

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

JÚLIA PEREIRA SOARES

**CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *Kalanchoe
brasilensis* E *Achyrocline satureoides* A LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE
MAMA**

PATOS DE MINAS- MG

AGOSTO/2022

JÚLIA PEREIRA SOARES

**CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *Kalanchoe*
brasiliensis E *Achyrocline satureoides* A LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE
MAMA**

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

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

PATOS DE MINAS-MG

AGOSTO/2022

JÚLIA PEREIRA SOARES

Citotoxicidade dos extratos de *Kalanchoe brasiliensis* e *Achyrocline satureoides* a linhagens celulares de câncer de mama

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

Banca Examinadora:

Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – UFU
Presidente

Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – UFU
Membro

Dr. Raoni Pais Siqueira – UFU
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas – MG, 11 de agosto de 2022.

Dedico este trabalho a pessoa mais importante da minha vida, que sempre torceu pelo meu sucesso, que me ama incondicionalmente e que com sua fé sempre lutou, e ainda luta, para que eu possa conquistar e realizar todos meus sonhos, dedico á Selma, minha mãe. Além dela, dedico ao meu pai, que infelizmente não está presente mas sei que está orgulhoso e que torce por mim lá de cima.

AGRADECIMENTOS

Hoje, depois de anos, finalmente chegou o dia em que um ciclo se encerra e ao mesmo tempo abre portas para o início de um novo. Para que eu tenha chegado aonde cheguei tive a ajuda de muitos, que com certeza carregarei em minha memória ao longo da minha vida.

Primeiramente agradeço à Deus, por sempre ter me guiado, dado forças para persistir neste caminho e permitir esta conquista.

À minha mãe e irmãos, Bruno e Lucas, que mesmo distantes sempre acreditaram em mim e me apoiaram independente da situação, na qual só nós sabemos o que passamos para que este sonho pudesse ter sido concluído. Sem vocês nada disso teria sentido.

À Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, que me acompanha desde 2019 me orientando durante a graduação e projetos; por ter me aceitado em seu laboratório além de todo conhecimento, paciência e compreensão que teve comigo ao longo desses anos, principalmente durante a pandemia, momento que não foi fácil para ninguém. Por último, gostaria de ressaltar que todo seu esforço e persistência pela ciência é notório e satisfatório, isso me faz crer e me motiva a continuar nesta direção.

Ao meu coorientador MSc. Douglas Brandão pelo tema e sequência de experimento e ajuda, mesmo que em momentos de correria deu tudo certo no final.

Ao Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas e Dr. Raoni Pais Filho pela disponibilidade de participarem da banca examinadora e pelos momentos de ajuda de laboratório, seja durante o projeto quanto na graduação.

A todos do Laboratório de Genética e Biotecnologia – GBio e do Laboratório de Cultura de Células Animais – LACCA pelos ensinamentos e auxílios sempre quando solicitado.

Aos meus colegas de estágio do Laboratório de Diagnóstico e Análise Molecular – LDAM, principalmente Vitória, Matheus e Maria pelas horas de desabafos, compreensão e dicas ao longo deste semestre.

Às minhas amigas Ana Júlia, Thatyla, Giovana e Luísa, que fazem parte da minha vida há anos e que mesmo distantes fazem questão de estar juntas a mim, sempre me apoiando e vibrando pelas minhas conquistas.

À todos meus amigos que fiz ao longo desses 5 anos, que em algum momento sempre estiveram comigo, me ajudando de alguma forma. Sou grata pelos momentos bons, risadas, conversas e também pelas discussões, os quais me fizeram evoluir para ser o que sou hoje. Lembrarei de todos sempre. Em especial gostaria de agradecer a Beatriz, Luís, Eric e Vinicius

que em pouco tempo presente em minha rotina me ajudaram em momentos indecisos e ansiosos, iluminando sempre qual o caminho a seguir e fazendo com que eu me sentisse mais segura, independente da escolha, pois teria sempre o apoio deles, para o que quer que fosse.

Enfim, agradeço a todos aqueles que não foram citados aqui mas que me ajudaram de forma direta ou indireta para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

O Câncer de Mama (CaM) é o tumor maligno mais comumente diagnosticado em mulheres por todo o mundo, sendo uma das principais causas de morte por câncer entre elas. Os tumores mamários, além de classificados histologicamente, também são caracterizados molecularmente de acordo com a expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e do Receptor 2 do Fator de crescimento epidérmico humano (HER2). O CaM Triplo Negativo (CMTN) não expressa nenhum dos três marcadores, é o mais agressivo e o de pior prognóstico devido à sua heterogeneidade e limitações terapêuticas. A quimioterapia permanece amplamente utilizada, mas pouco seletiva e responsável por efeitos colaterais debilitantes. Nesse contexto, a busca por novos compostos é imperativa e produtos naturais têm se mostrado promissores frente ao seu potencial farmacológico e reduzida toxicidade a células normais. O presente estudo objetivou avaliar a citotoxicidade do extrato hidrometanólico da espécie vegetal *Kalanchoe brasiliensis* e do extrato metanólico de *Achyrocline satureioides* em diferentes linhagens celulares de CaM (T47D e MCF-7 – luminal; MDA-MB453 – HER2+; MDA-MB157 e MDA-MB231 – TN) por meio do ensaio de MTT. A linhagem MCF-10A (não tumorigênica) foi utilizada como controle. Para *K. brasiliensis*, a linhagem MDA-MB231 teve sua viabilidade reduzida em mais de 50% após 24 e 48 horas, com $IC_{50} = 218,00 \mu\text{g/mL}$ e $IC_{50} = 311,00 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Contudo, o extrato foi seletivo apenas quando esta linhagem foi tratada por 48 horas. Para *A. satureioides*, a linhagem não-tumorigênica se mostrou mais sensível, sendo significativamente citotóxico já nas concentrações iniciais. Para as linhagens tumorais, o extrato foi mais seletivo para a MCF-7 após 48 horas, com $IS = 1,91$. Portanto, as células de CaM apresentaram um comportamento distinto para os dois extratos vegetais, sendo *K. brasiliensis* promissor para uma das linhagens TNs. Contudo, são necessários estudos adicionais para compreender os mecanismos de ação dos compostos presentes nesse extrato hidrometanólico em inibir a progressão do CaMTN.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Ensaio MTT. Citotoxicidade. Produtos Naturais.

ABSTRACT

*Breast Cancer (BC) is the most commonly diagnosed malignant tumor in women worldwide, being one of the main causes of cancer death among them. Breast tumors, in addition to being classified histologically, are also characterized molecularly according to the expression of hormone receptors (estrogen and progesterone) and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2). Triple Negative BC (TNBC) does not express any of the three markers, it is the most aggressive and has the worst prognosis due to its heterogeneity and therapeutic limitations. Chemotherapy remains widely used, but not very selective and responsible for debilitating side effects. In this context, the search for new compounds is imperative and natural products have shown promise in view of their pharmacological potential and reduced toxicity to normal cells. The present study aimed to evaluate the cytotoxicity of the hydromethanolic extract of the plant species *Kalanchoe brasiliensis* and of the methanolic extract of *Achyrocline satureioides* in different cell lines of BC (T47D and MCF-7 – luminal; MDA-MB453 – HER2+; MDA-MB157 and MDA-MB231 – TN) by means of the MTT assay. The MCF-10A strain (non-tumorigenic) was used as a control. For *K. brasiliensis*, the MDA-MB231 strain had its viability reduced by more than 50% after 24 and 48 hours, with $IC_{50} = 218.00$ and $IC_{50} = 311.00\mu g/mL$, respectively. However, the extract was selective only when this strain was treated for 48 hours. For *A. satureioides*, the non-tumorigenic strain was more sensitive, being significantly cytotoxic at initial concentrations. For tumor cell lines, the extract was more selective for MCF-7 after 48 hours, with $IS = 1.91$. Therefore, the BC cells showed a different behavior for the two plant extracts, with *K. brasiliensis* being promising for one of the TNs strains. However, further studies are needed to understand the mechanisms of action of the compounds present in this hydromethanolic extract to inhibit the progression of TNBC.*

Keywords: *Plant extracts. MTT assay. Cytotoxicity. Natural Products.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 O MQ: 3-O-metilquercetina
ACB: Aquirrobichalcona
AP-1: Ativador de proteína-1
AR: Androgénio
BRCA1: *Gene DNA repair associated 1*
BRCA2: *Gene DNA repair associated 2*
CaM: Câncer de Mama
CK: Citoqueratinas
CMTN: Câncer de Mama Triplo Negativo
CTLA-4: Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxica
DMEM/F-12: Meio de Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
ECM; Exame Clínico de Mama
EGF: Fator de Crescimento Epidérmico
SFB:Soro Fetal Bovino
HER2: Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
IARC: *International Agency for Research on Cancer*
IC50: Concentração de Inibitória de 50%
IDC: Carcinoma Ductal Invasivo
IM: Imunomodulador
INCA: Instituto Nacional do Cancer
LT: Luetolina
M: *Mesenchymal-like*
MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MRI: Ressonância Magnética de Imagem
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NFκB: Fator nuclear kappa B
OMS: Organização Mundial da Saúde
PARP: Poli (ADP Ribose) Polimerase
PI3K ou AKT: Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC: Proteína quinase C
RE: Receptor de estrógeno
RP: Receptor de progesterona
QT: Quercetina
RNM: Ressonância Nuclear Magnética
RPMI-1640: Meio produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park

SUMÁRIO

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
1.1 Aspectos gerais do câncer e dados epidemiológicos.....	10
1.2 Etiopatologia do Câncer de Mama.....	11
1.2.1 Do diagnóstico ao tratamento	13
1.3 Produtos naturais no tratamento sistêmico do CMTN	19
1.3.1 As espécies <i>Kalanchoe brasiliensis</i> e <i>Achyrocline satureoides</i>	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Obtenção do extrato e linhagens celulares.....	26
3.2 Avaliação de citotoxicidade.....	27
3.3 Análises estatísticas.....	27
4 RESULTADOS	28
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Aspectos gerais do câncer e dados epidemiológicos

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que se caracterizam pela proliferação desordenada de células. Quando malignos, os tumores são capazes de invadir e de se instalarem em tecidos e órgãos, processo este conhecido como metástase. Já os benignos possuem crescimento organizado e com limites definidos (INCA, 2008). A carcinogênese é, em geral, lenta, sendo necessários vários anos para sua identificação clínica. A ativação de oncogenes e/ou a inibição de genes supressores tumorais também são cruciais no processo maligno, sendo causadas por mutações, rearranjos cromossômicos ou amplificação gênica. Os oncogenes são responsáveis por codificarem proteínas que promovem a progressão tumoral, incluindo os fatores de crescimento e seus receptores, proteínas transdutoras de sinais e proteínas regulatórias (MARQUES et al., 2015). Supressores de tumores, por sua vez, auxiliam no controle do ciclo celular e na manutenção da estabilidade gênica, induzindo à morte programada de células transformadas. O *P53*, por exemplo, é o gene supressor de tumor mais amplamente estudado e alterações em sua sequência são encontradas em, aproximadamente, 70% dos cânceres de cólon, em 30 a 50% dos cânceres de mama e em 50% dos cânceres de pulmão (RIVOIRE, 2006; ALBERTS et al., 2011; MARQUES et al., 2015).

Os tecidos comprometidos determinam a nomenclatura dos diferentes tumores: carcinomas acometem tecidos epiteliais que revestem os órgãos internos; sarcomas se iniciam nos ossos, cartilagem, gordura, músculo, vasos sanguíneos ou outro tecido conjuntivo; leucemias são diagnosticadas no sangue/medula óssea; linfomas e mielomas atingem células do sistema imunológico; e cânceres do sistema nervoso central são identificados no cérebro e medula espinhal (ONCOGUIA, 2017a). A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê, no mundo, cerca de 21,4 milhões de casos para o ano de 2030, com 13,2 milhões de mortes (INCA, 2018a). Diante de sua relevância epidemiológica, o câncer é um problema de saúde pública com sérias consequências sociais e econômicas.

De acordo com a projeção do Observatório Global de Câncer do IARC (GCO), 998 mil brasileiros devem ser diagnosticados com câncer em 2040, um salto de 78% quando comparados aos 600 mil novos casos contabilizados em 2018. Nesse mesmo cenário, o número de mortes deve aumentar em 95%, chegando a 476 mil óbitos pela doença no mesmo período (IARC, 2018). Além disso, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimam-

se, no Brasil, 685 mil novos diagnósticos de câncer para ambos os sexos no triênio 2020-2022. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelo de mama e de próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Nos homens, os mais frequentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Já nas mulheres, também excluindo o câncer de pele não melanoma, o Câncer de Mama (CaM) (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurarão entre os principais (Tabela 1) (INCA, 2019a).

Tabela 1: Dados do Instituto Nacional do Câncer evidenciando a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 por sexo, excetuando o de pele não melanoma*

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

*Números arredondados para múltiplos de 10.
 FONTE: Adaptado de INCA, 2019a.

1.2 Etiopatologia do Câncer de Mama

O CaM é o tipo mais incidente entre as mulheres no mundo, sendo o responsável por 24,2% dos diagnósticos em 2018, com aproximadamente 3,2 milhões de casos novos. É a quinta

causa de morte por câncer em geral (626.679 óbitos) e a causa mais frequente de morte pela doença em mulheres. Dessa incidência anual, destaca-se a Ásia com o maior número de casos (43,6%), em seguida a Europa (25%) e América do Norte (12,6%) (IARC, 2018). Além do crescimento populacional, as taxas de incidência de CaM devem aumentar em países menos desenvolvidos, como o Brasil, devido à melhora da expectativa de vida, urbanização e mudanças no estilo de vida.

No Brasil, a taxa de mortalidade por CaM, ajustada pela população mundial, apresenta uma curva ascendente, representando a primeira causa de morte por câncer na população feminina, com 13,84 óbitos/100.000 mulheres em 2018. As regiões Sudeste e Sul são as que apresentam as maiores taxas, com 14,76 e 14,64 óbitos/100.000 mulheres em 2018, respectivamente (INCA, 2018b).

Diferentes fatores de risco são associados à ocorrência do CaM, o que dificulta uma análise pontual acerca da contribuição de cada um no desenvolvimento da doença. A idade é o mais bem estabelecido. Segundo THUN e JEMAL (2006) cerca de 80% de todos os casos ocorrem em mulheres com mais de 50 anos. A probabilidade de, em 10 anos, a mulher desenvolver CaM invasivo aumenta de 1,5% aos 40 anos a cerca de 3% aos 50 anos, e mais de 4% aos 70 anos. Esses índices decorrem do comprometimento do sistema de reparo a danos genéticos, ampliando o número de mutações em genes-chaves, o que favorece o aparecimento de lesões (*BREAST CANCER*, 2020b). Além disso, o histórico familiar e a predisposição genética também se destacam, apesar de serem associados a apenas 5-10% dos casos. Mutações germinativas nos genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* (*gene DNA repair associated*) são responsáveis por parcela importante dos diagnósticos de CaM hereditários. Estes também se relacionam ao câncer de ovário e de próstata (APOSTOLOU e FOSTIRA, 2013; LEVY-LAHAD e FRIEDMAN, 2007).

A história reprodutiva da mulher também influencia na ocorrência do CaM, uma vez que se refere diretamente ao estímulo estrogênico. Menopausa tardia (após os 55 anos), primeira gravidez com idade avançada (após 30 anos), menarca precoce (inferior a 12 anos), terapias para reposição hormonal e o uso de anticoncepcionais orais têm sido considerados como fatores de risco (INCA, 2019b). Tumores esporádicos contabilizam 90% dos casos e aspectos comportamentais/ambientais como estilo de vida, ingestão de bebida alcoólica, sobrepeso e obesidade na pós-menopausa e exposição a carcinógenos (químicos, físicos e biológicos) são preponderantes para o surgimento da doença (INCA, 2019b; BOYLE et al., 2003).

Nesse contexto, a prevenção do CaM é desafiadora diante de sua complexidade e dos múltiplos fatores relacionados. Contudo, algumas medidas são importantes e passíveis de serem

adotadas. A prevenção primária se baseia, justamente, no controle dos fatores de risco modificáveis, priorizando hábitos saudáveis. O aleitamento também é um comportamento protetor (INCA, 2018c). A prevenção secundária tem por finalidade alterar o curso da doença com o rastreio e diagnóstico precoce, viabilizando um tratamento oportuno e mais eficaz (SIQUEIRA et al., 2009). Por último, a prevenção terciária objetiva reabilitar os doentes com patologias instaladas recuperando e mantendo o equilíbrio funcional (OLIVEIRA e REIS, 2013).

Estima-se que, por meio dessas medidas, seja possível reduzir em até 28% o risco de desenvolvimento de CaM, além de minimizar os impactos da doença com cuidados especializados que priorizam a qualidade de vida do paciente (INCA, 2009; BRITO et al., 2012). No entanto, os desafios permanecem na busca de biomarcadores e de medicamentos seguros e eficazes. Nesse contexto, o estudo aprofundado da biologia do CaM impacta positivamente no bem-estar das pacientes.

1.2.1 Do diagnóstico ao tratamento

O CaM não possui sintomas ou sinais definidos, podendo ser relatados: inchaço total ou parcial da mama (mesmo que não seja sentido nódulo), irritação, vermelhidão ou alterações da pele que recobre o órgão (abaulamentos ou retrações), saída de secreção pelo mamilo e presença de caroço nas axilas (WHO, 2020a). As lesões são, em geral, indolores, fixas e apresentando bordas irregulares, com aspecto espiculado (LIPPMAN, 2005).

O diagnóstico precoce é imprescindível para a cura e, portanto, é priorizado em políticas públicas brasileiras. Em países de baixa e média rendas, o diagnóstico ocorre, em geral, em estágios mais avançados da doença, aumentando a morbidade relacionada ao tratamento, comprometendo a qualidade de vida e reduzindo a sobrevivência das pacientes. Recomenda-se o rastreamento por meio do exame clínico da mama (ECM) e a mamografia (INCA, 2004). O ECM deve ser realizado em todas as mulheres que procuram o serviço de saúde, independente da faixa etária, sendo o mais indicado a partir dos 40 anos e repetido anualmente (INCA, 2018d). Para as mulheres pertencentes a grupos populacionais considerados de risco elevado, como as com história familiar de CaM em parentes de primeiro grau, sugere-se o ECM a partir de 35 anos (INCA, 2004). Quanto à mamografia, a Sociedade Brasileira de Mastologia recomenda anualmente dos 40 aos 49 anos e bianualmente a partir dos 50 anos. Este exame tem por finalidade detectar precocemente anormalidades no tecido mamário imperceptíveis no ECM. Ademais, são geradas imagens detalhadas com alta resolução espacial da estrutura

interna do órgão aumentando sua acurácia (GEBRIM e QUADROS, 2006). Segundo dados do Sistema de Informação Ambulatorial do SUS (SIA/SUS) foram realizadas 4.609.094 mamografias em 2018. Os números indicam um aumento de 19% entre 2012 e 2017 para a faixa etária de 50 a 69 anos (INCA, 2019c). A correlação entre o ECM e a mamografia eleva a acuidade diagnóstica, o que corrobora a importância de ambos na rotina clínica (MOLINA et al., 2003).

É importante ressaltar que toda alteração suspeita de câncer nas mamas, identificada em uma mamografia de rotina ou pelo médico durante um exame clínico, necessita ser investigada quanto à malignidade. A ultrassonografia, Ressonância Magnética de Imagem (MRI) e biópsia são procedimentos utilizados no diagnóstico do CaM (ONCOGUIA, 2017b). O ultrassom permite analisar mudanças não detectadas na mamografia, particularmente em mulheres com mamas densas. Além disso, também pode ser utilizado para examinar regiões suspeitas e, ainda, para distinguir cistos com líquido de massas sólidas (*AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2019a). Este é um método não invasivo no qual ondas sonoras de alta frequência proporcionam imagens da estrutura interna da mama. A ressonância nuclear magnética (RNM) é recomendada em populações de alto risco, como pacientes com histórico familiar ou predisposição genética, em pacientes reincidentes ou em mulheres em tratamento (SÍRIO LIBANES, 2019). Nestas, o exame determina, com maior precisão, o tamanho do tumor e a existência, ou não, de outros focos malignos no órgão (*AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2019b).

No entanto, para confirmação diagnóstica é necessário que seja realizada uma biópsia. Tal técnica consiste na retirada de pequenas amostras de células, tecido mamário ou um nódulo suspeito por meio de punções (extração por agulha) ou através de uma pequena cirurgia. Em seguida, o material retirado é analisado pelo patologista para a definição do diagnóstico (*NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 2019; WHO, 2020b). O procedimento é minimamente invasivo e permite a avaliação histopatológica e imuno-histoquímica do tumor, possibilitando a programação do tratamento, sendo realizada tanto em lesões palpáveis quanto impalpáveis (INCA, 2019d).

Após o diagnóstico, os tumores mamários são classificados e estadiados. São lesões heterogêneas que diferem quanto à agressividade e resposta terapêutica. Histologicamente, são definidos, em geral, como invasivos ou *in situ* acometendo lóbulos e/ou ductos (*BREAST CANCER SOCIETY OF CANADA*, 2015). A lesão se torna invasiva ao romper a membrana basal, atingindo o tecido adjacente e passível de alcançar os sistemas linfático e sanguíneo. O mais comumente diagnosticado é o Carcinoma Ductal Invasivo (IDC), representando de 65 a 85% dos casos (*AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2019c).

O CaM também é categorizado molecularmente conforme a expressão de receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona) e do Receptor 2 do Fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Ademais, também é avaliada a proliferação celular dos subtipos a partir da expressão do marcador ki67, uma proteína expressa em diferentes níveis durante as fases de divisão celular. Contudo, ainda nenhum valor de corte foi claramente definido para o alto índice ki67 (DOWSETT, 2011; MIROSLAVA, 2016). Nesse contexto, são definidos quatro subtipos principais: Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido e Triplo Negativo, conforme padrão molecular apresentado na Tabela 2 (BARRETO-NETO et al., 2014).

Tabela 2. Critérios de classificação dos subtipos moleculares de Câncer de Mama.

Subtipo	Padrão Molecular
Luminal A	RE (+) e/ou RP (+); HER2 (-); ki67 < 14%
Luminal B*	RE (+/-) e/ou RP (+); HER2 (+/-) e/ou ki67 > 14%
HER2+	RE (-) RP (-); HER2 (+)
Triplo- Negativo	RE (-) RP (-); HER2 (-)

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER-2: Receptor 2 do Fator de crescimento epidérmico humano.

*ao menos um receptor hormonal positivo

FONTE: Adaptado de BARRETO-NETO et al., 2014

Os tumores luminais são os mais frequentes, representando 45 a 60% dos tumores de mama, com melhor prognóstico (CARMO et al., 2016). São bem diferenciados e subdivididos em Luminal A e B. Histologicamente, os Luminais B são menos diferenciados que os A, com maior índice proliferativo (avaliado pelo marcador ki67) e, conseqüentemente, com pior resposta à terapia (RAZZAGHI et al., 2013).

O terceiro subtipo HER2+ possui apenas este marcador superexpresso, sendo negativo para os receptores hormonais. São tumores com pior prognóstico, com maior índice de proliferação celular, angiogênese, invasão tumoral, alto grau nuclear e maior probabilidade de acometimento multifocal e multicêntrico. Contudo, respondem a terapia alvo com anticorpo anti-Her2 (CINTRA et al., 2012; MORROW, 2013).

O CaM triplo negativo (CMTN) não expressa nenhum dos marcadores adotados na classificação molecular. Histologicamente, aproximadamente 80-90% dos CMTN são carcinomas ductais invasivos (SORLIE et al., 2003; YUAN et al., 2014). Esses tumores apresentam fenótipo mais agressivo e de pior prognóstico, quando comparados aos outros subtipos, com elevado índice de metástases, recidiva precoce, sobrevida inferior e com limitadas opções terapêuticas capazes de abranger toda a sua heterogeneidade (YAO et al.,

2016). Apresentam alto grau nuclear e histológico e, das mulheres que apresentam mutação no gene *BRCA1*, mais de 75% são portadoras de CMTN (GLUZ et al., 2009; LIVASY et al., 2006; RAKHA et al., 2008).

Atualmente, conforme seu perfil de expressão gênica, Lehmann et al. (2011) descreveram seis subtipos de carcinomas TN: basal 1, basal 2, imunomodulador (IM), *mesenchymal-like* (M), de células-tronco mesenquimais (MLS) e luminal androgênico (LAR). Segundo SORLIE et al. (2001), os tumores basais expressam o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e citoqueratinas (CK) de alto peso molecular como as CKs 5/6, 14 e 17 (NIELSEN et al., 2004). Além disso, estudos indicam que pacientes com tumores desse subtipo apresentam menor sobrevida livre de doença. Importante salientar que de 65 a 85% dos TN são do tipo basal, portanto, há tumores basais que não são TN (REIS-FILHO et al., 2008; SORLIE et al., 2003). O subtipo IM superexpressa genes envolvidos na sinalização de células imunes e os subtipos M e MLS exibem uma expressão gênica aumentada para eventos de transição epitélio-mesenquimal, motilidade celular e invasão. Por fim, o subtipo LAR apresenta elevados níveis de receptor de androgênio (AR), com sensibilidade para antagonistas do AR e padrão genético de expressão luminal (LEHMANN e PIETENPOL, 2015; SARAIVA et al., 2017).

O prognóstico do CaM também depende da mobilidade das células malignas, uma vez que diferentes estágios compõem o desenvolvimento neoplásico, expressos em uma escala de 0 a IV. No 0 as células cancerígenas estão limitadas aos ductos ou lóbulos do tecido mamário. No I, II e III, as células transformadas rompem ou invadem o tecido mamário normal circundante e, no IV, o tumor, de qualquer tamanho, atinge órgãos distantes como pulmões, pele, ossos, fígado ou cérebro (*BREAST CANCER*, 2020a). Nesse contexto, o sistema adotado para tal é o TNM, o qual considera para a classificação o tamanho do tumor primário (T), as características dos linfonodos axilares (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, N0 a N3 e M0 a M1, respectivamente. Além disso, as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, distribuídas nos estádios I a IV (INCA, 2004). Adicionalmente, também é avaliado o status RE, RP e HER2 das células malignas e seu grau de diferenciação histológica para o agrupamento do estágio e definição do tratamento (*AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2021).

O grau histológico, estabelecido pelo índice de Nottingham e Kalmar, também é observado e considerado um fator prognóstico relevante. Este reflete o potencial de malignidade do tumor, indicando a sua maior ou menor capacidade de metastatização por meio da avaliação do índice de formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica (BARROS e

BUZAID, 2007; GALEA et al., 1992; SUNDQUIST et al., 1999). Dessa forma, a graduação é expressa em 3 categorias de diferenciação que varia de G1 a G3, sendo o G1 bem diferenciado (baixo grau), G2 moderadamente diferenciado (grau intermediário) e G3 pouco diferenciado (alto grau). Assim, quanto menos diferenciado o tumor, pior será o prognóstico, sendo que a maior sobrevida é encontrada nos pacientes em graus I e II (BATSCHAUER, 2009; DIANA et al., 2004; GUERRA et al., 2009; SCHNEIDER e D'ORSI, 2009).

Finalmente, o tratamento do CaM envolve múltiplas abordagens. São realizadas, de formas isoladas ou combinadas a cirurgia, radioterapia, hormonioterapia, terapia alvo, imunoterapia e quimioterapia (MEISNER et al., 2008). Para a escolha terapêutica, são considerados as características do tumor, estadiamento, idade da paciente, comprometimento linfonodal e presença de comorbidades (ONCOGUIA, 2020).

A terapia local visa tratar a lesão sem afetar outros órgãos, por meio da cirurgia, para a remoção do tumor, e da radioterapia, com o direcionamento de feixes ionizantes às células tumorais (ONCOGUIA, 2020). Cirurgicamente podem ser realizadas a mastectomia, com a retirada de toda a mama e do tecido que recobre o músculo peitoral maior e a quadrantecmia, em que o segmento ou setor comprometido é excisado (CANCER RESEARCH UK, 2014). A radioterapia, conduzida antes ou após a cirurgia, é um método que utiliza energia ionizante capaz de erradicar ou impedir a proliferação de células malignas. Todavia, o tratamento ionizante não é seletivo e pode atingir células normais, com efeitos colaterais (SALAZAR et al., 2008).

Os tratamentos sistêmicos incluem a hormonioterapia, terapia alvo, imunoterapia e quimioterapia, indicadas tanto como complemento aos métodos anteriores, quanto para tratamento paliativo ou neoadjuvante (antes da cirurgia) (INSTITUTO VENCER O CANCER, 2018). A terapia hormonal é frequentemente usada após a cirurgia, como tratamento adjuvante, para ajudar a reduzir o risco de recidiva do CaM, e como terapia neoadjuvante, aumentando a eficácia terapêutica. Estudos evidenciam que o uso da hormonioterapia no estágio inicial do CaM pode reduzir em 15 anos a recorrência e mortalidade pela doença, sendo recomendada como uma medida preventiva em 75-80% dos casos da doença (BURSTEIN et al., 2010; MURPHY et al., 2012). É indicada para pacientes positivas para RE, pois objetiva diminuir os níveis de estrogênio ou impedir que este se ligue a seus receptores, inibindo, assim, seu estímulo proliferativo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019d). Os principais hormonioterápicos utilizados no tratamento do CaM são os moduladores seletivos de receptor de estrogênio (como o Tamoxifeno®) e os inibidores de aromatase [Letrozol (Femara®), Anastrozol (Arimidex®), Exemestano (Aromasin®)] (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA, 2011).

A terapia alvo é um tratamento direcionado a alvos moleculares específicos, como fatores de crescimento, moléculas de sinalização, proteínas do ciclo celular, moduladores de apoptose ou moléculas que promovem a angiogênese (CHABNER E ROBERTS JR, 2005). O estudo dos mecanismos moleculares é, portanto, crucial na otimização da ação desses medicamentos. O Trastuzumabe, um anticorpo monoclonal humanizado anti- HER2, foi a primeira droga a ser empregada com êxito na terapia-alvo, resultando em um aumento da sobrevida das pacientes que superexpressam esse oncogene (DE BROT, 2009). Ademais, também já foram aprovados para o tratamento do CaM, ou estão em estudo clínico avançado, outros inibidores de HER como Afatinibe, Lapatinibe, Neratinibe, Pertuzumabe, TDMA-1 (ESTEVA et al.,2010).

Inibidores de Poli ADP Ribose Polimerase (PARP) também se encontram nesse grupo. Essas polimerases, com destaque à PARP 1, encontram-se envolvidas no reparo da dupla hélice do DNA. É sabido que, durante o ciclo celular, os filamentos dos ácidos nucleicos sofrem várias rupturas e agressões, promovendo alterações que, se persistirem, conduzem à formação de tumores. Contudo, quando exacerbadas, essas mutações acabam por ativar a morte celular programada. Portanto, o objetivo é promover o excesso de erros com inibidores de PARP para que células transformadas morram por apoptose. Exemplos de fármacos que atuam nessa via são Olaparibe, Rucaparibe e Niraparibe sendo indicados para pacientes com CMTN mutadas para *BRCAl*, uma vez que mutações nesse supressor de tumor colaboram com o acúmulo de erros genômicos, favorecendo também a morte de células tumorais (GONÇALVES JUNIOR, 2018).

A descoberta e compreensão da interação entre o tumor, seu microambiente e o sistema imunológico permitiu o uso da imunoterapia no tratamento do CaM (CRISCITIELLO et al., 2015). De acordo com Bayer et al. (2016) o sistema imunológico tem a capacidade de reconhecer células tumorais e eliminá-las precocemente. No entanto, essas células podem evadir ao sistema de defesa e modulá-lo para imunossupressor. Nesse cenário, a imunoterapia atua estimulando a resposta antitumoral por meio de medicamentos que bloqueiam as moléculas expressas pelas células tumorais que impedem sua eliminação, permitindo, assim, que o sistema imunológico da paciente seja ativado (BORGHAEI, 2009). Linfócitos T exercem um papel crucial nesse mecanismo de defesa e sua ativação pode ser inibida pela proteína 4 associada ao linfócito T citotóxica (CTLA-4) e pela proteína programada para morte celular (PD-1) e seus ligantes PD-L1 e PD-L2. Essas são expressas em tecidos periféricos e nos tecidos tumorais malignos. Em geral, os imunoterápicos restauram a ativação das células T por meio do emprego da ciclofosfamida, que bloqueia a CTLA-4, do atezolizumabe e nab-paclitaxel, que bloqueiam

a interação do receptor PD-1 com seus ligantes PD-L1 e PD-L2, e da capecitabina e carboplatina, que interferem na função do DNA (LEONARDI et al., 2018; WHO, 2019).

Por último a quimioterapia adjuvante, neoadjuvante ou paliativa consiste na utilização de compostos químicos denominados quimioterápicos, os quais são administrados de forma isolada ou em combinação via intravenosa ou oral. Esses medicamentos interferem no processo de crescimento e divisão celulares, sem especificidade, não destruindo seletiva ou exclusivamente as células tumorais. Por conseguinte, efeitos colaterais são relatados como toxicidade hematológica, gastrintestinal, hepatotoxicidade, leucopenia, trombocitopenia, anemia, toxicidade pulmonar, neurotoxicidade, disfunção reprodutiva, toxicidade vesical e renal, alterações metabólicas, toxicidade dermatológica, reações alérgicas, anafilaxia (BONASSA, 1992; WOODLOCK e LOUGHNER, 1995; INCA 1995; BRENDER, 1997). Para tumores TNs é a mais amplamente utilizada (CAREY et al., 2007; ZHANG et al., 2015) e drogas efetivas ainda são necessárias para melhorar a sobrevida dessas pacientes. Nesse cenário, compostos de fontes naturais são promissores, uma vez que apresentam diferentes mecanismos de ação e reduzida toxicidade, permitindo formulações e combinações medicamentosas inéditas.

1.3 Produtos naturais no tratamento sistêmico do CMTN

O CMTN representa cerca de 15 a 20% de todos os CaMs (ANDERS et al., 2008). Possui um curso clínico altamente agressivo, incluindo uma alta incidência de metástases viscerais e nervosas com mutações mais frequentes nos genes *BRAC1* (WILLIAM D et al., 2003). É um tumor de difícil tratamento devido a sua heterogeneidade inter e intra-tumoral. Entretanto, em razão de seu curso agressivo, é altamente sensível aos medicamentos citotóxicos e, por esse motivo, a busca por novos fármacos se mostra relevante (PERALES et al., 2016). Várias classes de drogas, como inibidores de VEGF e de tirosina quinase têm sido empregadas, no entanto, com resultados ainda preocupantes devido a falha no progresso para os estudos de fase II ou falha em replicar os resultados de fase I / II em grandes estudos clínicos de fase III (SHINDIKAR et al., 2016).

Alternativamente, entre 1984 e 2014, produtos derivados de plantas foram aprovados para o tratamento de diversas doenças, como malária, neuralgia pós-herpética, gota, dor neuropática crônica, demência associada à doença de Alzheimer e câncer (ATANASOV et al., 2015). Segundo COSTA-LOTUFO et al. (2010), cerca de 60% dos fármacos antitumorais descobertos no século XX são de origem natural. Derivados de alcalóides da Vinca como

Vincristina, Vinblastina, Vinorelbina, Vindesina e Vinflunina são drogas que inibem a dinâmica dos microtúbulos pela ligação à β -tubulina. Taxanos como o Paclitaxel e Docetaxel também são reguladores de microtúbulos e inibem as transições de fase do ciclo celular da metáfase para a anáfase, reduzindo a replicação das células cancerígenas (JORDAN et al., 2004; KHAZIR et al., 2014).

Diferentes medicamentos encontrados no mercado são derivados direta ou indiretamente de vegetais, micro-organismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres (CHIN et al., 2006). As plantas são consideradas fontes nobres de substâncias para o tratamento do câncer, sendo eficazes, seguras e com estruturas passíveis de modificações (BRANDAO et al., 2010). Além disso, apresentam atividades antioxidante, de inibição do crescimento, de indução de apoptose, e de controle da invasão e formação de metástases (GUPTA et al., 2014; CAO et al., 2013). Sendo assim, estudos científicos voltados para essa área vêm crescendo substancialmente, sendo que recentemente foi aprovado, após anos de testes clínicos, o uso medicamentoso do Tasetaxel e Larotaxel entre outros estudos presentes no banco de dados *Clinical Trials* (CLINICAL TRIAL REGISTRATION, 2016, 2021)

Contudo, estima-se que apenas 15% das 350.000 espécies de plantas existentes já tiveram seus constituintes químicos investigados, o que evidencia um conhecimento incipiente acerca de seu potencial farmacológico (WURTZEL e KUTCHAN, 2016). Dessa forma, com o intuito de incentivar a exploração dessas propriedades naturais, a OMS passou a reconhecer, desde 2002, que as plantas usadas na medicina tradicional são importantes recursos terapêuticos e precisam ser sistematicamente estudadas (OMS, 2002). Portanto, é sabida a necessidade de se desenvolver agentes terapêuticos eficazes para retardar, reduzir ou reverter a incidência de CaM em mulheres de alto risco. Além disso, a quimioprevenção por produtos naturais é vantajosa, pois apresentam poucos efeitos colaterais e baixa toxicidade em comparação aos compostos sintéticos (KO e MOON, 2015).

A riqueza do potencial terapêutico de uma planta se deve a presença da alta variedade de fitoquímicos ativos, como carotenóides, flavonóides, polifenólicos, terpenóides, sulfetos, ligninas e esteróis vegetais (MUNAZZA et al, 2016). LIAO et al. (2013) relataram que compostos fitoterápicos podem ser utilizados como adjuvantes da quimioterapia convencional ou até mesmo em sistemas de tratamento isolados. A curcumina (diferuloimetano) e o resveratrol (trans-3,4',5-tri-hidroxi-estilbeno) são exemplos de fitoterápicos que atuam efetivamente no tratamento do CMTN. A curcumina é obtida do rizoma de açafrão (*Curcuma longa* Linn), muito utilizada como medicamento tradicional na Índia, com propriedades antitumorais, antiangiogênicas, antioxidantes e anti-inflamatórias já demonstradas

em estudos *in vitro* e *in vivo* (CHAINANI-WU, 2003; SHANMUGAM et al., 2015). Já o resveratrol, componente comum de frutas, em particular uvas, é uma substância classificada como fitoalexina polifenólica não-flavonóide, com propriedades quimiopreventivas (HSIEH e WU, 2010; SINHA et al., 2016).

Dentre outros exemplos de fitoterápicos destacam-se:

- a espécie *Angelica Sinensis* (danggui) de cujas raízes é extraído o composto ativo N-butilidenoftalida capaz de radiosensibilizar células malignas (SU et al., 2018);

- a espécie *Berberis amurensis* (xiaoboan) a partir da qual se extrai a Berbamina capaz de inibir o crescimento, a migração e a invasão de células tumorais metastáticas, bem como induzir a apoptose (WANG et al., 2009);

- a espécie *Tabebuia avellandae*, cujos principais compostos ativos com ações antineoplásicas são lapachol (naftoquinona) e β -lapachona (quinona), ambos extraídos de sua casca interna (SOUSA et al., 2009; NETO et al., 2012; TELANG et AL., 2015);

- a espécie *Cornus officinalis* que apresenta antocianinas como seus principais compostos bioativos (TELANG et al., 2019);

- a espécie *Uncaria tomentosa* (UT) (Willd.) DC (unha de gato) e seus extratos aquosos com ações pro-apoptóticas e de inibição da proliferação de células tumorais mamárias, principalmente do subtipo TN (LAUS et al., 1997), todas com experimentos descritos no CMTN.

Diante da importância econômica e social das plantas medicinais na obtenção de fitofármacos e fitoterápicos, o Brasil é um país com imenso potencial inovador na área de produtos naturais, uma vez que possui uma abundante biodiversidade. Do ponto de vista mundial, aproximadamente 22% de todas as plantas e microrganismos conhecidos são encontrados em território nacional. Ademais, cerca de 25.000 espécies de plantas ainda não foram estudadas, demonstrando o potencial obsoleto da magnitude da biodiversidade brasileira (CALIXTO, 2005). Portanto, essa situação estabeleceu um cenário interessante para o desenvolvimento de pesquisas que visam à descoberta de novos fármacos a partir de espécies vegetais nativas.

1.3.1 As espécies *Kalanchoe brasiliensis* e *Achyrocline satureoides*

Segundo pesquisas de AMARAL et al. (2005), a espécie *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) é uma planta nativa do Brasil, conhecida no nordeste brasileiro como saião, coirama-branca, folha grossa, folha da sorte e folha da costa, muito utilizada popularmente no

tratamento local de furúnculos (AMABEOKU et al., 2007), tosse (ANISIMOV et al., 2009), anexite (LORENZI e MATOS, 2008), gastrite (CRUZ et al., 2011) e tumores (SILVA et al., 2007; MACHADO et al., 2008). Dentre os ensaios *in vitro* realizados com a espécie, já foram descritas suas atividades, anti-histamínica (ALMEIDA et al., 1997), antitireóide (FERREIRA et al., 2000), antiviral (SCHIAVO, 2005), anticolinesterásica (TREVISAN et al., 2006), antimicrobiana (SILVA et al., 2009) e anti- inflamatória (IBRAHIM et al, 2002).

K. brasiliensis apresenta características botânicas de um vegetal sublenhoso e perene, com altura podendo variar de 30 cm a 1 m. A planta é pouco ramificada com folhas suculentas, ovais ou obovadas, opostas, curtamente pecioladas e crenadas, conforme mostrado na Figura 1 (LORENZI e MATOS, 2008; AMARAL et al., 2005). Apresenta flores hermafroditas, gamopétalas com corola amarelo-laranja mais comprida que o cálice, com carpelos escamosos que se tornam folículos polispermos e cálice intumescido e glabro. O fruto é um folículo de 6 cm que possui semente com endosperma (BARROSO, 1991). As partes da espécie mais utilizadas popularmente são as folhas, sumos das folhas e o caule (AMARAL et al., 2005).

Figura 1. Folhas de *Kalanchoe brasiliensis*.



Fonte: SILVA, 2007.

Uma pesquisa fitoquímica prévia para o gênero *Kalanchoe* indicou a presença de taninos condensados (proantocianidinas) (STEVENS et al., 1995), lecitinas (ADENIKE e ERETAN, 2004), bufadienolídeos (glicosídeos cardiotônicos), esteróides, compostos fenólicos, saponinas, mucilagem e flavonóides (COSTA et al., 1994; NGUELEFACK et al., 2004). Com relação à espécie *K. brasiliensis* foi descrita a presença de diversas classes de substâncias químicas, tais como os bufadienolídeos, terpenóides e flavonoides, principalmente os glicosilados da

patuletina e da quercetina, predominantes no extrato hidrometanólico (COSTA et al., 1994; ROSSI-BERGMANN et al., 1994). Tais substâncias apresentam diversas atividades farmacológicas, sendo a ação anti-neoplásica a que mais se destaca (GAO et al. 2011; BUER et al., 2010).

Ademais, além da espécie *K. brasiliensis*, pode-se incluir como promissor produto terapêutico a espécie *Achyrocline satureioides*, pertencente à família *Asteraceae*, conhecida popularmente como “marcela” ou “macela”, já estudada sob os mais diversos aspectos químico, tecnológico e farmacológico, sendo muitas de suas propriedades atribuídas aos constituintes fenólicos (SABINI et al., 2012).

Seu gênero *Achyrocline* inclui cerca de trinta espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, não só no Brasil como também nas Américas do Sul e Central e na África, incluindo Madagascar (BREMER et al., 1994). *A. satureioides*, nativa no sul do Brasil (LORENZI e MATOS, 2008), tem sido usada na medicina natural e popular a partir dos extratos de suas flores, folhas e caule, com ação anti-inflamatória (SOUZA et al., 2007), antiespasmódica, analgésica e sedativa (OLIVEIRA et al., 2001), antioxidante (DESMARCHELIER et al., 1998), antiviral (SABINI et al., 2012), antimicrobiana (CEZAROTTO et al., 2011), hepatoprotetora (KADARIAN et al., 2002), imunoestimulante (PUHLMANN et al., 1992) e anticancerígena (RIVERA et al., 2004; POGLIA et al., 2014). Ademais, estudos mostraram que o potencial de cito e genotoxicidade de extratos desta planta podem variar (SABINI et al., 2013).

A. satureioides é descrita como uma planta herbácea perene, ereta, muito ramificada de aproximadamente 1 m de altura. Caule, ramos e folhas cobertos por pelos esbranquiçados; folhas simples alternadas, inteiras, sésseis lineares lanceoladas com largura de até 1,5 cm e 10 a 15 cm de comprimento. Flores em número de 5 a 10, reunidas em inflorescência axilares e terminais do tipo capítulo, de coloração amarelo-dourado e odor característico. Apresenta fruto do tipo aquênio, glabro e pardo de aproximadamente 0,5 cm (Figura 2; BAKER, 1967; LORENZI e MATOS, 2008; CASTRO e CHEMALE, 1995). É uma planta invasora comum em terrenos baldios, pastos e campos agrícolas abandonados. As inflorescências secas são utilizadas na medicina caseira e também no enchimento de travesseiros almofadas e colchões pelo aroma suave e agradável (LORENZI, 2000).

Figura 2. *Achyrocline satureoides* (marcela) em seu habitat natural.



Fonte: FLORA DIGITAL UFRGS, 2010.

A análise fitoquímica da marcela mostra que essa espécie é rica em flavonoides (flavonas, luteolina (LT) e quercetina (QT)) e terpenos (mono e sesquiterpenos) (LORENZI e MATOS, 2008). Em sua composição química também é relatada a presença de monoterpênicos, compostos fenólicos não flavonóicos como o ácido cafeico e ácido clorogênico (SAITO et al., 2005), polissacarídeos e minerais (LAMATY et al.; 1991; PETROVICK et al., 1997).

Quanto às frações extratoras, a metanólica já demonstrou a presença dos flavonóides QT, LT e 3-O-metilquercetina (FERRARO et al., 1981; SIMÕES, 1984), sendo esses os constituintes responsáveis por suas atividades farmacológicas. Para QT e LT já foram relatadas atividades citotóxicas, anti-invasivas, antiangiogênicas e antiproliferativas frente a várias linhagens de células tumorais, atuando em múltiplos alvos moleculares (CARINI et al., 2014). Além disso, são capazes de reduzir a toxicidade de quimioterápicos tradicionais e superar a resistência dos tumores a estes tratamentos. Seus efeitos já foram avaliados em câncer de bexiga, cólon, fígado, estômago, mama, próstata, pulmão, melanoma, glioma e leucemia. Para mais, alguns estudos na literatura apontam para a grande potencialidade da 3-O-metilquercetina como agente citotóxico frente a linhagens tumorais humanas (mama, fígado, leucemia, cervical e ovário), sendo ativa em baixas concentrações (5-10 Mm) (CARINI et al., 2014; BRASIL, 2018).

A bichalcona aquirobichalcona (ACB), integrante da classe das chalconas, também foi identificada e desperta interesse científico devido à sua semelhança estrutural com outras bichalconas com propriedades anticancerígenas (MDEE et al., 2003), incluindo em linhagens celulares tumorais de mama (JANDIAL et al., 2017) em modelos murinos de CaM (ABU et al., 2015).

Os alvos moleculares dos flavonóides geralmente são proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), proteína quinase C (PKC), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K ou AKT), e vias da β -catenina, cujas atividades têm sido associadas com transformação maligna e promoção do tumor. Os flavonoides podem também interferir no fator nuclear kappa B (NF κ B) e ativador de proteína-1 (AP-1), induzindo parada do ciclo celular e apoptose (ANGELONI et al., 2015).

Em suma, a crescente prevalência de cânceres resistentes a fármacos demonstra a necessidade de se pesquisar por novos agentes terapêuticos. Este problema ainda é agravado pela resistência desenvolvida pela maioria dos pacientes aos medicamentos quimioterápicos disponíveis o que aumento o risco de ocorrência de metástases, reduzindo drasticamente as chances de sobrevivência dos indivíduos (NEWMAN e CRAGG, 2016). Produtos naturais são promissores sendo as espécies *A. satureioides* e *K. brasiliensis*, particularmente interessantes, diante de seu potencial em intervir em vias diretamente relacionadas à carcinogênese.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito citotóxico dos diferentes extratos oriundos das espécies vegetais *Kalanchoe brasiliensis* e *Achyrocline satureioides* nas linhagens tumorais mamárias T47D, MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-157 e MDA-MB-231.

2.2 Objetivos específicos

- Definir as concentrações citotóxicas dos extratos das espécies *K. brasiliensis* e *A. satureioides* em células tumorais mamárias e em linhagem controle não-tumorigênica;
- Avaliar a seletividade dos extratos a células tumorais mamárias;
- Definir os subtipos moleculares do CM responsivos aos extratos avaliados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato e linhagens celulares

O extrato hidrometanólico das folhas da *K. brasiliensis* e o extrato metanólico de *A. saturoioides*, ambos liofilizados e posteriormente diluídos em 8 concentrações diferentes, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), para o tratamento das linhagens celulares mamárias. Foram utilizadas quatro linhagens, sendo uma não tumorigênica mamária MCF-10A e as demais representativas de tumores luminais (T47D e MCF-7), tumores positivos para HER2 (MDA-MB453) e de CMTN (MDA-MB-157 e MDA-MB-231). Todas as células foram mantidas em cultivo a 37°C em incubadora úmida. Quanto aos meios de cultivo foram utilizados: (i) DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 500 ng/mL de hidrocortisona, 10 µg/mL de insulina e 50 µg/mL de gentamicina para a linhagem MCF-10A; (ii) RPMI suplementado somente com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina para as linhagens T47D e MCF-7; (iii) IMDM suplementado com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina para a linhagem MDA-MB-453 e MDA-MB-157 e (iv) L15 suplementado com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina para MDA-MB231 (tabela 3). À exceção da linhagem TN MDA-MB231, todas permaneceram em uma atmosfera de 5% de CO₂. Os meios foram trocados em dias alternados até que as células atingissem 80% de confluência para serem usadas nos experimentos de citotoxicidade.

Tabela 3. Linhagens celulares com respectivas classificações características de cultivo celular e expressão de receptores hormonais.

	Não- tumoral	Tumor luminal	Tumor HER2+	Tumor triplo-negativo
Linhagens	MCF-10A	T-47D e MCF-7	MDA-MB-453	MDA-MB-157 e MDA-MB-231
Cultivo celular	-DMEM-F12 + 10% SFB, 10 ng/mL de EGF, 500 ng/mL de hidrocortisona, 10 µg/mL de insulina e 50 µg/mL de gentamicina; -Atmosfera de 5% de CO ₂ .	-RPMI + 10% de SFB e 50 µg/mL; Atmosfera de 5% de CO ₂ .	-IMDM + 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina. Atmosfera de 5% de CO ₂ .	-IMDM + 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina. -Atmosfera de 5% de CO ₂ (P/ MDA-MB- 157) -L15 suplementado com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina (P/ MDA-MB-231)
Expressão de receptor	-	RE e RP	HER2	-

3.2. Avaliação de citotoxicidade

Após confluência, as células foram desagregadas e centrifugadas por 5 min a 1.000 Xg. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura. Após contagem e teste de viabilidade em azul de tripano, 1×10^6 células foram plaqueadas por poço em um volume final de 1 mL, quando então foram mantidas sob condição de cultivo para aderência. Posteriormente, foram adicionados os extratos liofilizados diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e meio nas seguintes concentrações finais: 7,8125 $\mu\text{g/mL}$, 15,625 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 125,00 $\mu\text{g/mL}$, 250,00 $\mu\text{g/mL}$, 500,00 $\mu\text{g/mL}$ e 1000,00 $\mu\text{g/mL}$, incubados durante 24h e 48h a 37°C. Transcorrido esse período, 10 μL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5- difeniltetrazólio (MTT) a 5 mg/mL foi adicionado em cada poço e a placa mantida a 4 horas, quando, finalmente, foram pipetados 50 μL de solução de SDS 20%/N-dimetil-formamida 50%. Após 16 horas, as placas foram lidas a 570 a 590 nm em leitora Thermo Plate, TP-Reader. Como controle foram utilizadas células tratadas apenas com o diluente Dimetilsulfóxido (DMSO) e células não tratadas com nenhuma substância. A viabilidade percentual foi calculada de acordo com a Fórmula (F1):

(F1)

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

AA = Absorbância da Amostra

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

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

ADMSO = Absorbância do controle de tratamento (DMSO)

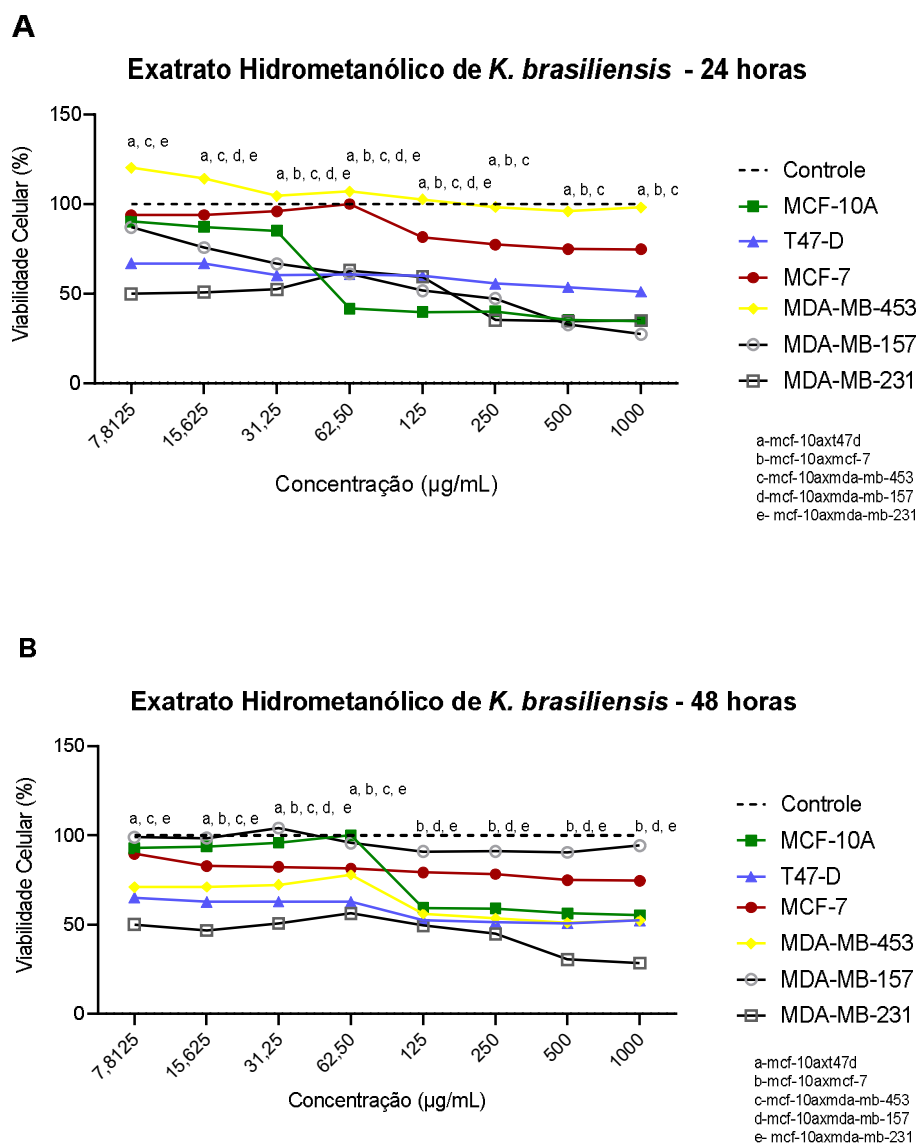
3.3 Análises estatísticas

Utilizando o software GraphPad Prism 8.0, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Posteriormente, dados foram submetidos à análise de variância univariada ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey. O cálculo da IC50 foi realizado por regressão não linear e o Índice de Seletividade (IS) foi obtido a partir da razão entre o valor de IC50 da linhagem não tumoral MCF-10A e IC50 das linhagens tumorais, sendo considerados promissores valores ≥ 2 . Por fim, foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Inicialmente, foi avaliado o extrato hidrometanólico de *K. brasiliensis* (Figura 3). Na análise da linhagem não tumoral, em ambos os tempos, o extrato foi citotóxico sendo que, no tratamento por 24 horas (Figura 3A), houve redução da viabilidade celular em 60% a partir de 62,5 µg/mL e, no tratamento por 48 horas (Figura 3B), apenas 55% das células se mantiveram viáveis a partir de 125,00 µg/mL.

Figura 3. Comparação da viabilidade celular das linhagens MCF-10A, T47-D, MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-157 e MDA-MB-231 após tratamento com extrato Hidrometanólico das folhas de *K. brasiliensis*. Os resultados foram avaliados em diferentes concentrações por 24 horas (A) e 48 horas (B). Estão apresentados em média do desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. As letras indicam significância estatística.



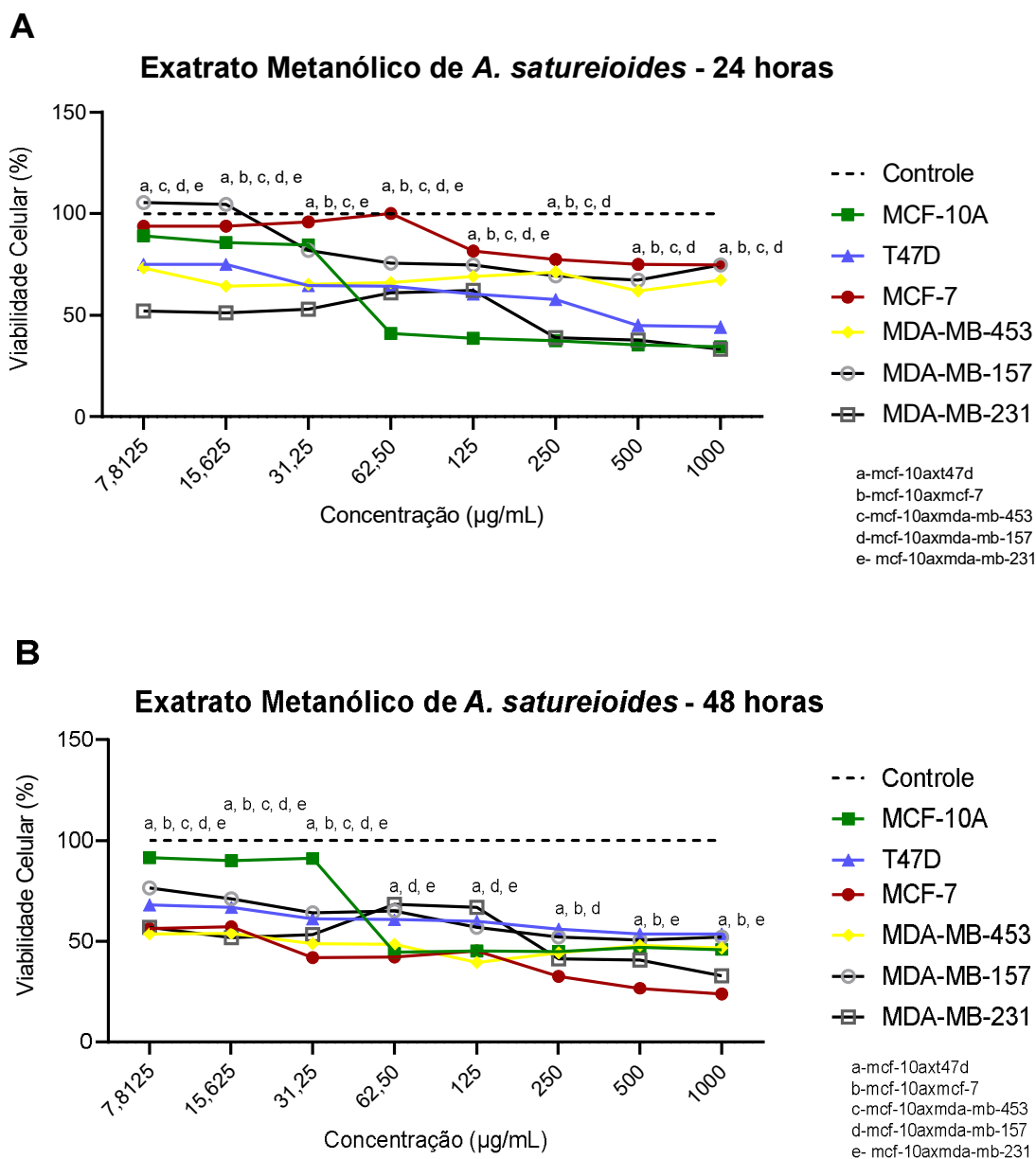
Os perfis das respostas celulares das linhagens luminais T47D e MCF-7 foram semelhantes em ambos os tempos, com viabilidade média de 55 e 75%, respectivamente.. Já para as células positivas para HER2 (MDA-MB453), houve indução da proliferação após 24 horas de tratamento com a concentração inicial do extrato e, nas demais, a viabilidade foi mantida em cerca de 90%. Em contrapartida, após 48 horas, o extrato foi capaz de reduzir e manter a viabilidade dessa linhagem em 50% nas quatro concentrações finais.

Considerando os subtipos TN, suas respostas diferiram da linhagem MCF-10A (não tumorigênica). A MDA-MB-157 demonstrou diferença entre os tratamentos, sendo que, após 24 horas, sua viabilidade foi reduzida em 50% a partir de 125,00 µg/mL. Por fim, a MDA-MB-231, diferentemente das demais, se mostrou mais sensível em ambos os tratamentos, com 50% de viabilidade já nas concentrações iniciais, chegando a uma redução de 30% nas concentrações próximas a 1000,00 µg/mL para ambos os tempos experimentais. Vale salientar que, após 48 horas, a viabilidade da MCF-10A se mostrou superior à MDA-MB231 nas quatro primeiras concentrações.

Em seguida foi avaliado o extrato metanólico de *A. saturoioides* (Figura 4). Na análise da linhagem não tumorigênica, o perfil de resposta celular se manteve semelhante em ambos os tratamentos, com uma redução significativa em sua viabilidade celular de cerca de 55% a partir da concentração 62,5 µg/mL.

Em relação às linhagens tumorigênicas, as células T47-D apresentaram redução de 50% em sua viabilidade somente nas concentrações finais de 500,00 µg/mL e 1000,00 µg/mL, em ambos os períodos. Quanto a MCF-7, o extrato se mostrou mais citotóxico após 48 horas, sendo capaz de reduzir a viabilidade em 50% nas cinco concentrações iniciais testadas, atingindo 30% nas concentrações de 250,00 µg/mL a 1000,00 µg/mL. As linhagens MDA-MB-453 (positiva para HER2) e MDA-MB-157 (TN) apresentaram redução de 50% da viabilidade celular apenas no tratamento por 48 horas. Finalmente, a MDA-MB-231 (TN) também apresentou um perfil de resposta diferente das demais em ambos os tempos com redução de 50% da viabilidade nas concentrações iniciais e viabilidade mínima de 35% nas duas concentrações finais. Novamente, como no extrato anterior, nas três primeiras concentrações, após 48 horas de tratamento, a viabilidade da MCF-10A se mostrou superior à MDA-MB231.

Figura 4. Comparação da viabilidade celular das linhagens MCF-10A, T47-D, MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-157 e MDA-MB-231 após tratamento com extrato Metanólico de *A. saturoides*. Os resultados foram avaliados em diferentes concentrações por 24 horas (A) e 48 horas (B). Estão apresentados em média do desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. As letras indicam significância estatística.



Conforme demonstrado na Tabela 3, o extrato vegetal obtido tanto de *K. brasiliensis* quanto de *A. saturoides* se mostraram ativos apenas para a linhagem tumoral MDA-MB231. Contudo, considerando o cálculo do índice de seletividade (IS), *K. brasiliensis* foi seletiva para a linhagem MDA-MB231 e *A. saturoides* à MCF-7.

Tabela 3. Valores de IC50 e IS após tratamento das linhagens celulares MCF10A, T47D, MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-157 e MDA-MB-231 com o extrato Hidrometanólico das folhas de *K. brasiliensis* ($\mu\text{g/mL}$) e extrato Metanólico de *A. saturoides* ($\mu\text{g/mL}$) por 24 e 48 horas.

<i>Kalanchoe brasiliensis</i> (Extrato Hidrometanólico)					
IC50 ($\mu\text{g/mL}$)			IS		
Linhagem	24H	48H	Linhagem	24H	48H
MCF 10A	44,00	>1000			
T-47D	>1000	>1000	MCF 10A x T-47D	ns	ns
MCF-7	>1000	>1000	MCF 10A x MCF-7	ns	ns
MDA-MB-453	>1000	>1000	MCF 10A x MDA-MB-453	ns	ns
MDA-MB-157	205,00	>1000	MCF 10A x MDA-MB-157	0,21	ns
MDA-MB-231	218,00	311,00	MCF 10A x MDA-MB-231	0,20	>2,0

<i>Achyrocline saturoides</i> (Extrato Metanólico)					
IC50 ($\mu\text{g/mL}$)			IS		
Linhagem	24H	48H	Linhagem	24H	48H
MCF 10A	45,00	44,00			
T-47D	346,00	>1000	MCF 10A x T-47D	0,13	ns
MCF-7	>1000	23,00	MCF 10A x MCF-7	-	1,91
MDA-MB-453	>1000	**	MCF 10A x MDA-MB-453	-	**
MDA-MB-157	>1000	>500	MCF 10A x MDA-MB-157	-	ns
MDA-MB-231	232,00	234,00	MCF 10A x MDA-MB-231	0,19	0,19

** Todas as concentrações exibiram efeito citotóxico semelhante

>1000: não ativo na faixa de concentrações utilizadas

ns: não seletivo

5. DISCUSSÃO

A complexidade dos tumores TNs mamários, com rápida evolução, desfecho clínico muitas vezes desfavorável e pior prognóstico com alto risco de recidiva e metástase, exige esforços dedicados à descoberta e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Apesar dos avanços na pesquisa molecular e o advento da imunoterapia e das terapias em associação, o CaMTN permanece tratado, principalmente, por quimioterapia, a qual se mostra essencial para a sobrevivência das pacientes. Nesse contexto, extratos de plantas nativas do Brasil têm contribuído substancialmente para a geração de novos fármacos, destacando-se por sua seletividade, com menos efeitos colaterais, baixa toxicidade e eficácia (SENEL e MCCLUER, 2004; KOOHPAR et al., 2015). O presente estudo avaliou os efeitos do extrato hidrometanólico

das folhas de *K. brasiliensis* e do extrato metanólico de *A. saturoides* sobre linhagens mamárias, em especial a células representativas de CaMTN.

Presentemente foi analisada a capacidade dos extratos em interferir na viabilidade de células de CaM pelo método colorimétrico utilizando MTT, o qual é considerado uma ferramenta válida para a determinação do potencial citotóxico de vários produtos químicos, drogas, poluentes ambientais e extratos vegetais (BONCLER et al., 2014). É baseado na atividade da enzima desidrogenase mitocondrial que, quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente em formazan, caracterizado por sua coloração arroxeada, insolúvel em água e solubilizado em DMSO. A quantidade de sal formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; LIU et al., 1997). Esse teste é amplamente utilizado para a avaliação do crescimento e sobrevivência celulares, sendo quantitativo, rápido, simples, de baixo custo e seguro. A sensibilidade do teste do MTT é dependente do tipo de célula, do seu estado metabólico médio e da técnica usada para solubilizar os cristais de formazan (CHAPDELAINÉ, 2010). Tal metodologia já foi explorada para estimar a citotoxicidade do extrato etanólico, aquoso e diclorometano de *K. daigremontiana* em linhagens celulares de câncer de colo de útero (HeLa), de ovário (SKOV-3), de mama (MCF-7) e melanoma (A375) (STEFANOWICZ et al., 2020). Também já foi aplicada a extratos metanólico, etanólico e aquoso de folhas de *Bryophyllum calycium* em células BHK-21 (JOSHI e CHAUHAN, 2013) e a extratos etanólico, hexano, diclorometano e aquoso de 52 espécies de plantas medicinais em células de câncer de pulmão (A549), de mama (MDA-MB-231), cervical (KB3-1) e de cólon (SW480) (KAEWPIBOON et al., 2012).

No CM, a atividade antitumoral de diferentes espécies vegetais já foi descrita, como *Curcuma ionga* Linn (GHORBANI e HOSSEINI, 2015), *Hedera nepalensis* (hera) (JAFRI et al., 2016), *Strobilanthes crispus* (YAACOB et al., 2015), *Camellia sinensis* (ASADI-SAMANI et al., 2016), *Vernonia condensata* (THOMAS et al., 2016), *Allium wallichii* (BHANDARI et al., 2017), *Elephantopus mollis* (KUETE et al., 2017), *Alpinia zerumbet* (ROMAN JUNIOR et al., 2017), *Panax ginseng* (SODRUL et al., 2018). Ademais, pesquisas científicas com indivíduos do gênero *Kalanchoe* já foram realizadas e demonstraram seu potencial farmacológico, incluindo atividades anti-leishmanicida, anti-tumoral, hepatoprotetora, anti-HIV e analgésica (SHIROBOKOV et al., 1981; DA-SILVA et al., 1999; SUPRATMAN et al., 2001; YADAV e DIXIT, 2003; WU et al., 2006). As espécies *K. pinnata*, *K. daigremontiana* e *K. tubiflora* apresentaram efeitos quimiopreventivos associados a bufadienolídeos extraídos de suas folhas (SUPRATMAN et al., 2001). KUO e colaboradores (2008) avaliaram o extrato metanólico de *K. hybridados*, o qual foi citotóxico à linhagem de CaM MCF-7 e de carcinoma

de pulmão NCI-H460. No trabalho realizado por STEFANOWICZ e colaboradores (2020) foi observada a ação antitumoral da fração diclorometano do extrato de *K. daigremontiana* em células MCF-7. *K. laciniata* também diminuiu a viabilidade dessa linhagem (RAHMAT et al., 2005).

Os resultados apontaram que os comportamentos das linhagens mamárias foram diferentes para cada um dos extratos testados. Enquanto o extrato hidrometanólico de *K. brasiliensis* foi citotóxico e seletivo à linhagem TN MDA-MB231, após 48 horas, o metanólico de *A. saturooides* foi mais ativo na linhagem de CaM luminal MCF-7 após esse mesmo tempo de tratamento. Importante salientar que a linhagem MCF-10A, não tumorigênica, também foi sensível, de modo que foi verificada redução na sua viabilidade. Portanto, diante de resultados divergentes conforme os subtipos moleculares de CaM, é imperativa a caracterização das substâncias majoritárias desses extratos para, assim, analisar a origem de seus efeitos farmacológicos. Interessantemente, extratos de plantas medicinais possuem diferentes constituintes químicos, os quais, em geral, apresentam efeitos sinérgicos e, para as espécies avaliadas nesse estudo, sugerimos que estejam modulando diferentes vias relacionadas aos subtipos TN e luminal. De fato, a caracterização de componentes ativos, bem como de mecanismos de ação é um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e para a farmacologia. Dados da literatura científica apontam que metabólitos secundários, principalmente flavonóides, alcalóides, carotenóides e terpenóides auxiliam no combate a tumores, inibindo a proliferação, angiogênese e invasão, além de induzirem danos ao DNA, parada do ciclo celular e apoptose (SWATON, 2004; LEE, 2005).

Segundo revisão de MILAD e colaboradores (2014), vários componentes de diferentes espécies de *Kalanchoe* já foram isolados, sendo estes: flavonóides glicosilados, alcalóides, antocianinas, cumarinas, triterpenóides, fenantrenos, lipídeos, esteróides e ácidos graxos. Para mais, estudos demonstram que suas folhas contêm um grupo de substâncias químicas denominadas bufadienolídeos, os quais são extremamente ativos, com ações antibacteriana, antitumoral, preventiva do câncer e inseticida (FERREIRA, 2016). A espécie *K. brasiliensis* foi estudada por COSTA e colaboradores (1994), que identificaram sete flavonóides derivados da patuletina glicosilados, sendo os calambrosídeos A, B e C descritos inicialmente, e a patuletina 3-*O*- α -L-rhamnopiranosil-7-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo posteriormente relatados como marcadores químicos de seu extrato hidrometanólico (COSTA et al., 2015). Flavonóides glicosídeos derivados da eupafolina também foram detectados (COSTA et al., 1994; ROSSIBERGMANN et al., 1994). Tais substâncias se destacam por suas ações anti-neoplásicas (BUER et al., 2010; GAO et al. 2011).

Para a espécie *A. saturoioides*, os metabólitos secundários com alta atividade antitumoral que mais se destacam em sua composição são os flavonoides luteolina (LT), quercetina (QT), 3-*O*-metilquercetina (3-*O*-MQ) e a bichalcona Aquirobichalcona (ACB) (SOUZA et al., 2018). Segundo estudos de Poglia et al (2014) as propriedades citotóxicas de LT e QT, já testadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* para diferentes tipos de câncer, incluem inibição da proliferação de células tumorais, proteção contra estímulos carcinogênicos, ativação da parada do ciclo celular, supressão das vias de sobrevivência celular e estimulação das vias de sinalização para a apoptose. Seus alvos moleculares anticancerígenos descritos são ciclinas e proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK1-CDK9) (SCHWARTZ e SHAH, 2005). Adicionalmente, apresentam efeito antioxidante, pois são capazes de inibir e reduzir os danos induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS) em lipídios, DNA e proteínas (BROWN e RICE-EVANS, 1998; BOOTS et al., 2008; ABARIKWU et al., 2012).

A QT e 3-*O*-MQ são semelhantes molecularmente, diferindo apenas por um grupo metil no carbono-3 do anel C (SCHWINGEL et al., 2014). Há relatos na literatura científica de que a metilação pode alterar as propriedades dos flavonoides permitindo que essas moléculas atravessem as membranas biológicas mais facilmente, levando a maiores concentrações intracelulares desses compostos e, portanto, resultando no aumento de suas atividades anticancerígenas e antiproliferativas (CHIDAMBARA et al., 2012; WESOŁOWSKA et al., 2012;). No entanto, ainda não foi determinado se o 3-*O*-MQ é mais citotóxico do que a QT e se o grupo metil adicional presente é responsável por esses efeitos. Já a ACB é uma molécula nova, descrita apenas para *A. saturoioides*, com estrutura semelhante a outras bichalconas naturais (CARINI et al., 2015; BARTMAŃSKA et al., 2018). Seus efeitos na linhagem MDA-MB231 foram publicados por BIACNCHI et al (2020), sendo mais ativo que 3-*O*-MQ. Em outro estudo, CHIEN et al (2009) demonstraram que a QT foi capaz de reduzir a viabilidade dessa mesma linhagem ao induzir a apoptose e parada de ciclo celular, além de reduzir os níveis da proteína p53. Já também foram descritos os efeitos da LT em células de câncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 e SK-BR3 (KIM et al., 2012; LEE et al., 2012).

Por fim, a LT também apresenta efeitos antiestrogênicos por reduzir o nível de expressão do ER através da inibição da transcrição do gene ER ou da potencialização da degradação desse receptor (HAN et al., 2002). Dessa forma, inibe a síntese e proliferação de DNA em células epiteliais mamárias e células de CaM induzidas por estrogênios, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HOLLAND e ROY et al., 1995; HAN et al., 2002), o que justifica os resultados aqui apresentados para a linhagem MCF-7.

Com base no exposto, flavonoides são substâncias fenólicas de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Apresentam-se como pigmentos naturais que desempenham um papel imprescindível na proteção contra agentes oxidantes e, quando consumidos, podem apresentar propriedade farmacológicas (NEVES et al., 2009; ROSA et al., 2010). Logo, sua atividade antitumoral se dá pela inibição da carcinogênese química ou biológica, devido à sua ação antioxidante, inibindo a liberação de radicais livres e induzindo a apoptose (KOBAYASHI et al., 2002). Nesse contexto, as atividades citotóxicas verificadas neste estudo para *K. brasiliensis* e *A. saturoioides* podem decorrer da ação dos flavonoides, já que são os principais constituintes presentes no extrato.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi avaliada a citotoxicidade do extrato hidrometanólico de *K. brasiliensis* e do extrato metanólico de *A. saturoioides* a linhagens mamárias MCF-10A, T47D, MCF-7, MDA-MB453, MDA-MB157 e MDA-MB-231 em diferentes concentrações nos tempos de 24 e 48 horas. Essas células apresentaram um comportamento distinto para os dois extratos vegetais, sendo o de *K. brasiliensis* promissor para as células MDA-MB231 (CaMTN) e o de *A. saturoioides* ativo na linhagem MCF-7 (CaM luminal). A linhagem MCF-10A também foi sensível aos tratamentos. Contudo, a fim de confirmar os resultados obtidos neste estudo, bem como esclarecer os mecanismos e as vias moleculares moduladas por essas espécies no CaM, é necessária a caracterização de suas substâncias majoritárias, bem como um aprofundamento nos ensaios a serem realizados, incluindo em modelos animais.

REFERÊNCIAS

ABARIKWU, S. O.; PANT, A. B.; FAROMBI, E. O. **Dietary antioxidant, quercetin, protects sertoli-germ cell coculture from atrazine-induced oxidative damage.** Journal of biochemical and molecular toxicology, v. 26, n. 11, p. 477-485, 2012.

ABU, N.; MOHAMED, N.E.; YEAP, S.K.; LIM, K.L.; AKHTAR, M.N.; ZULFADLI, A.J.; KEE, B.B.; ABDULLAH, M.P.; OMAR, A.R.; ALITHEEN, N.B. **In Vivo Anti-Tumor Effects of Flavokawain A in 4T1 Breast Cancer Cell-Challenged Mice.** Anticancer Agents Med Chem., v. 15, p. 905–915, 2015.

ADENIKE, K. & ERETAN, O.B. **Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw.** *Biochemistry and Molecular Biology*. V. 37, n. 2, 2004, p. 229-233.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula.** 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ALMEIDA, C. C. S.; BOGOSSIAN, F. B.; DOI, A. P. K.; ISOYAMA, D.; SIH, G. H.; ZANOLLA, W. R.; NASSIS, C. Z. et al. **Estudo da atividade antihistamínica da *K. brasiliensis*.** Arquivos Médicos do ABC, v. 1 e 2, p. 7-10, 1997.

ANGELONI, C.; MARALDI, T.; MILENKOVIC, D.; VAUZOUR, D. **Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2015, p. 1–2, 2015.

AMABEOKU, G. J.; GREEN, I.; KABATENDE, J. **Anticonvulsivant activity of *Cotyledon orbiculata* L. (Crassulaceae) leaf extract in mice.** Journal of Ethnopharmacology, v. 112, p. 101-107, 2007.

AMARAL, A. C. F.; SIMÕES, E. V.; FERREIRA, J. L. P. **Coletânea científica de plantas de uso medicinal.** Fiocruz. Curitiba, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Ultrasound, 2019a.** Disponível: < <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/breast-ultrasound.html> >. Acesso em 25/04/20

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast MRI, 2019b.** Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/breast-mri-scans.html#references> >. Acesso em 12/03/20

AMERICAN CANCER SOCIETY . **Invasive Breast Cancer (IDC/ILC), 2019c**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer/invasive-breast-cancer.html>>. Acesso em: 24/04/20

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Hormone Therapy for Breast Cancer, 2019d**. Disponível em:<<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/hormone-therapy-for-breast-cancer.html>>. Acesso em 18/07/2020

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Stages of Breast Cancer, 2021**. Disponível em:<<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/stages-of-breast-cancer.html>>. Acesso em 01/08/2022

ANDERS, C.and LISA A. C. **Understanding and treating triple-negative breast cancer**. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2008

ANISIMOV M.M.; GERASIMENKO N.I.; CHAIKINA E.L.; SEREBRIAKOV I. **Biological activity of metabolites of the herb Kalanchoe diagamontania (Hamet de la Bbathie) Jacobs et Perr**. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. Nov-Dec;(6):669-76. Russian. PMID: 20143626. 2009

APOSTOLOU, P.; FOSTIRA, F. **Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes**. *BioMed Research International*, v. 2013, Article ID 747318, 2013.

ASADI-SAMANI M; KOOTI W.; ASLANI E. et al. **A systematic review of Iran's medicinal plants with anticancer effects**. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2016.

ATANASOV, A.G., et al. **Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural product: a review**. *Biotechnol. Adv.* 33, 1582-1614. 2015.

BAKER, J.G. **Compositae. In: Flora Brasiliensis**. C.F.P. Martius & A.W. Eichler Eds., F. Fleischer, Lipsiae, v.6, pars 3, p.1-115, 1882-1884.

BARRETO-NETO, N. J.; PINHEIRO, A.B.; OLIVEIRA, J. F.; CRUSOÉ, N. S.; BERTRAND, S.A.; MACHADO, M.C.M.; PINTO, R.M.O.; CARVALHO-JUNIOR, J. D.; MACHADO, C. A.C. **Perfil epidemiológico dos subtipos moleculares de carcinoma ductal da mama em população de pacientes em Salvador, Bahia**. *Revista Brasileira de Mastologia*, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 98-102. 2014.

BARROS, A.C. S. D.; BUZAID, A.C. **Câncer de mama: tratamento multidisciplinar.** Dendrix edição e Design, 2007.

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil.** Minas Gerais: Imprensa Universitária, v. 2, 1991.

BARTMAŃSKA, A. T. T.; JAROSŁA, W. P.; MAGDALENA, M. B.; JOANNA, W. **"Highly cancer selective antiproliferative activity of natural prenylated flavonoids."** *Molecules* 23, no. 11. 2018.

BATSCHAUER, A. P. B. **Avaliação hemostática e molecular em mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo.** 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

BAYER V., AMAYA B., BANIEWICZ D., CALLAHAN C., MARSH L., MCCOY A.S.. **Cancer Immunotherapy: An evidencebased overview and implications for practice.** *Clinical journal of oncology nursing.* 2016.

BENDER C. **Implicações da quimioterapia para a enfermagem.** In: Clark JC, Mc Gee RF. *Enfermagem oncológica: um curriculum básico.* 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

BHANDARI J, MUHAMMAD BT, THAPA P, et al. **Study of phytochemical, anti-microbial, anti-oxidant, and anti-cancer properties of Allium wallichii.** *BMC Complement Altern Med.* 2017,

BIANCHI, S.E., et al. **Achyrocline satureioides compounds, achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin, induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human breast cancer cell lines.** *IUBMB Life.* 2020.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.; BAST, A. **Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical.** *European journal of pharmacology,* v. 585, n. 2-3, p. 325-337, 2008.

BONASSA EMA. **Enfermagem em quimioterapia.** São Paulo: Atheneu, 1992.

BONCLER, M. et al. **Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells.** *Journal of pharmacological and toxicological methods,* v. 69, n. 1, p. 9-16, 2014.

BORGHAEI, H.; SMITH, R.M.; CAMPBELL, S.K. Immunotherapy of câncer. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 41–54, 2009.

BOYLE P. et al. **European code against cancer and scientific justification: third version**. Ann Oncol. 2003

BRANDÃO, H. N. et al. **Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas**. Quim. Nova, v. 33, n. 6, p. 1359-69, 2010.

BRASIL. **Composição farmacêutica compreendendo a chrysoeriol e uso do composto a chrysoeriol**. Relatório Descritivo de Patente de Invenção. Brasil, 2018.

BREAST CANCER SOCIETY OF CANADA . **What is breast cancer?, 2015**. Disponível em: < <https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/?region=on>>. Acesso em 16/06/2020

BREAST CANCER. **Breast Cancer Stages, 2020a**. Disponível em: < <https://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging#stage0>>. Acesso em 10/06/2020

BREAST CANCER. **Age, 2020b**. Disponível em: < <https://www.breastcancer.org/risk/factors/age>>. Acesso em 19/07/2020

BREMER, K. e ARNE A. A. **Asteraceae: Cladistics & Classification**. Timber Press, 1994.

BRITO CMM.; LOURENÇÃO MIP.; BAZAN MSM.; MELLIK O.; SANTOS PP.; IMAMURA M et al. **Câncer de mama: reabilitação**. Rev Acta Fisiátrica [Internet] 2012; 19(2):66-72. Disponível em:< https://diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/cancer_de_mama_reabilitacao.pdf> Acesso em 15/05/2020

BROWN JE e RICE-EVANS C.A. **Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro**. Free Radic Res. 1998.

BUER, S. C.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. **Flavonoids: new roles for old molecules**. Journal of Integrative Plant Biology, v. 52, v. 1, p. 98-111, 2010.

BURSTEIN, H. J. et al. **American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer**. Journal of oncology practice, Alexandria, v. 6, n. 5, p. 243-246, 2010

CALIXTO, J. B. **Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAO, J. et al. **Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities.** *Food and Chemical Toxicology* 51. 2013.

CARINI JP, LEITÃO G.G.; SCHNEIDER P.H.; SANTOS C.C.; COSTA F.N.; HOLZSCHUH M.H.; KLAMT F.; BASSANI V.L. **Isolation of achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by high- speed countercurrent chromatography.** *Curr Pharm Biotechnol.* 2015.

CARINI, J. P.; KLAMT, F., & BASSANI, V. L. **Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy.** *RSC advances.* 2014.

CAREY, Lisa A. et al. **The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes.** *Clinical cancer research*, v. 13, n. 8, p. 2329-2334, 2007.

CARMO, P.O.; LEITE, I.C.; GUERRA, M. **Sobrevida de mulheres com câncer de mama subtipo luminal assistidas em Juiz de Fora, MG.** *Revista Brasileira de Mastologia*, vol. 26, nº 3, p. 118–252, 2016.

CASTRO L.O. e CHEMALE V.M. **Manual de identificação e cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas.** Porto Alegre, Instituto de Pesquisas Agronômicas, p.78, 1995.

CEZAROTTO V.; GIACOMELLI S.; MACK J.; BARIN J.,; SILVA U.; INARES C. **Seasonal variation, chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C.** *Lat Am J Pharm* 30: 1536 – 1541, 2011.

CHABNER B.A e ROBERTS T.G. **Timeline: Chemotherapy and the war on cancer.** *Nat Rev Cancer.* 2005.

CHAINANI-WU, N. **Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*).** *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, v. 9, n. 1, p. 161-168, 2003.

CHAPDELAINE M. S. **MTT reduction – a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation.** Pharmakon Research International, 1-6, 2010.

CHIDAMBARA M. K. N.; KIM J.; VIKRAM A.; PATIL BS. **Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus.** Food Chem. 2012.

CHIEN SY; WU YC; CHUNG JG; YANG JS; LU HF; TSOU MF; WOOD WG; KUO SJ; CHEN DR. **Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells.** Hum Exp Toxicol. 2009.

CHIN et al. **Drug discovery from natural sources.** *The AAPS journal.* 2006.

CINTRA J.R.D.; TEIXEIRA M.T.B.; DINIZ R.W.; GONÇALVES J.H.; FLORENTINO T.M. FREITAS G.F. et al. **Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama.** Rev Assoc Med Bras 2012.

CLINICAL TRIAL REGISTRATION. **Phase 2 Study of Tesetaxel Plus a Reduced Dose of Capecitabine in Patients With HER2 Negative, Hormone Receptor Positive, Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer Who Have Not Previously Received a Taxane.** NCT03858972, 26 de julho de 2021. Acesso em: 27/11/2021. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03858972>>

CLINICAL TRIAL REGISTRATION. **Study of XRP9881 (Larotaxel) in Combination With Weekly Trastuzumab (Herceptin®) in Patients With HER2 Positive Metastatic Breast Cancer (MBC).**, NCT00387907, 6 de abril de 2016. Acesso em: 27/11/2021. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00387907>>.

COSTA, A.C. et al. **Quantification of chemical marker of Kalanchoe brasiliensis (Crassulaceae) leaves by HPLC–DAD.** Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 38, n. 7, p. 795-800, 2015.

COSTA, S. S. et al. **Patuletin acetylramnosides from Kalanchoe brasiliensis as inhibitors of human lymphocyte proliferative activity.** Journal of Natural Products, v. 57, n. 11, p. 1503-1510, 1994.

COSTA-LOTUFO et al., **A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.** 2010, 11p. Universidade Federal do Ceará. Revista: Virtual Quim, v.2. Ceará, 2010.

COUGHLIN, S.S.; EKWUEME, D.U. Breast cancer as a global health concern. **Cancer epidemiology**, v. 33, n. 5, p. 315-318, 2009.

CRAGG, G. et al., organizadores. *Anticancer Agents from Natural Products*. 0 ed, CRC Press, 2005.

CRISCITIELLO, C. e GIUSEPPE, C. “**Immunotherapy of Breast Cancer**”. *Progress in Tumor Research*, vol. 42, p. 30–43, 2015.

CRUZ, B. P.; CHEDIER, L. M.; FABRI, R. L.; PIMENTA, D. S. **Chemical and agronomic development of *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers** under light and temperature levels. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, n. 4, p. 1434-1441, 2011.

CUNHA GMA; MAIA A.A.B.; NÉRI AND D.R. et al. **Atividade Antimicrobiana de plantas popularmente usadas no Ceará**. *Rev Bras Farm*. 1995.

DA-SILVA, S.A.G.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMANN, B. **The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediat nitric oxide intermediates**. *Parasitology*. V. 118, p 575-582, 1999.

DE BROT, M. D. **Carcinomas mamários de tipo basal: perfil clínico-patológico e evolutivo**. *Revista da Associação Medica Brasileira*, v.55, n.5, p.529- 534, 2009.

DENG, L. et al. “**Molecular Mechanisms of Bufadienolides and Their Novel Strategies for Cancer Treatment**”. *European Journal of Pharmacology*, vol. 887, p. 173379, 2020.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. **Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (“marcela”)**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.31, n.9, p.1163–1170, 1998.

DIANA, C. A. F. et al. **Factores pronósticos del cáncer de mama: modelo predictivo**. *Revista de Oncologia, Barcelona*, v. 6, n. 8, p. 472-482, 2004.

DOWSETT, M. et al. “**Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group**.” *Journal of the National Cancer Institute* vol. 103, p. 1656-64, 2011.

ESTEVA FJ et al. **Estado de PTEN, PIK3CA, pAKT e p-p70S6K: associação com resposta ao trastuzumab e sobrevivência em pacientes com câncer de mama metastático HER2- positivo** . Sou. J. Pathol. p. 1647- 1656, 2010.

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. **Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureoides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa***. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, n.1, p.49-54, 2007.

FERLAY, J. et al. Carga global do câncer de mama. In: **Epidemiologia do câncer de mama** . Springer, New York, NY, 2010. p. 1-19.

FERRARO, G. E., NORBEDO, C., COUSSIO, J. D. **Polyphenols from *Achyrocline satureioides***. *Phytochemistry*, v. 20, n. 8, p. 2053-2054, 1981.

FERREIRA, A. C. F.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. **Thyroid peroxidase inhibition by *Kalanchoe brasiliensis* aqueous extract**. Food and Chemical Toxicology, [S.l.], v. 38, p. 417-421, 2000.

FERREIRA, T. R. **Mecanismos envolvidos com as atividades antinociceptiva, antiedematogênica e anti-inflamatória do flavonoide majoritário das inflorescências de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Folha da fortuna)**. 2016. 80 f. Tese (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

FLORA DIGITAL UFRGS. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, 2010. Disponível em :< https://floradigital.ufsc.br/open_sp.php?img=4862> Acesso em: 10/07/2021

GALEA M.H.; BLAMEY R.W.; ELSTON C.E.; ELLIS IO. **The Nottingham Prognostic Index in primary breast câncer**. Breast Câncer Res Treat, 1992.

GAO, H. et al. **Bufadienolides and their antitumor activity**. Natural product reports, v. 28, n. 5, p. 953-969, 2011.

GEBRIM, L. H. e QUADROS, L. G. A. **Rastreamento do câncer de mama no Brasil**. Revista Brasileira. Ginecologia Obstetrícia. vol.28 no.6 Rio de Janeiro, 2006.

GHORBANI A, HOSSEINI A. **Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies**. Avicenna J Phytomed. p. 84-97, 2015.

GLUZ O, LIEDTKE C, GOTTSCHALK N, PUSZTAI L, NITZ U, HARBECK N. **Triple-negative breast cancer--current status and future directions**. *Ann Oncol*. 2009.

GONÇALVES-JÚNIOR, H. **Aspectos Clínico-epidemiológicos dos Tumores Mamários Triplo Negativos em uma População Brasileira**. UFJF, FACULDADE DE MEDICINA, Juiz de Fora – MG, 2018.

GUERRA, M. R, et al. **“Sobrevida de cinco anos e fatores prognósticos em coorte de pacientes com câncer de mama assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil”**. *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 25, nº 11, p. 2455–66, 2009.

GUPTA, S.C., et al. **"Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols."** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 559. 2014.

HAN DH; DENISON M.S.; TACHIBANA H.; YAMADA K. **Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids**. *Biosci Biotechnol Biochem*. p.1479-87, 2002.

HOLLAND M.B. e ROY D. **Estrone-induced cell proliferation and differentiation in the mammary gland of the female Noble rat**. *Carcinogenesis*. 1995.

HSIEH, T.C.; WU, J.M. **Resveratrol: biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule**. *Biofactors*, v. 36, p. 360-369, 2010.

IBRAHIM, T. et al. **Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoebrasiliensis***. *International Immunopharmacology*, [S.l.], v. 2, p. 875-883, 2002.

INCA. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle do Câncer. **Ações de enfermagem para o controle do câncer**. Rio de Janeiro, 1995.

INCA. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos** / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro, 2004.

INCA. Ministério da Saúde. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro, 2008.

INCA. Sumário Executivo. Políticas e Ações para Prevenção do Câncer no Brasil. **Alimentos, Nutrição e Atividade Física**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

INCA. **Tratamentos alternativos: mitos e verdades**. Revista Rede Câncer. pg 34-37, 2012.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil, 2018a**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/en/node/2396>>. Acesso em: 20/04/2020

INCA. **Atlas da Mortalidade**., 2018b. Acesso em: 18/09/2020.

INCA. **Prevenção do câncer de mama, 2018c**. Disponível em:< <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/acoes-de-controlado/prevencao> >. Acesso em 03/04/2020

INCA. **Deteção precoce do câncer de mama, 2018d**. Disponível em : <<https://www.inca.gov.br/en/node/1208>>. Acesso em 14/04/2020

INCA. **Estimativa 2020. Incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. 2019a.

INCA. **Fatores de risco para o câncer de mama, 2019b**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/fatores-de-risco>> Acesso em: 3/03/2020

INCA. José Alencar Gomes da Silva. **A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação**. / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019c.

INCA. **Câncer de mama - versão para Profissionais de Saúde, 2019d**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/profissional-de-saude> >. Acesso em 14/05/2020

INSTITUTO VENCER O CANCER. **Tratamento adjuvante e neoadjuvante**. Estadão, brasil, 2018. Disponível em : <<https://www.vencercancer.org.br/cancer/tratamento/tratamento-adjuvante-e-neoadjuvante/>>. Acesso em 14/05/2020

INSTITUTO VENCER O CANCER. **Plantas medicinais podem ser usadas durante o tratamento?**, 2019. Disponível em :< <https://vencercancer.org.br/cancer/noticias/plantas-medicinais-podem-ser-usadas-durante-o-tratamento/?catsel=cancer>>. Acesso em: 18/09/2020

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) – Cancer Today: **Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, all cancers, both sexes, all ages, 2018** – Disponível em : <https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&type_sex=0&mode=population&sex=0&populations=931_76&cancers=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0&single_unit=100000&print=0#collapse-group-1-16-0> Acesso em: 15/04/2020

JAFRI L; SALEEM S.; KONDRYTUK T.P., et al. **Hedera nepalensis K. Koch: a novel source of natural cancer chemopreventive and anticancerous compounds.** Phytother Res. 2016.

JANDIAL, D.D.; KRILL, L.S.; CHEN, L.; WU, C.; KE, Y.; XIE, J.; HOANG, B.H.,; ZI, X. **Induction of G2M Arrest by Flavokawain A, a Kava Chalcone, Increases the Responsiveness of HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells to Herceptin.** Molecules, v. 22, n. 3, p. 462-475, 2017.

JORDAN, MARY A. and LESLIE W. **Microtubules as a target for anticancer drugs.** *Nature Reviews Cancer* 4.4. 2004.

JOSHI, A. and CHAUHAN, R.S. **Phytochemical analysis and cytotoxicity studies of *Bryophyllum calycinum* in BHK-21 cells** A. Sch. Acad. J. Pharm. p. 190-194, 2013.

KAEWPIBOON, C.; LIRDPRAPAMONGKOL, K.; SRISOMSAP, C.; WINAYANUWATTIKUN, P.; YONGVANICH, T.; PUWAPRISIRISAN, P.; SVASTI, J.; ASSAVALAPSAKUL, W. **Studies of the *in vitro* cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants.** BMC Complement. Altern. Med. 2012.

KADARIAN C; BROUSSALIS A; MINO J.; LÓPEZ P.; GORZALCZARRY S.; FERRARO G.; ACEVEDO C. **Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.** Pharmacol Res. 2002.

KIM MJ; WOO J.S.; KWON C.H.; KIM J.H.; KIM Y.K.; KIM K.H. **Luteolin induces apoptotic cell death through AIF nuclear translocation mediated by activation of ERK and p38 in human breast cancer cell lines.** Cell Biol Int. 2012.

KHAZIR, J., et al. **"Role of plants in anticancer drug discovery."** *Phytochemistry Letters*. p. 173-181, 2014.

KO EY, M.. **Natural Products for Chemoprevention of Breast Cancer.** *J Cancer Prev*. p.223-231, 2015.

KOBAYASHI, T.; NAKATA, T.; KUZUMAKI, T. Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cell. **Cancer Letters**. V.176, p. 17-23, 2002.

KOOHPAR, Z. K., et al. **Anticancer activity of curcumin on human breast adenocarcinoma: Role of Mcl-1 gene.** *Iranian journal of cancer prevention*, v. 8, n. 3, 2015.

KUETE V.; NGNINTEDO D.; FOTSO G.W., et al. **Cytotoxicity of seputhecarpan D, thonningiol and 12 other phytochemicals from African flora towards uman carcinoma cells.** *BMC Complement Altern Med*. 2018.

KUO, P.C., et al. **Cytotoxic Principles and α -Pyrone Ring-Opening Derivatives of Bufadienolides from Kalanchoe Hybrida.** *Tetrahedron*, vol. 15, no 64, p. 3392–96, 2008.

LAMATY, G.; BÈSSIÈRE, J. M.; SCHENKEL, E. P.; SANTOS, M.; BASSANI, V. L. **The chemical composition of some Achyrocline satureioides and Achyrocline alata oils from Brazil.** *Brazilian Journal of Essential Oil Research*, v.3, p. 317-332, 1991.

LAUS, G. et al. **Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*.** *Phytochemistry*, v. 45, n. 4, p. 855-860, 1997.

LEE EJ; OH S.Y.; SUNG M.K. **Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells.** *Food Chem Toxicol*. 2012.

LEE, M. T. The antitumor activities of flavonoids. **Vivo** (Brooklyn), 2005.

LEHMANN B.D.; BAUER J.A.; CHEN X.; SANDERS M.E.; CHAKRAVARTHY A.B.; SHYR Y.; PIETENPOL J.A. **Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies.** *J Clin Invest*. 2011.

LEHMANN B.D. e PIETENPOL J.A. **Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer.** *Breast*. 2015 Nov;24 Suppl 2(0 2):S36-40. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.009. Epub 2015 Aug 5. PMID: 26253813; PMCID: PMC4641762.

LEONARDI G.C.; FALZONE L.; SALEMI R.; ZANGHÌ A.; SPANDIDOS D.A.; MCCUBREY J.A.; CANDIDO S.; LIBRA M. **Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review)**. *Int J Oncol*. p. 1071-1080, 2018.

LEVY-LAHAD and FRIEDMAN, E. **Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers**. *British Journal of Cancer*, v. 96, n. 1, p. 11-15, 2007.

LI, Y., et al. **Bufalin Inhibits Human Breast Cancer Tumorigenesis by Inducing Cell Death through the ROS-Mediated RIP1/RIP3/PARP-1 Pathways**. *Carcinogenesis*, vol. 39, n° 5, p. 700–707, 2018.

LIAO, G.S.; APAYA, M. K.; SHYUR, L.F. Herbal medicine and acupuncture for breast cancer palliative care and adjuvant therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

LIPPMAN, M. E. **Breast Cancer**. In: Kasper, D. L., Braunwald E., Fauci, A., et al. (eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16 ed., chapter 76, McGraw-Hill Professional, 2005.

LIU Y.; PETERSON D. A.; KIMURA H.; SCHUBERT D. **Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction**. *Journal Neurochem*. p. 581-593, 1997.

LIVASY CA, et al. **Avaliação fenotípica do subtipo basal-like do carcinoma de mama invasivo**. *Mod Pathol*. p. 264-271, 2006.

LORENZI, H.; **Plantas Daninhas do Brasil**, 3ª ed., Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Ltda., Nova Odessa, p.116, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2nd ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 223–224, 2008.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLICEIRA, T. T. **Flavonoides e seu potencial terapêutico**. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p.33-39, 2008.

MARQUES, C. L. T. Q. ; Barreiro, C. L.; Morais V. L. L.; Júnior N. F. L. **Oncologia: Uma abordagem multidisciplinar**. Recife: Carpe Diem Edições e Produções Ltda, Pg 822, 2015.

- MDEE, L. K.; YEBOAH, S. O.; ABEGAZ, B. M. **Rhuschalcones II-VI, five new bichalcones from root bark of Rhus pyroides**. *J Nat Prod.*, v.66, p.559-604, 2003.
- MEISNER, A. L.; FEKRAZAD, M. H.; ROYCE, M. E. **Breast Disease: Benign and Malignant**. *The Medical Clinics of North America*, v. 92, p. 1115-1141, 2008.
- MILAD, R.; EL-AHMADY, S.; SINGAB, A. N. Genus **Kalanchoe (Crassulaceae): A Review of Its Ethnomedicinal, Botanical, Chemical and Pharmacological Properties**. *European Journal of Medicinal Plants*, v. 4, n. 1, p. 86-104, 2014.
- MILLIKAN, R. et al. **HER2 codon 655 polymorphism and risk of breast cancer in African Americans and whites**. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.79, p.355-364, 2003.
- MIROSLAVA J., et al. “**Ki67, PCNA, and MCM Proteins: Markers of Proliferation in the Diagnosis of Breast Cancer**”. *Acta Histochemica*, vol. 118, no 5, p. 544–52, 2016.
- MOLINA, L; DALBEN, I; LUCA, L. A. DE. **Análise das Oportunidades de Diagnóstico Precoce para as Neoplasias Malignas de Mama**. *Revista Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v. 49, n.2, p. 185-90, 2003.
- MORROW M. **Personalizing extent of breast cancer surgery according to molecular subtypes**. *The Breast*. p. 106-109, 2013.
- MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *Journal Immunol Methods*. 1983.
- MUNAZZA S., et al. **Natural Cures for Breast Cancer Treatment**. *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 24, n° 3, p. 233–240, 2016
- MURPHY, C. C. et al. **Adherence to adjuvant hormonal therapy among breast cancer survivors in clinical practice: a systematic review**. *Breast cancer research and treatment*, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 459-478, 2012.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Breast Cancer Treatment, 2019**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#_148>. Acesso em 16/06/20.

NETO, J.L.F., et al. “**Caracterização Físico-Química Do Potencial Agente Antineoplásico β -Lapachona**”. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 33, n° 4, 2012.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. **Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera***. *Brazilian Journal of Food Technology*, [S.l.], p. 107-110, 2009.

NEWMAN D.J. and CRAGG G.M. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014**. *J Nat Prod*. 2016.

NGUELEFACK, T.B. et al. **Analgesic proprieties of aqueous and ethanol extracts of the leaves of *Kalanchoe crenata* (Carssulaceae)**. *Phytoterapy Research*. V. 18, n. 5, p 385-388, 2004.

NIELSEN, T.O. et al. **Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma**. *Clinical Cancer Research*, v.10, p.5367–5374, 2004.

OLIVEIRA, A.L., et al. **Achyrocline satureioides (Lam.) DC. (Macela) Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração**. *Caderno de Farmácia*, v. 7, n.1, p. 33-38, 2001.

OLIVEIRA, C.C. e REIS, A. **Questões epistemológicas e bioéticas da prevenção quaternária**. *Physis*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, p. 1485-1502, 2012.

OLIVEIRA, S. G. D.; MOURA, F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. S.; DEL PINO, F. A. B.; LUND, F. G. **An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.140, p.428-237, 2012.

ONCOGUIA. **O que é Câncer, 2017a**. Disponível em:
<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/> - acesso em 03/10/19

ONCOGUIA. **Diagnóstico do Câncer de Mama, 2017b**. Disponível em:
<<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/diagnostico/14/12/>>. Acesso em 14/04/20

ONCOGUIA. **Tratamento para o câncer de mama, 2020**. Disponível em:
<<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/acoes-de-controlado/tratamento>>.
Acesso em 14/02/2020

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Geneva: WHO, 2002.

PEROU C.M.; SØRLIE T.; EISEN M.B.; VAN DE R.I.; JEFFREY S.S.; REES C.A., et al. **Molecular portraits of human breast tumours**. Nature. 2000.

PEROU C.M. **Molecular stratification of triple-negative breast cancers**. Oncologist, p. 61-70, 2011.

PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G.; BASSANI, V. L. **From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants**. Journal of the Brazilian Association Advancement Science, v. 49, p. 364-369, 1997.

POGLIA J.; KLAMT F.; LINCK V. **Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy**. RSC Adv, p. 3131 – 3144, 2014.

PRUSKI, J.F. **Asteraceae. In: Flora of the Venezuelan Guyana**. Eds. Steyemark, J.A; Berry, P.E.; Yatskievych, K. & Holst, B.K. The Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, v.3 p.200, 1997.

PUHLMANN, J. et al. **Immunobiologically active metallic ioncontaining polysaccharides of *Achyrocline satureioides***. Phytochemistry, v.31, p.2617-21, 1992.

RAHMAT A.; MZZ N.; AKIM A.; BAKAR A.; FADZELLY M. **Efeito dos extratos de *Catharanthus roseus*, *Kalanchoe laciniata* e *Piper longum* na proliferação de células de câncer de mama dependente de hormônio (MCF- &) e de cólon (Caco2)**. *Malays J Med Health Sci*, p. 105-110, 2005.

RAKHA E.A, et al. **Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma**. J Clin Oncol. 2008,

RAZZAGHI H., et al. **Association between mammographic density and basal-like and luminal A breast cancer subtypes**. Breast Cancer Res. 2013.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. **Natural products for cancer prevention: a global prespective**. Pharmacology. Therapeutics. v. 99, p. 1-13, 2003.

REIS-FILHO, JS, et al. **Triple negative tumours: a critical review**. *Histopathology*, p. 108-118, 2008.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI A. L. **Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review**. *Industrial Crops and Products*, v.38, p.27-38, 2012.

RIVERA, F. et al. **Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela)**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.95, p. 359–362, 2004.

RIVOIRE W.A, et al. Bases **Biologia molecular do câncer cervical**. *Rev BRAS de Saúde Materno Infantil*, p. 179-84, 2006

ROMAN JUNIOR, W.A.; GOMES D.B.; ZANCHET B., et al. **Antiproliferative effects of pinostrobin and 5,6-dehydrokavain isolated from leaves of *alpinia zerumbet***. *Rev Bras Farmacogn*, p. 592-598, 2017.

ROSA, E. A. et al. **Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, [S.l.], v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010.

ROSSI-BERGMANN, B. et al. **Immunosuppressive effect of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* in mice**. *Phytotherapy Research*, [S.l.], v. 8, n. 7, p. 399-402, 1994

RUSSO, P., et al. **Flavonoids Acting on DNA Topoisomerases: Recent Advances and Future Perspectives in Cancer Therapy**. *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, nº 31, p. 5287–5293, 2012.

SABINI, M. C.; ESCOBAR, F. M.; TONN, C. E.; ZANON, S. M.; CONTIGIANI, M. S.; SABINI, L. I. **Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *Achyrocline satureioides* against Western equine encephalitis virus**. *Nat Prod Res.*, v. 26, p. 405-415, 2012.

SABINI, M.C. et al. **Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC**. *Food and Chemical Toxicology*, v. 60, p. 463–470, 2013.

SAITO, E.; FURLAN, C.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P.A. **Cromatografia líquida a vácuo na análise qualitativa e quantitativa de flavonóides em *Achyrocline satureioides***. *Revista Fitos*, v.1, n.1, p.57-59, 2005.

SALAZAR M.; VICTORINO F.R.; PARANHOS L.R., et al. **Efeitos e tratamento da radioterapia de cabeça e pescoço de interesse ao cirurgião dentista: revisão da literatura.** Odonto (São Bernardo do Campo). 2008.

SARAIVA D.P.; GUADALUPE C.M.; JACINTO A.; BRAGA S. **How many diseases is triple negative breast cancer: the protagonism of the immune microenvironment.** ESMO. 2017.

SCHIAVO, P. A. **Atividade antiviral de Kalanchoe brasiliensis (“saião”) frente a herpesvírus tipo I in vitro.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 111, 2005.

SCHNEIDER, I. J. C.; D’ORSI, E. **Sobrevida em cinco anos e fatores prognósticos em mulheres com câncer de mama em Santa Catarina, Brasil.** Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6, p.1285-1296, 2009.

SCHWARTZ G.K. and SHAH M.A. **Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy.** J Clin Oncol. 2005.

SCHWINGEL, L.C., et al. **3-O-Methylquercetin from organic Nicotiana tabacum L. trichomes: Influence of the variety, cultivation and extraction parameters.** *Industrial Crops and Products*, p. 56-62, 2014.

SENEL, S. and MCCLURE, S.J. **Potential applications of chitosan in veterinary medicine.** Adv. Drug Delivery Rev. v. 56, p. 1467-1480, 2004.

SHANMUGAM, M.K. et al. **The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment.** *Molecules*, v. 20, n. 2, p. 2728-2769, 2015.

SHENG, R. et al. **Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*.** *Anticancer Research*, v. 18, p. 3363, 1998.

SHENG, Y. et al. **Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.** *Molecular Cell*, v. 1, n. 9, p. 459-470, 2002

SHINDIKAR A.; SINGH A.; NOBRE M.; KIROLIKAR S. **Curcumin and Resveratrol as Promising Natural Remedies with Nanomedicine Approach for the Effective Treatment of Triple Negative Breast Cancer.** *Journal of Oncology*. 2016.

SHIROBOKOV, V.P. et al. **Antiviral activity of representatives of the family Crassulaceae.** Antibiotiki. V. 26, n. 12, 1981, p 897-900.

SILVA, J. G., et al. **Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 19, n. 3, p. 790-794, 2009.

SILVA, J.G. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE *Kalanchoe brasiliensis* Cambess.** Dissertação (Mestrado em ciencias farmaceuticas) - Federal de Pernambuco. Recife, p. 88. 2007.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela).** Dissertação (Mestrado em Farmácia).Universidade Federal do Rio Grande de Sul. Porto Alegre, 186p.1984

SINHA, D. et al. **Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms.** Seminars in Cancer Biology, v.40-41, p. 209-232, 2016.

SIQUEIRA, A. P., et al. **Cancer de mama - Níveis de Prevenção.** UNAERP. Guarujá, 2009.

SIRIO LIBANES. **Cancer de mama, 2019.** Disponível em: <
<https://www.hospitalsiriolibanes.org.br/hospital/especialidades/centro-oncologia/mama/Paginas/diagnosticos.aspx>>. Acesso em 30/03/2020

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA; FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. **Câncer de mama: terapia endócrina e terapia alvo.** In: AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR; ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA. Diretrizes clínicas na saúde suplementar. Brasil, 2011. Disponível em: <https://diretrizes.amb.org.br/ans/cancer_de_mama_terapia_endocrina_e_terapia_alvo.pdf>. Acesso em 18/07/2020

SODRUL I.M.D; WANG C.; CHEN X., et al. **Role of ginsenosides in reactive oxygen species-mediated anticancer therapy.** Oncotarget. 2018.

SØRLIE, T., et al. **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001.

SORLIE, T. **Molecular portraits of breast cancer: tumors subtypes as distinct disease entities.** *Eur J Cancer*. 2004.

SORLIE T; TIBSHIRANI R; PARKER J; HASTIE T; MARRON JS; NOBEL A, et al. **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003.

SOUSA, N.C., et al. **Modulatory effects of *Tabebuia impetiginosa* (Lamiales, Bignoniaceae) on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*.** *Genet. Mol. Biol.*, São Paulo , v. 32, n. 2, p. 382-388, 2009.

SOUZA, P.O., et al. **Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines.** *Toxicol In Vitro*, p. 23-33, 2018

SOUZA, K.C.B.; BASSANI, V.L. ; SCHAPOVAL, E.E.S. **Influence of excipients and technological process on antiinflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route.** *Phytomedicine*, v. 14, p. 102–108, 2007.

STEFANOWICZ-HAJDUK J, et al. **Identification of Flavonoids and Bufadienolides and Cytotoxic Effects of *Kalanchoe daigremontiana* Extracts on Human Cancer Cell Lines.** *Planta Med*, p. 239-246, 2020

STEVENS, J. F., et al. **Distribution of alkaloids and tannins in the Crassulaceae.** *Biochem Systemat Ecology*, p. 157-165, 1995.

SU Y.J.; HUANG S.Y.; NI Y.H.; LIAO K.F.; CHIU S.C. **Anti-Tumor and Radiosensitization Effects of N-Butylidenephthalide on Human Breast Cancer Cells.** *Molecules*. 2018.

SUNDQUIST M.; THORSTENSON S.; BRUDIN L.; NORDENSKJOLD B. **Applying the Nottingham Prognostic Index to a Swedish breast cancer population.** South East Swedish Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat* 1999.

SUPRATMAN, U. et al. **Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K.daigremontiana x tubiflora*.** *Bioscience Biotechnology Biochemical*. V. 65, p 947-949, 2001.

SWANTON, C. Cell-cycle targeted therapies. **The lancet oncology**, v. 5, n. 1, p. 27-36, 2004.

TELANG, N T.; NAIR H. B. and WON, G. "Efficacy of *tabebuia avellandae* extract on a cell culture model for triple negative breast cancer." 2015.

TELANG, N. T., NAIR, H. B., and WONG, G. **Growth inhibitory efficacy of *Cornus officinalis* in a cell culture model for triple-negative breast cancer.** *Oncology letters*. 2019.

THOMAS, E., GOPALAKRISHNAN, V.; SOMASAGARA R.R., et al. **Extract of *Vernonia condensata*, Inhibits tumor progression and improves survival of tumor-allograft bearing mouse.** *Sci Rep*. 2016.

THUN, M.J. e JEMAL, A. **Cancer epidemiology.** In: Kufe DW, Bast RC, Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei III E, editors. *Cancer 7 medicine*. Hamilton: BC Decker Inc, p. 339–53, 2006.

TREVISAN, M.T.S., et al. **Atividades Larvicida e Anticolinesterásica de plantas de gênero *Kalanchoe*.** *Quim Nova*, p. 415-418, 2006.

TREVISAN, M. T. S., et al. **Triple negative breast cancer: deciphering the biology and heterogeneity.** *Medicina Universitaria*, [s.l.], v. 18, n. 71, p. 105-114, 2016.

VAN DE RIJN, M. et al. **Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome.** *American Journal of Pathology*, v.161, p.1991-1996, 2002.

VERPOORTE, R.; FILHO, R.B. et al. **Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*.** *Química Nova*, [S.l.], v. 29, n. 3, p. 415-418, 2006.

WANG, S.; LIU, Q.; ZHANG, Y.; LIU, K.; YU, P.; LIU, K.; LUAN, J.; DUAN, H.; LU, Z.; WANG, F.; WU, E.; YAGASAKI, K., & ZHANG, G. **Suppression of growth, migration and invasion of highly-metastatic human breast cancer cells by berbamine and its molecular mechanisms of action.** *Molecular cancer*. 2009

WENG, C.J. and YEN, G.C. **Flavonoids, a Ubiquitous Dietary Phenolic Subclass, Exert Extensive in Vitro Anti-Invasive and in Vivo Anti-Metastatic Activities.** *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 31, nº 1–2, p. 323–351, 2012

WESOŁOWSKA, O., et al. **Multidrug resistance reversal and apoptosis induction in human colon cancer cells by some flavonoids present in citrus plants.** *J Nat Prod*. 2012.

WHO. World health organization model list of essential medicines. **Mental and Holistic Health: Some International Perspectives**, v. 21, p. 119–134, 2019.

WHO. **Early Diagnosis, 2020a**. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/en/>. Acesso em: 18/09/2020

WHO. **Diagnosis and Treatment, 2020b**. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/treatment/en/>. Acesso em: 18/09/2020

WILLIAM, D., et al. **Germline BRCA1 Mutations e um fenótipo epitelial basal no câncer de mama**. JNCI: Jornal do Instituto Nacional do Câncer , Volume 95, Edição 19, p. 1482-1485, 2003.

WOODLOCK, T.J. and LOUGHNER, J.E. **Farmacologia clínica dos agentes antineoplásicos**. In: Rosenthal S, Carignan JR, Smith BD. Oncologia prática: cuidados com o paciente. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, p. 41-64, 1995.

WU, P.L. et al. **Kalanchosides A-D New cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of Kalanchoe gracilis**. Organic Letters. V. 0, 2006.

WURTZEL, E.T. and KUTCHAN, T.M. **Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future**. Science, v. 353, n. 6305, 2016.

YAACOB, N.S.; YANKUZO, H.M.; DEVARAJ, S., et al. **Anti-tumor action, clinical biochemistry profile and phytochemical constituents of a pharmacologically active fraction of S. crispus in NMU-induced rat mammary tumour model**. PLoS One. 2015.

YADAV, N.P. and DIXIT, V.K. **Hepatoprotective activity of leaves of Kalanchoe pinnata Pers**. Journal of Ethnopharmacology. V. 86, p 197-202, 2003.

YANG, H. and DOU, Q.P. **Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer**. Curr Drug Targets. 2010.

YAO, H., et al. **Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon?** Oncotarget, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1913-1924, 2016.

YUAN, Na et al. **Clinical characteristics and prognostic analysis of triple-negative breast cancer patients**. Molecular and clinical oncology, v. 2, n. 2, p. 245-251, 2014.

ZHANG, Chi et al. **Higher locoregional recurrence rate for triple-negative breast cancer following neoadjuvant chemotherapy, surgery and radiotherapy.** Springerplus, v. 4, n. 1, p. 386, 2015.