarer than other types of BC, is responsible  
101 for just a few diagnosed cancer cases. In the USA, for example, only 1 to 5% of BC  
102 diagnosed patients present with IBC. Additionally, IBC is more often found in  
103 younger patients compared to other cancer types, being more prevalent in African  
104 and American women. Also, it seems to exist a relationship between IBC and body  
105 weight since this disease is more frequent in overweight subjects. IBC also can be  
106 diagnosed in men, however, differently than in women, this type of cancer occurs in  
107 advanced age [13].

108 According to the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and  
109 End Results (SEER) Program the average survival period after diagnosis for women  
110 with LABC is 4.9 years. However, this register cannot be extremely reliable since  
111 patients that developed IBC present less survival time [9].

112

### 113 **LABC pathophysiology**

114

115 LABC is related to bulky invasive tumor which spreads to breast skin and/or  
116 chest. LABC development may be followed by several consequences, such as skin  
117 ulceration and edema, tumor fixation into the chest wall, increase of the lymph nodes  
118 size and skin fixation of auxiliary nodes [14].

119 LABC includes large tumors, usually the tumor size is bigger than 5  
120 centimeters in diameter. In this sense, the tumor mass can cause injury to breast  
121 skin, underlying muscles and multiple local lymph nodes [11]. Furthermore, the most  
122 aggressive LABC form, IBC, can cause swelling, redness, affecting third or more of  
123 the breast [15]. The edema, in this case known as *peau d'orange*, occurs because  
124 cancer cells block lymph vessels in the skin of the breast with lymphatic fluid

125 extravasation. Other symptoms can be noted in this type of cancer, such as a rapid  
126 increase in breast size, sensation of inflammation as heaviness, aching, burning, or  
127 tenderness and moreover, patients can present inverted nipple (facing inward) [16].

128 IBC has rapid progression, and high angiogenic and angioinvasive  
129 development. This ability to invade vessels confers to IBC an extremely high  
130 metastatic potential, making this illness the most lethal BC type [17]. Several  
131 molecules involved in this pathway were identified as overexpressed in IBC tissue  
132 samples when compared to noninflammatory LABC samples, such as vascular  
133 endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR, an important signal  
134 protein that stimulates angiogenesis [18, 19]. Also, overexpression of inflammatory  
135 cytokines were described in IBC tissue samples, including basic fibroblast growth  
136 factor (bFGF), interleukin (IL)-6, IL-8, IL-1, IL-12, and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ).  
137 Further, some gene related to insulin-like growth factor-binding protein, for example  
138 HER-2, RhoC GTPase, and NF- $\kappa$ B are overexpressed in IBC [20, 21, 22].

139 Moreover, in comparison with non-IBC, IBC is frequently associated to  
140 negative estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR). Previous reports  
141 suggested that ER-positive patients presented a better prognostic and a longer  
142 survival compared to those IBC ER-negative subjects (4 years versus 2 years,  
143 respectively) [23, 24].

144 IBC has a very complex pathophysiology. Despite IBC being classified as a  
145 LABC, it seems to present a unique tumor pattern and specific characteristics. IBC  
146 has predominant growth, immortalized cells, tissue adhesion pathways and it is very  
147 aggressive. These tumor features are consequence of different genes and molecules  
148 expressions that provide the metastatic ability and tumor progression [25, 26].

149

## 150 **LABC diagnosis**

151

152 Mammography screening is an essential evaluation for diagnosing tumoral BC  
153 tissue with less than 1 centimeter of size. Only mammography can detect the tumor  
154 at this size ensuring in this way approximately 95% of cure. Physical examination is  
155 important to find tumor, however just tumors bigger than 1 centimeter are identified in  
156 this way, decreasing the chance of cure. In this sense, bilateral mammography  
157 screening is a significant tool to identify tumor in early stages and increase patient's  
158 survival rates. Although mammography helps to decrease breast cancer-related  
159 deaths, it is not recommended to young women [27]. Routine mammography  
160 screening is only suggested for women over the age of 40 years, since before that  
161 age mammography sensitivity is low [28].

162 In some cases, high mammary density can make difficult breast evaluation by  
163 mammography. In these subjects, ultrasound is a good alternative for evaluation.  
164 Ultrasound is helpful to determine tumor extensive breast involvement, nodal chains  
165 impairment, and to confirm mammography inconclusive results. Besides, ultrasound  
166 is used as an adjuvant to mammography in cases of abnormal results or it is applied  
167 as the first choice in special situations, for instance, in pregnancy, lactation, young  
168 women and inflammatory conditions in the breast tissue. In the presence of lesions  
169 found in the breast tissue by mammography, ultrasound auxiliaries in the biopsies  
170 collection as well as it is able to identify additional lesions in 14% of women with high  
171 mammary density [29].

172 Breast tissue biopsy is the most specific way to diagnose tumor development,  
173 however, breast surgery is an invasive procedure. In some cases, it is possible to  
174 perform a core needle biopsy that is essential to aid the diagnosis. The fine-needle  
175 aspiration biopsy has a high sensitivity and specificity in LABC. Moreover, the



176 identification of several detectable biomarkers from tumor samples, such as hormone  
177 receptors and inflammatory molecules, could help in the decision of treatment and  
178 improve patient's survival [30].

179         Likewise, breast-specific magnetic resonance imaging (MRI) is frequently used  
180 in the diagnostic setting, mainly in young and high breast density women.  
181 Theoretically, routine screening is not suggested for women under 40 years old,  
182 however, annual breast MRI is indicated for women over 30 years old that present a  
183 lifetime breast cancer risk at or exceeding 20%–25%. This group of population  
184 comprises women that suspect of a deleterious genetic mutation associated with BC  
185 or received radiation to treat lymphoma [31].

186         MRI is more sensitive to reveal LABC extension and staging of tumor than  
187 conventional methods, such as mammography and ultrasonography. Hence, MRI is a  
188 commonly used imaging modality in LABC. Pre-operative MRI is essential to LABC  
189 patients for surgical planning. MRI can classify the BC appearance by its morphology  
190 into different phenotypic categories. This information is involved with response of  
191 neoadjuvant chemotherapy and can offer breast-conserving surgery. Moreover, MRI  
192 can inform LABC in triple negative, Her2 positive and hormone receptor negative  
193 tumors, especially in solid imaging phenotype. Moreover, MRI is able to detect tumor  
194 physiology by demonstrating contrast enhancement associated with tumor  
195 angiogenesis. In this sense, MRI can provide an earlier more accurate marker of  
196 tumor than conventional methods [32].

197         Therefore, MRI, in the same way to ultrasound, has high sensitivity, on the  
198 other hand presents low specificity for BC detection. Nevertheless, MRI similarly to  
199 ultrasound is considered more sensitive than mammography for the dense breast  
200 tissue evaluation [33].

## 201 **LABC current treatments**

202

203 LABC treatment is the biggest challenge after diagnosis, since at BC stage III  
204 there is higher risk of metastasis. There are no standard therapy procedures  
205 conducted for LABC patients, particularly because this patient group is very  
206 heterogeneous. In this sense, the ideal therapy should be personalized and  
207 individual, considering the patient characteristics, as tumor size, ER, PR, human  
208 epidermal growth factor receptor-2 (HER2), local extension, and lymph nodes  
209 invasion state [34, 35, 36, 37].

210 The most common methods for BC therapy, including LABC, are surgery [38],  
211 radiotherapy [39], and chemotherapy [40]. All these procedures are performed to  
212 control the locoregional disease and to eliminate distant metastasis. However, even  
213 with the treatment, there are a lot of patients that present tumor recurrences [41].

214 The surgery for complete breast removal is called mastectomy. First of all, to  
215 perform this type of surgery it is essential to evaluate if surgery is feasible. Second of  
216 all, it is necessary to consider three main aspects, including primary tumor area size,  
217 skin or thoracic involvement, and axillary lymph node impairment. Finally, gathering  
218 all this information it is possible to select the most effective mastectomy procedure  
219 for the patient. There are four different mastectomy methods: radical mastectomy,  
220 modified radical mastectomy, simple total mastectomy, and subcutaneous  
221 mastectomy. Currently, the most used mastectomy procedure is the modified radical  
222 mastectomy that differently from the radical mastectomy, consists of breast removal  
223 and axillary lymphadenectomy (surgery to remove axillary lymph nodes), preserving  
224 the breast muscle [40]. Radical mastectomy is not used commonly because of the  
225 high mortality rates, comorbidity, associated with this kind of method. On the other

226 hand, simple total mastectomy and subcutaneous mastectomy are not indicated as  
227 an alternative way for LABC treatment [35, 42].

228 Radiotherapy is another technique that can be used for LABC patients [35].  
229 This procedure is able to destroy tumor cells through ionizing radiation beam [43].  
230 The radiation dose is calculated considering the tumor tissue volume to kill all the  
231 neoplastic cells with less damage to normal cells than possible. Irradiated cells  
232 undergo water hydrolysis and DNA damage following vital system and proliferation  
233 capacity impairments. Radiotherapy is indicated for regional or local treatment, being  
234 used alone or in association with another procedure, before, during or after surgery  
235 and/or chemotherapy. Depending of the radiation dose and machine source,  
236 radiotherapy can be classified as superficial, semiprofound, profound teletherapy,  
237 profound therapy and brachytherapy. Unfortunately, radiotherapy has some  
238 immediate and late side effects, such as mucositis, while late side effects comprise  
239 fibrosis and tissue atrophies. In order to minimize side effects and damages to  
240 normal cells, the tolerance of normal area must be respected [40, 44, 45, 46].

241 On the other hand, subjects with LABC can also be treated by chemotherapy  
242 [35, 47]. Chemotherapy is a method based on chemical agents in the treatment of  
243 diseases caused by biological mediators. In the treatment of different cancer types,  
244 chemotherapy is used as antineoplastic to specially reduce cell proliferation [48].  
245 Currently, there are several chemotherapeutic drugs being commercialized by the  
246 pharmaceutical industry and all these drugs perform their function acting in the cellular  
247 cycle. Chemotherapeutic drugs that act in cells at proliferative stage or not are called  
248 non-specific cell cycle. Drugs that damage cells only during the cellular proliferation  
249 are called cell cycle-specific. Additionally, there are some chemotherapeutics agents  
250 that perform their function at specific cellular cycle phases (synthesis, G2 or mitosis

251 phases), and those drugs are nominated phase-specific agents [48, 49, 50].  
252 Depending on the tumor development and stage of progression, the chemotherapy is  
253 a therapeutic alternative with curative purpose, however, in advanced situations, as  
254 for LABC, these drugs are used as neoadjuvant procedure or as palliative option to  
255 increase the quality of survival [51]. The biggest problem involving chemotherapy  
256 administration is that these agents are not specific for neoplastic cells. In this sense,  
257 usually chemotherapeutic drugs induce several side effects. These negative effects  
258 go from nausea, vomiting and agitation including also damages to the nervous  
259 central system related to the post period of administration being classified as early,  
260 immediate, late, or ultra-late side effects [38, 48, 52, 53]. Regarding to this problem,  
261 several researches around the world look for the development of more specific  
262 chemotherapeutic agents for the tumor cells with the aim of reducing side effects  
263 which could compromise therapeutic attendance.

264 To achieve BC remission, patients with LABC can perform all three main  
265 treatment alternatives, mastectomy, radiotherapy, and chemotherapy, usually  
266 combined or in different therapeutic phases. However, systemic procedures and/or  
267 radiotherapy before surgery also can be perform by some institutes [38]. However,  
268 neoadjuvant chemotherapy, which is the administration of therapeutic agents before  
269 the main treatment procedure, has been an important alternative for LABC therapy  
270 [41, 53, 54].

271 Unfortunately, there are many patients with LABC that present resistance to  
272 chemotherapy [55]. In this sense, several researches are trying to understand the  
273 tumor cell pathway of drug resistance development to find new targets and propose  
274 new chemotherapeutic agents. There are some aspects in cancer cells that can promote  
275 chemotherapy resistance, such as absorption, distribution, transport, metabolism,

276 and elimination. A study performed by Vishnukumar et al [56], for example, described  
277 that P-glycoprotein (P-gp), an ATP-dependent drug efflux pump which is able to  
278 transport anti-cancer drugs, is influenced by *MDR1* gene. *MDR1* gene, also called  
279 *ABCB1* gene, is located at chromosome 7 (q21.1). *MDR1* polymorphism directly  
280 affects P-gp expression, changing the anti-tumor agent transport.

281 The HER2 is a protein responsible for the development and growth of  
282 epithelial cells. However, HER2 gene is a proto-oncogene and an unspecific  
283 alteration in the sequence can activate this gene to an oncogene. Some LABC  
284 patients present HER2-positive receptors and it has been used as a new therapy  
285 target [41, 57, 58]. Trastuzumab emtansine is a recent chemotherapeutic drug which  
286 is an antibody loaded with the anti-tumor drug. The antibody binds specifically cells  
287 that present HER2 receptors expressed in the cellular membrane and release the  
288 drug inside of the tumor cell. This type of treatment has less side effects, is faster  
289 than common agents, and has been improving HER2-positive LABC treatment. On  
290 the other hand, some subjects still will develop recurrences post trastuzumab  
291 administration [58, 59]. In this sense, several works are focusing in the identification  
292 of more effective procedures. A new proposal in this respect is neoadjuvant therapy  
293 in HER2-positive BC using pertuzumab associated with trastuzumab. The incidences  
294 show higher percentage of patients achieving a pathological complete response with  
295 pertuzumab and trastuzumab than trastuzumab treatment alone [60]. In summary,  
296 figure 2 shows a schematic representation of BC diagnosis and treatment.

297

298

**Figure 2 here**

299

300 Despite these neoadjuvant therapies and treatment improvements, intensive

301 clinical research in this field should be maintained. A promising area is the use of  
302 natural products that are composed by a bioactive chemical matrix, including different  
303 molecules that are able to positively modulate cellular homeostasis, especially by  
304 antioxidant capacity. New perspectives of treatment for LABC are discussed in the  
305 next section.

306

### 307 **LABC new perspectives**

308

309 In some cases, LABC can present pharmacological resistance and difficulty to  
310 treatment, resulting in poor prognosis. Normally, chemotherapy is the first-line way of  
311 therapy in LABC, however multidrug resistance (MDR) is a severe problem found  
312 during the treatment. Therefore, it is very important for patient's survival to detect  
313 MDR before initiate the first-line chemotherapy [55].

314 In this sense, Atalay et al (2006) reported that some genes are involved in  
315 LABC MDR, such as ATP-binding cassette sub-family B member 1 gene (*ABCB1* –  
316 chromosome 7) and ATP-binding cassette sub-family C member 1 gene (*ABCC1* –  
317 chromosome 16). The results found in this study, performed with 25 women with  
318 LABC before chemotherapy, suggested that *ABCB1* gene expression during  
319 chemotherapy increased the resistance and treatment unresponsiveness.  
320 Nevertheless, *ABCC1* gene expression did not contribute strongly with the clinical  
321 drug response [61].

322 Since LABC patients frequently present MDR during the pharmacological  
323 therapy, studies to improve this obstacle are been performed. A previous report  
324 indicated that guaraná (*Paullinia cupana*), a functional food native from Amazon,  
325 composed of high levels of caffeine, catechins and other bioactive molecules with

326 several functional proprieties [62] presents antitumor activity against BC and  
327 increased the response to chemotherapeutic drugs [63]. Study performed by Hertz et  
328 al (2015) suggested that guaraná extract is able to decrease BC cells (MCF-7)  
329 proliferation and increase chemotherapy activity of several drugs commonly used for  
330 BC therapy [50].

331 Moreover, some bioactive molecules found in natural products have been  
332 studied as antitumor agents. Epigallocatechin-3-gallate, for example, found in huge  
333 concentrations in green tea, is capable of potentiating the antiproliferative activity of  
334 sunitinib by inhibiting Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) in the MCF-7 cell  
335 line, the most frequently altered pathway in this type of cancer [39].

336 Besides, caffeine also was tested in addition of cisplatin to analyze whether this  
337 molecule could be able to increase the chemotherapy response in MCF-7 cells.  
338 Niknafs (2011) reported that caffeine increased cisplatin response by apoptosis  
339 induction [63].

340

## 341 **Conclusion**

342

343 In summary, LABC is considered an aggressive type of BC and responsible for  
344 poor prognosis, resulting in low survival. LABC has the capacity to spread very fast  
345 and sometimes, this condition can complicate developing inflammatory injuries in the  
346 breast tissue, in case of IBC. Moreover, LABC is associated with difficult treatment,  
347 since LABC frequently present chemotherapy resistance. To solve this obstacle, new  
348 studies are being performed to find alternative therapies to improve treatment  
349 responsiveness. At this point, LABC is considered a huge challenge to science, since  
350 this condition is target for the development of new therapies to increase

351 chemotherapy response and ensure patients survival and quality of life.

352

## 353 **References**

354

355 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J*  
356 *Clin.* 2009; 59(4):225-49.

357

358 2 Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and  
359 Etiology. *Cell Biochem Biophys.* 2015 Jun; 72(2):333-8.

360

361 3 Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis  
362 CA, Khaled H, Liu MC, Martin M, Namer M, O'Shaughnessy JA, Shen ZZ, Albain KS.  
363 The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast*  
364 *Cancer.* 2005 Dec; 6(5):391-401.

365

366 4 Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest.* 2007 Nov;  
367 117(11):3155-63.

368

369 5 Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and  
370 models. *Nat Rev Cancer.* 2005 Aug; 5(8):591-602.

371

372 6 International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumors 7th ed  
373 (Wiley-Blackwell, 2009).

374

375 7 Tryfonidis K, Senkus E, Cardoso MJ, Cardoso F. Management of locally advanced  
376 breast cancer-perspectives and future directions. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015 Mar;  
377 12(3):147-62.

378

379 8 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM,  
380 Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and  
381 major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1; 136(5):E359-86.



- 382 9 World Cancer Research Fund International (WCRFI), 2016. Website:  
383 [http://www.wcrf.org/int/research-we-fund/continuous-update-project-findings-](http://www.wcrf.org/int/research-we-fund/continuous-update-project-findings-reports/breast-cancer)  
384 [reports/breast-cancer](http://www.wcrf.org/int/research-we-fund/continuous-update-project-findings-reports/breast-cancer)  
385
- 386 10 Allemani C, Sant M, Weir HK, Richardson LC, Baili P, Storm H, Siesling S,  
387 Torrella-Ramos A, Voogd AC, Aareleid T, Ardanaz E, Berrino F, Bielska-Lasota M,  
388 Bolick S, Cirilli C, Colonna M, Contiero P, Cress R, Crocetti E, Fulton JP, Grosclaude  
389 P, Hakulinen T, Izarzugaza MI, Malmström P, Peignaux K, Primic-Žakelj M, Rachtan  
390 J, Safaei Diba C, Sánchez MJ, Schymura MJ, Shen T, Traina A, Tryggvadottir L,  
391 Tumino R, Velten M, Vercelli M, Wolf HJ, Woronoff AS, Wu X, Coleman MP. Breast  
392 cancer survival in the US and Europe: a CONCORD high-resolution study. *Int J*  
393 *Cancer*. 2013 Mar 1; 132(5):1170-81.  
394
- 395 11 Balogun OD, Formenti SC. Locally advanced breast cancer - strategies for  
396 developing nations. *Front Oncol*. 2015 Apr 27; 5:89.  
397
- 398 12 Giordano SH. Update on locally advanced breast cancer. *Oncologist*. 2003;  
399 8(6):521-30.  
400
- 401 13 Anderson WF, Schairer C, Chen BE, Hance KW, Levine PH. Epidemiology of  
402 inflammatory breast cancer (IBC). *Breast Dis*. 2005-2006; 22:9-23.  
403
- 404 14 Newman LA. Epidemiology of locally advanced breast cancer. *Semin Radiat*  
405 *Oncol*. 2009 Oct; 19(4):195-203.  
406
- 407 15 Chia S, Swain SM, Byrd DR. Locally advanced and inflammatory breast cancer. *J*  
408 *Clin Oncol*. 2008 Feb 10; 26(5):786-90.  
409
- 410 16 Merajver SD, Sabel MS. Inflammatory breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME,  
411 Morrow M, Osborne CK, editors. *Diseases of the Breast*. 3rd ed. Philadelphia:  
412 Lippincott Williams and Wilkins, 2004.  
413
- 414 17 Kleer CG, van Golen KL, Merajver SD. Molecular biology of breast cancer  
415 metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular  
416 determinants. *Breast Cancer Res*. 2000; 2(6):423-9.

- 417 18 Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van den Eynden GG, Benoy I, van Dam P,  
418 Colpaert CG, Fox SB, Turley H, Harris AL, Van Marck EA, Vermeulen PB, Dirix LY.  
419 Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus  
420 noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene  
421 expression quantification. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 1; 10(23):7965-71.  
422
- 423 19 Shirakawa K, Furuhashi S, Watanabe I, Hayase H, Shimizu A, Ikarashi Y, Yoshida  
424 T, Terada M, Hashimoto D, Wakasugi H. Induction of vasculogenesis in breast  
425 cancer models. *Br J Cancer.* 2002 Dec 2; 87(12):1454-61.  
426
- 427 20 Guérin M, Gabillot M, Mathieu MC, Travagli JP, Spielmann M, Andrieu N, Riou G.  
428 Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and  
429 non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. *Int J Cancer.* 1989 Feb 15;  
430 43(2):201-8.  
431
- 432 21 Kleer CG, Zhang Y, Pan Q, Gallagher G, Wu M, Wu ZF, Merajver SD. WISP3 and  
433 RhoC guanosine triphosphatase cooperate in the development of inflammatory  
434 breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(1):R110-5.  
435
- 436 22 Cohen EN, Gao H, Anfossi S, Mego M, Reddy NG, Debeb B, Giordano A, Tin S,  
437 Wu Q, Garza RJ, Cristofanilli M, Mani SA, Croix DA, Ueno NT, Woodward WA,  
438 Luthra R Krishnamurthy S, Reuben JM. Inflammation Mediated Metastasis: Immune  
439 Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Inflammatory Breast Cancer Cells.  
440 *PLoS One.* 2015;10(7):e0132710.  
441
- 442 23 Kleer CG1, van Golen KL, Merajver SD. Molecular biology of breast cancer  
443 metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular  
444 determinants. *Breast Cancer Res.* 2000; 2(6):423-9.  
445
- 446 24 Wu M, Merajver SD. Molecular biology of inflammatory breast cancer: applications  
447 to diagnosis, prognosis, and therapy. *Breast Dis.* 2005-2006; 22:25-34.  
448
- 449 25 Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L,  
450 Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C  
451 promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 2001 Feb; 7(2):192-8.

- 452 26 Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular  
453 endothelial growth factor (VEGF)-C in preoperative biopsy specimens and metastatic  
454 foci of regional lymph nodes in submucosal gastric carcinoma. *World J Surg Oncol.*  
455 2005 Jan 7; 3(1):2.  
456
- 457 27 Cuckle H. Breast cancer screening by mammography: an overview. *Clin Radio. I*  
458 1991; 43:77–80.  
459
- 460 28 Foxcroft LM, Evans EB, Porter AJ. The diagnosis of breast cancer in women  
461 younger than 40. *Breast* 2004; 13:297–306.  
462
- 463 29 Hlawatsch A, Teifke A, Schmidt M, Thelen M. Preoperative assessment of breast  
464 cancer: sonography versus MR imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 2002; 179(6):1493-  
465 501.  
466
- 467 30 Ragaz J, Bard R, Rebbeck P, Goldie J, Coldman A, Spinelli J. Neoadjuvant  
468 (preoperative) chemotherapy for breast cancer. *Cancer* 1985; 56:719-724.  
469
- 470 31 Saslow D, Boetes C, Burke W, Harms S, Leach MO, Lehman CD, Morris E,  
471 Pisano E, Schnall M, Sener S, Smith RA, Warner E, Yaffe M, Andrews KS, Russell  
472 CA. American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct  
473 to mammography. *CA Cancer J Clin.* 2007 Mar-Apr; 57(2):75-89.  
474
- 475 32 Price ER, Wong J, Mukhtar R, Hylton N, Esserman LJ. How to use magnetic  
476 resonance imaging following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast  
477 cancer. *World J Clin Cases* 2015 July; 3(7): 607-613.  
478
- 479 33 Pediconi F, Catalano C, Roselli A, Dominelli V, Cagioli S, Karatasiou A, Pronio A,  
480 Kirchin MA, Passariello R. The challenge of imaging dense breast parenchyma: is  
481 magnetic resonance mammography the technique of choice? A comparative study  
482 with x-ray mammography and whole-breast ultrasound. *Invest Radiol.* 2009 Jul;  
483 44(7):412-21.

- 484 34 Hebert-Croteau N, Brisson J, Latreille J, Rivard M, Abdelaziz N, Martin G.  
485 Compliance with Consensus Recommendations for Systemic Therapy is Associated  
486 with Improved Survival of Women with Node-Negative Breast Cancer. *J Clin*  
487 *Oncology*. 2004; 22(18):3685-3693.  
488
- 489 35 Rustogi A, Budrukkar A, Dinshaw K, Jalali R. Management of locally advanced  
490 breast cancer: Evolution and current practice. *J Cancer Res Ther*. 2005; 1(1); 21-30.  
491
- 492 36 McCutcheon S, Cardoso F. Challenges in optimizing care in advanced breast  
493 cancer patients: Results of an international survey linked to the ABC1 consensus  
494 conference. *The Breast*. 2015; 24: 623-629.  
495
- 496 37 Al-Khanbashi M, Caramuta S, Alajmi AM, Al-Haddabi I, Al-Riyami M, Lui W, Al-  
497 Moundhri MS. Tissue and Serum miRNA Profile in Locally Advanced Breast Cancer  
498 (LABC) in Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy (NAC) Treatment. *PlosOne*.  
499 2016; 1-22.  
500
- 501 38 Brackstone M, Fletcher GG, Dayes IS, Madarnas Y, SenGupta SK, Verma S;  
502 Members of the Breast Cancer Disease Site Group. Locoregional therapy of locally  
503 advanced breast cancer: a clinical practice guideline. *Curr Oncol*. 2015; 22: S54-66.  
504
- 505 39 Zhou Y, Tang J, Du Y, Ding J, Liu JY. The green tea polyphenol EGCG  
506 potentiates the antiproliferative activity of sunitinib in human cancer cells. *Tumor Biol*.  
507 2016 Jul; 37(7):8555-66.  
508
- 509 40 Agrawal S, Banswal L, Saha A, Arun I, Datta SS, Chatterjee S, Ahmed R.  
510 Progesterone Receptors, Pathological Complete Response and Early Outcome for  
511 Locally Advanced Breast Cancer – a Single Centre Study. *Indian J Surg Oncol*. 2016;  
512 7(4):397-406.  
513
- 514 41 Smith JW, Buyse ME, Rastogi P, Geyer CE Jr, Jacobs SA, Patocskai EJ,  
515 Robidoux A, Conlin AK, Ansari B, Keogh GP, Stella PJ, Gross HM, Lord RS, Polikoff  
516 JA, Mauquoi C, Mamounas EP, Swain SM, Wolmark N. Epirubicin With  
517 Cyclophosphamide Followed by Docetaxel With Trastuzumab and Bevacizumab as

- 518 Neoadjuvant Therapy for HER2-Positive Locally Advanced Breast Cancer or as  
519 Adjuvant Therapy for HER2-Positive Pathologic Stage III Breast Cancer: A Phase II  
520 Trial of the NSABP Foundation Research Group, FB-5. *Clin Breast Cancer*. 2016; 1-  
521 7.  
522
- 523 42 Huang N, Liu M, Chen J, Yang B, Xue J, Quan C, Mo M, Liu G, Shen Z, Shao Z,  
524 Wu J. Surgical management of breast cancer in China. *Medicine*. 2016; 95(45); 1-7.  
525
- 526 43 Early Breast cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of  
527 radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year  
528 breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17  
529 randomised trials. *Lancet*. 2011; 378(9804):1707-1716.  
530
- 531 44 Hardenbergh PH, Bentel GC, Prosnitz LR, Marks LB. Postmastectomy  
532 radiotherapy: toxicities and techniques to reduce them. *Semin Radiat Oncol*. 1999; 9:  
533 259-268.  
534
- 535 45 Le Scodan R, Selz J, Stevens D, Bollet MA, de la Lande B, Daveau C, Lerebours  
536 F, Labib A, Bruant S. Radiotherapy for stage II and stage III breast cancer patients  
537 with negative lymph nodes after preoperative chemotherapy and mastectomy. *Int J*  
538 *Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 82:1- 7.  
539
- 540 46 Liu J, Mao K, Jiang S, Jiang W, Chen K, Kim BYS, Liu Q, Jacobs LK. The role of  
541 postmastectomy radiotherapy in clinically node-positive, stage II-III breast cancer  
542 patients with pathological negative nodes after neoadjuvant chemotherapy: an  
543 analysis from the NCDB. *Oncotarget*. 2015; 7(17):24848-24859.  
544
- 545 47 Nielsen DL. Mechanisms and functional aspects of multidrug resistance in Ehrlich  
546 ascites tumor cells. *Dan Med Bull*. 2004; 51:393-414.  
547
- 548 48 Rang HP, Dale, MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Pharmacology. 7 ed.  
549 Elsevier, 2012.

- 550 49 Spence, R. A. J.; Jonhston, P. G. *Oncology*; Jonhston, P. G., ed; Oxford  
551 University Press: Oxford, 2001, p. 1-14, 121-132; B. A.; Longo, D. L. *Cancer*  
552 *chemotherapy and biotherapy*; 2<sup>a</sup>. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia, 1996.
- 553 50 Hertz E, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin V, Holmrich S, Assmann C, Ledur P,  
554 Ribeiro EE, DE Souza Filho OC, Mânica-Cattani MF, DA Cruz IB. Effect of Paullinia  
555 cupana on MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. *Mol Clin*  
556 *Oncol.* 2015 Jan; 3(1):37-43.
- 557
- 558 51 Yeo B, Turner NC, Jones A. An update on the medical management of breast  
559 cancer. *BMJ.* 2014; 348: 3608.
- 560
- 561 52 Weiss J. Cancer-related fatigue: prevalence, assessment and treatment  
562 strategies. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2011; 11:441-446.
- 563
- 564 53 Wang Z, Chen JQ, Liu JL, Qin XG. Serious neutropenia following neoadjuvant  
565 chemotherapy for locally advanced breast cancer: A case report. *Oncol Lett.* 2016;  
566 11(2):1597-1599.
- 567
- 568 54 Nahleh ZA, Barlow WE, Hayes DF, Schott AF, Gralow JR, Sikoy WM, Perez EA,  
569 Chennuru S, Mirshahidi HR, Corso sw, Lew DL, Puztai I, Livingston RB, Hortobagyi  
570 GN. SWOG S0800 (NCI CDR0000636131): addition of bevacizumab to neoadjuvant  
571 nab-paclitaxel with dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide improves  
572 pathologic complete response (pCR) rates in inflammatory or locally advanced breast  
573 cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2016; 158(3):485-495.
- 574
- 575 55 Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of  
576 resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol.*  
577 2007; 608:1-22.
- 578
- 579 56 Vishnukumar S, Umamaheswaran G, Anichavezhi D, Indumathy S, Adithan C,  
580 Srinivasan K, Kadambari D. P-glycoprotein expression as a predictor of response to  
581 neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Indian J Cancer.* 2013; 50(3):195-199.
- 582
- 583 57 Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive  
584 breast cancer. *N Engl J Med.* 2011; 365:1273-83.

- 585 58 Perez EA, Romond EH, Suman VJ, et al. Trastuzumab plus adjuvant  
586 chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer:  
587 planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J*  
588 *Clin Oncol* 2014; 32:3744-52.
- 589
- 590 59 Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY,  
591 Diéras V, Guardino E, Fang I, Lu MW, Olsen S, Blackwell K, Emilia Study Group.  
592 Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.*  
593 2012; 367(19): 1783-1791.
- 594
- 595 60 Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *Lancet.* 2016, *in press.*
- 596
- 597 61 Atalay C, Deliloglu Gurhan I, Irkkan C, Gunduz U. Multidrug resistance in locally  
598 advanced breast cancer. *Tumor Biol.* 2006; 27(6):309-18.
- 599
- 600 62 Schimpl FC, da Silva JF, Gonçalves JF, Mazzafera P. Guarana: revisiting a highly  
601 caffeinated plant from the Amazon. *J Ethnopharmacol.* 2013 Oct 28; 150(1):14-31.
- 602
- 603 63 Niknafs B. Induction of apoptosis and non-apoptosis in human breast cancer cell  
604 line (MCF-7) by cisplatin and caffeine. *Iran Biomed J.* 2011; 15(4):130-3.

Figure 1.

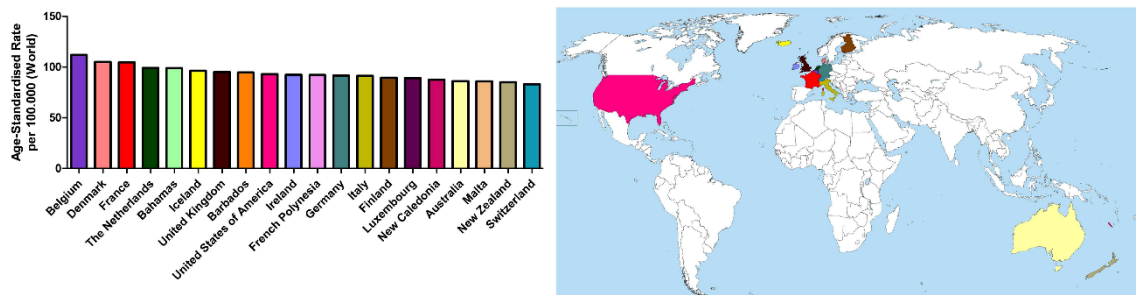


Figure 1. Representative image of the countries with the top 20 highest incidence of breast cancer in 2012.

Figure 2.

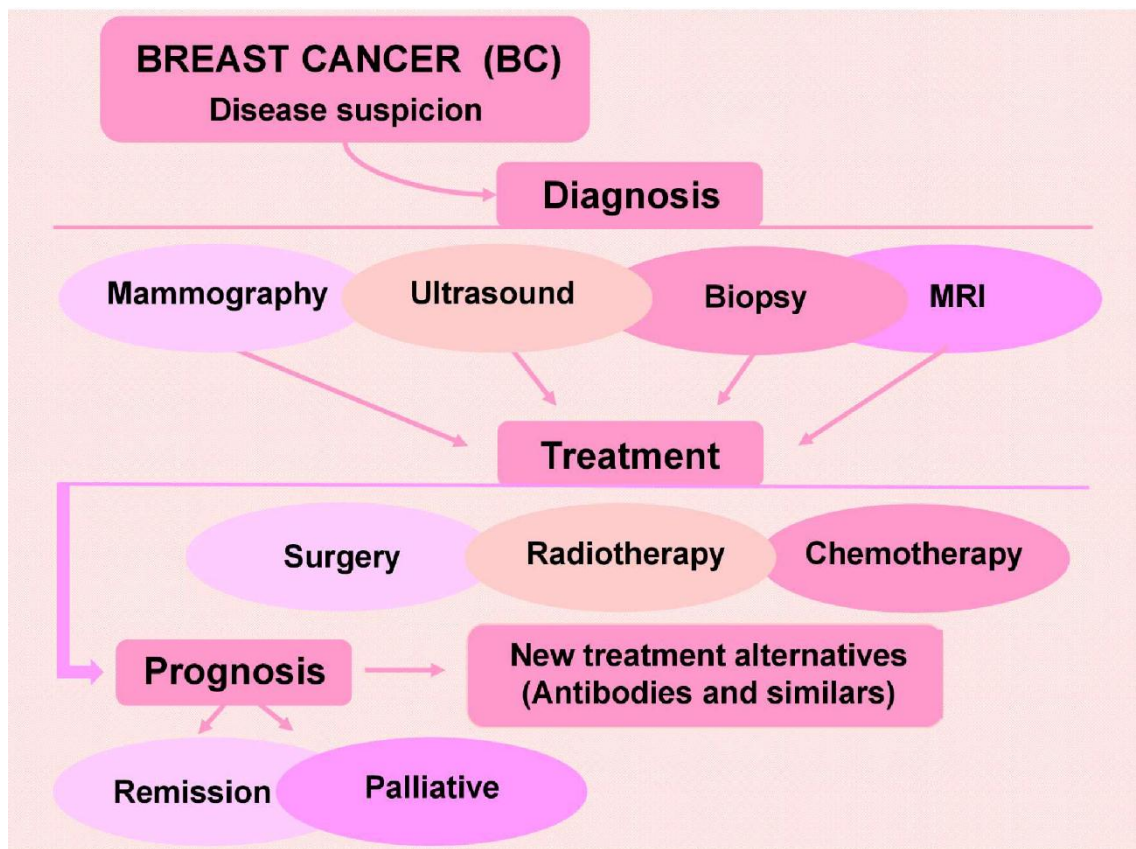


Figure 2. Schematic representation of breast cancer diagnosis and treatment approaches and disease progression (Tryfonidis et al., 2015).



3.2 MANUSCRITO 2 - TEA TREE OIL PRESENTS *IN VITRO* ANTITUMOR ACTIVITY ON BREAST CANCER CELLS WITHOUT CYTOTOXIC EFFECTS ON FIBROBLASTS AND ON PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

**Autores:** Charles Elias Assmann, Francine Carla Cadoná, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman, Eduardo Bortoluzzi Dornelles, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Revista:** Cancer Chemotherapy and Pharmacology.

**Situação:** Submetido.

1 **Tea tree oil presents *in vitro* antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic**  
2 **effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells**

3

4 Charles Elias Assmann<sup>a,b</sup>, Francine Carla Cadoná<sup>b</sup>, Beatriz da Silva Rosa Bonadiman<sup>b,c</sup>,  
5 Eduardo Bortoluzzi Dornelles<sup>b</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>a,b,c,\*</sup>

6

7 <sup>a</sup>Graduate Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry), Federal University  
8 of Santa Maria, Brazil

9 <sup>b</sup>Laboratory of Biogenomics, Federal University of Santa Maria, Brazil

10 <sup>c</sup>Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Brazil

11

12 \*Corresponding author at: 1000 Roraima Av., Building 19, Room 3101, Santa Maria-RS,  
13 Brazil, Zip Code: 97105900. Phone.: +55 55 32208163, E-mail address:  
14 ivana.biogenomica@gmail.com (I. B. M. da Cruz)

15 **Acknowledgments**

16 We would like to thank the Laboratory of Biogenomics team for support and  
17 technical assistance as well as the participating subjects for their contribution to this study.  
18 We also would like to thank for the Brazilian financial support provided by “Coordenação de  
19 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” and “Conselho Nacional de  
20 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”.

## 1 Abstract

2 *Purpose* To investigate the *in vitro* antitumor activity of tea tree oil (TTO) on breast cancer  
3 cells (MCF-7) and its cytotoxicity on fibroblasts (HFF-1) and on peripheral blood  
4 mononuclear cells (PBMCs).

5 *Methods* TTO composition was analyzed by High Resolution Gas Chromatography (HRGC).  
6 MCF-7 were exposed to different TTO concentrations for 24h and 72h. HFF-1 and PBMCs  
7 were exposed to the same conditions to evaluate TTO cytotoxicity. Cell viability and  
8 proliferation were measured by MTT assay. Apoptosis and cell cycle analysis were evaluated  
9 by flow cytometry. p53, Bax/Bcl-2 gene modulation was determined by qRT-PCR analysis.  
10 Colony formation was assessed through Clonogenic Assay. A growth curve was performed to  
11 evaluate cell proliferation.

12 *Results* TTO HRGC showed seventeen main constituents, such as Terpinen-4-ol,  $\gamma$ -Terpinene  
13 and  $\alpha$ -Terpinene. TTO at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  showed a high antitumor action, decreasing cell  
14 viability and cell proliferation of MCF-7. TTO at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  increased the number of MCF-7  
15 in the early stages of apoptosis and increased the Bax/Bcl-2 genes ratio. TTO decreased cell  
16 growth and arrested MCF-7 in the S of the cell cycle. Lower antitumor concentrations  
17 evaluated in MCF-7 were not toxic to PBMCs and HFF-1. Also, TTO was capable of  
18 inducing cell proliferation in fibroblasts after 72h indicating non-cytotoxic effect in these  
19 cells.

20 *Conclusions* TTO exhibited *in vitro* antitumor breast cancer effect by decreasing cell viability,  
21 modulating apoptotic pathways and cell proliferation arrestment. In this sense, TTO could be  
22 used as a target to develop new therapies to treat topically locally advanced breast cancer.

23

24 **Keywords:** *Melaleuca alternifolia*, Breast cancer, Antitumor activity, Apoptosis, Cell cycle.

## 1 Introduction

2 *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (Myrtaceae), popularly known as  
3 tea tree, is an Australian native plant. Its essential oil, known as tea tree oil (TTO) is topically  
4 used in folk medicine for several treatments, such as acne vulgaris and wounds related to  
5 herpes virus. Scientific evidences have suggested that TTO presents biological properties,  
6 such as antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, and antitumor activity [1-5]. Moreover,  
7 TTO can reduce skin inflammation and improve healing processes [3, 5].

8 Due to TTO bioactive chemical matrix, some studies also postulated its use to treat  
9 superficial cancer types. Some investigations reported that TTO, when applied topically, can  
10 inhibit tumor growth through its cytotoxic action by mechanisms possibly related to its skin  
11 penetrating antioxidant components [6-8]. Terpenes are present in abundance in TTO and  
12 they are known for their positive biological activities. Terpinen-4-ol, for example, one of the  
13 main constituents of TTO, has been related to *in vitro* human melanoma cells growth  
14 inhibition [9].

15 Although there are many investigations assessing the effects of TTO or several TTO  
16 isolated components, especially on melanoma tumors, most of these studies were restricted to  
17 skin cancer cells due to the toxicity of its bioactive compounds [8]. However, a previous  
18 research performed by Nielsen [10] suggested that TTO could present some important  
19 antiproliferative effect against breast cancer cells.

20 In fact, breast cancer is the most prevalent diagnosed cancer worldwide and the  
21 leading cause of cancer mortality in women [11]. Although the existence of extensive and  
22 effective treatments for some breast cancer types, including surgery, chemotherapy,  
23 immunotherapy and radiotherapy, approximately 30-40% of patients develop advanced breast  
24 cancer to either distant tumor dissemination (metastasis) or locally advanced breast cancer

1 (LABC). LABC includes primary cancers with extensive nodal or skin involvement that are  
2 not amenable to initial surgery or radiotherapy with curative intent. Moreover, LABC often  
3 heralds the rapid onset of metastatic disease, explaining the high mortality rates [11, 12]. In  
4 these terms, solutions are needed to address this health issue including exploratory studies of  
5 new antitumor therapy alternatives, based in natural products such as TTO, with potential  
6 topical activity directed for subjects with LABC.

7 In order to test the potential efficacy of TTO topical use on LABC, the current study  
8 investigated TTO effects on the cellular viability and proliferative rate of breast cancer cells  
9 (MCF-7) evaluating its modulatory capacity on apoptotic and proliferative genes. Also, a  
10 complementary investigation was performed to analyze the potential TTO cytotoxic effect on  
11 normal cells, including fibroblasts cell line (HFF-1) and peripheral blood mononuclear cells  
12 (PBMCs) derived from healthy subjects.

13

## 14 **Material and methods**

### 15 **Tea tree oil production and characterization**

16 TTO was obtained by the conventional method of steam distillation from tree leaves.  
17 The essential oil chemical composition analysis was performed by High Resolution Gas  
18 Chromatography (HRGC) using an AGILENT 7820A GC (Agilent Technologies, Santa  
19 Clara, CA, USA) gas chromatographer, under the following conditions: Column: HP-5 30m x  
20 0.32mm x 0.25 $\mu$ m (AGILENT); Column temperature 70°C (0min), 3°C/min at 200°C;  
21 Injector: 250°C Split: 1/; Detector FID: 250°C; Injection volume 1 $\mu$ L (diluted in chloroform  
22 1%). The standards used in this analysis included  $\alpha$ -Thujene,  $\alpha$ -Pinene, Sabinene,  $\beta$ -Pinene,  
23 Myrcene,  $\alpha$ -Phellandrene,  $\alpha$ -Terpinene, p-Cymene, Limonene, 1,8-cineol,  $\gamma$ -Terpinene,  
24 Terpinolene, Terpinen-4-ol,  $\alpha$ -Terpineol,  $\beta$ -gurjunene, Viridiflorene and Cis-calamenene  
25 acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## 1 **Cell culture**

2 MCF-7 breast cancer cell line (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>) and HFF-1 fibroblast cell line  
3 (ATCC<sup>®</sup> SCRC-1041<sup>™</sup>) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC<sup>®</sup>,  
4 Manassas, VA, USA). MCF-7 and HFF-1 cell lines were cultured in *Dulbecco's Modified*  
5 *Eagle Medium* (DMEM) Gibco<sup>™</sup> Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA) with  
6 fetal bovine serum (FBS) to a final concentration of 10% and 15%, respectively, and  
7 supplemented with 1% penicillin/streptomycin (10.000 U/mL; 10 mg/mL) and amphotericin  
8 B (0.25 µg/mL) all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

9 Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from three healthy  
10 individuals (age between 20-25 years) by venous puncture technique and separated using  
11 Histopaque<sup>®</sup>-1077 (1.077 g/mL) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) density centrifugation  
12 media. All of the subjects provided written informed consent to participate in this study, and  
13 the Human Ethics Committee from the Federal University of the Santa Maria previously  
14 approved the protocol under number of registration 23081.015838/2011-10. PBMCs were  
15 cultured using *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 medium Gibco<sup>™</sup> Thermo Fisher  
16 Scientific (Grand Island, NY, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS), and supplemented  
17 with penicillin/streptomycin and amphotericin B as described above. Cell lines were cultured  
18 at 37°C in a humidified atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub> and expanded to obtain the optimal cell  
19 amount to perform all the experiments.

20

## 21 **Cell viability assays**

### 22 **MTT Cell Assay**

23 Initially, a concentration-effect curve of 1, 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 µg/mL was  
24 performed to evaluate the antitumor activity of TTO on MCF-7 cells. The exposition time of

1 24h was used to evaluate cell viability. Untreated cells were maintained as a negative control  
2 and bleomycin (10 µg/mL) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) was chosen as a positive  
3 control. Bleomycin is a chemotherapeutic agent used for cancer treatment that acts via DNA  
4 damage induction [13]. Dimethylsulfoxide (DMSO) 0.25% Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,  
5 USA) was used as the vehicle control for TTO dilution. The highest DMSO percentage found  
6 in the TTO concentration-effect curve was estimated in 0.25%. Therefore, to evaluate whether  
7 DMSO present in the dilution could affect the viability of all cell lines used for this study, we  
8 maintain a DMSO control of 0.25% for the initial MTT cell viability assay. The TTO range  
9 effective concentrations against MCF-7 cells were tested to evaluate the potential cytotoxic  
10 effect on fibroblasts and on PBMC cells.

11 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used  
12 to evaluate MCF-7, HFF-1 and PBMCs cell viability [14]. Briefly, cells were seeded in 96-  
13 well plates ( $2.5 \times 10^5$  cells/well) and treated with TTO concentrations. After the exposition  
14 times, treatments were removed and cells were washed with phosphate buffer (PBS 0.01M,  
15 pH 7.4) to avoid any polyphenols interference. In brief, MTT reagent (5 mg/mL, dissolved in  
16 PBS) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) was added and plates were incubated for 4h at  
17 37°C. The formazan crystals generated due to reduction of MTT salt by metabolically active  
18 cells were released from the cells through DMSO addition and the absorbance was measured  
19 at 560nm using a 96-microplate reader SpectraMax<sup>®</sup> i3 Multimode Plate Reader (Molecular  
20 Devices, Sunnyvale, CA, USA).

21

## 22 **Apoptosis Assay**

23 The potential TTO apoptosis induction on MCF-7 cells was evaluated by flow  
24 cytometry. This assay was performed to confirm TTO treatment cytotoxicity using FITC  
25 Annexin V and Propidium Iodide (PI) staining kit BD Pharmingen<sup>™</sup> (BD Biosciences, San

1 Diego, CA, USA). FITC Annexin V is a sensitive probe for the identification of apoptotic  
2 cells, while PI distinguishes dead cells. Viable cells are both FITC Annexin V and PI  
3 negative, cells undergoing apoptosis are FITC Annexin V positive and PI negative and cells  
4 in the final stages of apoptosis and death cell are FITC Annexin V and PI positive. The  
5 protocol was performed following manufacturer's instructions. In this sense, cells were  
6 seeded in 6-well plates at  $1 \times 10^6$  cells per well. After 24h of treatment, cells were detached  
7 using Trypsin/EDTA (0.25%) Gibco™ Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA),  
8 washed twice with cold PBS and resuspended in 1X Binding Buffer at a concentration of  $1 \times$   
9  $10^6$  cells/mL. Therefore, 100  $\mu$ L of the solution containing  $1 \times 10^5$  cells were transferred to a  
10 5 mL culture tube and the cells were stained with 5  $\mu$ L of FITC Annexin V and 5  $\mu$ L of PI.  
11 Cells underwent smooth vortexing and were incubated in the dark at room temperature (25°C)  
12 for 15 min. Following incubation, 400  $\mu$ L of 1X Binding Buffer was added to each tube, and  
13 the fluorescence of cells was measured by flow cytometry in a BD Accuri™ C6 BD  
14 Biosciences (San Diego, CA, USA) equipment [15].

15

#### 16 **Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)**

17 To further confirm the apoptotic effect of TTO on MCF-7 cells, gene expression of  
18 p53, Bax and Bcl-2 genes was analyzed by qRT-PCR. Shortly, total RNA was isolated with  
19 TRIzol Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA) and quantified at 260 nm using a  
20 NanoDrop™ 1000 spectrophotometer Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA).  
21 Reverse transcription was performed using the iScript cDNA synthesis kit Bio-Rad  
22 Laboratories (Hercules, CA, USA) and oligo primers dT. RNA was added to a final  
23 concentration of 1  $\mu$ g/ $\mu$ L with 0.2  $\mu$ L of DNase Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA,  
24 USA). The first steps of the reaction were: 37°C for 5 minutes, followed by heating at 65°C  
25 for 10 minutes and cooling at 5°C for 10 min. The cDNA was generated with 1  $\mu$ L of iScript



1 reverse transcriptase and 4  $\mu$ L of iScript Mix. The next steps of the reaction were: 25°C for 5  
2 minutes, 42°C for 30 minutes, 85°C for 5 minutes and a final incubation step of 5°C for 60  
3 minutes.  $\beta$ -actin was used as a housekeeping gene. The following sequences of forward and  
4 reverse primers were used for each evaluated gene:  $\beta$ -actin forward  
5 [TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA] and reverse [TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA];  
6 p53 forward [TTGGGTCTTTGAACCCTTGCT] and reverse  
7 [GTGCAGGCCAACTTGTTTCAGT]; Bax forward [CCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA] and  
8 reverse [CCCGGAGGAAGTCCAATGT]; Bcl-2 forward  
9 [GAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT] and reverse [AGTCATCCACAGGGCGATGT].

10 qRT-PCR was performed in a total reaction volume of 20  $\mu$ L with 1  $\mu$ L of cDNA  
11 and 1x of KAPA SYBR FAST Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Woburn, MA,  
12 USA). The specified parameters were used: 95°C for 3 minutes followed by 40 cycles at 95°C  
13 for 10 seconds, 60°C for 30 seconds followed by a melting curve of 65°C to 95°C with an  
14 increase of 0,5°C for 5 seconds in a Rotor-Gene Q equipment (Qiagen, Hilden, Germany).

15

## 16 **Cell proliferative assays**

### 17 **MTT Cell Assay**

18 To investigate the antiproliferative capacity of TTO treatment on breast cancer cells,  
19 the same concentration-effect curve previously described was used under 72h of exposition.  
20 Also, the same MTT method conditions and steps performed to evaluate cell viability were  
21 used here. The TTO range effective concentrations against MCF-7 cells were tested to  
22 evaluate the potential cytotoxic effect on fibroblasts after 72h as well.

## 1 **Cell cycle analysis**

2 TTO antiproliferative effect on MCF-7 cells was confirmed by cell cycle analysis  
3 using flow cytometry after 72h of exposition. PI is a fluorescent nucleic acid dye that can  
4 insert between DNA bases. After DNA staining, it is possible to identify the amount of cells  
5 in each of the interphase stages of the cell cycle by measuring the relative DNA content.  
6 However, RNA molecules can also be stained by PI and a prior treatment with RNase is  
7 necessary to avoid interference. In brief, cells were seeded in 6-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well)  
8 and after 72h of treatment cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in  
9 ethanol 70%. The suspension underwent vortexing and was kept overnight at  $-20^\circ\text{C}$ .  
10 Subsequently, cells were centrifuged and washed once with PBS. After that, cells were  
11 resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of the staining solution prepared in PBS: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
12 RNase and 0.05% Triton X-100 and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 40 min. At last, cells were washed  
13 with 1mL of PBS and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of PBS to perform flow cytometry analysis  
14 using a BD Accuri™ C6 equipment [16].

15

## 16 **Clonogenic Assay and Cell growth curve**

17 Clonogenic assay was performed to further assess TTO antiproliferative effect on  
18 MCF-7 cells. This test, also known as colony formation assay, investigates the clone-forming  
19 ability of single cells. This assay evaluates the capacity of each cell in the population of  
20 undergoing unlimited division and can be used to determine the efficacy of cytotoxic agents  
21 [17]. In short, 500 cells/well were seeded in 6-well plates in triplicate. Plates were incubated  
22 at  $37^\circ\text{C}$  until colony formation (approximately 10-15 days). After that, colonies were stained  
23 using crystal violet dye 0.2% diluted in ethanol 2% at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min. The number of  
24 colonies was then counted using the software *ImageJ* [18].

1           Also, to determine cellular growth a curve was performed [18]. This assay allows the  
2 analysis of chemical agent's cytotoxic effects on the growth of cells during each day of  
3 treatment or after long-time treatments. Briefly, cells (2000 cells/well) were seeded in 6-well  
4 plates and treated at the second day, after cells adherence. Each day one of the plates was  
5 stained with crystal violet dye 0.2% diluted in ethanol 2% at 37°C for 30 min. Finally, sodium  
6 dodecyl sulfate (SDS) 1% was added to solubilize the crystals and the absorbance was  
7 measured at 550 nm using a 96-microplate reader (SpectraMax<sup>®</sup> i3 Multimode Plate Reader).

8

### 9 **Statistical analysis**

10

11           All obtained data were converted to percentages of the control group and statistically  
12 analyzed using *GraphPad Prism* software version 6 GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA,  
13 USA). The results were compared by one- or two-way analysis of variance followed by  
14 Dunnett *post hoc* test. All experiments were conducted in triplicate. Data with  $p < 0.05$  were  
15 considered significant.

16

### 17 **Results**

18

19           Seventeen different molecules were identified in the chemical composition of TTO:  
20  $\alpha$ -Thujene (peak 1),  $\alpha$ -Pinene (peak 2), Sabinene (peak 3),  $\beta$ -Pinene (peak 4), Myrcene (peak  
21 5),  $\alpha$ -Phellandrene (peak 6),  $\alpha$ -Terpinene (peak 7), p-Cymene (peak 8), Limonene (peak 9),  
22 1,8-cineol (peak 10),  $\gamma$ -Terpinene (peak 11), Terpinolene (peak 12) Terpinen-4-ol (peak 13)  
23  $\alpha$ -Terpineol (peak 14)  $\beta$ -gurjunene (peak 15) Viridiflorene (peak 16) Cis-calamenene (peak  
24 17) (Fig. 1 and Table 1) The major molecules found in TTO sample were  $\alpha$ -Terpinene  
25 (10.1%),  $\gamma$ -Terpinene (20.3%) and Terpinen-4-ol (34.6%), comprising 65% of all constituents.

1 **Fig. 1** Representative High Resolution Gas Chromatography profile of *Melaleuca alternifolia*  
2 essential oil.  $\alpha$ -Thujene (peak 1),  $\alpha$ -Pinene (peak 2), Sabinene (peak 3),  $\beta$ -Pinene (peak  
3 4), Myrcene (peak 5),  $\alpha$ -Phellandrene (peak 6),  $\alpha$ -Terpinene (peak 7), p-Cymene (peak 8),  
4 Limonene (peak 9), 1,8-cineol (peak 10),  $\gamma$ -Terpinene (peak 11), Terpinolene (peak 12)  
5 Terpinen-4-ol (peak 13)  $\alpha$ -Terpineol (peak 14)  $\beta$ -gurjunene (peak 15) Viridiflorene (peak 16)  
6 Cis-calamenene (peak 17). Peak numbers are consistent with Table 1

7

8 **Table 1** Percentage chemical composition of *Melaleuca alternifolia* essential oil measured by  
9 HRGC

10

11 TTO effect on MCF-7, HFF-1 and PBMCs viability was initially determined by  
12 MTT assay after 24h of treatment (Fig. 2). Figure 2a shows a significant decrease in MCF-7  
13 cell viability for TTO at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  compared to the negative control (C). At this  
14 concentration, the cytotoxic effect was more intense than observed in cells treated with  
15 bleomycin (B). In order to test TTO cytotoxicity on HFF-1 and PBMCs, a 24h treatment with  
16 these cells was also performed. Based on the results from MCF-7 cells and due to high  
17 toxicity of TTO at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , TTO concentration of 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was included to evaluate  
18 possible intermediate concentration-response effects. The highest concentration of TTO also  
19 decreased cell viability of HFF-1 and PBMCs (Fig. 2b and 2c, respectively), while TTO 600  
20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  showed cytotoxic effects only for PBMCs. DMSO 0.25% (D) did not alter  
21 significantly cell viability for all tested cell lines.

22

23 **Fig. 2** TTO treatment effect on the viability and proliferation of MCF-7 (A and D), HFF-1 (B  
24 and E) and PBMCs (C) evaluated by MTT Assay. C Negative control, B Bleomycin (10

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), *D* DMSO (0.25%). Results were compared as percentage of the negative control.  
2  $N=3$ , \*\*\* ( $p<0.0001$ ), \*\* ( $p<0.01$ ) and \* ( $p<0.05$ )

3  
4 Considering the effects of TTO at high concentrations and to further assess the  
5 mechanisms underlying its cytotoxicity on MCF-7 cells, the apoptosis and cellular death  
6 induction was determined by Annexin V apoptosis marker and PI dye (figure 3). Initially, the  
7 percentage amount of viable, dead, early and late apoptotic MCF-7 cells after 24h of exposure  
8 was evaluated by flow cytometry (Fig. 3a). As figure 3b shows, the treatment with TTO at  
9 concentrations 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was capable to increase the early stages of  
10 apoptosis in MCF-7 cells (FITC Annexin V+/PI−cells). The same result was observed for  
11 bleomycin, while TTO at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  decreased the number of cells in the early stages of  
12 apoptosis. The increase in apoptosis events of TTO at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was approximately 6x  
13 higher compared to untreated cells. Bleomycin and TTO at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  decreased the number  
14 of dead cells after 24h while TTO 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was able to increase the number of dead cells  
15 (FITC Annexin V−/PI+ cells) approximately by 5x compared to the control group.

16

17 **Fig. 3** Flow cytometry analysis of MCF-7 cells treated with TTO concentrations (A and B).  
18 Apoptosis and cell death was assessed using FITC Annexin V apoptosis marker and PI dye.  
19 Viable cells were considered FITC Annexin V−/PI−; early apoptotic cells were considered  
20 FITC Annexin V+/PI−; late apoptotic/dead cells were identified as FITC Annexin V+/PI+. C  
21 and D Gene expression profile of TTO treatment in genes of the apoptotic pathway: p53 (C),  
22 Bax and Bcl-2 (presented as Bax/Bcl-2 ratio, D) of MCF-7 cells. Gene expression was  
23 normalized by  $\beta$ -actin and performed using qRT-PCR. C Negative control, B Bleomycin (10  
24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).  $N=3$ , \*\*\* ( $p<0.0001$ ), \*\* ( $p<0.01$ ) and \* ( $p<0.05$ )

25

1           To confirm flow cytometry results, gene expression profile of genes involved in the  
2 apoptotic pathway was analyzed. TTO at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was chosen based on the flow cytometry  
3 results for MCF-7 cells and because this concentration did not alter cell viability for normal  
4 cells. Bleomycin (B) was kept as the chemotherapeutic control. p53 and Bax/Bcl-2 gene  
5 expression was investigated as demonstrated in figure 3. There was a significant decrease in  
6 the expression of the p53 gene in cells treated with bleomycin compared to the control group  
7 (C) (Fig. 3c). Also, we found a significant increase in the expression of the Bax/Bcl-2 genes,  
8 analyzed here as Bax/Bcl-2 ratio for TTO at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 3d).

9           Additionally, cell proliferation analysis were performed to investigate the effect of  
10 TTO treatment on MCF-7 cells. First, a concentration-effect curve was determined by MTT  
11 assay for MCF-7 and HFF-1 cells to evaluate cell proliferation 72h after treatment. The  
12 concentrations of the curve were chosen based on the MTT assay in 24h. Figure 2d shows a  
13 significant decrease in MCF-7 cell proliferation at different TTO concentrations, especially  
14 between 30-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The antiproliferative effect of TTO treatment on MCF-7 cells was  
15 equal or even higher when compared to bleomycin. TTO at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  showed the highest  
16 decrease in cell proliferation, similarly to the observed after 24h of exposition. To test cell  
17 proliferation of HFF-1 cells 72h after TTO treatment, the same concentrations of TTO were  
18 maintained as for MTT assay in 24h. As expected, a significant decrease in cell proliferation  
19 for TTO at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was observed (Fig. 2e). However, TTO at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was capable to  
20 induce cell proliferation of HFF-1 cells 72h after treatment.

21           In addition, to assess if TTO treatment could be interfering with cell cycle  
22 progression, the effect of TTO on MCF-7 cells was also evaluated by cell cycle analysis 72h  
23 after treatment (Fig. 4a). Bleomycin was able to decrease the number of cells in the S phase of  
24 the cell cycle while treatment with TTO at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  significantly increased the number of  
25 cells at this stage of division (Fig 4b).

1 **Fig. 4** Cell cycle profile of MCF-7 cells treated with TTO concentrations was assessed after  
2 72h with flow cytometry (A and B). The graphic shows the DNA content in each phase of cell  
3 cycle (B). Colony formation assay was performed with MCF-7 cells exposed to different TTO  
4 concentrations (C and D). E Cell proliferation curve of MCF-7 cells was performed during 7  
5 days of treatment with different TTO concentrations. The results were compared to the  
6 negative control. C negative control, B Bleomycin (10 µg/mL). N=3, \*\*\*\* (p<0.0001), \*  
7 (p<0.05)

8

9 To further analyze the antitumor effect of TTO, Clonogenic Assay was performed to  
10 evaluate the colony formation ability of MCF-7 cells after 10 days of treatment (Fig. 4c). As  
11 figure 4d shows, TTO 300 µg/mL and 600 µg/mL significantly decreased the number of cell  
12 colonies when compared to negative control. Bleomycin showed a significantly higher size  
13 effect, decreasing the number of colonies to approximately 6% when compared to the  
14 untreated cells. The cell growth curve exhibited an antiproliferative capacity of the TTO (Fig.  
15 4e). A significant decrease in cellular proliferation of MCF-7 cells for all TTO tested  
16 concentrations and bleomycin was observed after 7 days of treatment.

17

## 18 Discussion

19 The present *in vitro* study described some of the mechanisms underlying the  
20 antitumor activity of the *M. alternifolia* essential oil on MCF-7 breast cancer cells (Fig. 6).  
21 TTO had an important cytotoxic activity, especially at the highest concentrations, decreasing  
22 cell viability and proliferation. Especially at 300 µg/mL, TTO was capable to significantly  
23 increase the number of cells in the early stages of apoptosis as well as arresting cells in the S  
24 phase of the cell cycle.

25

1 **Fig. 6** Overview of *Melaleuca alternifolia* essential oil mechanisms of action. 1) TTO has  
2 several constituents, such as  $\alpha$ -Terpinene,  $\gamma$ -Terpinene and Terpinen-4-ol, possibly involved  
3 in the observed responses; 2) TTO presents antitumor activity *in vitro* on breast cancer cells  
4 by mechanisms related to: 3) expression of genes involved with programmed cell death, such  
5 as Bax/Bcl-2, 4) cell cycle arrestment and 5) antiproliferative activity by inhibiting colony  
6 formation and decreasing cell viability; 6) TTO has no cytotoxic effect on fibroblasts and  
7 PBMCs at low concentrations, increasing cell proliferation of fibroblasts.

8

9 *M. alternifolia* essential oil chemical matrix characterization showed the presence of  
10 several constituents with known biological effects, mainly  $\alpha$ -Terpinene,  $\gamma$ -Terpinene and  
11 Terpinen-4-ol. In fact, terpenes or terpenoids compose the major group of natural bioactive  
12 compounds. Some of them, for example, retinoic acid (vitamin A),  $\beta$ -carotene, lutein and  
13 lycopene are well known for their antioxidant and anti-inflammatory properties [19]. It was  
14 previously described that terpinen-4-ol inhibits the growth rate of human melanoma cells [9].  
15 Also, Nielsen [10] postulated that TTO and some of its major compounds ( $\alpha$ -terpineol e  
16 Terpinen-4-ol) reduced the proliferation of MCF-7 cells, indicating some previous antitumor  
17 properties of this oil. The results presented through this study go in consonance with these  
18 previous investigations indicating that TTO antitumor activity probably is due to regulation of  
19 cell cycle, apoptosis and gene expression.

20 Further, bleomycin (10  $\mu$ g/mL) was used in this study as a positive control.  
21 Bleomycin is a glycopeptide antibiotic isolated from *Streptomyces verticillilis* [20] and a well-  
22 known chemotherapeutic agent used for the treatment of several tumors, such as testicular  
23 carcinomas, lymphomas, head and neck cancers, among others [21]. The antitumor effects of  
24 bleomycin are related to its capacity of binding to iron and oxygen to produce reactive oxygen  
25 species (ROS) that can induce single- and double-strand DNA breaks [13]. Some of the main



1 common cellular responses to bleomycin treatment are apoptosis, mitotic cell death and cell  
2 cycle arresting [22].

3 As expected, bleomycin was capable of significantly reduce cell viability and  
4 proliferation of MCF-7 cells and increasing apoptosis after 24h following treatment. Although  
5 no significant difference was observed in the number of cells in G2/M phase when compared  
6 to the control, the results showed a significant decrease in the number of MCF-7 cells in the S  
7 phase assessed by cell cycle analyses, indicating some extensive DNA damage for those cells  
8 after bleomycin treatment. Also, TTO treatment at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was capable to arrest cells at S  
9 phase. In fact, in two murine cancer cell lines, mesothelioma (AE17) and melanoma (B16),  
10 TTO and its main constituent, terpinen-4-ol, were able to arrest cells in the G1 phase, showing  
11 a significant antiproliferative activity against those cells [7]. These aspects suggest that TTO  
12 could be interfering with the synthesis of proteins involved with mitosis.

13 A significant increase in the amount of cells in the early stages of apoptosis or  
14 already dead was observed following TTO treatment. Low concentrations, as 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  
15 were able to increase apoptosis events, while high concentrations induced necrosis. This result  
16 corroborates with a previous *in vitro* and *in vivo* study performed by Wu et al. [23] showing  
17 that terpinen-4-ol is capable of inducing apoptosis in human non-small cell lung cancer.  
18 Moreover, a recent study postulated that terpinen-4-ol significantly inhibits the growth of  
19 pancreatic, colorectal, gastric and prostate cancer cells. The study suggested that apoptosis  
20 could be the cell death mechanism responsible for the cytotoxic effect induced by Terpinen-4-  
21 ol. In addition, Terpinen-4-ol administration was combined with several chemotherapeutic  
22 drugs (Oxaliplatin, Fluorouracil, Gemcitabine, Tarceva) and biological agents (Cetuximab)  
23 and the combination effect of those was significantly enhanced [24].

24 The results from the apoptosis assay corroborate with our findings from the Bax/Bcl-  
25 2 gene expression ratio, indicating that cells treated with TTO at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  increased the

1 pro-apoptotic expression of genes, although no difference was observed in the expression of  
2 the p53 gene. Tumors, in general, have dysregulated expression of the p53, Bax and Bcl-2  
3 genes. When the Bax protein is overexpressed it accelerates cell death by apoptosis. On the  
4 other hand, when Bcl-2 protein is overexpressed, it slows down programmed cell death [25].  
5 It is also known that p53 protein can induce the expression of the Bax protein and suppress  
6 the expression of the Bcl-2 protein, leading cells in this condition to apoptosis-induced cell  
7 death [26].

8 Clonogenic assay and cell growth curve exhibited an antiproliferative capacity of  
9 TTO on MCF-7 cells after 10 and 7 days, respectively. This capacity could be related to  
10 terpenes present in the essential oil chemical matrix. In a study performed by Levy et al. [27]  
11 the antiproliferative properties of lycopene, a terpene found in abundance in tomato, were  
12 compared with those of  $\alpha$ - and  $\beta$ - carotene. The results showed a strong inhibition of  
13 mammary (MCF- 7), lung (NCI- H226) and endometrial (Ishikawa), human cancer cells  
14 detected after 24 h of treatment. The inhibitory effect of  $\alpha$ - and  $\beta$ - carotene were far less  
15 effective when compared to lycopene. Also, Russin et al. [28] already postulated the  
16 chemopreventive effects of limonene and five other monoterpenes in a rat-induced mammary  
17 carcinogenesis model, showing a protective effect of terpenes in mammary tumors.  
18 Complementary, the cell growth curve exhibited a decrease in cellular proliferation of MCF-7  
19 cells for all TTO tested concentrations and bleomycin after 7 days of treatment.

20 The results from the MTT cell viability assay showed that DMSO concentration of  
21 0.25% exhibited no significant cytotoxic effects on MCF-7 cells following a 24h exposure  
22 according to the previously described by Adefolaju et al. [29]. Moreover, further analysis of  
23 TTO effect on the viability and proliferation of two healthy human cells lines, fibroblasts  
24 (HFF-1) and PBMCs were performed.

1 TTO at high concentrations revealed to be toxic for both cell lines, decreasing cell  
2 viability (HFF-1 and PBMCs) and proliferation (HFF-1) assessed by MTT assay. Literature  
3 data previously demonstrated some toxic activity of TTO exposition (10-1000 µg/mL) on  
4 human fibroblasts, following 1, 4, 24 and 48h of exposure [30]. Our results corroborate with  
5 those findings, showing the cytotoxicity of high TTO concentrations. However, we also  
6 evaluated the effects after 72h following TTO exposure on HFF-1 cells proliferation and  
7 observed a significant increase in the proliferation of those cells, indicating some cellular  
8 protection. Considering that fibroblasts are cells mainly found in the skin, these findings can  
9 be explained perhaps by the many dermatological properties of TTO. TTO exhibits strong  
10 antimicrobial, antifungal and anti-inflammatory properties and several studies have suggested  
11 the use of TTO for the treatment of seborrheic dermatitis, acne vulgaris, besides other  
12 diseases affecting the skin [31]. Koh et al. [5] also postulated that TTO can reduce histamine-  
13 induced skin inflammation in a small group of human subjects. Moreover, essential oils, as  
14 TTO, could also have the potential to play a significant role in wound healing processes  
15 although there are a few papers exploring this issue [32]. Regarding TTO toxicity on PBMCs,  
16 we found no significant difference for the lowest concentrations after 24h of exposure.  
17 Indeed, in a previous study TTO showed to have antioxidant and anti-inflammatory properties  
18 on PBMCs at low concentrations. The results demonstrated that TTO acts as an anti-  
19 inflammatory mediator due to its antioxidant activity. In fact, TTO was able to increase the  
20 secretion of the anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) with no changes in cell  
21 proliferation [33].

22 In this *in vitro* study, we described some possible mechanisms related to the  
23 antitumor activity of the *M. alternifolia* essential oil on MCF-7 breast cancer cells. We  
24 showed mainly that those mechanisms involve cytotoxic and antiproliferative properties of  
25 TTO as well as induction of apoptosis, cell cycle arrestment and gene regulation of MCF-7

1 cells. Also, we have demonstrated that some TTO concentrations are not only effective  
2 against tumor cells but also save, as they did not negatively modify cellular proliferation of  
3 normal cells, especially fibroblasts. In this sense, all the obtained results are suggestive that  
4 TTO could be a potential alternative for additional topical drug research development,  
5 especially to treat topically LABC. Due to *in vitro* methodological limitations,  
6 complementary studies, are still needed to address other mechanisms involved in those  
7 pathways. Moreover, our findings could help to the development of new alternative therapies  
8 for breast cancer treatment, especially at the LABC stage, to treat lesions and wounds related  
9 to tumor progression and improve patient's survival rates.

10

#### 11 **Compliance with Ethical Standards**

#### 12 **Conflict of interest**

13 The authors declare that they have no conflict of interest.

#### 14 **Ethical approval**

15 All procedures performed in this study involving human participants were in  
16 accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee  
17 and with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical  
18 standards.

#### 19 **Informed consent**

20 Informed consent was obtained from all individual participants in the study.

## 1   **References**

2

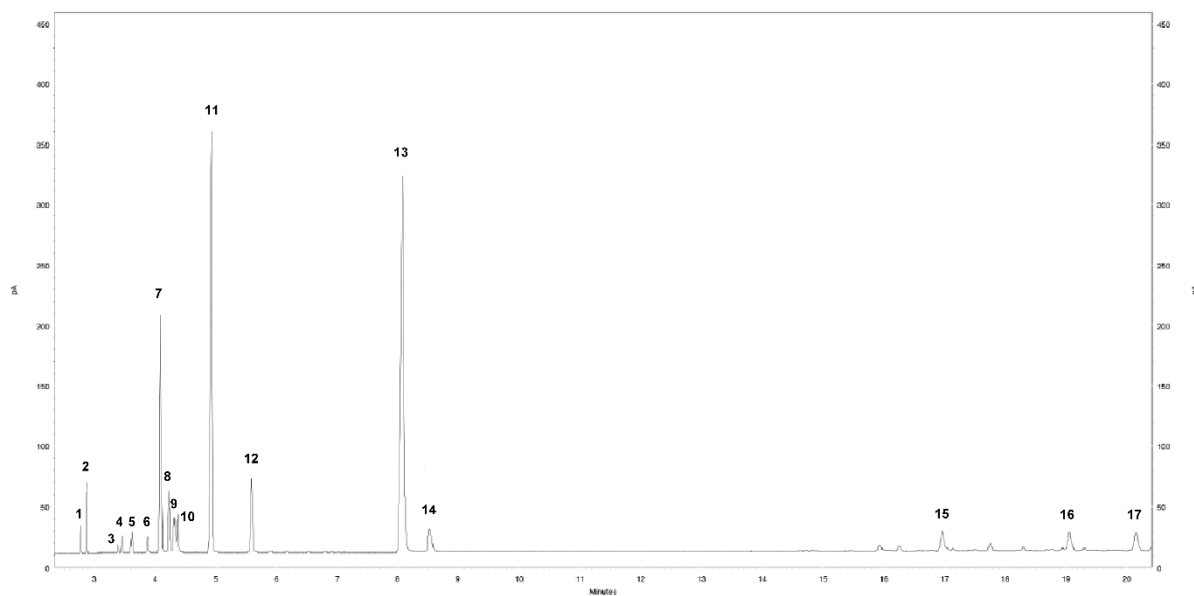
- 3   [1] Carson CF, Hammer KA, Riley TV (2006) *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a  
4   Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev 19:50-62
- 5   [2] Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB (2006) A review of the toxicity of  
6   *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Food Chem Toxicol 44:616-25
- 7   [3] Halcón L, Milkus K (2004) *Staphylococcus aureus* and wounds: A review of tea tree oil as  
8   a promising antimicrobial. Am J Infect Control 32:402-8
- 9   [4] Kim HJ, Chen F, Wu C, Wang X, Chung HY, Jin Z (2004) Evaluation of Antioxidant  
10   Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. J Agric  
11   Food Chem 52:2849-54
- 12   [5] Koh KJ, Pearce AL, Marshman G, Finlay-Jones JJ, Hart PH (2002) Tea tree oil reduces  
13   histamine-induced skin inflammation. Br J Dermatol 147:1212-7
- 14   [6] Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Heenan PJ, Carson CF, Riley TV, Beilharz MW (2010)  
15   Inhibition of established subcutaneous murine tumour growth with topical *Melaleuca*  
16   *alternifolia* (tea tree) oil. Cancer Chemother Pharmacol 66:1095-102
- 17   [7] Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Levy A, Beilharz MW, Riley TV, Carson CF (2010)  
18   Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca*  
19   *alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. Cancer Chemother Pharmacol 65:877-88
- 20   [8] Ireland DJ, Greay SJ, Hooper CM, Kissick HT, Filion P, Riley TV, Beilharz MW (2012)  
21   Topically applied *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil causes direct anti-cancer cytotoxicity in  
22   subcutaneous tumour bearing mice. J Dermatol Sci 67:120-9
- 23   [9] Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G,  
24   Mondello F, Arancia G, Molinari A (2004) Terpinen-4-ol, The Main Component of  
25   *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the *In Vitro* Growth of Human Melanoma  
26   Cells. J Invest Dermatol 122:349-60
- 27   [10] Nielsen JB (2008) What you see may not always be what you get - bioavailability and  
28   extrapolation from *in vitro* tests. Toxicol In Vitro 22:1038-42
- 29   [11] Ghislain I, Zikos E, Coens C, Quinten C, Balta V, Tryfonidis K, Piccart M, Zardavas D,  
30   Nagele E, Bjelic-Radisic V, Cardoso F, Sprangers MA, Velikova G, Bottomley A; European  
31   Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Quality of Life Group; Breast  
32   Cancer Group; EORTC Headquarters (2016) Health-related quality of life in locally advanced  
33   and metastatic breast cancer: methodological and clinical issues in randomised controlled  
34   trials. Lancet Oncol 17:e294-304
- 35   [12] Balogun OD, Formenti SC (2015) Locally advanced breast cancer - strategies for  
36   developing nations. Front Oncol 5:89

- 1 [13] Chen J, Ghorai MK, Kenney G, Stubbe J (2008) Mechanistic studies on bleomycin-  
2 mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage.  
3 *Nucleic Acids Res* 36:3781-90
- 4 [14] Fukui M, Yamabe N, Zhu BT (2010) Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of  
5 paclitaxel in human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Cancer* 46:1882-91
- 6 [15] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for  
7 apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells  
8 using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51
- 9 [16] William-Falgaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G (2006) Cell cycle arrest and  
10 apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res*  
11 26:2093-9
- 12 [17] Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay  
13 of cells *in vitro*. *Nat Protoc* 1:2315-9
- 14 [18] Cubillos-Rojas M, Amair-Pinedo F, Peiró-Jordán R, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL  
15 (2014) The E3 Ubiquitin Protein Ligase HERC2 Modulates the Activity of Tumor Protein  
16 p53 by Regulating Its Oligomerization. *J Biol Chem* 289:14782-95
- 17 [19] Singh B, Sharma RA (2015) Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis,  
18 regulation and clinical applications. *3 Biotech* 5:129–51
- 19 [20] Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y (1966) New antibiotics, bleomycin A and  
20 B. *J Antibiot (Tokyo)* 19: 200–9
- 21 [21] Chen J, Stubbe J (2005) Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5:102-  
22 12
- 23 [22] Cloos J, Temmink O, Ceelen M, Snel MH, Leemans CR, Braakhuis BJ (2002)  
24 Involvement of cell cycle control in bleomycin-induced mutagen sensitivity. *Environ Mol*  
25 *Mutagen* 40:79-84
- 26 [23] Wu CS, Chen YJ, Chen JJ, Shieh JJ, Huang CH, Lin PS, Chang GC, Chang JT, Lin CC  
27 (2012) Terpinen-4-ol Induces Apoptosis in Human Nonsmall Cell Lung Cancer *In Vitro* and  
28 *In Vivo*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:818261
- 29 [24] Shapira S, Pleban S, Kazanov D, Tirosh P, Arber N (2016) Terpinen-4-ol: A Novel and  
30 Promising Therapeutic Agent for Human Gastrointestinal Cancers. *PLoS One* 11:e0156540
- 31 [25] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a  
32 conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-19
- 33 [26] Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman  
34 B, Reed JC (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in*  
35 *vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 9:1799-805
- 36 [27] Levy J, Bosin E, Feldman B, Giat Y, Miinster A, Danilenko M, Sharoni Y (1995)  
37 Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-  
38 carotene or beta- carotene. *Nutr Cancer* 24:257-66

- 1 [28] Russin WA, Hoesly JD, Elson CE, Tanner MA, Gould MN (1989) Inhibition of rat  
2 mammary carcinogenesis by monoterpenoids. *Carcinogenesis* 10:2161-4
- 3 [29] Adefolaju GA, Theron KE, Hosie MJ (2015) BAX/BCL-2 mRNA and protein expression  
4 in human breast MCF-7 cells exposed to drug vehicles-methanol and dimethyl sulfoxide  
5 (DMSO) for 24 hrs. *Niger Med J* 56: 169–74
- 6 [30] Söderberg TA, Johansson A, Gref R (1996) Toxic effects of some conifer resin acids and  
7 tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology* 107:99-109
- 8 [31] Pazyar N, Yaghoobi R, Bagherani N, Kazerouni A (2013) A review of applications of tea  
9 tree oil in dermatology. *Int J Dermatol* 52:784-90
- 10 [32] Woollard AC, Tatham KC, Barker S (2007) The influence of essential oils on the process  
11 of wound healing: a review of the current evidence. *J Wound Care* 16:255-7
- 12 [33] Caldefie-Chézet F, Fusillier C, Jarde T, Laroye H, Damez M, Vasson MP, Guillot J  
13 (2006) Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human  
14 peripheral blood leukocytes. *Phytother Res* 20:364-70

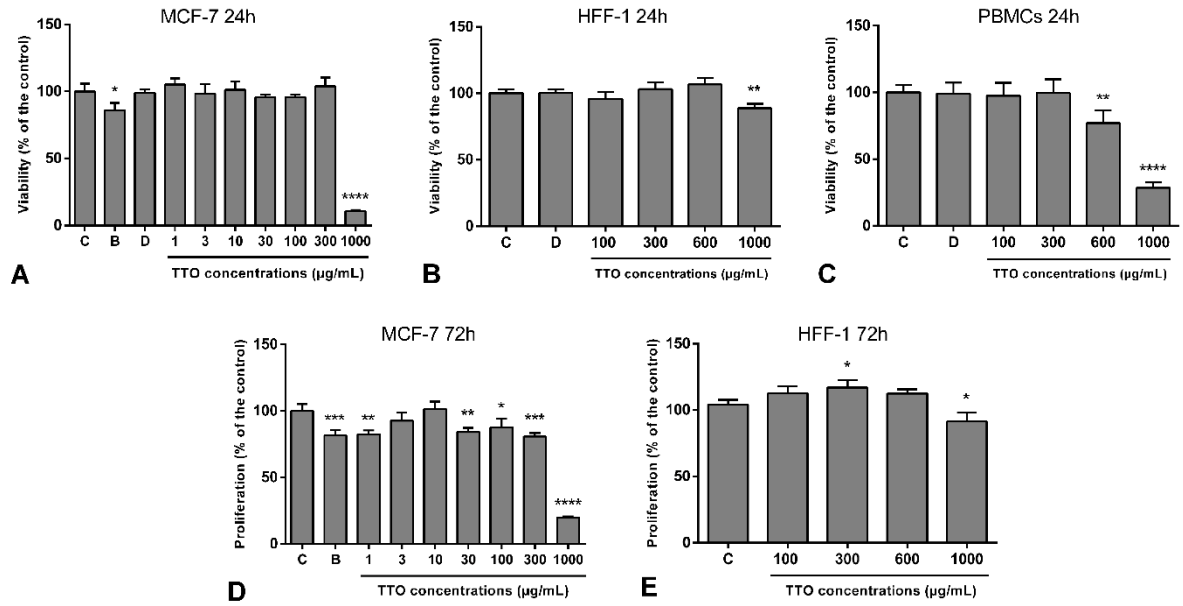
**Table 1**

Peak	Compound	Percentage (%)
1	$\alpha$ -Thujene	0.8
2	$\alpha$ -Pinene	2.2
3	Sabinene	0.4
4	$\beta$ -Pinene	0.7
5	Myrcene	1.0
6	$\alpha$ -Phellandrene	0.9
7	$\alpha$ -Terpinene	10.1
8	p-Cymene	2.8
9	Limonene	2.1
10	1,8-cineol	2.0
11	$\gamma$ -Terpinene	20.3
12	Terpinolene	4.2
13	Terpinen-4-ol	34.6
14	$\alpha$ -Terpineol	2.7
15	$\beta$ -gurjunene	2.2
16	Viridiflorene	2.2
17	Cis-calamenene	2.2

**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

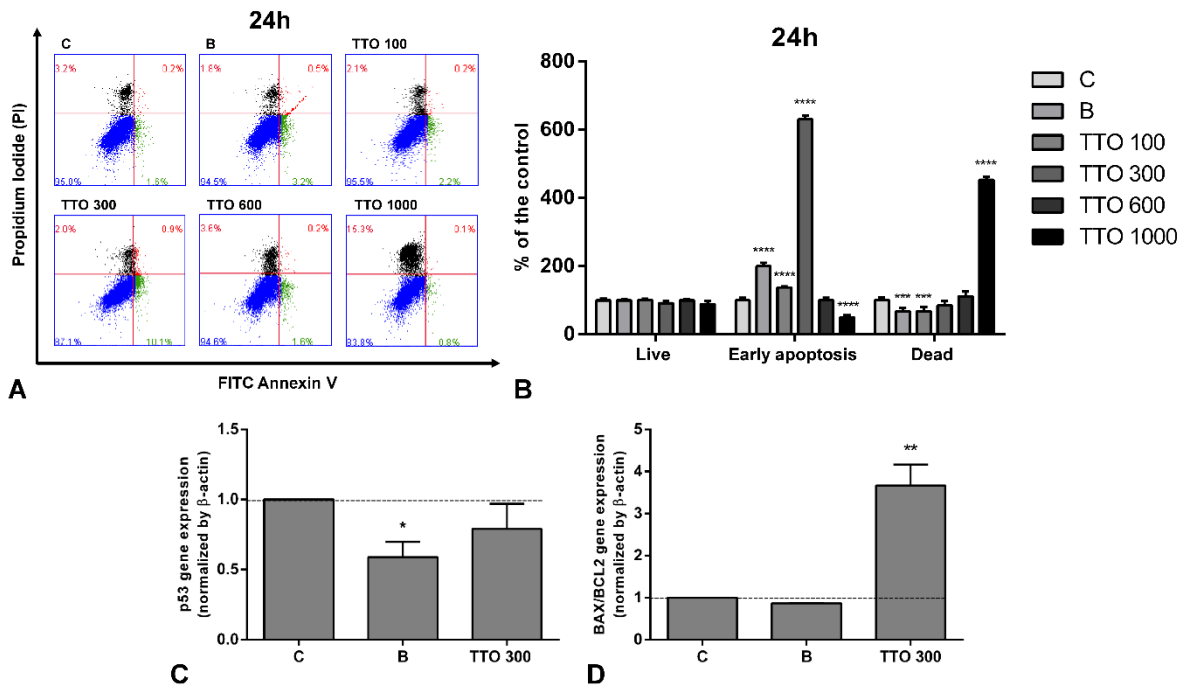


Fig. 4

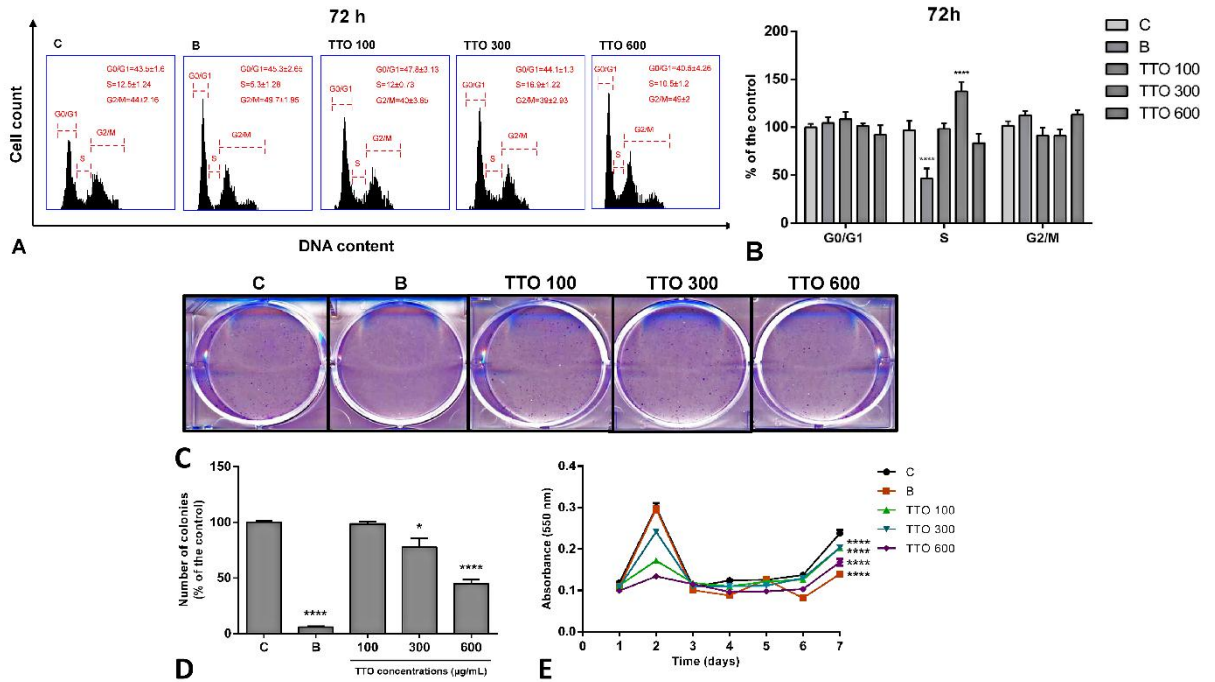
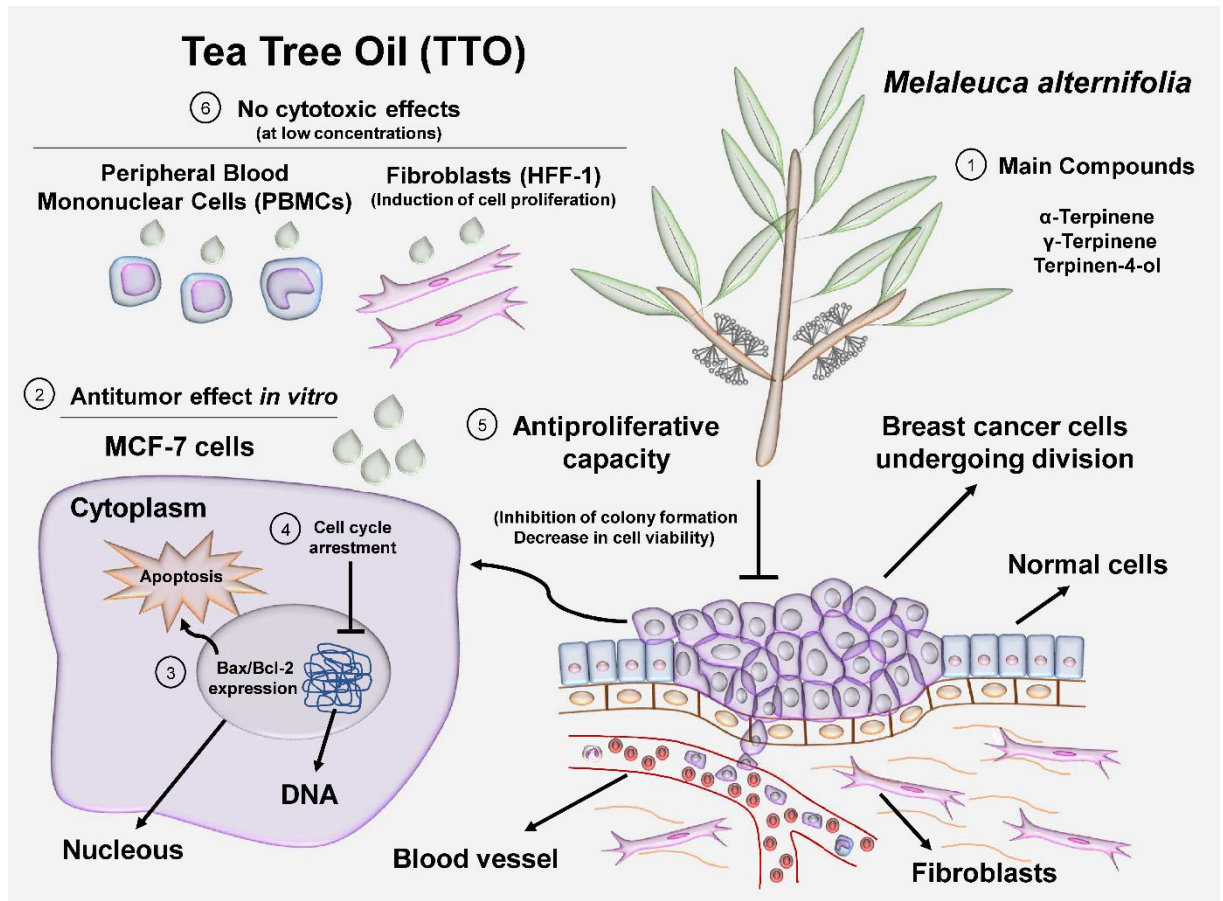


Fig. 5



## 4 DISCUSSÃO

A presente dissertação apresentou resultados organizados em dois manuscritos científicos. O primeiro deles refere-se a uma revisão bibliográfica sobre o tema CMLA, percorrendo sobre alguns fatores relacionados com a doença, como epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. Já o segundo manuscrito apresentou resultados obtidos a partir de ensaios experimentais *in vitro* para a avaliação do caráter antitumoral do óleo essencial de *M. alternifolia* em células de câncer de mama, bem com a avaliação da sua citotoxicidade em linhagens de células saudáveis.

No artigo de revisão literária, apresentou-se um panorama geral sobre o CMLA, doença que se coloca, atualmente, como um grande desafio para a ciência. O CMLA é classificado como estágio III no processo de progressão tumoral do câncer de mama, que inclui os estágios de 0 a IV (POLYAK, 2007; NCI, 2016). O CMLA é uma doença complexa, especialmente porque o seu tratamento representa um grande desafio após o seu diagnóstico, posto que a neoplasia mamária pode evoluir rapidamente para o estágio metastático, explicando as altas taxas de mortalidade encontradas (BALOGUN et al., 2015).

O CMLA é correlacionado com diversas alterações no tecido mamário, especialmente no tecido muscular e adiposo e com envolvimento de nódulos linfáticos, devido à progressão tumoral (IARC, 2016). O desenvolvimento do CMLA geralmente está associado com edema de pele, aumento de linfonodos adjacentes e fixação do tumor na parede torácica causando diversas injúrias a esses tecidos. Além disso, feridas e lesões expostas podem acometer os pacientes em estágios mais avançados da doença (POLYAK, 2007; NEWMAN et al., 2009; BALOGUN et al., 2015; NCI, 2016). A forma mais agressiva do CMLA, CMI, pode causar vermelhidão e edema devido ao bloqueio por células malignas de vasos linfáticos, podendo ocorrer extravasamento de fluidos linfáticos (MERAJVER et al., 2004; CHIA et al., 2008).

Dessa maneira, a sobrevivência de pacientes com CMLA é baixa, ainda que diversas estratégias terapêuticas sejam utilizadas, como quimioterapia e radioterapia, o que leva os pacientes a apresentarem altas taxas de recidivas e grande probabilidade de vir à óbito (TRYFONIDIS et al., 2015). O conceito de terapia personalizada, considerando-se as características de cada indivíduo, como

expressão de receptores de hormônios, extensão e invasão de linfonodos e tecidos adjacentes e tamanho do tumor, mostra-se ideal para a realização do tratamento (RUSTOGI et al., 2005; AL-KHANBASHI et al., 2016).

Com o intuito de solucionar os diversos obstáculos colocados pelo CMLA, diversos estudos estão sendo realizados para encontrar terapias alternativas e, dessa maneira, melhorar o tratamento dos pacientes acometidos, prolongar a sua sobrevida e qualidade de vida e diminuir as taxas de recidivas e óbitos.

Entretanto, nos quadros clínicos mais avançados, quando há o surgimento de feridas, lesões e metástases associadas à progressão tumoral pouco ainda pode ser feito e, muitas vezes, o tratamento é somente paliativo já que as chances de cura são baixas nos casos mais graves. Pesquisas nesse campo ainda são muito insipientes e é de essencial importância que sejam realizadas novas investigações a fim de encontrar terapias alternativas para barrar o avanço do câncer de mama e propiciar um cuidado adicional para pacientes em estágios, muitas vezes, terminais.

Devido ao fato de já haver indícios na literatura a respeito da atividade antitumoral do óleo essencial de *M. alternifolia* em células de câncer de mama, segundo o trabalho realizado por Nielsen (2008), no segundo manuscrito dessa dissertação foram avaliados os prováveis mecanismos responsáveis pelo efeito antitumoral do óleo essencial de *M. alternifolia* em células de câncer de mama da linhagem comercial MCF-7.

Através da determinação por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *M. alternifolia*, utilizado nesse estudo, foram encontrados constituintes com importantes capacidades bioativas, destacando-se principalmente o  $\alpha$ -Terpineno,  $\gamma$ -Terpineno e Terpinen-4-ol. Os terpenos ou terpenoides, como o ácido retinoico (vitamina A), luteína,  $\beta$ -caroteno e licopeno, são a classe de biomoléculas com maior representação em plantas e notadamente reconhecidas pelas suas capacidades anti-inflamatórias e antioxidantes (SINGH e SHARMA, 2015). Nielsen (2008) demonstrou anteriormente a capacidade antiproliferativa que dois dos principais componentes do óleo essencial ( $\alpha$ -terpineol e Terpinen-4-ol) possuem em células MCF-7. Além disso, o estudo de Calcabrini et al. (2004) já apontava a inibição do crescimento de células de melanoma humano quando tratadas com o principal constituinte do óleo, o terpinen-4-ol. Estudos complementares também demonstraram a ação antineoplásica em tumores cutâneos (GREAY et al., 2010a;

IRELAND et al., 2012). Ainda, diversas propriedades biológicas foram relacionadas ao óleo essencial durante os últimos anos. Vários estudos demonstraram as atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, como importantes propriedades do óleo essencial (KOH et al., 2002; HALCÓN; MILKUS, 2004; KIM et al., 2004). Dois outros estudos demonstraram que o óleo, quando aplicado topicamente, pode diminuir a inflamação cutânea e melhorar o processo de cicatrização da pele (KOH et al., 2002; HALCÓN; MILKUS, 2004). Dessa forma, os resultados mostram que o óleo essencial apresenta diversas substâncias biofuncionais, sugerindo que ele possa apresentar um potencial efeito antitumoral no câncer de mama.

A exposição das células MCF-7 a diferentes concentrações do óleo essencial (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL) diminuiu a viabilidade e a proliferação celular em 24h e 72h, respectivamente, após o tratamento, especialmente nas concentrações mais altas. Em ambos os tempos de exposição a concentração de 1000 µg/mL foi extremamente tóxica, diminuindo os parâmetros avaliados, embora outras concentrações também tenham se mostrado citotóxicas. A bleomicina (10 µg/mL) foi utilizada neste estudo como controle positivo de agente quimioterápico. Os seus efeitos antitumorais estão relacionados com a sua capacidade de ligar-se ao ferro e ao oxigênio produzindo EROs que levam a formação de quebras no DNA, sejam de fita simples ou dupla (CHEN et al., 2008). Já as respostas celulares mais comumente encontradas no tratamento com este agente quimioterápico são indução de apoptose e morte celular (CLOOS et al., 2002). O tratamento com bleomicina foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade e proliferação celular de células MCF-7 após os tempos analisados.

Análises complementares para a avaliação da viabilidade e proliferação celular utilizando linhagens de células saudáveis, fibroblastos (HFF-1) e CMSPs, foram realizadas utilizando o ensaio do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Mais uma vez, o óleo mostrou-se tóxico em altas concentrações para ambas as linhagens. Os resultados encontrados para a linhagem de fibroblastos estão em consonância com o trabalho de Söderberg et al. (1996) que demonstrou a citotoxicidade do óleo essencial em fibroblastos após 1, 4, 24 and 48h de exposição. Todavia, após 72h, período não avaliado no estudo anteriormente citado, a exposição ao óleo essencial mostrou um aumento da

proliferação celular em fibroblastos na concentração de 300 µg/mL, indicando algum mecanismo de proteção celular. Em virtude de os fibroblastos serem encontrados em grande quantidade em tecidos cutâneos, os resultados obtidos podem ser explicados devido à propriedades dermatológicas do óleo essencial, como a melhora da cicatrização da pele, já que o óleo é usado no tratamento de acne, dermatite seborreica e feridas relacionadas ao herpes vírus (PAZYAR et al., 2012). De fato, a investigação anterior de Koh et al. (2002) já postulou que o óleo seria capaz de diminuir a inflamação cutânea em um grupo de estudo utilizando seres humanos e auxiliar em processos de cicatrização, embora poucos estudos explorem esta questão (WOOLLARD et al., 2007).

Com relação a toxicidade em CMSPs, não foi encontrada diferença significativa em baixas concentrações após 24h de exposição. De fato, em um estudo prévio realizado com essas células, o óleo essencial mostrou ter atividade antioxidante e anti-inflamatória em baixas concentrações. Os resultados mostraram que o óleo essencial age como um mediador anti-inflamatório devido à sua capacidade antioxidante. No estudo, o óleo essencial foi capaz de aumentar a secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 and IL-10) sem alterações na proliferação celular (CALDEFIE-CHÉZET et al., 2006). Adicionalmente, os resultados com o ensaio de MTT demonstraram que o dimetilsulfóxido (DMSO), o qual foi utilizado como veículo para diluição do óleo essencial na concentração de 0,25%, não alterou significativamente os parâmetros de viabilidade e proliferação celular avaliados para as três linhagens celulares.

A averiguação dos mecanismos pelos quais o óleo poderia estar exercendo o seu efeito antitumoral foi realizada através de testes adicionais para investigar processos de regulação apoptótica, ciclo celular e expressão gênica, além da averiguação da proliferação celular.

Nesse sentido, a concentração de 300 µg/mL foi capaz de aumentar significativamente o número de células nos estágios iniciais de apoptose, enquanto concentrações altas aumentaram o número de células mortas, possivelmente por necrose. Esses resultados vão ao encontro de estudos como o de Shapira et al. (2016) que sugeriram que o mecanismo responsável pela citotoxicidade do óleo essencial em células de câncer pancreático, prostático, colorretal e gástrico seria a indução de apoptose pelo composto Terpinen-4-ol, encontrado em abundância no óleo. No estudo *in vitro* e *in vivo* de Wu et al. (2012), a molécula de Terpinen-4-ol

também foi associada com indução de apoptose em células de câncer de pulmão não-pequenas.

Complementarmente, a expressão dos genes *Bax* e *Bcl-2*, analisados como a razão de *Bax/Bcl-2* corroboram com os achados da citometria de fluxo, que investigou a capacidade de indução de apoptose, demonstrando que a concentração de 300 µg/mL foi capaz de aumentar significativamente a expressão da razão dos genes *Bax/Bcl-2*. As análises de ciclo celular revelaram que a mesma concentração do óleo essencial foi capaz de induzir a parada do ciclo celular na fase S, quando ocorre a síntese de DNA, indicando que o óleo essencial poderia estar interferindo com proteínas necessárias para o processo mitótico. Um estudo publicado por Greay et al. (2010b), utilizando linhagens de mesotelioma e melanoma, demonstrou a atividade antiproliferativa expressiva do principal constituinte do óleo essencial, o Terpinen-4-ol, através da interrupção do ciclo celular dessas células logo no seu início. A bleomicina foi capaz de diminuir significativamente o número de células na fase S do ciclo celular. Isso pode ser explicado possivelmente pela sua capacidade de gerar quebras simples ou duplas no material genético das células (CHEN et al., 2008).

A capacidade antiproliferativa do óleo essencial foi demonstrada em células MCF-7, adicionalmente, através do ensaio para formação de colônias e curva de crescimento, após 10 e 7 dias, respectivamente. A bleomicina também apresentou significativo potencial antiproliferativo demonstrado no ensaio para formação de colônias. O potencial antiproliferativo do óleo essencial pode estar relacionado aos terpenos presentes na sua matriz química. Um estudo desenvolvido por Levy et al. (1995), comparou as propriedades antiproliferativas do licopeno com as do  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno demonstrando uma forte inibição de células de câncer de mama (MCF-7), pulmão (NCI-H226) e endometriais (Ishikawa) após 24h de tratamento. Ainda, um estudo anterior demonstrou *in vivo* os efeitos antitumorais de diversos terpenos em um modelo induzido de tumor mamário (RUSSIN et al., 1989).

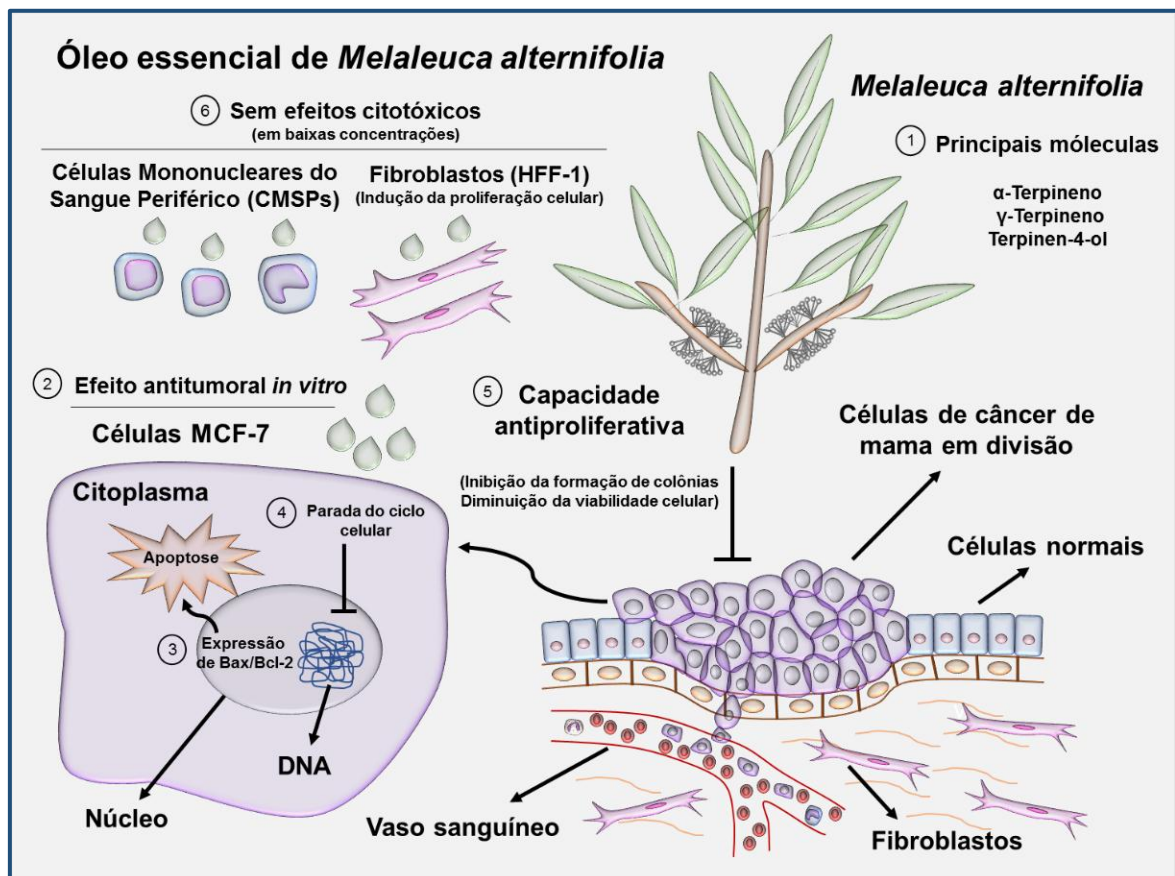
A análise complementar da curva de crescimento celular também demonstrou um efeito antiproliferativo do óleo essencial em células MCF-7. Após 7 dias de tratamento, todas as concentrações do óleo essencial, bem como a bleomicina, exibiram um forte efeito antiproliferativo.

No estudo *in vitro*, apresentado nesta dissertação, foram demonstrados os possíveis mecanismos relacionados com a atividade antitumoral do óleo essencial

de *M. alternifolia* em células MCF-7. Os principais mecanismos responsáveis por este efeito estão relacionados, possivelmente, com as propriedades citotóxicas e antiproliferativas do óleo essencial, bem como indução de apoptose, modulação do ciclo celular e da regulação gênica em células MCF-7. De forma complementar, foi demonstrado que algumas concentrações do óleo essencial não são apenas efetivas em células tumorais, mas também seguras, posto que não modificaram negativamente a proliferação de células normais, especialmente de fibroblastos.

A figura 6 apresenta um esquema geral dos mecanismos sugeridos anteriormente.

Figura 6 - Panorama sobre os mecanismos de ação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. 1) O óleo essencial possui diversas moléculas, como  $\alpha$ -Terpineno,  $\gamma$ -Terpineno e Terpinen-4-ol, provavelmente envolvidas com as respostas observadas; 2) O óleo essencial apresenta atividade antitumoral *in vitro* em células de câncer de mama através de mecanismos possivelmente relacionados com: 3) expressão de genes envolvidos com a morte celular programada, como *Bax/Bcl-2*, 4) parada do ciclo celular, 5) atividade antiproliferativa através da inibição da formação de colônias e diminuição da viabilidade celular; 6) O óleo essencial não apresenta efeito citotóxico em fibroblastos e CMSPs em baixas concentrações, aumentando a proliferação de fibroblastos.





Dessa maneira, os resultados obtidos com esta dissertação sugerem que o óleo essencial poderia ser uma potencial alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos de uso tópico de forma a auxiliar no tratamento do câncer de mama, especialmente da sintomatologia verificada em estágios mais avançados da doença, como no caso do CMLA, quando lesões e feridas associadas à progressão tumoral levam à baixa sobrevida e diminuem a qualidade de vida dos pacientes. De fato, quando a doença progride para estágios avançados e as chances de cura são, muitas vezes, bem reduzidas, tratamentos paliativos baseados em produtos naturais e com comprovada ação antitumoral poderiam estar auxiliando os pacientes na melhora da sua sobrevida. O óleo essencial de *M. alternifolia* poderia ser utilizado para a formulação de drogas que auxiliassem nos cuidados paliativos, especialmente de pacientes com áreas teciduais injuriadas devido ao desenvolvimento do câncer.

Devido às limitações metodológicas de estudos *in vitro*, como esse, pesquisas complementares utilizando outros modelos experimentais, como o *in vivo*, fazem-se necessárias para o melhor entendimento e confirmação dos resultados encontrados.

## 5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão de literatura mostrou um panorama geral sobre o CMLA, incluindo parâmetros epidemiológicos e fisiopatológicos, bem como aspectos relacionados ao diagnóstico e tratamento da doença.

Os resultados experimentais realizados *in vitro* com as três linhagens celulares, descritos no segundo manuscrito, permitem concluir que o óleo essencial de *M. alternifolia*:

1) Na atividade antitumoral em células MCF-7:

- Apresentou grande potencial anticarcinogênico, em diversas concentrações, reduzindo tanto a viabilidade quanto a proliferação celular;
- Induziu a apoptose através da expressão de genes apoptóticos na concentração de 300 µg/mL;
- Demonstrou importante atividade antiproliferativa, reduzindo o crescimento celular e a formação de colônias.

2) No efeito citotóxico em células HFF-1 e CMSPs:

- Apresentou citotoxicidade em altas concentrações;
- Foi capaz de induzir a proliferação celular na concentração de 300 µg/mL em células HFF-1.

Portanto, o conjunto dos resultados sugere que o óleo essencial de *M. alternifolia* possui atividade antitumoral no câncer de mama. Com base nas investigações realizadas, pode-se sugerir que o óleo essencial poderia ser um agente terapêutico para o tratamento de sintomas tópicos relacionados com o CMLA.

## REFERÊNCIAS

- AL-KHANBASHI, M. et al. Tissue and Serum miRNA Profile in Locally Advanced Breast Cancer (LABC) in Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy (NAC) Treatment. **PloS One**, v. 11, p. 1-22, 2016.
- ALLEMANI, C. et al. Breast cancer survival in the US and Europe: a CONCORD high-resolution study. **Int. J. Cancer**, v. 132, p. 1170-81, 2013.
- BALOGUN, O. D.; FORMENTI, S. C. Locally advanced breast cancer - strategies for developing nations. **Front. Oncol.**, v. 5, p. 1-5, 2015.
- BARLOW, W. E. et al. Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 17, p. 1204-14, 2006.
- BRACKSTONE, M. et al. Locoregional therapy of locally advanced breast cancer: a clinical practice guideline. **Curr. Oncol.**, v. 22, p. S54-66, 2015.
- BROPHY, J. J. et al. Gas Chromatographic Quality Control for Oil of *Melaleuca* Terpinen-4-ol Type (Australian Tea Tree). **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, p. 1330-1335, 1989.
- BROPHY, J. J.; CRAVEN, L. A.; DORAN, J. C. **Melaleucas: their botany, essential oils and uses**. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra, 2013, 415 p.
- CALCABRINI, A. et al. Terpinen-4-ol, The Main Component of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the *In Vitro* Growth of Human Melanoma Cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 122, p. 349-360, 2004.
- CALDEFIE-CHÉZET, F. et al. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. **Phytother. Res.**, v. 20, p. 364-70, 2006.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 50-62, 2006.
- CHEN, J. et al. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 3781-90, 2008.
- CHIA, S.; SWAIN, S. M.; BYRD, D.R. Locally advanced and inflammatory breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, p. 786-90, 2008.
- CLOOS, J. et al. Involvement of cell cycle control in bleomycin-induced mutagen sensitivity. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 40, p. 79-84, 2002.

- CUCKLE, H. Breast cancer screening by mammography: an overview. **Clin. Radiol.**, v. 43, p. 77-80, 1991.
- DE ABREU, F. B. et al. Personalized therapy for breast cancer. **Clin. Genet.**, v. 86, p. 62-7, 2014.
- DEMAN, J.; VAN LAREBEKE, N. Carcinogenesis: mutations and mutagens. **Tumour Biol.**, v. 22, p. 191-202, 2001.
- ERBAS, B. et al. The natural history of ductal carcinoma *in situ* of the breast: a review. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 97, p.135-44, 2006.
- FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, p. 759-67, 1990.
- FORD, D.; EASTON, D. F. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 62, p. 676-689, 1998.
- GREAY, S. J. et al. Inhibition of established subcutaneous murine tumor growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 66, p. 1095-1102, 2010a.
- GREAY, S. J. et al. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 65, p. 877-88, 2010b.
- HALCÓN, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: A review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **Am. J. Infect. Control.**, v. 32, p. 402-408, 2004.
- HAMMER, K. A. et al. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 616-625, 2006.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-74, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HANCE, K. W. et al. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 97, p. 966-75, 2005.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - Ministério da Saúde. **Câncer de mama**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 20 de novembro de 2016.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - Ministério da Saúde. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. Acesso em: 20 de novembro de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - Ministério da Saúde. **O que é câncer?**. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 20 de novembro de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - Ministério da Saúde. **O que causa o câncer?**. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 20 de novembro de 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Cancer fact sheets: all cancers excluding non-melanoma skin**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=29&type=0&sex=0>>. Acesso em: 20 de novembro de 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Cancer fact sheets: breast cancer**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=29&type=0&sex=0>>. Acesso em: 20 de novembro de 2016.

IRELAND, D. J. et al. Topically applied *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil causes direct anti-cancer cytotoxicity in subcutaneous tumor bearing mice. **J. Dermatol. Sci.**, v. 67, p. 120-129, 2012.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat. Rev. Genet.**, v. 3, p. 415-28, 2002.

KIM, H. J. et al. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2849-54, 2004.

KOH, K. J. et al. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. **Br. J. Dermatol.**, v. 147, p. 1212-1217, 2002.

LACROIX, M.; TOILLON, R.; LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 13, p. 293-325, 2006.

LANG, J. E. et al. Molecular markers for breast cancer diagnosis, prognosis and targeted therapy. **J. Surg. Oncol.**, v. 111, p. 81-90, 2015.

LEVY, J. et al. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. **Nutr. Cancer**, v. 24, p. 257-66, 1995.

LIU, G.; STORZ P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radic. Res.**, v. 44, p. 1-31, 2010.

LOIBL, S.; GIANNI, L. HER2-positive breast cancer. **Lancet**, p. 1-15, 2016.

MCDONALD, E. S. et al. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. **J. Nucl. Med.**, v. 57, p. 9S-16S, 2016.

MERAJVER, S. D.; SABEL, M. S. Inflammatory breast cancer. In: HARRIS, J. R., editores. **Diseases of the Breast**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2004.

MIYASHITA, T. et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. **Oncogene**, v. 9, p. 1799-805, 1994.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. Anatomia orientada para a clínica. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION (NBCF). **Breast Anatomy**. 2016. Disponível em: <<http://www.nationalbreastcancer.org/breast-anatomy>>. Acesso em: 19 de outubro de 2016.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Breast Cancer Treatment (PDQ®)**. 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq>>. Acesso em: 15 de outubro de 2016.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Drugs Approved for Breast Cancer**. 2016. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/breast>>. Acesso em: 03 de Novembro de 2016.

NEWMAN, L. A. Epidemiology of locally advanced breast cancer. **Semin. Radiat. Oncol.**, v. 19, p. 195-203, 2009.

NIELSEN, J. B. What you see may not always be what you get - Bioavailability and extrapolation from *in vitro* tests. **Toxicol. in Vitro**, v. 22, p. 1038-1042, 2008.

OKAI, A. et al. Re-engineered p53 activates apoptosis *in vivo* and causes primary tumor regression in a dominant negative breast cancer xenograft model. **Gene Ther.**, v. 21, p. 903-912, 2014.

OLTVAL, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 Heterodimerizes *In Vivo* with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programed Cell Death. **Cell**, v. 74, p. 609-619, 1993.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. **Cell Death Dis.**, v. 7, p. 1-12, 2016.

PAZYAR, N. et al. A review of applications of tea tree oil in dermatology. **Int. J. Dermatol.**, v. 52, p. 784-90, 2013.

PEREZ, E. A. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. **J. Clin. Oncol.**, v. 32, p. 3744-52, 2014.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 3155-63, 2007.

PRICE, E. R. et al. How to use magnetic resonance imaging following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. **World J. Clin. Cases**, v. 3, p. 607-613, 2015.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radic. Biol. Med.**, v. 49, p. 1603-16, 2010.

RUSSIN, W. A. et al. Inhibition of rat mammary carcinogenesis by monoterpenoids. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 2161-4, 1989.

RUSTOGI, A. et al. Management of locally advanced breast cancer: Evolution and current practice. **J. Cancer Res. Ther.**, v. 1, p. 21-30, 2005.

SASLOW, D. et al. American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. **CA Cancer J. Clin.**, v. 57, p. 75-89, 2007.

SCHUMACKER, P. T. Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil. **Cancer Cell**, v. 27, p. 156-157, 2015.

SHAPIRA, S. et al. Terpinen-4-ol: A Novel and Promising Therapeutic Agent for Human Gastrointestinal Cancers. **PLoS One**, v. 11, p. 1-13, 2016.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, p. 129-151, 2015.

SLAMON, D. et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, p. 1273-83, 2011.

SMITH, J. W. et al. Epirubicin With Cyclophosphamide Followed by Docetaxel With Trastuzumab and Bevacizumab as Neoadjuvant Therapy for HER2-Positive Locally Advanced Breast Cancer or as Adjuvant Therapy for HER2-Positive Pathologic Stage III Breast Cancer: A Phase II Trial of the NSABP Foundation Research Group, FB-5. **Clin. Breast Cancer**, v. 17, p. 48-54, 2017.

SÖDERBERG, T. A.; JOHANSSON, A.; GREF, R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. **Toxicology**, v. 107, p. 99-109, 1996.

SURENDER et al. Exemestane for Locally Advanced Breast Cancer: A Case Report. **The Internet Journal of Surgery**, v. 15, p. 1-4, 2007.

TRYFONIDIS, K. et al. Management of locally advanced breast cancer-perspectives and future directions. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 12, p. 147-62, 2015.

VEER, L. J. v. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, p. 530-536, 2002.

VERMA, S. et al. Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 367, p. 1783-91, 2012.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VEER, L. J. v. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 5, p. 591-602, 2005.

WESTON, A.; HARRIS, C. C. Multistage Carcinogenesis. In: KUFFE D. W. et al., editores. **Holland-Frei Cancer Medicine, Multistage Carcinogenesis**. 6 ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem. J.**, v. 313, p. 17-29, 1996.

WOOLLARD, A.C.; TATHAM, K. C.; BARKER, S. The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence. **J. Wound Care**, v. 16, p. 255-7, 2007.

WU, C. S. et al. Terpinen-4-ol Induces Apoptosis in Human Nonsmall Cell Lung Cancer *In Vitro* and *In Vivo*. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

ZHOU, Y. et al. The green tea polyphenol EGCG potentiates the antiproliferative activity of sunitinib in human cancer cells. **Tumour Biol.**, v. 37, p. 8555-66, 2016.