



POTENCIAL EFEITO EPIGENÉTICO DO EXTRATO DE
PRÓPOLIS BRASILEIRA E DE SEUS COMPONENTES
SOBRE LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE
CARCINOMAS MAMÁRIOS

JOÃO HENRIQUE MAIA ASSUMPÇÃO

BOTUCATU – SP

Setembro/ 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - GENÉTICA

POTENCIAL EFEITO EPIGENÉTICO DO EXTRATO DE
PRÓPOLIS BRASILEIRA E DE SEUS COMPONENTES
SOBRE LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE
CARCINOMAS MAMÁRIOS

JOÃO HENRIQUE MAIA ASSUMPÇÃO

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Cláudia Aparecida Rainho

CO-ORIENTADORES: Dr^a. Agnes Alessandra Sekijima Takeda

Prof^o. Adj. José Maurício Sforcin

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, UNESP, Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de mestre junto ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas - Genética

BOTUCATU – SP

Setembro / 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Assumpção, João Henrique Maia.

Potencial efeito epigenético do extrato de própolis brasileira e de seus componentes sobre linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários / João Henrique Maia Assumpção. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Cláudia Aparecida Rainho

Coorientador: Agnes Alessandra Sekijima Takeda

Coorientador: José Maurício Sforcin

Capes: 20205007

1. Mamas - Câncer. 2. Epigenética. 3. Própole. 4. Genética.
5. Biologia molecular.

Palavras-chave: Ácido p-cumárico; Câncer; Terapia epigenética; DNA-metiltransferase; Docking molecular.

Epígrafe

“Mestre não é aquele que sempre ensina, mas aquele que de repente aprende”.

(Guimarães Rosa)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais...

...Eunice Maia Assumpção

“Nossas mãos ainda encaixam certo

Peço um anjo que me acompanhe

Em tudo eu via a voz de minha mãe

Em tudo eu via nóiz”

(Mãe, Emerica)

... João Alberto Lisboa Assumpção

“It's not time to make a change

Just sit down, take it slowly

You're still young, that's your fault

There's so much you have to go through”

(Father and son, Cat Stevens)

Agradecimentos

Agradeço...

À Prof.^a Dr.^a Cláudia Aparecida Rainho pela orientação de excelência, pelo profissionalismo, ética e dedicação. Obrigado por além de ser minha orientadora, ser minha mentora e amiga.

À Dr.^a Agnes Sekijima Takeda, pelo apoio, orientação e pela eterna vigilância durante o trabalho.

Ao Prof.^o Dr.^o José Maurício Sforcin por sempre compartilhar seus conhecimentos, suas experiências e por ser um modelo de profissionalismo e dedicação ao trabalho. À CAPES pela disponibilidade da bolsa durante o curso, à FAPESP pelo financiamento da pesquisa.

À minha família, em especial meus pais, Eunice e João Alberto, e minha irmã Alice Ceci Maia Assumpção.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho pelo acolhimento, companhia e por todos os momentos de alegria ao decorrer destes dois anos.

Resumo

RESUMO

A própolis é uma substância de origem natural, de aspecto resinoso, produzida pelas abelhas a partir de diferentes plantas, que determina a sua composição química. Centenas de componentes foram identificados em diferentes amostras de própolis, cujo extrato exerce uma diversidade de efeitos biológicos e farmacológicos. Alguns estudos demonstraram que este produto pode interferir em vias de sinalização de oncogenes, inibir o crescimento, reduzir a proliferação celular, induzir apoptose e apresentar efeito antiangiogênico. O câncer de mama é uma doença complexa, caracterizada por heterogeneidade em nível molecular, histológico e clínico. O câncer de mama triplo-negativo é caracterizado pela ausência de expressão dos receptores hormonais ER (receptor de estrogênio) e PgR (receptor de progesterona), bem como pela baixa expressão da proteína Her-2; esse subtipo de câncer de mama é um problema do ponto de vista clínico devido ao seu pior prognóstico quando comparado aos outros subtipos, alta agressividade e ausência de terapias que possuam alvos específicos. Estudos prévios demonstraram que os compostos de origem natural podem inibir a atividade de enzimas da maquinaria epigenética, como as DNA metiltransferases e, consequentemente, aumentar a expressão de genes supressores de tumor silenciados por hipermetilação no câncer. Portanto, o presente estudo investigou a hipótese de que os efeitos antitumorais da própolis são, em parte, mediados por mecanismos epigenéticos. Primeiramente, utilizou-se a abordagem *in silico* de *docking* molecular a fim de verificar se moléculas derivadas da própolis podem interagir com o domínio metiltransferase (MTase) da DNMT1 (DNA metiltransferase 1) humana. Os ligantes foram selecionados a partir da composição química definida de uma amostra de própolis brasileira contendo: benzil benzoato, ácido cafeico, CAPE (éster de ácido cafeico), ácido dihidrocinâmico, (2E,6Z)-farnesol, ácido ferúlico, kaempferide, ácido p-cumárico, ácido hidrocinâmico e espatulenol. Foram selecionados 3 programas para as previsões de *docking* molecular: AutoDock 4.2, Dock 6.7 e SwissDock. As estruturas químicas dos ligantes foram obtidas no banco de dados PubChem e o modelo cristalográfico da DNMT1 humana em complexo com S-adenosil-homocisteína (SAH) (PDBID:4WXX) foi utilizado como receptor, onde foi definido uma área de interesse no sítio de interação de SAH ao domínio MTase (resíduos de aminoácidos 1135-1605). As conformações calculadas foram agrupadas em *clusters* usando Gromacs. O programa LigPlot + para verificar os contatos com os resíduos de aminoácidos de DNMT1. Adicionalmente, analisamos a inibição da atividade da metilase *M.SssI* na presença de EEP (extrato etanólico de própolis), EGCG (epigallocatequina-3-galato) e ácido p-cumárico, bem como o efeito do tratamento *in vitro* com EEP, EGCG e três ácidos aromáticos (cafeico, hidrocinâmico e p-cumárico). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]; a análise de MS-PCR (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*) foi realizada para verificar a possível efeito hipometilante do ácido p-cumárico, EGCG e EEP em 3 linhagens celulares de câncer de mama. Os nossos resultados de *docking* indicaram que CAPE, (2E,6Z)-farnesol e o ácido p-cumárico foram os ligantes que apresentaram energias de ligação mais favoráveis, melhor ocupação do sítio de ligação e interações químicas comuns com o complexo SAH-DNMT1. O EEP reduziu a viabilidade celular das linhagens BT-20 e BT-549, enquanto o ácido p-cumárico e EGCG reduziram a viabilidade de todas as linhas celulares estudadas, de um modo dose e tempo dependentes.

Tanto o EGCG como o ácido p-cumárico foram incapazes de inibir a metilase *M.SssI*; porém, os resultados da MS-PCR demonstraram que o EEP é capaz de induzir hipometilação *locus*-específica nas linhagens BT-549 e MDA-MB-436. EGCG também foi capaz de hipometilar as linhagens BT-549 e MDA-MB231. Em conclusão, a análise de *docking* molecular mostrou evidências de que os compostos derivados de própolis brasileira podem interagir com o sítio de ligação de SAH no domínio metiltransferase da DNMT1 humana e devem ser considerados em estudos futuros dedicados à identificação de novas drogas para a terapia epigenética.

Abstract

ABSTRACT

Propolis is a natural resinous substance produced by honeybees from several parts of plants, which are related to its chemical composition. Hundreds of chemical substances have been identified in different samples of propolis, which extract shows a plethora of biological and pharmacological activities. Generally, it has been demonstrated that this complex mixture can disrupt oncogene signaling pathways, inhibit cell growth and proliferation, induces apoptosis, and shows antiangiogenic effects. Breast cancer is a complex disease characterized by molecular, histological, and clinical heterogeneity. Triple-negative breast cancer, characterized by absence of expression of the receptors ER (estrogen receptor), PgR (progesterone receptor), and HER2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2), presents a significant clinical problem due to its poor prognosis, aggressiveness and lack of targeted therapies. Previous studies reported that compounds of natural origin target epigenetic modifying enzymes, such as DNA methyltransferases (DNMTs), and reactivate methylation-silenced genes in cancer. Thus, we hypothesized that the effects of propolis in cancer cell lines are, in part, mediated by epigenetic mechanisms. Therefore, this study aims to demonstrate the possible hypomethylating effect of propolis or its compounds on triple negative breast cancer cell lines. Initially, we used an *in silico* approach based on molecular docking to find propolis-derived molecules able to interact with the MTase domain of human DNMT1. The potential ligands were selected based on the chemical composition of a defined Brazilian propolis sample: benzyl benzoate, caffeic acid, CAPE (caffeic acid phenethyl ester), dihydrocinnamic acid, farnesol, ferulic acid, kampeferide, p-coumaric acid, hydrocinnamic acid, and spathulenol. For molecular docking predictions three software were selected: AutoDock 4.2 (autodock.scripps.edu/), Dock 6.7 (<http://dock.compbio.ucsf.edu/>), and SwissDock (www.swissdock.ch). The chemical structures of probable ligands were retrieved from PubChem database (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) and the crystallographic model of human DNMT1 in complex with S-adenosyl-homocysteine (SAH) (PDBID: 4WXX) was used to refine the site of interest in the receptor [methyltransferase (Mtase) domain, amino acids residues 1135-1605]. All structures were prepared for docking using Chimera 1.11.2 (cgl.ucsf.edu/chimera). The known interaction of methyl group donator S-adenosyl-methionine (SAM) and the intrinsic inhibitor (SAH) with DNMT1 were used as reference. The calculated conformations were clustered using Gromacs (www.gromacs.org) with the Gromos algorithm, using a RMSD (Root-Mean-Square Deviation) of atomic positions cutoff of 1Å. The middle structure of the 3 clusters with more conformations of each ligand was analyzed with LigPlot+ (www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/) to verify the contacts with the amino acids residues of DNMT1. Further, we have analyzed the inhibition of M.SssI methylase activity in the presence of EEP (ethanolic extract of propolis), EGCG and p-coumaric acid as well as the effect after *in vitro* treatment with EPP (concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50 and 100mg/mL), EGCG, and three aromatic acids (caffeic, hydrocinnamic, and p-coumaric) (concentration of 6.25, 12.5, 25, 50 and 100µM), during 24, 48, 72 and 96h in the BT-20, BT-549, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 breast cancer cell lines. Cell viability was determined by MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide)] test and Methylation Specific – Polymerase Chain Reaction (MS-PCR) was used to verify the possible hypomethylation effect of p-coumaric acid, EGCG and EEP three breast cancer cell-lines (BT-549, MDA-MB-231 and MDA-MB-436). Our results indicates that CAPE, (2E, 6Z)-farnesol and p-coumaric acid were the ligands that showed more negative free binding energies, better occupation of the binding site and common chemical interactions with the complex SAH-DNMT1. The EEP reduced the cell viability of BT-20 and BT-549, while p-coumaric acid and EGCG reduced the viability of all cell lines studied, in a dose and time dependent manners. Both EGCG and p-coumaric acid were unable to inhibit *M.SssI* methylase, however MS-PCR results demonstrated that EEP is able to induce locus-specific hypomethylation in the BT-549 and MDA-MB-436 cell lines and EGCG was also able to hypomethylate BT-549 and MDA-MB231. In conclusion, the molecular docking demonstrates that compounds derived from Brazilian propolis can interact with SAH binding pocket of methyltransferase domain of human DNMT1 and could be included in future studies of new drugs for epigenetic therapy.

Lista de Abreviações

LISTA DE ABREVIACÕES

Å - ångström

ADD – domínio funcional das DNA metiltransferases 3 [*domain ATRX-DNMT3-DNMT3L*]
(também chamado de PHD, *plant homeodomain*)

ADT - *AutoDock Tools*

AKT - *AKT serine/threonine kinase 1*

BAH - *Bromo Adjacent Homology*

BAH1 - *Bromo-Adjacent Homology 1*

BAH2 - *Bromo-Adjacent Homology 2*

BAX - *BCL2 associated X, apoptosis regulator*

BCL2 - *Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 2*

CAPE - *Caffeic Acid Phenethyl Ester*

CD44 - *CD44 molecule (indian blood group)*

CH₃ - radical metil

CHOP - *C/EBP homologous protein* (também chamada de *DNA damage inducible transcript 3*)

CID – *PubChem Compound Identification*

cm² – centímetros quadrado

COMT - catecol-o-metiltransferase

CpG – dinucleotídio CpG, citosina seguida de guanina na mesma fita de DNA

CXXC *zinc finger* – domínio funcional da DNA metiltransferase 1 em forma de dedo de zinco

dbSNP - *Single Nucleotide Polymorphism database*

DMAP1- *DNA methyltransferase associated protein 1*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNMT – DNA metiltransferase

DNMT1 – DNA metiltransferase 1

dNTP – desoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilenodiamino tetra-acético

EEP – extrato etanólico de própolis

EGCG – epigallocatequina-3-galato

ER – receptor de estrógeno

ERBB2 - *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

FasL/Fas – via de sinalização (*Fas ligand/ Fas cell surface death receptor*)

g - grama

GC-MS - *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

HDAC – Histona desacetilase

HER2 – *protoncogene HER2, human EGF receptor* ou *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

HIF-1 - *hypoxia inducible factor 1*

hMLH1 - *mutL homolog 1 [Homo sapiens (human)]*

IC₅₀ – concentração inibitória 50 (concentração de um inibidor onde a resposta é reduzida pela metade)

ICG – ilha CpG

INCA - Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva

Kcal/mol – quilocalorias por mol

KG *linker* – domínio funcional da DNA metiltransferase 1, composto por uma série de lisinas e glicinas

Ki67 – marcador ou antígeno de proliferação celular Ki-67

L - litro

LINES - *Long interspersed nuclear elements*

MECP2 - *methyl-CpG binding protein 2*

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MGMT - *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*

mL - mililitro

mM - nanomolar

MMP2 – metaloproteinase 2

MMPs – metaloproteinases

MS-PCR – *Methylation Specific – Polymerase Chain Reaction*

M.SssI – metilase ou metiltransferase de *Spiroplasma sp*, cepa MQ1

MTase – domínio metiltransferase

MTT - *3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NaCl – cloreto de sódio

NF-κB - *nuclear factor kappa B*

ng – nanograma

nm – nanômetro

NGF/p75NTR – via de sinalização (*nerve growth factor / p75 neurotrophin receptor*)

(NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio

NLS - sequência de localização nuclear

nM - nanomolar

p21(CIP1) - proteína p21 (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*)

p53 - proteína p53

p38/MAPK - via de sinalização p38/MAPK (*p38 mitogen-activated/mitogen- activated protein kinases*)

PAK1 - *p21 (RAC1) activated kinase 1*

pb – pares de bases

PBD - *PCNA bind domain*

PCNA- *Proliferation Cell Nuclear Antigen*

PCQ – motivo catalítico das DNA metiltransferases contendo cisteína

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDBID – identificador no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*)

PgR – receptor de progesterona

PWWP – domínio funcional das DNA metiltransferases 3

RARB – *retinoic acid receptor*

RFTS - *Replication Foci Targeted Sequence*

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

SAH – S-adenosil homocisteína

SAM - S-adenosil-metionina

SBDD - *Structure Based-Drug Design*

SINES - *Short interspersed nuclear elements*

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

Taq - *Thermus aquaticus*

TCGA - *The Cancer Genome Atlas Network*

TIMP2 - *tissue inhibitor of metalloproteinases 2*

TCSR - *Tissue Culture Shared Resource*

TNM - Tumor-Nódulo-Metástase

TP16 – *tumor supressor protein p16* ou *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*

TRAIL/DR4/5 - via de sinalização (*TNF- related apoptosis-inducing ligant/ TRAIL death receptors DR4 and DR5*)

Tris-HCl - *Tris hydrochloride*

TS - *Targeting Sequence*

UICC - *Union for International Cancer Control*

VEGF - *vascular endothelial growth factor*

µg - micrograma

µL - microlitro

µM – micromolar

Sumário

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer de mama.....	1
1.2. Mecanismos epigenéticos e câncer	4
1.3. Própolis e seus efeitos antitumorais	6
1.4. Produtos naturais e terapia epigenética	12
1.5. Abordagens computacionais na pesquisa de novos inibidores de DNMTs.	15
1.6. Estrutura e funcionamento das DNA metiltransferases (DNMTs): perspectivas para a terapia epigenética do câncer	16
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Caracterização química da própolis e ácidos fenólicos.....	25
3.2. Seleção de ligantes para a predição in silico de novos inibidores de DNMTs.....	26
3.3. Análise in silico da potencial interação entre componentes da própolis e o domínio MTase da DNMT1.....	29
3.3.1. Preparação de estruturas tridimensionais dos ligantes e da molécula receptora	31
3.3.2. Configurações usadas para o cálculo de docking molecular	32
3.3.3. Clusterização dos resultados obtidos.	34
3.3.4. Visualização e análise dos resultados de docking molecular.....	35
3.4. Ensaio in vitro de inibição da metilase M.SssI	35
3.5. Viabilidade celular após o tratamento com própolis ou com seus componentes isolados	39
3.5.1. Linhagens celulares.....	39
3.5.2. Descongelamento e manutenção in vitro das linhagens celulares	40
3.5.3. Avaliação do efeito do tratamento in vitro com própolis e seus derivados pelo teste de viabilidade celular pelo MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide).....	40
3.6. Análise do padrão de metilação de genes específicos pelo ensaio de Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR) após exposição ao EEP, EGCG e ácido p-cumárico	41
3.6.1. Tratamento in vitro das linhagens celulares.....	42
3.6.2 Extração de DNA	42
3.6.3 Modificação de DNA por bissulfito de sódio e amplificação por MS-PCR (Methylation Specific – Polymerase Chain Reaction).....	Erro! Indicador não definido.

3.7. Análise estatística.....	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Predição computacional de novos inibidores de DNMTs a partir de componentes da própolis	45
4.2. Efeito da própolis e seus componentes em linhagens derivadas de câncer de mama humano triplo negativo.....	56
4.3. Inibição in vitro da metilação do DNA.....	62
4.4 Análise do padrão de metilação de genes específicos após exposição ao EEP, EGCG e ácido p-cumárico.....	64
5. DISCUSSÃO	66
5.1. Dados in silico sugerem possíveis interações entre componentes da própolis e o domínio MTase da DNMT1 humana	66
5.1.1 Docking molecular de SAH e EGCG	67
5.1.2 Docking molecular dos ácidos cafeico, ferúlico, hidrocinâmico e p-cumárico.....	68
5.1.3 Docking molecular de benzil benzoato, CAPE, espatulenol e (2E,6Z)-farnesol....	68
5.2. Efeitos do extrato de própolis e de componentes selecionados sobre linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários triplo negativos.....	70
6. CONCLUSÕES	74
7. Referências bibliográficas.....	75

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea e progressiva, resultante do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas (BECA; POLYAK, 2016). Essa doença corresponde a um dos tipos de câncer mais comumente diagnosticados e uma das principais causas de morte em mulheres no mundo (FERLAY et al., 2015), sendo que a sua incidência continua aumentando tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. No Brasil, excetuando-se os tumores de pele não melanoma, é o câncer mais comum em mulheres, correspondendo a aproximadamente 25% dos casos, com estimativa de 57.960 casos novos em 2016 (INCA, 2016) e risco de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres, além de aproximadamente 14.206 mortes por ano (SIM, 2013).

Vários fatores de risco foram associados ao seu desenvolvimento, incluindo os relacionados à vida reprodutiva da mulher como menarca precoce e menopausa tardia, idade e histórico familiar de câncer (LAMBERTINI et al., 2016). A incidência de câncer de mama até os 35 anos é relativamente baixa e infrequente, porém aumenta rápida e progressivamente especialmente após os 50 anos de idade. O histórico familiar é considerado um fator de risco crítico, evidenciando a importância da predisposição hereditária no desenvolvimento desse tipo de câncer: estima-se que entre 5 a 10% dos casos sejam hereditários, geralmente acometendo pacientes jovens e com histórico da doença na família em parentes de primeiro e segundo grau (CHEUNG; GRAVES; ROBERTSON, 2000; GOLUBNITSCHAJA et al., 2016).

A maioria dos subtipos de câncer de mama foi correlacionada a um bom prognóstico, desde que o tumor seja diagnosticado e tratado prontamente (INCA, 2016). No entanto, alguns tumores mamários evoluem de forma rápida e apresentam prognóstico pobre. No Brasil, há uma tendência de aumento nas taxas de mortalidade por neoplasias mamárias,

sendo em muitos casos decorrentes de um diagnóstico tardio em muitos casos (BARRIOS et al., 2005)

Do ponto de vista clínico, utiliza-se o sistema de estadiamento recomendado pela *Union for International Cancer Control (UICC)* denominado Tumor-Nódulo-Metástase (TNM). Essa classificação baseia-se na localização e tamanho do tumor primário, extensão tumoral, além da presença ou ausência de metástases ou seja, a categoria T descreve o tumor primário e o local onde o mesmo se encontra; a categoria N descreve o envolvimento loco-regional, considerando-se a presença de células tumorais em linfonodos axilares; e a categoria M descreve a presença ou ausência de metástases à distância. Esse sistema de estadiamento clínico varia de 0 a IV (UICC, 2013).

Histologicamente, os carcinomas mamários são classificados em subtipos distintos: o carcinoma ductal é o tipo histológico mais comum, sua frequência varia entre 80 a 85% dos casos, seguido dos carcinomas lobulares (aproximadamente 15% dos casos). Geralmente, os carcinomas não-invasivos (*in situ*, ou crescimento confinado ao epitélio) são os tumores que mostram o melhor prognóstico. Existem ainda os carcinomas invasivos de prognóstico favorável: carcinoma ductal invasivo com componente intraductal predominante (ou carcinoma ductal microinvasivo), carcinoma mucinoso (coloide), carcinoma medular, carcinoma papilífero, carcinoma tubular, carcinoma adenocístico e carcinoma secretor (juvenil). Os tumores de pior prognóstico são os carcinomas ductais ou lobulares invasivos (Barros et al., 2001).

Durante décadas, foram desenvolvidas muitas pesquisas para a identificação de marcadores moleculares de diversos tipos de câncer, incluindo os da mama. Atualmente, os marcadores moleculares amplamente utilizados no diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer de mama incluem os receptores hormonais ER (receptor de estrógeno) e PgR (receptor de progesterona), o marcador de proliferação celular Ki-67, além do nível de

expressão do receptor codificado pelo protooncogene *HER-2* (também denominado ERBB2, *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*) (INWALD et al., 2015). A expressão dos receptores hormonais ER e PgR normalmente está associada a tumores de baixo grau histológico, ou seja, menor potencial de malignidade (PUSZTAI et al., 2006). A taxa de proliferação celular, por sua vez, é investigada pelo do antígeno nuclear Ki-67. Portanto, quanto mais elevada a expressão de Ki-67, pior o prognóstico, já que tumores com essa característica apresentam maior probabilidade de evoluir para metástases (ESTEVA; HORTOBAGYI, 2004).

O protooncogene *HER-2* codifica um membro da família de receptores do fator de crescimento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), possui atividade tirosina quinase e atua na ativação das vias de sinalização mitogênica. Quando este é ativado por amplificação gênica, a sua expressão aumentada está associada à proliferação celular, devido à transmissão constante de sinais para o crescimento e proliferação celular.

Considerando-se a grande heterogeneidade clínica, histopatológica e nos padrões anormais de expressão gênica no câncer de mama, Perou e colaboradores (2000) investigaram a variação no padrão global de expressão gênica de 65 amostras de tumores primários de mama, utilizando uma plataforma de *microarray* contendo 8.102 genes humanos. Baseados nesta análise, os autores sugeriram a primeira classificação molecular de tumores mamários, a partir de assinaturas de expressão gênicas distintas.

Atualmente, o câncer de mama é classificado em pelo menos quatro subtipos moleculares intrínsecos: luminal A (geralmente os tumores são ER e PgR positivos e negativos para a expressão aumentada de HER-2), luminal B (grupo caracterizado por tumores ER positivos com expressão baixa ou ausente de PgR, mostrando altas taxas de proliferação celular e, ocasionalmente, expressão alta da proteína HER-2), tumores que expressam altos níveis de HER-2 (ER e PgR negativos, mas com níveis elevados de

expressão de HER-2) e *basal-like* (geralmente ER, PgR, e HER-2 negativos, também conhecidos como triplo negativos) (INWALD et al., 2015).

Os subtipos moleculares do câncer de mama diferem em incidência, prognóstico e resposta a terapia (MIRZANIA, 2016). Neste contexto, o câncer de mama triplo negativo corresponde a aproximadamente 15% dos carcinomas mamários e caracteriza-se por comportamento mais agressivo, maior risco de recorrência e metástases, sendo mais difíceis de serem tratados (ALLISON, 2012; AMBROSONE; HONG; GOODWIN, 2015; RAKHA; GREEN, 2017).

Considerando-se o impacto que os padrões anormais de metilação do DNA possuem sobre a regulação da expressão gênica no câncer (ESTELLER, 2002; JIN; ROBERTSON, 2013; ROBERTSON, 2005), estudos recentes investigaram a relação existente entre os perfis anormais de metilação do DNA e os subtipos moleculares do câncer de mama (TCGA - The Cancer Genome Atlas Network, 2012). O perfil de metilação do DNA dos subtipos Luminais é caracterizado por ganhos de metilação na região promotora de genes específicos, enquanto os tumores *basal-like* tendem a ser hipometilados no corpo do gene e em regiões repetitivas (Stefansson et al., 2015; Györfy et al., 2016; Holm et al., 2016).

1.2. Mecanismos epigenéticos e câncer

A definição moderna de epigenética refere-se à herança de características estáveis decorrentes de modificações no DNA ou na cromatina e que não decorrem de mudanças na sequência de bases nitrogenadas do genoma. Diferentes radicais químicos podem ser ligados tanto no DNA quanto nas histonas. Tais marcações químicas podem ser conservadas e transmitidas a cada geração celular (BERGER et al., 2009). Existem diversas enzimas que podem adicionar ou remover diferentes radicais: metil, acetil, ubiquitina, entre outros, modificando as histonas em resíduos de aminoácidos específicos. No DNA, a marca

epigenética melhor estudada é a adição de um radical metil no carbono cinco de citosinas, formando a 5-metilcitosina (5mC) (JAENISCH; BIRD, 2003).

No genoma de mamíferos, diversos estudos demonstram que a presença de metilação ao longo do DNA é importante para alguns processos como o silenciamento de retrotransposons (BOURC'HIS; BESTOR, 2004), o *imprinting* genômico (LI; BEARD; JAENISCH, 1993) e a inativação do cromossomo X (BRIGGS; REIJO PERA, 2014). A metilação do DNA acontece quase que exclusivamente no contexto de dinucleotídeos CpGs, ou seja, uma citosina imediatamente seguida por uma guanina na mesma fita de DNA. Quando o genoma humano foi sequenciado e montado pela primeira vez, descobriu-se que existe uma quantidade de nucleotídeos CpGs inferior à esperada, porém existem regiões com uma alta concentração de CpGs, conhecidas como ilhas CpGs (ICG). Foi estimado que aproximadamente 60% dos genes humanos possui uma ilha CpG associada à sua região promotora (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001).

As ilhas CpGs estão presentes em várias regiões do genoma: promotores, corpo de genes, regiões não codificadoras e região de elementos de transposição. Entende-se que a metilação do DNA está associada à regulação da transcrição e com o processo de heterocromatização (JONES, 2012). Geralmente, a alta densidade de metilação do DNA nas ilhas CpG presentes nas regiões promotoras resulta em silenciamento gênico devido à inibição da ligação dos complexos de transcrição a suas respectivas sequências regulatórias ou pelo recrutamento de proteínas que se ligam às sequências CpG metiladas iniciando modificações epigenéticas coordenadas na cromatina (ESTELLER, 2007). Em genes transcricionalmente ativos, as ilhas CpG associadas aos promotores gênicos são normalmente não metiladas. Entretanto, elementos repetitivos (DNA satélite, LINES, SINES e transposons) e a região promotora de alguns genes tecido-específicos, caracterizados por

ausência de expressão, são geralmente metiladas na maioria dos tecidos (ESPADA; ESTELLER, 2010). Logo, a distribuição correta da metilação no genoma como um todo é necessária para o desenvolvimento normal do organismo (ARMSTRONG, 2013).

A perda dos padrões normais de metilação do DNA tecido-específicos pode resultar no silenciamento de genes importantes na manutenção de vias e processos celulares, que regulam algumas funções básicas, incluindo o ciclo celular e a apoptose. Por isso, a hipermetilação levando ao silenciamento epigenético de genes supressores de tumor pode estar associada à formação de câncer, já que existe a possibilidade da célula perder o controle sobre alguns processos essenciais. Por outro lado, a diminuição da metilação no genoma (hipometilação) pode fazer com que genes que deveriam estar silenciados comecem a ser transcritos ou gerar instabilidade genômica (BEST; CAREY, 2010; JIN; ROBERTSON, 2013). Portanto, tanto a hipermetilação quanto a hipometilação são dois fenômenos relevantes para o surgimento e progressão do câncer (EHRlich; LACEY, 2013).

1.3. Própolis e seus efeitos antitumorais

Própolis é um produto natural, com aspecto resinoso, produzido por abelhas (*Apis mellifera*) e utilizada na construção e manutenção de suas colmeias. As abelhas coletam resinas exsudadas por plantas, nos troncos e ápices de folhas e misturam com cera e produtos de suas próprias glândulas, para formar a própolis (BURDOCK, 1998).

A própolis é produzida a partir de materiais coletados na flora local, portanto a sua composição dependerá das condições do ambiente, tais como tipo de vegetação, clima, altitude, etc. Isso faz com que sua composição química seja complexa, contando com diversos compostos conhecidos, variando de acordo com a localização geográfica de coleta (BANKOVA, 2005).

Devido à sua grande complexidade e diferenças na composição, existe um grande esforço para a caracterização química mais detalhada da própolis ao redor do globo (HUANG et al., 2014; SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015). Estes estudos identificaram que os grupos químicos presentes nos diferentes tipos de própolis incluem, principalmente os flavonóides e os ácidos fenólicos.

Diversos trabalhos demonstraram que a própolis possui diversas propriedades biológicas: antibacteriana, anti-inflamatória, imunomoduladora e antitumoral (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Em adição, a própolis não tem praticamente sido associada a nenhum efeito colateral (SFORCIN; NOVELLI; FUNARI, 2002) ou toxicidade (JASPRICA et al., 2007). Todas essas evidências posicionam a própolis entre os produtos de origem natural com um grande potencial farmacológico a ser explorado e que ainda foi pouco estudado quanto aos seus mecanismos de ação, incluindo a definição de quais componentes químicos seriam responsáveis pelas suas propriedades biológicas.

Uma das propriedades biológicas da própolis que tem despertado grande interesse é o seu efeito antitumoral. É bem descrito na literatura que a própolis pode inibir a proliferação de células tumorais (BÚFALO et al., 2010) ou prevenir a carcinogênese (BAZO et al., 2002) em modelos *in vivo*. Em um artigo de revisão dos efeitos citotóxicos e inibição do crescimento de células tumorais exercido pelos diferentes tipos de extratos de própolis (alcoólicos e aquosos) e pelos compostos químicos derivados da própolis de diferentes origens geográficas (WATANABE et al., 2011). Onde, foi observado que as vias de ação sugeridas nesses trabalhos são bem variadas: inibição de angiogênese (WU et al., 2011), inibição de migração celular e de formação de colônias (PENG et al., 2012a), além de indução da apoptose (SZLISZKA et al., 2011).

Um dos efeitos antitumorais mais descritos é o de que a própolis, ou algum de seus componentes, pode induzir a apoptose em diversos tipos de câncer. Ainda, a indução da

apoptose pode acontecer por via intrínseca ou extrínseca: inibição de NF- κ B (WATABE et al., 2004), indução de caspases (SEDA VATANSEVER et al., 2010) e de genes pró-apoptóticos (TSENG et al., 2014). Diversos outros trabalhos demonstraram os efeitos antitumorais da própolis utilizando ensaios *in vitro* e linhagens celulares derivadas de diversos tipos de cânceres humanos, inclusive câncer de mama. A tabela 1 apresenta uma compilação dos principais estudos sobre os diversos efeitos da própolis e de seus constituintes isolados em diferentes linhagens celulares humanas.

Tabela1. Estudos *in vitro* sobre os efeitos da própolis ou de seus componentes em células humanas. Principais efeitos da própolis descritos na literatura, incluindo as vias específicas envolvidas. Os estudos que utilizaram linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários e suas respectivas referências bibliográficas encontram-se destacados em negrito.

EFEITO	VIA BIOLÓGICA	COMPOSTO/EXTRATO	LINHAGENS	REFERÊNCIAS
INDUÇÃO DE APOPTOSE	Modulação de caspases	EEP, CAPE	MCF7 , HUVEC e HLL60	CHEN et al., 2001; KAMIYA et al., 2012 ; KUNIMASA et al., 2011; MOTAWI et al., 2016 ; SEDA VATANSEVER et al., 2010 e TSUCHIYA et al., 2013.
	Modulação da via NF-KB	CAPE	MCF7 , MDA-MB-231 e Daoy	LEE et al., 2008b; WATABE et al., 2004 e WU et al., 2011
	Modulação por CHOP	EEP, CAPE	MCF7	KAMIYA et al., 2012
	Indução de apoptose por TRAIL/DR4/5 e FasL/Fas	EEP	DLD-1 , SW480 , DLD-1/5FU , DLD-1/OXA , LNCap, DU145 e HeLa	KROL et al., 2011; KUMAZAKI et al., 2014 ; SZLISZKA et al., 2011, 2013
	Outros	cardanol, crisina, CAPE, EEP, artepelina C, quercetina, kaempferol e ácido p-cumárico.	BT-474 , Hep-2, SW620, DU145 e PC3	BUAHORM et al., 2015 ; FROZZA et al., 2017; KUSTIAWAN et al., 2017; HE et al., 2006 e RYU et al., 2017
	Ativação da via p38/MAPK e NGF/p75NTR	CAPE	C6	KUO et al., 2006; LEE et al., 2003 e TSENG et al., 2014
CONTROLE DO CRESCIMENTO CELULAR	Modulação da via de sinalização beta-catenina	CAPE	SW480	HE et al., 2006
	Efeito citotóxico e distúrbios no metabolismo glicolítico	EEP	HCT-15	VALENÇA et al., 2013
	Supressão da proliferação, formação de colônia e	CAPE	PC3 e HCT-15	LIN; JIANG; CHUU, 2012

INTERAÇÕES COM PROTEÍNAS	progressão do ciclo celular			
	Bloqueio da via de sinalização mediada por PAK1	artepelin C e CAPE	HUVEC	MESSERLI et al., 2009
	Modulação da via de sinalização AKT	CAPE	LNCap, DU145 e HepG2	CHUU et al., 2012
	Efeito citotóxico, por uma via não apoptótica (morfologia semelhante à necrose)	EEP	PANC-1	AWALE et al., 2008
	Regulação do ciclo celular	CAPE	TW2.6	KUO et al., 2013
	Outros	EEP, EMP, bacarina, drupanina, nemorosome	MDA-MB-231; Hs578T, MCF7, A-498, DLD-1, COLO201, MKN1, MKN28, MUGC4, NB4, HL60, K562, U937, S180, HeLa, L929, HT-29, Hep-2, raw 264.7, Vero, Chago, KATO-III, BT-474, HS27, PC-3, DU-145 HEP3b, HNSCC e MCF7-BUS	AKAO et al., 2003; CAMARGO et al., 2013; CHEN et al., 2012; CHOUDHARI et al., 2013; HERNANDEZ et al., 2007; KUBINA et al., 2015; KUSTIAWAN et al., 2015; POPOLO et al., 2009, 2011; RZEPECKA-STOJKO et al., 2015; THIRUGNANASAMPANDAN; RAVEENDRAN; JAYAKUMAR, 2012; UMTHONG et al., 2011; UTISPAN; CHITKUL; KOONTONGKAEW, 2017; VALENTE et al., 2011
INTERAÇÕES COM PROTEÍNAS	Inibição de desacetilases de histonas	Crisina, CAPE	MCF7, MDA-MB-231 e SK-BR-3	
	Modulação do receptor de estrógeno (ER)	EEP, REP, CAPE	MCF7 e MDA-MB-231	JUNG et al., 2010; SONG et al., 2002
	Inibição de HIF-1	Isosakunaretina, bacarina,	HEK293 e HCT116	HATTORI et al., 2011

drupanina				
ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	Modulação de genes codificadores das proteínas p21CIP1 e p53	EEP	CaCo2, HCT116, HT29 e SW480,	ISHIHARA et al., 2009
	Modulação de genes codificadores de ciclinas	CAPE, nimfaeol-A e C	DU145, PC3,	LI et al., 2007
	Modulação de MMP2 e TIMP2	CAPE	SCC2	PENG et al., 2012b
	Modulação de BCL2 e BAX	EAP	HCT116 e HL-60	SULAIMAN et al., 2012
	Outros	EEP,	A549, SAS e OECM-1	CHUNG et al., 2017; NGUYEN et al., 2017
INIBIÇÃO DE ANGIOGÊNESE E MIGRAÇÃO	Inibição de MMPs	CAPE	HT1080, SK-Hep1	HWANG et al., 2006; LEE et al., 2008a
	Modulação de VEGF	EEP e CAPE	HUVEC	IZUTA et al., 2009
	Outros	Artepelina C, polifenóis derivados da própolis, CAPE	HUVEC, EA.hy926, RCC4 e PANC-1	AHN et al., 2007; DALEPRANE et al., 2012; DUAN et al., 2017; OHTA et al., 2008
INIBIÇÃO DE METÁSTASE	Inibição da atividade de VGSC (<i>voltage-gates channel</i>)	CAPE	MDA-MB-231 e MDA-MB-468	FRASER; HEMSLEY; DJAMGOZ, 2016
OUTROS	Inibição da auto-renovação celular, formação de progenitores, crescimento clonal em soft ágar, e diminuição da contagem de células CD44	CAPE	eCSC (breast cancer stem cells)	OMENE et al., 2013
	Efeito protetor contra danos oxidativos	CAPE	HepG2	LEE et al., 2008b

CAPE – *Caffeic Acid Phenethyl Ester*; EEP – Extrato Etanólico de Própolis; EMP – Extrato Metanólico de Própolis; EAP – Extrato Aquoso de Própolis, REP - *ether extract of propolis*.

1.4. Produtos naturais e terapia epigenética

Alguns estudos recentes indicam que produtos de origem natural podem ser uma grande fonte de drogas para terapia epigenética (ZWERGEL; VALENTE; MAI, 2015). Exemplos de compostos químicos que apresentam atividade inibidora de proteínas envolvidas na programação epigenética incluem os compostos fenólicos ácido cafeico, epigallocatequina-3-galato (EGCG) e curcumina. A curcumina, o principal componente da cúrcuma, possui capacidade reguladora do ciclo celular e indução de apoptose (SRIVASTAVA et al., 2007), podendo também inibir a acetilação de histonas (KANG; CHA; JEON, 2006).

O EGCG é um polifenol, principal componente do chá verde, com propriedades antitumorais (LI; TOLLEFSBOL, 2010). No estudo de FANG e colaboradores (2003) foi demonstrado que a exposição *in vitro* da linhagem KYSE 150, derivadas de câncer de esôfago, por um período de até 144 horas levou à reversão da hipermetilação dos genes *TP16* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), receptor de ácido retinóico beta (*RARB*), O6-metilguanina metiltransferase (*MGMT*) e mutL homólogo 1 (*hMLH1*). A perda de metilação nesses locus foi acompanhada da expressão dos mRNAs desses genes. Este efeito também foi observado nas células HT-29 (câncer de cólon humano) e PC3 (câncer de próstata) (FANG et al., 2003).

Os efeitos moduladores de dois polifenóis presentes no café (ácidos cafeico e ácido clorogênico) na metilação *in vitro* de substratos de DNA sintéticos foram demonstrados em duas linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários humanos (MCF-7 e MDA-MB-231) (LEE; ZHU, 2006). A inibição máxima *in vitro* da metilação do DNA foi de aproximadamente 80%, quando a maior concentração (20µM) de ácido cafeico ou ácido clorogênico foi testada. As análises cinéticas mostraram que a metilação do DNA catalisada pela metilase procariótica *M. SssI* reduziu a atividade da

metilase através de um mecanismo não competitivo. Os autores sugeriram que esta inibição foi, em grande parte, devido, ao aumento da formação S-adenosil-homocisteína, resultante da ação da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT). Em adição, o estudo também demonstrou que o tratamento dessas células com ácido cafeico ou ácido clorogênio inibiu parcialmente a metilação da região promotora do gene *RARB* (receptor do ácido retinóico).

Considerando-se que o silenciamento de genes supressores de tumor decorrente de ganhos de metilação nas ilhas CpGs associadas às regiões promotoras específicas é um evento frequente em diversos tipos de cânceres humanos, a identificação de compostos químicos que inibam a atividade das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) e, conseqüentemente, que induzam a reexpressão desses genes, é de grande interesse para a terapia epigenética do câncer. Em termos gerais, existem dois tipos de inibidores de DNMTs: os análogos de nucleosídeos e os não análogos de nucleosídeos (figura 1).

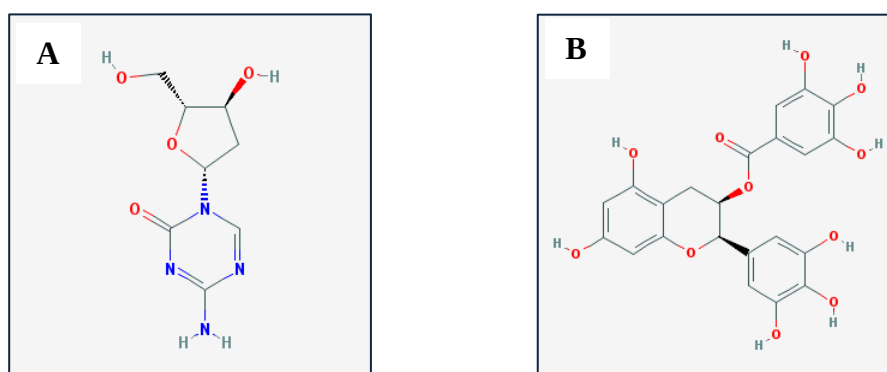


Figura 1. A) 5-Aza-2'-deoxycitidina, inibidor análogo de nucleosídeo. **B)** EGCG, principal componente do chá verde e representante dos inibidores não análogos de nucleosídeos.

Inibidores análogos de nucleosídeos apresentam um anel de citosina modificado, o ao qual é ligado a uma ribose ou desoxirribose. Eles são metabolizados por quinases, que os convertem de nucleosídeos para nucleotídeos, permitindo a sua incorporação ao

DNA durante a sua duplicação. A metilação é inibida quando esses compostos são incorporados às fitas recém-sintetizadas. Como exemplo, os análogos de nucleosídeos Azacitidina e Decitabina são fosforilados por quinases específicas, como a deoxicitidina quinase, o que permite a sua incorporação ao DNA (YOO; JONES, 2006). A incorporação desses análogos de citosina evita a liberação da enzima DNMT pela formação de um complexo covalentemente ligado ao substrato (SANTI; NORMENT; GARRETT, 1984; ZHOU et al., 2002) o que impossibilita metilações posteriores, resultando em células filhas pouco metiladas. Essas células podem reativar a expressão de genes relacionados à apoptose e reguladores de ciclo celular, auxiliando no controle tumoral.

Inibidores não análogos apresentam grande interesse clínico por se ligarem diretamente à região catalítica e não ser necessária sua incorporação ao DNA (BRUECKNER et al., 2005; YOO; JONES, 2006). Uma pequena molécula sintética desenhada para ajustar-se ao sítio catalítico da DNMT1 humana é a RG108 (BRUECKNER et al., 2005). O uso *in vitro* dessa molécula em linhagens celulares derivados de cânceres humanos demonstrou a diminuição significativa da metilação e reexpressão do gene supressor de tumor *TP16*, acarretando em diminuição das taxas de proliferação das células tumorais (HEERBOTH et al., 2014).

Fontes naturais de compostos ativos também podem levar à descoberta de candidatos a drogas ou ser o ponto de partida para desenvolvimento de novas drogas (HAUSER; JUNG, 2008). O EGCG é proposto como um inibidor de DNMT1, que atuaria no sítio ativo da enzima (FANG et al., 2003). Outros polifenóis como catequinas, flavonoides (quercetina, miricetina) e polifenóis (ácido cafeico, ácido clorogênico etc) também são descritos como potenciais inibidores de DNMT1 (MEDINA-FRANCO et al., 2011; ZWERGEL; VALENTE; MAI, 2015).

1.5. Abordagens computacionais na pesquisa de novos inibidores de DNMTs.

Nos últimos anos, alguns estudos descreveram o uso de abordagens computacionais para a identificação de novas moléculas inibidoras de DNMTs. Uma estratégia muito empregada é o *docking* molecular (MEDINA-FRANCO; CAULFIELD, 2011), que é uma abordagem computacional que calcula as diferentes conformações e posições que uma molécula ligante pode apresentar, quando entra em contato com uma molécula receptora. Utilizando campos de forças moleculares é possível calcular essas posições e conformações, bem como os valores de energia de interação entre o ligante e o receptor. O processo de cálculo de *docking* molecular envolve várias etapas, onde a complexidade do problema aumenta a cada etapa realizada (KITCHEN et al., 2004).

Durante os últimos anos, diferentes abordagens computacionais foram desenvolvidas para o estudo de pequenas moléculas bioativas em relação a seus potenciais alvos, considerando-se que o entendimento dos princípios pelos quais estas pequenas moléculas ou ligantes reconhecem e interagem com macromoléculas é uma etapa essencial na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas de interesse terapêutico (FERREIRA et al., 2015). O *docking* molecular é um dos métodos mais utilizados de *Structure Based-Drug Design* (SBDD), sendo definido como um processo *in silico* que envolve a predição de possíveis conformações e orientações (ou posicionamento) entre uma molécula ligante a um sítio de ligação em um alvo ou molécula receptora (KITCHEN et al., 2004). *Docking* é um processo em múltiplas etapas que se inicia com o conhecimento da estrutura tridimensional do ligante e do receptor, fundamental para as etapas de determinação da conformação mais provável de ligação e para a identificação das interações intermoleculares correspondentes (HUANG, S. Y. AND ZOU, 2010).

Uma variedade de programas para a análise de *docking* molecular estão disponíveis. Estes programas diferem quanto aos métodos utilizados que podem considerar a flexibilidade do ligante. Os métodos de *docking* molecular baseados na flexibilidade do ligante podem ser agrupados em três classes principais: métodos sistemáticos, randômicos ou estocásticos e por simulação (KITCHEN et al., 2004).

Muitos estudos utilizamram a abordagem computacional para o desenho de novas moléculas inibidoras de DNMT1 (MEDINA-FRANCO et al., 2015): o EGCG (MEDINA-FRANCO et al., 2011) e curcumina (LIU et al., 2009) foram propostos como inibidores de DNMTs, a partir de métodos computacionais.

Como a própolis é um produto natural com uma composição química extremamente complexa, há uma grande dificuldade de estudar suas propriedades biológicas e identificar quais componentes químicos são responsáveis por essas propriedades definidas. Como já foram relatados na literatura, produtos naturais são grandes fontes de inibidores de DNMTs, incluindo compostos fenólicos e flavonóides (ambos presentes nas amostras de própolis brasileira). Neste contexto, a utilização de abordagens computacionais pode ser útil na triagem de um universo muito grande de compostos oriundos da própolis, permitindo delinear experimentos mais precisos a fim de se identificar novos inibidores de DNMTs.

1.6. Estrutura e funcionamento das DNA metiltransferases (DNMTs): perspectivas para a terapia epigenética do câncer

As modificações epigenéticas do genoma abrangem mecanismos reversíveis e herdáveis de regulação da expressão gênica. Produtos de origem natural, como os compostos fenólicos, representam uma fonte importante para o desenvolvimento *de novo* medicamentos para o tratamento de pacientes com câncer, pois muitos possuem

ação inibidora de proteínas pertencentes à maquinaria epigenética, incluindo as enzimas responsáveis pela metilação do DNA e pelas modificações das histonas. Os inibidores das DNA metiltransferases e de desacetilases de histonas são as principais classes de drogas utilizadas na terapia epigenética do câncer, por levarem à reexpressão dos genes silenciados nas células tumorais (YOO; JONES, 2006).

As enzimas responsáveis pela metilação do DNA, denominadas DNA-metiltransferases, são conservadas em diferentes grupos de eucariotos. Em mamíferos, são conhecidas quatro proteínas pertencentes à família DNMT: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L, que juntas coordenam os processos de manutenção e de metilação *de novo* (JIA et al., 2007). As DNMT3A e 3B são responsáveis principalmente pela metilação *de novo*, ou seja, a metilação que será estabelecida nas células durante a gametogênese ou durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. A DNMT3L estimula a metilação *de novo* e é necessária para o estabelecimento do *imprinting* genômico, apesar de não apresentar atividade de metiltransferase (OKANO et al., 1999). A DNMT1 executa a metilação de manutenção, ou seja, copia o padrão estabelecido durante o desenvolvimento a cada ciclo de duplicação de DNA (Jurkowska et al., 2011).

Como a metilação do DNA é uma importante marca epigenética para o desenvolvimento de mamíferos, é necessário que o padrão correto de metilação seja estabelecido. Para essa função, existem as enzimas DNMT3A, 3B e 3L. Que funcionam em conjunto durante a gametogênese e nas etapas iniciais do desenvolvimento para o estabelecimento do “programa epigenético”. Essa metilação é chamada *de novo*, pois será um “novo” programa epigenético estabelecido (OKANO et al., 1999).

Após o estabelecimento do padrão de metilação *de novo*, é necessário que a próximas células originadas a partir da divisão celular também possuam o mesmo

padrão. Devido à natureza semiconservativa da duplicação do DNA e de não haver nucleotídeos livres metilados, a tendência natural é de que fitas de DNA recém-sintetizadas percam as marcas de metilação estabelecidas, portanto é necessário que a DNMT1, durante a replicação, mantenha o mesmo padrão de metilação, a partir da fita molde de DNA durante a replicação (ARMSTRONG, 2013; LI; BESTOR; JAENISCH, 1992).

A proteína DNMT1 é transcrita a partir do gene *DNMT1* (*cytosine-5-methyltransferase 1*) que está localizado na região 19p13.2 e possui 40 éxons, 39 íntrons e 61.790pb (ROSENBLOOM et al., 2015). A DNMT1 é uma enzima multimodular, ou seja, possui vários domínios que agem coordenadamente para sua atividade. É interessante ressaltar que essas enzimas compartilham o mesmo domínio MTase na região C-terminal cuja estrutura é bem conservada entre elas (figura 2). Dessa forma, as predições computacionais e os estudos funcionais realizados para uma enzima podem ser extrapolados para a família.

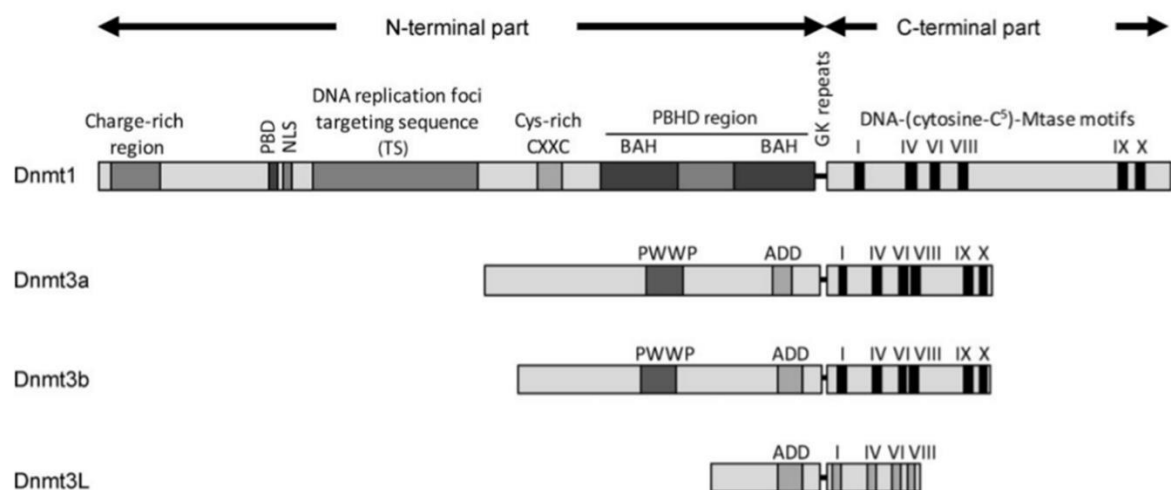


Figura 2. Estrutura das DNA metiltransferases. Comparação dos domínios funcionais de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. Fonte: Jurkowska et al., 2011.

Os principais domínios da DNMT1 estão descritos a seguir (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011):

DMAP1 (*DNA methyltransferase associated protein 1*) - é um domínio responsável pela interação entre DNMT1 e DMAP1, um repressor transcricional. DMAP1 também está associado com a estabilidade da proteína e com a interação entre a enzima e sequências de dinucleotídeos CpG (ROUNTREE; BACHMAN; BAYLIN, 2000).

RFTS (*Replication Foci Targeted Sequence*) - esse domínio apresenta diversas regiões. A primeira é a região *PCNA bind domain* (PBD), responsável pela interação com o *Proliferation Cell Nuclear Antigen* (PCNA) e auxilia no posicionamento da proteína na forquilha de duplicação. Nesse domínio também se encontra uma sequência de localização nuclear (NLS), que está associada com a importação da proteína ao núcleo. A região TS (*Targeting Sequence*) é a grande responsável para direcionar a proteína para a forquilha de replicação e também está associada com o processo de dimerização da proteína. No entanto, não está elucidada a funcionalidade do dímero de DNMT1 (ROUNTREE; BACHMAN; BAYLIN, 2000).

CXXC zinc finger - é um domínio contendo zinco, que está relacionado com a interação entre a enzima e sequências de DNA. Ela apresenta uma sequência conservada de 8 cisteínas organizadas em duas repetições CXXCXXC que se ligam a dois átomos de zinco e desempenham papel importante na atividade enzimática (IYER; ABHIMAN; ARAVIND, 2011).

BAH1 e BAH2 (*bromo-adjacent homology 1 and 2*) - são domínios homólogos ao domínio *Polybromodomain 1* da galinha; em muitas espécies, são domínios relacionados com o silenciamento gênico a nível transcricional. Entretanto, a função exata desses domínios em DNMT1 ainda é desconhecida (CALLEBAUT; COURVALIN; MORNON, 1999).

KG linker - uma sequência de lisinas e glicinas que liga a região N-terminal com a região C-terminal da proteína. Pode estar relacionada com o direcionamento da proteína à forquilha de replicação, devido a sua afinidade com Z-DNA (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

MTase – Domínio metilase que apresenta 6 motivos envolvidos na reação de metilação (KUMAR et al., 1994). É importante ressaltar que esse é o domínio de interesse para a pesquisa de inibidores de DNMT, já que ele é bem conservado entre todas as enzimas da família e é responsável pela reação de metilação em si.

As DNMTs possuem uma região C-terminal contendo o domínio MTase, que é bem conservado entre eucariotos e uma região N-terminal com domínios responsáveis pela interação da proteína com outras moléculas. Enquanto a região C-terminal das DNMT1 e DNMT3 compartilham os mesmos motivos e executam a mesma função, a porção N-terminal possuem domínios funcionais bem diferentes. DNMT3A e DNMT3B possuem os mesmos domínios funcionais: ADD (ATRX-DNMT3A-DNMT3L), PWWP e DNA-MTase. A DNMT3L não possui o domínio PWWP e 2 dos 6 motivos do domínio DNA-MTase, o que resulta na ausência de atividade catalítica. O domínio ADD é responsável pela interação da DNMT com outras proteínas como fatores de transcrição bem como modificadoras de histonas (OTANI et al., 2009) e o domínio PWWP é composto por motivos de prolina-triptofano que são importantes para a interação com diferentes modificações de histonas e direcionamento da enzima para a região pericentromérica da cromatina (QIU et al., 2002).

O primeiro modelo tridimensional de DNMT1 depositado no PDB (*Protein DataBase*, <http://www.wwpdb.org/>) foi descrito por Syeda e colaboradores (2011) (PDBID: 3EPZ) e corresponde ao domínio *Replication Foci Targeted Sequence* (RFTS). Em 2011, Song e colaboradores (2011) elucidaram a estrutura de DNMT1 de camundongo (*Mus musculus*) com os aminoácidos 650-1602 (PDBID: 3PT6) e no mesmo ano foi elucidada a estrutura de DNMT1 humana do resíduo 646 ao 1600 (PDBID: 3PTA). O modelo mais recente da DNMT1 humana compreende os resíduos 300-1600 (PDBID: 4WXX) (ZHANG et al., 2015c).

O primeiro modelo tri-dimensional da DNMT3 foi depositado no PDB por Qiu e colaboradores (2002) (PDBID: 1KHC) e representa somente o domínio PWWP de DNMT3B de camundongo (*Mus musculus*). Em 2007, foram elucidadas algumas estruturas importantes: DNMT3L humana (PDBID: 2PV0) (OOI et al., 2007), o complexo entre DNMT3L e a lisina 4 não metilada da histona 3 (H3) (PDBID: 2PVC) (OOI et al., 2007), o complexo formado pela DNMT3A e DNMT3L que interagem pela região C-terminal (PDBID: 2QRV) (JIA et al., 2007) (Jia et al., 2007). Em 2015, foi depositado o modelo do complexo entre DNMT3, DNMT3L e H3 (PDBID: 4U7T) (GUO et al., 2015) e recentemente foram identificadas as estruturas envolvidas no reconhecimento da modificação H3K36me3 (tri-metilação na lisina 36 da histona 3) pelo domínio PWWP das DNMTs 3A e 3B (PDBID: 5CIU e 5CIY) (RONDELET et al., 2016).

As DNMTs possuem um sítio de ligação ao DNA e um sítio de ligação à S-adenosil-metionina (SAM). SAM atua como um doador de radicais metil: após a reação, o carbono cinco da citosina no DNA é transformado em 5mC (5 metil citosina) e SAM se torna S-adenosil-homocisteína (SAH), conforme apresentado na figura 3. É importante destacar que SAH compete com SAM pelo sítio de ligação do cofator. Quando SAH se liga a esse sítio a atividade enzimática é reduzida. Assim, os níveis de concentração de SAM e SAH constituem um mecanismo de regulação intrínseco da atividade enzimática (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

Durante o processo de metilação do DNA, as DNMTs promovem a torção dos anéis de citosina da dupla hélice para formação de um complexo intermediário, com a participação do cofator SAM (ERLANSON; CHEN; VERDINE, 1993; KLIMASAUŠKAS et al., 1994; YOO; JONES, 2006). Nesse complexo, a enzima ataca o carbono 6 da citosina se ligando com uma cisteína do motivo PCQ (MTase),

formando uma ligação covalente entre a enzima e o substrato. Essa ligação causa um aumento da densidade de cargas negativas no carbono 5, atacando o radical metil da molécula doadora. Outros motivos do domínio MTase tem a função de manter o complexo formado estável e facilitam a transferência do metil de SAM para a citosina. A adição do metil na citosina é seguindo de uma protonação do carbono 5, o que causa a quebra da ligação da enzima com o substrato. Após a reação, SAM se torna SAH devido a perda do radical metil. Quando SAH se liga ao sitio alostérico da proteína ao invés de SAM, a reação não ocorre devido à ausência do radical metil (ERLANSON; CHEN; VERDINE, 1993; JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

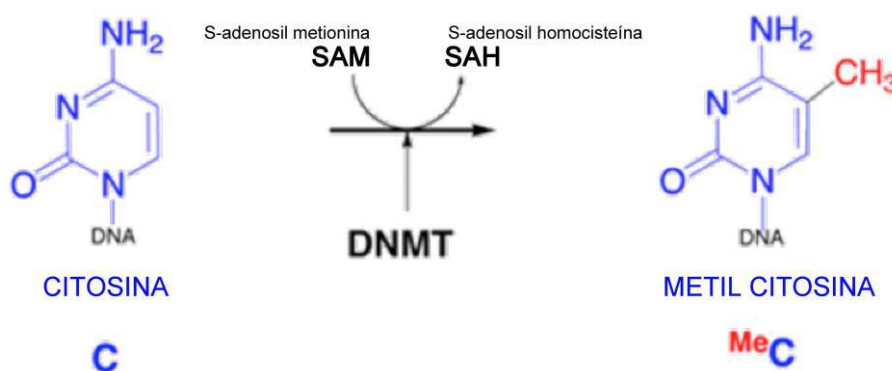


Figura 3. Diagrama representando a reação de metilação do DNA catalisada por enzimas da família DNMT, que utilizam a S-adenosil-metionina (SAM) como doadora do grupo metil e liberam a S-adenosil-homocisteína, resultando na metilação no carbono 5 da citosina. Fonte: Moison et al., 2014.

Concluindo, com base em todas essas evidências dos efeitos antitumorais mediados pela própolis e nos avanços na caracterização das DNMTs, o presente estudo propõe a seguinte hipótese: a própolis ou algum de seus componentes podem possuir efeito hipometilante em células derivadas de câncer de mama triplo negativos. Do ponto de vista de pesquisa básica, espera-se demonstrar os potenciais mecanismos epigenéticos mediados pela exposição à própolis e seus principais componentes sobre as

células tumorais e, do ponto de vista aplicado, contribuir para a identificação de novos compostos para a terapia epigenética.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a hipótese de que os efeitos antitumorais demonstrados pela própolis e seus componentes sobre linhagens celulares derivados de cânceres mamários humanos também são mediados por mecanismos epigenéticos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar *in silico* as possíveis interações entre os principais componentes químicos da própolis brasileira com as enzimas da família das DNA metiltransferases usando a estratégia de *docking* molecular e o sítio de ligação de SAM/SAH ao domínio MTase da enzima DNMT1 como modelo de interação;
- Avaliar o efeito do tratamento com o extrato etanólico de própolis e alguns de seus componentes isoladamente (ácido cafeico, hidrocinâmico e p-cumárico) nas taxas de viabilidade celular em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários humanos triplo negativos (BT20, BT549, MDA-MB-231 e MDA-MB-436);
- Investigar a capacidade de inibição *in vitro* da metilase *M.SssI* dos compostos EGCG, ácido cafeico, hidrocinâmico e p-cumárico;
- Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* dos compostos EGCG, ácido cafeico, hidrocinâmico e p-cumárico no padrão de metilação da ilha CpG associada à região promotora do gene *RASSF1A* nas quatro linhagens de carcinomas mamários

Materiais e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização química da própolis e ácidos fenólicos

A amostra de própolis utilizada neste estudo e os compostos fenólicos foram fornecidos pelo Prof. Adj. José Maurício Sforcin, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Essa amostra de própolis bruta foi coletada em 1997 no apiário da Fazenda Experimental do Lageado, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, câmpus de Botucatu – SP, sendo armazenada sob temperatura de -20°C.

A caracterização química da própolis foi realizada pela análise de GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) que identificou os principais grupos químicos da sua composição: flavonoides (kaempferide, 5,6,7-trihidroxi-3,4' dimetoxiflavona, aromadendrine-4'-metil éter); óleos essenciais (espatulenol, (2Z,6E)-farnesol, benzil benzoato e acetofenonas); ácido cumárico e benzopiranos (E e Z 2,2-dimetil-6-carboxyetenil-8-prenil-2H-benzopiranos); ácidos fenólicos (ácido dihirocinâmico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido 3,5-diprenil-p-cumárico , 2,2-dimetil-6-carboxi-etenil-8-prenil-2H-1-benzo-pirano) e terpenos. Recentemente, essa mesma amostra foi reanalisada pela mesma técnica e apresentou os seguintes componentes: ácido benzóico, ácido dihidrocinâmico, ácido cumárico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, flavonoides, artemisina C, trihidroximetoxi flavona, tetrahidroxí flavona, e triterpenos. A comparação entre as duas análises não revelou diferenças qualitativas na sua composição (CONTI; BANKOVA; SFORCIN, 2015). A lista de compostos químicos identificados nesta amostra foi utilizada como referência para as análises subsequentes incluídas no presente estudo.

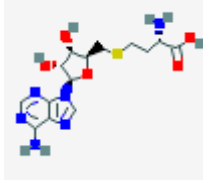
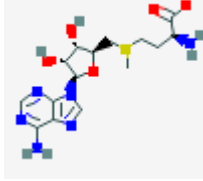
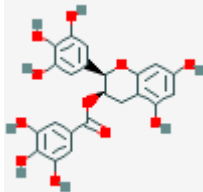
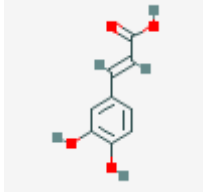
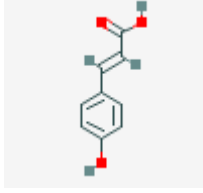
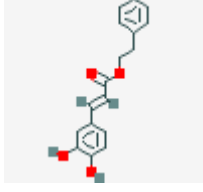
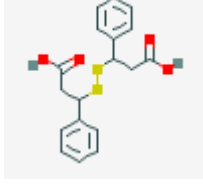
Para os experimentos, o extrato etanólico de própolis (EEP) foi preparado a 30% em etanol 70%, na ausência de luz, em temperatura ambiente e sob agitação moderada. Após uma semana, os extratos foram filtrados e seu peso seco medido (110mg/ml). Esta medida foi utilizada para o cálculo das concentrações avaliadas nos experimentos *in vitro* (SFORCIN et al., 2000).

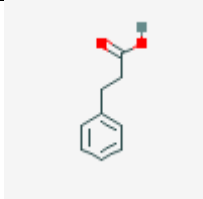
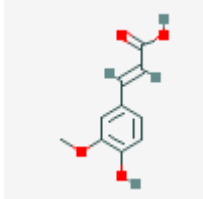
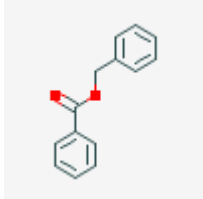
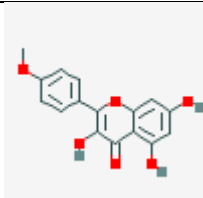
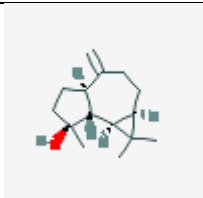
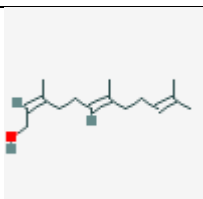
Os compostos fenólicos ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido hidrocinâmico foram cedidos pelo Prof. Titular Jairo Kenupp Bastos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, para os estudos do grupo coordenado pelo Prof. Adj. José Maurício Sforcin.

3.2. Seleção de ligantes para a predição in silico de novos inibidores de DNMTs

A partir da caracterização química da amostra de própolis utilizada no presente estudo (descrita no item 3.1), foram selecionados os compostos que estavam descritos no banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, acesso em fevereiro de 2016), com estruturas tridimensionais conhecidas para realizar o cálculo de *docking* molecular. A partir dessa investigação, foram escolhidos os seguintes componentes: ácido cafeico, ácido p-cumárico, fenetil ester do ácido cafeico (CAPE), farnesol, ácido hidrocinâmico, ácido dihidrocinâmico, kaempferide, ácido ferúlico e espatulenol. Também foi realizado o *docking* de SAH e SAM, pois é conhecido que SAH é o inibidor intrínico da atividade de DNMTs e que SAM se liga no mesmo sítio que SAH (tabela 2). Logo, o complexo formado entre SAH e DNMT1 foi utilizado como referência na análise das simulações com os compostos derivados da própolis. O polifenol EGCG (*epigallocatechin-3-gallate*) também foi incluído nesta análise por sua atividade inibidora da metilação do DNA, já descrita em literatura (KHAN et al., 2015a).

Tabela 2. Relação de compostos químicos selecionados para a análise de *docking* molecular, categorizados pela classe química, suas respectivas estruturas e CID do PubChem*.

CID	Nome do componente	Estrutura
Ligantes conhecidos da DNMT		
439155	SAH (S-adenosil-homocisteína)	
34755	SAM (S-adenosil-metionina)	
Ácidos fenólicos		
65064	EGCG Epigallocatequina-3-galato	
689043	Ácido cafeico	
637542	Ácido p-cumárico	
5281787	CAPE (<i>caffeic acid phenethyl ester</i>)	
64913	Ácido dihidrocinâmico	

107	Ácido hidrocinâmico	
445858	Ácido ferúlico	
2345	Benzil benzoato	
Flavonóides		
5281666	Kaempferide	
Óleos essenciais		
92231	<i>Espatulanol</i>	
Terpenos		
1549108	2-cis,6-trans-farnesol	

The PubChem Project (disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>; CID – *PubChem compound identification*. Quadrados pequenos: cinza escuro = H, azul = N, vermelho = O e amarelo = S

3.3. Análise in silico da potencial interação entre componentes da própolis e o domínio MTase da DNMT1

No presente estudo, foram selecionados três diferentes programas de *docking* molecular descritos na Tabela 3: Autodock, SwissDock e DOCK. As etapas das predições por *docking* molecular incluem: seleção de ligantes, preparação das estruturas tridimensionais, clusterização e visualização dos resultados. Tais etapas estão esquematizadas na Figura 4.

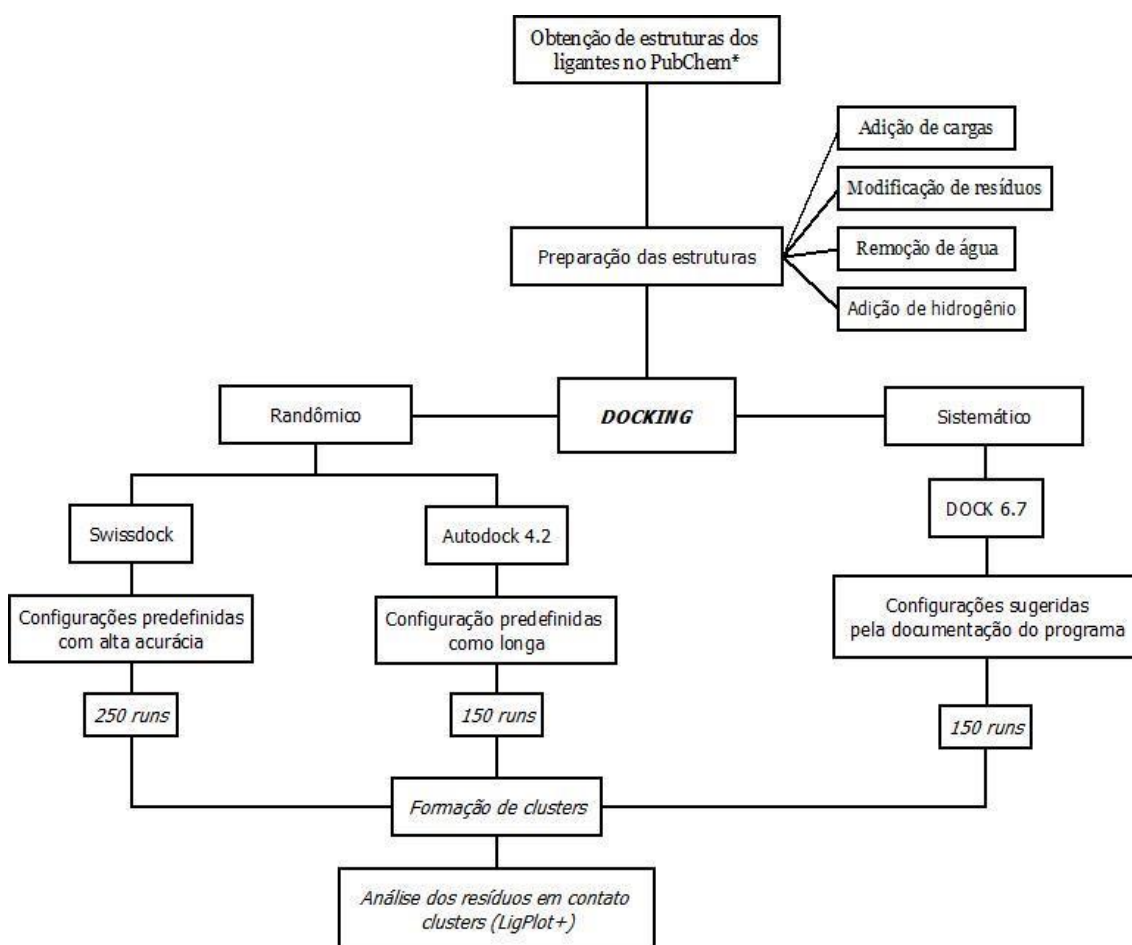


Figura 4. Principais etapas da estratégia de *docking* utilizada no presente estudo (* <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabela 3. Programas de *docking* molecular utilizados no presente estudo e suas principais características.

Nome do programa	Tipo de algoritmo	Parâmetros analisados/ Número de corridas	Referências
SwissDock^a	Randômico	<i>Fullfitness</i> / 250	GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011
Autodock 4.2^b	Randômico	<i>Free Binding Energy</i> / 150	MORRIS; HUEY, 2009
DOCK 6.7^c	Sistemático	<i>Grid Score</i> / 150	ALLEN et al., 2015

Disponível em a) <http://www.swissdock.ch> b) <http://autodock.scripps.edu> e c) <http://dock.compbio.ucsf.edu>.

Os programas Autodock e SwissDock utilizam abordagens randômicas, porém com algoritmos diferentes, enquanto o DOCK utiliza uma abordagem sistemática. Todos esses programas utilizam funções que predizem possíveis interações químicas a partir de grandezas físicas e, portanto, cada programa utiliza algoritmos próprios e calculam um *score* próprio, que representa a possível interação do ligante com o receptor. O programa SwissDock, calcula como *score* dois diferentes parâmetros *Simplefitness* e *Fullfitness*. Primeiramente, o programa gera 250 conformações do ligante e calcula o valor de *Simplefitness* para cada conformação e utiliza a melhor para ser o centro do *cluster*; uma vez que um *cluster* é definido, é calculado o *Fullfitness*, considerando-se todo o *cluster*. Este último, leva em consideração diversas forças participantes na interação entre ligante e receptor (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011). O programa DOCK calcula o *GridScore* que leva em consideração termos em um campo de força moleculares não relacionadas às ligações químicas, como por exemplo, as forças de Van Der Waals (ALLEN et al., 2015).

3.3.1. Preparação de estruturas tridimensionais dos ligantes e da molécula receptora

O modelo cristalográfico da DNMT1 humana (figura 5A) (PDBID: 4WXX) foi editado no *software* Chimera 1.10.2 (PETTERSEN et al., 2004) para o isolamento do domínio MTase (resíduos 1135-1605) (figura 5B). O modelo utilizado foi obtido a partir da co-cristalização de SAH e DNMT1 humana, onde SAH está em complexo com o seu respectivo sítio de ligação no domínio MTase (ZHANG et al., 2015b). O modelo do complexo foi editado para a remoção de moléculas de água não estruturais, adição de átomos de hidrogênio, modificação de resíduos incompletos e adição de cargas de cada átomo. Essas moléculas de água não são necessárias para atividade da enzima e, portanto, não devem ser consideradas na análise de *docking*, sendo necessário removê-las. Alguns resíduos de aminoácidos podem não possuir todos os átomos resolvidos adequadamente e precisam ser modificados para glicinas, segundo recomendações dos programas utilizados. A maioria dos modelos omitem os átomos de hidrogênio, por isso é necessário adicioná-los manualmente e, por fim, é necessário o cálculo das cargas de cada átomo caso o modelo não apresente essa informação. Tais modificações foram conduzidas utilizando o DockPrep pelo Chimera 1.10.2 (DOCK) e Auto Dock Tools (AutoDock).

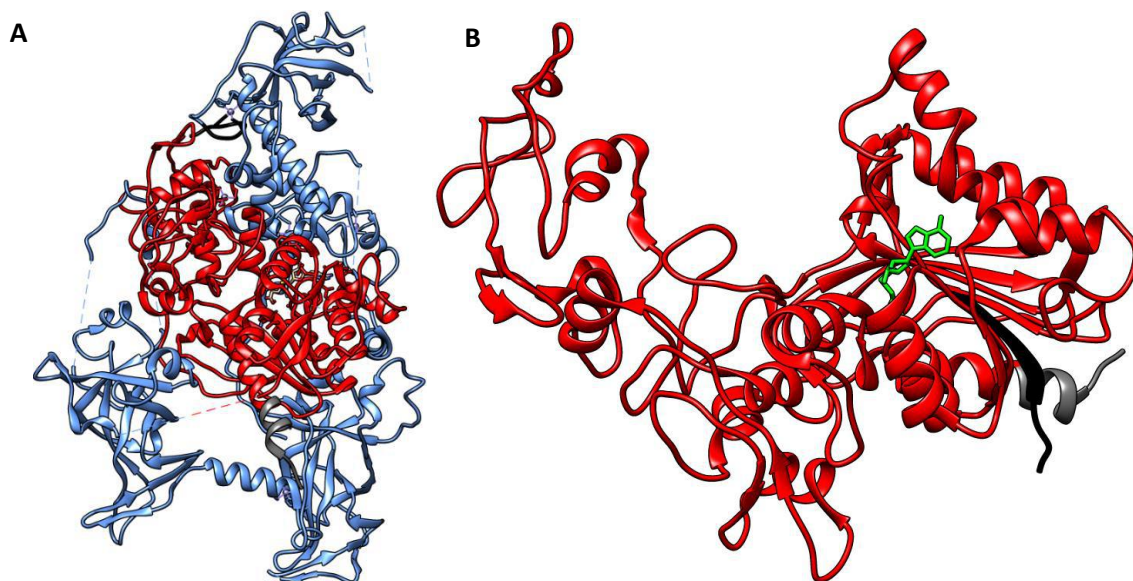


Figura 5. Modelo cristalográfico da DNMT1 humana. **A)** Representação em diagrama de fitas da estrutura cristalográfica completa da DNMT1 humana (PDBID: 4WXX) utilizada como modelo para o *docking* molecular e seu respectivo domínio MTase em vermelho. **B)** Domínio MTase isolado a partir da estrutura completa de DNMT1, em complexo com SAH (verde), o inibidor intrínscio de DNMT1. Em ambas as imagens, a porção N-terminal está destacada em preto e a porção C-terminal destacada em cinza. A edição do modelo original foi realizada no *software* Chimera versão 10.1.2.

3.3.2. Configurações usadas para o cálculo de *docking* molecular

Para o programa SwissDock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011) foram utilizadas as configurações consideradas de maior acurácia, predefinidas pelo próprio servidor. Nas configurações avançadas do programa, a área de interesse foi delimitada a partir da coordenadas XYZ ($X = -42.250$, $Y = 43.855$, $Z = 12.971$), que representam o centro do sítio de ligação de SAH no domínio MTase da proteína receptora. Também foi definida a área determinada pelo comprimento de 30Å para cada eixo, a partir desse ponto.

O segundo programa utilizado foi o *AutoDock* (MORRIS; HUEY, 2009). Para a definição da área de interesse para a avaliação das prováveis interações ligante-receptor, inicialmente, utilizou-se o *software* AutoGrid (MORRIS; HUEY, 2009), que acompanha o *AutoDock*. A partir de coordenadas conhecidas ($X = -45.550$, $Y = 61.520$, $Z = 6.091$), definiu-se o comprimento de 40Å para cada um dos eixos. Utilizando o *AutoDock Tools* (ADT), programa de interface gráfica do *AutoDock*, foi verificado que a área definida engloba o sítio de ligação de SAH (Figura 6) ao domínio MTase. A análise foi conduzida segundo parâmetros

predefinidos como longa, que considera o maior número de conformações baseado no algoritmo genético (*Lamarckian Genetic Algorithm*).

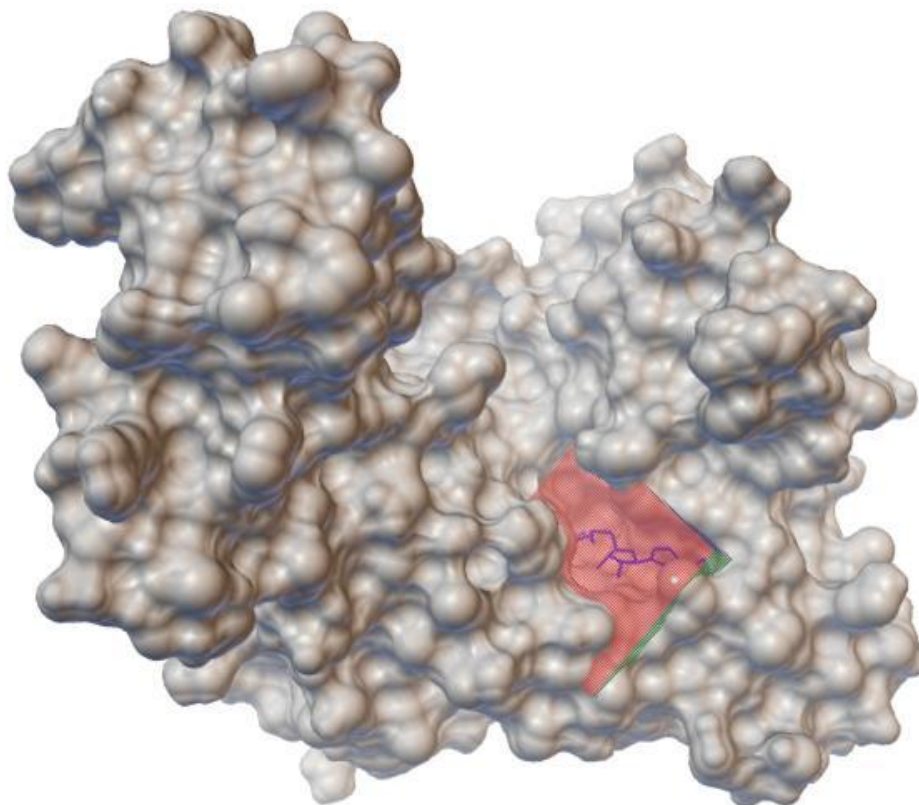


Figura 6. Modelo representando a superfície de contato do domínio MTase da DNMT1 humana usado como receptor do *docking* molecular. A molécula de SAH aparece como *sticks* azuis. A área vermelha representa uma face da delimitação da área de interesse.

O terceiro programa utilizado foi o DOCK (ALLEN et al., 2015). A área de interesse foi determinada de acordo com as recomendações descritas na documentação do próprio programa. Inicialmente, foi gerado um arquivo com a superfície molecular do receptor usando o Chimera 1.10.2. Em seguida, foi utilizado o *software sphegen* (ALLEN et al., 2015) para gerar esferas que tangenciam o ponto de contato da superfície de Van Der Waals e foi calculado o vetor normal de cada ponto na superfície (cada esfera representa uma molécula de água) (EWING; KUNTZ, 1997). Após gerar todas as esferas, foi selecionado o *cluster* de esferas que estivessem num raio de 10Å a partir das coordenadas dos átomos de SAH, utilizando o script

sphere_selector (ALLEN et al., 2015) (Figura 6). Utilizando as coordenadas do *cluster* de esferas foi gerado o *grid* para o cálculo de *docking*. O *docking* molecular foi realizado utilizando-se as configurações recomendadas pela documentação do *software* e configurado para 150 corridas de cada ligante.

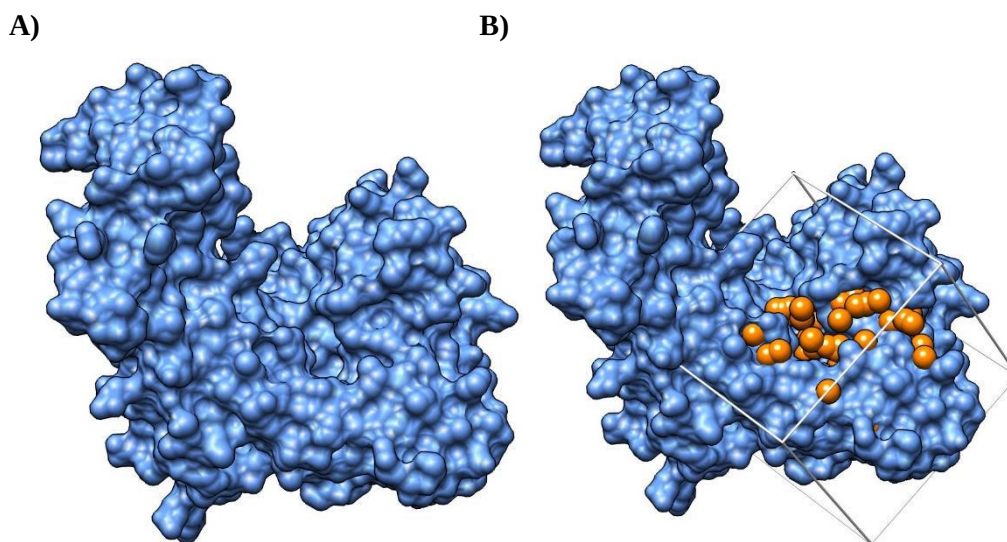


Figura 7. O domínio MTase com destaque para o sítio de interação ligante-receptor. A) Modelo representando a superfície molecular do domínio MTase gerado pelo *software* Chimera versão 10.1.2. **B)** Representação do *cluster* de esferas calculado e selecionado juntamente com o *grid box* determinando a área de interesse a partir da posição do *cluster* na molécula receptora.

3.3.3. Clusterização dos resultados obtidos.

Após a obtenção dos resultados pelo cálculo de *docking* foi feita a clusterização pelo programa GROMACS (SZILÁRD et al., 2015) pelo método GROMOS (DAURA et al., 1999). Neste processo, foi estabelecido um corte de *Root Mean Square Deviation* (RMSD) de 1Å e formados *clusters* para cada solução do *docking* cuja distância fosse igual ou menor que o corte. Cada *cluster* é representado por uma estrutura central, que constitui o resultado de *docking* que melhor representa o *cluster* inteiro.

3.3.4. Visualização e análise dos resultados de *docking* molecular

Os resultados foram visualizados utilizando a ferramenta ViewDock disponível no próprio Chimera 1.10.2. Os *clusters* foram isolados em arquivos separados e as melhores posições foram recuperadas para a visualização de contatos com o uso do programa LigPlot+ (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Foram considerados o *score* fornecido por cada programa (Tabela 2), bem como a quantidade de estruturas dentro do *cluster* e contatos identificados entre a solução de *docking* e o receptor. Esses parâmetros foram comparados com os dados obtidos pela co-cristalização de SAH-DNMT1 (ZHANG et al., 2015b) e com os resultados de *docking* molecular de SAH ao domínio MTase.

3.4. Ensaio *in vitro* de inibição da metilase *M.SssI*

Esse ensaio tem como objetivo avaliar a atividade de metilação *in vitro* da enzima *CpG methyltransferase (M.SssI)* (New England Biolabs). Esta metilase foi isolada a partir de *E. coli* recombinante modificada com o gene da DNA metiltransferase de *Spiroplasma sp.*, cepa MQ1 (MATSUO et al., 1994) e é amplamente utilizada para o estudo da metilação de citosinas, porque a mesma mimetiza o padrão de modificações observadas em genomas de eucariotos superiores e atua sobre substratos de DNA não metilados ou hemi-metilados com igual eficiência (RENBAUM et al., 1990).

Para este ensaio foi gerado um fragmento de 658pb (nucleotídeos das posições chrX: 154,030,181-154,030,838, localizado no éxon 4 do gene *MECP2, methyl-CpG binding protein 2*) (dados obtidos em *UCSC Genome Browser on Human* Dec. 2013 (GRCh38/hg38) *Assembly*, disponível em <https://genome.ucsc.edu/>). A Tabela 4, apresenta o conjunto de *primers* utilizados para a obtenção do fragmento, bem como o número de dinucleotídeos CpGs passíveis de metilação pela ação da enzima *M.SssI*, número de sítios de reconhecimento para a endonuclease de restrição *BstUI* (5'CGCG3'), sensível à metilação das citosinas presentes nestes dinucleotídeos CpGs.

Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do fragmento de DNA utilizado como substrato da reação da metilase *M.SssI*, número de dinucleotídeos CpGs e de sítios de reconhecimento da endonuclease de restrição *BstUI*.

Gene	Oligonucleotídeos Iniciadores (5' - 3')	Tamanho (pb)	Número de CpGs	Sítio <i>BstUI</i>	Fragmentos após a clivagem (pb)
MECP2	F- AAAACATCCCCAATGCTCCA R- GAAGAGCGGGAAAGGACTGAA	658	26	1 (posição 332)	332 e 326
F (forward), R (reverse)					

O fragmento de 658pb foi obtido pela amplificação do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR), realizada em um volume final igual a 25µL, contendo 75mM de Tris-HCl , 20mM de (NH₄)₂SO₄, 0,01% de Tween 20, 1,5mM de MgCl₂, 500mM de cada dNTP, 50nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2 unidades de Taq DNA polimerase (*Fermentas*) e 200ng de DNA genômico humano como molde (linhagem ZR-75-1). As condições de amplificação incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C, *annealing* a 59°C e extensão a 72°C, durante 1 minuto cada e uma etapa final a 72°C durante 7 minutos. A origem e especificidade do produto foram avaliadas em gel de poliacrilamida a 6% e coloração por nitrato de prata. Após a precipitação com etanol, os produtos foram centrifugados, secos ao ar e ressuspensos em água ultra-pura estéril. Em seguida, a concentração foi determinada no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific*).

Considerando-se que a interpretação do ensaio de metilação do DNA *in vitro* baseia-se na presença do sítio de reconhecimento da enzima *BstUI* e que muitos sítios de restrição são polimórficos, o produto da PCR utilizado neste ensaio foi previamente sequenciado para a confirmação da presença do sítio de restrição. Inicialmente, a presença de polimorfismos do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) contidos nesta região do genoma foi pesquisada em bancos de dados específicos, principalmente os que se sobrepõem com o sítio CGCG

reconhecido pela enzima *BstUI*. Segundo o banco de dados dbSNP (*Single Nucleotide Polymorphism database*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, allSNPs 141), quatro SNPs coincidem com este sítio de restrição: um na primeira base (rs146632223, C>T), dois na segunda base (rs782805738, A>G e rs61753973, A/G/T) e um na quarta base (rs782798565, A>G). Diante desses dados, tornou-se imprescindível confirmar a presença do sítio *BstUI* no fragmento de DNA por sequenciamento direto do produto da PCR (Figura 8). Para tanto, após a purificação do produto da PCR pela ExoSap IT (*Affymetrix*), o mesmo foi utilizado em reações de sequenciamento direto pelo método de Sanger no sequenciador automático de DNA 3500 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*), do Instituto de Biotecnologia da UNESP, Câmpus de Botucatu, segundo as recomendações do fabricante. Os eletroferogramas obtidos foram analisados usando o CLC *Main Workbench software* 6.0 (CLC Bio, Aarhus, Denmark) e alinhados na sequência de referência do genoma humano por meio da ferramenta *online Human BLAT Search* (assembly GRCh38/hg38, <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>).

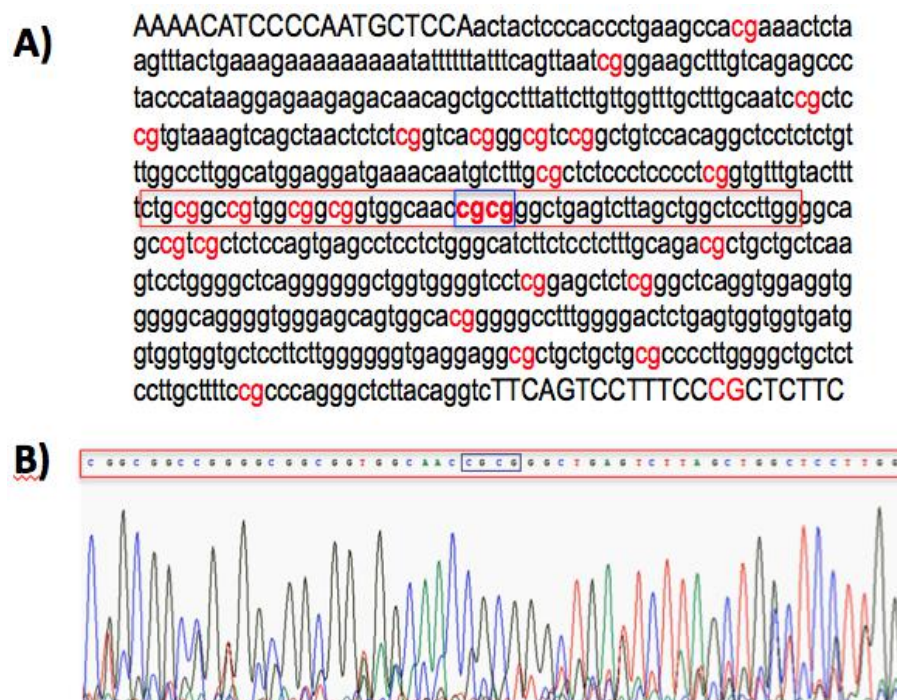


Figura 8. Detalhe da sequência de 658pb do gene *MECP2* utilizada como substrato na reação de metilação *in vitro* pela ação da metilase *M.SssI* obtida a partir do DNA genômico da linhagem derivada de carcinoma mamário humano ZR-75-1. **A)** Os 26 dinucleotídeos CpG alvo da ação da metilase encontram-se em vermelho e o sítio reconhecido pela *BstUI* está destacado pelo retângulo azul. **B)** Eletroferograma confirmando a presença do sítio de restrição CGCG. O retângulo vermelho corresponde à região comum em A e B.

A reação de metilação *in vitro* seguiu o protocolo descrito por Brueckner et al. (2005), com modificações. Foram utilizados 400ng do produto da PCR purificado, 4 unidades da metilase *Ms.SssI* (*New England Biolabs*) em tampão contendo 50mM de NaCl, 10mM de Tris-HCl, 10mM de MgCl₂, 1 mM de dietilteitrol e 160μM de S-adenosil metionina (diluída em solução de etanol a 10%) como doadora de radicais metil (CH₃). Esta reação ocorreu a 37°C *overnight*, na presença ou ausência das drogas com potencial ação inibidora da atividade da enzima *M.SssI*. Foram avaliadas diferentes concentrações dos potenciais inibidores (concentração final igual a 25, 50, 100, 200 e 400μM). Como controles foram incluídos: um microtubo de reação sem a droga a ser testada (correspondente ao substrato 100% metilado pela enzima), um microtubo sem a metilase *M.SssI* (correspondente ao substrato não metilado) e um controle positivo para a inibição da *M. SssI*. O composto ECGC (*Epigallocatechin-3-gallate*,

Sigma) foi selecionado como controle positivo, pois é um polifenol obtido do chá verde e com atividade inibidora da DNA metiltransferase reconhecida. Afim de determinar se os diluentes das drogas testadas [etanol e dimetilsulfóxido (DMSO)] interferem na ação da metilase, foi realizada uma série de reações de metilação e digestão pela *BstUI*, substituindo-se as concentrações da drogas pelas quantidades correspondentes de etanol e DMSO.

Após a reação de metilação *in vitro*, o fragmento de DNA foi precipitado com isopropanol (*Sigma*), centrifugado a 14.000 rpm durante 20 minutos, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água ultrapura estéril. Em seguida, os fragmentos de DNA foram submetidos à clivagem com 30 unidades da enzima de restrição *BstUI*, em tampão contendo 50 mM de acetato de potássio, 20 mM de Tris-HCl, 10 mM de acetato de magnésio e 1 mM de dietilteitrol a 60 °C *overnight*. Após a digestão, os produtos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6 % e coloração por nitrato de prata. A visualização de um produto não digerido indica ausência de inibição da enzima *M.SssI* e o surgimento de bandas correspondentes à clivagem nas posições dos sítios de reconhecimento da endonuclease de restrição corresponde à ausência de metilação nestes sítios e, portanto, inibição da atividade da *M.SssI* pelo composto testado.

3.5. Viabilidade celular após o tratamento com própolis ou com seus componentes isolados

3.5.1. Linhagens celulares

Para o presente estudo, foram selecionadas quatro linhagens celulares: BT-20, BT-549, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 que são classificadas como derivadas de carcinomas mamários humanos triplo-negativos. Estas linhagens compõem o painel de linhagens disponíveis no Laboratório de Epigenética, do Departamento de Genética, IBB – UNESP e foi estabelecido previamente pela colaboração com a Dra Luciane Regina Cavalli, *Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University Medical Center, Washington* – EUA. Antes dos experimentos, todas as linhas celulares foram genotipadas com o Cell ID TM System (Promega)

para autenticação genômica pelo *Tissue Culture Shared Resource* (TCSR) da *Georgetown University*.

3.5.2. Descongelamento e manutenção *in vitro* das linhagens celulares

Alíquotas de aproximadamente 1×10^6 células, mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas rapidamente em banho a 37 °C e imediatamente transferidas para frascos plásticos de 25 cm² contendo 5 mL de meio de cultura completo (meio DMEM (Gibco BRL) suplementado com glicose, L-glutamina e piruvato de sódio, 10 % de soro bovino fetal (LGC) e 1 % de solução de antibióticos penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL (LGC)). As linhagens foram mantidas a 37°C, em atmosfera contendo 95 % de unidade e 5 % de CO₂. Após um período de tempo variável de crescimento *in vitro*, as células foram removidas dos frascos com o uso de solução de tripsina/EDTA (0,25 % de tripsina suína 1:250 e 0,2 g/L de EDTA), ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura DMEM e contadas no equipamento *Countess™ Automated Cell Counter* (Invitrogen). A contagem (número de células/mL) e a estimativa da viabilidade celular foi determinada pela exclusão do corante azul de trypan: uma alíquota da suspensão celular foi misturada em corante azul de trypan 0,4 % na proporção de 1:1; em seguida, 10 µL da mistura foram carregados nas lâminas específicas para a leitura no contador, segundo as recomendações do fabricante.

3.5.3. Avaliação do efeito do tratamento *in vitro* com própolis e seus derivados pelo teste de viabilidade celular pelo MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Posteriormente, um total de 2000 células/poço foram semeadas em placas de cultura de 96 poços em meio completo em um volume final de 100 µL. Após 24 horas para a aderência das células, as mesmas foram expostas continuamente a diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP) ou de seus componentes selecionados (ácidos caféico, p-cumárico e

hidrocinâmico) e incubadas à 37 °C, 5 % de CO₂, por um período de tempo variável (24, 48, 72 e 96 horas). Foram testadas diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis (EEP): 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL e para os compostos: 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50µM e 100µM onde cada tratamento foi realizado em triplicada. Para efeitos de comparação, também foi realizado o tratamento com EGCG, nas mesmas concentrações e tempos testados para os demais compostos derivados da própolis. Também foram incluídos controles não tratados na presença do diluente (etanol ou DMSO) correspondente à quantidade presente na maior concentração dos testes com a presença dos compostos analisados.

Decorrido cada tempo de exposição, o meio de cultura foi removido e foram adicionados meio de cultura contendo 5mg/mL de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) *overnight*. Ao final do período, a mistura da reação foi cuidadosamente aspirada e então acrescentados em cada poço 100 µL de DMSO. Após 4 horas, foi realizada a leitura em espectrofotômetro para microplacas ELX800 (BioTeK®) a um comprimento de onda de 540 nm.

A média das triplicatas dos poços controles dos valores da densidade óptica (absorbância a 540nm), foi considerada como sendo 100% de viabilidade e a média de cada concentração foi comparada com a média do controle do mesmo período de tempo, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs 540 das células tratadas} - \text{Abs 540 do branco}}{\text{Abs 540 dos controles} - \text{Abs 540 do branco}} \times 100$$

3.6. Análise do padrão de metilação de genes específicos pelo ensaio de Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR) após exposição ao EEP, EGCG e ácido p-cumárico

3.6.1. Tratamento *in vitro* das linhagens celulares

Uma alíquota de 1×10^5 células das linhagens MDA-MB-436, MDA-MB-231 e BT-549 foram semeadas em meio DMEM (Gibco BRL) suplementado com glicose, L-glutamina e piruvato de sódio, 10% de soro bovino fetal (LGC) e 1% de solução de antibióticos penicilina 10.000U/ml e estreptomicina 10.000µg/mL (LGC). Após 48 horas as células foram expostas a uma concentração de 10µg/mL de EEP, 10µM de EGCG ou 10µM de ácido p-cumárico, durante 96 horas. O meio de cultura completo e suplementado com as drogas foi renovado a cada 24 horas. Ao término da exposição, as células foram mantidas durante 48 horas em meio sem as drogas e removidas dos frascos com o uso de solução de tripsina/EDTA (0,25% de tripsina suína 1:250 e 0,2g/L de EDTA), suspendidas em 10 mL de meio de cultura DMEM. A suspensão foi centrifugada a 1.200 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi congelado a -20°C. Cada tratamento foi realizado em duplicata.

3.6.2 Extração de DNA

O *pellet* celular foi descongelado à temperatura ambiente e submetido à digestão enzimática adicionando-se proteinase K na concentração final de 100 µg/mL, tampão de extração (100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de EDTA e 500 mM de NaCl) e 50 µL de SDS 20 % num volume final de 500 µL. Após homogeneização, o tubo foi incubado a 37 °C *overnight*. Em seguida, foi realizada a etapa de purificação com solventes orgânicos pela adição de 1 mL de solução composta por fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado durante 5 minutos por inversão e centrifugado durante 10 minutos à 14.000 rpm. A fase transparente formada na porção superior do tubo foi transferida para outro microtubo e foi adicionado 1 mL de clorofórmio, homogeneizado durante 5 minutos por inversão e centrifugado novamente por 10 minutos à 14.000rpm.

A fase formada na porção superior foi transferida novamente para outro microtubo e foi

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Predição computacional de novos inibidores de DNMTs a partir de componentes da própolis

O modelo cristalográfico estudado por Zhang e colaboradores (2015) representa o complexo formado entre a proteína DNMT1 humana com uma molécula de SAH (PDBID: 4WXX). Logo, este modelo descreve as posições atômicas referentes à interação SAH-DNMT1, pela formação de 7 ligações de hidrogênio com seis resíduos de aminoácidos (ME1169, D1190, C1191, S1146, G1150 e L1151) e 12 interações hidrofóbicas (L1247, F1145, D1189, G1147, W1170, P1225, D1168, G1223, N1578, V1580, G1149, A1579). Portanto, este modelo foi utilizado como referência para as comparações entre os dados obtidos pela análise de *docking* molecular da própria molécula de SAH ao domínio *MTase*, bem como para se avaliar se as predições de *docking* dos compostos químicos selecionados sugerem que os mesmos podem interagir de forma semelhante a SAH-DNMT1 ou de forma diferente.

As moléculas de SAH e EGCG foram utilizadas como controles dos ensaios de *docking*. Para cada programa utilizado, foi possível observar para SAH variações nas distribuições do tamanho de *clusters* em relação ao *score* da solução que representa um *cluster* inteiro. Dentre eles, foi observado que os programas Dock e Swissdock resultaram em uma distribuição das estruturas em que é possível observar um *cluster* com maior frequência em relação aos demais, ao contrário do resultado obtido no programa Autodock, em que há frequências semelhantes em diferentes *clusters* (Figura 9).

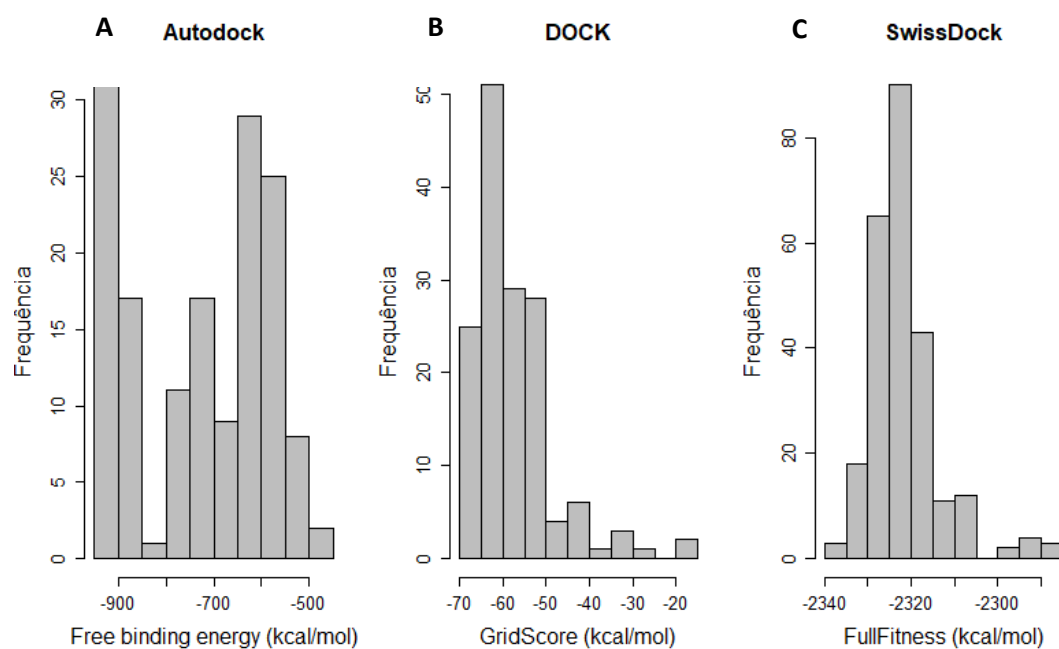


Figura 9. Distribuição da composição dos diferentes *clusters* após a análise de *docking* de SAH, em relação ao *score* obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* estão apresentados em Kcal/mol.

O composto químico EGCG apresentou uma distribuição semelhante a SAH, possuindo diversos *clusters* que se aproximam de um *score* mais negativo nos programas Autodock e Swissdock (figura 10 A e C), enquanto os resultados do DOCK apresentaram diversos *clusters* com diferentes *scores* (Figura 10 B).

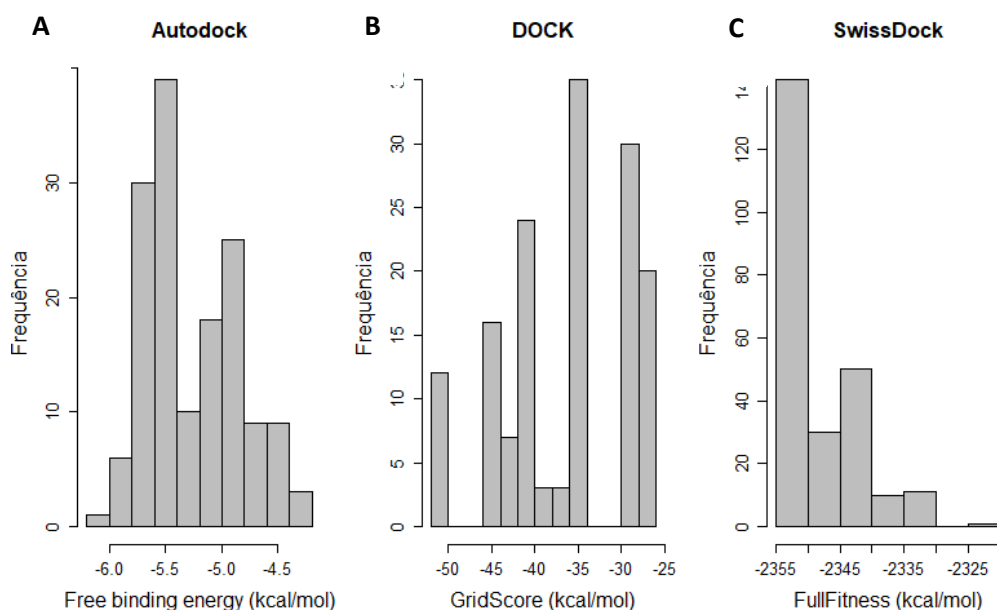


Figura 10. Distribuição da composição dos diferentes *clusters* dos resultados de *docking* de EGCG em relação ao *score* obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* são apresentados em Kcal/mol.

Após a observação da distribuição dos *clusters*, foram levados em consideração os parâmetros de energia de ligação (dado pelo *score* específico de cada programa) e o tamanho de cada *cluster*, junto às possíveis interações estabelecidas entre as moléculas. Os resultados de cada ligante testado encontram-se descritos na tabela 6.

Em geral, os *scores* obtidos após o *docking* de SAH foram os mais negativos em todos os programas utilizados, com valores de -9,04Kcal/mol, -65,28kcal/mol e -2328,48Kcal/mol para os parâmetros de *free binding energy*, *gridscore* e *fullfitness*, respectivamente. Em geral, os resultados de *docking* de EGCG sugerem que essa molécula pode ocupar o sítio de interação de SAH ao domínio *MTase*, embora os *scores* obtidos nos programas Autodock e DocK sejam maiores, com excessão do *fullfitness* de -2352,82 (SwissDock) (tabela 6).

Dentre os ácidos aromáticos, todos os compostos testados apresentaram valores de *fullfitness* mais negativos, quando comparados aos valores de SAH e EGCG, porém, somente o valor de *free binding energy* de -5,46Kcal/mol do ácido p-cumárico foi menor do que a do

EGCG (-5,43 Kcal/mol). Todos os demais compostos (Kaempferide, bezil benzoato, CAPE, espatulenol e (2E,6Z) ζ -farnesol) se mostraram valores de *free binding energy* menores do que o EGCG. No entanto, valores mais negativos de gridscore e fullfitness foram concordantes, somente para os compostos CAPE e (2E,6Z)-farnesol, na mesma comparação ao EGCG (tabela 6).

Tabela 6. Valor do *score* (Kcal/mol) determinado por cada programa após a análise de *docking* ao domínio *MTase* da DNMT1.

Composto	Autodock (<i>Free binding energy</i>)	DOCK (<i>Gridscore</i>)	SwissDock (<i>FullFitness</i>)
SAH	-9,04	-65.28	-2328.48
EGCG	-5.43	-35.67	-2352.82
Ácido aromáticos			
cafeico	-5,04	-30,49	-2387,48
ferúlico	-5,39	-32,32	-2364,26
hidrocinâmico	-4,68	-20,63	-2405,43
p-cumárico	-5,46	-24,60	-2388,96
Flavonoides			
kaempferide	-6,43	-20.08	-2340.45
Outros			
benzil benzoato	-7,12	-33,30	-2344,15
CAPE	-8,02	-44,36	-2357,07
espatulenol	-5,89	-16,30	-2121,36
(2E,6Z)* farnesol	-6,39	-38,52	-2375,26

*(2E,6Z) = 2-cis,6-trans-farnesol

A solução de *docking* de SAH ocupou o sítio de interação de maneira semelhante a SAH-DNMT1, enquanto EGCG ocupou parcialmente o sítio de interação (Figuras 10A e B; 11A e B). CAPE e 2E,6Z-farnesol foram as moléculas que melhor ocuparam o sítio de interação, de forma semelhante a SAH-domínio *MTase* de DNMT1 (Figura 12 E e G). Kaempferide ocupou uma posição mais próxima da solução de EGCG (Figura 11 C).

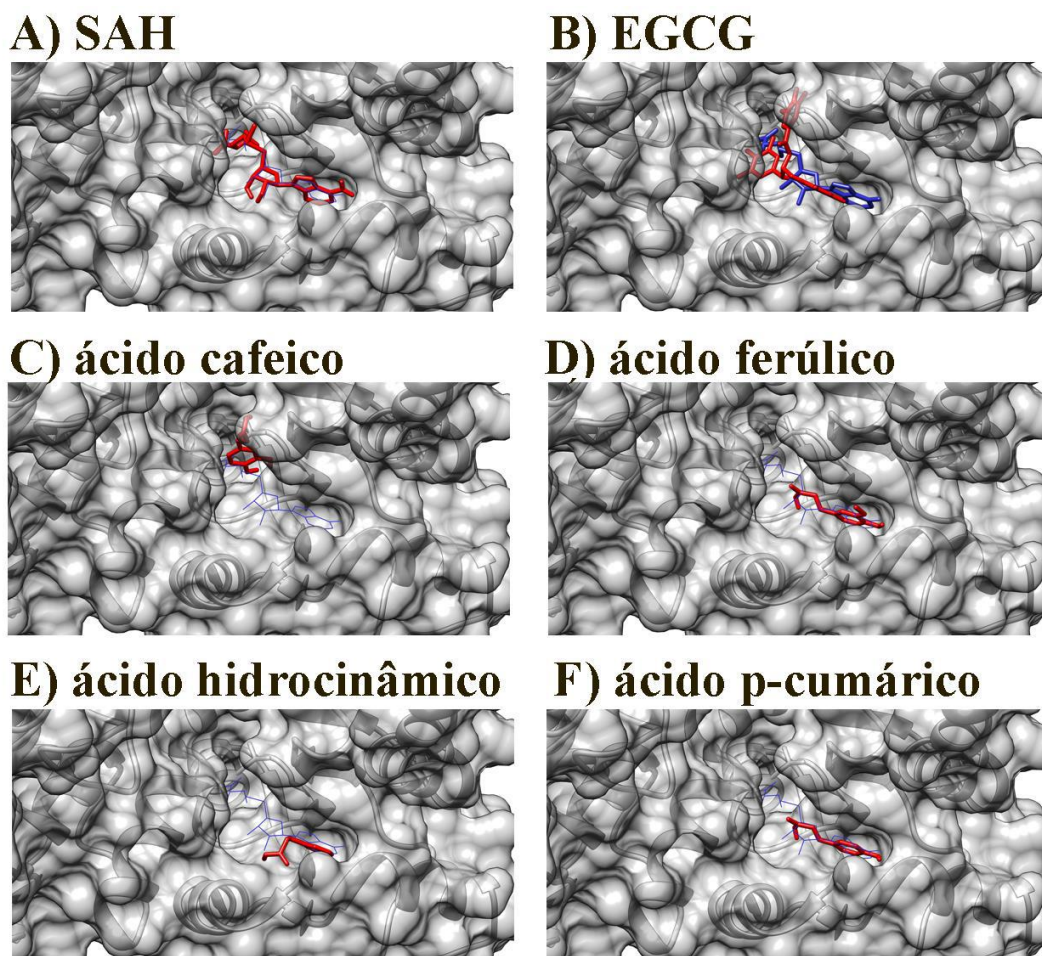


Figura 11. Análise de *docking* molecular pelo programa Autodock mostrando em cinza a estrutura tridimensional do domínio *MTase* da DNMT1 (molécula receptora) e as interações preditas com os ácidos aromáticos derivados da própolis (ligantes). A estrutura de cada composto encontra-se em vermelho e se sobrepõem com a conformação de SAH ao sítio *MTase* (estrutura em azul em cada quadro).

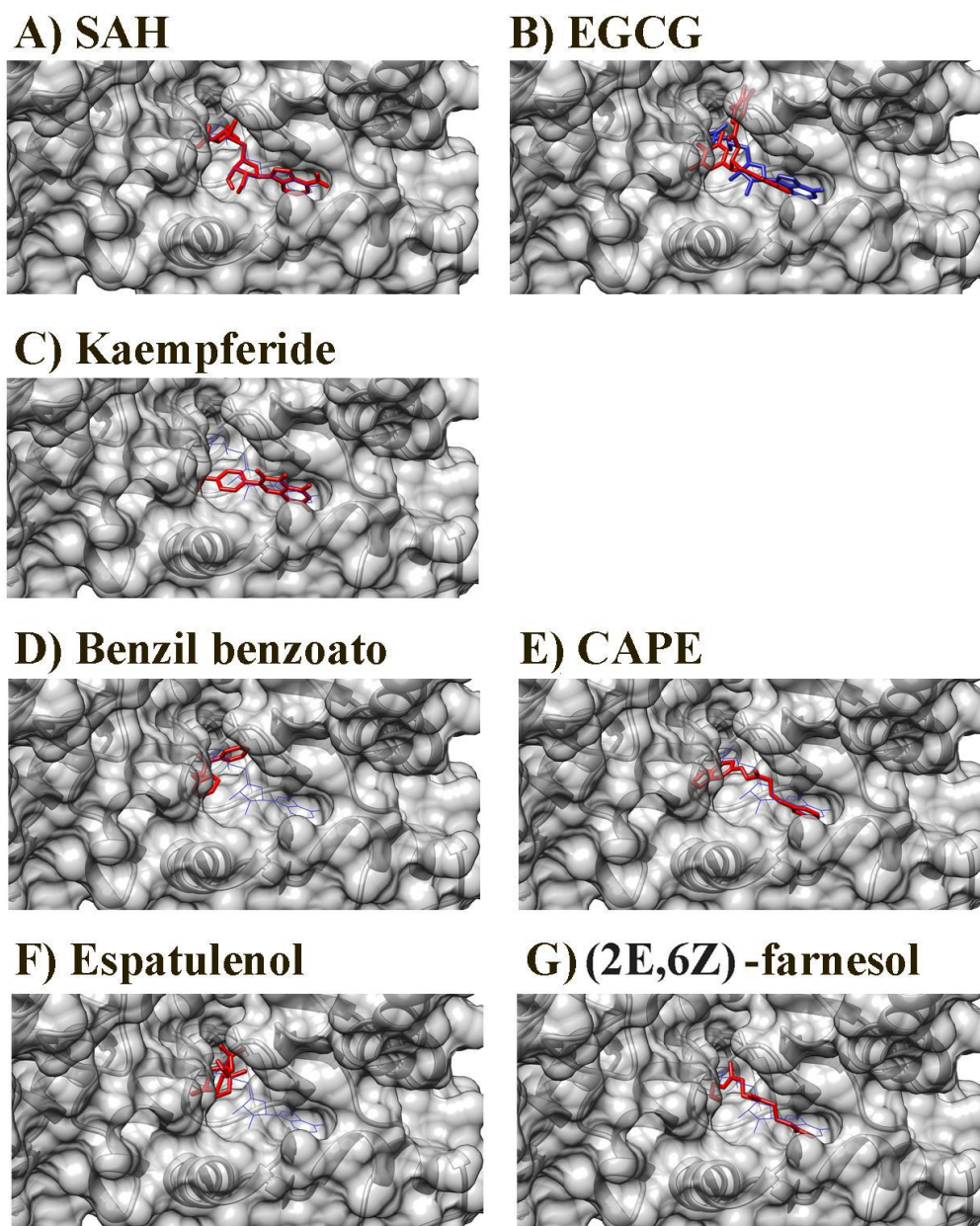


Figura 12 Análise de *docking* molecular pelo programa Autodock mostrando em cinza a estrutura tridimensional do domínio *MTase* da DNMT1 (molécula receptora) e as interações preditas com os derivados da própolis: kaempferide, benzil benzoato, CAPE, espatulenol e (2E,6Z)-farnesol. A estrutura de cada composto encontra-se em vermelho e se sobrepõem com a conformação de SAH ao sítio *MTase* (estrutura em azul em cada quadro).

As soluções de *docking* foram analisadas pelo LigPlot+ para identificar os contatos em comum entre a solução de *docking* e de SAH-MTase. A solução de *docking* de SAH reproduziu quase todos os contatos obtidas pela cristalização (Figura 13), incluindo 7 ligações de hidrogênio com 6 resíduos (D1190, E1168, G1150, G1149, V1588, G1149) e interação hidrofóbicas com 10 resíduos (L1247, M1169, F1145, W1170, E1189, G1147, S1146, A1579, N1578, G1223), faltando somente uma interação hidrofóbica (P1225). EGCG conseguiu reproduzir em parte os contatos feitos por SAH (figura 13), tendo em comum algumas interações hidrofóbicas (M1169, F1145, A1579, G1147, N1578, G1223, P1225, E1168) e realizando 4 ligações de hidrogênio com 3 resíduos Q1575, C1148, E1266. Na tabela 7 estão listados os contatos que as soluções de *docking* possuem em comum com o complexo SAH-DNMT1.

O composto CAPE apresentou ligações de hidrogênio com 3 resíduos em comum com SAH-DNMT1 (G1150, G1149, C1148) e interações hidrofóbicas com outros resíduos (S1146, A1579, G1147, N1578, F1145, P1225, E1168, E1189, M1169, C1191, D1190). O composto (2E,6Z)-farnesol apresentou resultados semelhantes a CAPE em termos de interações com resíduos em comum com SAH-DNMT1, potencialmente envolvido em ligações de hidrogênio com 4 resíduos (S1146, G1149, G1150, C1148) e interações hidrofóbicas (G1189, C1191, M1169, F1145, E1168, G1223, N1578, G1147, P1225) .

Para o ácido p-cumárico também foram preditas algumas interações em comum com SAH-DNMT1, porém em menor número. Potencialmente, este composto químico pode realizar ligações de hidrogênio com 3 resíduos (D1143, E1266, G1223) e interações hidrofóbicas com outros 3 aminoácidos (F1145, M1169, G1147).

Tabela 7. Lista de contatos em comum entre a solução de *docking* de cada ligante com SAH e o domínio *MTase* da DNMT1.

Composto	Contatos em comum com o complexo	
	SAH-DNMT1*	
	Ligações de hidrogênio	Interações hidrofóbicas
SAH	D1190, E1168, G1150, G1149, V1588, G1149.	L1247, M1169, F1145, W1170, E1189, G1147, S1146, A1579, N1578, G1223.
EGCG	Q1575, C1148, E1266.	M1169, F1145, A1579, G1147, N1578, G1223, P1225, E1168.
Ácidos aromáticos		
cafeico	D1143, E1266, G1223.	A1579, N1578, L1151, V1580, F1145, S1146, G1150.
ferúlico	D1190, C1191, E1168.	F1145, G1147, L1247, E1168, M1169.
hidrocinâmico		F1145, C1191, E1168, E1189, W1170, D1190, M1169.
p-Cumárico	E1168, D1190, C1191.	F1145, M1169, G1147.
Flavonóides		
kaempferide	C1191 e N1578	D1190, E1189, M1169, F1145, E1168, W1170, G1147, L1247.
Outros		
benzil benzoato	V1580, L1151, G1149.	N1578, A1579, G1150, G1223, G1147, F1145, S1146.
CAPE	G1150, G1149, C1148.	S1146, A1579, G1147, N1578, F1145, P1225,

		E1168, E1189, M1169, C1191, D1190.
espatulenol	N1578.	G1149, L1151, G1150, V1158, Ser1146, G1223, F1145, G1147, A1579.
(2E,6Z)-farnesol	S1146, G1149, G1150, C1148.	G1189, C1191, M1169, F1145, E1168, G1223, N1578, G1147, P1225.

(*) a tabela com os códigos de cada aminoácido encontra-se no anexo 1.

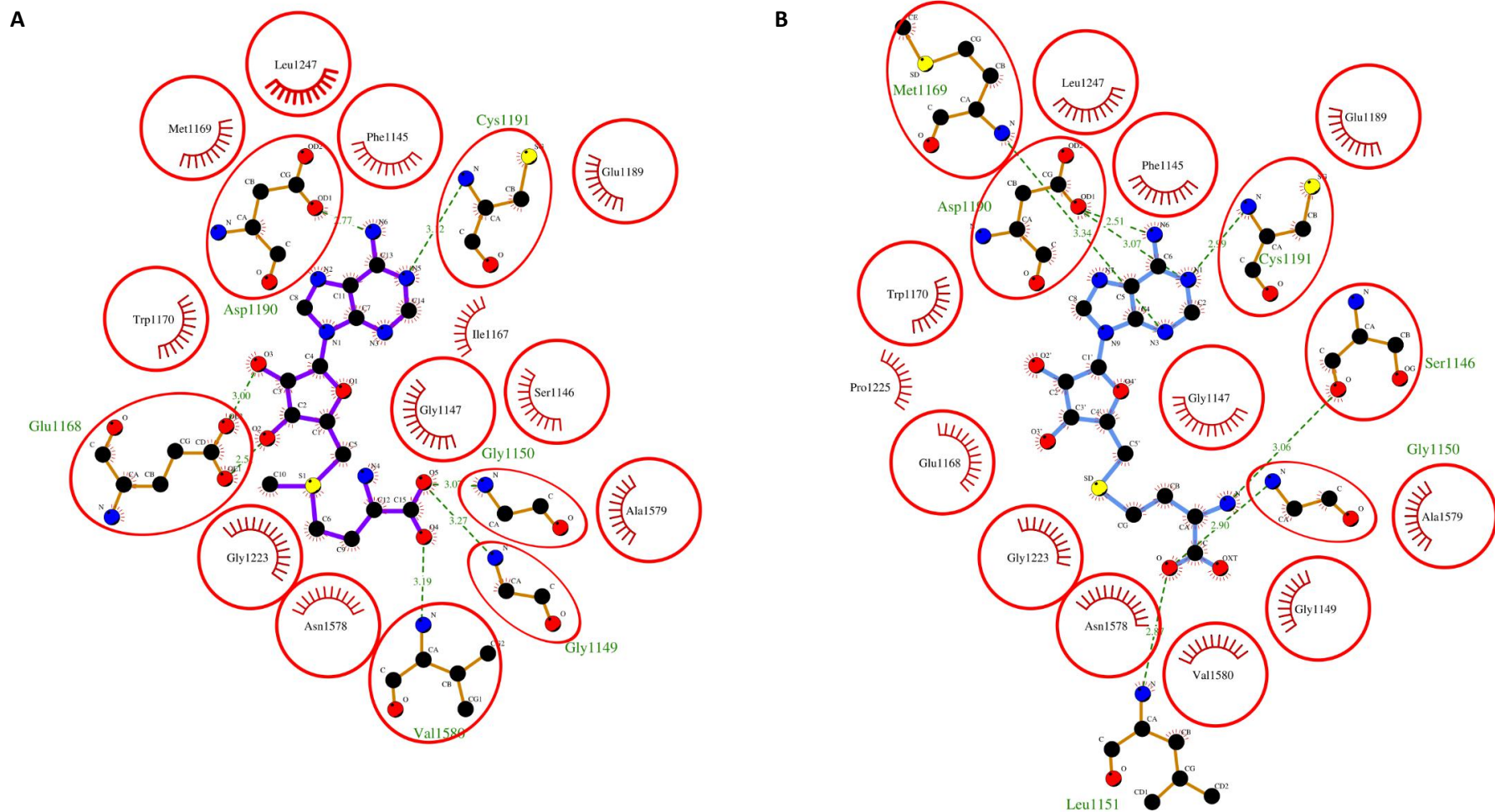


Figura 13. **A)** Interações obtidas por *docking* molecular entre SAH e o domínio *MTase* da DNMT1. **B)** Interações obtidas a partir da co-cristalografia (PDBID: 4WXX), com destaque para os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio de comprimentos específicos (verde) e interações hidrofóbicas (vermelho escuro). Os aminoácidos circulados em vermelho são comuns entre a conformação obtida por *docking* e por co-cristalografia. Figura obtida com o programa LigPlot+.

4.2. Efeito da própolis e seus componentes em linhagens derivadas de câncer de mama humano triplo negativo

Para a avaliação do efeito do tratamento com própolis ou seus componentes isolados sobre a viabilidade celular nas linhagens derivadas de carcinomas mamários humanos triplo-negativos, utilizou-se 2000 células/poço expostas a diferentes concentrações de própolis (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ou de seus derivados ácidos cafeico, hidrocinâmico e p-cumárico (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μM) nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Também foi utilizado o polifenol EGCG, nas mesmas concentrações.

O tratamento com própolis apresentou diminuição da viabilidade celular de um modo dose e tempo dependente nas linhagens BT-20 e BT-549, mas não nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436 (figura 14). O cálculo de IC_{50} revelou valores de 18,06 e 25,45 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens BT-20 e BT-549, respectivamente.

Os tratamentos com os compostos EGCG e ácido p-cumárico apresentaram diferenças significativas tempo e dose dependente em todas as linhagens estudadas (figuras 15 e 16). Os valores de IC_{50} foram iguais a 20,10; 19,16; 24,97 e 18,18 μM para o EGCG e 17,02; 13,94; 22,85 e 23,55 μM para o ácido p-cumárico, nas linhagens BT-20, BT-549, MDA-MB-231 e MDA-MB-436, respectivamente.

O ácido hidrocinâmico apresentou um aumento da viabilidade celular em 96h nas duas maiores concentrações apenas na linhagem BT-20, enquanto que a exposição *in vitro* ao ácido cafeico não apresentou diferenças significativas nos tempos e nas doses testadas nas quatro linhagens estudadas (figuras 17 e 18).

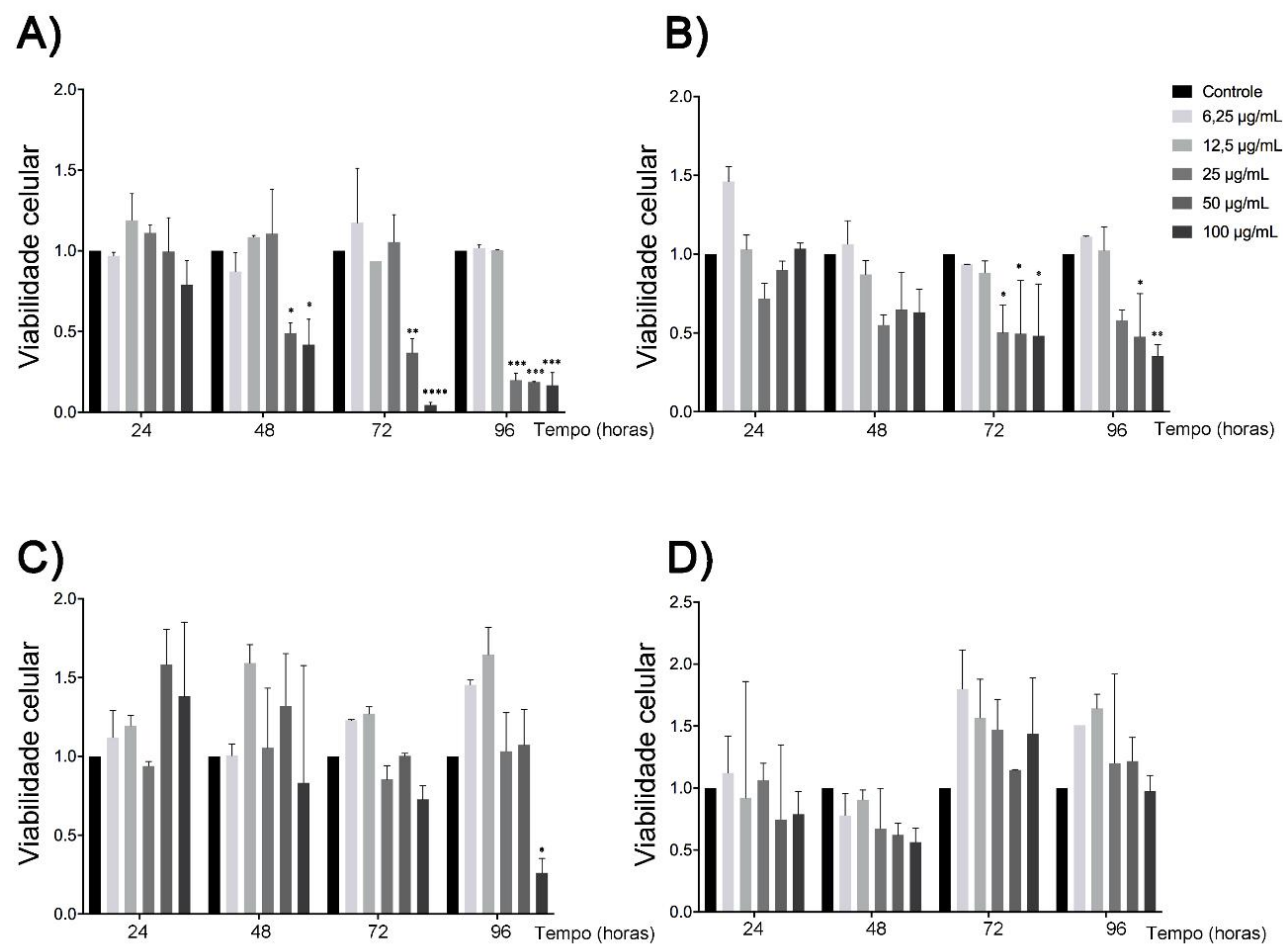


Figura 14. Viabilidade celular após a exposição *in vitro* a diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EPP) das linhagens BT20 (A), BT549 (B), MDA-MB-231 (C) e MDA-MB-436 (D). Os valores baseiam-se na média e desvio padrão obtidos das triplicatas, em comparação com o controle no mesmo período de tempo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,0002$ e **** $p < 0,0001$.

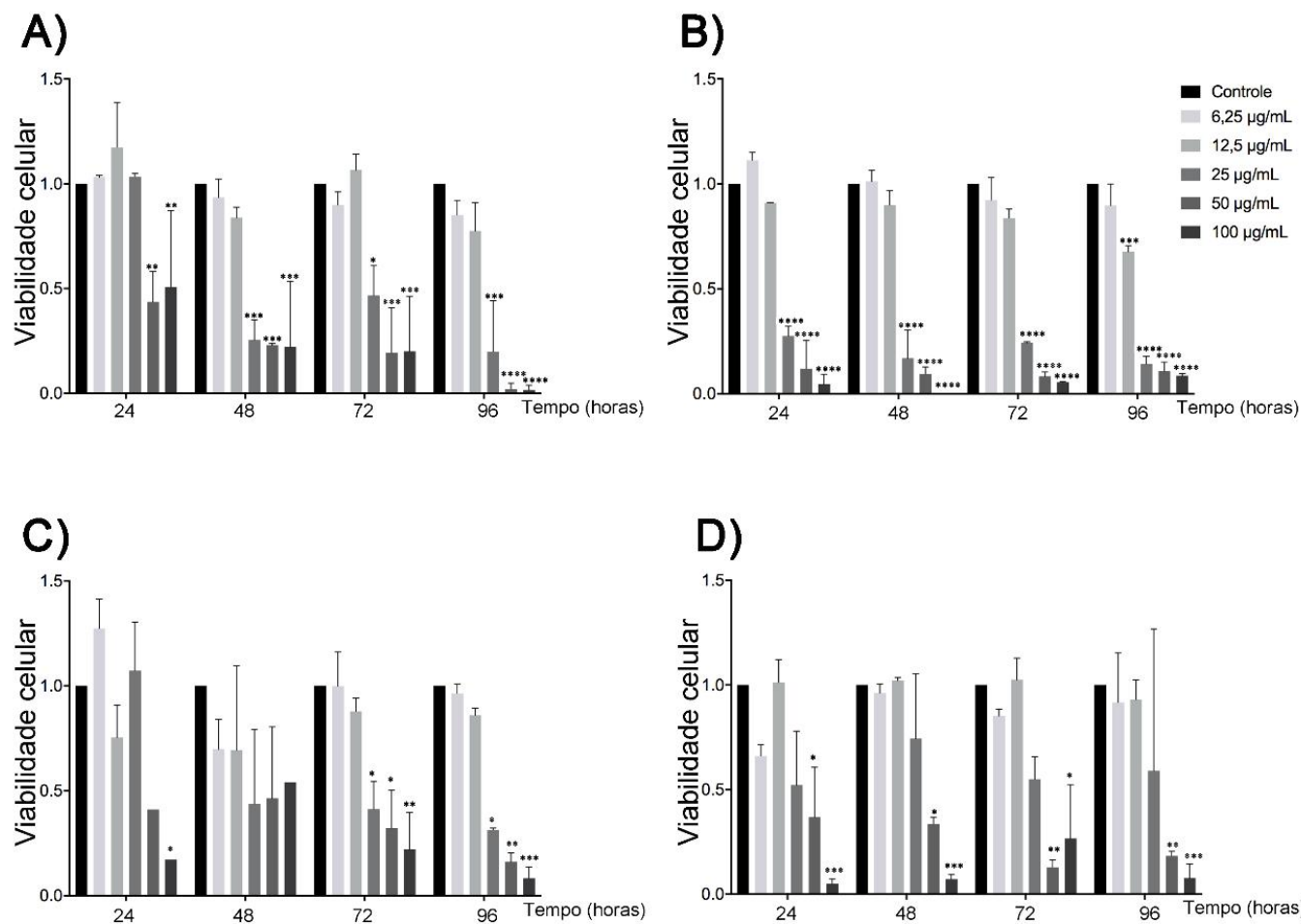


Figura 15 Viabilidade celular após a exposição *in vitro* das linhagens BT-20 (A), BT-549 (B), MDA-MB-231 (C) e MDA-MB-436 (D) com diferentes concentrações de EGCG. Os valores baseiam-se na média e desvio padrão obtidos das triplicatas, em comparação com o controle no mesmo período de tempo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,0002$ e **** $p < 0,00001$.

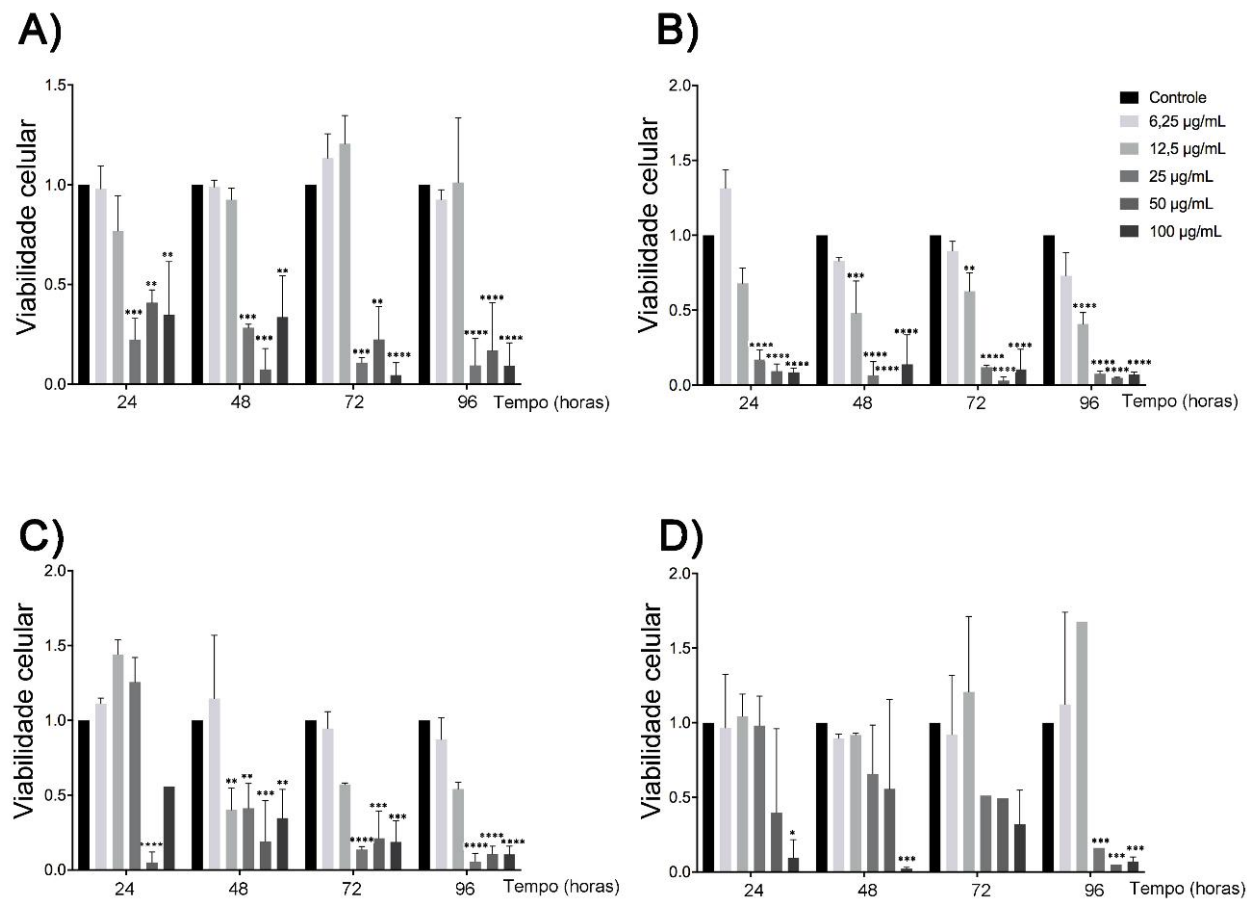


Figura 16. Viabilidade celular após a exposição *in vitro* das linhagens BT-20 (A), BT-549 (B), MDA-MB-231 (C) e MDA-MB-436 (D) com diferentes concentrações de ácido p-cumárico. Os valores baseiam-se na média e desvio padrão obtidos das triplicatas, em comparação com o controle no mesmo período de tempo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,0002$ e **** $p < 0,00001$.

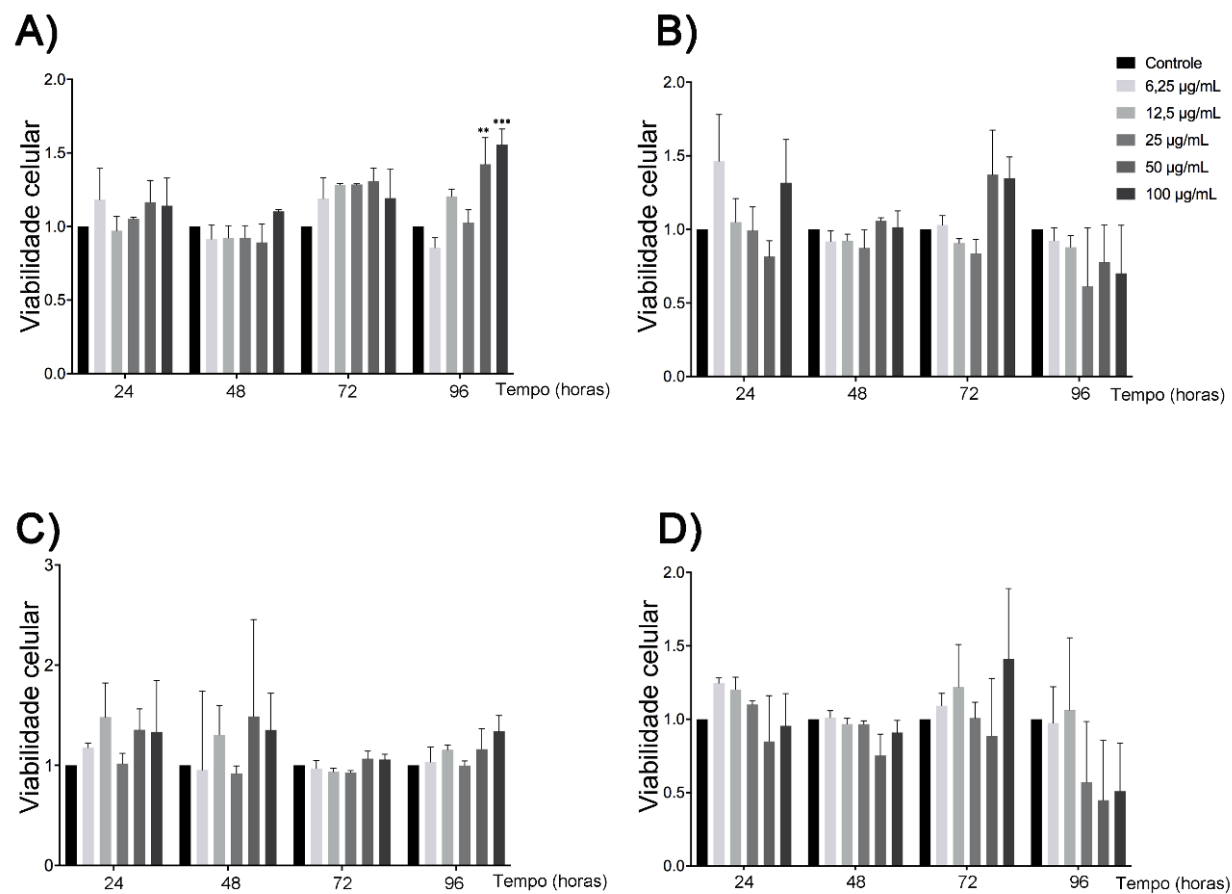


Figura 17. Viabilidade celular após a exposição *in vitro* das linhagens BT-20 (A), BT-549 (B), MDA-MB-231 (C) e MDA-MB-436 (D) com diferentes concentrações de ácido hidrocínâmico. Os valores baseiam-se na média e desvio padrão obtidos das triplicatas, em comparação com o controle no mesmo período de tempo. ** $p < 0,02$ e *** $p < 0,0002$.

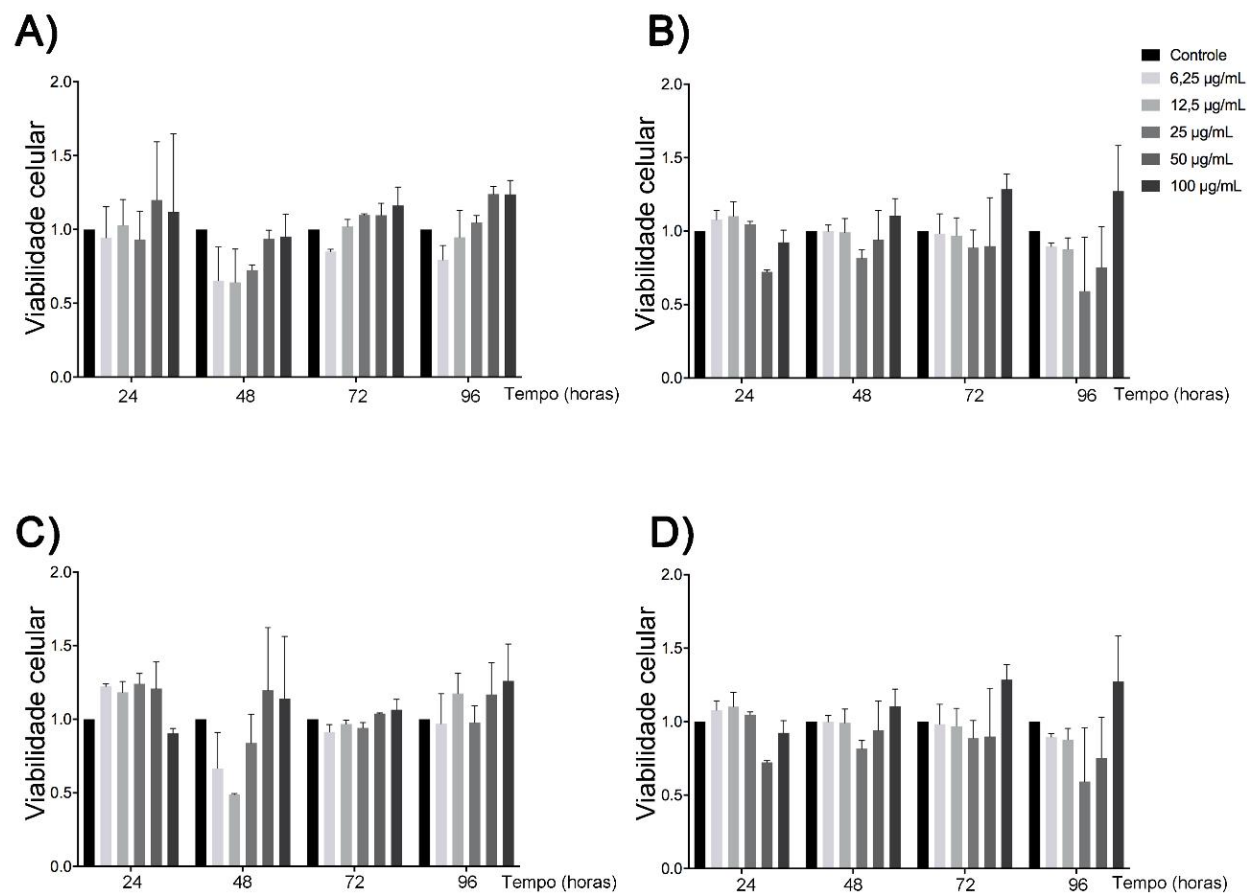


Figura 18. Viabilidade celular após a exposição *in vitro* das linhagens BT-20 (A), BT-549 (B), MDA-MB-231 (C) e MDA-MB-436 (D) com diferentes concentrações de ácido cafeico. Os valores baseiam-se na média e desvio padrão obtidos das triplicatas, em comparação com o controle no mesmo período de tempo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

4.3. Inibição *in vitro* da metilação do DNA

Para a padronização do ensaio de inibição da metilase *M.SssI*, inicialmente foram pesquisados conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação de fragmentos de DNA pela PCR. Como pré-requisitos, os fragmentos deveriam possuir vários dinucleotídeos CpG passíveis de receberem um grupo metil e, pelo menos, um sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição *BstUI*, sensível à metilação do DNA. Foi selecionado um fragmento de 658pb correspondendo ao gene *MECP2*, que, quando não metilado, produz fragmentos de 332 e 326pb. Após os primeiros ensaios, verificou-se que o fragmento foi metilado totalmente, segundo as condições recomendadas pelo fabricante. A genotipagem direta do produto da PCR confirmou a presença dos sítios de restrição para a enzima a partir da amostra de DNA genômico utilizada.

Em seguida, foi realizado uma rodada do ensaio utilizando-se soluções de DMSO e etanol nas concentrações equivalentes das diferentes diluições dos compostos a serem testados (0.08, 0.04, 0.02, 0.01 e 0.005%), a fim de avaliar uma possível atividade inibitória dos solventes utilizados. A figura 17A confirma que os diluentes não possuem qualquer efeito sobre a atividade da metilase *M.SssI*, o que valida o ensaio. No entanto, não foi possível observar qualquer efeito inibitório dos compostos EGCG e ácido p-cumárico na atividade da metilase, sob as condições testadas (Figura 19B).

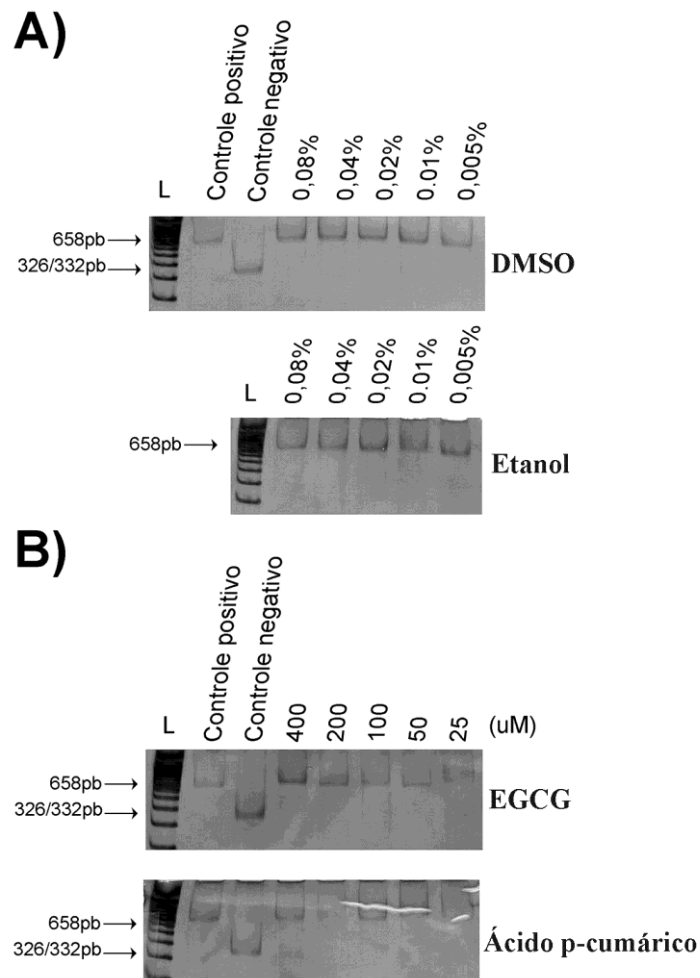


Figura 19. Ensaio de inibição *in vitro* da metilase *M.SssI*. Eletroforese em gel de poliacrolamida a 6 % e coloração por nitrato de prata. As bandas de 658 pb indica um fragmento metilado (controle positivo) e as sua clivagem nas bandas de 326/332 pb a ausência de metilação d.o sítio alvo (controle negativo). Em **(A)** nota-se que os diluentes utilizados (DMSO e etanol) não interferem na atividade enzimática e em **(B)** nota-se que os compostos EGCG e ácido p-cumárico também não inibiram a atividade da metilase *M.SssI*.

4.4 Análise do padrão de metilação de genes específicos após exposição ao EEP, EGCG e ácido p-cumárico

Para se avaliar o potencial efeito desmetilante do EEP, EGCG e ácido p-cumárico sobre as linhagens derivadas de carcinomas mamários triplo-negativos, **primeiramente** foram selecionados os genes *RARB* e *RASSF1* que apresentam hipermetilação da ilha CpG associada às suas regiões promotoras. Após o tratamento contínuo com 10 µg/mL de EPP ou 10 µM de EGCG ou ácido p-cumárico, o padrão de metilação foi determinado por MS-PCR.

A presença de uma banda específica para alelos não-metilados do gene *RASSF1* nas linhagens MDA-MB-436 e BT-549 indicou o potencial efeito hipometilante do EEP; porém, não foi possível observar esse mesmo efeito na linhagem MDA-MB-231 (Figura 20).

Adicionalmente, os dados de MS-PCR indicam a inibição da metilação do DNA pelo EGCG nas células das linhagens MDA-MB-436 e BT-549. Entretanto, a reação da linhagem MDA-MB-436 falhou, já que não foi possível visualizar nem fragmentos metilados ou fragmentos não metilados. Os dados do ácido p-cumárico foram considerados inconclusivos pois apenas na linhagem MDA-MB-436 foi possível observar as bandas esperadas após a amplificação pela PCR, apesar da presença de uma banda muito fraca correspondente ao alelo não metilado. O mesmo problema foi observado para todas as análises de MS-PCR para o gene *RARB*. Esta análise será repetida oportunamente para a confirmação dos dados obtidos.

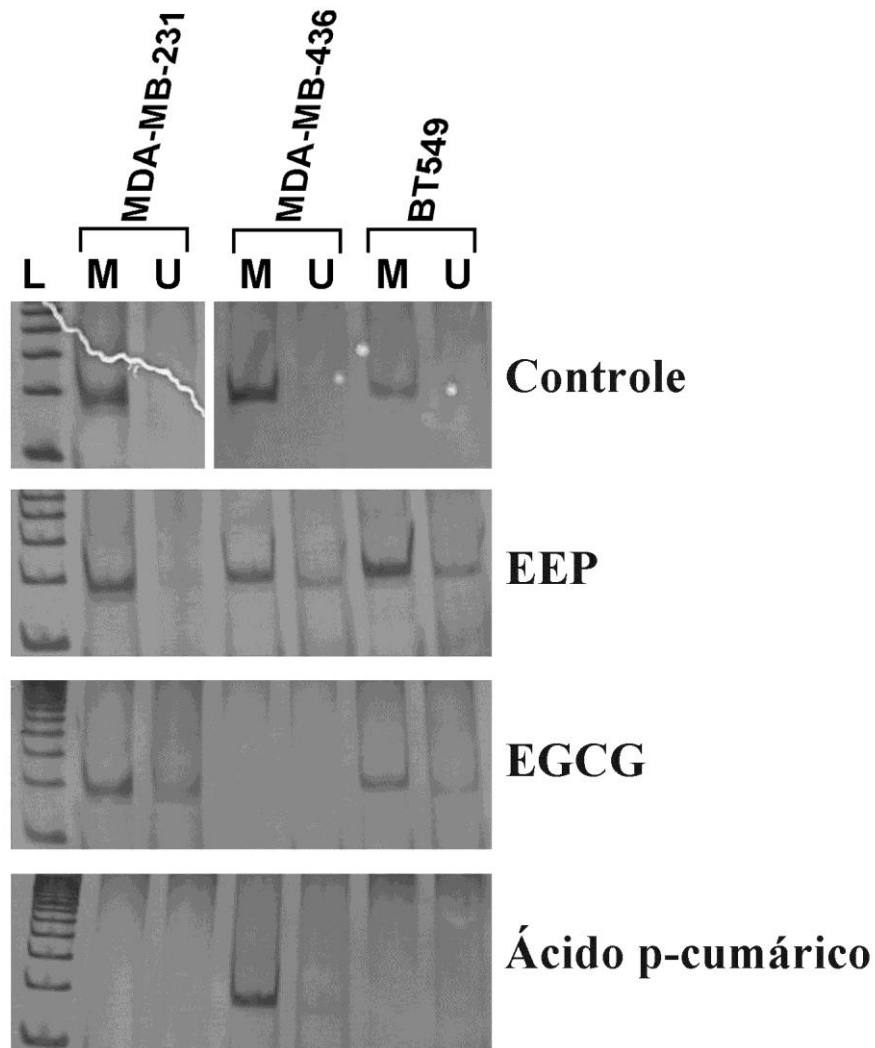


Figura 20. Ensaio de MS-PCR para o gene *RASSF1A* após a exposição *in vitro* das linhagens derivadas de carcinomas mamários triplo-negativos com EEP, EGCG e ácido p-cumárico. O surgimento de uma banda correspondente a alelos não metilados (U) indica o efeito de inibição da metilação do DNA do EEP e do EGCG. (M) alelo metilado; (U) alelo não metilado.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Dados *in silico* sugerem possíveis interações entre componentes da própolis e o domínio MTase da DNMT1 humana

Inicialmente, é importante lembrar que a DNMT1 possui um mecanismo intrínseco de inibição: à medida que SAM é convertido a SAH pela reação de metilação do DNA, SAH compete com SAM pelo sítio de ligação no domínio MTase. Quando SAH se liga no lugar de SAM, a reação não acontece pela ausência do radical metil na molécula de SAH (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

No presente estudo, todos os programas de *docking* testados calcularam conformações de SAH muito próximas da conformação de SAH-DNMT1 usada como referência nas análises (ZHANG et al., 2015c) (PDBID:4WXX); adicionalmente, essas conformações calculadas foram as que obtiveram os menores *scores* em todos os programas utilizados.

Uma das moléculas estudadas foi o EGCG (principal componente do chá verde), que apesar de não estar presente na composição química da própolis, alguns trabalhos demonstraram o seu efeito antitumoral através de diversos mecanismos: indução de apoptose, inibição de angiogênese, interação com outras proteínas, regulação de vias de sinalização celular, entre outros (XIANG et al., 2016). Dentre os efeitos descritos do EGCG, encontra-se a sua ação hipometilante do DNA, ou seja, a capacidade da molécula diminuir os níveis de metilação no DNA, o que tem sido associado com a expressão de genes silenciados epigeneticamente no câncer (ZHANG et al., 2015a). Existem evidências de que esse efeito seja oriundo da interação de EGCG com o domínio MTase de DNMTs (KHAN et al., 2015b). Esses dados são importantes pois SAH e EGCG são moléculas com efeito hipometilante conhecidos, além de que EGCG é um polifenol oriundo de um produto natural (chá verde), portanto essas moléculas foram utilizadas com controles positivos.

5.1.1 *Docking* molecular de SAH e EGCG

A partir do *docking* de SAH ao domínio Mtase, foi possível obter soluções que se assemelham com a conformação do complexo SAH-DNMT1 (PDBID:4WXX) e essas conformações compartilham grande parte das interações químicas descritas pela co-cristalização. Adicionalmente, em dois programas (Autodock e Dock) os *scores* obtidos foram os mais negativos de todos os ligantes testados.

É importante salientar que o resíduo C1226 é muito importante no ataque ao anel presente na citosina do DNA, o que permite o início da reação que transfere o radical metil de SAM para o carbono 5 da citosina, convertendo a citosina em 5-metil-citosina (DU; WANG; SCHRAMM, 2016). Logo a ocupação do sítio próximo a esse resíduo por SAH é importante para a inibição da enzima, portanto a interação com resíduos desse sítio (P1225, G1223, F1145, M1169, D1190, C1191, S1146, G1150 e L1151) é importante para manter a molécula inibidora no *pocket* do sítio ativo da enzima.

Os resultados obtidos no cálculo de *docking* para EGCG apresentaram *score* negativo e, em geral, foram concordantes com os encontrados na literatura, que demonstram que o EGCG poderia se ligar no sítio de interação com o DNA do domínio MTase, impedindo a interação com a molécula de DNA (KHAN et al., 2015a). A melhor conformação observada de EGCG, possivelmente ocupa o sítio de interação de SAH e realiza contato com os resíduos já citados, o que sugere que EGCG tem potencial de ocupar o *pocket* estudado na área de interesse.

EGCG e mentol (principal componente da menta) são capazes de inibir a metilase *M.SssI* recombinante *in vitro* (PARASHAR; PARASHAR; CAPALASH, 2017). Essas moléculas possivelmente são capazes de interagir com o sítio catalítico de DNMT1 (MEDINA-FRANCO et al., 2011). Maldonado-Rojas e colaboradores também descreveram outras moléculas capazes de interagir com o sítio de interação de SAH de DNMT1 e DNMT3, usando uma abordagem de *docking*, como por exemplo: daunorubicina, pirromicina

e centaureina (MALDONADO-ROJAS; OLIVERO-VERBEL; MARRERO-PONCE, 2015). Adicionalmente, é descrito que EGCG tem uma maior atividade inibidora quando é adicionada solução de Mg^{2+} e dados de *docking* molecular realizado pelo mesmo estudo sugerem que na presença de magnésio, o EGCG possui uma capacidade inibidora maior (LEE; SHIM; ZHU, 2005).

5.1.2 *Docking* molecular dos ácidos cafeico, ferúlico, hidrocinâmico e p-cumárico

Os ácidos cafeico, ferúlico, hidrocinâmico e p-cumárico apresentaram *scores* semelhantes aos dados obtidos para EGCG, principalmente pelos programas Autodock e SwissDock. Entretanto, houve diferença na distribuição de tamanho dos *clusters* formados nessas análises mostrou diferenças. Enquanto o EGCG demonstrou diversos *clusters* com grupos menores de soluções, estes ácidos possuíram pouquíssimos *clusters* que agrupam um grande número de soluções. Esse fato sugere que os algoritmos que consideram a flexibilidade de ligantes encontre poucas conformações com moléculas de baixa flexibilidade e baixos graus de liberdade (KITCHEN et al., 2004).

5.1.3 *Docking* molecular de benzil benzoato, CAPE, espatulenol e (2E,6Z)-farnesol

CAPE, (2E,6Z)-farnesol e benzil benzoato tiveram um comportamento mais similar ao *docking* de SAH, com tamanho de *clusters* menores e com *scores* mais semelhantes aos obtidos no *docking* de SAH. Especialmente, os compostos CAPE e (2E,6Z)-farnesol foram as moléculas que mais se aproximaram da conformação da interação de SAH e apresentaram vários contatos de resíduos em comum com SAH. Esses resultados sugerem que, possivelmente, CAPE e (2E,6Z)-farnesol são capazes de ocupar o mesmo sítio de interação entre SAH e o domínio MTase de DNMT1 humana.

O composto benzil benzoato, apesar de apresentar contatos em comum importantes com a interação de SAH ao domínio MTase, a conformação demonstrada pelos programas não foi tão próxima da conformação de SAH, quando comparado aos dados obtidos com

CAPE e (2E,6Z)-farnesol. Finalmente, o espatulenol mostrou um comportamento único. Apenas um *cluster* onde praticamente todas as conformações calculadas não divergem mais que 1Å de RMSD. A estrutura química rígida apresentada pela molécula e, portanto, a sua baixa flexibilidade e os baixos graus de liberdade podem ter sido um empecilho para os algoritmos dos programas usados. Estes dados sugerem que a metodologia utilizada neste trabalho não seja compatível com esta molécula.

Comparando-se os dados obtidos em todos os programas de *docking* utilizados, alguns resíduos em contato com os ligantes foram recorrentes: G1223, E1168, F1145, G1147, M1169, N1578. Alguns desses contatos também foram descritos em predições de *docking* de outras moléculas no mesmo sítio de ligação (CASTELLANO et al., 2011; MALDONADO-ROJAS; OLIVERO-VERBEL; MARRERO-PONCE, 2015; MEDINA-FRANCO et al., 2015) como a F1145, que é descrita com maior frequência, além de G1223 e E1168, que também são descritos nesses trabalhos. Yoo e colaboradores, 2013 demonstraram que esses contatos também são importantes no *docking* de SGI-1027 e CBC12, ambas moléculas sintéticas. Esses dados sugerem que esses contatos possam ser importantes para a interação de ligantes no sítio catalítico e função biológica da enzima.

Concluindo, com base nos parâmetros analisados, nossos dados de *docking* sugerem que os compostos químicos CAPE e (2E,6Z)-farnesol são novos potenciais inibidores da metilação do DNA e, portanto, são os melhores candidatos a serem investigados experimentalmente. Adicionalmente, o ácido ferúlico e ácido p-cumárico também apresentam possível interação com o sítio analisado, assim como EGCG. Portanto, componentes derivados da própolis, possivelmente, podem ser capazes de interagir com o sítio de ligação de SAH ao domínio MTase, embora com valores de energia de ligação maiores aos observados para este inibidor intrínseco da DNMT1.

5.2. Efeitos do extrato de própolis e de componentes selecionados sobre linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários triplo negativos

A própolis é um dos produtos de origem natural estudado extensivamente nos últimos anos e seu efeito antitumoral *in vitro* tem sido demonstrado em linhagens celulares de diversos tipos cânceres, incluindo o câncer de mama (Watanabe et al., 2011; Patel, 2016). Em adição, alguns estudos demonstram que componentes isolados da própolis, como o CAPE, possuem efeito citotóxico nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231, derivadas de carcinomas mamários, além de atuarem em importantes vias relacionadas ao câncer como as vias de crescimento e proliferação celular, indução de apoptose, modulação por NF-kB, controle do ciclo celular e inibição da angiogênese (WU et al., 2011).

O potencial efeito epigenético de componentes específicos da própolis foi sugerido pelo estudo de Omene et al. (2013) que demonstrou que o CAPE possui efeito antitumoral mediado pela atividade de inibição de acetilases de histonas nessas linhagens celulares (OMENE; WU; FRENKEL, 2012). Adicionalmente, CAPE também foi capaz de inibir o potencial metastático da linhagem MDA-MB-231 (FRASER; HEMSLEY; DJAMGOZ, 2016). Beuregard et al., demonstram que CAPE induz apoptose mediada por caspases, também utilizando as células MDA-MB-231 como modelo de estudo (Beuregard et al., 2015).

Rzepecka-Stojko et al. descrevem o efeito citotóxico da própolis sobre duas linhagens de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231 e Hs-578T), após o teste de viabilidade celular pelo MTT (Rzepecka-Stojko et al., 2015). Também é descrito que o CAPE possivelmente induz a expressão do receptor de estrógeno tanto *in vitro* (na linhagem MDA-MB-231) quanto em *in vivo* (em modelo murino), porém não demonstra o mesmo efeito na linhagem MCF7 (JUNG et al., 2010).

Em conjunto com esses dados da literatura, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que EEP é capaz de diminuir a viabilidade celular em duas linhagens estudadas (BT-20 e BT-549), mas o mesmo efeito não foi detectado nas demais linhagens (MDA-MB-231 e MDA-MB-436). Esses dados corroboram um estudo recente que demonstrou que o mesmo extrato de própolis utilizado no presente estudo não foi efetivo sobre a linhagem MDA-MB-231, enquanto que a própolis vermelha cubana exerceu um efeito citotóxico sobre a mesma linhagem (FRIÓN-HERRERA et al., 2017). Diferenças específicas na composição das duas amostras de própolis podem explicar essas diferenças.

Entretanto, nossos dados mostraram que o EGCG e o ácido p-cumárico apresentaram uma clara redução da viabilidade nas quatro linhagens estudadas. Um estudo recente demonstrou que o ácido p-cumárico diminui a viabilidade da linhagem MDA-MB-231, possivelmente por modular a via NF- κ B (YAMAGUCHI et al., 2015). Também foi descrito que o ácido p-cumárico exerce efeito citotóxico sobre a linhagem de câncer de mama MCF7, possivelmente, a partir da reversão da acetilação da histona H3, o que sugere que o ácido p-cumárico é capaz de inibir atividade de desacetilase de histonas (HDAC) (SAENGLLEE et al., 2016).

O ácido cafeico foi outro derivado da própolis estudado. Recentemente, foi demonstrado que esse composto, em concentrações maiores do que aqueles presentes na própolis, é capaz de induzir a apoptose a partir da regulação da via intrínseca em células Hep-2 (da Silva et al., 2017). Entretanto, nas condições utilizadas no presente estudo, não foi possível observar efeito do ácido cafeico na viabilidade celular nas linhagens derivadas de carcinomas mamários triplo-negativas

Atualmente, o tratamento de câncer de mama triplo negativo configura-se como um grande desafio pela falta de estratégias adequadas às características da doença (Mouh et al., 2016); portanto, o desenvolvimento de drogas que atuem sozinhas ou como adjuvantes das

modalidades terapêuticas atualmente em uso é de grande importância. Uma das abordagens pesquisadas são as drogas epigenéticas que utilizam como vantagem o caráter reversível dos mecanismos epigenéticos para regulação adequada da expressão gênica, o que eventualmente resultaria na reversão do fenótipo (Mirzania, 2016). No conjunto, os dados obtidos no presente estudo demonstram que a própolis é uma potencial fonte de inibidores de DNMTs, sendo assim de grande interesse na pesquisa de novas drogas epigenéticas.

Brueckner et al. (2005), utilizaram uma abordagem *in vitro* para determinar a capacidade de inibição de pequenas moléculas sobre uma metiltransferase recombinante, a *M.SssI*. Neste estudo, os autores demonstraram a capacidade da molécula sintética RG108 de inibir a metilase *M.SssI*. Lee et al. (2006) demonstraram que o ácido cafeico e o ácido clorogênico também são capazes de inibir DNMTs utilizando uma metodologia semelhante; entretanto, utilizaram um método de detecção do DNA metilado mais sensível. No presente estudo, os ensaios realizados com EGCG e ácido p-cumárico não apresentaram inibição da metilase *M.SssI*.

Catecol-O-metiltransferase (COMT) é uma enzima que catalisa a reação de metilação em catequinas e moléculas derivadas como EGCG; nessa reação, COMT utiliza SAM como molécula doadora de radical metil para a reação de metilação (AXELROD; TOMCHICK, 1958; MOVASSAGH; MUDVARI; HORVATH, 2017) o que resulta na conversão de SAM em SAH da mesma maneira que ocorre a inibição intrínseca de DNMT1. Portanto, quando a molécula de EGCG é metilada por COMT, ocorre um aumento da concentração de SAH o que intensifica a inibição intrínseca de DNMT1 (LEE; SHIM; ZHU, 2005). Um estudo mais recente demonstrou que EGCG é um substrato para enzima COMT e a subsequente metilação de EGCG diminui a sua atividade inibidora sobre o proteasoma em células tumorais (HUO et al., 2009). Segundo os autores, estes achados sugerem que a COMT afeta a atividade anti

proliferativa do EGCG e seus análogos, especialmente em células com alta atividade da COMT, como as células de MDA-MB-231.

O ácido p-cumárico, apesar de ser capaz de reduzir a viabilidade celular de todas as linhagens estudadas não apresentou inibição da *M.SssI*. Este achado sugere que essas moléculas podem apresentar tal efeito a partir de outra via celular. Roy et al., (2016) demonstraram que, na presença de ácido p-cumárico e ácido ferúlico, houve um efeito citotóxico e regulação negativa da expressão do receptor EGFR em células de câncer colorectal. Os dados de *docking* molecular sugeriram que ambos os compostos são capazes de interagir com esse receptor (ROY et al., 2016), indicando que essas moléculas podem demonstrar um efeito citotóxico, a partir de vias diferentes que não a expressão de genes supressores tumorais silenciados no câncer.

Pelo resultado do ensaio de MS-PCR foi possível observar que EEP demonstra atividade hipometilante nas linhagens MDA-MB-436 e BT-549, entretanto não foi possível observar esse efeito na linhagem MDA-MB-231. EGCG também apresentou efeito hipometilante nas linhagens MDA-MB-231 e BT-549. Esses dados são concordantes com as evidências da literatura, que demonstram a capacidade de inibição da viabilidade celular na linhagem MDA-MB-231 e que o EGCG possui capacidade de inibição da metilação do DNA. Por fim, o ácido p-cumárico nas condições testadas, não apresentou atividade inibidora da metilação do DNA na linhagem MDA-MB-436, o que sugere que a inibição da viabilidade do ácido p-cumárico, demonstrada no ensaio de MTT, possa ser explicado por outras vias como, por exemplo, a modulação de EGFR ou de interação com outras enzimas epigenéticas como as HDACs (SAENGLER et al., 2016).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Os resultados de *docking* molecular demonstraram que CAPE e (2E,6Z)-farnesol, possivelmente, sejam as moléculas que melhor ocupam o sítio de ligação SAM/SAH e fazem interações e com contatos químicos em comum com SAH e o domínio MTase da DNMT1.
- O ensaio de viabilidade celular demonstrou que EEP foi capaz de reduzir a viabilidade nas linhagens BT-20 e BT-549 de maneira dose e tempo dependente, enquanto EGCG e ácido p-cumárico reduziram a viabilidade de todas as linhagens estudadas.
- Sob as condições testadas, o EEP e os compostos EGCG e ácido p-cumárico, não mostraram inibição da atividade da metilase *M.SssI* *in vitro*.
- A análise da metilação do gene *RASSF1A* após o tratamento *in vitro* com o EGCG confirmou a sua atividade inibidora da metilação do DNA. Este ensaio também demonstrou que algum componente do EEP também é capaz inibir a metilação do DNA *locus* específica.

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

AHN, M. R. et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artemisin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 252, n. 2, p. 235–243, 2007.

AKAO, Y. et al. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 7, p. 1057–1059, 2003.

ALLEN, W. J. et al. DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. **Journal of Computational Chemistry**, v. 36, n. 15, p. 1132–1156, 2015.

ALLISON, K. H. Molecular Pathology of Breast Cancer. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 138, n. 6, p. 770–780, 1 dez. 2012.

AMBROSONE, C. B.; HONG, C.-C.; GOODWIN, P. J. Host Factors and Risk of Breast Cancer Recurrence: Genetic, Epigenetic and Biologic Factors and Breast Cancer Outcomes. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 862, p. 143–53, 2015.

ARMSTRONG, L. **Epigenetics**. [s.l: s.n.].

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181–189, 2008.

AXELROD, J.; TOMCHICK, R. Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. **The Journal of biological chemistry**, v. 233, n. 3, p. 702–5, set. 1958.

BANKOVA, V. **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization** *Journal of Ethnopharmacology*, 2005.

BARRIOS, C. et al. Recomendações para o manejo adjuvante de pacientes com câncer de mama inicial. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 1, n. 5, p. 3–11, 2005.

BARROS ACSD, BARBOSA EM, G. L. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama Projeto Diretrizes. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, p. 1–15, 2001.

BAZO, A. P. et al. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 22, n. 3, p. 183–194, 2002.

BECA, F.; POLYAK, K. Intratumor heterogeneity in breast cancer. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 882p. 169–189.

BERGER, S. L. et al. An operational definition of epigenetics. **Genes and Development**, v. 23, n. 7, p. 781–783, 2009.

BEST, J. D.; CAREY, N. **Epigenetic opportunities and challenges in cancer** *Drug Discovery Today*, 2010.

BOURC'HIS, D.; BESTOR, T. H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. **Nature**, v. 431, n. 7004, p. 96–99, 2004.

BRIGGS, S. F.; REIJO PERA, R. A. X chromosome inactivation: recent advances and a look forward. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 28, p. 78–82, 2014.

BRUECKNER, B. et al. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. **Cancer Research**, v. 65, n. 14, p. 6305–6311, 2005.

BUAHORM, S. et al. Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 55, 2015.

BÚFALO, M. C. et al. In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. **Natural product research**, v. 24, n. 18, p. 1710–1718, 2010.

BURBEE, D. G. et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 9, p. 691–9, 2 maio 2001.

BURDOCK, G. A. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)** *Food and Chemical Toxicology*, 1998.

CALLEBAUT, I.; COURVALIN, J. C.; MORNON, J. P. The BAH (bromo-adjacent homology) domain: A link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. **FEBS Letters**, v. 446, n. 1, p. 189–193, 1999.

CAMARGO, M. S. et al. Evaluation of estrogenic, antiestrogenic and genotoxic activity of nemorosone, the major compound found in brown Cuban propolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 201, 31 dez. 2013.

CASTELLANO, S. et al. Synthesis and biochemical evaluation of $\delta(2)$ -isoxazoline derivatives as DNA methyltransferase 1 inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, n. 21, p. 7663–77, 10 nov. 2011.

CHEN, C.-N. et al. Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis. **Natural Product Research**, v. 26, n. 2, p. 116–124, 2012.

CHEN, Y. J. et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5615–5619, 2001.

CHEUNG, K. L.; GRAVES, C. R. L.; ROBERTSON, J. F. R. **Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer** *Cancer Treatment Reviews*, 2000.

CHOUDHARI, M. K. et al. Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: An in vitro study. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

CHUNG, L.-C. et al. Caffeic acid phenethyl ester upregulates N-myc downstream regulated gene 1 via ERK pathway to inhibit human oral cancer cell growth in vitro and in vivo. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 9, p. 1600842, set. 2017.

CHUU, C.-P. et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 5, n. 5, p. 788–97, 2012.

CONTI, B. J.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Chemical composition of the same brazilian propolis sample analyzed in 1997 and in 2012: No freezing effect. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 7, 2015.

DALEPRANE, J. B. et al. Suppression of Hypoxia-Inducible Factor-1 Contributes to the Antiangiogenic Activity of Red Propolis Polyphenols in Human Endothelial Cells. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 441–447, 2012.

DAURA, X. et al. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. **Angew. Chem. Int. Ed**, v. 38, n. 12, 1999.

DU, Q.; WANG, Z.; SCHRAMM, V. L. Human DNMT1 transition state structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 11, 2016.

DUAN, J. et al. Direct interaction between caffeic acid phenethyl ester and human neutrophil elastase inhibits the growth and migration of PANC-1 cells. **Oncology reports**, v. 37, n. 5, p. 3019–3025, maio 2017.

EHRlich, M.; LACEY, M. DNA Hypomethylation and Hemimethylation in Cancer. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l.: s.n.]. v. 754p. 31–56.

ERLANSON, D. A.; CHEN, L.; VERDINE, G. L. DNA methylation through a locally unpaired intermediate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 26, p. 12583–12584, 1993.

ESPADA, J.; ESTELLER, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 2, p. 238–246, abr. 2010.

ESTELLER, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5427–40, 12 ago. 2002.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286–298, 2007.

ESTEVA, F. J.; HORTOBAGYI, G. N. Prognostic molecular markers in early breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 109, 2004.

EVRON, E. et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. **Lancet (London, England)**, v. 357, n. 9265, p. 1335–6, 28 abr. 2001.

EWING, T. J. A.; KUNTZ, I. D. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 1175–1189, 15 jul. 1997.

FANG, M. Z. et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. **Cancer research**, v. 63, n. 22, p. 7563–70, 15 nov. 2003.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

FERREIRA, L. et al. **Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies**.

[s.l: s.n.]. v. 20

FRASER, S. P.; HEMSLEY, F.; DJAMGOZ, M. B. A. Caffeic acid phenethyl ester: Inhibition of metastatic cell behaviours via voltage-gated sodium channel in human breast cancer in vitro. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 71, p. 111–8, fev. 2016.

FRIÓN-HERRERA, Y. et al. Mechanisms underlying the cytotoxic effect of propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma cells. **Natural Product Research**, p. 1–7, 8 ago. 2017.

FROZZA, C. O. DA S. et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 951–963, 2017.

GOLUBNITSCHAJA, O. et al. Breast cancer epidemic in the early twenty-first century: evaluation of risk factors, cumulative questionnaires and recommendations for preventive measures. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 10, p. 12941–12957, 22 out. 2016.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 10, p. 2149–2159, 2011.

GUO, X. et al. Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A. **Nature**, v. 517, n. 7536, p. 640–4, 29 jan. 2015.

GYÖRFFY, B. et al. Aberrant DNA methylation impacts gene expression and prognosis in breast cancer subtypes. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 1, p. 87–97, 2016.

HATTORI, H. et al. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 5392–5401, 2011.

HAUSER, A.-T.; JUNG, M. Targeting epigenetic mechanisms: potential of natural products in cancer chemoprevention. **Planta medica**, v. 74, n. 13, p. 1593–1601, 2008.

HE, Y.-J. et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves beta-catenin associated signaling pathway down-regulation. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 12, n. 31, p. 4981–5, 2006.

HEERBOTH, S. et al. Use of epigenetic drugs in disease: An overview. **Genetics and Epigenetics**, v. 1, n. 6, p. 9–19, 2014.

HERNANDEZ, J. et al. Sonoran propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. **Planta Medica**, v. 73, n. 14, p. 1469–1474, 2007.

HOLM, K. et al. An integrated genomics analysis of epigenetic subtypes in human breast tumors links DNA methylation patterns to chromatin states in normal mammary cells. **Breast cancer research : BCR**, v. 18, n. 1, p. 27, 29 fev. 2016.

HUANG, S. Y. AND ZOU, X. Advances and challenges in Protein-ligand docking. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3016–3034, 2010.

HUANG, S. et al. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**

(Basel, Switzerland), v. 19, n. 12, p. 19610–32, 2014.

HUO, C. et al. Proteasome inhibition in human breast cancer cells with high catechol-O-methyltransferase activity by green tea polyphenol EGCG analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1252–1258, 2009.

HWANG, H. J. et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, n. 5, p. 356–62, 2006.

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

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 2001.

INWALD, E. C. et al. 4-IHC classification of breast cancer subtypes in a large cohort of a clinical cancer registry: use in clinical routine for therapeutic decisions and its effect on survival. **Breast cancer research and treatment**, v. 153, n. 3, p. 647–58, 14 out. 2015.

ISHIHARA, M. et al. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. **Oncology Reports**, v. 22, n. 2, p. 349–354, 2009.

IYER, L. M.; ABHIMAN, S.; ARAVIND, L. Natural history of eukaryotic DNA methylation systems. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 101, p. 25–104, 2011.

IZUTA, H. et al. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 45, 2009.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3s, p. 245–254, 2003.

JASPRICA, I. et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 548–54, 4 abr. 2007.

JIA, D. et al. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 248–251, 2007.

JIN, B.; ROBERTSON, K. D. **DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2013.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–492, 2012.

JUNG, B. et al. Caffeic acid phenethyl ester, a component of beehive propolis, is a novel selective estrogen receptor modulator. **Phytotherapy research : PTR**, v. 24, n. 2, p. 295–300, 2010.

JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. **ChemBioChem**, v. 12, n. 2, p. 206–222, 24 jan. 2011.

KAMIYA, T. et al. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 11065–11070, 2012.

KANG, S.-K.; CHA, S.-H.; JEON, H.-G. Curcumin-induced Histone Hypoacetylation Enhances Caspase-3-dependent Glioma Cell Death and Neurogenesis of Neural Progenitor Cells. **Stem Cells and Development**, v. 15, n. 2, p. 165–174, 2006.

KHAN, M. A. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reverses the expression of various tumor-suppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1976–1984, 2015a.

KHAN, M. A. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reverses the expression of various tumor-suppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells. **Oncology reports**, v. 33, n. 4, p. 1976–84, 13 abr. 2015b.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KLIMASAUSKAS, S. et al. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 357–369, 1994.

KROL, W. et al. Ethanolic extract of propolis augments TRAIL-induced apoptotic death in prostate cancer cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

KUBINA, R. et al. The ethanol extract of polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and Me45 Malignant melanoma cells in vitro conditions. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 2, p. 203–212, 2015.

KUMAR, S. et al. The DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 11 jan. 1994.

KUMAZAKI, M. et al. Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8–9, p. 1070–1077, 2014.

KUNIMASA, K. et al. Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK1/2. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

KUO, H.-C. et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v. 234, n. 2, p. 199–208, 2006.

KUO, Y.-Y. et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Suppresses Proliferation and Survival of TW2.6 Human Oral Cancer Cells via Inhibition of Akt Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 8801–8817, 2013.

KUSTIAWAN, P. M. et al. Propolis from the Stingless Bee *Trigona incisa* from East Kalimantan, Indonesia, Induces In Vitro Cytotoxicity and Apoptosis in Cancer Cell lines. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 16, n. 15, p. 6581–9, 2015.

KUSTIAWAN, P. M. et al. Molecular mechanism of cardol, isolated from *Trigona incisa*

stingless bee propolis, induced apoptosis in the SW620 human colorectal cancer cell line. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 32, 2017.

LAMBERTINI, M. et al. Reproductive behaviors and risk of developing breast cancer according to tumor subtype: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **Cancer treatment reviews**, v. 49, p. 65–76, set. 2016.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 2011.

LEE, K. W. et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B. **Genes & Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 319–22, 2008a.

LEE, W. J.; SHIM, J.-Y.; ZHU, B. T. Mechanisms for the Inhibition of DNA Methyltransferases by Tea Catechins and Bioflavonoids. **Molecular Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 1018–1030, 18 jul. 2005.

LEE, W. J.; ZHU, B. T. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 2, p. 269–277, 2006.

LEE, Y.-J. et al. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 2281–2289, 2003.

LEE, Y. Y. et al. Caffeic acid phenethyl ester preferentially enhanced radiosensitizing and increased oxidative stress in medulloblastoma cell line. **Child's Nervous System**, v. 24, n. 9, p. 987–994, 2008b.

LI, E.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, v. 366, n. 6453, p. 362–365, 1993.

LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v. 69, n. 6, p. 915–926, 1992.

LI, H. et al. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 3, p. 601–606, 2007.

LI, Y.; TOLLEFSBOL, T. O. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 20, p. 2141–2151, 2010.

LIN, H.-P.; JIANG, S. S.; CHUU, C.-P. Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction, Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31286, 2012.

LIU, Z. et al. Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 3, p. 706–709, 2009.

MALDONADO-ROJAS, W.; OLIVERO-VERBEL, J.; MARRERO-PONCE, Y. Computational fishing of new DNA methyltransferase inhibitors from natural products. **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 60, p. 43–54, jul. 2015.

- MATSUO, K. et al. The CpG-specific methylase SssI has topoisomerase activity in the presence of Mg²⁺. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 24, p. 5354–5349, 1994.
- MEDINA-FRANCO, J. L. et al. Natural products as DNA methyltransferase inhibitors: A computer-aided discovery approach. **Molecular Diversity**, v. 15, n. 2, p. 293–304, 2011.
- MEDINA-FRANCO, J. L. et al. Discovery and development of DNA methyltransferase inhibitors using in silico approaches. **Drug discovery today**, v. 20, n. 5, p. 569–577, 2015.
- MEDINA-FRANCO, J. L.; CAULFIELD, T. **Advances in the computational development of DNA methyltransferase inhibitors** *Drug Discovery Today*, 2011.
- MESSERLI, S. M. et al. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 3, p. 423–427, 2009.
- MIRZANIA, M. **Approach to the triple negative breast cancer in new drugs area** *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 2016.
- MORRIS, G.; HUEY, R. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of ...**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.
- MOTAWI, T. K. et al. Modulation of Tamoxifen Cytotoxicity by Caffeic Acid Phenethyl Ester in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 3017108, 2016.
- MOVASSAGH, M.; MUDVARI, P.; HORVATH, A. Co-Occurrence of *COMT* and *BRCA1/2* Variants in a Population. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 21, p. 2090–2091, 25 maio 2017.
- NGUYEN, B. C. Q. et al. Frondoside A from sea cucumber and nymphaeols from Okinawa propolis: Natural anti-cancer agents that selectively inhibit PAK1 &in vitro & Drug Discoveries & Therapeutics, v. 11, n. 2, p. 110–114, 30 maio 2017.
- OHTA, T. et al. Propolis Suppresses Tumor Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 9, p. 2436–2440, 23 set. 2008.
- OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–57, 29 out. 1999.
- OMENE, C. et al. Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. **Journal of cancer science & therapy**, v. 5, n. 10, p. 334–342, 21 out. 2013.
- OMENE, C. O.; WU, J.; FRENKEL, K. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. **Investigational new drugs**, v. 30, n. 4, p. 1279–88, 3 ago. 2012.
- OOI, S. K. T. et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 714–7, 9 ago. 2007.
- OTANI, J. et al. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. **EMBO reports**, v. 10, n. 11, p.

1235–41, 16 nov. 2009.

PARASHAR, G.; PARASHAR, N. C.; CAPALASH, N. – (-) Menthol Induces Reversal of Promoter Hypermethylation and Associated Up-Regulation of the FANCF Gene in the SiHa Cell Line. **doi.org**, n. 5, 2017.

PENG, C.-Y. et al. **Caffeic Acid phenethyl ester inhibits oral cancer cell metastasis by regulating matrix metalloproteinase-2 and the mitogen-activated protein kinase pathway**Evid. Based. Complement. Alternat. Med., 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/732578>><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320037><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535744>>All Papers/P/Peng et al. 2012 - Caffeic Acid phenethyl ester inhibits oral cancer ce ... x metalloproteinase-2 a>

PENG, C.-Y. et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits Oral Cancer Cell Metastasis by Regulating Matrix Metalloproteinase-2 and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–10, 2012b.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

POPOLO, A. et al. Antiproliferative activity of brown cuban propolis extract on human breast cancer cells. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, 2009.

POPOLO, A. . et al. Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 89, n. 1, p. 50–57, 2011.

PUSZTAI, L. et al. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. **The oncologist**, v. 11, n. 8, p. 868–77, 2006.

QIU, C. et al. The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. **Nature Structural Biology**, 2002.

RAKHA, E. A.; GREEN, A. R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. **Pathology**, v. 49, n. 2, p. 111–119, fev. 2017.

RENBAUM, P. et al. Cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of the gene coding for the CpG DNA methylase from Spiroplasma sp. strain MQ1 (M Sssl). **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 1145–1152, 1990.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 8, p. 597–610, 2005.

RONDELET, G. et al. Structural basis for recognition of histone H3K36me3 nucleosome by human de novo DNA methyltransferases 3A and 3B. **Journal of Structural Biology**, v. 194, n. 3, p. 357–367, 2016.

ROSENBLOOM, K. R. et al. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D670–D681, 2015.

ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; BAYLIN, S. B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. **Nature genetics**, v. 25, n. 3, p.

269–77, 1 jul. 2000.

ROY, N. et al. Plant phenolics ferulic acid and P-coumaric acid inhibit colorectal cancer cell proliferation through EGFR down-regulation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 8, p. 4017–4021, 2016.

RYU, S. et al. Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 12, p. 3786–3797, dez. 2017.

RZEPECKA-STOJKO, A. et al. Caffeic Acid phenethyl ester and ethanol extract of propolis induce the complementary cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 5, p. 9242–62, 20 maio 2015.

SAENGLER, S. et al. Cytotoxic effects of peanut phenolics possessing histone deacetylase inhibitory activity in breast and cervical cancer cell lines. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1102–1110, 2016.

SANTI, D. V.; NORMENT, A.; GARRETT, C. E. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 22, p. 6993–7, nov. 1984.

SEDA VATANSEVER, H. et al. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. **Acta Histochemica**, v. 112, n. 6, p. 546–556, 2010.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1–2, p. 243–249, 2000.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253–260, 2011.

SFORCIN, J. M.; NOVELLI, E. L. B.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 244–254, 2002.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. **Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2015.

SIM. **SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE MORTALIDADE**. Disponível em: <<http://svs.aids.gov.br/cgiae/sim/>> acesso em novembro 2016>. Acesso em: 20 jun. 2011.

SONG, J. et al. Structure of DNMT1-DNA Complex Reveals a Role for Autoinhibition in Maintenance DNA Methylation. **Science**, v. 331, n. 6020, p. 1036–1040, 2011.

SONG, Y. S. et al. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 2–3, p. 89–95, 2002.

SRIVASTAVA, R. K. et al. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1). **Cell Cycle**, v. 6, n. 23, p. 2953–2961, 2007.

STEFANSSON, O. A. et al. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. **Molecular Oncology**, v. 9, n. 3, p. 555–568, 2015.

SULAIMAN, G. M. et al. Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1632–1641, 2012.

SYEDA, F. et al. The Replication Focus Targeting Sequence (RFTS) Domain Is a DNA-competitive Inhibitor of Dnmt1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 17, p. 15344–15351, 29 abr. 2011.

SZILÁRD, P. et al. Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. In: [s.l.] Springer, Cham, 2015. p. 3–27.

SZLISZKA, E. et al. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 4, p. 941–953, 2011.

SZLISZKA, E. et al. Ethanolic extract of polish propolis: Chemical composition and TRAIL-R2 death receptor targeting apoptotic activity against prostate cancer cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012.

THIRUGNANASAMPANDAN, R.; RAVEENDRAN, S. B.; JAYAKUMAR, R. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 651–4, ago. 2012.

TSENG, T.-H. et al. Activation of neutral-sphingomyelinase, MAPKs, and p75 NTR-mediated caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis in C6 glioma cells. **Journal of biomedical science**, v. 21, n. 1, p. 61, 5 jul. 2014.

TSUCHIYA, I. et al. Nymphaeol-a isolated from okinawan propolis suppresses angiogenesis and induces caspase-dependent apoptosis via inactivation of survival signals. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

UICC. **TNM**. Disponível em: <<http://www.uicc.org/resources/tnm>>.

UMTHONG, S. et al. In vitro antiproliferative activity of partially purified Trigona laeviceps propolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 37, 2011.

UTISPAN, K.; CHITKUL, B.; KOONTONGKAEW, S. Cytotoxic Activity of Propolis Extracts from the Stingless Bee Trigona Sirindhornae Against Primary and Metastatic Head and Neck Cancer Cell Lines. v. 18, p. 1051–1055, 2017.

VALENÇA, I. et al. Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, 2013.

VALENTE, M. J. et al. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 86–92, 2011.

WATABE, M. et al. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 7, p. 6017–26, 13 fev. 2004.

WATANABE, M. A. E. et al. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 63, n. 11, p. 1378–86, nov. 2011.

WU, J. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. **Cancer letters**, v. 308, n. 1, p. 43–53, 1 set. 2011.

XIANG, L.-P. et al. Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 458, 28 jul. 2016.

YAMAGUCHI, M. et al. The flavonoid p-hydroxycinnamic acid mediates anticancer effects on MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro: Implications for suppression of bone metastases. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 4, p. 1563–1571, 2015.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 1, p. 37–50, jan. 2006.

YOO, J.; CHOI, S.; MEDINA-FRANCO, J. L. Molecular modeling studies of the novel inhibitors of DNA methyltransferases SGI-1027 and CBC12: implications for the mechanism of inhibition of DNMTs. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62152, 25 abr. 2013.

ZHANG, Y. et al. Green tea polyphenol EGCG reverse cisplatin resistance of A549/DDP cell line through candidate genes demethylation. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 69, p. 285–90, fev. 2015a.

ZHANG, Z.-M. et al. Crystal Structure of Human DNA Methyltransferase 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 15, p. 2520–2531, 2015b.

ZHANG, Z.-M. et al. Crystal Structure of Human DNA Methyltransferase 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 15, p. 2520–2531, 31 jul. 2015c.

ZHOU, L. et al. Zebularine: A novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. **Journal of Molecular Biology**, v. 321, n. 4, p. 591–599, 2002.

ZWERGEL, C.; VALENTE, S.; MAI, A. DNA Methyltransferases Inhibitors from Natural Sources. **Curr Top Med Chem**, p. 680–696, 2015.

Anexos e Apêndices

ANEXO

Anexo 1. Nomenclatura dos aminoácidos, símbolos e código de uma letra (abreviação).

Aminoácido	Símbolo	Código de uma letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

APÊNDICE

Apêndice 1. Dados da análise de *docking* molecular dos compostos químicos derivados da própolis. Os gráficos da distribuição dos tamanhos de *clusters* em relação ao *score* obtido por estrutura central de cada *cluster* estão apresentados nas figuras 1 a 9 e os diagramas representado os contatos ligantes, em destaque para os contatos em comum com SAH-domínio MTase da DNMT1 estão apresentados nas figuras 10 a 18.

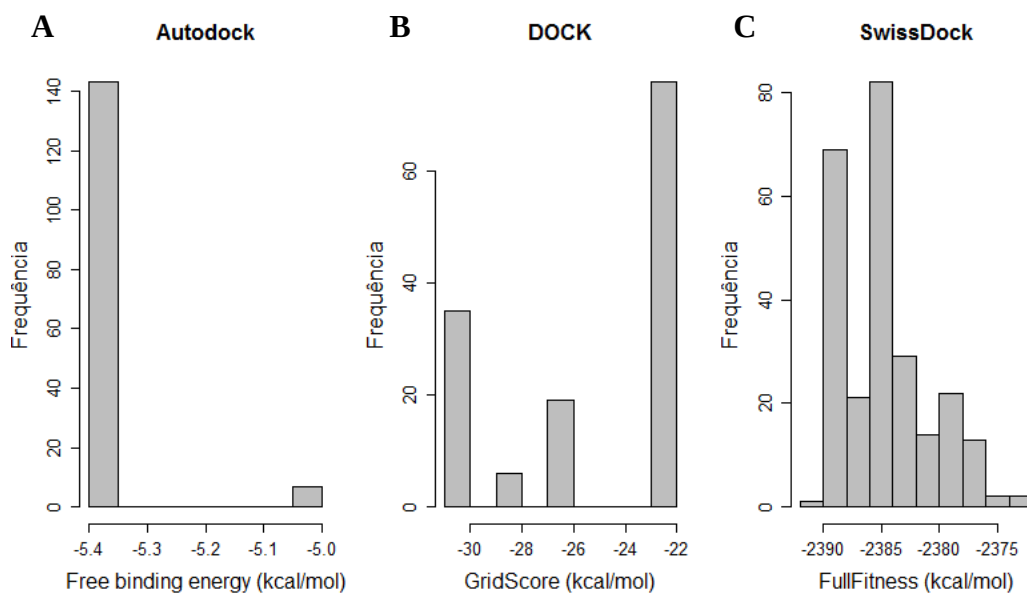


Figura 1. Distribuição de *clusters* dos resultados de *docking* de ácido cafeico em relação ao *score* obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* foram dados em kcal/mol.

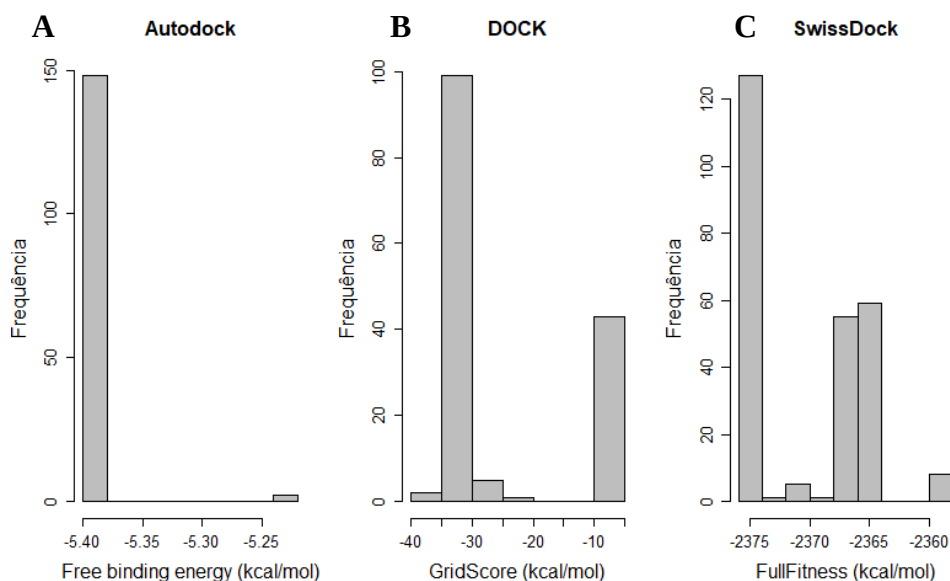


Figura 2. Distribuição de *clusters* dos resultados de *docking* de ácido ferúlico em relação ao *score* obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* foram dados em kcal/mol.

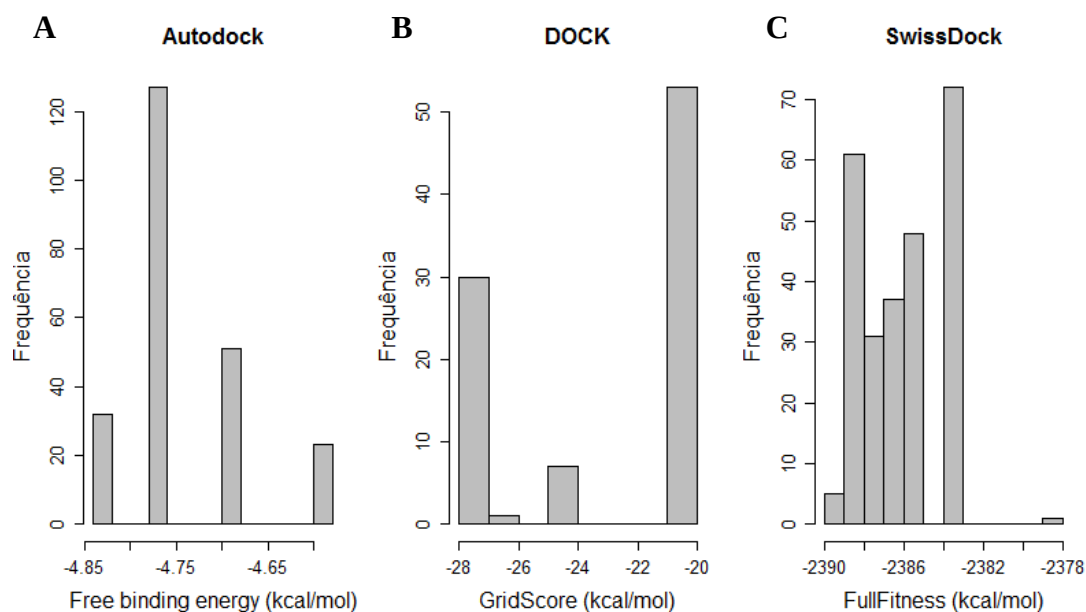


Figura 3. Distribuição de *clusters* dos resultados de *docking* de ácido hidrocinâmico em relação ao score obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* foram dados em kcal/mol.

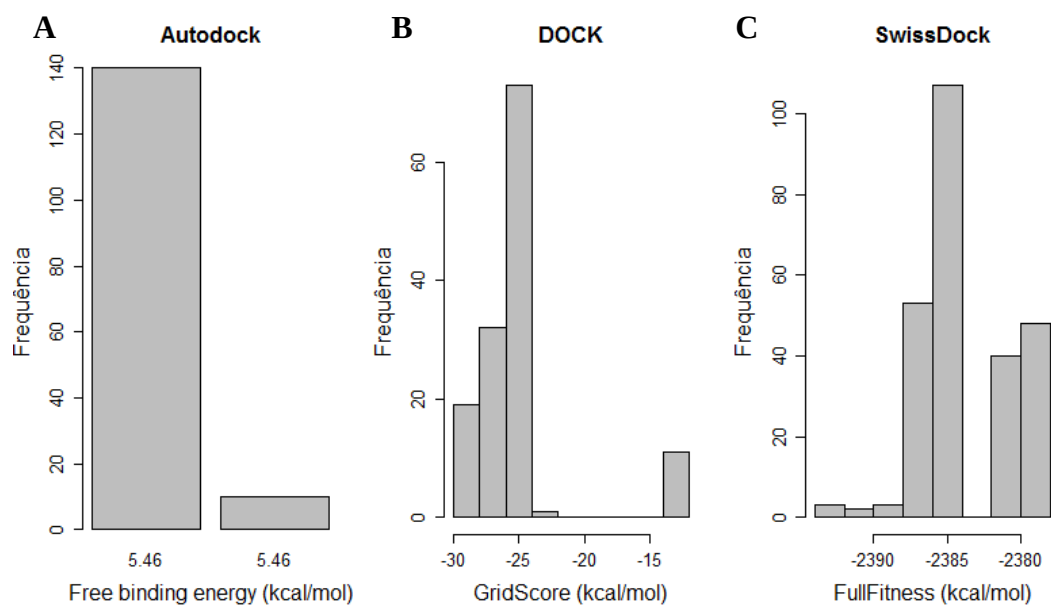


Figura 4. Distribuição de *clusters* dos resultados de *docking* de ácido p-cumárico em relação ao score obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* foram dados em kcal/mol.

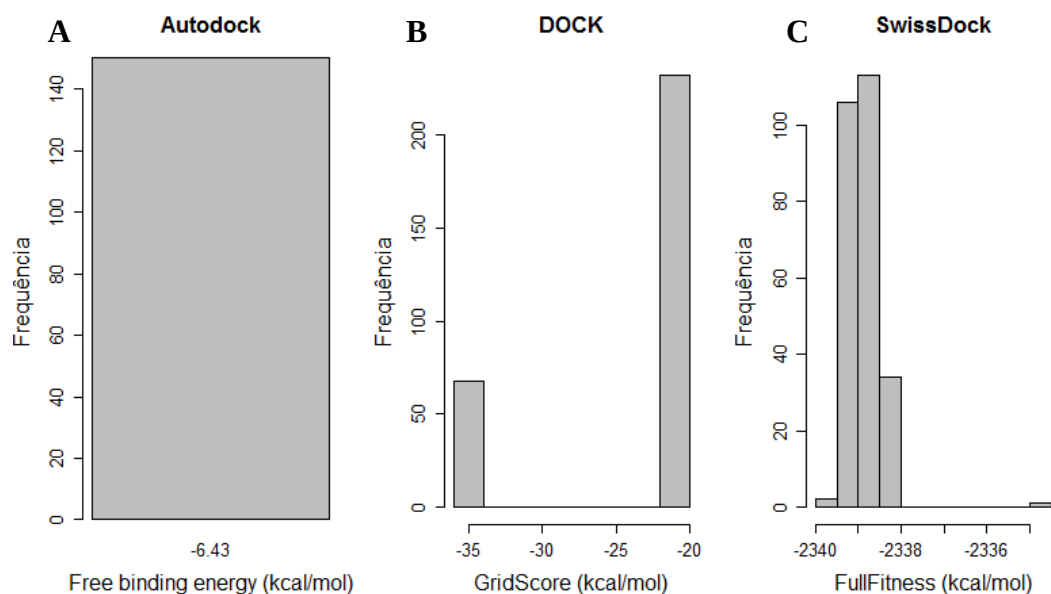


Figura 5. Distribuição de *clusters* dos resultados de *docking* de kaempferide em relação ao score obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* foram dados em kcal/mol.

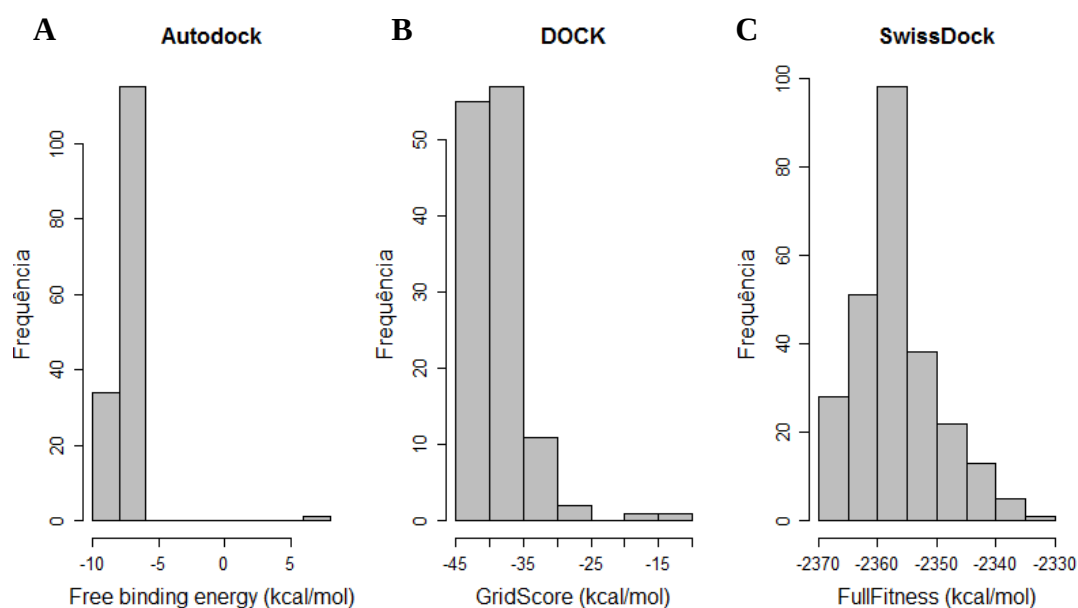


Figura 6. Distribuição de *clusters* dos resultados de *docking* de CAPE em relação ao score obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* foram dados em kcal/mol.

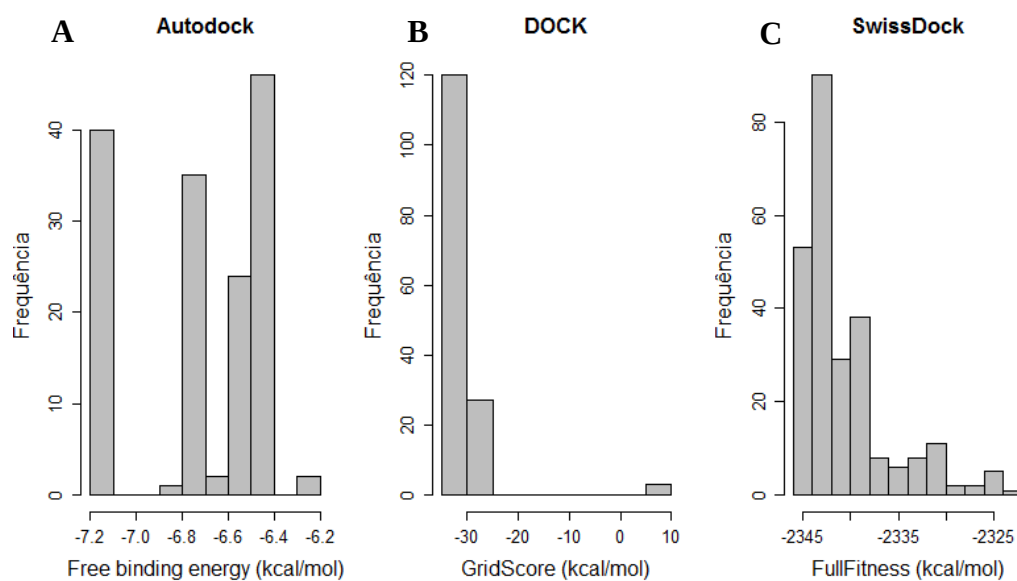


Figura 7. Distribuição de *clusters* dos resultados de *docking* de benzil benzoato em relação ao score obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* foram dados em kcal/mol.

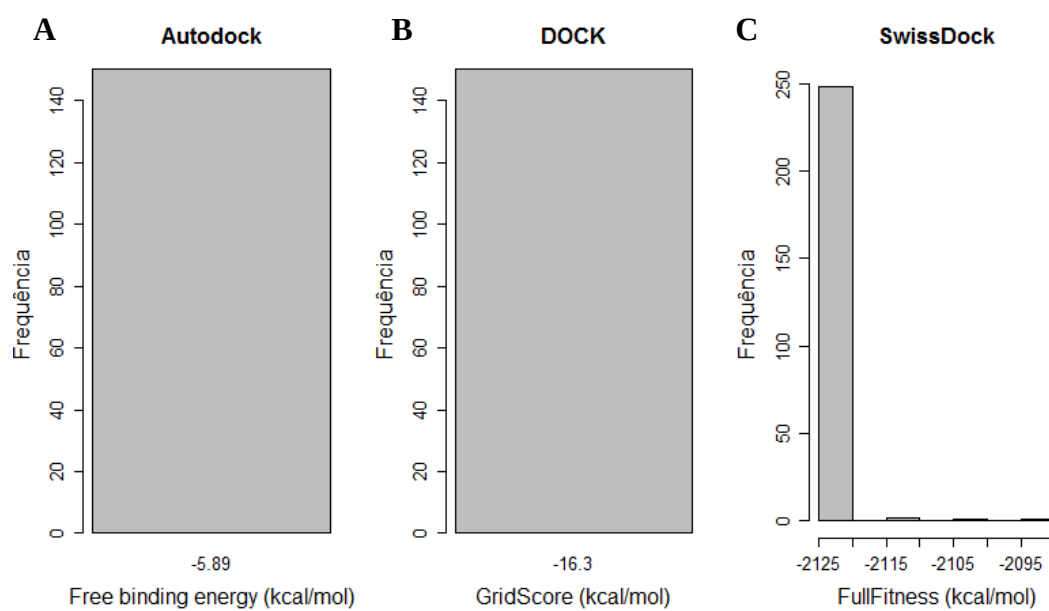


Figura 8. Distribuição de *clusters* dos resultados de *docking* de espatulenol em relação ao score obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os *scores* foram dados em kcal/mol.

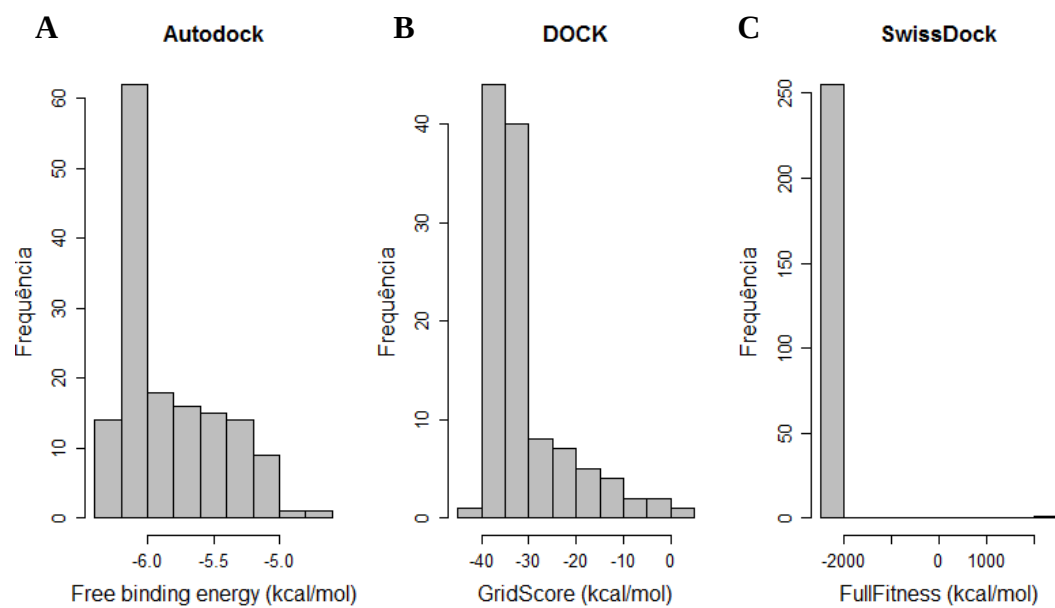


Figura 9. Distribuição de *clusters* dos resultados de *docking* de (2E,6Z)-farnesol em relação ao score obtido por cada estrutura central. **A)** Autodock. **B)** DOCK. **C)** SwissDock. Todos os scores foram dados em kcal/mol.

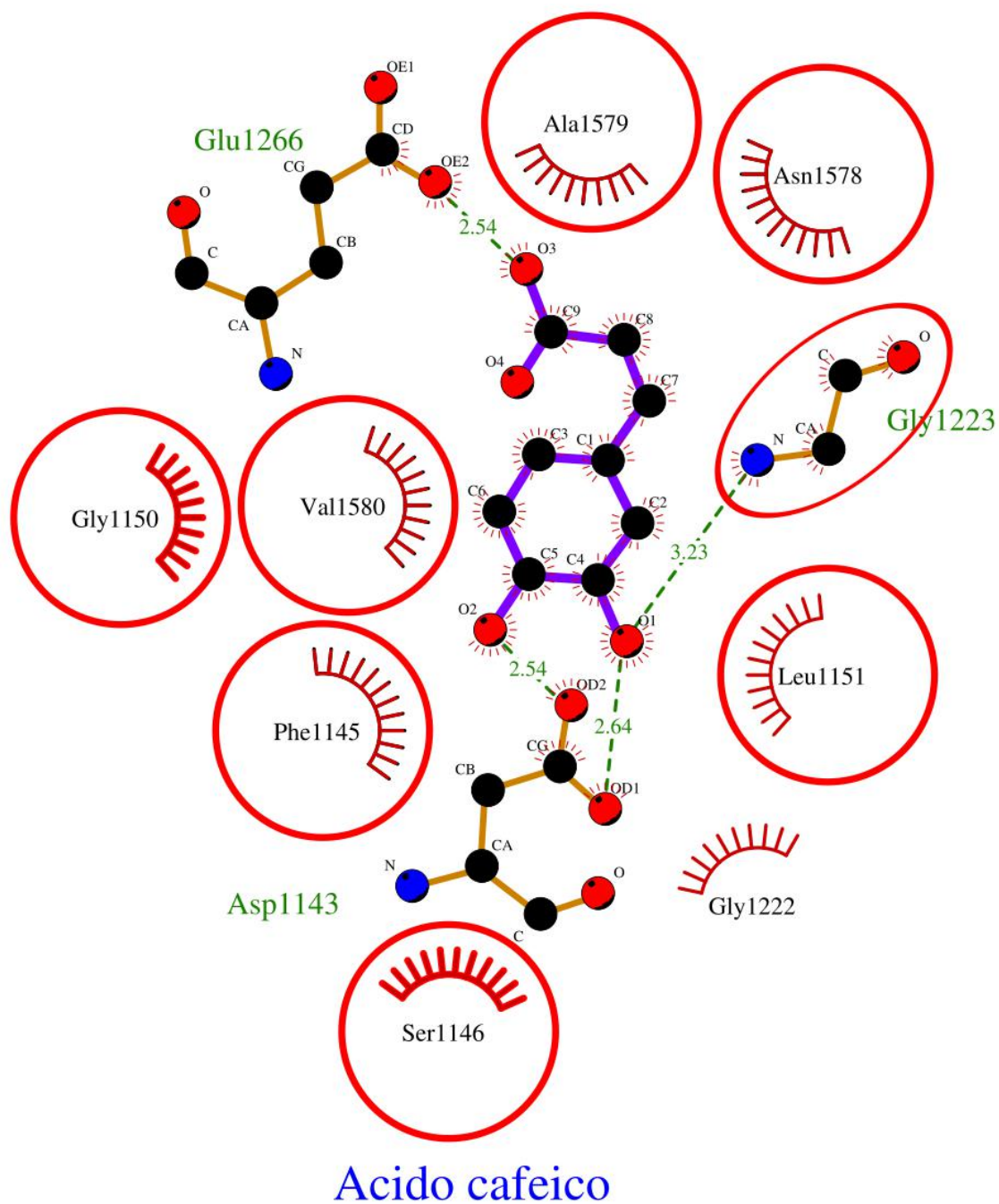
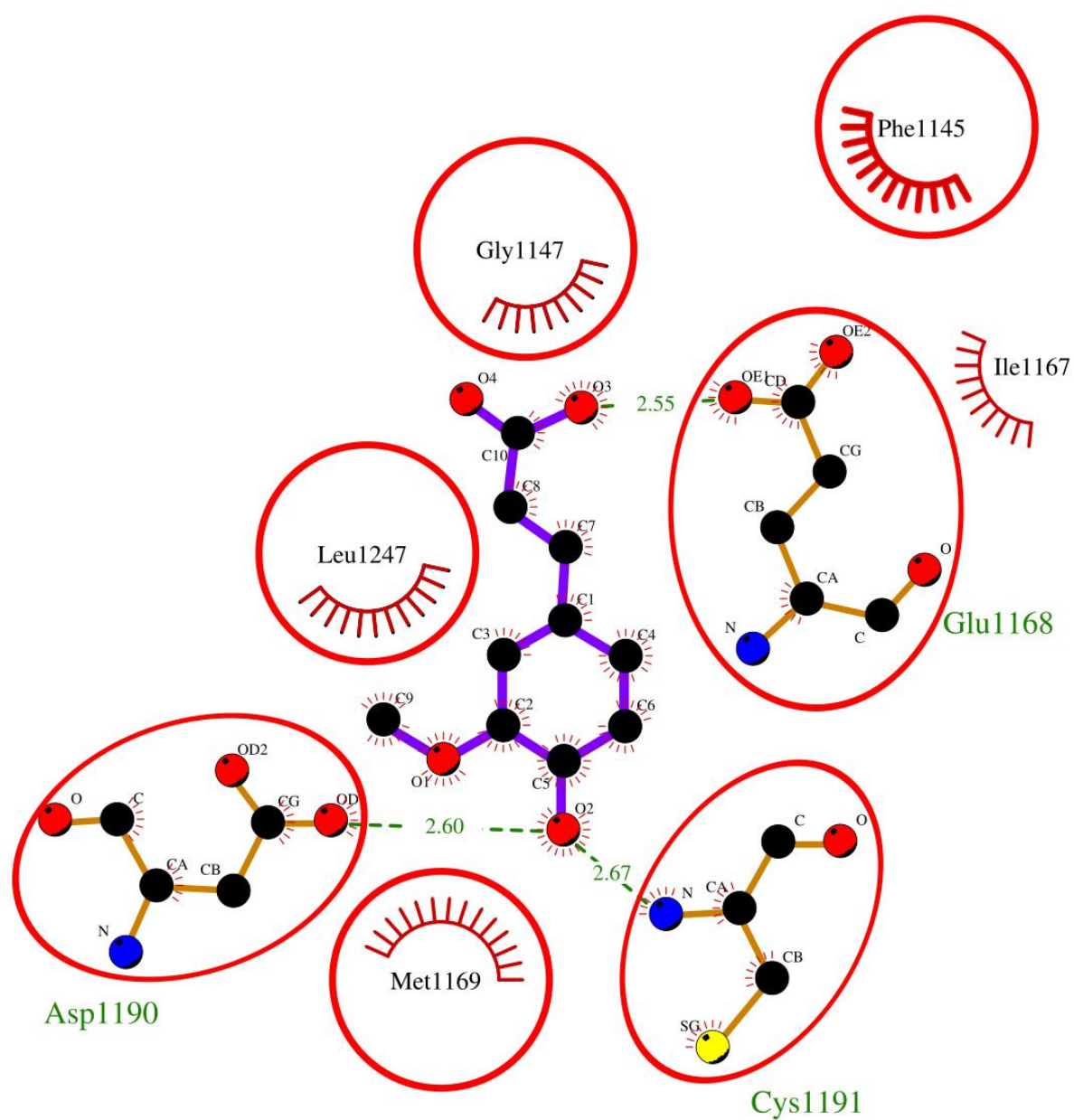
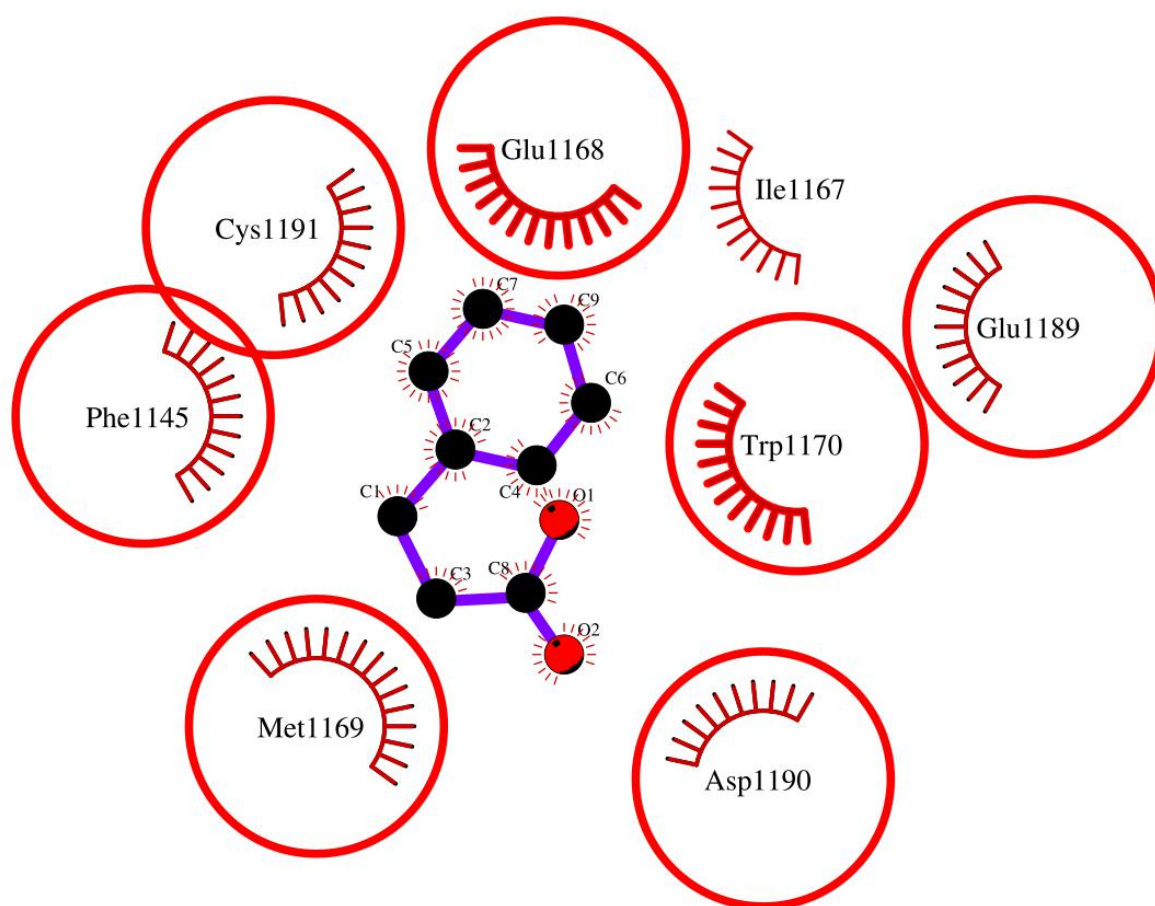


Figura 10. Interações obtidas por *docking* molecular entre ácido cafeico e o domínio MTase. Com destaque para os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio de comprimentos específicos (verde) e interações hidrofóbicas (vermelho escuro). Os aminoácidos circutados em vermelho são comuns entre a conformação obtida por *docking* e SAH-Mtase. Figura obtida com o programa LigPlot+.



Acido ferulico

Figura 11. Interações obtidas por *docking* molecular entre ácido ferúlico e o domínio MTase. Com destaque para os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio de comprimentos específicos (verde) e interações hidrofóbicas (vermelho escuro). Os aminoácidos circutados em vermelho são comuns entre a conformação obtida por *docking* e SAH-Mtase. Figura obtida com o programa LigPlot+.



Acido hidrocínamico

Figura 12. Interações obtidas por *docking* molecular entre ácido hidrocínâmico e o domínio MTase. Com destaque para os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio de comprimentos específicos (verde) e interações hidrofóbicas (vermelho escuro). Os aminoácidos circutados em vermelho são comuns entre a conformação obtida por *docking* e SAH-Mtase. Figura obtida com o programa LigPlot+.

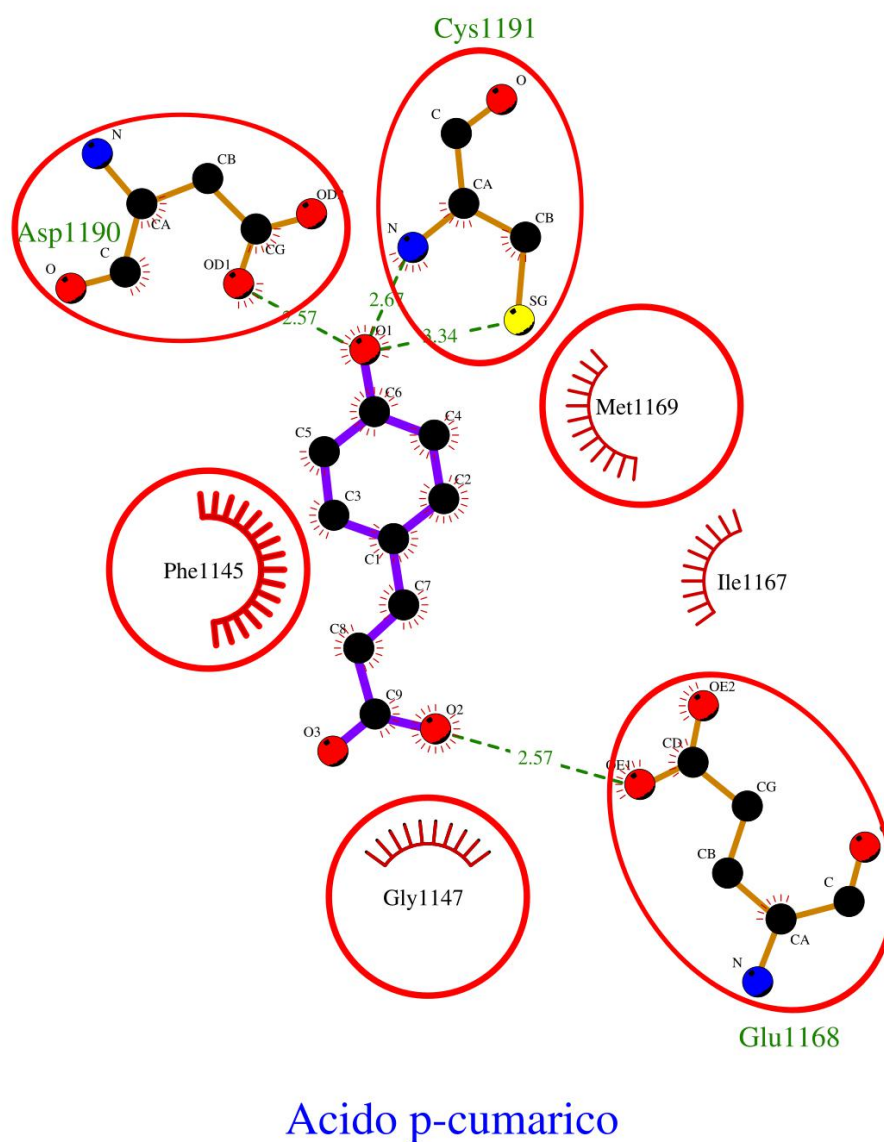
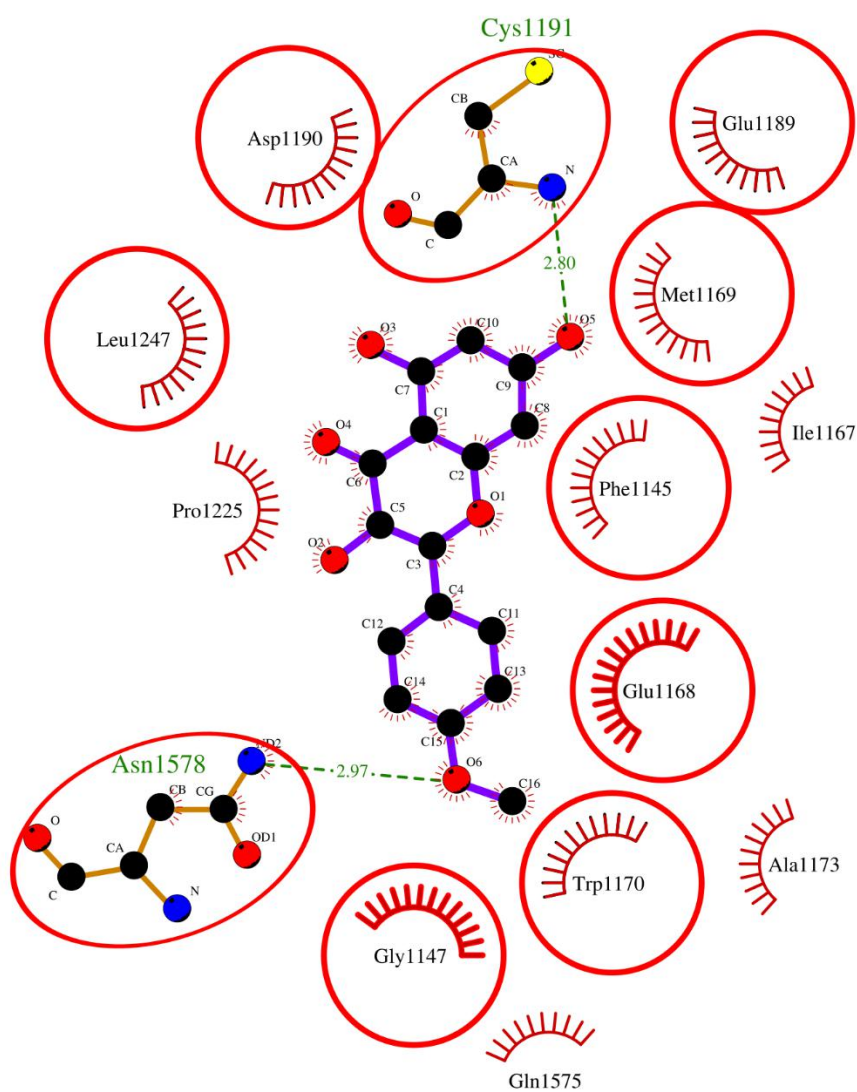


Figura 13. Interações obtidas por *docking* molecular entre ácido p-cumárico e o domínio MTase. Com destaque para os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio de comprimentos específicos (verde) e interações hidrofóbicas (vermelho escuro). Os aminoácidos circulados em vermelho são comuns entre a conformação obtida por *docking* e SAH-Mtase. Figura obtida com o programa LigPlot+.



Kaempferide

Figura 14. Interações obtidas por *docking* molecular entre kaempferide e o domínio MTase. Com destaque para os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio de comprimentos específicos (verde) e interações hidrofóbicas (vermelho escuro). Os aminoácidos circutados em vermelho são comuns entre a conformação obtida por *docking* e SAH-Mtase. Figura obtida com o programa LigPlot+.

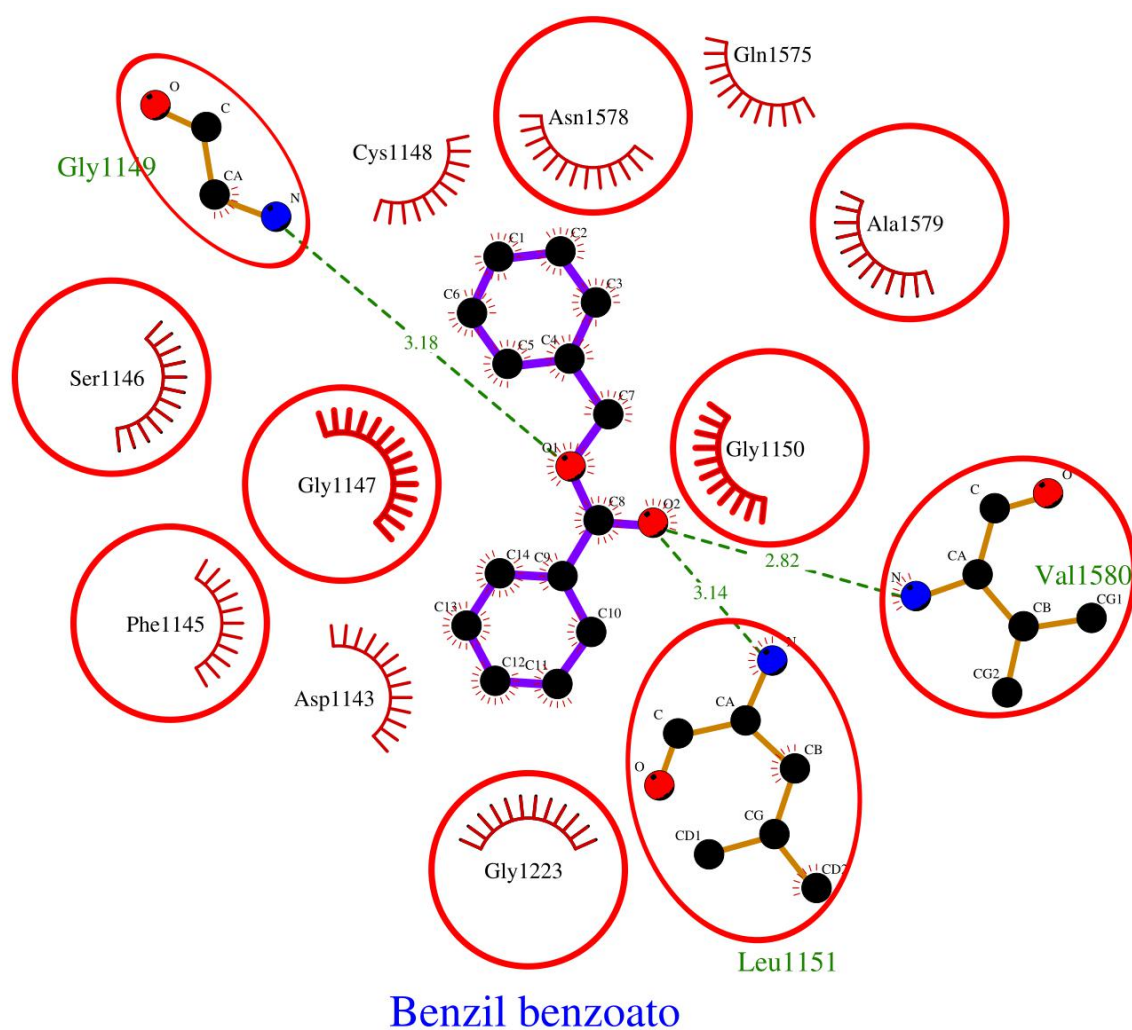


Figura 15. Interações obtidas por *docking* molecular entre benzil benzoato e o domínio MTase. Com destaque para os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio de comprimentos específicos (verde) e interações hidrofóbicas (vermelho escuro). Os aminoácidos circulados em vermelho são comuns entre a conformação obtida por *docking* e SAH-Mtase. Figura obtida com o programa LigPlot+.

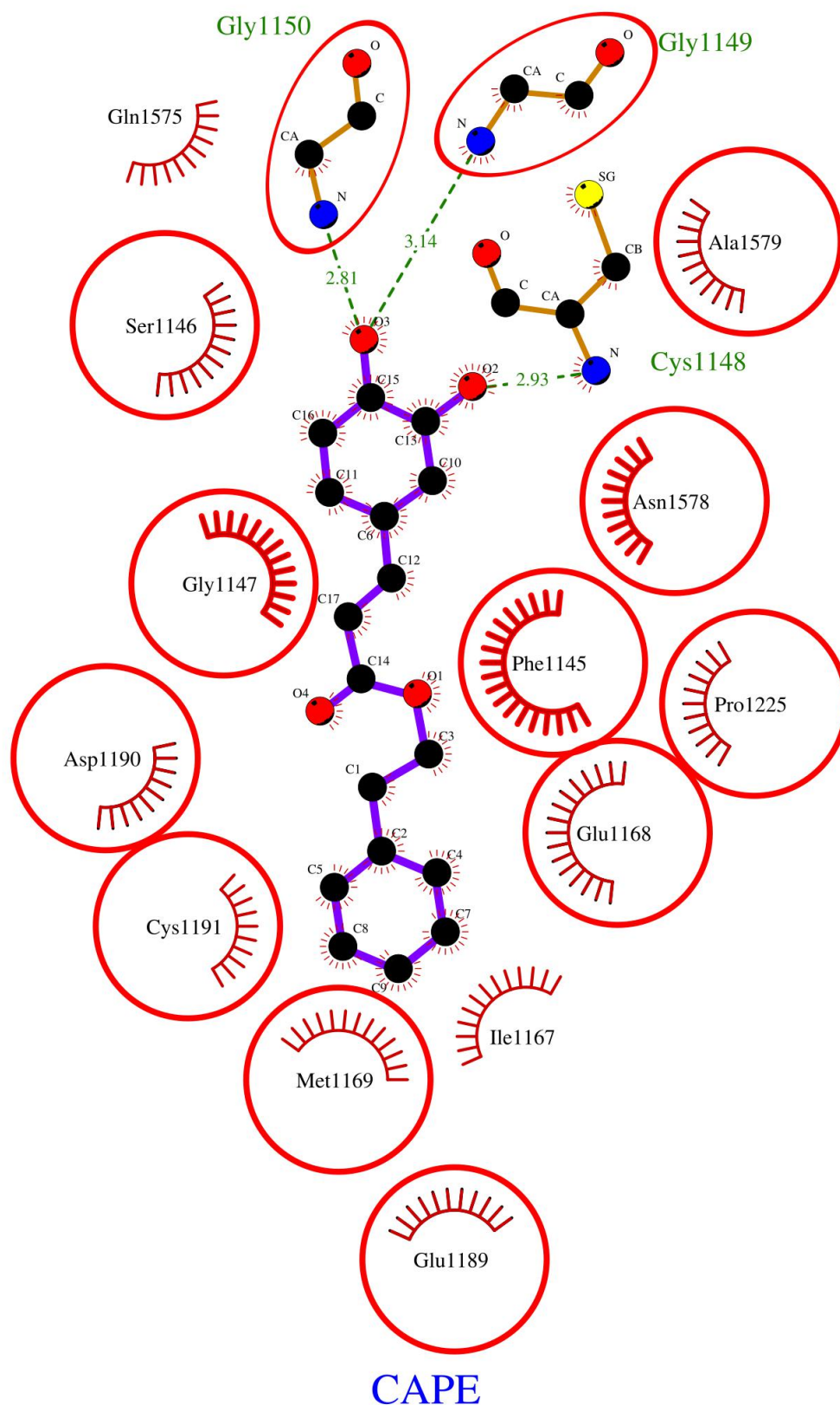


Figura 16. Interações obtidas por *docking* molecular entre CAPE e o domínio MTase. Com destaque para os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio de comprimentos específicos (verde) e interações hidrofóbicas (vermelho escuro). Os aminoácidos circutados em vermelho são comuns entre a conformação obtida por *docking* e SAH-Mtase. Figura obtida com o programa LigPlot+.

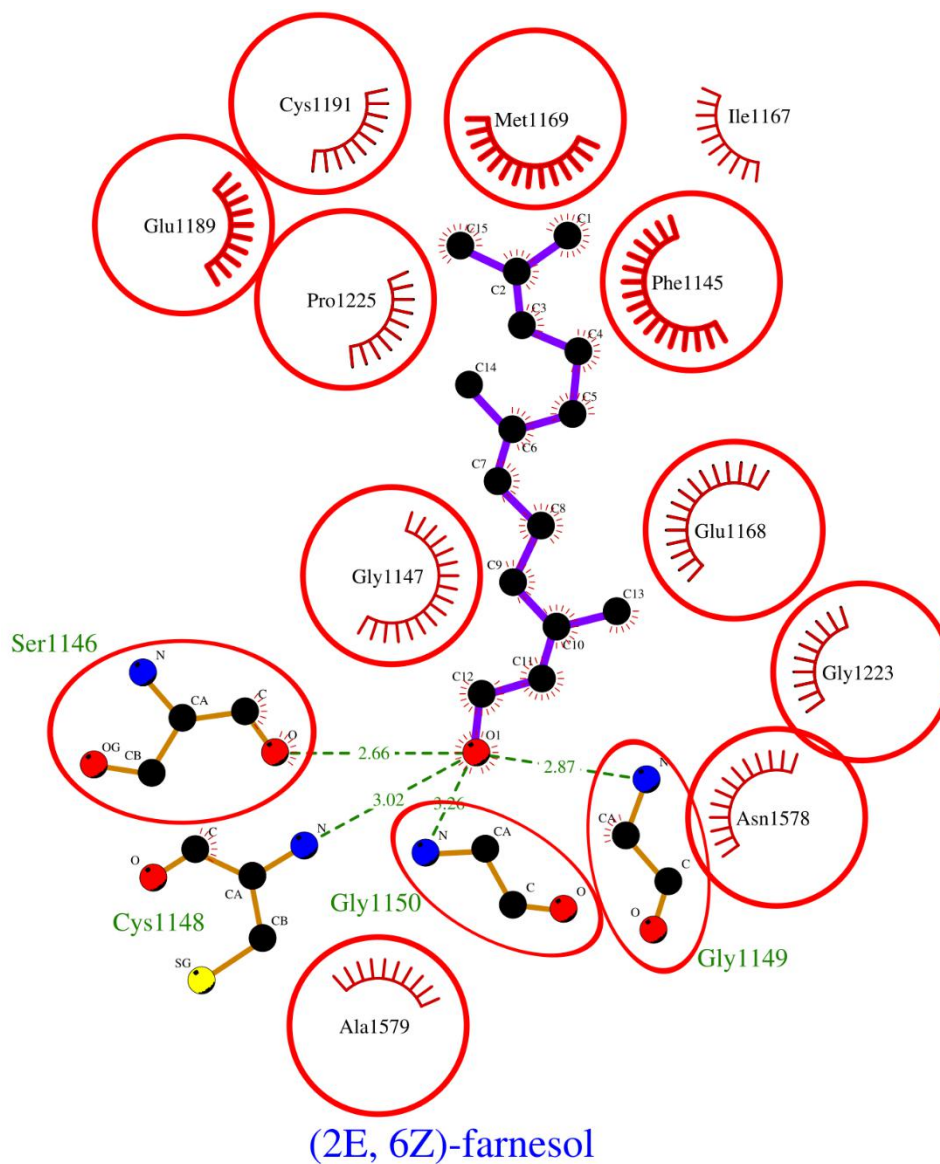
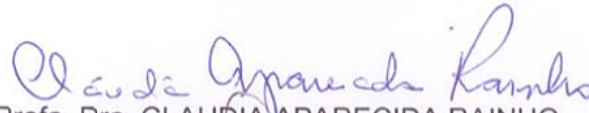
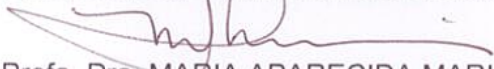


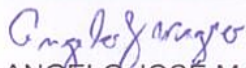
Figura 17. Interações obtidas por *docking* molecular entre (2E,6Z)-farnesol e o domínio MTase. Com destaque para os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio de comprimentos específicos (verde) e interações hidrofóbicas (vermelho escuro). Os aminoácidos circulosados em vermelho são comuns entre a conformação obtida por *docking* e SAH-Mtase. Figura obtida com o programa LigPlot+.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JOÃO HENRIQUE MAIA ASSUMPÇÃO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 29 dias do mês de setembro do ano de 2017, às 14:00 horas, no(a) Sala de Pós-Graduação do IBB, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. CLAUDIA APARECIDA RAINHO - Orientador(a) do(a) Departamento de Genética / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES do(a) Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP, Prof. Dr. ANGELO JOSÉ MAGRO do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JOÃO HENRIQUE MAIA ASSUMPÇÃO, intitulada **Potencial efeito epigenético do extrato de própolis brasileira e de seus componentes sobre linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. CLAUDIA APARECIDA RAINHO


Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES


Prof. Dr. ANGELO JOSÉ MAGRO