

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Fernanda Brito Leite

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS DO GÊNERO
OCOTEA EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE CÉLULAS DE CÂNCER
DE MAMA**

Juiz de Fora

2024

Fernanda Brito Leite

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS DO GÊNERO
OCOTEA EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE CÉLULAS DE CÂNCER
DE MAMA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Linha de Pesquisa: Avaliação Biológica e Farmacológica de Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvoat

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Brito Leite, Fernanda.

Avaliação da atividade citotóxica de extratos do gênero *Ocotea* em modelo experimental in vitro de células de câncer de mama / Fernanda Brito Leite. -- 2024.

88 p.

Orientadora: Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat

Coorientadora: Fernanda Maria Pinto Vilela

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Câncer de mama. 2. *Ocotea*. 3. *Ocotea villosa*. 4. MCF-7. 5. Citotoxicidade. I. Chagas de Paula Ladvocat, Ana Cláudia, orient. II. Pinto Vilela, Fernanda Maria, coorient. III. Título.

Fernanda Brito Leite

Avaliação da atividade citotóxica de extrato do gênero *Ocotea* em modelo experimental *in vitro* de células de câncer de mama

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 10 de julho de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Clarissa Ferreira Cunha

EBSERH - Hospital Universitário da UFJF

Dra. Thaís Maria da Mata Martins

Universidade Federal de Viçosa

Juiz de Fora, 20/06/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Maria Pinto Vilela, Professor(a)**, em 12/07/2024, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thaís Maria da Mata Martins, Usuário Externo**, em 12/07/2024, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **CLARISSA FERREIRA CUNHA, Usuário Externo**, em 12/07/2024, às 12:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1835452** e o código CRC **DBCCF4D7**.

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, meu amigo e auxiliador. Dedico a minha família e a todos que em algum momento sofreram com doenças tumorais, aos que venceram o câncer, aos que enfrentam a doença, e também todos que perderam um amigo ou familiar por causa dela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder saúde e a oportunidade de participar do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Agradeço ao meu esposo, Rafael, que acompanhou cada desafio e conquista durante esse período importante da minha vida. Agradeço aos meus pais e minha irmã, que sempre me incentivaram na vida acadêmica e me concederam suporte sempre que precisei.

Agradeço aos meus amigos do LCTP que me acompanharam neste caminho pela pesquisa e ciência, especialmente a Wanderleya e Diogo, que me introduziram no cultivo celular in vitro. Agradeço também a Valéria, Carine, Victor, Laura, Juliana, Daniel e Vanessa que foram um suporte nos dias difíceis durante a pesquisa. Aos funcionários do Centro de Pesquisas Farmacêuticas, a todos os técnicos que sempre estiveram disponíveis para auxiliar nos experimentos, em especial à equipe da CentralBio, do Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular e do Laboratório de Biologia Molecular por todo o suporte. Aos professores e alunos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL, em especial à professora Daniela e sua equipe por disponibilizarem os extratos. À Dra. Clarissa por disponibilizar o uso do citômetro de fluxo do HU-CAS, e ensinar com dedicação sobre o uso do equipamento e a técnica.

Agradeço imensamente a Prof. Dra. Ana Cláudia, que me recebeu e me confiou um projeto tão cheio de significado e desafios. Em cada momento difícil onde me senti incapaz, ela foi capaz de acreditar, incentivar, ensinar com paciência cada etapa que aos poucos foi sendo concluída. Agradeço a Ana por acreditar e se dedicar aos seus alunos e a pesquisa científica com sinceridade, respeito e diligência. Agradeço a Prof. Dra. Fernanda por me acolher como aluna, por auxiliar no meu crescimento e por todo incentivo durante o programa. Agradeço a banca examinadora pela disponibilidade e por conceder a honra de participar da história desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001 pela bolsa de mestrado e às agências de fomento, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), códigos de financiamento APQ-00443-18; RED-00213-23 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), código de financiamento 409090/2023-9.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, responsável por minha formação desde a graduação, e a todos os pesquisadores e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

O câncer de mama é o mais diagnosticado em mulheres tendo sido alvo de estudos científicos ao redor do mundo com o claro objetivo de reduzir sua incidência e aperfeiçoar seu tratamento. O câncer de mama ocupa o segundo lugar na causa de morte por câncer em mulheres. Os tratamentos disponíveis são agressivos e, em sua maioria, acompanhado de fortes efeitos adversos. O gênero *Ocotea* tem demonstrado propriedades farmacológicas promissoras, inclusive citotóxica, embora muito pouco tenha sido investigado com relação a essa propriedade. A partir deste cenário, o objetivo do presente trabalho foi investigar a citotoxicidade de extratos do gênero *Ocotea*, selecionar o extrato mais promissor, a partir do qual foram avaliadas as atividades citotóxicas e antiproliferativas em modelo *in vitro* de células de câncer de mama. Diante disso, células do câncer de mama (MCF-7) e fibroblastos (CCD1059Sk) foram cultivados e tratados com extratos diferentes provenientes de 56 espécies de *Ocotea*. Então, o extrato mais promissor, de *O. villosa*, foi avaliado quanto a citotoxicidade e efeito antiproliferativo. Os resultados deste trabalho demonstraram que o extrato bruto de *O. villosa* apresentou ação citotóxica ($IC_{50} = 100,00 \pm 6,06 \mu\text{g/mL}$), pró-apoptótica e antiproliferativa, além de ação na inibição da migração celular e na formação de colônias (inibição de 50%). Não foi possível confirmar alguma influência do extrato no ciclo celular. Com relação à expressão dos marcadores analisados, destaca-se o aumento da expressão de CASP9, um marcador pró-apoptótico. Assim, os resultados apontam que maiores estudos do extrato bruto desta espécie possa contribuir na elucidação mais aprofundada sobre seu mecanismo de ação, descoberta de novos tratamentos e/ou princípios ativos contra o câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama; *Ocotea*; *Ocotea villosa*, MCF-7, citotoxicidade.

ABSTRACT

Breast cancer is the most diagnosed cancer in women and has been the subject of scientific studies around the world with the clear objective of reducing its incidence and improving its treatment. Breast cancer ranks second as the cause of cancer-related death in women. The available treatments are aggressive and mostly accompanied by strong adverse effects. The genus *Ocotea* has shown promising pharmacological properties, including cytotoxicity, although very little has been investigated regarding this property. In this context, the aim of the present study is to investigate the cytotoxicity of extracts from the genus *Ocotea*, select the most promising extract, and evaluate the cytotoxic and antiproliferative activities in an in vitro model of breast cancer cells. Therefore, breast cancer cells (MCF-7) and fibroblasts (CCD1059Sk) were cultured and treated with different extracts from 56 *Ocotea* species. The most promising extract, from *O. villosa*, was then evaluated for cytotoxicity and antiproliferative effect. The results of this study demonstrated that the crude extract of *O. villosa* showed cytotoxic action ($IC_{50} = 100.00 \pm 6.06 \mu\text{g/mL}$), pro-apoptotic, and antiproliferative effects. It also inhibited cell migration and colony formation (50% inhibition). It was not possible to confirm any influence of the extract on the cell cycle. Regarding the expression of the analyzed markers, an increase in the expression of CASP9, a pro-apoptotic marker, was highlighted. Thus, the results suggest that further studies of the crude extract of this species may contribute to a deeper elucidation of its mechanism of action and the discovery of new treatments or active principles against breast cancer.

Keywords: Breast cancer; *Ocotea*; *Ocotea villosa*, MCF-7, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema de classificação histológica do câncer de mama.....	28
Figura 2 –	Esquema de classificação molecular do câncer de mama.....	30
Figura 3 –	Exsicata de <i>Ocotea lancifolia</i> e de <i>Ocotea olegans</i> , respectivamente..	38
Figura 4 –	Fluxograma.....	42
Figura 5 –	Fotomicrografia da linhagem de fibroblastos humanos (CCD1059Sk) (A) e fotomicrografia da linhagem tumoral de mama (MCF-7) (B).....	56
Figura 6 –	Resultado do ensaio de MTT para screening de 56 espécies de <i>Ocotea sp.</i> com potencial citotóxico para linhagem MCF-7.....	57
Figura 7 –	Resultados MTT do extrato bruto de <i>O. villosa</i> para MCF-7 e CCD1059Sk respectivamente.....	59
Figura 8 –	Curva dose-resposta determinada após 48h do tratamento das células MCF-7 com extrato bruto de <i>O. villosa</i> e células normais.....	60
Figura 9 –	Resultados do teste de exclusão por Azul de Tripán com extrato bruto de <i>O. villosa</i>	61
Figura 10 –	Resultados do teste de migração celular com extrato bruto de <i>O. villosa</i>	63
Figura 11 –	Imagem das colônias coradas dos grupos tratados e não tratados com EB (A). Gráfico representativo da formação de colônias (B).....	64
Figura 12 –	Resultados do ensaio de ciclo celular com grupo controle (A), extrato bruto de <i>O. villosa</i> (B) e 5-FU(C). Gráfico representativo (D).....	65
Figura 13 –	Resultados do teste de tipo de morte celular, diagrama SSCxFSC (A) com extrato bruto de <i>O. villosa</i> (B), grupo controle (C), 5-FU(D). Gráficos de percentual de apoptose (E) e necrose (F).....	70
Figura 14 –	Imagem do gel de eletroforese com amostras tratadas e não tratadas.....	71

Figura 15 – Gráficos (A-F) da contagem de pixels da imagem do gel após reação de PCR das amostras EB e controle, em função de GAPDH que foi usado como normalizador..... 72

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema de classificação do câncer de mama e taxa de sobrevida...	29
Tabela 2 – Resultados de estudos de citotoxicidade do gênero <i>Ocotea</i>	39
Tabela 3 – Espécies do Gênero <i>Ocotea</i> que foram testadas em relação ao potencial citotóxico para linhagem MCF-7.....	45
Tabela 4 – Valores de IC ₅₀ determinados após 48h de tratamento com extrato bruto de <i>O. villosa</i>	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-fluoracil
A-549	células de carcinoma de pulmão
ATCC	American Type Culture Collection
B16F10	células murinas de melanoma
Bax	regulador apoptótico
Bcl-2	regulador apoptótico
BCT	terapia conservadora da mama
BRCA	oncogene do câncer de mama
CCD1059Sk	fibroblasto humano
CCND1	oncogene que codifica ciclina D1
CDIS	carcinoma ductal in situ
CDK	proteínas-cinase dependentes de ciclinas
CLIS	carcinoma lobular in situ
Colo-205	células de câncer de cólon
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	receptor de estrogênio
ERBB2	gene que expressa HER2

FDA	Food and Drugs Administration
FDA	Food and Drug Administration
GCO	Global Cancer Observatory
HeLa	célula epitelial humana
Hep-2	célula de hepatocarcinoma
HER-2	receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
IC50	concentração inibitória média
IHQ	imuno-histoquímica
IS	índice de seletividade
LLC	células de carcinoma pulmonar de Lewis
MCF-7	células de carcinoma de mama
MCM	proteínas de Manutenção de Minicromossomos
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina
P-388	células de leucemia
PARP	poly(ADP-ribose)polymerase
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline
PCNA	antígeno nuclear de célula em proliferação
PI	iodeto de propídeo
PR	receptor de progesterona
PTFE	politetrafluoretileno
qPCR	PCR quantitativo

rcf	força G
RNA	ácido ribonucleico
rtPCR	PCR real time
SFB	soro fetal bovino
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
TNBC	câncer de mama triplo negativo
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 O câncer de mama.....	21
2.1.1 Epidemiologia e fatores de risco.....	21
2.1.2 Diagnóstico do câncer de mama.....	23
2.1.3 Marcadores patológicos.....	24
2.1.4 Aspectos clínicos e classificação.....	27
2.1.5 Principais terapias para o câncer de mama.....	30
2.1.6 Estudos <i>in vitro</i>	33
2.2 Bioprospecção de produtos naturais bioativos no câncer de mama.....	34
2.3 O gênero <i>Ocotea</i>	36
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivos Gerais.....	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4 MÉTODOS.....	42
4.1 Linhagens celulares e cultivo.....	43
4.2 Obtenção dos extratos.....	44
4.3 Ensaio de viabilidade celular.....	45
4.4 Exclusão por azul de tripan.....	49
4.5 Ensaio de migração celular pela técnica de <i>Scratch</i>	49
4.6 Ensaio clonogênico.....	50
4.7 Análise do tipo de morte celular.....	51
4.8 Análise do ciclo celular.....	52

4.9 Análise da expressão diferencial de RNA de proteínas reguladoras do ciclo celular.....	53
4.10 Análise estatística.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Extrato bruto de <i>O. villosa</i> é citotóxico para células de câncer de mama....	56
5.2 Extrato bruto de <i>O. villosa</i> inibe migração celular.....	62
5.3 Extrato bruto de <i>O. villosa</i> inibe em 50% a formação de colônias.....	64
5.4 Extrato bruto de <i>O. villosa</i> promove morte celular por apoptose.....	65
5.5 Extrato bruto de <i>O. villosa</i> não promove alteração no ciclo celular.....	68
5.6 Aumento da expressão CASP9 pós tratamento com extrato bruto de <i>O. villosa</i>	70
6. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é segundo câncer mais frequente entre as mulheres no mundo. Foram estimados 2,3 milhões de casos no mundo só no ano de 2022 (GCO, 2023). Além disso, ele representa a maior taxa de mortalidade entre os cânceres mais frequentes em mulheres, correspondendo a 666.103 mortes no mundo (GCO, 2023). No Brasil, é o segundo câncer mais frequente em mulheres, sendo o primeiro o câncer de pele não melanoma (GCO, 2023). Em 2022, foram estimados 73.610 casos novos (INCA, 2023). Ele não apresenta uma causa única, diversos fatores podem ser responsáveis pelo aumento do risco para seu desenvolvimento, entre eles podem ser listados fatores endócrinos, genéticos e comportamentais (GCO, 2023; BRAY et al., 2018).

O câncer de mama possui uma classificação histológica e molecular. A classificação, como também o seu estágio, são fatores importantes para o diagnóstico, tratamento e prognóstico. A classificação dos estágios inicia em estágio 0 (*in situ*), em sequência: estágio I e II, estágio III e estágio IV (que se refere a metástase, quando o tumor está fora do seu sítio original, tendo invadido outros tecidos) (MAUGHAN et al., 2010; TRAYES e COKENAKES, 2020). Na classificação histológica, estão estabelecidos os tipos: ductal (quando se instala nos ductos), lobular (origina nos lóbulos da mama), *in situ* (se situa em um tecido específico e não afeta os adjacentes) e invasivo (que invade outros tecidos) (MALHOTRA et al., 2010; TRAYES e COKENAKES, 2020). A subdivisão molecular classifica em quatro subtipos: luminal A, luminal B, superexpressão de HER2 e basal. A luminal A apresenta os melhores prognósticos e a luminal B os piores devido ao seu maior índice de proliferação celular (SØRLIE, 2004; TRAYES e COKENAKES, 2020).

Os tratamentos atuais para o câncer de mama podem incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia medicamentosa direcionada e imunoterapia. A maioria desses tratamentos são muito agressivos e apresentam efeitos colaterais, como fadiga, náuseas e vômitos, diarreia, linfedema, dor, entre outros sintomas. Por isso, estudos ao redor do mundo buscam melhorar o tratamento da doença (BRAY et al., 2018). Uma busca por produtos naturais bioativos tem sido realizada constantemente, apresentando resultados positivos que já puderam fornecer medicamentos eficazes para tratamento da doença, como o taxol (Paclitaxel)

que é um dos quimioterápicos utilizados para tratamento do câncer de mama. Em uma revisão sistemática, Newmann e Cragg (2020) registraram que 35 produtos naturais, 65 derivados de produtos naturais podendo conter alguma alteração sintética e 53 produtos totalmente sintéticos foram aprovados contra o câncer entre o período de 1981 e 2019; como a doxorubicina, produto natural aprovado em 1966 pelo FDA (Food and Drug Administration). Esse trabalho demonstra o grande potencial dos produtos naturais para o tratamento de tumores (NEWMAN, 2020).

Ainda há muito a ser aperfeiçoado quando o assunto é tratamento do câncer. Assim, muitos estudos continuam a investigar o potencial citotóxico de extratos de diversas espécies de plantas, ou mesmo compostos isolados das mesmas (SACCHETTI et al., 2006).

O gênero *Ocotea* tem se destacado quanto aos seus potenciais citotóxicos, porém ainda é muito pouco estudado com relação a esta propriedade (SACCHETTI et al., 2006). Ele é o maior da família Lauraceae no continente americano, sendo cerca de 350 espécies distribuídas em áreas tropicais e subtropicais do mundo (CHAVERRI, 2005). No Brasil, existem 101 espécies endêmicas de *Ocotea* e cerca de 160 espécies no total, que estão significativamente presentes na Mata Atlântica, em terras de um elevado número de estados em diferentes partes do país, mas principalmente sul e centro-leste (YAMAGUCHI et al., 2011).

Representado principalmente por árvores aromáticas que são fundamentalmente produtoras de óleos essenciais, o gênero desperta grande interesse econômico. Possui grande valor agregado na indústria madeireira, na indústria de cosméticos e perfumaria (CHAVERRI, 2005). Além disso, as *Ocotea* spp. estão relacionadas à potencial atividade farmacológica para um espectro diversificado de doenças (SACCHETTI et al., 2006).

Os povos nativos da América do Sul já utilizam as *Ocotea* spp. na medicina popular. No Peru e no Equador, por exemplo, a *O. quixos* que é usada como substituto da canela para aromatizar os alimentos, demonstrou propriedades anestésicas locais e antidiarréicas. No Brasil, a *O. lancifolia*, é conhecida por suas propriedades antirreumáticas (PALOMINO et al., 1996; CAMARGO et al., 2013). Além disso, estudos recentes confirmam propriedades anti-inflamatórias de *O. odorifera* e *O. diospyrifolia* (ALCÂNTARA, 2018; SILVA, 2019). Da mesma forma, *O. leucoxydon* tem

potencial para tratar o câncer, pois seus extratos brutos apresentaram inibição da topoisomerase I em ensaios antiproliferativos em células de leucemia, em células murinas de melanoma, pulmão e em células de câncer de cólon (ZHOU et al., 2000). Quimicamente, o gênero *Ocotea* revelou possuir diversos metabólitos secundários e grande potencial de estudo para tratamento de diversas doenças (BATISTA et al., 2010; CAMARGO et al., 2013).

Nesse contexto, considerando que o câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres no mundo, causando manifestações clínicas e com terapias agressivas que geram grande impacto na qualidade de vida dessas mulheres, são necessários tratamentos mais seguros, eficazes e menos danosos. Por isso, 56 extratos do gênero *Ocotea* foram investigados e o mais promissor foi avaliado com relação ao potencial citotóxico para células tumorais de mama, a fim de elucidar seu potencial terapêutico para o tratamento desta grave doença. Vale ressaltar que os resultados deste trabalho poderão contribuir para o desenvolvimento tecnológico de formulações que podem melhorar o tratamento do câncer de mama.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres no mundo, perdendo apenas para o câncer de pele não-melanoma (GCO, 2023). Ele é caracterizado pela proliferação e indiferenciação celular na mama. O processo de carcinogênese, que pela etiologia da palavra significa “começo do câncer”, se inicia com alterações genéticas nas células, seguido de anormalidades proliferativas e anormalidades de morte celular. O câncer de mama pode apresentar características patológicas diferentes, em alguns casos possuem um crescimento lento com bom prognóstico, enquanto outros são tumores agressivos (AZEVEDO, 1993; SUNG et al., 2021; MAIRINK et al., 2020).

A proliferação celular descontrolada está ligada diretamente a processos biomoleculares, como a super expressão de proteínas, receptores, mecanismos de ação, alterações no ciclo celular e na morte apoptótica. As células tumorais induzem de forma lenta ou rápida condições favoráveis para o seu próprio crescimento. Um processo importante que exemplifica essa característica é a angiogênese, ou seja, o surgimento de novos vasos sanguíneos em torno do tumor com a finalidade de nutri-lo (RIBEIRO, 2023).

Avanços tecnológicos na medicina e nos cuidados de saúde tornaram possível detectar a doença precocemente e iniciar o tratamento mais rapidamente para evitar o progresso da doença para um estado metastático. Considerando que o câncer de mama possui muitas variações, existem estudos ainda em desenvolvimento no que diz respeito aos mecanismos moleculares subjacentes a agressividade de certas formas desta doença (TAO et al., 2014).

2.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

O câncer de mama é um grande problema de saúde pública devido à alta incidência, as altas taxas de mortalidade/morbimortalidade, e ao alto custo de

tratamento. Foram estimados 2.296.840 novos casos em todo o mundo no ano de 2022, e dados estatísticos atuais sugerem que a incidência mundial de câncer de mama e a mortalidade dos pacientes está aumentando (GCO, 2023).

De acordo as estatísticas do GCO (Global Cancer Observatory, órgão internacional da World Health Organization), o câncer de mama em mulheres ultrapassou o câncer de pulmão como a principal causa de incidência global de câncer em 2020, com 2,3 milhões de novos casos estimados, que representa 11,7% de todos os casos de câncer (SUNG et al., 2021). Sendo essa a quinta causa de mortalidade por câncer em todo o mundo, com 666.103 mortes em 2022 (GCO, 2023). Entre mulheres, o câncer de mama é responsável por 1 em cada 4 casos de câncer e para 1 em 6 mortes por câncer, ocupando o primeiro lugar em incidência em 159 de 185 dos países, e para mortalidade em 110 países (SUNG et al., 2021).

Ainda segundo o GCO, em 2020 as taxas de incidência são 88% mais altas em países desenvolvidos do que nos países emergentes. Todavia, as taxas de mortalidade são 17% mais altas em mulheres que vivem em países emergentes em comparação com mulheres que vivem em países desenvolvidos (SUNG et al., 2021). Estudos epidemiológicos sugerem abordar questões socioeconômicas, promover o conhecimento em saúde e dar acesso à informação e cuidado às mulheres, para que seja possível buscar a redução da incidência mundial de câncer de mama (TAO et al., 2014).

Quanto aos fatores de risco, as mudanças no estilo de vida, socioculturais, os hábitos gerados por economias em crescimento, obesidade, inatividade física, adiamento da gravidez e outros, tiveram um impacto na prevalência do câncer de mama. O câncer de mama não apresenta uma causa única e diversos fatores podem estar associados ao aumento do risco para seu desenvolvimento, entre eles podem ser listados: fatores endócrinos/história reprodutiva (idade da primeira menarca precoce e idade avançada da menopausa); nuliparidade ou gravidez após os 30 anos; utilização de contraceptivos hormonais e terapia de reposição hormonal pós menopausa; fatores genéticos (histórico familiar de câncer de mama); e fatores comportamentais (consumo de álcool e sobrepeso) (TRAYES e COKENAKES, 2020; BARNARD et al., 2015; INCA, 2019).

2.1.2 Diagnóstico do câncer de mama

O diagnóstico e o rastreamento são estratégias para a detecção precoce do câncer de mama a fim de contribuir com o tratamento da doença. Em relação ao diagnóstico destaca-se a importância da educação da mulher e profissionais de saúde no reconhecimento dos sinais e sintomas da doença (INCA, 2002).

A autopalpação das mamas visa a descoberta casual de pequenas alterações mamárias sem nenhuma recomendação de técnica específica. Porém, ela não substitui o exame físico realizado por profissional de saúde qualificado. O exame que permite a detecção precoce do câncer, a mamografia (ou radiografia das mamas), atualmente, é o principal método de rastreamento e investigação da doença (INCA, 2002).

No exame mamográfico a paciente tem sua mama comprimida por um mamógrafo, onde é incidida uma radiação ionizante. Ao final, o exame fornece imagens com informações da estrutura interna, elevando a capacidade de diagnóstico. A partir do resultado, outros exames podem ser requeridos para confirmação de diagnóstico, como a biópsia ou o ultrassom das mamas (ondas de alta frequência analisam se um nódulo é sólido ou não) (FERREIRA, 2021).

Apesar de ser menos acessível, a ressonância magnética (que reproduz imagens detalhadas da mama) também pode ser usada para diagnóstico. Devido à alta sensibilidade, ela é importante para identificar tumores ocultos que estão em estágio inicial, tumores multifocais e lesões que não são identificadas por outros métodos (FRANCA et al, 2017).

Graças aos avanços no diagnóstico, é possível oferecer tratamento personalizado às características de um determinado câncer. Os testes multigênicos são uma valiosa ferramenta de diagnóstico, possibilitando planejar o tratamento ideal para um determinado paciente e avaliar a probabilidade de recorrência da doença. OncotypeDX® ou Mammaprint® são exemplos desses testes diagnósticos usados para medir a atividade de um grupo de genes no câncer de mama. Os resultados dos testes distinguem os grupos de prognóstico (com risco ou não de recorrência), possibilita saber se existe super expressão gênica de receptores hormonais ou do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2),

podendo assim indicar ou não a hormonioterapia ou quimioterapia (BRAVO et al., 2021).

As diretrizes atuais do American Cancer Society recomendam que as mulheres com 40 anos a 54 anos devem fazer os exames anualmente, mulheres maiores de 55 anos devem fazer a triagem anualmente ou de forma bienal (SUNG et al., 2021).

2.1.3 Marcadores patológicos

Os marcadores patológicos são macromoléculas relacionadas com a gênese e o crescimento de células neoplásicas, funcionando como indicadores da presença de câncer (ALMEIDA, 2006).

Em 1984, Gerdes e colaboradores fizeram análises detalhadas nos núcleos das células que revelaram a presença do antígeno Ki67 em todas as fases do ciclo celular, exceto em células quiescentes ou em repouso na fase G0. Sua ausência em células quiescentes e expressão universal em todas as células proliferativas (normais e tumorais) fazem desta proteína um excelente marcador para avaliar o crescimento de uma determinada população celular. A expressão de Ki67 oscila durante o ciclo celular, e é induzida quando as células são estimuladas a proliferar (GERDES, 1990). O papel do Ki67 na divisão celular foi definido quando se observou que ao ser bloqueado por anticorpos ocorre a parada da proliferação celular. Dessa forma, anticorpos contra Ki67 têm sido usados no diagnóstico de diferentes tipos de neoplasias (KILL, 1996; STARBORG et al., 1996).

Existe uma forte correlação entre expressão de Ki67 e a proliferação. De forma que os estágios tumorais mais avançados estão associados a uma porcentagem maior de células que expressam Ki67 (INWALD et al., 2013). Além disso, maior expressão de Ki67 foi encontrada em metástases linfonodais do que em tumores primários de mama, e correlacionou com menor sobrevida em pacientes (JURÍKOVÁ et al., 2016). Dowsett e colaboradores (2011) reforçam que alterações na expressão de Ki67 em células tumorais em comparação com células normais podem ser usadas como um preditor precoce da eficácia do tratamento e como um fator prognóstico para resultados de longo prazo em pacientes com câncer.

Outro marcador importante é o antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA), conhecido como um marcador do ciclo celular, cuja função está relacionada ao metabolismo do ácido nucleico, como na replicação do DNA, reparo por excisão do DNA, controle do ciclo celular, montagem da cromatina e transcrição do RNA. Marcada pelo seu papel na replicação do DNA, ele funciona como uma “braçadeira deslizante de DNA” para aumentar a eficiência de polimerases durante a síntese de longas fitas de DNA. PCNA interage com o complexo CDK2-ciclina A e estimula a fosforilação. Em contraste, a interrupção das interações entre PCNA e complexos ciclina-CDK pela ligação competitiva do p21 (inibidor de CDK) é um sinal para a parada da replicação do DNA (CELIS E CELIS, 1985; KOUNDRIOUKOFF et al., 2000).

A síntese de PCNA é baixa em células quiescentes e sua expressão é regulada no nível transcricional (ALMENDRAL et al., 1987). Ela é detectada em células normais em proliferação e células tumorais. Sua concentração varia durante o ciclo celular, com aumento durante a fase S. A localização nuclear da PCNA muda ao longo da fase S e coincide com os locais de replicação do DNA (CELIS E CELIS, 1985; JURÍKOVÁ et al., 2016).

A família de proteínas chamadas de proteínas de manutenção de minicromossomos ou MCM (MCM2 a MCM7) são outro marcador ideal para a proliferação celular. Estudos moleculares sugeriram que níveis aumentados de MCMs podem ser um marcador de células proliferativas malignas, células pré-cancerosas e indicar potencial de recorrência (ALISON et al., 2002; HUNT et al., 2002). Como o próprio nome diz, as MCM são responsáveis pela manutenção dos minicromossomos e são consideradas o fator chave para o início da replicação. Além disso, elas são necessárias para o alongamento da replicação, coesão, condensação, transcrição e recombinação do DNA (FORSBURG, 2004).

O MCM2 é um forte marcador prognóstico no câncer de mama já que sua alta expressão está associada à sobrevida, recorrência regional e metástases distantes (GONZALEZ et al., 2003). Além disso, o MCM2 foi expresso com mais frequência no câncer de mama quando comparado com o Ki67 (GONZALEZ et al., 2003; SHETTY et al., 2005). Também foi observada correlação positiva entre a expressão de Ki67 e MCM2, ambos envolvidos no controle da proliferação celular (WOJNAR et al., 2011).

De acordo com *National Academy of Clinical Biochemistry guidelines*, o receptor de estrogênio (ER) e os receptores de progesterona (PR) são marcadores preditivos e prognósticos (parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico para prever a sobrevida do paciente). ER e PR devem ser investigados em todas as pacientes com câncer de mama com o objetivo de identificar pacientes com câncer que podem ser tratadas com terapia hormonal. Em geral, o ensaio recomendado para ER e PR é imunoenzimático (ELISA) ou imuno-histoquímica (IHQ). Associados com fatores prognósticos estabelecidos, ou seja, estágio do tumor, grau do tumor e número de metástases linfonodais, ER e PR também podem ser usados para determinar o prognóstico de curto prazo em pacientes com câncer de mama recém-diagnosticado (DONEPUDI et al., 2014).

O oncogene HER2 também é um importante marcador para o câncer de mama. Ele codifica receptores do fator de crescimento epidérmico e é um marcador de prognóstico. Usado principalmente em pacientes com linfonodo positivo, ele deve ser medido em todas as pacientes com câncer de mama invasivo. O objetivo principal de medir esse marcador é selecionar pacientes com câncer de mama que pode ser tratado com trastuzumabe (anticorpo monoclonal humanizado anti-HER-2), ou identificar a possibilidade de tratamento à base de antraciclina (quimioterapia adjuvante) (DONEPUDI et al., 2014).

O gene supressor de tumor p53 é um dos marcadores que será avaliado nesse trabalho. A proteína p53 desempenha um dos principais mecanismos de controle do câncer, pois codifica proteína de reparo do DNA, bloqueando o ciclo celular em células que sofreram alteração no seu DNA, fornecendo tempo para a sua reparação, impedindo que as células se repliquem com DNA danificado. p53 pode ativar proteínas inibidoras de CDKs (proteínas-cinase dependentes de ciclinas), ativar as enzimas de reparo do DNA ou induzir a apoptose. Por isso, mutações nos genes supressores de tumor, como p53, p16 e p21 levam ao início da proliferação celular descontrolada (DONEPUDI et al., 2014). Mutações na proteína p53 são encontradas em cerca de 50% de todos os cânceres humanos (ALMEIDA, 2007).

O controle da divisão celular é regulado por um complexo mecanismo com a interação de muitos genes. As ciclinas E, A, D e B estimulam a proliferação celular se ligando aos complexos com quinase dependente de ciclina. No câncer de mama, o

gene CCND1 (oncogene) codifica a ciclina D1 ativada, que resulta em proliferação celular irregular. A ciclina E1 é um dos biomarcadores mais promissores no câncer de mama, podendo determinar a escolha de classe de medicamentos chamada de inibidores de CDK. Devido ao seu forte valor preditivo, a expressão da ciclina E1 pode ser usada para triagem de pacientes. É importante ressaltar que o gene da ciclina E1 é altamente relacionada ao da ciclina E2, ambos são alvos de estrogênio que podem facilitar a resistência antiestrogênica e podem ser altamente expressos no câncer de mama (MILIOLI et al., 2020).

2.1.4 Aspectos clínicos e classificação

Em um estudo de Koo e colaboradores (2017), foram analisados os sinais e sintomas de quase três mil mulheres com câncer de mama, sendo que 83% apresentaram-se sintomáticas. Apesar da presença de sinais, é relatado que maior parte das mulheres aguarda 90 dias ou mais para procurar assistência médica. Foram relatados um total de 56 sintomas iniciais distintos, sendo o nódulo na mama o mais comum, registrado em cerca de 80% de todas mulheres. Além disso, também é detectado anormalidade nos mamilos (7%), dor nas mamas (6%) e anormalidades da pele da mama (2%).

Em geral, os sinais e sintomas consistem em mudança do tamanho ou forma dos seios, aparecimento de caroço, espessamento, rubor, erupção na pele ou entorno do mamilo, enrugamento da pele ou ondulação, inversão ou mudança de posição ou forma do mamilo, inchaço e aparecimento de caroços nas axilas, além de dor mamária e axilar (KOO et al., 2016).

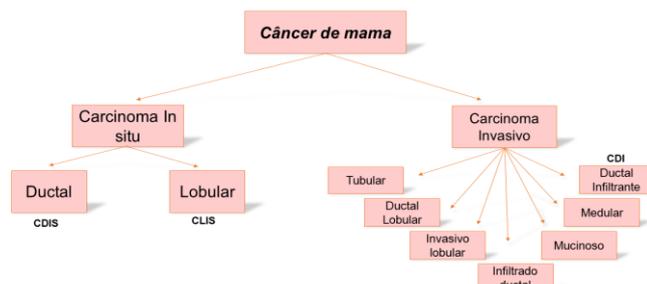
A qualidade de vida da paciente é afetada negativamente devido ao tratamento. Ela pode manifestar alopecia, retirada da mama (mastectomia), déficit de autonomia, decadência de atividades laborais e outros que remetem a uma modificação direta nas relações sociais, envolvendo aspectos emocionais e físicos (ROBERTO et al., 2020).

Quanto à classificação da doença, o câncer de mama pode ser dividido em classificação histológica e classificação molecular. Compreender os estágios que o câncer de mama pode apresentar ou evoluir é importante para entender as opções de tratamento da doença e os cuidados necessários (TRAYES e COKENAKES, 2020).

Na classificação histológica, o câncer de mama pode ser amplamente categorizado em carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (MALHOTRA et al., 2010). O carcinoma *in situ* é um achado microscópico de crescimento tecidual anormal da mama, quando nos lóbulos ele é subclassificado em lobular, quando nos ductos, ductal. Padrões de crescimento e características citológicas formam a base para distinguir entre os dois subtipos, sendo que o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é mais comum que o carcinoma lobular *in situ* (CLIS). O carcinoma *in situ* não progride, mas aumenta o risco de desenvolver o câncer de mama invasivo em qualquer uma das mamas em aproximadamente 7% ao longo de 10 anos. Para esses casos, a *National Comprehensive Cancer Network* recomenda mamografia anual e exame clínico das mamas semestralmente. Nesse caso, terapias locais e sistêmicas não são indicadas, mas as pacientes devem ser submetidas a vigilância rigorosa, além de receber informações sobre a quimioprevenção com moduladores seletivos dos receptores de estrogênio, como o tamoxifeno (MAUGHAM et al., 2010; MALHOTRA et al., 2010; TRAYES e COKENAKES, 2020).

O carcinoma invasivo é um grupo heterogêneo de tumores diferenciados em subtipos histológicos. Os principais tipos de tumores invasivos incluem infiltração ductal, invasivo lobular, ductal/lobular, mucinoso (colóide), tubular, carcinomas medular e papilar (**Figura 1**). Destes, o carcinoma ductal infiltrante (CDI) é o mais comum, representando 70-80% de todas as lesões invasivas. Ele é ainda subclassificado como bem diferenciado (grau 1), moderadamente diferenciado (grau 2) ou pouco diferenciados (grau 3) (MALHOTRA et al., 2010, TRAYES e COKENAKES, 2020). A **Tabela 1** demonstra o esquema de classificação do câncer de mama associada a taxa de sobrevivência do paciente (MAUGHAM et al., 2010, TRAYES e COKENAKES, 2020).

Figura 1- Esquema de classificação histológica do câncer de mama



Fonte: Adaptado de MALHOTRA et al., 2010.

Tabela 1 - Esquema de classificação do câncer de mama e taxa de sobrevida.

Estágio do câncer	Classificação	Taxa de sobrevida em cinco anos (%)
0	In situ	100
I, IIa, IIb	Invasivo (inicial)	98 (local) 83.6 (regional)
IIIa, IIIb, IIIc	Localmente avançado	57
IV	Metastático	23,4

Fonte: Adaptado de MAUGHAM et al., 2010.

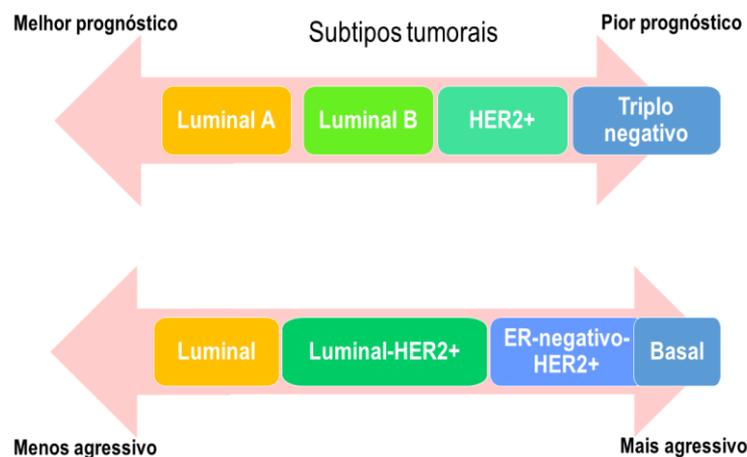
Com os avanços no tratamento da doença em busca de realizar cirurgias assertivas e reduzir os efeitos adversos, tornou-se necessário identificar com mais precisão pacientes com base no risco relativo de recorrência ou progressão. Essas demandas levaram à adoção de novos sistemas de classificação que incorporam marcadores moleculares como: ER, PR, ErbB2 (Her2/neu) e p53 (MAUGHAM et al., 2010; MALHOTRA et al., 2010).

Apesar de que nos carcinomas *in situ*, o uso de marcadores moleculares ainda ser debatido, eles são muito usados para CDI e recomenda-se que seja determinado em todos os carcinomas invasivos. O uso da classificação em ER, PR e HER2 no CDI exemplifica o potencial de biomarcadores moleculares na orientação de decisões clínicas. A presença ou ausência desses marcadores ajuda a determinar quais os pacientes provavelmente responderão a terapias direcionadas (MAUGHAM et al., 2010; MALHOTRA et al., 2010).

O estudo da expressão gênica permitiu a identificação de subtipos moleculares de câncer de mama, como: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo e tumores basais (**Figura 2**). Luminal A é caracterizado pela alta expressão de genes associados à atividade dos receptores hormonais (RH) e baixa expressão de genes associados a proliferação (Ki67) e genes que expressam receptor HER2 (ERBB2). Luminal B é

caracterizado por RH positivo associado a baixa expressão de ERBB2, e marcação Ki67 maior ou igual a 15%. O subtipo HER2 positivo é caracterizado pela super expressão de ERBB2 combinada com a ausência de RH. O carcinoma de mama tipo basal, ou câncer triplo negativo (TNBC), é marcado por ser negativo para RH e ERBB2, e apresentar elevado percentual de Ki67, ele é conhecido como a forma mais agressiva da doença (SARHANGI et al., 2023).

Figura 2 - Esquema de classificação molecular do câncer de mama.



Fonte: Adaptado de DAI et al., 2017.

2.1.5 Principais terapias para o câncer de mama

Os tratamentos para o câncer de mama são escolhidos com base no tipo de tumor, no estágio que se encontra, histologia, marcadores moleculares e outros. Dentre os tratamentos é possível citar: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia direcionada e imunoterapia.

Os procedimentos cirúrgicos para o câncer de mama geralmente são aplicados nos estágios iniciais da doença, sendo os principais: excisão tumoral; mastectomia; excisão do linfonodo sentinela; excisão do sistema linfático axilar. Em casos de estágio III, tumores maiores, são utilizadas técnicas quimioterápicas. No estágio IV, as escolhas são baseadas no prolongamento do tempo de vida, resposta do tumor e viabilidade dos procedimentos que são causadores de muitos efeitos adversos (SILVA et. al, 2020).

Atualmente, a terapia conservadora da mama (*breast-conserving therapy*, BCT), um método aplicado no início do câncer, está se tornando cada vez mais usado. Pacientes que atendem aos critérios de elegibilidade para tratamento poupador, de acordo com as diretrizes da Associação de Cirurgia de Mama, devem ter a oportunidade de escolher entre esse tratamento e a mastectomia completa. O tratamento cirúrgico conservador da mama consiste em: retirada do tumor juntamente com a margem de tecidos saudáveis; ou quadrantectomia; ou cirurgia dentro da fossa axilar. Além da intervenção cirúrgica, geralmente é usado o tratamento adjuvante que consiste no uso de radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia ou uma combinação destes métodos (BRAVO et al., 2021).

A radioterapia é aplicada em todas as pacientes tratadas pelo método BCT, com o intuito de reduzir o risco de recorrência do processo da doença. Indicações para o uso de radioterapia adjuvante também incluem a ocorrência de metástases em pelo menos quatro linfonodos e a presença de margens teciduais positivas. O procedimento consiste na irradiação da área do peito e dos campos nodais, onde essa radiação destrói ou inibe o crescimento das células tumorais (BRAVO et al., 2021).

A quimioterapia pode ser o tratamento principal ou adjuvante e envolve o uso de citostáticos. Ela é um método de tratamento sistêmico, ou seja, são administrados na corrente sanguínea para atingir as células tumorais em todo o corpo. Geralmente, a quimioterapia é um processo longo e agressivo, onde os pacientes enfrentam ciclos de aplicação dos citostáticos (ou de um grupo deles). Em alguns casos, a quimioterapia é adjuvante, quando o objetivo é diminuir o tumor para uma cirurgia, por exemplo. Também pode ser aplicada após a cirurgia a fim de diminuir o risco de recorrência (DEVITA et al., 2023). A via mais utilizada é endovenosa e pode introduzir uma combinação de 2 ou 3 medicamentos, sendo que os fatores de risco, prognóstico e condições da paciente definem qual ou quais drogas serão escolhidas (DEVITA et al., 2023; RANG, 2012).

A perda de apetite, desânimo, perda de peso, fadiga, cansaço, infecções, hemorragias, hematomas, diarreia ou constipação, perda de cabelo são alguns dos efeitos colaterais da quimioterapia, que induz, na maioria dos casos, o uso de outros medicamentos para auxiliar contra esses efeitos, funcionando como uma terapia de suporte (RANG, 2012).

Com relação aos medicamentos quimioterápicos ou agentes citotóxicos, eles podem ser divididos em: alquilantes (como, ciclofosfamida), antimetabólitos (como, 5-FU, metotrexato), antibióticos citotóxicos (como, doxorubicina), derivados de plantas (paclitaxel, vimblastina e outros), hormônios/antagonistas (terapia hormonal, exemplo o tamoxifeno), inibidores de proteínas quinases (imatinibe e outros) e anticorpos monoclonais (imunoterapia, exemplo o trastuzumabe), sendo as três últimas terapias alvo-dirigida (RANG, 2012; BRUNTON et al., 2012).

A hormonioterapia busca interferir no crescimento tumoral em pacientes com câncer de mama associado à expressão de receptores hormonais. Ela tem o objetivo de reduzir o número de hormônios e diminuir os sintomas associado ao câncer (BRAVO et al., 2021).

A imunoterapia consiste no aprimoramento da resposta imune no microambiente imunossupressor do tumor para controlar a proliferação celular maligna (MELIS et al., 2017). Ela utiliza anticorpos monoclonais para bloquear os pontos de verificação imune expressas na superfície de linfócitos T. Os linfócitos TCD8+ reconhecem antígenos tumorais, produzem interferon- γ e induzem parada do ciclo celular, morte celular, atividade antitumoral de macrófagos no microambiente tumoral e inibição da angiogênese (DUNN et al., 2004). Contudo, as reações adversas imunomediadas estão presentes devido à ativação e proliferação dos linfócitos T. As reações imunes podem ser graves, como: hepatites, endocrinopatias, neuropatias, toxicidade hematológica e doenças autoimunes, e até fulminantes, e geralmente ocorrem após a primeira administração. Essas condições exigem monitoramento clínico e intervenções a fim de amenizar os efeitos tóxicos (VOLPE et al., 2017).

Como múltiplas lesões genéticas estão envolvidos na iniciação e manutenção do câncer, o direcionamento dessas vias oncogênicas pode ser uma estratégia muito poderosa para inibir o crescimento do tumor. Esse tratamento é chamado de terapia direcionada. Estudos sugerem que muitos cânceres são dependentes de uma única via oncogênica e suscetível à inibição de oncogenes únicos. Além disso, muitos tumores dependem de diferentes proteínas celulares que não são oncogenes e não estão envolvidas na iniciação do tumor, mas são absolutamente necessárias para sobrevivência e/ou crescimento do tumor, podendo ser exploradas para a terapia do câncer (LEV, 2020).

Atualmente, os inibidores de PARP (*poly(ADP-ribose)polymerase*) foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de câncer ovariano e pacientes com câncer de mama com mutações BRCA (gene do câncer de mama). É importante ressaltar que até 15% dos pacientes com câncer de mama triplo negativo apresentam mutações germinativas no BRCA, particularmente no BRCA1, e dois inibidores de PARP, olaparibe e talazoparibe, foram aprovados pelo FDA para pacientes TNBC com mutações BRCA. No entanto, a resistência aos inibidores de PARP permanece um problema na clínica (LEV, 2020).

Embora os agentes utilizados mostrem melhora na sobrevida dos pacientes, cada terapia se associa a uma série de limitações que incluem resposta terapêutica de pouca duração, efeitos adversos e resistência medicamentosa, com progressão da doença no sexto a sétimo mês de tratamento (MELIS et al., 2017). Em adição, a terapia direcionada exige também a elucidação e melhor entendimento dos alvos moleculares que sejam satisfatórios em desempenhar funções-chave no crescimento e sobrevivência das células cancerígenas (SHARIFIRAD et al., 2019). Desta forma, é relevante a descoberta de substâncias líderes para o desenvolvimento de novos medicamentos com mecanismo de ação diferente e superior ao dos disponíveis atualmente.

2.1.6 Estudos *in vitro*

Na busca científica por novos fármacos, os testes *in vitro* são utilizados para identificar atividades citotóxicas ou antiproliferativas. Devido aos vários tipos de câncer nesse tópico apresentado, diversas linhagens celulares são cultivadas em laboratório para identificar a correta aplicação do possível fármaco, seu mecanismo de ação e resultado. Essas linhagens se diferem quanto ao local de origem (ductos, epitélio mamário e outros), quanto ao paciente de origem e o tempo (ATCC, 2023). Elas possuem características moleculares e expressão de alguns genes diferentes entre si. MDA-MB-453, MDA-MB-231, HCC38 e BT-549 são células de linhagem humana de adenocarcinoma mamário, com características de câncer de mama triplo-negativo, o tipo mais agressivo. Dentre essas, a mais citada em testes para TNBC é a MDA-MB-231 (FERREIRA, 2022). A linhagem MCF-7 também é uma linhagem celular humana de adenocarcinoma mamário muito utilizada em laboratórios de

pesquisa ao redor do mundo, ela não representa um grupo com características metastáticas (ATCC, 2022). Já as células MCF-10A são células da mama que apresentam displasia mamária benigna, não cancerígena (REHMAN et al., 2022).

2.2 Bioprospecção de produtos naturais bioativos no câncer de mama

Desde os primórdios da humanidade o uso de plantas e produtos naturais para o tratamento de doenças é alvo de estudo. Os extratos de uma grande biodiversidade ainda não explorada têm sido alvos de muitos estudos científicos (ZHANG, 2002).

Muitos agentes extraídos de plantas podem ter potencial para tratamento do câncer de mama. Eles geralmente apresentam ação por indução de apoptose, epigenética, modulação hormonal, entre outros. Experimentos *in vitro* contra células cancerígenas, ou *in vivo* (principalmente com modelo murino) e ensaios clínicos têm reafirmado a eficácia de produtos naturais e os compostos derivados contra o câncer de mama (MAGALHÃES et. Al, 2021). Também são encontradas evidências com relação a um efeito protetor contra casos de recorrência e quimiossensibilização a drogas padrão. Além disso, atualmente o emprego da nanotecnologia tem proporcionado a entrega otimizada dessas moléculas terapêuticas. Portanto, os produtos naturais são promissores para serem usados como tratamento ou tratamento adjuvante contra o câncer de mama (MAGALHÃES et. Al, 2021).

Atualmente, os agentes antineoplásicos (ou quimioterápicos) podem ser divididos de forma didática pelo seu mecanismo de ação, podendo ser da classe de: antimetabólitos (como os antimetabólitos de pirimidinas, cita-se o 5-FU ou 5-fluoracil); alquilantes (agentes altamente eletrofílicos, que reagem com nucleófilos formando ligações covalentes fortes, cita-se a ciclofosfamida); de origem natural que atuam em proteínas estruturais (como paclitaxel ou taxol, vincristina, vimblastina e outros); de origem natural que atuam na inibição da topoisomerase (como a camptotecina, as antraciclinas); e os antineoplásicos de ação mista (ROCHE, 2008).

A seguir, são apresentados alguns estudos de extratos ou substâncias isoladas provenientes de plantas aplicados ao câncer de mama ou com potencial para aplicação no tratamento da doença.

Alcalóides da *Vinca rosea* são bem conhecidos por ligar à tubulina, impedir sua polimerização e consequente formação dos microtúbulos (ALMEIDA, 2005). Já o taxol, proveniente da espécie *Taxus brevifolia* age se ligando a tubulina e acelerando a polimerização, porém a despolimerização é inibida causando supressão da mitose (ALMEIDA, 2005). A camptotecina da *Camptotheca acuminata* age inibindo a topoisomerase I e quebrando a fita de DNA (STAKER et al., 2002).

Para o câncer de mama dependente de hormônio uma outra classe de tratamento deve ser citada: as terapias hormonais, como os antiestrogênios (por exemplo o tamoxifeno) (ROCHE, 2008). Um estudo demonstrou que a berberina (alcaloide benzilisoquinolina) e o tamoxifeno associados induzem a inibição do crescimento celular de forma mais eficaz do que tamoxifeno sozinho. A berberina (naturalmente extraída de rizomas e raízes de várias plantas, como as da espécie *Berberis aristata*) com células induzidas sinergicamente por evodiamina geram uma parada no ciclo celular e apoptose de células MCF-7 (WEN et al., 2016).

A quercetina (um polifenol pertencente à classe dos flavonóides) na dose de 50 μ M suprime efetivamente a viabilidade e proliferação de células MCF-7 pela ativação das vias de sinalização de apoptose e necrose (induzida através do aumento expressão de Bax e Caspase-3 e expressão decrescente de genes Bcl-2). A necrose foi induzida pelo aumento da expressão de RIPK1 e RIPK3 (WEN et al., 2016).

Assim esses estudos fornecem estratégias potenciais para o desenvolvimento de novos agentes contra cânceres resistentes à apoptose. Outros trabalhos têm investigado extratos com potenciais citotóxicos para células tumorais, alguns serão citados abaixo.

A berberina foi avaliada contra células do câncer de mama. No trabalho de Al-Dabbagh e colaboradores (2018), o composto foi usado junto com a cisplatina (antineoplásico) e levou a ativação de fatores pró-apoptóticos, levando ao aumento da expressão de caspases, em especial a caspase-9 (responsável pelas fases iniciais da apoptose), podendo indicar como terapia coadjuvante.

O resveratrol é um polifenol não flavonoide presente em várias fontes dietéticas, incluindo uvas, bagas, soja, romã e amendoim. Ele apresenta eficácia contra proliferação de células tumorais, metástase, alterações epigenéticas e para

indução de apoptose, bem como sensibilização para quimioterápicos em vários modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama. É considerando um composto importante como tratamento adjuvante do câncer (SINHA et al., 2015).

Extratos de diversas espécies são pesquisados com a intenção de inovar o tratamento do câncer de mama, o extrato de *Christia vespertiliomis* apresentou efeito antiproliferativo em células MCF-7. A fração diclorometano desse extrato teve alto efeito antiproliferativo contra as células MCF-7 ($IC_{50} = 24 \mu\text{g/mL}$, índice seletivo (IS) = 8,17), induzindo apoptose, aumentando a expressão de BAX, citocromo c, caspase-8, caspase-3 e regulando negativamente BCL-2 e o nível de PCNA (antígeno nuclear de célula em proliferação). Além de ativar a via de morte apoptótica dependente de p53 (ISMAIL et al., 2021).

Outro estudo que apresenta extratos com potencial citotóxico para o câncer de mama foi desenvolvido com o extrato de *Grammatophyllum speciosum* Blume, que exibiu várias atividades farmacológicas promissoras. Os extratos etanólicos de pseudobulbo de *G. Speciosum* e da isovitexina apresentaram efeito antiproliferativo em células de câncer de mama humano MCF-7 e suprimiram o nível de AKT fosforilado e β -catenina (CHOWJAREAN, 2021).

Ainda há muitas possibilidades quando o assunto é produtos naturais e câncer de mama, sendo o principal objetivo encontrar tratamentos mais seletivos e com menor efeito colateral, sendo essa uma problemática na quimioterapia atual.

2.3 O gênero *Ocotea*

O Brasil é uma das nações com maior biodiversidade do mundo e o potencial terapêutico da maioria das espécies endêmicas permanece desconhecido (SILVA, 2016). A família Lauraceae está presente nas Américas, Ásia tropical, Madagascar e Austrália. Possui 50 gêneros e entre 2500 a 3000 espécies. No Brasil, são encontrados cerca de 23 gêneros e 434 espécies (BROTTO et al., 2013; KAMIMURA et al., 2017). Ela apresenta uma grande importância comercial, na alimentação, na carpintaria e na indústria de cosméticos (MARQUES, 2001).

A família Lauraceae é conhecida por possuir alto grau de quimiodiversidade em óleos essenciais. Um dos principais gêneros dessa família é o gênero *Ocotea*, no qual

componentes químicos únicos foram encontrados. O gênero *Ocotea* possui mais de 350 espécies tropicais e subtropicais, como arbustos aromáticos e árvores nas regiões das Américas e da África Austral, sendo uma grande fonte de óleos essenciais que são conceituados na indústria de perfumes. Aproximadamente 160 dessas espécies são encontradas no Brasil, muitas são conhecidas como “plantas medicinais”. Além da perfumaria, espécies de *Ocotea* são importantes nas indústrias madeireiras, trazendo um alerta quanto ao desmatamento ou exploração excessiva das espécies do gênero (SACCHETI, 2006; YAMAGUCHI et al., 2011).

Algumas espécies do gênero *Ocotea* são conhecidas na medicina tradicional, como a *Ocotea longifoli*, que foi relatada no tratamento de dermatose e sífilis (PECKOLT, 1853), e de febre e malária pelos índios guaranis (SOUZA, 2004; SACCHETI, 2006). A *Ocotea puchury* é usada na medicina tradicional para tratar doenças gastrointestinais e antirreumáticas, além de possuir propriedades sedativas (LEPORATTI et al., 2014; NORIEGA, 2016).

A *Ocotea quixos* é conhecida pelas suas propriedades aromáticas desde os incas, era usada como aperitivo, desinfetante, anestésico local, e suas folhas eram tradicionalmente usadas para fazer uma infusão antidiarréica (SACCHETI, 2006). Esta espécie possui árvore que produz grandes cálices florais que são tradicionalmente usados pelos povos indígenas da Amazônia como um substituto da canela para aromatizar doces e bolos. O óleo essencial obtido dos cálices florais é composto principalmente por fenilpropanóides (cinamaldeído e cinamato de metila) (SACCHETI, 2006).

Em 2010, Ballabeni e colaboradores investigaram as propriedades anti-inflamatórias do óleo essencial de *O. quixos* e de seus componentes principais, trans-cinamaldeído e cinamato de metila, em modelos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados do estudo mostraram a atividade gastroprotetora e propriedades anti-inflamatórias no óleo de *O. quixos* e de seus principais componentes.

A *Ocotea corymbosa* tem sua madeira empregada na indústria da construção civil. Dela já foram isolados monoterpenos e sesquiterpenos, bem como fitoesteróis dos frutos verdes, e sesquiterpenos com esqueleto de calameneno foram caracterizados a partir de sua casca. Já a *Ocotea elegans* é abundante no Brasil, e há relatos do isolamento de neolignanas dos caules. Batista e colaboradores isolaram

um éster do ácido 4-O-E-cafeoilquínico e três flavonóides de *O. corymbosa*, um sesquiterpeno aromático e um flavonóide de *O. elegans* (BATISTA et al., 2010).

A *Ocotea lancifolia* (**Figura 3**) conhecida por canela pilosa, no Paraguai é usada na medicina popular como antiparasitário. Apesar disso, há pouca descrição na literatura de estudos fitoquímicos do extrato de alcalóides da planta. Fournet e colaboradores (2007) desenvolveram um estudo que avaliou *in vitro* a atividade de treze alcalóides isolados de *O. lancifolia* contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. O alcalóide noraporfínico (-) caaverina foi o que mais apresentou atividade antiprotozoária contra os parasitas *L. amazonensis* e *T. Cruzi*. Em 2013, Camargo e colaboradores realizaram o isolamento de oito sesquiterpenos a partir do extrato de *Ocotea lancifolia*, sendo seis deles inéditos (CAMARGO et al., 2013).

Figura 3- Exsicata de *Ocotea lancifolia*, e de *Ocotea olegans*, respectivamente.



Fonte: Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil 2020.

Dentre as atividades farmacológicas do gênero *Ocotea*, seja por seus extratos ou substâncias isoladas, estão: atividade antioxidante, anti-inflamatória (DESTRYANA et al., 2014), atividade depressora no sistema nervoso central (SOUSA et al., 2005), ação cardiovascular, anti-hipertensivo (BARBOSA-FILHO et al., 2008), atividade acaricida (CONCEIÇÃO et al., 2017), atividade anti-plasmodial e contra o *Aedys*

aegypti (RAKOTONDRAIBE et al., 2014), atividade antifúngica (DA SILVA et al., 2017), atividade anti-herpética (GARRETT et al., 2012), inibição da produção de óxido nítrico e atividade contra micobactérias (COSTA et al., 2015) e ação antiproliferativa em células do câncer do ovário (LIU et al., 2015).

A **Tabela 2** reúne resultados de estudos do gênero *Ocotea* já publicados que estão relacionados a um potencial citotóxico.

Tabela 2 – Resultados de estudos de citotoxicidade do gênero *Ocotea*.

Espécie	Atividade / Linhagem testada / Tipo do tumor	Referência
<i>Ocotea caparrapi</i>	Atividade inibidora do crescimento contra células de leucemia	PALOMINO et al., 1995
<i>Ocotea leucoxydon</i>	Inibição da topoisomerase I em ensaios antiproliferativos em células de leucemia (P-388), em células murinas de melanoma (B16F10), e carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) e em células de câncer de cólon (Colo-205)	ZHOU et al., 2000
<i>Ocotea aacutifolia</i>	Possui um alcaloide neolitsina apresentou potencial citotóxico para MCF-7	GARCEZ et al., 2010
<i>Ocotea macrophylla</i>	Possui duas lignanas e um diterpeno isolados de três plantas da família Lauraceae (na qual uma delas era a <i>Ocotea macrophylla</i>). Os compostos lilifol A e mirandin A (derivados sintéticos) exibiram efeito citotóxico para MCF-7	CUCA et al., 2011
<i>Ocotea longifolia</i>	Extrato do caule da <i>Ocotea longifolia</i> Kunth apresentou atividade contra linhagens Hep-G2 (células de carcinoma humano de fígado) e HL60 (células de leucemia humana). Extrato das folhas dessa espécie foi citotóxico para Hep-G2, HL60, B16-F10 (células de melanoma murino), K562 (células eritroleucêmica Ph+) e PBMC (célula mononuclear do sangue periférico).	SILVA et al., 2016

As *Ocotea* spp. possuem uma diversidade na composição química dos óleos essenciais e das diferentes partes das plantas (galhos, frutos e flores). Esse gênero chama a atenção por exibir diversos tipos e classes de metabólitos secundários, como furanos, lignanas, biciclooctano, neolignanas, benzilisoquinolina, alcalóides aporfínicos, alcalóides benzilisoquinolidínicos e sesquiterpenos (CAMARGO et al.,

2013; CUCA et al., 2011, BATISTA et al., 2010). Diversos estudos demonstraram o potencial citotóxico, inclusive para linhagens de câncer de mama (CUCA et al., 2011; GARCEZ et al., 2010) e anti-inflamatório (BALLABENI et al., 2010; DESTRYANA et al., 2014) de espécies do gênero, ressaltando a importância que o gênero representa na descoberta de novos compostos para tratamento do câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de extratos do gênero *Ocotea*, selecionar a espécie mais promissora, a partir da qual foram avaliadas as atividades citotóxicas e antiproliferativas do extrato em modelo *in vitro* de células de câncer de mama, e sugerir o possível mecanismo de ação.

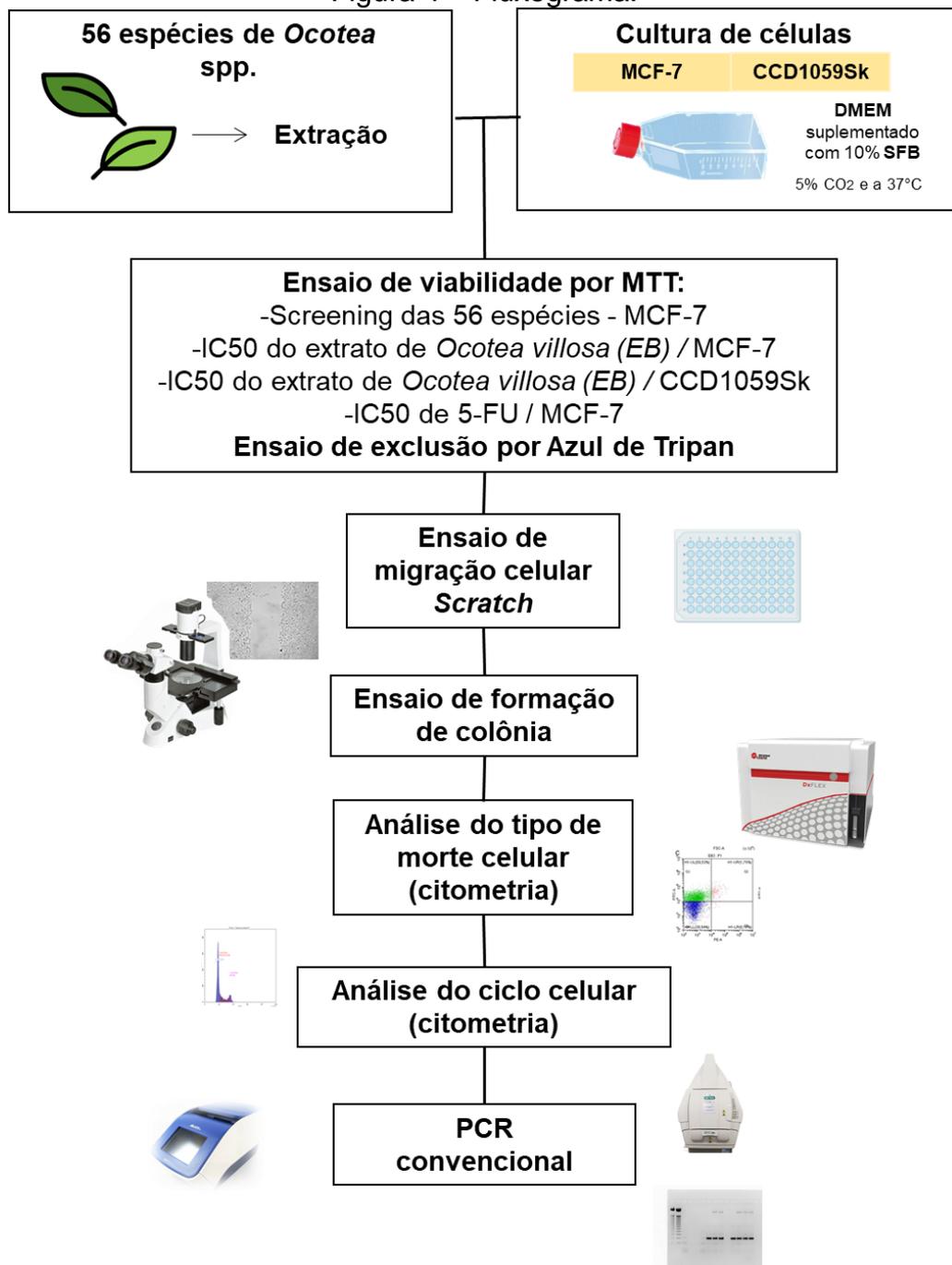
3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade de extratos de espécies do gênero *Ocotea* e selecionar a espécie mais promissora.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato da espécie de *Ocotea* sp. selecionado.
- Avaliar o efeito antiproliferativo do extrato.
- Caracterizar o tipo de morte celular induzida pelo extrato.
- Avaliar a influência do extrato no ciclo celular.
- Avaliar a expressão diferencial de mRNA de proteínas reguladoras do ciclo celular.

4 MÉTODOS

Nesse capítulo foi descrito todos os métodos e técnicas empregadas para desenvolver o presente trabalho. Com o intuito de facilitar o entendimento das etapas, foi feito um fluxograma com a sequência de ensaios realizados, apresentado na **Figura 4** abaixo.

Figura 4 – Fluxograma.



Fonte: Autoria própria.

4.1 Linhagens celulares e cultivo

Foram empregadas neste estudo células de câncer de mama da linhagem MCF-7 e fibroblastos humanos da linhagem CCD1059Sk (esses foram utilizados como células saudáveis a fim de comparar a atividade citotóxica nos mesmos com a atividade nas células tumorais). Ambas as linhagens foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) – high glicose com 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (Êxodo Científica), 100 U/mL de penicilina e 0,10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich), pH entre 7,2-7,4 ajustado em pHmetro (Hanna HI 2221).

Após o preparo, o meio de cultura foi submetido a filtração à vácuo em aparato contendo membrana filtrante esterilizante de 0,22 µm (MF-Millipore™, Merck, Darmstadt, Alemanha). Após filtrado, o meio de cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, São Paulo, Brazil). O meio das células MCF-7 foi suplementado também com insulina humana regular a 0,01mg/mL (Novolin®, Novo Nordisk, São Paulo, Brasil).

Para iniciar os experimentos, as células foram adquiridas por doação de outro grupo de pesquisa. Foram descongeladas em banho maria a 37° C (Kacil BM-02), pois estavam mantidas congeladas em tubo criogênico em ultrafreezer -80° C (Thermo Fisher). O meio de congelamento foi preparado contendo 95% de DMEM e crioprotetidas com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (SigmaAldrich). O conteúdo de cada tubo criogênico foi transferido para um tubo Falcon contendo meio de cultura DMEM e 10% de SFB gelado. Em seguida foi feita a centrifugação (Fanem Excelsa II 206 BL) dos tubos à 111rcf (força G) por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante do tubo e ressuspendeu-se o pellet de células formado, com 1 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB a 37°C. A suspensão de células foi novamente centrifugada, nas mesmas condições, com a finalidade de eliminar totalmente o meio de congelamento contendo 5% de DMSO. O pellet formado foi ressuspendido com 1 mL de meio (DMEM suplementado com 10% SFB e 0,01mg/mL de insulina) e transferido para garrafa de cultivo celular de 25 cm² de crescimento (Sarstedt), e o volume foi completado para 5 mL.

As células foram incubadas e cultivadas a 37° C em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de umidade (incubadora VWR® Air Jacketed CO₂). O meio de cultura foi renovado três vezes por semana. As células foram mantidas até a confluência de 80%, confirmada por microscópio óptico invertido trinocular (Physis), e, ao atingir essa confluência, o meio foi retirado, e as células lavadas duas vezes com 3 mL de tampão fosfato (Phosphate Buffered Saline – PBS) esterilizado em membrana filtrante de 0,22 µm e pH ajustado para 7,2-7,4. Após lavagem com PBS para retirada de todo meio de cultivo, as células foram tratadas com 500 µL de tripsina 0,05% EDTA (Sigma-Aldrich) por até 5 minutos. A ação da tripsina foi inativada com pelo menos 500 µL de DMEM 10% SFB. A suspensão de células foi recolhida, e foram centrifugadas nas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em 1 mL de meio (DMEM suplementado com 10% SFB e 0,01mg/mL de insulina) e contadas no microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer e de um hemocitômetro. Todo processo de cultivo celular, ensaios de viabilidade celular, ensaio clonogênico e ensaio de migração celular foram realizados no laboratório de células tronco e parasitologia molecular, LCTP, na UFJF. Os ensaios de morte celular e ciclo celular foram realizados no laboratório de análises clínicas do hospital universitário da UFJF. Cada linhagem foi plaqueada em quantidades especificadas para a execução dos experimentos. Todos os ensaios biológicos foram realizados em triplicatas.

4.2 Obtenção dos extratos

A extração das 56 espécies do gênero *Ocotea* foi feita em parceria com o grupo do Laboratório de Fitoquímica, Química Medicinal e Metabolômica (LFQMM) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). O grupo selecionou as amostras vegetais (folhas), cujo acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional também foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), cadastro nº A5A8F67. Todas as espécies tiveram exsiccatas depositadas em herbário da UNIFAL-MG, e foi coletada apenas a quantidade de folhas suficientes para a realização do estudo, o que não comprometeu as suas respectivas sobrevivências. Parte das amostras foram doadas

de herbário, também na quantidade mínima necessária, sem prejuízo do material depositado.

As amostras foram esmagadas em almofariz com pistilo e nitrogênio líquido até a pulverização. Posteriormente, ao material em pó (20 mg cada amostra), foram adicionados 1,7 mL de etanol/água, 7:3 (v/v) para extrair o material mais polar e compostos semipolares. As amostras foram colocadas em banho de ultrassom quente (35 °C) por 15 min (170 W, 50 kHz, L100 Schuster) e depois centrifugadas a 22 °C e 112 rcf. Em sequência, para remover substâncias apolares, os sobrenadantes foram particionados com hexano. Depois foram filtradas através de filtro de seringa de politetrafluoretileno (PTFE – tamanho de poro 22 µm) e secas usando equipamento de centrifugação a vácuo por 3 horas a 40 °C. Após este procedimento as amostras foram mantidas em freezer (-20 °C) até o momento das análises. Os extratos secos foram pesados e enviados para serem utilizados nos ensaios biológicos na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

A solução estoque de cada um dos extratos foi preparada na UFJF a partir dos extratos secos enviados pela UNIFAL. Cada um deles foi solubilizado com 1% DMSO (concentração não tóxica para as células) e água miliQ. Todos foram preparados para uma concentração final de 1 mg/mL, a partir da qual os experimentos foram realizados.

4.3 Ensaio de viabilidade celular

Primeiramente, foi realizado um *screening* de extratos de 56 espécies do gênero *Ocotea* a partir das soluções dos extratos anteriormente preparadas. A **Tabela 3** mostra a lista das espécies testadas e o número identificador.

Tabela 3 – Espécies do Gênero *Ocotea* que foram testadas em relação ao potencial citotóxico para linhagem MCF-7

3	<i>Ocotea amazonica</i> (Meiss) Mez	42	<i>Ocotea nitida</i> (Meisn.) Rohwer
4	<i>Ocotea brachybotrya</i> (Meisn.) Mez	43	<i>Ocotea nitidula</i> (Nees et Mart. ex Ness)
6	<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil	44	<i>Ocotea notata</i> (Nees & Mart.) Mez
7	<i>Ocotea caesia</i> Mez	45	<i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez

9	<i>Ocotea catharinensis</i> Mez	47	<i>Ocotea odorifera</i> Vell. Rohwer
10	<i>Ocotea cujumary</i> Mart.	48	<i>Ocotea paranaensis</i> Brotto, Baitello, Cervi & E.P.Santos
11	<i>Ocotea cernua</i> (Nees) Mez	49	<i>Ocotea percoriacea</i> Kosterm.
12	<i>Ocotea corymbosa</i> (Meisn.)Mez	52	<i>Ocotea pomaderroides</i> (Meisn.) Mez
13	<i>Ocotea complicata</i> (Meisn.) Mez	53	<i>Ocotea porosa</i> (Nees & Mart.) Barroso
14	<i>Ocotea dispersa</i> (Nees & Mart.) Mez	54	<i>Ocotea pretiosa</i> (Nees) Mez (sin. <i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer)
16	<i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez	55	<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees
17	<i>Ocotea divaricata</i> (Nees) Mez	57	<i>Ocotea pulchea</i> Vattimo-Gil
18	<i>Ocotea elegans</i> Mez (sin. <i>Ocotea indecora</i> (Schott) Mez)	58	<i>Ocotea pulchella</i> (Nees & Mart.) Mez
20	<i>Ocotea felix</i> Coe-Teix.	39	<i>Ocotea minarum</i> (Nees & Mart.) Mez
21	<i>Ocotea glauca</i> (Nees & Mart.) Mez	40	<i>Ocotea nummularia</i> (sin. <i>Ocotea tristis</i> (Nees & Mart.) Mez)
23	<i>Ocotea glaucina</i> (Meisn.) Mez	41	<i>Ocotea nectandrifolia</i> Mez
24	<i>Ocotea glaziovii</i> Mez	60	<i>Ocotea pulchra</i> Vattimo-Gil
25	<i>Ocotea guianensis</i> Aubl.	62	<i>Ocotea spectabilis</i> (Meisn.) Mez
26	<i>Ocotea hypoglauca</i> (Nees & Mart.) Mez	64	<i>Ocotea spixiana</i> (Nees) Mez
27	<i>Ocotea indecora</i> (Schott) Mez	65	<i>Ocotea tabacifolia</i> (Meisn.) Rohwer
28	<i>Ocotea kuhlmannii</i> Vattimo-Gi (sin. <i>Ocotea nectandrifolia</i> Mez)	68	<i>Ocotea tenuiflora</i> (Nees) Mez
29	<i>Ocotea lanata</i> (Nees & Mart.) Mez	69	<i>Ocotea teleiandra</i> (Meisn.) Mez
30	<i>Ocotea lanceolata</i> (Nees) Nees (sin. <i>Ocotea lancifolia</i> (Schott) Mez)	71	<i>Ocotea tristis</i> (Nees & Mart.) Mez
31	<i>Ocotea lancifolia</i> (Schott) Mez	74	<i>Ocotea vaccinioides</i> (Meisn.) Mez (sin. <i>Ocotea daphnifolia</i> (Meisn.) Mez)
33	<i>Ocotea langsdorffii</i> (Meisn.) Mez	75	<i>Ocotea variabilis</i> Mart. (sin. <i>Ocotea lancifolia</i> (Schott) Mez/ <i>Ocotea lanceolata</i> (Nees) Nees/ <i>Ocotea percoriacea</i> Kosterm.)

35	<i>Ocotea laxa</i> (Nees) Mez	77	<i>Ocotea velloziana</i> (Meisn.) Mez
37	<i>Ocotea lobbii</i> (Meisn.) Rohwer	78	<i>Ocotea velutina</i> (Nees) Rohwer
38	<i>Ocotea longifolia</i> Kunth	79	<i>Ocotea villosa</i> Kosterm.

Fonte: Autoria própria.

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT, que baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis, em converter o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. Dessa forma, a produção dos cristais de formazan retrata o estado funcional ativo das células após tratamento, que é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Para realização do ensaio de viabilidade por MTT, as células de câncer de mama MCF-7 foram contadas em um hemocítmetro e plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt), na densidade de 5×10^3 células/poço com 150 μ L de meio DMEM suplementado com SFB 10%. A placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% CO₂, para adesão. Após este período, foi verificada a adesão e a confluência das células através do microscópio óptico, e as células foram tratadas com 40 μ g/mL de extrato correspondente a cada espécie estudada. Essa concentração foi escolhida porque é geralmente empregada para *screening* de extratos para investigar atividade citotóxica (GARCIA et al., 2024).

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 48 h. Decorridos 48 h de tratamento, o meio foi descartado e foi adicionado em cada poço 100 μ L de solução de MTT na concentração de 10% preparado em DMEM suplementado com SFB 10%. Em seguida, incubaram-se as células a 37 °C e 5% CO₂, por 4 h e, após, a formação dos cristais de formazan foi confirmada por microscopia óptica. O meio foi descartado e os cristais foram dissolvidos adicionando-se 100 μ L de solução de isopropanol 0,05M acidificado para completa dissolução dos cristais.

Por fim, a leitura das amostras foi realizada a 570 nm e 645 nm, no espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Go Thermo Scientific). Todo o procedimento foi realizado em condições de baixa luminosidade, devido a foto

instabilidade do MTT. Os resultados da viabilidade celular foram apresentados como porcentagem de células, calculados da seguinte forma:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{[(\text{Abs. Teste} - \text{Abs. Branco}) \times 100]}{(\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Branco})}$$

Sendo a abs. branco, o valor de absorvância do isopropanol (usado para a dissolução dos cristais), abs. controle, o valor de absorvância adquirido nas replicatas sem tratamento (apenas com células), e abs. teste é o valor de absorvância encontrado nos poços que receberam células e tratamento. O extrato de *Ocotea villosa* que foi capaz de inibir aproximadamente 50% da viabilidade foi selecionado para prosseguir nos experimentos.

Foi realizado o ensaio de viabilidade celular em células de câncer de mama da linhagem MCF-7 e em fibroblastos humanos da linhagem CCD1059Sk para avaliar a citotoxicidade e seletividade do extrato de *O. villosa*. Estudos anteriores mostram que, para um composto apresentar citotoxicidade seletiva para células tumorais em relação a células normais, o valor do índice de seletividade (IS) deve ser numericamente maior do que 2 (DA'I et al., 2019).

Para avaliar a concentração inibitória, as células de câncer de mama MCF-7 e fibroblasto CCD1059Sk foram plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt), na densidade de 5×10^3 células/poço com 100 μL de meio DMEM suplementado com SFB 10%. A placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% CO_2 , para adesão celular. Após este período, foi verificada a adesão à placa e a confluência das células através do microscópio óptico. As células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato de *O. villosa* (200 mg/mL – 100 $\mu\text{g/mL}$ – 50 $\mu\text{g/mL}$ – 25 $\mu\text{g/mL}$ – 12,5 $\mu\text{g/mL}$), e 5-Fluorouracil (5-FU) (50 $\mu\text{g/mL}$ – 25 $\mu\text{g/mL}$ – 12,5 $\mu\text{g/mL}$ – 6,25 $\mu\text{g/mL}$ – 3,12 $\mu\text{g/mL}$ – 1,56 $\mu\text{g/mL}$) preparadas em DMEM suplementado com SFB 10%. Para o controle-positivo (morte celular) foi utilizado DMSO 2% preparado em DMEM.

O teste de viabilidade também foi realizado para avaliar o tratamento com 5-FU, a fim de definir uma concentração inibitória desse composto para MCF-7 e poder utilizá-lo em outros experimentos como um controle positivo de citotoxicidade. O 5-FU

é um quimioterápico utilizado no tratamento de neoplasias como câncer de mama (GREM, 2000). O ensaio de MTT foi realizado conforme metodologia já descrita.

O IC_{50} (concentração inibitória mínima) foi calculado a partir de regressão linear e expresso como média \pm desvio padrão. O valor do índice de seletividade (DA'l et al., 2019) foi calculado da seguinte forma: $IS = \text{valor da } IC_{50} \text{ das células normais} \div \text{valor da } IC_{50} \text{ das células tumorais}$.

4.4 Exclusão por azul de tripan

Com o objetivo de confirmar o resultado de viabilidade celular, foi realizado o ensaio de azul de tripan. Ele é um corante que reage com células que possuem a membrana danificada. Desse modo, as células viáveis não absorvem o corante e as células não viáveis são coradas em azul (TRAN et al., 2011).

Para o ensaio de azul de tripan, as células (MCF-7) foram contadas e plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 2×10^4 células por poço em 400 μ L de DMEM. Após 24h de plaqueamento, as células foram tratadas com extrato de *O. villosa* nas concentrações de 150, 100 e 50 μ g/mL por 24, 48 e 72h. Após os respectivos tempos de tratamento, as células foram tripsinizadas, coletadas em um tubo eppendorf e centrifugadas a 111rcf por 5 minutos. Após esse processo, o sobrenadante de meio DMEM foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 100 μ L de DMEM. Para a coloração, 20 μ L da suspensão de células foram misturadas a 20 μ L de solução de azul de tripan 0,4%, por 2 minutos, essa solução foi colocada na câmara de Neubauer e as células viáveis (não coradas) e inviáveis (coradas em azul) foram contadas em microscópio óptico. Após isso, foi feito o cálculo descontando o fator de diluição da câmara e um gráfico foi plotado em função da quantidade de células viáveis.

4.5 Ensaio de migração celular pela técnica de *Scratch*

O ensaio de migração celular foi feito pelo método *Scratch*, que se baseia na interrupção da continuidade de uma monocamada celular a partir de uma ranhura artificial e o acompanhamento do fechamento dessa ranhura por microscopia óptica,

considerando que as células se multiplicam e/ou migram para reestabelecerem as interações intercelulares (LIANG et al., 2007).

Em placas de 24 poços (Sarstedt) foram plaqueadas 4×10^5 células/poço e incubadas por 24 h em estufa umidificada a 37° C e 5% CO₂ para se obter uma confluência próxima de 100%, em monocamada. Após o período de incubação, a monocamada confluenta foi confirmada por análise no microscópio óptico (Physis). Em seguida, foi feita uma ranhura em cada poço da placa, ou seja, uma “ferida artificial” em linha reta com o auxílio de uma ponteira de 200 µL e uma régua. Logo após a ranhura, os poços foram cuidadosamente lavados duas vezes com PBS 1x para remoção das células em suspensão. Então, as células foram tratadas com 100 µg/mL do extrato bruto de *O. villosa* preparado em DMEM (que será representado pela sigla EB a partir desse momento) e foi utilizado DMSO 2% como controle positivo. A placa foi incubada novamente nas mesmas condições.

Cada poço da placa foi fotografado utilizando um microscópio óptico invertido (Physis) acoplado a uma câmera anatômica (Opton 5150) nos tempos de tratamento 0, 24, 48 e 72 h. A área de ranhura (entre as duas margens de células) foi medida através do programa *Image J* (EUA) em todos os tempos capturados. A taxa de migração foi calculada pela fórmula:

$$\text{Fechamento da ranhura (\%)} = \left[\frac{(\text{área da ranhura no tempo } 0 \text{ h} - \text{área da ranhura nos tempos de tratamento})}{\text{área da ranhura no tempo } 0 \text{ h}} \right] \times 100.$$

Após obter o resultado final, um gráfico foi plotado e foi feita a análise estatística dos dados.

4.6 Ensaio clonogênico

As células de câncer de mama (MCF-7) foram plaqueadas na densidade de 1000 células/poço em placas de 6 poços (Sarstedt) e incubadas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ por 24 h até a adesão completa na placa. Em sequência, as células foram tratadas com EB a 100 µg/mL durante 48 h. Após o tratamento, o meio contendo o extrato foi substituído pelo meio de cultura e as células foram mantidas em cultura por 14 dias.

Ao findar os 14 dias, tempo ideal para formação de colônias, o meio foi removido e as placas foram cuidadosamente lavadas duas vezes com PBS 1x. As colônias foram fixadas com 1 mL de paraformaldeído 10% por 30 minutos, lavadas com PBS 1x duas vezes, e o fixador foi substituído por 1 mL de solução de cristal violeta 0,5%, que após 1 minuto foi retirado e a placa foi imersa em água para a lavagem final.

As placas foram fotografadas para comparação e quantificação das colônias nos grupos com o tratamento e controle não tratado, para contagem foi usado o software *Image J* (EUA). Foram consideradas colônias viáveis aquelas que possuíam mais de 50 células (mínimo a ser contado) (FRANKEN et al., 2006). Após a análise do resultado, um gráfico foi construído e foi feita a análise estatística dos dados obtidos.

4.7 Análise do tipo de morte celular

A análise do tipo de morte celular foi realizada pela técnica de citometria com Anexina V e iodeto de propídio (IP) (BORGES et al., 2013; SATZGER et al., 2010; TROUSIL et al., 2017), utilizando o kit comercial Alexa Fluor® 488 annexin V/PI (Invitrogen). A coloração foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante e o número de células anexina V+ e IP+ foram mensuradas através de citometria de fluxo (DxFlex).

O fundamento do teste baseia-se na característica das células apoptóticas em translocar moléculas de fosfatidilserina para a porção externa da membrana plasmática. Assim, a Anexina V liga-se às células com fosfatidilserina exposta na membrana. Essa marcação sugere a ocorrência de apoptose, onde a célula apoptótica ainda possui a membrana plasmática íntegra. Todavia, a marcação de AnexinaV + IP acontece somente após a perda da integridade da membrana, indicando estágios posteriores de apoptose ou necrose. Quando a marcação indica apenas IP, sugere necrose. Dessa forma, a coloração distingue células viáveis (não marcadas), células apoptóticas (marcadas com AnexinaV) e células em necrose (AnexinaV+/PI+) (NEGRÍN et al., 2010; ROZENBLAT et al., 2008).

As células do câncer de mama MCF-7 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/poço, em placas de 24 poços (Sarstedt) e incubadas a 37° C, 5% de CO₂,

por 24 h. Em seguida, o meio foi substituído pelo tratamento com a concentração de 100 µg/mL de EB e de 12,5 µg/mL de 5-FU. O controle negativo recebeu somente meio de cultura DMEM. Após 24h, o meio de cultura foi reservado em microtubos e as células foram lavadas 2x com 250 µL de PBS e desaderidas por ação da tripsina (250 µL), transferidas para o microtubo reservado e centrifugadas. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de DMEM para contagem.

Após contagem no hemocítmetro, foi confirmada a densidade de, pelo menos, $1,5 \times 10^5$ células/mL. As células foram centrifugadas novamente, ressuspensas em 100 µL de PBS gelado e centrifugadas para retirar todo resíduo de meio (esse processo foi repetido três vezes). Então, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensado no tampão de coloração previamente preparado, seguindo as recomendações do kit. As células marcadas foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Em sequência as amostras foram mantidas no gelo, enquanto foram analisadas em citômetro de fluxo (DxFlex). Foram lidos 10.000 eventos e os resultados foram analisados no software *CytExpert for DxFLEX*. Após obter os resultados, um gráfico foi construído em função do percentual de apoptose e necrose, e foi feita a análise estatística dos mesmos.

4.8 Análise do ciclo celular

As células do câncer de mama MCF-7 foram plaqueadas na densidade de 4×10^5 células/poço em placas de 24 poços (Sarstedt) e incubadas a 37° C, 5% de CO₂, por 24 h. Em seguida, o meio foi substituído pelo tratamento com a concentração de 100 µg/mL de EB e de 12,5 µg/mL 5-FU por 24h. Após 24h, o meio de cultura foi reservado em microtubo. As células foram lavadas duas vezes com 250 µL de PBS, desaderidas por ação da tripsina (250 µL), transferidas para o microtubo reservado e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de DMEM para contagem. Após contagem no hemocítmetro, foi confirmada a densidade de pelo menos $1,5 \times 10^5$ células/mL. As células foram centrifugadas novamente, ressuspensas em 100 µL de PBS gelado e centrifugadas para retirar todo resíduo de meio (esse processo foi repetido duas vezes). Então, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspensado em 25 µ de PBS 1x gelado e 230

μL de etanol absoluto (Merck). Posteriormente, os tubos foram incubados por 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e centrifugados. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado com $300\text{ }\mu\text{L}$ de PBS 1x e centrifugado novamente. Após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuscitado em solução tampão do ciclo celular ($30\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ de IP + $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase livre de DNase em PBS) e foi incubado por 45 minutos em temperatura ambiente, na ausência de luz. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo, pelo menos 10.000 eventos foram lidos. O conteúdo de DNA das células marcado com IP permite diferenciar as fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M).

4.9 Análise da expressão diferencial de mRNA de proteínas reguladoras do ciclo celular

As células do câncer de mama MCF-7 foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 6 poços (Sarstedt) e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 , por 24 h. Em seguida, o meio foi substituído pelo tratamento com a concentração de $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ de EB e foi feito um controle de células sem tratamento por 48h. Após o tratamento, as células foram lavadas com $500\text{ }\mu\text{L}$ de PBS 1x e foi adicionado $1\text{ }\mu\text{L}$ do reagente Trizol (Invitrogen) em cada poço. A suspensão de células no trizol foi recolhida em um tubo e congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Em seguida foi feita a extração utilizando clorofórmio. Foram adicionados $200\text{ }\mu\text{L}$ de clorofórmio (Merck) e o tubo foi vigorosamente agitado por cerca de 20 segundos e incubado por 3 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 12000 rcf a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fase aquosa e incolor, situada na parte superior do tubo, foi transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado $500\text{ }\mu\text{L}$ de álcool isopropílico. Os tubos foram então incubados a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, por aproximadamente 30 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 12000 rcf a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol (Merck) 75% gelado por tubo. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a 7500 rcf a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Novamente, o sobrenadante foi descartado. Após a evaporação do etanol (através do banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), ao precipitado formado foi adicionado $30\text{ }\mu\text{L}$ de H_2O DPEC (Invitrogen). Por fim, a suspensão foi homogeneizada no thermomixer a $58\text{ }^{\circ}\text{C}$, 400 rpm , por 10 minutos.

A concentração do RNA total foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer). As amostras foram tratadas com o kit RQ1 Rnase-Free Dnase (Promega) antes de iniciar a síntese do DNA complementar (cDNA) para certificar que o RNA isolado não estava contaminado. O tratamento com DNase foi realizado de acordo com as instruções do fabricante Promega. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o Kit RevertAid H Minus First Strand Cdna Synthesis (Thermo Scientific) após tratamento com DNase.

Os pares de primers específicos para cada gene de interesse TP53 (NM_000546.6); CASP9 (NM_001229); CASP8 (NM_001080125.2); CDK1 (NM_001786.5); CCNB1 (NM_031966.4); P16 (NM_000077.4) e GAPDH (NM_002046.5) foram desenhados através do programa Primer3 versão 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os parâmetros selecionados no programa Primer3 para a elaboração dos oligonucleotídeos foram: amplificar fragmentos cujo peso molecular varie entre 70 e 150 pares de base (pb), apresentar teor de GC (guanina-citosina) entre 30 e 60%, não apresentar complementariedade entre si ou mesmo estruturas secundárias estáveis e apresentar temperatura de anelamento de 60 °C.

A reação de PCR foi realizada utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), utilizando o termociclador (Veriti 96, Applied Biosystems, Massachusetts, EUA) e seguindo o protocolo e orientações do fabricante. Para visualizar o resultado do PCR convencional foi feito um gel de eletroforese.

O gel de agarose a 3% foi preparado a partir da pesagem de 3g de agarose, transferido para um erlenmeyer onde foi adicionado 100 mL do tampão TAE 1x (tampão Tris-Acetato-EDTA, um tampão acetato da base Tris, com Ph 8.0 e EDTA). Foi aquecido por 60 segundos no microondas (potência média) para solubilização. Em sequência, 10 µL de brometo de etídeo foi adicionado com a solução do gel ainda quente, e essa foi dispensada na cuba de eletroforese já com o pente escolhido (definidor da quantidade de poços no gel) para seu esfriamento e enrijecimento. Com o gel pronto, foi adicionado 80 mL de TAE 1x com 5µL de brometo de etídeo que submergiu o gel dentro da cuba. O pente foi retirado e os poços do gel foram preenchidas com os produtos amplificados e com um marcador de peso molecular (50 bp DNA Step Ladder, Promega). Foram selecionados os parâmetros da corrida (80 V, 150 mA, e 120 min) e, após sua finalização, o gel foi levado para um fotodocumentador

(Gel Doc XR+ Gel Documentation System, Bio-Rad, Brasil), onde as imagens foram adquiridas.

Com o resultado das imagens foi possível realizar uma análise pela contagem do número de pixels pelo *Image J* (EUA), plotar gráficos e comparar semiquantitativamente a expressão dos marcadores.

4.10 Análise estatística

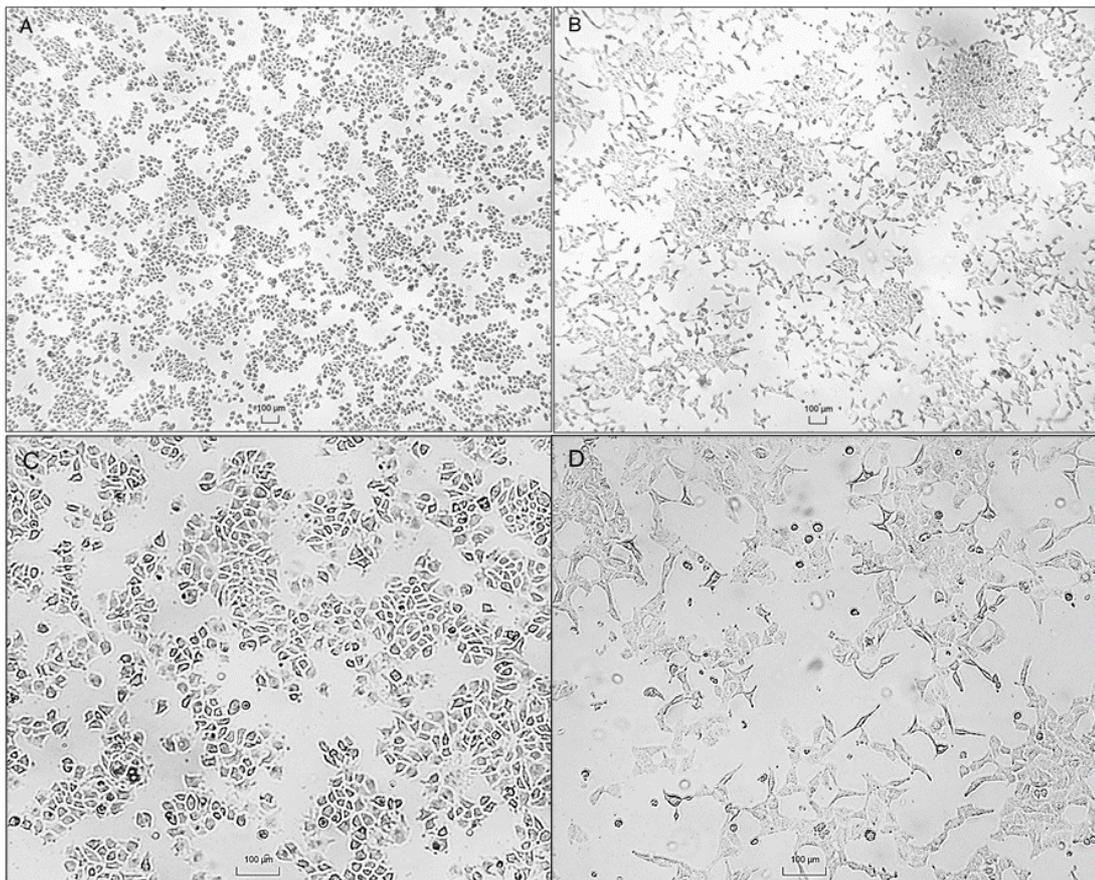
A análise estatística dos resultados foi realizada usando o software GraphPad Prism 8.0® (GraphPad Inc., USA). Os testes foram feitos em triplicata e os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. Foram comparados os diferentes grupos com o grupo controle usando o método de análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas Dunnet ou Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$ que foram simbolizadas com um asterisco. O grupo controle em todo trabalho nomeou o grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento, sendo formado apenas por células com meio de cultura. O quimioterápico 5-FU foi utilizado como controle positivo para morte celular nos ensaios de apoptose e ciclo celular.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extrato bruto de *O. villosa* é citotóxico para células de câncer de mama

As células de câncer de mama, MCF-7, e as de fibroblastos humano, CCD1059Sk, foram cultivadas e fotomicrografias foram feitas para avaliar a confluência e morfologia de cada linhagem. Assim, na **Figura 5**, é possível observar que os fibroblastos CCD1059Sk (A) apresentam morfologia fusiforme característica, e as células MCF-7 (B) apresentam morfologia epitelial. A linhagem MCF-7 é uma linhagem de adenocarcinoma mamário, e a linhagem CCD1059Sk foi estabelecida a partir da pele de tecido mamário normal. Considerando a proximidade tecidual, a CCD1059Sk é utilizada como controle de células saudáveis em relação às células tumorais da mama (MCF-7).

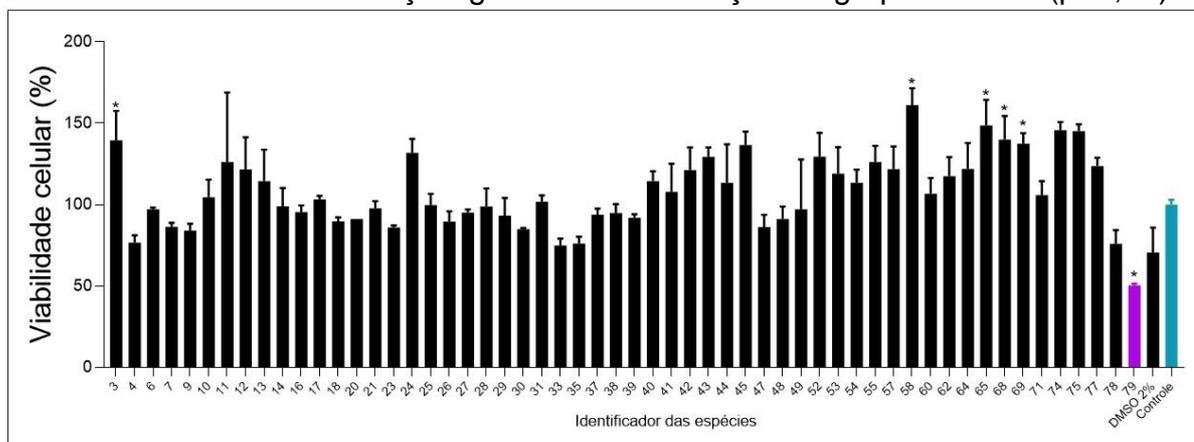
Figura 5 – Fotomicrografias da linhagem tumoral de mama (MCF-7) (A,C) e da linhagem de fibroblastos humanos (CCD1059Sk) (B,D). Barra de escala 1:100 µm.



Fonte: fotografadas pelo próprio autor.

O ensaio de viabilidade celular é primordial para estudos *in vitro*, tanto para os que visam propor novos caminhos para tratar tumores, quanto para outros fins, como garantir que o ativo estudado não é tóxico às células saudáveis. Esse ensaio foi feito com 56 espécies de *Ocotea* spp., utilizando o reagente MTT. A partir dos resultados, foi possível rastrear as espécies mais promissoras que podem apresentar atividade citotóxica (**Figura 5**).

Figura 6 – Resultado do ensaio de MTT para screening de 56 espécies de *Ocotea* spp. com potencial citotóxico para a linhagem MCF-7. Os resultados representam a média \pm DP (n=3). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. *O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,05).



Fonte: Autoria própria.

De acordo com a **Figura 6**, a espécie cujo código identificador é 79 (extrato bruto de *Ocotea villosa*, destacado em roxo) apresentou potencial citotóxico significativo para células MCF-7 em relação ao controle (destacado em azul). Foi possível observar espécies que elevaram o percentual de viabilidade significativamente diferente em relação ao controle, são elas: 3, 58, 65, 68 e 69; respectivamente, *Ocotea amazônica*, *Ocotea pulchella*, *Ocotea tabacifolia*, *Ocotea tenuiflora*, *Ocotea teleiandra*. Uma hipótese para esse resultado é a existência de ativos que influenciam na proliferação celular e não causam toxicidade, sendo uma possibilidade para estudos com outros objetivos. Diante do efeito observado nessa linhagem, é interessante realizar novos testes com linhagens de células não tumorais visando investigar um possível efeito no processo de cicatrização, por exemplo.

Para avaliar a citotoxicidade e a capacidade de diminuir em 50% a viabilidade das células tumorais do extrato bruto de *O. villosa* (EB), a espécie que apresentou melhor atividade, foi feito outro ensaio de MTT utilizando a linhagem MCF-7. A fim de

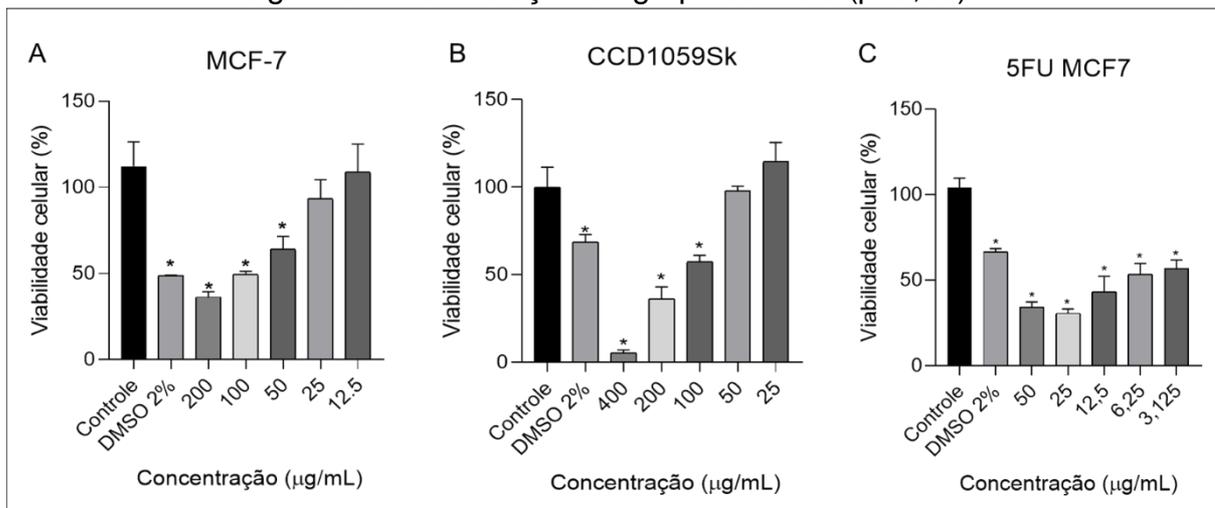
verificar a citotoxicidade de EB em células saudáveis, o ensaio de MTT também foi feito para a linhagem CCD1059Sk e, através desse teste, também foi possível definir a capacidade de diminuir 50% da viabilidade celular, que é o IC₅₀. A princípio esses testes foram realizados usando uma curva de concentração onde a maior concentração escolhida foi 200µg/mL, entretanto não foi possível calcular o IC₅₀ para CCD1059Sk, pois o valor de inibição do primeiro teste ficou próximo de 200µg/mL, sendo necessário um ponto acima desse valor para calcular o índice, por essa razão, para CCD1059Sk a maior concentração usada foi 400µg/mL.

A **Figura 7** apresenta os resultados em gráfico de barra onde é possível observar em **A** o percentual de viabilidade celular após o tratamento com EB em MCF-7, em **B** em CCD1059Sk. O tratamento com DMSO a 2% reduziu em aproximadamente 50% a viabilidade celular em MCF-7, o que confirma que as células estavam susceptíveis a morte, sendo esse um controle positivo de morte celular. O valor de DMSO apresenta uma diferença nos gráficos de **A** e **C** possivelmente devido as condições de análise, considerando que não foi possível realizar todos os testes na mesma semana, consequentemente as células estavam em passagens diferentes. Nesse ponto é possível presenciar um fator limite do método *in vitro*, apesar da pequena diferença, os resultados nos gráficos corroboram entre si.

Nesse trabalho foi determinado que o termo controle sempre se refere a um grupo que não recebeu nenhum tratamento, possuindo apenas células com meio de cultura. Assim, nesse resultado ele está representado na primeira barra em preto, confirmando que as células estavam viáveis quando o teste foi realizado. Em sequência as barras em cinza representam as células tratadas com uma curva de diluição seriada de EB, a partir da concentração de 200 µg/mL até 12,5 µg/mL para MCF-7 e 400 µg/mL até 25 µg/mL para CCD1059Sk, em **B**. Para a análise de viabilidade usando 5-FU em células MCF-7 foi utilizado as concentrações de 50 µg/mL a 3,125 µg/mL, sendo esse valores escolhidos a partir de testes preliminares. Foi feita análise de IC₅₀ para 5-FU a fim de comparar a morte causada celular por EB com a morte celular causada por um quimioterápico já consolidado no tratamento do câncer (5-FU). Assim, na **Figura 7 C** é possível verificar os resultados de viabilidade a partir do tratamento com 5-FU.

É possível afirmar que conforme a concentração de EB diminuía a viabilidade aumentava. A partir desses resultados foi possível calcular o índice de IC₅₀ pelo software GraphPad Prism8®, que define a concentração de EB para reduzir 50% das células viáveis.

Figura 7 – Resultados de ensaio de viabilidade por MTT de EB para CCD1059Sk e MCF-7 e 5-FU para MCF-7. Os resultados representam a média ± DP (n=3). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,05).



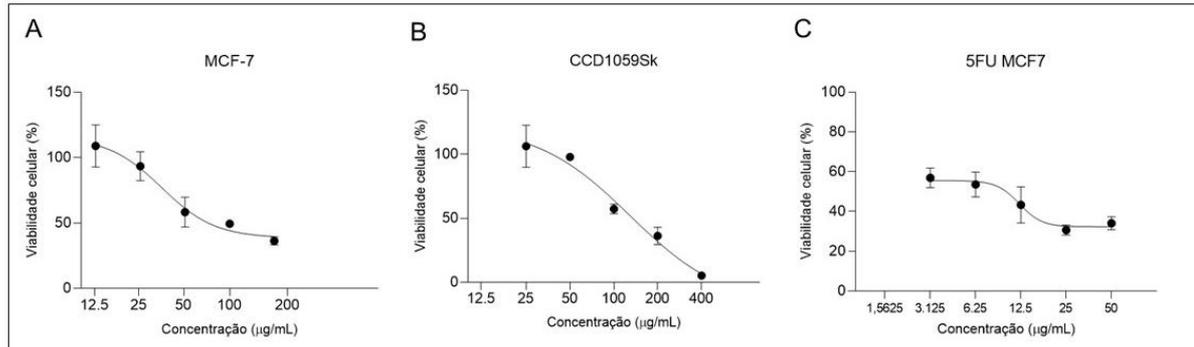
Fonte: Autoria própria.

Ainda sobre a **Figura 7**, em **7B** é demonstrado o percentual de viabilidade celular após o tratamento com EB em CCD1059Sk. Assim como no **Figura 7A**, o grupo controle confirmou a viabilidade inicial das células e o tratamento com DMSO 2% confirmou a possibilidade de morte dessas células. A curva de diluição do tratamento com EB para esse tipo celular foi de 400 µg/mL até 25 µg/mL, porque quando testado apenas até 200 µg/mL não houve 50% de diminuição da viabilidade em nenhum dos pontos, logo foi necessário incluir um ponto de concentração superior a 200 µg/mL. Nos fibroblastos também foi visto que conforme ocorre o aumento da concentração de EB, diminui a viabilidade celular.

Na **Figura 8**, é possível analisar a curva-dose resposta de cada ensaio de viabilidade celular por MTT, sendo os gráficos dos tratamentos apresentados na **Figura 7**.

Todos estes resultados são inéditos, visto que não são encontrados trabalhos publicados que tenham testado o potencial citotóxico de EB anteriormente.

Figura 8 – Curva dose-resposta determinada após 48h do tratamento das células MCF-7 (A) e CCD1059Sk (B) com extrato bruto de *O. villosa* e MCF-7 com 5-FU (C).



Fonte: Autoria própria.

Os resultados de IC_{50} estão apresentados na **Tabela 4**. O teste para a linhagem de câncer de mama no qual foram utilizadas as concentrações de 200 µg/mL a 12,5 µg/mL, teve o valor de IC_{50} igual a 100 µg/mL. Já no teste para a linhagem de fibroblasto humano, onde foram escolhidas as concentrações entre 400 µg/mL e 25 µg/mL, o valor de IC_{50} foi de aproximadamente 130 µg/mL. No teste de MTT para 5-FU em MCF-7 o valor de IC_{50} foi de aproximadamente 12,5 µg/mL.

Tabela 4 – Valores de IC_{50} determinados após 48h de tratamento com extrato bruto de *O. villosa*

Tratamentos	$IC_{50} \pm$ Desvio Padrão	
	MCF-7	CCD1059Sk
Extrato bruto de <i>O. villosa</i>	100,00 ± 6,06 µg/mL	129,2 ± 3,73 µg/mL
5-FU	12,21 ± 1,96 µg/mL	não testado

Fonte: Autoria própria.

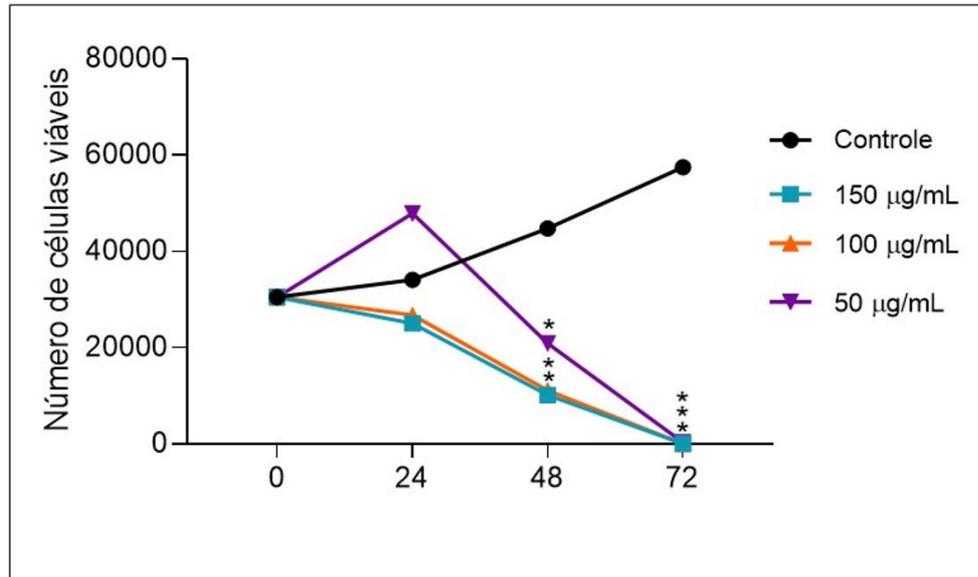
Considerando esses resultados de IC_{50} , o qual para MCF-7 é igual a 100 µg/mL e para CCD1059Sk é igual a 129,2 µg/mL, é possível obter um índice de seletividade (IS) de 1,292. Considera-se significativamente seletivo um IS acima de 2, entretanto, muitos trabalhos consideram que obter índices menores que 2 em período de 48 horas de tratamento não diminuem a relevância do potencial citotóxico de um princípio ativo para o câncer de mama. No trabalho de Costa (2020) é apresentado um IS de 1,7 para o teste de compostos antitumorais (MIH, um composto mesoiônico sintético) em células MCF-7. Dessa forma, os demais ensaios empregados nesse estudo são

importantes para demonstrar de forma mais concludente o potencial citotóxico do extrato em questão.

Após o ensaio de viabilidade celular por MTT, foi realizado também o ensaio de exclusão com azul de tripan. O azul de tripan marca de azul apenas as células inviáveis, deixando as viáveis sem coloração. O teste tem o objetivo de analisar o efeito antiproliferativo dos tratamentos ao longo do tempo. A **Figura 9** apresenta o resultado do teste, onde as células MCF-7 foram tratadas com 150 µg/mL (um ponto acima do valor de IC₅₀), com 100 µg/mL (o valor de IC₅₀) e 50 µg/mL (um ponto abaixo do valor de IC₅₀). As células viáveis de cada um dos grupos foram contadas nos períodos de 24, 48 e 72 h. Através do gráfico da **Figura 9** é possível afirmar que a viabilidade celular diminuiu após 24, 48 e 72 h em relação ao controle (linha azul).

No início do teste, ou seja, no tempo 0 h, a quantidade de células foi semelhante. Após 24 h, o grupo tratado com 150 µg/mL e 100 µg/mL estavam com quantidade de células semelhantes, e o grupo 50 µg/mL aparenta um aumento no número de células, porém não é possível afirmar mudanças significativas. No tempo de 48 h, todos os grupos aparentam diminuir a quantidade de células viáveis com relação ao tempo de 24h, com exceção do grupo controle, porém só há comprovação estatística, ou seja, uma diferença significativa nos grupos tratados com EB com relação ao controle. Em 72h, todos os grupos de tratamento apresentaram redução na quantidade de células viáveis de forma significativa em relação ao controle. O grupo controle permitiu mostrar que as células possuíam condições de se multiplicar ao longo do tempo, tornando possível inferir que os tratamentos reduziram a viabilidade (**Figura 9**).

Figura 9 – Resultados do teste de exclusão por Azul de Tripan com extrato bruto de *O. villosa*. Os resultados representam a média ± DP (n=3). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Turkey. *O asterisco indica diferenças significativas em relação ao grupo controle (p<0,05).



Fonte: Autoria própria.

Considerando o número de células do tempo 0 h, ou seja, aproximadamente 30.500 células viáveis como 100%, o grupo tratado com 150 µg/mL teve a redução de cerca de 66% das células viáveis em 48 h. O grupo tratado com 100 µg/mL teve a redução de cerca de 63% das células viáveis em 48 h, e o grupo tratado com 50 µg/mL teve a redução de cerca de aproximadamente 31% das células viáveis em 48 h. Todos os grupos de tratamento obtiveram uma redução em 100% das células viáveis em 72h.

5.2 Extrato bruto de *O. villosa* inibe migração celular

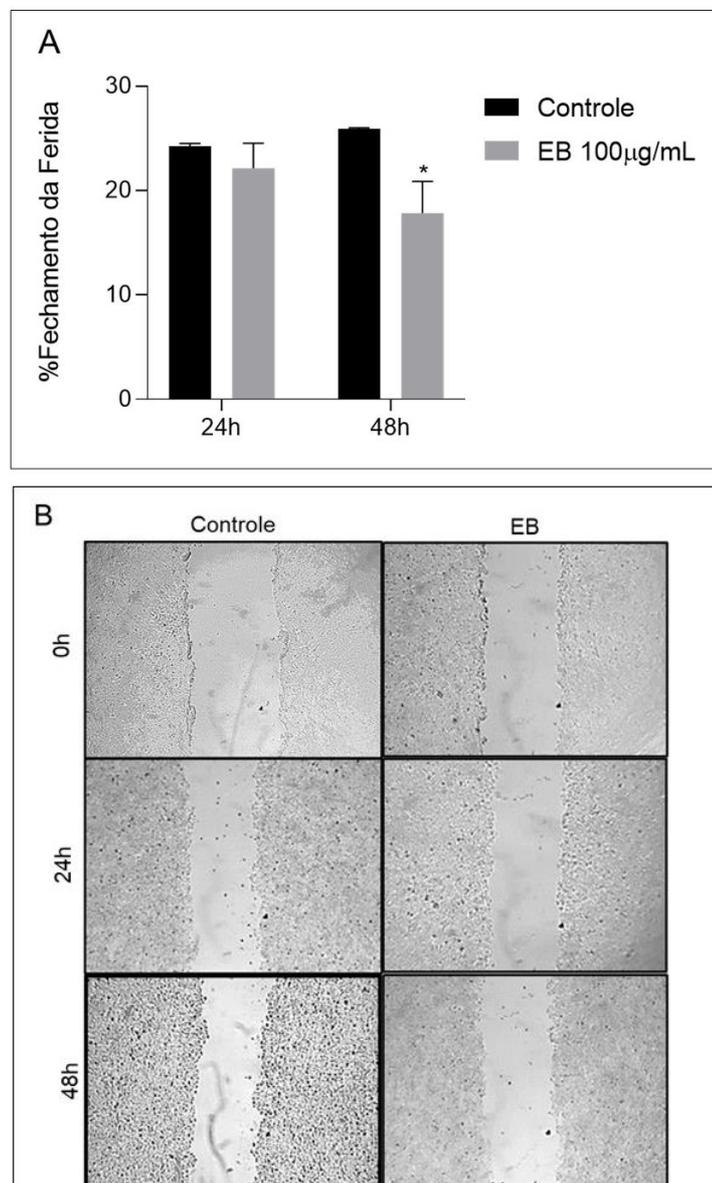
O ensaio de migração celular (*scratch*) foi aplicado para avaliar a migração das células tumorais, sendo a migração uma característica desse tipo celular. Assim, os resultados desse ensaio podem ser um indicador de uma possível diminuição das características metastáticas do câncer em questão.

O resultado desse teste é analisado a partir do cálculo da área inicial e da área final da ferida artificial criada. Assim, a subtração desses valores de área fornece uma porcentagem de fechamento da ferida. Assim, para o tempo de 24 h, a porcentagem de fechamento encontrada foi de 22% para EB e 24,46% para o grupo controle. Já para o tempo de 48h, a porcentagem de fechamento foi de 17 % para EB e 25,91 % para o grupo controle, conforme vistos nos gráficos em barras representados na **Figura 10A**. De 24 h para 48 h de tratamento com EB é possível verificar a redução

de 5% da migração celular. Já no grupo controle a migração celular aumentou 1,45% entre esses tempos.

Os resultados demonstraram uma diminuição da migração das células tratadas com EB a 100 µg/mL em relação ao grupo controle após o período de 48h, considerando que esse grupo obteve uma menor porcentagem de fechamento da ferida nesse período de 48h.

Figura 10 – Resultados do teste de migração celular com extrato bruto de *O. villosa*. Os resultados representam a média ± DP (n=3). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Turkey. *O asterisco indica diferenças significativas em relação ao grupo controle (p<0,05).



Fonte: A autoria própria.

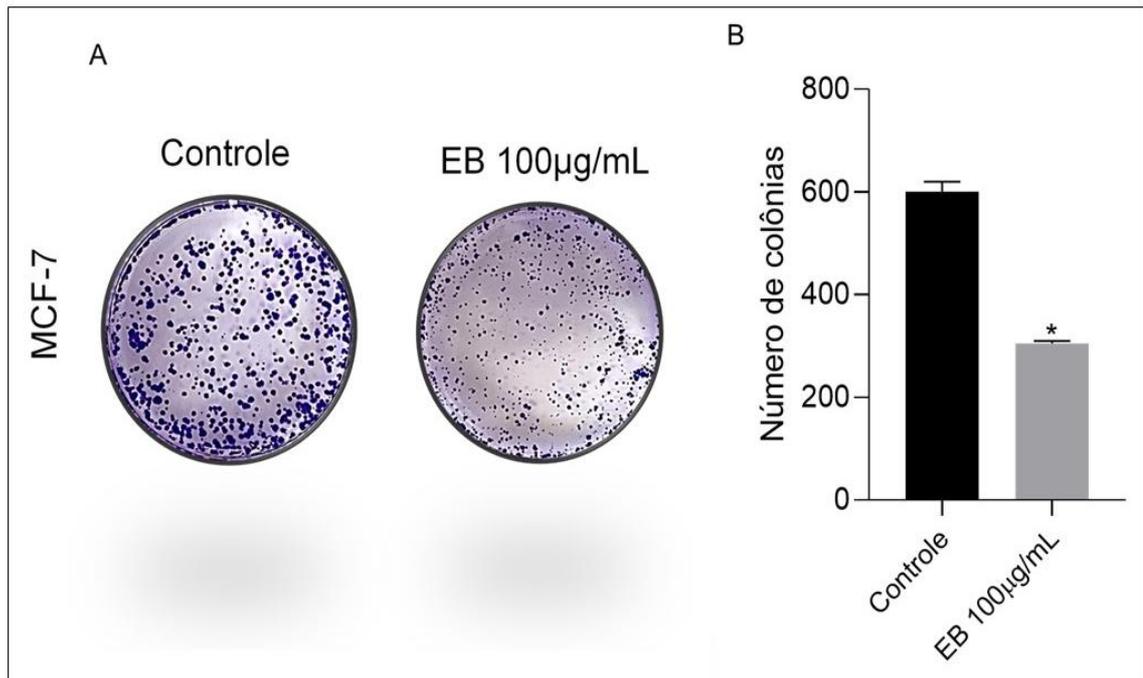
A **Figura 10B** mostra a imagem das feridas artificiais fotografadas nos tempos de 0, 24 e 48 h. Nessas imagens é possível perceber que a imagem inicial do grupo que recebeu tratamento com EB permanece semelhante até o tempo de 48 h. Já a imagem inicial do grupo controle (tempo 0h) sofre nítidas modificações visuais no decorrer das horas. É possível inferir a migração das células na imagem de 48h quando comparada com a de 0h. Após 48h, não houve o fechamento total da ranhura feita em nenhum dos grupos, entretanto observa-se que os grupos tratados reduziram a migração celular.

5.3 Extrato bruto de *O. villosa* inibe em 50% a formação de colônias

O ensaio clonogênico avalia a capacidade das células de formarem colônias, sendo essa uma característica das células MCF-7. Nesse teste, as células MCF-7 foram plaqueadas na densidade de 1000 células/poço e, em sequência, tratadas com EB a 100 µg/mL por 48 horas, conforme descrito anteriormente na metodologia. Para analisar o resultado, as colônias marcadas foram contadas uma a uma e o percentual de redução foi calculado considerando o grupo controle.

Os resultados do teste estão representados na **Figura 11**, onde em **11A** é possível observar visualmente a diminuição do número de colônias no grupo tratado com EB. O teste foi realizado em triplicata e a média da quantidade de colônias contadas no grupo controle foi de 600 colônias, conforme o gráfico da **Figura 11 B**. No grupo tratado com EB a 100 µg/mL a média de colônias contadas é de aproximadamente 300 colônias. Dessa forma, é possível afirmar que o tratamento com o extrato inibiu 50,8% da formação de colônias de MCF-7, bloqueando de forma significativa essa característica tumoral.

Figura 11– Imagem das colônias coradas com solução de cristal violeta dos grupos tratados e não tratados com EB (A). Gráfico representativo da formação de colônias(B). (*) Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet. *O asterisco indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p<0,05).



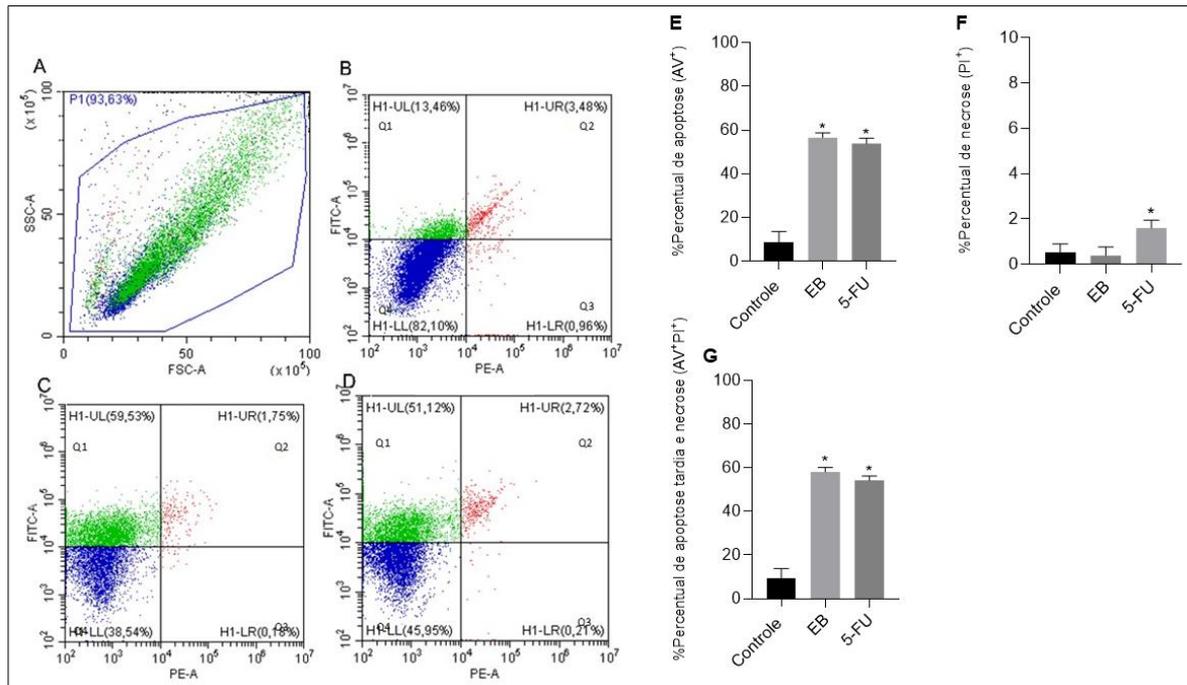
Fonte: Autoria própria.

Esse resultado corrobora com o resultado do teste de MTT e definição de IC_{50} , considerando que 100 µg/mL é confirmado como um valor de concentração que realmente inibe a viabilidade em 50%.

5.4 Extrato bruto de *O. villosa* promove morte celular por apoptose

O ensaio de tipo de morte de celular foi realizado com o intuito de investigar a forma de morte e mecanismos que ocorrem nas células quando tratadas com o extrato. Como descrito anteriormente, a Anexina V é capaz de se ligar a fosfatidilserina externada pelas células apoptóticas e IP é capaz de marcar células que a membrana não está íntegra. Assim os resultados desse ensaio são interpretados a partir desse fundamento, onde Anexina V marca células apoptóticas e IP marca células com morte tardia e necrose.

Figura 12 – Resultados do teste de tipo de morte celular, diagrama SSCxFSC (A), grupo controle – não tratado (B), tratado com EB (C), 5-FU (D). Gráficos de percentual de apoptose (E), percentual de necrose (F), percentual de apoptose tardia e necrose (G). (*) Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet: * $p < 0,05$.



Fonte: Autoria própria.

A **Figura 12 A** mostra o digrama de pontos (ou *dotplot*) de tamanho (FSC) por granulosidade/complexidade celular (SSC), onde é possível localizar a população de células MCF-7. Foi realizada a compensação entre as fluorescências FITC e PE do citômetro, de forma que a matriz ficou: no canal do FITC foi configurado o valor de 16,16 -%PE, e no canal de PE o valor de 65,25 -%FITC. A compensação é feita para que os valores de fluorescência encontrados por cada canal não se sobreponham, considerando que FITC é capaz de ler a incidência de Anexina V e PE detecta a autofluorescência de IP. O valor de ganho dos canais foi definido como, FSC: 114; SSC: 126; FITC:5 e PE:7.

Ainda em etapas preliminares e utilizando amostras não marcadas e marcadas com Anexina V e IP foi definido a escala de detecção negativa e positiva para cada canal. Para esse ensaio foi utilizado como “branco” amostras que não foram marcadas com Anexina V ou IP.

Como é possível ver nos diagramas de pontos, antes de 10^{-4} não foi encontrado marcação (em azul), logo esse ponto pôde definir os resultados positivos e negativos para cada fluorescência. Ou seja, acima de 10^{-4} no eixo Y é positivo para Anexina V (detectada no FITC, marcada em verde) e abaixo é negativo. A partir de 10^{-4} no eixo X é positivo para IP (detectada no PE, marcado em vermelho) e abaixo é negativo. Dessa maneira forma-se 4 quadrantes (Q), onde: Q1 é marcado por Anexina V+ que indica a ocorrência de apoptose; Q2 é marcado por IP+ e AV+ que indica ocorrência

de apoptose tardia e necrose; Q3 é marcado apenas por IP+ que indica necrose; e Q4 apresenta as células não marcada (células viáveis).

Na **Figura 12 B** é possível ver o diagrama de pontos de uma das triplicadas do grupo controle (não tratado), em **12C** está o diagrama de pontos de uma das triplicadas do grupo tratado com EB, e em **12D** está o diagrama de pontos da marcação do grupo tratado com 5-FU. Neles é possível localizar os quatro quadrantes e analisar a porcentagem de marcação.

Os gráficos (**Figura 12 E e F**) demonstram a média do percentual de células marcadas nos diagrama de pontos das triplicatas, sendo que a **Figura 12 E** está em função do percentual de marcação com Anexina V, ou seja, percentual de apoptose. Nessa figura, o percentual de apoptose do grupo controle foi 8,83%, sendo esse um valor aceitável considerando que pode ocorrer morte durante os procedimentos do ensaio, apesar de manter as condições necessárias para a sobrevivência das células.

Ainda na **Figura 12 E**, o percentual de apoptose do grupo tratado com EB foi de 56,59%, aproximadamente 48% de morte por apoptose a mais que o grupo não tratado com o extrato, sendo esse um resultado estatisticamente significativo. O percentual de apoptose do grupo tratado com 5-FU foi de 53,8%, que também expressa aumento da apoptose de modo significativo em relação ao grupo controle. De acordo com os resultados, EB induziu apoptose 2,79% a mais que 5-FU, um dado positivo considerando que 5-FU já é um quimioterápico consolidado.

A **Figura 12 F** apresenta os valores de necrose celular, sendo que no grupo controle o percentual de células necróticas foi de 0,5%, no grupo tratado com EB foi de 0,4% e no grupo tratado com 5-FU foi de 1,6%. Por consequência, é possível inferir que o percentual de morte por necrose é baixo, sendo que o tipo majoritário de morte celular sucedida a partir dos tratamentos é a apoptose. A **Figura 12 G** reúne os resultados positivos para apoptose e necrose das células.

Conforme os resultados apresentados, EB induz a morte celular por apoptose. Esse é um resultado positivo quanto a investigação de seu potencial como fármaco porque a morte celular por apoptose é menos agressiva do que a morte celular por necrose (BERTHELOOT, 2021).

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada onde a célula é induzida a morte por meio de mecanismos apoptóticos que podem ser desencadeados de forma intrínseca ou extrínseca. Os eventos característicos da apoptose são comumente usados para identificar qual mecanismo de morte que a célula seguiu. Ao

final, a célula apoptótica é fagocitada pelos macrófagos impedindo que moléculas intracelulares sejam liberadas no meio extracelular, evitando assim o processo inflamatório (BERTHELOOT, 2021).

Quando o processo de morte ocorre por necrose muitas células sofrem lesões em conjunto, por não ser autoinduzida e com uma sequência específica de mecanismos, o processo necrótico rompe a membrana celular e libera moléculas pró-inflamatórias. Essas moléculas acionam as células do sistema imunológico iniciando inflamação e lesões necróticas características (BERTHELOOT, 2021).

Em razão disso, o processo apoptótico é mais eficiente para eliminar a célula tumoral, reduzindo a possibilidade de inflamação e danos às células não tumorais. Induzir a morte por apoptose é uma estratégia farmacológica conhecida e utilizada para antitumorais. Aumentar proteínas iniciadoras da apoptose, ou outras moléculas que desencadeiam o processo são mecanismos investigados para novos fármacos. Estudos são continuamente desenvolvidos para construção de agentes que induzam a apoptose de forma seletiva para as células cancerígenas (LETAI, 2017).

5.5 Extrato bruto de *O. villosa* não promove alteração no ciclo celular

Uma das formas de investigar o mecanismo de ação de um composto é analisar as possíveis alterações no ciclo celular das células tratadas com o mesmo. Assim, o ensaio de ciclo celular é realizado através da citometria de fluxo, onde a quantidade de DNA é quantificada em cada parte do ciclo. Caso exista uma drástica alteração na quantidade de material em uma fase do ciclo em relação ao controle, pode ser inferido que a célula não evolui daquela fase, logo, “para” naquela etapa do ciclo. Sabendo em qual etapa do ciclo ocorre a parada e conseqüente morte da célula é possível indicar possíveis marcadores que influenciam no ciclo, que podem estar desencadeando a morte da célula tumoral.

Também é possível inferir que quando o resultado desse teste demonstra que não ocorreu a parada do ciclo celular, mecanismos não associados diretamente ao ciclo celular devem ser investigados a fim de justificar o potencial citotóxico do composto.

Dessa forma, com o intuito de avaliar EB e buscar evidências sobre um possível mecanismo de ação, foi realizado o ensaio de ciclo celular, onde um grupo de células MCF-7 foram tratadas com EB (100 µg/mL), um grupo não foi tratado (controle), e um

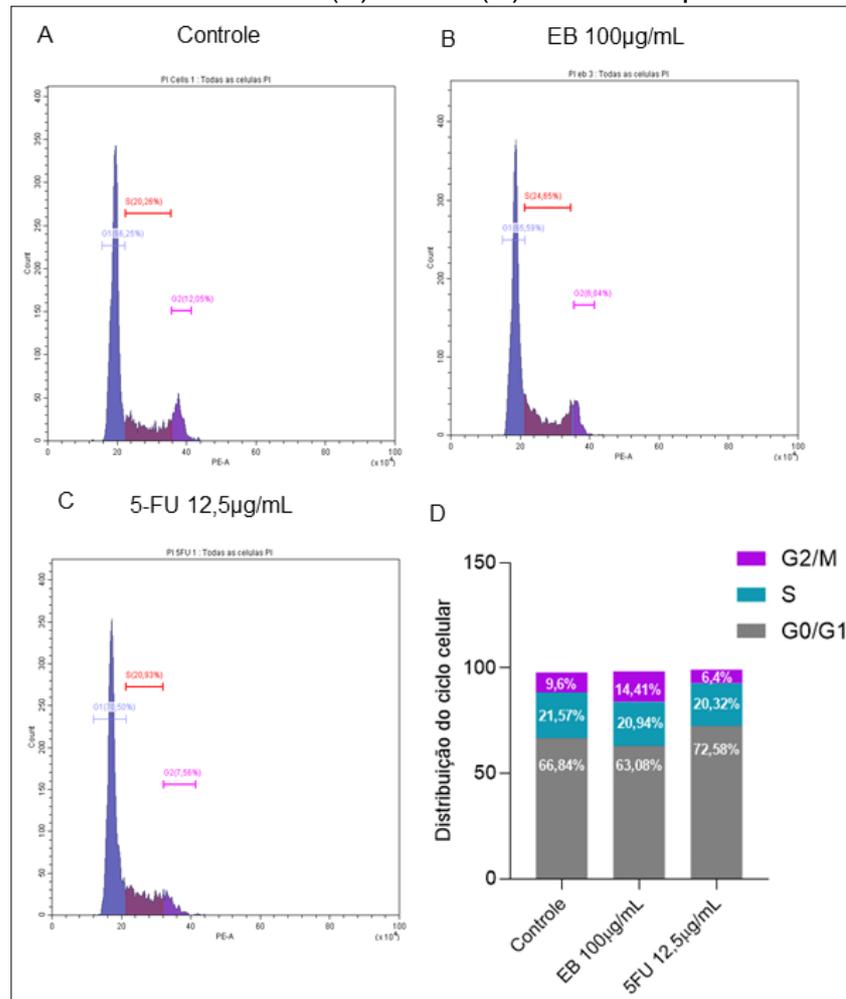
grupo foi tratado com 5-FU (12,5 µg/mL). O DNA das células de todos os grupos foi marcado com IP e quantificado por citometria de fluxo. Esse teste foi feito em triplicata e foram lidos pelo menos 10.000 eventos.

Os resultados estão dispostos em histogramas e no gráfico na **Figura 13**, onde é possível observar que: o grupo controle apresentou 66,84% das células em G0/G1, 21,57% em S e 9,6% em G2/M; o grupo tratado com EB apresentou 63,08% em G0/G1, 20,94% em S e 14,41% em G2/M; o grupo tratado com 5-FU apresentou 72,58% em G0/G1, 20,32% em S e 6,43% em G2/M.

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular aponta que 5-FU possui maior percentual de material genético na fase G1 em relação ao controle, logo é possível inferir que este influencia a parada do ciclo celular das células MCF-7 na fase G1. No trabalho de Hernández-Vargas e colaboradores (2006), é apontado que o 5-FU impede o progresso das células MCF-7 no ciclo celular na fase G1, o que corrobora com o resultado encontrado. O 5-FU é um análogo da molécula uracil com átomo de flúor na posição C-5 no lugar do hidrogênio, seu mecanismo de ação consiste na inibição da timidilato sintase e da incorporação de seus metabólitos em RNA e DNA (LONGLEY et al., 2003). Em relação a EB, a porcentagem de DNA nas fases do ciclo celular não apresentou diferença significativa em relação ao controle.

Considerando os resultados desse teste, não é possível associar a ação direta de EB como uma possível influência no ciclo celular das células MCF-7, visto que a partir de análises estatísticas não há diferenças no ciclo dos grupos tratados e não tratados.

Figura 13– Resultados do ensaio de ciclo celular com grupo controle (A), extrato bruto de *O. villosa* (B) e 5-FU(C). Gráfico representativo (D).



Fonte: Autoria própria.

5.6 Aumento da expressão CASP9 pós tratamento com extrato bruto de *O. villosa*

A reação de PCR foi utilizada para avaliar a expressão de marcadores tumorais analisando uma possível supressão ou elevação dos mesmos quando as células são tratadas com EB. O RNA das células tratadas foi extraído, isolado e então a partir dele foi sintetizado o cDNA, que foi amplificado na reação de PCR permitindo a detecção dos alvos escolhidos através do uso de primers.

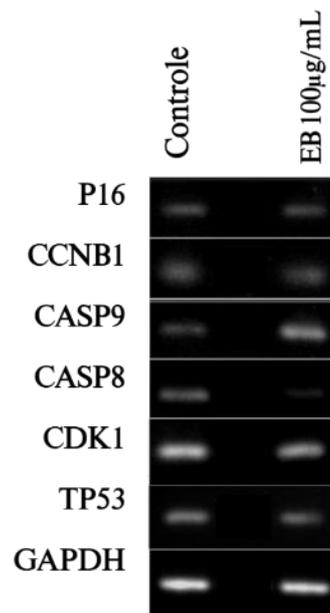
Os primers foram previamente desenhados considerando as informações na literatura que associam o gene alvo com a morte celular, parada do ciclo celular, indução de apoptose e outros mecanismos que são capazes de destruir as células tumorais. Dentre os marcadores testados estão: P16 (reguladora do ciclo celular); CCNB1 (ciclina B); CASP9 e CASP8 (proteínas pró apoptóticas); CDK1 (reguladora

do ciclo celular); TP53 (reparador de DNA) e GAPDH (enzima que participa da glicólise, usado como controle).

Após a reação de PCR, as amostras foram pipetadas em poços do gel de agarose (3%) submerso em uma solução tampão onde ocorreu a corrida de eletroforese. Esse método busca separar macromoléculas pelo peso molecular através de corrente elétrica. Após 120 minutos a corrida se encerrou e foi possível identificar as bandas, marcadas e separadas no gel, através de um fotodocumentador (**Figura 14**). Junto às amostras foi aplicado um marcador de peso molecular no gel para que fosse possível comparar o tamanho dos amplicons esperados com os marcados após a corrida. Após a corrida, todas as bandas referentes aos primers marcaram no gel o valor de peso molecular esperado considerando o tamanho de seus respectivos amplicons.

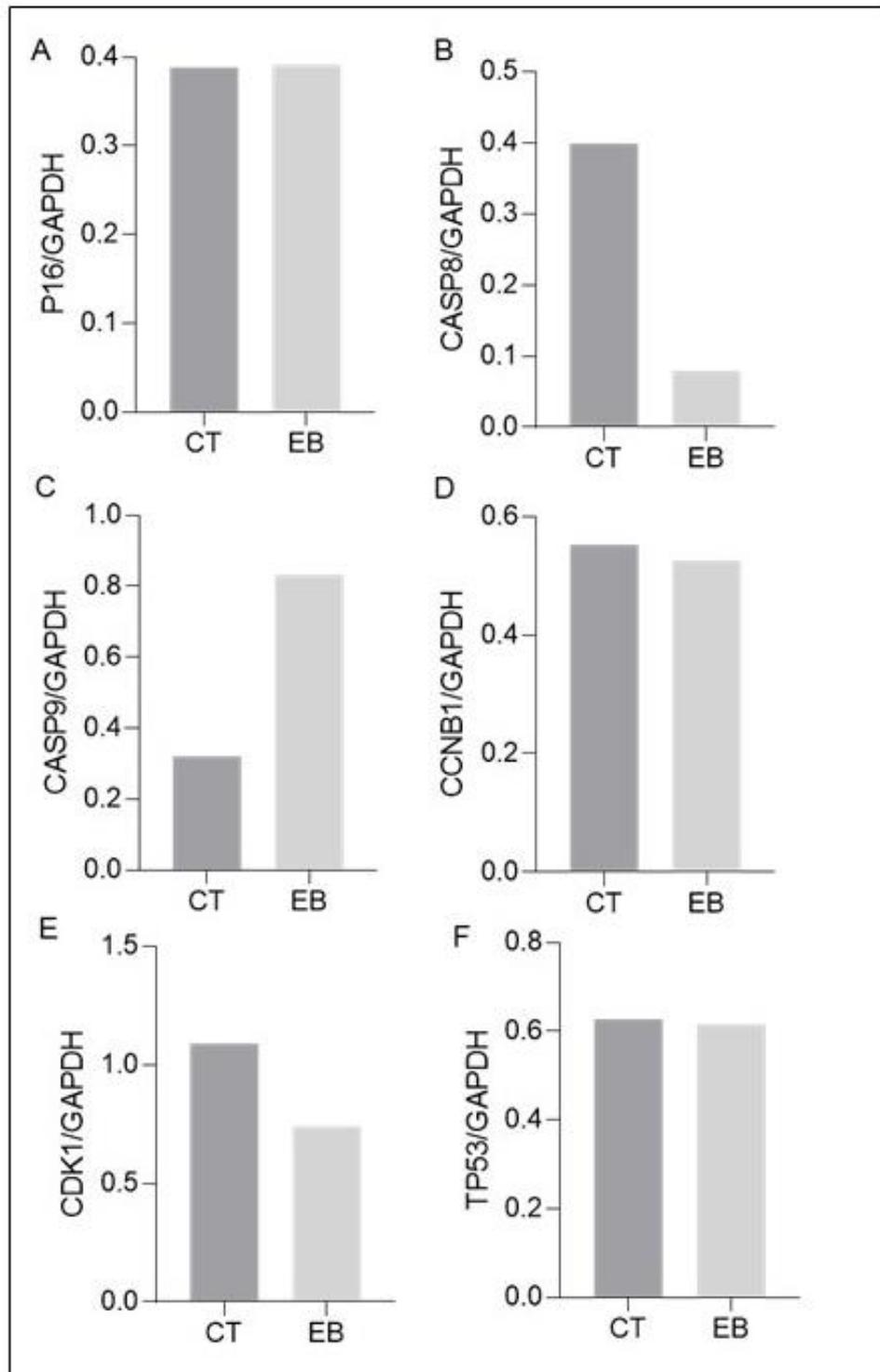
Esse é um teste semiquantitativo porque a intensidade das bandas identifica a expressão dos marcadores, sendo possível sugerir valores para as bandas através da contagem de pixels na imagem do gel. Para quantificar com precisão a expressão desses marcadores é necessário realizar PCR em tempo real, que é um dos próximos passos desse trabalho.

Figura 14– Imagem do gel de eletroforese com amostras tratadas e não tratadas.



Fonte: Autoria própria.

Figura 15 – Gráficos (A-F) da contagem de pixels da imagem do gel após reação de PCR das amostras EB e controle, em função de GAPDH que foi usado como normalizador.



Fonte: Autoria própria.

A partir da **Figura 15** é possível notar visualmente os marcadores presentes nas amostras tratadas e não tratadas. Nesse teste a expressão de GAPDH atua como

um controle positivo, sendo expresso em ambos os grupos com intensidade semelhante. Analisando os demais marcadores é possível afirmar que CCNB1, TP53 e P16 demonstram bandas muito semelhantes às da amostra controle, logo são grupos que não evidenciam marcação diferencial com o tratamento de EB (**Figura 15 A, B e C**). CASP8 apresentou na uma menor expressão no grupo tratado com EB em relação ao grupo controle (**Figura 15 D**).

Apesar de na **Figura 14** as bandas de CDK1 nos grupos controle e tratado não demonstrarem uma grande diferença de intensidade, a contagem de pixels plotada no gráfico (**Figura 15 E**) demonstra que a expressão de CDK1 apresentou redução nas células tratadas com EB. Considerando que CDK1 é essencial para as transições de fase G2/M do ciclo celular, funcionando como reguladora do ciclo celular, esse é um resultado que deve ser investigado através do PCR em tempo real para definir se realmente há redução e se pode indicar um caminho para elucidar o mecanismo de EB.

A CASP9 destaca-se entre todos os marcadores ao demonstrar uma maior densidade na banda do grupo tratado com EB do que no grupo controle de células (**Figura 15 F**). Considerando que CASP9 codifica a enzima caspase-9 que é iniciadora da via apoptótica, esse resultado pode apontar uma hipótese do mecanismo de ação de EB como agente citotóxico. Nessa hipótese não é necessário comprovar a parada do ciclo celular em uma das fases, o que não foi confirmado no resultado anterior (ensaio de ciclo celular por citometria de fluxo). Todavia, o resultado do tipo de morte celular (demonstrado que o tipo de morte ocorrido foi apoptose) corrobora com a hipótese que EB aumenta a expressão das caspases-9, iniciando o processo de apoptose da célula tumoral.

A hipótese para o mecanismo de ação de EB nas células MCF-7 é por aumentar a expressão da caspase-9, que é uma proteína iniciadora do processo de apoptose. A apoptose pode ocorrer pela via intrínseca ou extrínseca, em ambas ocorre a ativação das caspases. A via intrínseca está ligada a sinais de estresse intracelular, sendo que através de proteínas ocorre a sinalização e regulação da morte celular. Nessa via, essas proteínas acionam a liberação de citocromo C pela mitocôndria e ativam caspase-9, essa em sequência ativa as caspases executoras da apoptose (caspase-3, -6 e -7) (ROBINS, 2013). A via extrínseca é iniciada por ligantes extracelulares nos receptores de membrana, que ativam caspases-8 e -9 e

desencadeiam a cascata de apoptose. Por essa razão as caspases são marcadores importantes de apoptose (ROBINS, 2013).

Pouco foi descrito sobre a espécie *O. villosa*, e ainda não existem trabalhos publicados que comprovem ou investiguem seu potencial antitumoral. Entretanto, alguns trabalhos relacionados ao gênero *Ocotea* são encontrados, como o de Diniz (2023). Nesse trabalho foi avaliado o potencial citotóxico do óleo essencial de *Ocotea indecora* para as linhagens celulares SCC9 (carcinoma de células escamosas na língua), HT29 (adenocarcinoma colorretal), HepG2 (hepatocarcinoma), e B16F10 (melanoma). Foi demonstrado que ocorreu citotoxicidade para essas linhagens e aumento de caspases-3 e -7. Em 2011, Chaverri e colaboradores investigaram o efeito do óleo essencial de *O. gomezii* e *O. morae* em linhagens celulares tumorais, incluindo MCF-7, e encontraram uma redução na viabilidade e proliferação. Entretanto, relatam não sugerir quais são os compostos responsáveis devido à complexidade química. Esses estudos foram desenvolvidos a partir do óleo essencial de espécies de *Ocotea* diferentemente do presente trabalho investigou o potencial antitumoral do extrato bruto.

O gênero *Ocotea* demonstra um perfil interessante de bioatividades e insuficientemente estudado. Katchborian-Neto e outros (2023) investigaram a atividade anti-inflamatória do extrato bruto de 60 espécies do gênero, sendo que 49 de 60 extratos exibiram inibição da liberação de prostaglandinas, revelando potencial anti-inflamatório. Alguns biomarcadores relacionados a essa atividade foram registrados como alcalóides aporfínicos, benzilisoquinolina e fenantreno. Dentre as 60 espécies testadas, a *O. villosa* inibiu 90,7% de prostaglandinas e foi uma das 10 espécies destacadas pelo autor por apresentar atividade anti-inflamatória e biomarcadores de interesse. Pela técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução, Katchborian-Neto e outros (2023) demonstraram nesse trabalho a presença do alcalóide boldina no extrato bruto de *O. villosa*.

Dentro da família Laureacea, o gênero *Ocotea* é o segundo maior produtor de alcalóides, são conhecidos mais de 140 diferentes alcaloides (BARBORA-FILHO, 2000). A maioria dos alcalóides isolados são derivados do núcleo benziltetrahydroisoquinolina, e entre os alcalóides derivados deste núcleo, a aporfina

é o mais comum. Os alcalóides aporfínicos são encontrados em análises químicas da maioria das espécies de *Ocotea spp.* (TELES et al., 2019).

Em uma revisão sistemática, Muthna e colaboradores (2013) relataram que a boldina apresenta propriedade antioxidante dose-dependente, podendo gerar um efeito bifásico. Em determinada dose atua eliminando espécies reativas de oxigênio (ERO), como um ativo antioxidante. Em outra dose pode exibir atividade pró-oxidante e gerar ERO em quantidades letais para uma célula tumoral (LOO, 2013).

Além do efeito antioxidante, a boldina apresenta efeito anti-inflamatório e antipirético, mas pouco foi descrito sobre suas propriedades antiproliferativas. Um estudo utilizando extrato de *P. boldus*, rico em boldina, demonstrou que essa atividade depende do tipo celular. Em M14 (melanoma) o extrato induziu uma redução na expressão da proteína Hsp70, que está relacionada a fragmentação do DNA e aumento significativo na atividade de caspase-3. Um crescimento paralelo na produção de ERO pode ter amplificado as cascatas de apoptose nesse caso (RUSSO et al., 2011). Foi demonstrada redução da proliferação celular quando derivados da boldina foram testados para células MCF-7 e MDA-MB-231 (THOMET et al., 2011).

A boldina exibe maior citotoxicidade nas células do câncer do que nas normais, e suprime fortemente a atividade da telomerase em concentrações subcitotóxicas (NOUREINI, 2015). Ela foi testada por Tomšík e colaboradores (2016) em camundongos com tumor de Ehrlich e em células MCF-7 e demonstrou retardar o crescimento tumoral nos testes *in-vivo*, e reduzir a viabilidade das células MCF-7 *in-vitro*. A boldina pode influenciar na proliferação, sobrevivência e metabolismo das células (MUTHNA et al., 2013).

Diante dos resultados apresentados nesse presente trabalho e as evidências científicas relacionadas ao extrato bruto de *O. villosa* relatadas na literatura, é relevante discutir que EB pode induzir efeito antiproliferativo em células tumorais mamárias a partir de mecanismos relacionados a presença de substâncias que podem estar desencadendo a morte apoptótica pela ativação da cascata de caspases ou ainda por meio do estresse oxidativo.

A fim de formar uma hipótese ainda mais concludente sugere-se a realização de mais testes *in vitro* e *in vivo*, como a avaliação da expressão de marcadores da via intrínseca da apoptose, para buscar evidências com relação à atividade da caspase-

9; recomenda-se a avaliação quantitativa dos marcadores apoptóticos, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Sugere-se a investigação da produção de espécies reativas de oxigênio, que podem estar envolvidas na indução da morte celular.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que dentre as 56 espécies testas do gênero *Ocotea*, a *O. villosa* apresenta ação citotóxica. Além disso, algumas espécies do gênero induzem a proliferação celular e devem ser investigadas.

O extrato bruto de *O. villosa* apresentou ação citotóxica, pró-apoptótica e antiproliferativa. Ainda possui ação na inibição da migração celular e na formação de colônias. Não foi possível confirmar alguma influência do extrato no ciclo celular.

Com relação à expressão dos marcadores analisados nas células tratadas com extrato bruto de *O. villosa*, destaca-se o aumento da expressão de caspase-9, um marcador pró-apoptótico pertencente a via intrínseca da apoptose, que indica uma hipótese para o mecanismo de ação do extrato.

Por conseguinte, este estudo apresenta dados promissores do extrato bruto de *O. villosa* como um potencial agente antitumoral natural contra células do câncer de mama. Estudos futuros devem considerar os resultados apresentados nesse trabalho a fim de elucidar os mecanismos de ação e substâncias ativas desse extrato.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, B. G. V. Metabolômica e fitoquímica de espécies de Lauraceae e avaliação da inibição das principais vias inflamatórias por seus extratos e substâncias purificadas. 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2018.
- AL-DABBAGH, B. et al. Antioxidant and anticancer activities of *Trigonella foenum graecum*, *Cassia acutifolia* and *Rhazya stricta*. **BMC Complement Altern Med**, n.18, p. 240, 2018.
- ALISON, M.R.; HUNT, T.; FORBES, S.J. Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers. **Gut**, n. 50, p. 290–291, 2002.
- 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, p. 118-129, 2005.
- ALMENDRAL, J. M. et al. Cloning and sequence of a human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 84, p. 1575–1579, 1987.
- ATCC. MCF10A. Disponível em: < <https://www.atcc.org/products/crl-10317> >, acesso em 12/07/2023.
- ATCC. MCF7. Disponível em: < <https://www.atcc.org/products/htb-22> >, acesso em 12/07/2023.
- ATCC. MDA-MB-231. Disponível em: < <https://www.atcc.org/products/htb-26> >, acesso em 12/07/2023
- AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Câncer na população feminina brasileira. **Revista de Saude Publica**, v. 27, n. 1, p. 68–75, 1993.
- AZEVEDO-BARBOSA, H. Et al. Phenylpropanoid-based sulfonamide promotes cyclin D1 and cyclin E downregulation and induces cell cycle arrest at G1/S transition in estrogen positive MCF-7 cell line. *Toxicology in Vitro*, p. 150–160, 2019.
- BACKHOUSE, N.; DELPORTE, C.; GIVERNAU, M.; CASSELS, B.K.; VALENZUELA, A.; SPEISKY, H. Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine. **Agents and Actions**, v. 42, p. 114-117, 1994.
- BALLABENI, V. et al. *Ocotea quixos* Lam. Essential oil: in vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, n. 81, v. 4, p. 289–295, 2010.
- BARBOSA-FILHO, J. M. Et al. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twentycentury review. **Brazilian journal of Pharmacology**, v. 16, n. 1, p. 109–139, 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L.; GRAY, A. I. Alkaloids of the Menispermaceae. **Alkaloids**, v. 54, p. 1–190, 2000.

BARNARD, M. E. et al. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer**, v. 1856, n. 1, 2015.

BATISTA A. N. De L., et al. Aromatic compounds from three brazilian lauraceae species. **Quimica Nova**, v. 33, n. 2, p. 321–323, 2010.

BERTHELOOT, D.; LATZ, E.; FRANKLIN, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular and Molecular Immunology*. **Springer Nature**, v. 18, p. 1106–1121, 2021.

BORGES, B. E. et al. De novo galectin-3 expression influences the response of melanoma cells to isatin-Schiff base copper (II) complex-induced oxidative stimulus. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 1, p. 37–46, 2013.

BRAVO, B. S. Et al. Câncer de mama: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 14254-14264, 2021.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; DOS SANTOS, E. P. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná Brasil. **Rodriguesia**, v. 64, n. 3, p. 495–525, 2013.

BRUNTON L.L. et al. (Ed). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12^a. Edição. AMGH Editora, 2012.

BRUSTULIM, L. J. R.; MONTEIRO, L. M.; DE ALMEIDA, V. P.; RAMAN, V.; MAIA, B. H. L. De N. S.; CASAPULA, I.; PALUDO, K. S.; BUSSADE, J. E.; REHMAN, J. U.; KAHN, I. A.; FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M. *Ocotea porosa*: Anatomy and histochemistry of leaves and stems, chemical composition, cytotoxicity and insecticidal activities of essential oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.

CAMARGO, M. J. et al. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1008–1013, 2013.

CELIS, J.E., CELIS, A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. **Proc. Natl. Acad. Sci**, n. 82, v. 10, p. 3262–3266, 1985.

CHAVERRI, C.; CICCIO, J. F. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. **Revista de Biologia Tropical**, v. 53, n. 3–4, p. 431–436, 2005.

CHAVERRI, C.; DÍAZ, C.; CICCIO, J. F. Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at “Reserva Biológica Alberto M. Brenes” in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines. **J. Braz. Chem. Soc.**, p. 741-745, 2011.

CONCEIÇÃO, R. S. Et al. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 275–282, 2017.

COSTA, I. F. B. et al. Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *Ocotea notata* from Brazilian restinga. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

COSTA, L. A. M. Estudo da atividade antitumoral do composto mih2.4bl em linhagens celulares de câncer de mama. 2020. 73 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2020.

CUCA, L. E. et al. Cytotoxic effect of some natural compounds isolated from Lauraceae plants and synthetic derivatives. **Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud**, n.31, v.3, p. 335–343, 2011.

DA SILVA, D. T. Et al. Physicochemical characterization of leaf extracts from *Ocotea lancifolia* and its effect against wood-rot fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 117, p. 158–170, 2017.

DA’I, M. et al. Selectivity Index of Alpinia galanga Extract and 1’Acetoxychavicol Acetate on Cancer Cell Lines. **Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention**, v. 10, n. 2, p. 95, 2019.

DENG, W. et al. MICAL1 facilitates breast cancer cell proliferation via ROS-sensitive ERK/cyclin D pathway. **J Cell Mol Med**, v. 22, p. 3108–3118, 2018.

DESTRYANA, R. A. et al. Antioxidant and anti-inflammation activities of *Ocotea*, *Copaiba* and *Blue cypress* essential oils *in vitro* and *in vivo*. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 91, p. 1531–1542, 2014.

DEVITA, V.T.; LAWRENCE, T.S.; ROSENBERG, S.A. Cancer: Principles and Practice of Oncology (12th edition). Wolters Kluwer, 2023.

DONEPUDI, M.S.; KONDAPALLI, K.; AMOS, S.J.; VENKANTESHAN, P. Breast cancer statistics and markers. **J Can Res Ther**, n. 10, p. 506-11, 2014.

DOWSETT, M., et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 103, p. 1656–1664, 2011.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 4, p. 329–360, 2004.

FENG, H.; JIANG, Y.; CAO, H.; SHU, Y.; YANG, X.; ZHU, D.; SHAO, M. Chemical characteristics of the sesquiterpenes and diterpenes from Lauraceae family and their multifaceted health benefits: A review. **Heliyon**, p. 2405-8440, 2022.

FERREIRA, S. S. Et al. Indicações de exames de ressonância magnética das mamas em um centro de referência no diagnóstico e tratamento de câncer de mama no Brasil. **Revista de Radiologia Brasileira**, v. 54, n. 2, 2021.

FERREIRA, A. C. Molecular heterogeneity in different established human triple-negative breast cancer cell lines. Tese de doutorado em Ciências Biológicas. UNIFESP, São Paulo, 2022.

FOCAC CETTI, C.; BRUNO, A.; MAGNANI, E.; BARTOLINI, D.; PRINCIPI, E.; DALLAGLIO, K.; BUCCI, E. O.; FINZI, G.; SESSA, F.; NOONAN, D. M.; ALBINI, A. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ros production in endothelial cells and cardiomyocytes. **PloS ONE**, v. 10, v. 2, 2015.

FORSBURG, S.L. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. **Microbiol. Mol. Biol. Ver**, n. 68, p. 109–131, 2004.

FOURNET, A. et al. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382-384, 2007.

FRANCA, L. K. L. et al. Role of magnetic resonance imaging in the planning of breast cancer treatment strategies: comparison with conventional imaging techniques. **Revista de Radiologia Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 76-81, 2017.

FRANKEN, N. A. Et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

GARCIA, D. A.; PRESSETE, C. G.; MIRANDA, R.; SALEM, P. P. O; NICÁCIO, K. J.; COSTA, L. P. D. M.; MURGU, M.; LAGO, J. H. G.; DIAS, D. F.; SOARES, M. G.; IONTA, M.; CHAGAS-PAULA, D. A. Biological and metabolomics-guided isolation of tetrahydrofurofuran lignan from *Croton* spp. with antiproliferative activity against human melanoma cell line. **Fitoterapia**, v. 177, 2024.

GARCEZ, F. R.; FRANCISCA DA SILVA, A. G.; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; DE FATIMA MATOS, M. C.; S SANTOS, E. C.; M QUEIROZ, L. M. Cytotoxic Aporphine Alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Med**, v. 77, p. 383–387, 2011.

GARRETT, R. et al. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 306–313, 2012.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J. Immunol**, v. 133, p. 1710–1715, 1984.

GERDES, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. **Semin. Cancer Biol**, v. 1, p. 199–206, 1990.

GERHARDT, D. Bioquímica avaliação do efeito do alcaloide boldina sobre modelos experimentais de malignidades do sistema nervoso central e bexiga. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2012.

GERHARDT, D.; HORN, A. P.; GAELZER, M. M.; FROZZA, R.L.; DELGADO-CAÑEDO, A.; PELEGRINI, A. L.; HENRIQUES, A. T.; LENZ, G.; SALBEGO, C. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. **Investigational New Drugs**, v. 27, p. 517-525, 2009.

GONZALEZ, M.A. et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 4306–4313, 2003.

GOSPODINOVAZI, Z. I. et al. *Cotinus coggygria* Scop. induces cell cycle arrest, apoptosis, genotoxic effects, thermodynamic and epigenetic events in MCF7 breast cancer cells. **Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences**, 2020.

GREM J.L. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. **Invest New Drugs**, n. 18, p. 299–313, 2000.

HERNÁNDEZ-VARGAS, H.; BALLESTAR, E.; CARMONA-SAEZ, P.; VON KOBBE, C.; BAÑÓN-RODRÍGUEZ, I.; ESTELLER, M.; MORENO-BUENO, G.; PALACIOS, J. Transcriptional profiling of MCF7 breast cancer cells in response to 5-flouracil: Relationship with cell cycle changes and apoptosis, and identification of novel targets of p53. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 5, p. 1164–1175, 2006.

HUNT, D.P. et al. Early recurrence of benign meningioma correlates with expression of mini-chromosome maintenance-2 protein. **Br. J. Neurosurg**, n. 16, p. 10–15, 2002. INCA - Instituto Nacional do Câncer. Prevenção e controle de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 317-332, 2002.

INWALD, E.C. et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 139, n. 2, p. 539–552, 2013.

ISMAIL, N.Z. et al. *Christia vespertilionis* extract induced antiproliferation and apoptosis in breast cancer (MCF7) cells. **Mol Biol Rep**, n. 48, p. 7361-7370, 2021.

KAMALIDEHGHAN, B.; WONG, Y. L.; WONG, W. F.; LOOI, C. Y.; MUSTAFA, M. R. Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using in vitro and in vivo models. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 719–733, 2014.

KATCHBORIAN-NETO, A.; NICÁCIO, K. de J.; CRUZ, J. C.; BUENO, P. C. P.; MURGU, M.; DIAS, D. F.; SOARES, M. G.; PAULA, A. C. C.; CHAGAS-PAULA, D. A. Bioprospecting-based untargeted metabolomics identifies alkaloids as potential anti-inflammatory bioactive markers of *Ocotea* species (Lauraceae). **Phytomedicine**, v. 120, 2023.

KAZEMI NOUREINI, S.; TANAVAR, F. Boldine, a natural aporphine alkaloid, inhibits telomerase at non-toxic concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 27–34, 2015.

KILL, I.R. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus: evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. **J. Cell Sci.**, v. 109, p. 1253–1263, 1996.

KOO, M. M. et al. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. **Cancer epidemiology**, n. 48, p. 140–146, 2017.

KOUNDRIOUKOFF, S. et al. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA interacting proteins for phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, n. 275, p. 22882–22887, 2000.

KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. K. **Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro, ed, 9, 2021.

LEPORATTI, M. L. et al. Formerly natural product letters chemical, biological, morphoanatomical and antimicrobial study of *Ocotea puchury*-major Mart. **Natural Product Research**, v. 28, p. 37–41, Jan. 2014

LETAL, A. Apoptosis and cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, p. 275–294, 2017.

LEV, S. Targeted therapy and drug resistance in triple-negative breast cancer: the EGFR axis. *Biochemical Society transactions*, v. 48, n. 2, p. 657–665, 2020.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols** v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIU, S.M.; OU, S.Y.; HUANG, H.H. Green tea polyphenols induce cell death in breast cancer MCF-7 cells through induction of cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 18, p. 89-98, 2017.

LIU, Y. et al. Antiproliferative compounds from *Ocotea macrocarpa* from the. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 3630–3632, 2015.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, 2003.

LOO, G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 64-73, 2003.

MAGALHÃES, I. F. B. et al. The Use of Plants' Natural Products in Breast Cancer: Have We Already Found the New Anticancer Drug?. *Breast Cancer - Evolving Challenges and Next Frontiers*. **IntechOpen**, 2021.

MAIRINK, A. P. A. R. et al. Experience of Young Women in face of Breast Neoplasia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n.4, 2020.

MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology and Therapy**, v. 10, n. 10, p. 955–960, 2010.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae. **Rev Floram**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. S. Treatment of breast cancer. **American family physician**, v. 81, n. 11, p. 1339–1346, 2010.

MELIS, C. et al. Molecular genetic and immunotherapeutic targets in metastatic melanoma. **Virchows Archiv**, v. 471, n. 2, p. 281–293, 2017.

MILIOLI, H. H. et al. Cyclin E1 and cyclin E2 in ER+ breast cancer: prospects as biomarkers and therapeutic targets. **Endocrine-Related Cancer**, n.27, p. 93-112, 2020.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUTHNA, D.; CMIELOVA, J.; TOMSIK, P.; REZACOVA, M. Boldine and Related Aporphines: From Antioxidant to Antiproliferative Properties. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 12, p. 1791-1800, 2013.

NEGRÍN, G. et al. Naturally occurring asteriscunolide A induces apoptosis and activation of mitogen-activated protein kinase pathway in human tumor cell lines. **Molecular carcinogenesis** v. 49, n. 5, p. 488–499, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products: American Chemical Society**, 2020.

NORIEGA, P. Ishpink, *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. History, traditional uses, chemical, pharmacological properties and the economic potential of its essential oils present within this amazonian species. **Quito: Nova Science Publishers**, 2016.

NOUREINI, S. K.; TANAVAR, F. Boldine, a natural aporphine alkaloid, inhibits telomerase at non-toxic concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 27-34, 2015.

PALOMINO, E. et al. Caparratriene, an active sesquiterpene hydrocarbon from *Ocotea caparrapi*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 1, p. 77–79, 1996.

PASSOS, B. G.; DE ALBUQUERQUE, R. D. D. G.; MUÑOZ-ACEVEDO, A.; ECHEVERRIA, J.; LLAURE-MORA, A. M.; GANOZA-YUPANQUI, M. L.; ROCHA, L. Essential oils from *Ocotea* species: Chemical variety, biological activities and geographic availability. **Fitoterapia**, 2022.

PAULA, A.C. et al. Human adipose tissue-derived stem cells cultured in xeno-free culture condition enhance c-MYC expression increasing proliferation but bypassing spontaneous cell transformation. **Stem Cell Res Ther**, v. 14, n. 6, p. 76, 2015.

PECKOLT, G.; PECKOLT, T. História das plantas medicinais e úteis do Brasil. **Companhia Typographica do Brasil**, p. 281–282, 1853.

RAKOTONDRAIBE, L. H. et al. Neolignans and other metabolites from *Ocotea cymosa* from the Madagascar rain forest and their biological activities. **Journal of Natural Products**, 2014.

RANG HP et al. Rang & Dale Farmacologia. 7a. Edição. Elsevier, 2012.

REHMAN, A. et al. Microfluidic Device for the Separation of Non-Metastatic (MCF-7) and Non-Tumor (MCF-10A) Breast Cancer Cells Using AC Dielectrophoresis. **J. Vis. Exp**, 2022.

RODRIGUES, P.S.M. et al. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. sobre células normais e tumorais. **J Health Biol Sci.**, n. 5, p. 16- 23, 2017.

ROZENBLAT, S. et al. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 369–382, 2008.

RUSSO, A.; CARDILE, V.; CAGGIA, S.; GUNTHER, G.; TRONCOSO, N.; GARBARINO, J. Boldo prevents UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and reduces the expression of Hsp70 protein in melanoma cancer cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1219-29, 2011.

SACCHETTI, G. et al. Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 4, p. 674–676, 2006.

SARHANGI, N. et al. Breast cancer in the era of precision medicine. **Molecular biology reports**, v. 49, n.10, p. 10023–10037, 2022.

SATZGER, I. et al. MicroRNA-15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. **International Journal of Cancer** v. 126, n. 11, p. 2553–2562, 2010.

SCHRÖDER L. et al. Effects of green tea, matcha tea and their components epigallocatechin gallate and quercetin on MCF 7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells. **Oncology Reports**, v.41, p. 387-396, 2019.

SHARIFI-RAD, J. et al. Natural products and synthetic analogs as a source of antitumor drugs. [S.l: s.n.], v. 9, 2019.

SHETTY, A., LODDO, M., FANSHAW, T., PREVOST, A.T., SAINSBURY, R., WILLIAMS, G.H.,STOEBER, K. DNA replication licensing and cell cycle kinetics of normal and neoplastic breast. *Br. J. Cancer* 93, 1295–1300, 2005.

SILVA TELES, M. M. R.; VIEIRA PINHEIRO, A. A.; DA SILVA DIAS, C.; FECHINE TAVARES, J.; BARBOSA FILHO, J. M.; LEITÃO DA CUNHA, E. V. Alkaloids of the Lauraceae. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 82, p. 147–304, 2019.

SILVA, A.F. Estudo metabolômico e anti-inflamatório de *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez para identificação de suas substâncias ativas e inéditas. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas.

SILVA, M. M. R. T.; VIEIRA, A. A. P.; DA SILVA, C. D.; FECHINE, J. T.; BARBOSA, J. M. F.; CUNHA, E. V. L. Alkaloids of the Lauraceae. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 82, p. 147-304, 2019.

SINHA, D. et al. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. **Seminars in Cancer Biology**, p.40-41, 2016.

SØRLIE T, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, 2001.

SØRLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667–2675, 2004.

SOUSA, F. C. F. et al. Central Nervous System Activity of Yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in Mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 282–286, 2005.

SOUZA, M.V.N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 308-312, 2004.

STAKER, K. et al. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 15387-15392, 2002.

STARBORG, M. et al. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. **J. Cell Sci**, v. 109, p. 143–153, 1996.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.**, n. 71, p. 209-249, 2021.

TAO, J.J. et al. Antagonism of EGFR and HER3 enhances the response to inhibitors of the PI3K-Akt pathway in triple-negative breast cancer. **Sci. Signal**, v. 7, n. 29, 2014.

THOMET, F. A.; PINYOL, P.; VILLENA, J.; ESPINOZA, L. J.; REVECO, P. G. Cytotoxic thiocarbamate derivatives of boldine. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1587-90, 2010.

TOMŠÍK, P., MIČUDA, S., MUTHNÁ, D., ČERMÁKOVÁ, E., HAVELEK, R., RUDOLF, E., ŽIVNÝ, P. Boldine Inhibits Mouse Mammary Carcinoma In Vivo and Human MCF-7 Breast Cancer Cells In Vitro. **Planta Medica**, v. 82, n. 16, p. 1416–1424, 2016.

TRAYES, K. P.; COKENAKES, S. E. H. Breast Cancer Treatment. **American Family Physician**, v. 104, n. 2, 2021.

TROUSIL, S. et al. Phenformin Enhances the Efficacy of ERK Inhibition in NF1-Mutant Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology** v. 137, n. 5, p. 1135– 1143, 2017.

V. F. ROCHE. Cancer and Chemotherapy. In: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, D. A. WILLIAMS, T. L. LEMKE (Eds). 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2008, p. 1147-1192.

VOLPE, V. O. et al. The new paradigm of systemic therapies for metastatic melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 77, n. 2, p. 356– 368, 2017.

WEN, C. et al. Berberine enhances the antitumor activity of tamoxifen in drug-sensitive MCF-7 and drug-resistant MCF-7/TAM cells. **Molecular Medicine Reports**, n. 14, p. 2250-2256, 2016.

WOJNAR, A., et al. Correlation of intensity of MT-I/II expression with Ki-67 and MCM-2 proteins in invasive ductal breast carcinoma. **Anticancer Res.**, n. 31, p. 3027–3033, 2011.

YAMAGUCHI, M. U. et al. Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 507–514, 2011.

ZHAO, G. et al. Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells. **Oncol Rep**, n. 19, p. 2277–2285, 2017.

ZHOU, B. N. et al. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxylo*n. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 2, p. 217–221, 2000.