

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**RAYRA JORDANA SILVA PEREIRA**

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS EXTRATOS HIDROMETANÓLICO E  
ACETATO DE ETILA DE *Sabicea brasiliensis* EM MODELOS CELULARES DE  
CÂNCER DE MAMA**

**PATOS DE MINAS - MG**

**MAIO DE 2019**

**RAYRA JORDANA SILVA PEREIRA**

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS EXTRATOS HIDROMETANÓLICO E  
ACETATO DE ETILA DE *Sabicea brasiliensis* EM MODELOS CELULARES DE  
CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientadora: Dra. Thaise Gonçalves de Araújo**

**PATOS DE MINAS-MG**

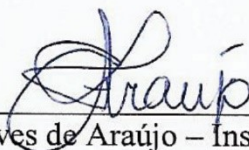
**MAIO DE 2019**

**RAYRA JORDANA SILVA PEREIRA**

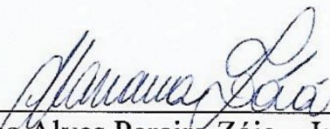
**Atividade antiproliferativa dos extratos hidrometanólico e acetato de etila de *Sabicea brasiliensis* em modelos celulares de câncer de mama**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:



\_\_\_\_\_  
Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – Instituto de Biotecnologia- UFU  
Presidente



\_\_\_\_\_  
MSc. Mariana Alves Pereira Zóia – Instituto de Biotecnologia- UFU  
Membro



\_\_\_\_\_  
MSc. Douglas Cardoso Brandão – Instituto de Biotecnologia- UFU  
Membro

Patos de Minas – MG, 27 de maio de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Hoje um ciclo se encerra, foram anos de estudos, oportunidades, conhecimento e crescimento. Finalizo a graduação com imensa gratidão a Deus que me fortaleceu quando estive desanimada, que iluminou essa jornada com pessoas incríveis que me apoiaram e lutaram comigo em busca desta conquista realizada.

Sou grata aos meus pais Adailton Marcelino da Silva e Rivânia Lusia Pereira, que são meu alicerce, me ajudaram nos momentos de indecisão, me acalmaram quando estive em conflito, e comemoram imensamente felizes o encerramento deste ciclo.

A minha irmã Raflésia Jovanka Pereira Melo, minha grande conselheira, agradeço pela paciência, compreensão e por todo carinho.

A minha Tia Nice, minha mãe de consideração que sempre esteve ao meu lado, acompanhou o meu crescimento, e me cuidou com muito amor.

As minhas primas Ana Flávia, Isabela, Mariane e Marina, pelo apoio, atenção e carinho.

A toda minha família, meu exemplo de união e amor.

A Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de fazer parte desta equipe, pelos professores capacitados e pelos colegas que fiz amizade.

A orientadora Dra. Thaise Gonçalves de Araújo pelos ensinamentos que foram de suma importância para o meu crescimento e desenvolvimento deste trabalho. Pela compreensão, conselhos, confiança, e por ser um exemplo de profissionalismo.

Ao grupo Gbio, aos colegas e técnicos que estiveram comigo em cada experimento, me orientando para que tudo ocorresse perfeitamente. Em especial aos colegas Antonielle, Douglas e Paula, que estiveram junto a mim, auxiliando a cada experimento.

## RESUMO

O Câncer de Mama (CM) é uma das neoplasias mais temida pelas mulheres. O diagnóstico é comumente encarado com dificuldade e o tratamento quimioterápico ainda ocasiona efeitos colaterais debilitantes. O estudo de produtos naturais como drogas antineoplásicas tem se mostrado promissor, ao permitir identificar substâncias com atividade antitumoral controlando a multiplicação de células transformadas. A *Sabicea brasiliensis*, L. conhecida popularmente como sangue-de-cristo, é encontrada nas regiões de cerrado do Brasil. Algumas propriedades medicinais são atribuídas a esta planta como anti-inflamatória, antioxidante e antinociceptiva. Contudo, seu efeito sobre células tumorais mamárias ainda é pouco estudado. Neste estudo objetivou-se avaliar o efeito antiproliferativo dos extratos hidrometanólico e acetato de etila de *Sabicea brasiliensis*, L. nas linhagens mamárias MCF-7 (tumorigênica de fenótipo luminal) e MDA-MB231 (tumorigênica de fenótipo triplo-negativo) por meio do ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide). Todas as células foram devidamente cultivadas até atingirem 80% de confluência. Para o teste de viabilidade foram utilizadas as seguintes concentrações dos extratos 1ug/uL, 0,5ug/uL, 0,25ug/uL e 0,125ug/uL, 0,0625ug/uL, 0,03125ug/uL, 0,015625ug/uL e 0,0078125ug/uL e as células tratadas por 24h e 48h. Para o extrato hidrometanólico, na concentração de 1ug/uL, verificou-se efeito citotóxico para as células MCF-7, quando comparadas ao controle de tratamento com diluente e à linhagem MDA-MB231. O extrato acetato de etila apresentou comportamento peculiar, inibindo a proliferação da linhagem luminal após 24 horas de tratamento quando na menor concentração e, após 48 horas, esse comportamento foi verificado apenas na concentração de 1ug/uL. Apesar de intrigante, seus compostos majoritários necessitam ser avaliados, assim como seus mecanismos de ação em células tumorais mamárias.

**Palavras-chave:** câncer de mama, MTT, produtos naturais, cerrado.

## **ABSTRACT**

*Breast cancer is one of the most feared neoplasms by women. The diagnosis is commonly faced with difficulty and chemotherapy still causes side effects. The research on natural products as antineoplastic drugs is promising, allowing the identification of antitumor compounds that can control the proliferation of transformed cells. Sabicea brasiliensis is a plant usually found in Brazilian savanna, and exhibits medical properties such as anti-inflammatory, antioxidant and antinociceptive activities. The objective of this study was to evaluate the antiproliferative effect of the hydromethanolic and the ethyl acetate extracts from Sabicea brasilienses on the mammary lineages MCF-7 (tumorigenic with luminal phenotype) and MDA-MB231 (tumorigenic with triple negative phenotype) through MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide) assay. All cells were properly cultivated until reached 80% confluence. For the cell viability assay the extracts were used in the following concentrations 1ug/uL, 0,5ug/uL, 0,25ug/uL e 0,125ug/uL, 0,0625ug/uL, 0,03125ug/uL, 0,015625ug/uL e 0,0078125ug/uL and the cells treated for 24h and 48h. The hydromethanolic extract, in 1ug/uL concentration, presented cytotoxic effect to the MCF-7 cell, when compared to the control treated with diluent and to the MDA-MB231 lineage. The ethyl acetate extract demonstrated a peculiar behavior, inhibiting the proliferation of the luminal lineage upon 24 hours of treatment in its lower concentration. After 48 hours, this behavior was verified only for the treatment with 1ug/uL. Despite its intriguing behavior, the majority compounds need to be evaluated, as well as their mechanisms of action in the mammary tumor cells.*

**Keywords:** breast cancer, MTT, natural products, cerrado.

## LISTA DE ABREVIATURAS

*BRCA1: (BreastCancer1)*

*BRCA2: (BreastCancer 2)*

CDI: Carcinoma ductal invasivo

CDIS: Carcinoma ductal *in situ*

CLIS: Carcinoma lobular *in situ*

CM: Câncer de Mama

DMSO: Dimetilsulfóxido

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico

HER2: Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

OMS: Organização Mundial da Saúde

PN: Produtos naturais

RE: Receptor de estrógeno

RP: Receptor de progesterona

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	9
2.1 A mama, sua transformação maligna e opções de tratamento .....	9
2.2 Os produtos naturais e sua perspectiva na oncologia.....	15
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Obtenção do extrato e cultivo celular .....	19
4.2 Ensaio de MTT .....	19
4.3 Análises estatísticas .....	20
5 RESULTADOS .....	20
6 DISCUSSÃO.....	23
7CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS .....	27



## 1 INTRODUÇÃO

O Câncer de Mama (CM) permanece como um tipo de tumor altamente incidente no mundo, sendo associado a diferentes fatores, incluindo à predisposição genética, maus hábitos alimentares, exposição a fatores carcinogênicos e estímulo hormonal ao longo da vida (SKOL et al., 2016; LIMA et al., 2018). As principais estratégias de tratamento incluem a radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, hormonioterapia e cirurgia. No tratamento quimioterápico, são introduzidos fármacos citotóxicos para o controle ou a cura da doença, alvejando também células tumorais circulantes (SILVA et al., 2017). Porém, este tratamento também atinge células normais, o que resulta em efeitos colaterais indesejáveis como vômitos, disfunção cognitiva, náuseas e queda de cabelo (MYERS et al., 2016; SHAPOSHNIKOV et al., 2017). Nesse sentido, o CM ainda é muito temido pelas mulheres, sobretudo devido aos efeitos terapêuticos, o que evidencia a necessidade de se desenvolver novos medicamentos.

Os produtos naturais têm se destacado ao se mostrarem menos agressivos e mais efetivos, quando comparados aos medicamentos sintéticos. De fato, ao longo da evolução humana, muitas espécies vegetais foram empiricamente exploradas com finalidade terapêutica. Contudo, a análise minuciosa de suas ações e de seus constituintes permitiu o desenvolvimento de novos agentes, inclusive com ação antitumoral.

O Brasil é um país que se destaca por sua biodiversidade e o cerrado vem sendo estudado enquanto bioma potencialmente promissor. Algumas de suas plantas apresentam atividade terapêutica como antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória, citotóxica e antioxidante. A espécie do cerrado *Sabicea brasiliensis* tem demonstrado atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante. Espécies desse gênero têm sido estudadas no tratamento de reumatismo, insônia, malária, epilepsia e doenças transmitidas sexualmente (BATISTA et al., 2014). Contudo seu efeito sobre células tumorais mamárias ainda é pouco explorado. Hipotetiza-se que os extratos hidrometanólico e acetato e etila de *Sabicea brasiliensis* apresentem potencial citotóxico frente a células mamárias.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 A mama, sua transformação maligna e opções de tratamento

O câncer é um problema de saúde pública, em maior destaque nos países em desenvolvimento. É expectável que em alguns anos, o impacto da doença na população represente 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025 (THEOBALD et al., 2016).

O câncer engloba um grupo de mais de 100 doenças, cuja malignidade é caracterizada pelo crescimento desregrado de células que possuem capacidade de invadir órgãos e tecidos. Já o tumor benigno é formado por um conjunto de células que tem multiplicação lenta, organizada e diferenciada, mantendo as características do tecido original. Quando a neoplasia surge a partir de tecidos epiteliais, como a glândula mamária, é conhecida por carcinoma. Em tecidos conjuntivos, como músculo, cartilagem ou osso, é nomeado de sarcoma (INCA, 2011).

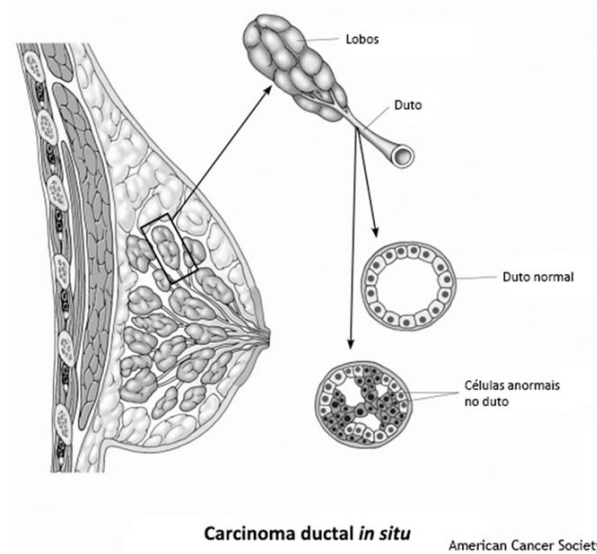
No Brasil, após o câncer de pele não melanoma, os tipos mais incidentes em homens são próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) representam os principais. O câncer de mama (CM) é considerado o segundo maior causador de mortes pela doença após o câncer de pulmão. Se diagnosticado previamente, apresenta um bom prognóstico, contudo as taxas de mortalidade permanecem ascendentes no Brasil. Estimam-se 59.700 novos casos da doença, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco previsto de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

As causas que levam ao desenvolvimento do CM são associadas à vida reprodutiva da mulher, ao histórico familiar, à densidade mamária, ao consumo de bebida alcoólica e tabaco, ao estímulo hormonal (estrogênios), a radiações ionizantes, ao envelhecimento, ao sobrepeso, ao sedentarismo e a alterações genômicas e genéticas como mutações nos genes *BRCA1* (*BreastCancer1*) e *BRCA2* (*BreastCancer 2*), conhecidamente supressores tumorais (HUNTER et al., 2010). Ainda acerca dos fatores de risco, o parto tardio e o tempo curto de amamentação estão relacionados à ocorrência da doença, assim como a idade imatura do fluxo menstrual e avançada na menopausa (KOBAYASHI et al., 2012; ANDERSON, 2014). Hábitos alimentares também estão associados a tumores na mama, como o consumo excessivo de carne vermelha e uma dieta pobre em frutas e legumes (KRUK, 2014; CASTELLÓ et al., 2014).

A mama feminina adulta está localizada entre a segunda e a sexta costela, e entre o externo e a linha axilar média (DEVITA et al., 2010). É constituída por aproximadamente 15 a 20 lóbulos glandulares e sustentada por tecido fibroso sendo formada por seis a dez sistemas ductais. Os ductos se estendem até a unidade ducto lobular terminal, onde estão os lóbulos (ROBBINS et al., 2010). Formando a glândula, existem dois tipos celulares principais, as células mioepiteliais e lumio epiteliais. Histologicamente, a maioria dos cânceres esporádicos da mama se origina nas células epiteliais luminiais, sendo este fato apoiado por evidências morfológicas, moleculares e bioquímicas (CALLAGY, 2003).

No ano de 2012, a organização mundial de saúde (OMS) divulgou a Classificação para Tumores de Mama – 4ª edição, identificando mais de 20 tipos histológicos da doença. Em geral, os tumores mamários originam-se no epitélio ductal (cerca de 80%) definidos como carcinoma ductal invasivo (CDI). Este é identificado de acordo com suas variações morfológicas e o padrão de disseminação. Os CDIs são pouco circunscritos, firmes, de consistência arenosa e com bordas infiltrativas, o que lhes conferem um aspecto espiculado ou estrelado (SENISKI, 2008). Trata-se de um grupo de tumores epiteliais malignos que têm capacidade de invadir o tecido adjacente e, por conseguinte, originar metástases à distância. A maior parte é derivada das células da unidade ducto-terminal do lóbulo mamário (BÖCKER et al., 2002; TAVASSOLI, 2003; BIRNBAUM et al., 2004).

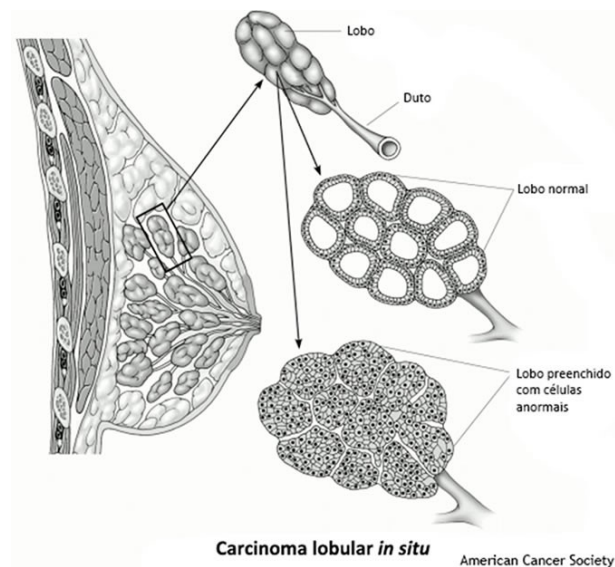
O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é caracterizado por uma multiplicação celular anormal, preferencialmente nas unidades ducto-lobulares terminais da mama e apresenta maior risco de recorrência local sem tratamento apropriado (DE ALMEIDA et al., 2005). O estudo do CDIS relacionado ao carcinoma invasivo pode facilitar o entendimento dos mecanismos envolvidos na evolução da doença até a invasão. Algumas células do carcinoma *in situ* sofrem mutações genéticas permitindo a sua passagem através da membrana basal, transformando-as em carcinoma invasivo (VAN DIEST, 1999). De caráter heterogêneo, o CM também pode ser classificado como lobular, mucinoso, tubular, micropapilar, medular e papilar (INCA, 2016).



**Figura 1** - Carcinoma ductal *in situ*

(<http://www.abrapac.org.br/img/tipos-de-cancar-de-mama-01.jpg>).

O carcinoma lobular *in situ* (CLIS) surge, geralmente, em mulheres jovens sendo que aproximadamente 80% a 90% dos casos ocorrem anteriormente à menopausa (LI, 2005). Neste tumor, não se verifica a expressão da E-caderina, uma proteína transmembranar que auxilia na adesão das células epiteliais (DEVITA et al., 2008; GUGGENHEIMER et al., 2009).



**Figura 2** - Carcinoma lobular *in situ*

(<http://www.abrapac.org.br/img/tipos-de-cancar-de-mama-02.jpg>).

O carcinoma tubular é formado por um estroma desmoplásico e por apenas uma camada de células epiteliais. Corresponde a cerca de 0,7% a 10,3% dos casos e aparece, em geral, em mulheres menopausadas (YERUSHALMI et al., 2009). O mucinóide é reconhecido pela produção farta, tanto extra como intracelularmente, de mucina. De acordo com a OMS, divide-

se em três subtipos: cistadenocarcinoma, carcinoma mucinoso de células colunares e carcinoma mucinoso (TAVASSOLI, 2003).

O carcinoma medular surge como uma massa circunscrita, radiologicamente igual a um tumor benigno (SOARES, 2012). É formado por células pouco específicas, um estroma insuficiente, sem estruturas glandulares, com infiltrações linfoplasmocíticas e margens circunscritas (VU-NISHINO et al., 2005; VINCENT-SALOMON et al., 2007). O carcinoma metaplásico é representado pela presença de metaplasia, podendo ser de origem epitelial ou mesenquimal (TAVASSOLI, 2003).

Além de classificadas, as neoplasias da mama são estadiadas considerando-se o tamanho do tumor (T), o número de gânglios comprometidos (N) e a presença ou ausência de evidência de metástases à distância (M). Os estadios são divididos em: 0: tumor *in situ* (não invasivo); I: tumor de até 2cm, sem comprometimento de linfonodos; IIA: tumor de até 2cm e até 3 linfonodos axilares ou tumor de até 5cm sem comprometimento de linfonodos; IIB: tumor de até 5cm, com comprometimento de até 3 linfonodos ou tumor maior que 5cm sem comprometimento linfonodal; IIIA: tumor maior que 5cm, com até 9 linfonodos comprometidos; IIIB: invasão da parede do tórax ou pele; IIIC: dez ou mais linfonodos comprometidos (qualquer tamanho de tumor); e estágio IV: doença metastática presente (KALIKS, 2015).

O grau nuclear também é observado microscopicamente e verifica quão próximos os núcleos das células cancerosas estão em relação às normais. Tumores de menor grau nuclear, 1 e 2, podem ser menos propícios à recidiva local e com menor agressividade comparados com aqueles de grau nuclear 3 (HETELEKIDIS, 1999; RUIZ et al., 2002). Além disso, para se observar as alterações do tumor durante sua progressão também podem ser utilizados marcadores moleculares (SILVEIRA, 2005).

Marcadores tumorais são moléculas presentes no tumor e nos fluidos biológicos, cujo surgimento ou alterações em suas concentrações se relacionam com a gênese e progressão de células neoplásicas. Estas substâncias agem como indicadores produzidos pelo organismo em resposta à presença da lesão ou mesmo pelo próprio tecido maligno (LISBOA, 2009; CARVALHO, 2010; MACHADO, 2007).

Os marcadores auxiliam na avaliação da resposta terapêutica, no diagnóstico, prognóstico, detecção de recidivas e estadiamento, além de contribuírem para o desenvolvimento de novas formas de tratamento (LISBOA, 2009; CARVALHO, 2010; MACHADO, 2007). No CM, os principais marcadores, detectados por imunohistoquímica, são o receptor de estrógeno (RE), o receptor de progesterona (RP) e o Receptor 2 do Fator de

Crescimento Epidérmico Humano (HER2) (SHIPITSIN et al., 2007; KALIKS, 2015), os quais definem seus subtipos moleculares.

O luminal A se origina em células epiteliais, sendo positivos para RE e RP e negativos para HER2. O índice proliferativo (Ki67) é baixo (<14%) e são suscetíveis a hormonioterapia. O luminal B também se origina em células epiteliais luminais que expressam RE. Contudo RP e HER2 podem ou não ser detectados e o Ki67 é elevado (PRAT, 2011). Pacientes do subtipo HER2 apresentam a amplificação desse receptor, o qual se relaciona a um pior prognóstico. Estes são passíveis de tratamento com trastuzumab (Herceptin®), um anticorpo monoclonal anti-HER2 administrado junto com a quimioterapia. (DE BARROS, 2015). Seu mecanismo de ação envolve o bloqueio da porção extracelular desses receptores. Sendo assim, as vias de sinalização intracelulares vinculadas à proliferação celular são inibidas, com efeito citotóxico e citostático (OLIVEIRA et al, 2003; NAKAMATU et al., 2008; PAREDES et al., 2014).

O CM triplo-negativo baseia-se na ausência destes receptores. Estes são biologicamente mais agressivos e tratáveis apenas por quimioterapia e radioterapia (CLEATOR et al., 2007). Apresentam maiores chances de recidiva da doença e uma sobrevida inferior comparada aos demais subtipos (KATZ, 2016).

O diagnóstico é, em sua maioria, encarado com dificuldade, uma vez que o tratamento culmina com impactos negativos na percepção da sexualidade e estética (INCA, 2018; VOLLBRECHT, 2009). A detecção precoce pode ser realizada pela mamografia, autoexame da mama (EEB), exame clínico e programas de triagem (DEY, 2015). A OMS determina que a realização regular de testes em pessoas presumivelmente saudáveis, concernentes a uma faixa etária de risco, permite a identificação da patologia em fase pré-clínica diminuindo, assim, os índices de mortalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2007).

Os sintomas da doença são tardios e podem incluir manchas, encolhimento da pele ou regiões de abaulamentos e líquidos expelidos pelo mamilo. Os tratamentos acessíveis para o CM são a terapia local, tendo como exemplo a radioterapia e cirurgia; a terapia hormonal; a terapia alvo e a terapia sistêmica, como a quimioterapia (BARRETOS, 2016).

No CM, conforme sua classificação e o estado de saúde da paciente, é indicada a cirurgia, podendo esta ser conservadora ou radical (com a remoção completa da mama). A mastectomia radical pode acarretar maiores prejuízos na qualidade de vida da mulher, ao desencadear quadros de linfedema e comprometer a sua imagem corporal. Portanto, na rotina clínica, tem sido adotada com frequência a opção pela quadrantectomia e adenectomia (RICHIE, 2003; ASSIS et al., 2013).

A radioterapia é um método de tratamento que utiliza radiações ionizantes, como os raios gama, raios X, partículas alfa e partículas beta. A radiação liberada para combater o tumor é regularmente limitada pelos riscos de danos aos tecidos vizinhos. A braquiterapia objetiva conduzir localmente essa radiação, sendo que a administração da fonte pode ser intraluminal, intracavitária ou intersticial (PEREIRA et al., 2000).

A hormonioterapia tem se destacado no tratamento da doença, favorecendo de forma significativa a sobrevida livre e a sobrevida global das pacientes (BURSTEIN et al., 2010; MURPHY et al., 2012). Quando comparada à quimioterapia, observam-se custos reduzidos em relação a recursos humanos, hospitalização e equipamentos (TIMMERS et al., 2014; BENJAMIN et al., 2013). Os medicamentos mais utilizados são os moduladores seletivos do RE (Tamoxifeno) e os inibidores de aromatase, como o anastrozol. Para que haja decaimento das taxas de recorrência e mortalidade, é preciso que o tratamento seja realizado integralmente (BRITO et al., 2014; MAKUBATE et al., 2013).

A terapia alvo tem como objetivo conter o crescimento e disseminação das células cancerígenas bloqueando antígenos tumorais específicos. Essa estratégia altera a maneira como uma célula tumoral cresce, se auto-repara e se divide. Alguns compostos são utilizados junto a outros tratamentos, e, em geral, apresenta efeitos colaterais adversos. Anticorpos monoclonais como Trastuzumabe, Pertuzumabe, Ado-Trastuzumabe, Emtansina, Lapatinibe são exemplos dessa terapia, utilizados no tratamento de mulheres portadoras de CM do tipo HER2 (MOHAMED et al., 2013).

A quimioterapia é uma estratégia amplamente utilizada para tratar o CM. Esta pode ser realizada antes (neoadjuvante) ou após (adjuvante) a cirurgia. Os medicamentos podem ser administrados de forma oral ou intravenosa. As drogas são selecionadas considerando a idade, o estágio do câncer e sua classificação (BAILLY, 2009). De caráter sistêmico, atinge as células tumorais mamárias e as circulantes diminuindo a incidência de metástases. Diversos efeitos colaterais são associados à medicação como vômitos, diarreia, mielossupressão, náuseas e alopecia (RODRIGUES, 2012). Portanto, torna-se necessária a busca por formas adicionais ou complementares de tratamento, aumentando sua eficácia, mas, sobretudo, diminuindo essas reações adversas, não somente temidas, mas que também contribuem para um quadro debilitante das pacientes.

A nanotecnologia vem se destacando no combate aos efeitos indesejáveis do tratamento quimioterápico. É uma das áreas que possibilita a manipulação e preparo de materiais na escala nanométrica. Permite o desenvolvimento de novos produtos como nanocarreadores e nanomedicamentos para uso terapêutico. Essa tecnologia empregada à medicina moderna tem

a finalidade de desenvolver sistemas que possibilitam o *drug delivery* de forma direta e equilibrada de fármacos ao tecido alvo. Nesse cenário, tem aumentado a procura por carreadores dotados de propriedades que proporcionam a redução da dosagem do medicamento, seletividade ao alvo biológico e redução dos efeitos colaterais (PRINCIVAL, 2015).

Outra opção se refere aos produtos naturais (PN) e fitoterápicos. Há uma diversidade de moléculas com atividade antineoplástica proveniente de microrganismos, plantas e organismos marinhos (CONTI, 2012). Conhecer atuais alvos terapêuticos aumenta as chances de exploração de diferentes moléculas com capacidade anticâncer. O estudo de novas drogas necessita de um impulso multidisciplinar na descoberta de diferentes moléculas naturais e do aprimoramento molecular por meio da utilização de técnicas de síntese bioquímica, química combinatória, juntamente a estudos biológicos (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Neste contexto, a descoberta de novos compostos apresenta-se como uma alternativa promissora no tratamento das neoplasias em geral, sobretudo do CM.

## **2.2 Os produtos naturais e sua perspectiva na oncologia**

O uso de PN acompanha a história da humanidade. São utilizados no combate a diferentes patologias e seu estudo sistemático vem trazendo importantes avanços na farmacologia (MENDES et al., 2018; NEWMAN, 2007).

As plantas possuem o metabolismo primário e o secundário. O primário é responsável pela síntese de substâncias essenciais à sua sobrevivência. Secundariamente, ocorre a produção de moléculas responsáveis por conferir características adicionais, como sabor e proteção contra predadores. Essas despertam especial interesse devido a seus efeitos biológicos e sua possível aplicabilidade farmacológica (PEREIRA, 2012). De fato, a maioria das substâncias biotivas são metabólitos secundários gerados pelas plantas, os quais são classificados conforme sua origem biossintética. Estes são divididos em três grupos principais: compostos fenólicos (cumarinas, flavonóides, ligninas, taninos e estilbenos), terpenos (glicosídeos cardíacos, carotenóides e esteróis), e compostos azotados (glucosinolatos e alcaloides) (PRITHIVIRAJ et al., 2007; AGOSTINI-COSTA et al., 2012). Os compostos antioxidantes são eficazes na estabilização dos radicais livres, efetuando um papel fundamental na modulação enzimática, no metabolismo hormonal, na diminuição da agregação plaquetária e no estímulo do sistema imunológico. (JÁUREGUI et al., 2007).

Aproximadamente 75% dos medicamentos antitumorais são provenientes de PN (ZHANG et al, 2011). No Brasil há fontes disponíveis em abundância, o que possibilita a



descoberta de substâncias de interesse terapêutico (NEWMAN, 2007; HARVEY, 2008). O principal objetivo de um quimioterápico é controlar a multiplicação das células transformadas, além de bloquear mecanismos tumorais específicos como a angiogênese, a apoptose e a diferenciação celular (ALMEIDA et al., 2005). De fato, alguns fármacos derivados de PN já são utilizados na oncologia (Tabela 1).

**Tabela 1:** Produtos naturais de uso rotineiro no tratamento oncológico e suas respectivas espécies e indicação terapêutica.

<b>Fármaco</b>	<b>Espécie</b>	<b>Alvo molecular</b>	<b>Indicação Terapêutica</b>
Topotecano, Irinotecano.	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I.	Câncer de cólon.
Podofilotoxina, Etoposídeo, Teniposídeo.	<i>Podophyllum peltatum.</i>	Topoisomerase II.	Câncer de pulmão, ovário e testículo; leucemia linfocítica aguda.
Vimblastina, Vinorelbina Vincristina, Vindesina.	<i>Catharanthus roseus.</i>	Tubulina, Microtúbulos.	Leucemia linfoblástica aguda; doença de Hodking; câncer de testículo.
Paclitaxel, Docetaxel.	<i>Taxus brevifolia.</i>	Tubulina, Microtúbulos.	Câncer de mama.

**Fonte:** (COSTA-LOTUFO et al, 2010).

O estudo de PN como drogas antineoplásicas requer ampla pesquisa sobre a planta e análise de seus constituintes. O trabalho, geralmente, se inicia com um etnobotânico, botânico ou ecólogo que coleta e descreve a espécie de interesse. Parte-se de organismos que possuam algum composto ativo descrito ou estejam relacionados taxonomicamente a espécies conhecidas (BALUNAS, 2005). Após a coleta, a planta é armazenada e passa por métodos de extração com diferentes solventes para a obtenção de suas frações.

Os extratos são submetidos à triagem biológica. O isolamento do princípio ativo é o próximo passo na busca de produtos promissores e que, de fato, possam se tornar medicamentos. São necessárias técnicas de biologia molecular para determinar os mecanismos celulares envolvidos no tratamento, e então descrever a ação desses compostos (BALUNAS, 2005). Os agentes isolados podem ser classificados conforme sua ação antitumoral: quando inibem o início do processo carcinogênico e quando controlam a multiplicação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer (NOBILI et al., 2009). Alguns compostos

provenientes de plantas do cerrado apresentam toxicidade e efeito significativo a determinadas doenças, inclusive ao câncer.

O cerrado é um tipo de vegetação que constitui a fitogeografia brasileira, sendo seu segundo maior bioma, apenas superado pela Amazônia. Engloba a área central do Brasil, incluindo os Estados de Goiás, Distrito Federal, e parte dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Bahia, Tocantins, Piauí, Maranhão e Pará. Nessas regiões é encontrado um terço da biodiversidade brasileira e aproximadamente 5% da flora e fauna mundiais (DOS SANTOS et al., 2010).

A vegetação do cerrado floresce em condições ambientais adversas, o que favorece a produção de compostos bioativos. São encontrados nos frutos desse bioma os compostos fenólicos, incluindo antocianinas, flavonoides e taninos (DE BRITO et al., 2018). Com a imensa diversidade de espécies, o cerrado pode ser explorado em pesquisas, na busca de PN para o uso terapêutico.

Diferentes plantas oriundas do cerrado já foram descritas por sua capacidade terapêutica como o Bacupari (*Garcinia brasiliensis*), cujos metabólitos secundários demonstram atividade antimicrobiana (MAHAMODO et al., 2014; NALDONI et al., 2009), antiparasitária (GONTIJO et al., 2012; PEREIRA et al., 2010), anti-inflamatória (CASTARDO et al., 2008; SANTA-CECÍLIA et al., 2011) e citotóxica (TANG et al., 2015) e o Pequi (*Caryocar brasiliense*), o qual apresenta produtos com atividade antioxidante (SORAES et al., 2014).

Na oncologia, compostos químicos extraídos de PNs são uma alternativa de tratamento com menores efeitos colaterais ou com sinergismo farmacológico promissor. Explorar a vasta vegetação do cerrado é, portanto, fundamental para a ampliação dos conhecimentos acerca de medicamentos voltados para o combate ao câncer. Algumas plantas já vêm sendo estudadas para esse fim como a espécie *Erythroxylum daphnites* pertencente à família *Erythroxylaceae*, própria do bioma Cerrado. Ao analisar sua atividade biológica, verificou-se que o extrato hexânico apresenta atividade citotóxica e efeito indutor de apoptose em linhagem de câncer de boca (ELIAS et al., 2015). O extrato bruto etanólico de *Pouteria ramiflora*, da família *Sapotaceae*, possui atividade antioxidante (ELIAS et al., 2014). Outros extratos originários dessa espécie se mostraram citotóxicos para linhagens de carcinoma de mama e de cabeça e pescoço quando associados à radioterapia (ELIAS et al., 2013; ELIAS et al., 2015).

O gênero *Sabicea*, refere-se à família *Rubiaceae*, à subfamília *Ixoroideae* e à tribo *Sabicea*. É constituído por cerca de 100 espécies distribuídas pela África e América Tropical. Espécies deste gênero são empregados na medicina popular como recurso terapêutico contra

dor de estômago e de dente, reumatismo, febre, malária, insônia, epilepsia, vômitos e para combater doenças transmitidas sexualmente (BATISTA et al., 2014).

A espécie *Sabicea brasiliensis*, conhecida popularmente como sangue-de-cristo, é um arbusto com cerca 80 cm de altura e encontra-se nas regiões de cerrado do Brasil. Suas ações antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória já foram descritas (BATISTA et al., 2014). Contudo, ainda carecem estudos acerca de sua ação em tumores. Além disso, com a variedade de compostos químicos que podem ser identificados e isolados a partir de seus extratos, novas formulações podem ser propostas possibilitando uma análise detalhada de sua atividade antitumoral.

Os produtos naturais são fonte de substâncias promissoras no controle do câncer. Portanto, é preciso intensificar os estudos sobre os efeitos citotóxicos e potencial anticancerígeno dos compostos, para o bom aproveitamento da enorme variedade de espécies encontradas no país.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar o efeito dos extratos hidrometanólico e o acetato de etila de *Sabicea brasiliensis*, L. sobre linhagens tumorais de câncer de mama.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar, por meio de ensaios de MTT, a capacidade antiproliferativa dos extratos nas células tumorais mamárias MCF-7 (fenótipo luminal) e MDA-MB231 (fenótipo triplo-negativo);
- Determinar as melhores concentrações dos extratos de *Sabicea brasiliensis* com atividade antitumoral;
- Avaliar o potencial dos extratos de *Sabicea brasiliensis* para o tratamento do câncer de mama.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do extrato e cultivo celular

Os extratos hidrometanólico e acetato de etila das raízes de *Sabicea brasiliensis* foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Cristina Ribas Fürsternau. Para avaliação de seus efeitos citotóxicos/antiproliferativos, diferentes concentrações foram testadas em linhagens mamárias. Foram utilizadas as linhagens MCF-7 (tumorigênica de fenótipo luminal) e MDA-MB231 (tumorigênica de fenótipo triplo-negativo).

A linhagem tumoral MCF-7 foi mantida em meio RPMI. A linhagem MDA-MB231 foi mantida em meio L15. Todos os meios de cultivo foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 50ug/L de gentamicina. As células foram incubadas a 37 °C. A linhagem MCF-7 também foi mantida em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.2 Ensaios de MTT

Para avaliar o efeito antiproliferativo dos extratos hidrometanólico e acetato de etila foi realizado o ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide). Após 80% de confluência as linhagens foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 min a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura.

Foi realizada a contagem e o teste de viabilidade em azul de tripano antes do plaqueamento de 10<sup>5</sup> células/poço em um volume de 100 uL de meio de cultura completo. Posteriormente, as células plaqueadas foram incubadas a 37°C e, para a linhagem luminal, com 5% de CO<sub>2</sub> para a aderência.

Após esse período, foram adicionados os extratos liofilizados de *Sabicea brasiliensis* diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e meio nas seguintes concentrações finais: 0,0078125ug/uL, 0,015625ug/uL, 0,03125ug/uL, 0,0625ug/uL, 0,125ug/uL, 0,25ug/uL, 0,5ug/uL, e 1ug/uL, mantidos por 24h e 48h. Foram acrescentados os controles de tratamento com células tratadas apenas com DMSO para cada concentração dos extratos; o controle de viabilidade com apenas células e o controle negativo com apenas o meio de cultura completo. Tanto o tratamento quanto os controles foram avaliados em triplicata.

Após cada incubação, 10 uL de MTT a 5mg/mL, diluído em tampão fosfato-salino (PBS) foi adicionado e mantido por 4 horas, quando então foram incluídos 50 uL de solução de

SDS 20%/N-dimetil-formamida 50% e mantido por 16 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram lidas a 560 nm em leitora Thermo Plate, TP-Reader. Para o cálculo da viabilidade foi utilizada a fórmula abaixo.

$$Viabilidade = \frac{AA - (ABSC - ABSM)}{ADMSO - (ABSC - ABSM)} \times 100$$

AA = Absorbância da Amostra

ABSC = Absorbância do controle de viabilidade (apenas com células)

ABSM = Absorbância do controle negativo (apenas meio de cultura)

ADMSO = Absorbância do controle de tratamento (DMSO)

### 4.3 Análises estatísticas

Foram calculadas a média e os desvios padrão para cada tratamento e a distribuição dos dados analisados. Para a comparação dos resultados foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e o teste de múltiplas comparações de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Os dados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism, versão 7.0 para Windows.

## 5 RESULTADOS

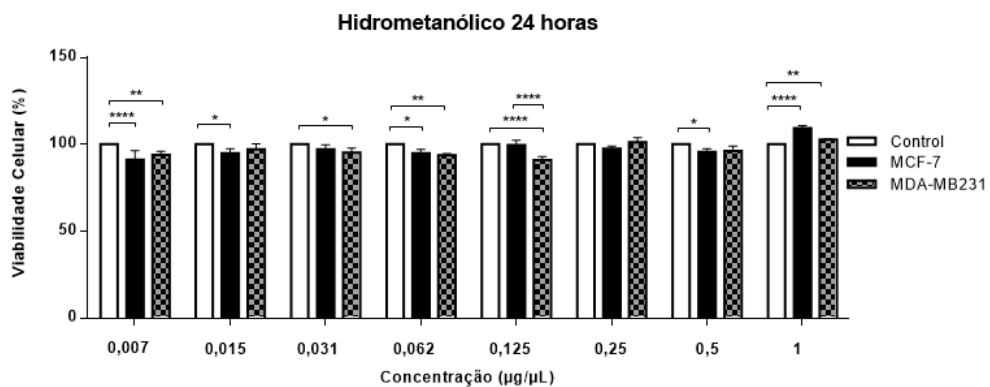
As linhagens celulares de CM foram tratadas com os extratos hidrometanólico (Figura 3) e acetato de etila (Figura 4) de *S. brasiliensis*. Para o tratamento com o extrato hidrometanólico, por 24 horas (Figura 3A), a viabilidade celular das linhagens tratadas se manteve próxima ao controle tratado apenas com o diluente. Considerando a linhagem luminal, o extrato se apresentou levemente citotóxico nas concentrações 0,007ug/uL; 0,015ug/uL; 0,062ug/uL e 0,5ug/uL, quando comparado ao controle celular tratado com DMSO. As células triplo-negativas se mostraram menos viáveis nas concentrações 0,007ug/uL; 0,031ug/uL; 0,62ug/uL e 0,125ug/uL. Nesta última concentração, pôde-se notar uma maior diminuição da viabilidade das células MDA-MB231. Além disso, nessa mesma condição, verificou-se uma diferença entre as linhagens, com maior citotoxicidade para o modelo triplo-negativo

( $p < 0,0001$ ). Na maior concentração houve indução da proliferação de ambas células, quando comparadas ao controle tratado com DMSO.

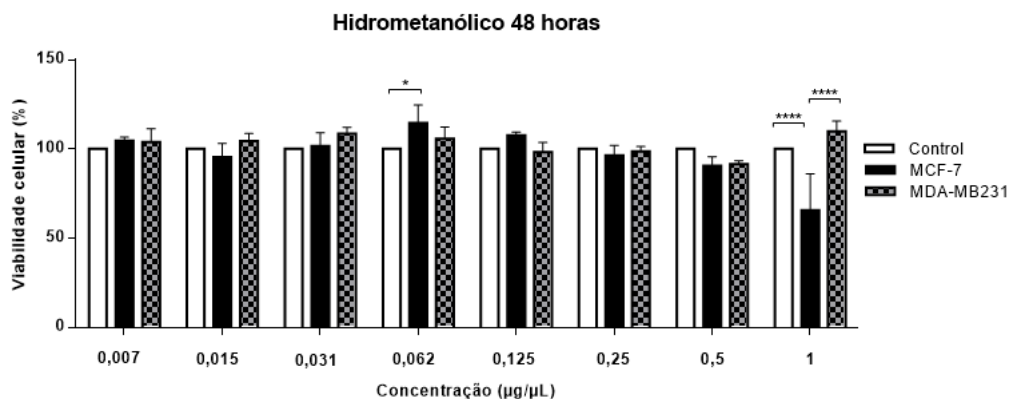
Após 48 horas (Figura 3B), na concentração de  $1\mu\text{g}/\text{uL}$ , verificou-se efeito citotóxico para as células MCF-7, quando comparadas ao controle de tratamento com diluente e à linhagem MDA-MB231. Nas demais concentrações, as células se mantiveram próximas à viabilidade celular do controle, com efeito proliferativo para a linhagem MCF-7 na concentração de  $0,062\mu\text{g}/\text{uL}$  ( $p < 0,05$ ).

**Figura 3. Comparação da viabilidade celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB231 após tratamento com extrato hidrometanólico de *Sabicea brasiliensis*.** Os resultados referem-se ao produto avaliado em diferentes concentrações por 24 horas (A) e 48 horas (B). Estão apresentados em média do desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. O asterisco indica significância estatística (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

A



B



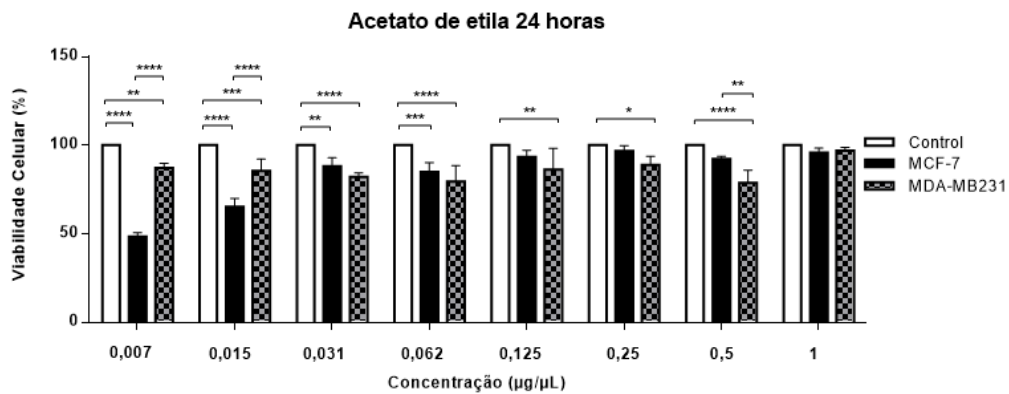
No tratamento por 24 horas com o extrato acetato de etila de *S. brasiliensis* (Figura 4A), observou-se atividade antitumoral nas concentrações  $0,007\mu\text{g}/\text{uL}$ ,  $0,015\mu\text{g}/\text{uL}$ ,  $0,031\mu\text{g}/\text{uL}$ ,  $0,062\mu\text{g}/\text{uL}$  para ambas as linhagens comparadas ao controle tratado com DMSO. Nas duas

menores concentrações, o extrato se mostrou mais citotóxico à linhagem MCF-7, com significativa redução da viabilidade quando comparada à MDA-MB231. A partir da concentração 0,12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  até 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , houve redução da viabilidade celular apenas para MDA-MB 231, com maior citotoxicidade a 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  quando comparada à MCF-7. A 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  os resultados não se mostraram significativos.

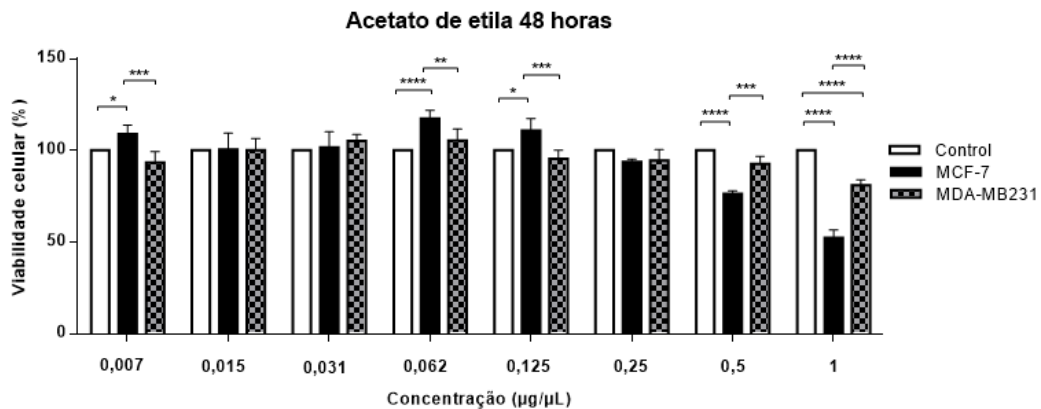
Posteriormente, no tratamento de 48 horas (Figura 4B), houve uma inversão no comportamento celular. Na menor concentração, observou-se um estímulo proliferativo para a linhagem MCF-7. Já nas duas maiores concentrações, verificou-se uma redução na viabilidade desse modelo celular comparando-se ao controle com DMSO e à linhagem MDA-MB231. A 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  o efeito citotóxico se mostrou interessante, uma vez que ambas, MCF7 e MDA-MB231, tiveram sua viabilidade significativamente comprometida quando comparadas ao controle.

**Figura 4. Comparação da viabilidade celular das linhagens MCF-7 e MDA-MB231 após tratamento com extrato acetato de etila de *Sabicea brasiliensis*.** Os resultados referem-se ao produto avaliado em diferentes concentrações por 24 horas (A) e 48 horas (B). Estão apresentados em média do desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. O asterisco indica significância estatística (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

**A**



**B**



## 6 DISCUSSÃO

A riqueza estrutural e a complexidade dos esqueletos carbônicos dos produtos de fontes naturais evidenciam a importância dessas moléculas na descoberta de novas drogas (PYE, 2017). Muitas substâncias naturais são consideradas como protótipos, alvos ou bases para as modificações na busca de drogas com atividade farmacológica e aplicabilidade terapêutica. Os desafios na área são muitos, uma vez que se torna mandatório desvendar as interações metabólicas; desenvolver sistemas rentáveis de purificação e isolamento e compreender o sinergismo ou antagonismo com outros fármacos (YULIANA et al., 2011).

Em oncologia, o papel desses compostos no tratamento quimioterápico é destruir as células tumorais, impedir sua multiplicação e conter sua migração. Os PNs com propriedades antitumorais e anti-mutagênicas podem agir sobre as células neoplásicas por diferentes mecanismos, inibindo vias de transdução de sinal, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou sinalizando para a apoptose. O composto vitaferina A, extraído da espécie *Withania somnifera*, promove a paralisação do ciclo celular em G2, conduzindo à morte celular programada (NISHIKAWA, 2015; LEE et al., 2017). O juncusol, obtido de raízes da planta *Juncus inflexus*, apresentou efeito antiproliferativo e pró-apoptótico em câncer cervical ao inibir a polimerização da tubulina e a ativação do receptor EGFR (KUO et al., 2019). De fato, fármacos de origem natural já são rotineiramente utilizados no tratamento do câncer como o taxano, extraído da espécie *Taxus brevifolia*, o qual se liga aos microtúbulos causando maior polimerização da tubulina bloqueando o processo mitótico (TAHER et al., 2017).

O presente estudo avaliou o efeito antitumoral dos extratos hidrometanólico e acetato de etila de *S. brasiliensis*, L. sobre as linhagens tumorais da mama MCF-7 (fenótipo luminal) e MDA-MB231 (fenótipo triplo-negativo). O CM caracteriza-se por sua heterogeneidade, tanto histológica quanto molecular. Considerando seus marcadores, essa neoplasia é subdividida em diferentes subtipos, sendo os mais amplamente definidos o luminal A, o luminal B, o triplo-negativo e o HER-2; cada um com diferentes respostas terapêuticas e perfis de progressão da doença (QUIST et al., 2018; TONG et al., 2018).

Tumores luminiais são positivos para receptores hormonais, diferindo-se em termos de espectro de mutações, prognóstico e padrão de expressão gênica. Os tumores RE positivos são passíveis de tratamento com bloqueadores, contudo, muitas pacientes apresentam um quadro de resistência preocupante, com comprometimento do tempo de sobrevida (CURTIS et al., 2012; TANG et al., 2016).



O subtipo triplo-negativo apresenta alta taxa de proliferação, metástase recorrente, características histopatológicas heterogêneas e pior prognóstico entre os subtipos de CM (KHOSRAVI-SHAHI, 2018; RIDA et al., 2018). Carecem de padronização molecular, apesar de descrita uma alta frequência de mutações no gene *TP53*, *BRCA1/BRCA2* e em genes responsáveis pelo reparo por combinação homóloga, além de instabilidade genômica e superexpressão do receptor HER1 (KHOSRAVI-SHAHI, 2018). Para esse tipo de tumor ainda não há terapia-alvo específica (PRAT et al., 2015). Já os tumores HER2 não expressam os receptores hormonais e, apesar do prognóstico desfavorável das pacientes, estas respondem à terapia com anticorpo monoclonal direcionado ao HER2 (WUERSTLEIN; HARBECK, 2017).

Para ensaios em modelos celulares, as células em cultura necessitam apresentar as características esperadas e descritas para os tipos que representam. As linhagens foram escolhidas de acordo com suas características genóticas e fenotípicas, as quais definem seus subtipos. Esses modelos se diferem molecularmente, logo apresentam um padrão singular de marcadores, que são usados como alvos em sua caracterização (SIMSTEIN, 2003; JÄNICKE, 2009).

A linhagem MCF-7 apresenta características comparáveis ao epitélio mamário sendo positiva para RE. São células aderentes medindo de 20-25 micrômetros. (FAGAN et al., 2017; VENUGOPAL et al., 2017). Já a linhagem de células de CM MDA-MB-231 possui fenótipo invasivo, sendo definidas como triplo-negativas, ou seja, não expressam RE, RP e HER2 (GRIFFITHS; OLIN, 2012). As células cultivadas apresentaram o genótipo e fenótipo esperados e, portanto, se mostraram passíveis de serem utilizadas nos experimentos posteriores de MTT.

O ensaio colorimétrico MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo] é de suma importância para indicar a toxicidade celular ou o efeito antiproliferativo de compostos sintéticos e naturais frente a linhagens celulares. É baseado no metabolismo celular de glicídeos, geralmente mediado por enzimas desidrogenases mitocondriais (enzima mitocondrial redutase) e da sua respectiva capacidade redox. A viabilidade é quantificada pela diminuição do MTT (um sal de pigmentação amarela e solúvel em água) a formazan (um sal de pigmentação roxa e insolúvel em água) pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, (BOCHNIE, 2016). Em estudos voltados para a oncologia, o ensaio de MTT é amplamente utilizado, se destacando por sua simplicidade e sensibilidade. Essa metodologia já foi explorada na avaliação dos efeitos celulares de produtos naturais contra leucemia (VIEIRA et al., 2017; ARINI et al., 2018); câncer de próstata (DUARTE et al., 2017) e câncer de ovário (COSTA et al., 2018).

No CM, a atividade antitumoral de diferentes espécies vegetais já foi avaliada, como *Azadiractha indica* (BRAGA et al., 2018); *Prosopis juliflora* (COSTA et al., 2018); *Schisandra chinensis* (JUNG et al., 2019); *Patrinia heterophylla* (SHENG et al., 2019); *Antrodia cinnamomea* (CHEN et al. 2019). No caso de *S. brasiliensis*, a raiz e o fruto extraídos com os solventes hexano e etanol também já foram utilizados no tratamento de células tumorais e não apresentaram atividade antiproliferativa contra a linhagem de CM MDA-MB-435 (DE MESQUITA et al., 2009).

Previamente, os extratos hidrometanólicos e de acetato de etila, de outras espécies apresentaram efeito citotóxico contra modelos *in vitro* de CM incluindo a linhagem MCF-7 (AL-AWAIDA et al., 2018; NORDIN et al., 2018) e MDA-MB231 (MAKRANE et al., 2018). No presente estudo, o extrato hidrometanólico obtido das raízes de *S. brasiliensis* se mostrou citotóxico apenas à linhagem de CM MCF-7, quando utilizado a 1µg/uL e por 48 horas. Já o acetato de etila demonstrou um perfil interessante, ao se comparar os tempos de tratamento. Diferentes solventes orgânicos podem ser empregados na obtenção de metabólitos secundários incluindo etanol, éter, metanol, acetato de etila, hexano, tolueno, éter dietílico, acetato de butila e diclorometano (ANDRO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2001). As frações são escolhidas de acordo com sua polaridade sendo capazes de extrair grupos fenólicos, terpenos, glicosídeos e alcaloides (GARCÍA, 2011). Em estudo anterior, o extrato metanólico das folhas de *S. brasiliensis* foi qualificado e seus constituintes definidos como flavonóides kaempferol 3-O-robinobiosídeo e variabilosídeo G (SANTOS JÚNIOR, 2007). Frações hexânica, butanólica, clorofórmica, hidrometanólica e acetato de etila de *S. brasiliensis* também já foram previamente caracterizadas e identificados três ácidos cafeoilquínicos, três esteroides, uma cumarina, um triterpeno, um dissacarídeo e um esteroide glicosilado (BATISTA et al., 2014). Quanto aos extratos utilizados em nosso estudo, já foi demonstrada a presença de compostos fenólicos, sugerindo sua atividade antioxidante (OLIVEIRA, 2018; FARHAT et al., 2014; SHAHRZAD et al., 2014).

Considerando o tratamento nas menores concentrações do extrato acetato de etila, este se apresentou citotóxico após 24 horas de tratamento. Contudo, as células retomaram a viabilidade após 48 horas. Esse comportamento evidencia a possível ação das vias de reparo das células tumorais. A resistência das linhagens tumorais ao agente quimioterápico advém de diferentes mecanismos como diminuição do influxo, aumento do efluxo, modificações epigenéticas, inibição da apoptose, contínua ativação da proliferação celular e aumento da capacidade de reparo do DNA (MAIER, 2005). Nossos dados sugerem que o tratamento por 24 horas não se mostra efetivo, com a reversão da citotoxicidade às células neoplásicas.

Já nas duas maiores concentrações (0,5ug/uL e 1ug/uL) houve uma redução na viabilidade apenas após 48 horas. Observou-se que a ação citotóxica deste extrato aumenta com o tempo de exposição e em concentrações mais elevadas. Sugerimos que os produtos do metabolismo dos compostos são responsáveis pelos efeitos observados, incluindo a produção de ROS. Contudo, se mostra necessário melhor caracterizar essas vias, uma vez que a complexidade e variabilidade interindividual das enzimas responsáveis pela metabolização de medicamentos podem explicar as respostas celulares a um determinado medicamento (CHOENE, 2016).

Por fim, a maior citotoxicidade à linhagem MCF-7 sugere sua ação como complementar ao tratamento de tumores luminiais, o que requer estudos adicionais. Além disso, apesar do perfil intrigante do extrato acetato de etila, seus compostos majoritários não foram avaliados, assim como seus mecanismos de ação ainda necessitam ser investigados.

## **7 CONCLUSÃO**

No presente estudo foi avaliada a atividade antiproliferativa dos extratos hidrometanólico e acetato de etila de *S. brasiliensis* sobre as linhagens MCF7 (fenótipo luminal) e MDA-MB231 (fenótipo triplo-negativo) no tempo de 24 horas e 48 horas. O extrato acetato de etila se mostrou particularmente promissor, sendo citotóxico a ambas as linhagens quando estas foram tratadas com 1ug/uL do extrato por 48 horas. Na menor concentração, houve uma recuperação de viabilidade após as 24 horas de tratamento. Nossos dados incitam novos estudos que visam desvendar os mecanismos moleculares modulados pelos compostos majoritários isolados desse extrato. Estudos mecanísticos adicionais são necessários para investigar o papel do extrato acetato de etila no tratamento complementar de tumores luminiais, assim como desvendar seu mecanismo de ação no CM.

## REFERÊNCIAS

- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B. do CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Secondary metabolites. In: **Chromatography and Its Applications**. InTech, 2012.
- AL-AWAIDA, W. et al. In vitro anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant potentials of *Ephedra aphylla*. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 14, n. 6, p. 1350, 2018.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANDERSON, K. N. et al. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 144, n. 1, p. 1-10, 2014.
- ARINI, L. E. S. et al. Avaliação da atividade citotóxica de extratos obtidos das folhas de *Bauhinia rufa* (*Fabaceae*). In: **Anais do Congresso de Ensino**, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE) (ISSN 2447-8687). 2018.
- ASSIS, M. R. et al. Late morbidity in upper limb function and quality of life in women after breast cancer surgery. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 17, n. 3, p. 236-243, 2013.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.
- Banco de células do Rio de Janeiro, BCRJ**. Disponível em: <<http://bcnj.org.br/catalogo/cell/?celula=mda-mb-231luc-luciferase-firefly>>. Acesso em: 09 abr. 2019.
- BAILLY, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. **Biochemical pharmacology**, v. 77, n. 9, p. 1447-1457, 2009.
- BARRETOS, H. C. **Prevenção e Sintomas do Câncer de Mama**, 2016.

BATISTA, J. C. et al. Chemical constituents and devaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of roots of *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 638-642, 2014.

BENJAMIN, L. et al. Budget impact analysis of the use of oral and intravenous anti-cancer drugs for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. **Journal of Medical Economics**, v. 16, n. 1, p. 96-107, 2013.

BIRNBAUM, D. et al. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous. **International Journal of Oncology**, v. 25, n. 2, p. 249-258, 2004.

BOCHNIE, K. A.; GREGÓRIO, P. C.; MACIEL, R. A. P. Análise da viabilidade celular por mtT em células tratadas com toxinas urêmicas – revisão. **Saúde**, v. 1, n. 15, p. 42-51, 2016.

BÖCKER, W. et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 6, p. 737-746, 2002.

BRITO, C.; PORTELA, M. C.; VASCONCELLOS, M. T. L. Fatores associados à persistência à terapia hormonal em mulheres com câncer de mama. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 284-295, 2014.

BURSTEIN, H. J. et al. American society of clinical oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 5, p. 423-438, 2010.

CALLAGY, G. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 12, n. 1, p. 27-34, 2003.

CARVALHO, S. M. T. **Avaliação de fatores prognósticos em tumores de mama nos estádios IIA e IIIB e sua correlação com sobrevida**. 2010. 99 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2010.

CASTARDO, J. C. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 405-411, 2008.

CASTELLÓ, A. et al. Spanish Mediterranean diet and other dietary patterns and breast cancer risk: case-control Epi GEICA Mstudy. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 7, p. 1454-1462, 2014.

CHEN, Y. et al. *Antrodia cinnamomea*, a Treasured Medicinal Mushroom, Induces Growth Arrest in Breast Cancer Cells, T47D Cells: New Mechanisms Emerge. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 833, 2019.

CHOENE, M.; MOTADI, L. Validation of the Antiproliferative Effects of *Euphorbia tirucalli* Extracts in Breast Cancer Cell Lines. **Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 98- 110, 2016.

CLEATOR, Susan; HELLER, Wolfgang; COOMBES, R. Charles. **Triple-negative breast cancer: therapeutic options**. *The lancet oncology*, v. 8, n. 3, p. 235-244, 2007.

CONTI, R. et al. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.

COSTA, A. C. F.; CAVALCANTE, G. M. Atividade antitumoral in vitro de *Prosopis juliflora* frente a células de câncer de mama e câncer de ovário. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 9, n. 1, p. 130-136, 2018.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346-352, 2012.

DE ALMEIDA, M. S. et al. Variação interobservador no diagnóstico histopatológico do carcinoma ductal in situ da mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2005.

DE BARROS, A. C. S. D.; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 25, n. 4, p. 146-55, 2015.

DE BRITO, B. N. et al. Determinação de Fenóis Totais em Produtos Derivados de Frutas do Cerrado. In: **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)** (ISSN 2447-8687). 2018.

DE MESQUITA, M. L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439-445, 2009.

DEVITA, V. T. et al. DeVita. **Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology** (Cancer: Principles & Practice (DeVita). 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins, p. 1316, 2008.

DEVITA, V. T.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, STEVEN, A. (Ed.). **Cancer: principles and practice of oncology-advances in oncology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

DEY, S. Preventing breast cancer in LMICs via screening and/or early detection: The real and the surreal. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 509, 2014.

DOS SANTOS, M. A. et al. **O cerrado brasileiro: notas para estudo**. Belo Horizonte, Brazil: UFMG/Cedeplar, 2010.

DUARTE, G. K. G. F. et al. Avaliação da atividade citotóxica em linhagem de células tumorais de extrato das folhas de *Esenbeckia pumila Pohl*. In: **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)** (ISSN 2447-8687). 2017.

ELIAS, S. T. **Avaliação in vitro do potencial antineoplástico de plantas do Cerrado em carcinoma de cabeça e pescoço**. 2014. Dissertação (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília.

ELIAS, S. T. et al. Cytotoxic effect of Pouteria torta leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 9, n. 4, p. 601, 2013.

ELIAS, S. T. et al. Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. **Clinical Oral Investigations**, v. 19, n. 3, p. 637-646, 2015.

FAGAN, D. H. et al. Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation. **Hormones and Cancer**, v. 8, n. 4, p. 219-229, 2017.

FARHAT, M. B et al. Antioxidant potential of *Salvia officinalis L.* residues as affected by the harvesting time. **Industrial Crops and Products**, v. 54, n. 1, p. 78-85, 2014.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, 2011.

GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613-623, 2012.

GRIFFITHS, C. L.; OLIN, J. L. Triple negative breast cancer: a brief review of its characteristics and treatment options. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 25, n. 3, p. 319-323, 2012.

GUGGENHEIMER, J.; CLOSE, J. M.; EGHTEHAD, B. Sialadenosis in patients with advanced liver disease. **Head and Neck Pathology**, v. 3, n. 2, p. 100-105, 2009.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19, p. 894-901, 2008.

HETELEKIDIS, S. et al. Predictors of local recurrence following excision alone for ductal carcinoma *in situ*. **Cancer**, v. 85, n. 2, p. 427-431, 1999.

HUNTER, D. J. et al. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, p. cebp. 0747.2010, 2010.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **INCA**; 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **INCA**; 2011. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc\\_do\\_cancer.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2019.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **INCA**; 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **INCA**; 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//catalogo-expo-mama-3a-ed-2018.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2019.



JÄNICKE, R. U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 117, n. 1, p. 219-221, 2009.

JÁUREGUI, A. M. M. et al. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 73, n. 3, p. 142-149, 2007.

JUNG, S. et al. Anticancer activity of gomisin J from *Schisandra chinensis* fruit. **Oncology Reports**, v. 41, n. 1, p. 711-717, 2019.

KALIKS, R. **Câncer da mama**, 2015. Disponível em: <<http://cancerdamama.com/sintomas-e-diagnosticos/determinacao-do-prognostico-do-cancer-de-mama/>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

KATZ, A. **Coordenador de Oncologia Clínica do Centro de Oncologia o Hospital Sírio-Libanês**, 2016. Disponível em: <<https://www.hospitalsiriolibanes.org.br/sua-saude/Paginas/cancer-mama-triplo-negativo-imunoterapia-tratamento.aspx>>. Acesso em: 28 abr. 2019.

KHOSRAVI-SHAHI, P.; CABEZÓN-GUTIÉRREZ, L.; CUSTODIO-CABELLO, S. Metastatic triple negative breast cancer: Optimizing treatment options, new and emerging targeted therapies. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 32-39, 2018.

KOBAYASHI, S. et al. Reproductive history and breast cancer risk. **Breast Cancer**, v. 19, n. 4, p. 302-308, 2012.

KRUK, J. Lifestyle components and primary breast cancer prevention. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 24, p. 10543-10555, 2014.

KUO, C. et al. Investigation of natural phenanthrenes and the antiproliferative potential of juncusol in cervical cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 58, n. 1, p. 152770, 2019.

LEE, J. N. et al. Anti-melanogenic effect of gomisin N from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon (*Schisandraceae*) in melanoma cells. **Archives of pharmacal research**, v. 40, n. 7, p. 807-817, 2017.

LI, C. I.; DALING, J. R.; MALONE, K. E. Age-specific incidence rates of in situ breast carcinomas by histologic type, 1980 to 2001. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 4, p. 1008-1011, 2005.

LIMA, P. M. A. P. et al. Effects of a carbonated soft drink on epithelial tumor incidence in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 240-247, 2018.

LISBOA, L. F. **Tendências da incidência e da mortalidade do câncer de mama feminino no município de São Paulo**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2009.

MACHADO, V. F. **Importância da detecção precoce do câncer de mama**. Disponível em: <[http://www.cceursos.com.br/img/resumos/citologia/mono\\_edilza.pdf](http://www.cceursos.com.br/img/resumos/citologia/mono_edilza.pdf)>. Acesso em: 27 abr. 2019.

MAHAMODO, S. et al. Antimicrobial prenylated benzoylphloroglucinol derivatives and xanthenes from the leaves of *Garcinia goudotiana*. **Phytochemistry**, v. 102, p. 162-168, 2014.

MAIER, S. et al. Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. **American Journal of Pharmacogenomics**, v. 5, n. 4, p. 223-232, 2005.

MAKRANE, H. et al. Cytotoxicity of the Aqueous Extract and Organic Fractions from *Origanum majorana* on Human Breast Cell Line MDA-MB-231 and Human Colon Cell Line HT-29. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2018, 2018.

MAKUBATE, B. et al. Cohort study of adherence to adjuvant endocrine therapy, breast cancer recurrence and mortality. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 7, p. 1515, 2013.

MENDES, V. A. et al. Avaliação do uso de produtos naturais na prática do profissional de saúde. **Saúde**. v. 44, n. 1, 2018.

MOHAMED, A. et al. Targetedtherapy for breastcancer. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 4, p. 1096-1112, 2013.

MURPHY, C. C. et al. Adherence to adjuvant hormonal therapy among breast cancer survivors in clinical practice: a systematic review. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 134, n. 2, p. 459-478, 2012.

MYERS, M. B. Targeted therapies with companion diagnostics in the management of breast cancer: current perspectives. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 9, n. 1, p. 7-16, 2016.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 2, p. 403-407, 2009.

NAKAMATU, T. Estudo da expressão da proteína BCL-2 em mulheres com carcinoma ductal invasivo de mama. **Correlação Anatomopatológica e da Sobrevida**. 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NISHIKAWA, Y. et al. Withaferin A induces cell death selectively in androgen-independent prostate cancer cells but not in normal fibroblast cells. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0134137, 2015.

NOBILI, S. et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, n. 6, p. 365-378, 2009.

NORDIN, M. L. et al. *In vitro* investigation of cytotoxic and antioxidative activities of *Ardisia crispa* against breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 87, 2018.

OLIVEIRA, D. S. et al. Antioxidant activity of *sabicea brasiliensis* and its effects on adenine nucleotides metabolism in A7R5 cells. **Purinergic signalling**. Van godewijkstraat 30, 3311 GZ Dordrecht, Netherlands: Springer, 2018. p. S76-S77.

OLIVEIRA, M. A. et al. Imunoexpressão da proteína Her-2 em punção aspirativa com agulha fina de carcinoma de mama: correlação com os achados da peça cirúrgica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, 2003.

PAREDES, A. O. et al. **Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em portadoras de carcinoma mamário submetidas ao uso de doxorubicina**. 2014. Dissertação (Mestrado em Saúde do Adulto e da Criança) – Universidade Federal do Maranhão.

PEREIRA, A. J. et al. **Manual para técnicos em radioterapia**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2000.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular oncology**, v. 5, n. 1, p. 5-23, 2011.

PRAT, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The Breast**, v. 24, n. 1, p. 26-35, 2015.

PRINCIVAL, I. M. R. G. **Síntese de Derivado de Furano ligados em Dendrimerobis-MPA e sua atividade anticâncer**. 2015.

PRITHIVIRAJ, B.; PASCHKE, M. W.; VIVANCO, J. M. Root communication: the role of root exudates. **Encyclopedia of Plant and Crop Science**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2007.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.

QUEIROZ, S. C. N. et al. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QUIST, J. et al. A four-gene decision tree signature classification of triple-negative breast cancer: Implications for targeted therapeutics. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 1, p. 204-212, 2019.

RICHIE, R. C.; SWANSON, J. O. Breast cancer: a review of the literature. **Journal of Insurance Medicine**, v. 35, n. 2, p. 85-101, 2003.

RIDA, P. et al. First international TNBC conference meeting report. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 169, n. 3, p. 407-412, 2018.

ROBBINS, S. L. et al. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. Philadelphia, PA: Saunders. 2010.

- RODRIGUES, F. S. S.; POLIDORI, M. M. Enfrentamento e resiliência de pacientes em tratamento quimioterápico e seus familiares. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 619-627, 2012.
- RUIZ, A. et al. Ductal Carcinoma *In Situ* of the Breast: A Comparative Analysis of Histology, Nuclear Area, Ploidy, and Neovascularization Provides Differentiation Between Low-and High-Grade Tumors. **The Breast Journal**, v. 8, n. 3, p. 139-144, 2002.
- SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 280-285, 2011.
- JÚNIOR, H. M. S. **Estudo fitoquímico das folhas de *Merremia tomentosa* (Choisy) Hall. F. (Convolvulaceae), *Sabicea brasiliensis* Wernh. (Rubiaceae) e *Heteropterys byrsonimifolia* adr. JUSS. (Malpighiaceae).** 2007. Cap. 3. p. 72-115. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SENISKI, G. G. **Análise do perfil de metilação do promotor do gene ADAM33 e sua correlação clínica com câncer de mama.** 2008.
- SHAHRZAD, K. et al. Hepatoprotective and Antioxidant Effects of *Salvia officinalis* L. *hydroalcoholic* Extract in Male Rats. **Chinese Medicine**, v. 5, n. 1, p. 130-136, 2014.
- SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. Twelve Gel comet assay format for quick examination of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 1644, p. 181-186, 2017.
- SHENG, L. et al. Chemical constituents of *Patrinia heterophylla* Bunge and selective cytotoxicity against six human tumor cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 129-135, 2019.
- SHIPITSIN, M. et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. **Cancer Cell**, v. 11, n. 3, p. 259-273, 2007.
- SILVA, A.V.D.; ZANDONADE, E.; AMORIM, M.H.C. Anxiety and coping in women with breast cancer in chemotherapy. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 5, p. 25-28, jun. 2017.
- SILVEIRA, L. A. (Ed.). **Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento.** Ed. da UFSC, 2005.
- SIMSTEIN, R. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 9, p. 995-1003, 2003.

SKOL, A. D.; SASAKI, M. M.; ONEL, K. The genetics of breast cancer risk in the post-genome era: thoughts on study design to move past BRCA and towards clinical relevance. **Breast Cancer Research**, v.18, n. 1, 2016.

SOARES, R. M. M. **Análise Imuno-histológica de tumores da mama, induzidos quimicamente com N-metil-N-nitrosureia, em ratos Sprague-Dawley**. 2012.

TANG, Z. et al. Four new cytotoxic xanthenes from *Garcinia nuijiangensis*. **Fitoterapia**, v. 102, n. 1, p. 109-114, 2015.

TANG, Y. et al. Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, n. 5, p. 335-343, 2016.

TAHER, M. A. et al. Vinca alkaloid-the second most used alkaloid for cancer treatment-A review. **International Journal of Physiology, Nutrition and Physical Education**, v. 2, n. 2, p. 723-727, 2017.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Ed.). **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs**. Iarc, 2003.

THEOBALD, M. R. et al. Percepções do paciente oncológico sobre o cuidado. **Revista de Saúde Coletiva**, v. 26, n. 1 p. 1249-1269, 2016.

TIMMERS, L. et al. Adherence and patients' experiences with the use of oral anticancer agents. **Acta Oncologica**, v. 53, n. 2, p. 259-267, 2014.

TONG, C. W. S. et al. Recent advances in the treatment of breast cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 1, p. 227, 2018.

VAN DIEST, P. J. Ductal carcinoma in situ in breast carcinogenesis. **The Journal of Pathology**, v. 187, n. 4, p. 383-384, 1999.

VENUGOPAL, K. et al. The impact of anticancer activity upon Beta vulgaris extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, n. 1, p. 99-107, 2017.

VIEIRA, G. T. et al. Atividade citotóxica do extrato de Croton urucurana Baill contra linhagens de células leucêmicas humanas U937 e THP1. **Ciência e Natura**, v. 39, n. 3, p. 512-519, 2017.

VINCENT-SALOMON, A. et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. R24, 2007.

VOLLBRECHT, B. et al. Fertilidade e sintomas de climatério em pacientes jovens com câncer de mama. **SciMed**, v. 19, n. 2, p. 58-63, 2009.

VU-NISHINO, H. et al. Clinicopathologic features and long-term outcome of patients with medullary breast carcinoma managed with breast-conserving therapy (BCT). **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 62, n. 4, p. 1040-1047, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Cancer control: knowledge into action. WHO guide for effective programmes: prevention. **World Health Organization**, 2007.

WUERSTLEIN, R.; HARBECK, N. Neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer. **Reviews on Recent Clinical Trials**, v. 12, n. 2, p. 81-92, 2017.

YERUSHALMI, R.; HAYES, M. M.; GELMON, K. A. Breast carcinoma-rare types: review of the literature. **Annals of oncology**, v. 20, n. 11, p. 1763-1770, 2009.

YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 157-169, 2011.

ZHANG, Z. et al. Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 cells via a mechanism involving the ROS-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathways. **Plos One**, v. 6, n. 11, p. e27441, 2011.