

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

ANA LUIZA VARGAS MENDES

**CITOTOXICIDADE DO EXTRATO CLOROFÓRMICO E DO ÁCIDO BETULÍNICO
DE *Eremanthus erythropappus* A CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS**

**PATOS DE MINAS
NOVEMBRO DE 2023**

ANA LUIZA VARGAS MENDES

**CITOTOXICIDADE DO EXTRATO CLOROFÓRMICO E DO ÁCIDO BETULÍNICO
DE *Eremanthus erythropappus* A CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS**

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

**PATOS DE MINAS
NOVEMBRO DE 2023**

ANA LUIZA VARGAS MENDES

Citotoxicidade do extrato clorofórmico e do ácido betulínico de *Eremanthus erythropappus* a células tumorais mamárias

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:

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – Instituto de Biotecnologia - UFU

Presidente

MSc. Fernanda Cardoso da Silva – Instituto de Biotecnologia – UFU

Membro

Dr. Raoni Pais Siqueira – Instituto de Biotecnologia – 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, 20 de novembro de 2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me abençoado e me dado sabedoria, saúde e força para ter chegado até aqui.

À Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, por ter me acolhido e me orientado, me proporcionando muito aprendizado. Agradeço imensamente!

As minhas queridas amigas Gislaine Gonçalves Rocha e Laryssa Aparecida Sales Barbosa agradeço pela paciência, ajuda e por terem me ensinado tantas coisas. Vocês são incríveis!

À minha família e ao meu namorado por terem acreditado em mim e me apoiado em todos os momentos. Amo vocês!

Aos membros da bancada que se disponibilizaram a estar comigo nesse momento importante.

À todos os professores e servidores da UFU pelos ensinamentos e contribuições para a minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho pela colaboração e parceria no desenvolvimento dessa pesquisa.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma fizeram parte dessa trajetória.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

RESUMO

O Câncer de Mama é o tumor maligno mais comumente diagnosticado no mundo, superando os casos de câncer de pulmão. Apesar dos avanços científicos, permanece sendo a segunda causa de morte em mulheres, questionando os métodos atuais de tratamento e exigindo esforços dedicados à caracterização de novos medicamentos. Produtos naturais se destacam, uma vez que possuem compostos ativos com ampla ação antitumoral, interferindo em diferentes vias oncogênicas. O presente estudo objetivou determinar a atividade *in vitro* do extrato clorofórmico de *Eremanthus erythropappus* e do ácido betulínico obtido dessa espécie em linhagens celulares de câncer de mama. Quatro linhagens, MCF-10A (não-tumorigênica), MCF7 (tumoral luminal), MDA-MB-453 (tumoral HER2-positiva) e MDA-MB-231 (tumoral triplo negativa) foram cultivadas e tratadas com diferentes concentrações (7 µg/mL a 500 µg/mL) de EAT21 (extrato clorofórmico) e EAT22 (eri betulínico). A citotoxicidade foi avaliada pelo método-padrão utilizando MTT, o IC₅₀ (capacidade de inibir 50% das células) calculado e a seletividade definida. A atividade antiproliferativa também foi determinada pelo ensaio clonogênico, utilizando a linhagem triplo negativa MDA-MB-231. Tanto EAT21 quanto EAT22 foram ativos nas células MCF7 e MDA-MB-231. Contudo, a linhagem de câncer de mama luminal foi mais sensível, com IC₅₀ abaixo da menor concentração para ambos os compostos e após os tratamentos por 24 e 48h. Já para a MDA-MB-231, destacou-se o EAT22, com IC₅₀ < 7 µg/mL após 24 h e 48 h. Esse composto também inibiu significativamente a clonogenicidade das células de câncer de mama triplo-negativo. Nossos resultados direcionam estudos aprofundados em modelos animais e dos mecanismos de ação do ácido betulínico enquanto possível alternativa terapêutica para o tratamento do câncer de mama triplo-negativo.

Palavras-chaves: Ácido betulínico. Câncer de Mama. Produtos naturais. Tratamento.

ABSTRACT

*Breast Cancer is the most commonly diagnosed malignant tumor worldwide, surpassing cases of lung cancer. Despite scientific advances, it remains the second cause of death in women, questioning current treatment methods and requiring dedicated efforts to characterize new drugs. Natural products stand out, since they have active compounds with broad antitumor action, interfering with different oncogenic pathways. The present study aimed to determine the in vitro activity of the chloroform extract of *Eremanthus erythropappus* and betulinic acid obtained from this species in breast cancer cell lines. Four cell lines, MCF-10A (non-tumorigenic), MCF7 (luminal tumor), MDA-MB-453 (HER2-positive tumor) and MDA-MB-231 (triple-negative tumor) were cultured and treated with different concentrations (7 µg/mL at 500 µg/mL) of EAT21 (chloroform extract) and EAT22 (betulinic acid). Cytotoxicity was evaluated by the standard method using MTT, the IC₅₀ (capacity to inhibit 50% of cells) calculated and selectivity defined. Antiproliferative activity was also determined by clonogenic assay, using the triple negative cell line MDA-MB-231. Both EAT21 and EAT22 were active in MCF7 and MDA-MB-231 cells. However, the luminal breast cancer line was more sensitive, with IC₅₀ below the lowest concentration for both compounds and after treatments for 24 and 48h. For MDA-MB-231, EAT22 stood out, with IC₅₀ < 7 µg/mL after 24 h and 48 h. This compound also significantly inhibited the clonogenicity of triple-negative breast cancer cells. Our results direct in-depth studies in animal models and the mechanisms of action of betulinic acid as a possible therapeutic alternative for the treatment of triple-negative breast cancer.*

Keywords: Betulinic acid. Breast cancer. Natural products. Treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB- ácido betulínico
BRCA: Breast Cancer - Câncer de Mama
BRCA1: Breast Cancer 1 - Câncer de Mama 1
BRCA2: Breast Cancer 2 - Câncer de Mama 2
CCNB1: Gene regulador envolvido na mitose
CM: Câncer de Mama
CMTN: Câncer de mama fenótipo triplo-negativo
CTLA-4: Antígeno-4 de linfócitos T citotóxicos
DMEM/F-12: Meio de Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EGF: Fator de Crescimento Epidérmico
ER: Receptor de Estrógeno
FBS: Soro Fetal Bovino
GLOBOCAN - Global Cancer Observatory
HER2: Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HER2E: HE2-enriquecido
IC50: Concentração de Inibitória de 50%
IGF: Fatores de crescimento semelhantes à insulina
IMDM: Modificação do meio Eagle Modificado de Dulbecco
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IS: Índice de Seletividade
Ki-67: Marcador nuclear de proliferação celular
L15: Meio Leibowitz
MCF-10A: Célula humana não tumoral
MCF7: Célula tumoral derivada de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-231: Célula tumoral derivada de adenocarcinoma mamário
MKI67: Gene para proteína ki-67, necessária para a proliferação celular
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MYBL2: Gene envolvido na progressão do ciclo celular
NADP: Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NADPH: Forma reduzida do NADP
PARP: Enzima Poli Adenosina difosfato Ribose Polimerase
PBS: Tampão fosfato salino
PD-1: Receptor de morte programada
PD-L1: Ligante do receptor de morte programada
PI3K3- genes da via da fosfoinositídeo 3-quinase, que regula crescimento
PR: Receptor de Progesterona
RB: Gene retinoblastoma
RE: Retículo Endoplasmático
RPMI-1640: Meio produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park
TN: Triplo Negativo
TP53- gene que produz a proteína p53, supressora de tumor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características ou marcas moleculares associadas ao câncer.....	10
Figura 2. Dados epidemiológicos mostrando a taxa de incidência de cânceres em mulheres no Brasil.....	12
Figura 3. Representação anatômica da mama.....	13
Figura 4. Foto da planta <i>Eremanthus erythropappus</i> de Loeuille, 2016.....	20
Figura 5. Estrura do ácido betulínico.....	21
Figura 6. Diagrama representativo do ensaio de citotoxicidade.....	24
Figura 7. Diagrama representativo do ensaio clonogênico.....	25
Figura 8. Viabilidade das linhagens mamárias após tratamento com o extrato clorofórmico de <i>E. erythropappus</i> (EAT21).....	27
Figura 9. Viabilidade das linhagens mamárias após tratamento com ácido betulínico de <i>E. erythropappus</i> (EAT22).....	28
Figura 10. Clonogenidade das células MDA-MB-231 (câncer de mama triplo-negativo) após tratamento com ácido betulínico (EAT22) por 48 horas.....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Câncer: definição e epidemiologia.....	9
1.2	Anatomofisiologia mamária.....	12
1.3	Câncer de Mama.....	13
1.4	As classificações histológicas e moleculares dos tumores mamários.....	15
1.4.1	Os desafios no tratamento de tumores mamários.....	17
1.5	Produtos naturais no controle de tumores.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivo específico.....	21
3	MATERIAIS E METODOS.....	22
3.1	Obtenção dos extratos e linhagens celulares.....	22
3.2	Ensaio de citotoxicidade.....	22
3.3	Ensaio clonogênico.....	24
3.4	Análises estatísticas.....	25
4	RESULTADOS.....	25
4.1	Ensaio de citotoxicidade.....	26
4.2	Ensaio clonogênico.....	29
5	DISCUSSÃO.....	30
6	CONCLUSÃO.....	31
	REFERÊNCIA.....	32

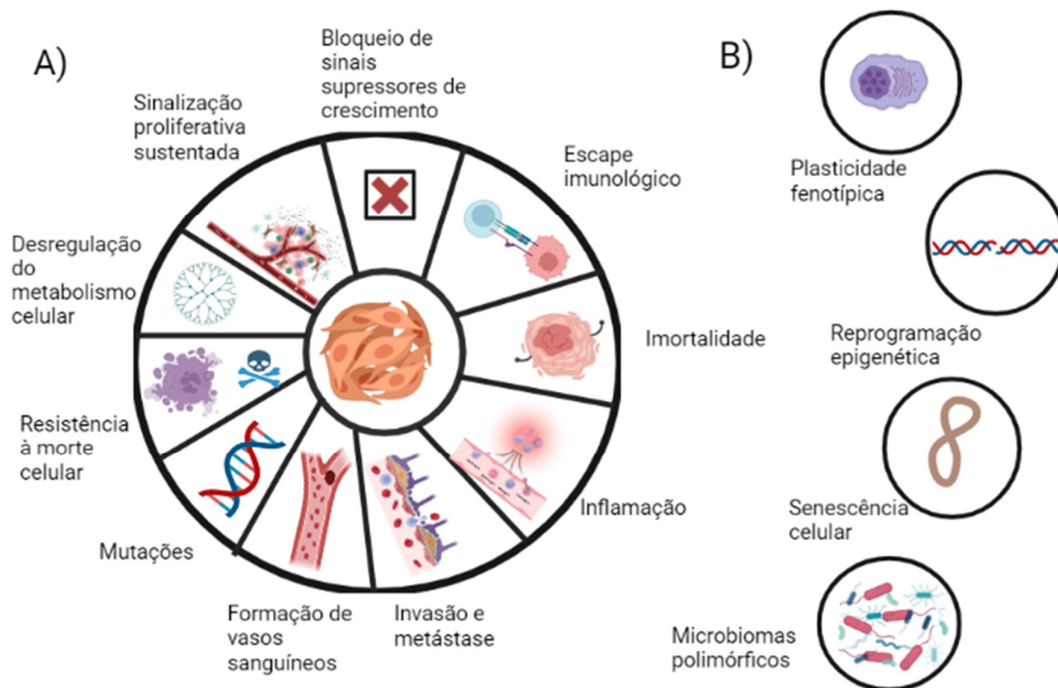
1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: definição e epidemiologia

O câncer é um dos problemas de saúde pública mais alarmantes em todo o mundo. É definido como um conjunto de células com intensa capacidade replicativa, podendo ser benigno ou maligno. No primeiro caso, o crescimento é lento e organizado e não há alterações nas características moleculares das células. Quando maligno, há mudanças genéticas críticas com perda da capacidade de controle de diferentes vias como a de proliferação e morte, de modo que há a possibilidade de invasão e alcance de órgãos e tecidos além do seu sítio de origem, definido como metástase (FILHO *et al*, 2002).

Hanahan e Robert, em 2011, apresentaram algumas características das células malignas que se destacam, como sustentação da sinalização proliferativa, bloqueio de sinais supressores de crescimento, ativação de mecanismos de invasão e metástase, imortalização, angiogênese, morte celular, reprogramação metabólica e escape imunológico. Já em 2022, Hanahan publicou um novo estudo destacando o papel da vascularização nesse processo, uma vez que os tumores podem se tornar suficientemente vascularizados, seja pela ativação da angiogênese ou pela captação de vasos de tecidos normais. Também foi citado o desbloqueio da plasticidade fenotípica, pois na organogênese as células desempenham suas funções em um estado homeostático de diferenciação terminal, estabelecendo uma barreira à proliferação contínua. Assim, no câncer, ocorre a desdiferenciação de estados maduros para estados progenitores, o que promove o desenvolvimento e progressão da doença. Os autores também evidenciam a importância da reprogramação epigenética não mutacional, a qual contribui para a modulação do tumor. Finalmente, a influência dos microbiomas polimórficos é citada, já que a microbiota pode promover tumores devido à produção de toxinas que danificam o DNA, ou esses microrganismos expressam moléculas que mimetizam sinais extracelulares proliferativos. Também foi acrescentado o conceito de “características habilitantes”, as quais incluem mecanismos moleculares e celulares pelos quais as marcas anteriormente descritas são adquiridas. Essas características permitem com que as células pré-neoplásicas em evolução desenvolvam e adquiram fenótipos aberrantes (Figura 1) (HANAHAN, 2022; HANAHAN *et al*, 2011).

Figura 1- Características ou marcas moleculares associadas ao câncer. A) Características publicadas em 2011. B) Características incorporadas em 2022 por HANAHAN *et al.*



Fonte: autoria própria.

De acordo com Roy (2017), o surgimento de células cancerosas decorre da incapacidade do sistema de defesa identificá-las e destruí-las. De fato, o risco de desenvolvimento de tumores é maior em pessoas com deficiência no sistema imunológico em função de estresse, idade avançada, doença crônica debilitante, uso prévio de quimioterapia e abuso de drogas como analgésicos, antibióticos e corticosteroides. Portanto, lesões malignas são consideradas massas complexas compostas por diferentes tipos celulares com participação heterotípica. Além disso, a biologia dos tumores não pode ser entendida simplesmente por características pontuais das células cancerígenas, devendo abranger as contribuições do microambiente tumoral (HANAHAN *et al.*, 2011).

Ao longo dos séculos XX e XXI é notável o aumento do número de casos de câncer em todo o mundo, o que está relacionado aos diferentes fatores de risco, especialmente ambientais, ao comportamento e ao envelhecimento populacional. Os dados epidemiológicos corroboram esse fato, uma vez que, em 1919, no Rio de Janeiro, o câncer ficava em sexto lugar dentre as causas de morte na população, depois da tuberculose, doenças gastroenterites, cardiovasculares, pneumonias e nefrites (FILHO; MONCAU, 2002). Atualmente, segundo dados apresentados pelo GLOBOCAN, dos 193 países existentes no mundo, 112 deles apresentam o câncer como

primeira ou segunda doença que mais mata pessoas abaixo de 70 anos, sendo uma importante barreira para o aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo. Para ambos os sexos, metade de todos os casos e 58,3% das mortes por câncer ocorreram na Ásia em 2020, onde residem 59,5% da população global. A Europa apresenta 22,8% do total de casos de câncer e 19,6% das mortes, embora represente 9,7% da população global. Nas Américas ocorreram 20,9% dos diagnósticos e 14,2% dos óbitos (SUNG PHD *et al.*, 2021).

Dados epidemiológicos são essenciais para a compreensão do curso da doença e dos impactos dos avanços científicos na população, possibilitando intervenções oportunas e adequadas e o desenvolvimento de políticas eficientes de prevenção, rastreamento e diagnóstico (MATTIUZZI; LIPPI, 2019). Com o início da pandemia da COVID 19, houve uma paralização de atividades presenciais e imposição do distanciamento social como forma de conter a transmissão da doença. Como consequência, a coleta de dados em campo sobre a epidemiologia do câncer no Brasil e em diversos países do mundo ficaram em segundo plano, em decorrência da urgência de informar os dados relativos ao vírus e tentar conter e amenizar seus impactos. Por isso, é possível observar que há uma lacuna de informações epidemiológicas sobre cânceres em geral entre os anos de 2019 até 2022 (SILVEIRA; BASTOS, 2022).

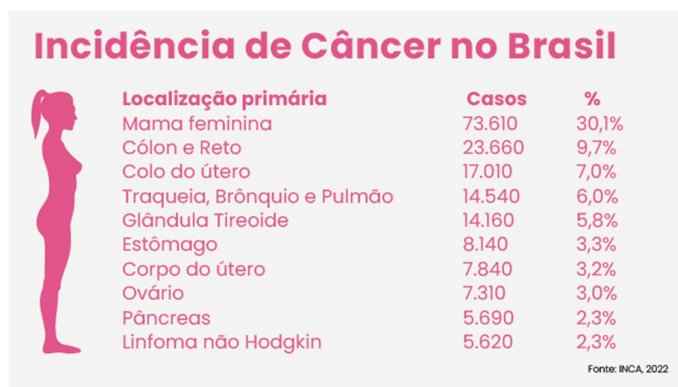
Contudo, as doenças malignas podem ser consideradas como o primeiro e mais importante problema de saúde pública, impondo um desgaste clínico dramático, perturbando os padrões sociais e demandando uma enorme quantidade de recursos econômicos (MATTIUZZI; LIPPI, 2019). No mundo, o risco de desenvolver câncer entre 0 e 74 anos é de 20,2% (22,4% em homens e 18,2% em mulheres) sendo registrados 19 milhões de casos em 2020. O Câncer de Mama (CM) é o mais incidente (46,3 por 100.000 pessoas) com 2,3 milhões de diagnósticos nesse mesmo ano. Destacam-se também o câncer de pulmão (11,4%) com 2,206,771 casos; e próstata (7,3%) com 1,414,259 casos (MATTIUZZI; LIPPI, 2019; GLOBOCAN, 2020). Quanto à mortalidade, o câncer de pulmão é o que mais mata (18,0% do total de mortes por câncer), seguido pelo câncer colorretal (9,4%), de fígado (8,3%), de estômago (7,7%) e CM feminino (6,9%). Por sexo, o câncer de pulmão é a principal causa de morte pela doença em homens, seguido pelo câncer de próstata e colorretal, porém o câncer de próstata é o mais comumente diagnosticado. Nas mulheres, o CM, além de ser o mais incidente, é também a principal causa de morte pela doença, seguido pelo câncer colorretal e de pulmão (SUNG PHD *et al.*, 2021).

Segundo estimativas publicadas na American Cancer Society's (2023), no ano de 2023, nos Estados Unidos, são esperados aproximadamente 1.958.310 casos de câncer, o equivalente

a cerca de 5.365 novos casos por dia. Destes, 300.590 serão de CM. A mortalidade chegará a 609.820 pessoas, correspondendo a quase 1.671 mortes por dia (SIEGEL; MILLER *et al.*, 2023)

No Brasil, entre os anos de 1978 a 2017 houve um aumento no número de casos de câncer em geral de 8,3% para 16,2% nos homens e de 9,1% para 18,3% nas mulheres (SILVA *et al.*, 2020). Segundo dados do INCA (2022), os homens apresentam maiores taxas de ocorrência de tumores em relação as mulheres. No Brasil estima-se que, entre 2023-2025, ocorrerão 704 mil novos casos de câncer a cada ano, sendo o de pele não melanoma o mais incidente, com 220 mil casos; seguido pelo de mama com cerca de 73.610 e próstata com 71.730 casos (Figura 2). No Brasil, os cânceres mais frequentes em mulheres para o triênio 2023-2025 estão representados na Figura 2.

Figura 2- Dados epidemiológicos mostrando a taxa de incidência de cânceres em mulheres no Brasil. Os dados são estimados para o triênio 2023-2025.

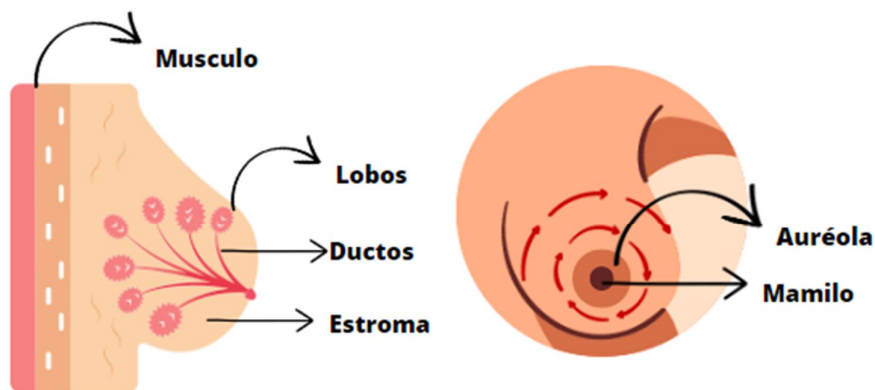


Fonte: ONCOGUIA, 2022.

1.2 Anatomofisiologia mamária

A mama é composta por tecido glandular, conjuntivo e adiposo, sendo responsável pela produção de leite durante a lactação. O leite é produzido pelos lóbulos mamários e conduzido por ductos até o mamilo. A mama adulta se encontra no musculo peitoral, localizada na caixa torácica, se estendendo do esterno até o centro da axila. A área formada por tecido mamário nas axilas é chamada de "cauda axilar de Spence". Cada mama possui de 15-25 lobos independentes, os quais são constituídos por um conjunto de lóbulos, sendo que cada lobo possui um ducto principal. A maioria dos casos de CM começa nas células epiteliais que revestem os ductos e lóbulos (BAZIRA *et al.*, 2022; ALEX *et al*2020) (Figura 3).

Figura 3: Representação anatômica da mama.



Fonte: autoria própria.

O microambiente em que as células epiteliais mamárias estão presentes é composto de estroma (incluindo matriz, adipócitos, fibroblastos e vasos sanguíneos) e células imunes. Alterações nesses componentes são associadas ao desenvolvimento de CM. Além disso, fazem parte da mama os vasos sanguíneos e linfáticos (HIEKEN, 2022; RIVARD *et al.*, 2021). O estrogênio é fundamental no desenvolvimento e manutenção do órgão, sendo responsável pelo crescimento dos ductos e maturação dos mamilos, agindo como um indutor de proliferação celular. É um hormônio lipossolúvel produzido pelos ovários e, em menor quantidade, pelas glândulas suprarrenais sendo estimulado pela hidrocortisona, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) e hormônios de crescimento. A hidrocortisona é importante para manter um bom funcionamento das glândulas suprarrenais, já o hormônio de crescimento altera o fluxo e o metabolismo das células, aumentando a glicose circulante para que haja desenvolvimento tecidual. Durante a adolescência, esse hormônio estimula a produção de IGF, o qual também é essencial na proliferação celular. Sua produção diminui na menopausa, em que há uma redução do tecido glandular e um aumento de células adiposas. A progesterona também é liberada pelos ovários e ajuda no desenvolvimento dos ductos terminais e das estruturas lóbulo-alveolares (BISTONI; FARHADI, 2015).

1.3 Câncer de Mama

O CM é uma doença caracterizada pelo crescimento rápido e desordenado de células que adquirem características anormais, podendo acometer os lobos e ductos mamários, originando os carcinomas lobular e ductal, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2015). Quando detectado precocemente e ainda localizado é passível de cura. Quando metastático pode atingir ossos, fígado, pulmão e cérebro (SUN *et al.*, 2017). Quanto aos sintomas, estes são indefinidos e inespecíficos, incluindo inchaço, surgimento de nódulo, irritação e/ou dor na mama, retração do mamilo, vermelhidão, espessamento da pele ou do mamilo, secreção pelos mamilos e linfonodos aumentados (ONCOGUIA, 2020)

No mundo, mais de 1,5 milhões de mulheres (25% da população feminina) são diagnosticadas com CM todos os anos (SUN *et al.*, 2017). No Brasil, depois do câncer de pele não melanoma, o de mama é o mais incidente em mulheres em todas as regiões. De acordo com estimativas do INCA de 2023 a 2025, as taxas anuais de CM por 100 mil mulheres no país irão atingir 39.330 na região sudeste; 15.690 na região nordeste; 11.230 na região sul; 4.950 na região centro-oeste e 2.410 na região norte. O CM é o tumor que mais mata mulheres no Brasil, principalmente após os 40 anos (INCA, 2022).

Há vários fatores intrínsecos e extrínsecos que podem influenciar o surgimento do CM. Dentre os intrínsecos destacam-se: sexo, idade, histórico familiar e hereditariedade. De fato, o CM é mais frequente em mulheres, estando diretamente relacionado à exposição aos hormônios estrogênio e progesterona (MANOUCHEHRI *et al.*, 2022). Nesse contexto, as chances aumentam quando a menarca é precoce, a menopausa tardia, e a primeira gravidez acontece tardiamente (SUN *et al.*, 2017). Além disso, cerca de quatro em cada cinco casos ocorrem após os 50 anos, o que evidencia o papel da idade na gênese desses tumores, com o acúmulo de alterações moleculares. De fato, essas são exacerbadas pelo comprometimento do funcionamento celular decorrente do envelhecimento. O histórico familiar e hereditariedade também são importantes. Quando há casos de CM na família, as chances de ocorrência da doença aumentam em 10%. Um estudo no Reino Unido avaliou 103.738 mulheres que tiveram CM, sendo que 15.520 participantes (15%) tinham histórico de CM na família. Essas participantes tiveram um risco relativo de 3,5 em comparação com aquelas sem parentes afetados (BREWER *et al.*, 2017). A suscetibilidade hereditária é parcialmente atribuída às mutações nos genes supressores tumorais, como *Breast Cancer* gene 1 ou 2 (*BRCA1* e *BRCA2*) localizados no cromossomo 17q21 e 13q12, respectivamente. Em 90% dos casos em que há mutação nesses genes, os tumores são mais agressivos e heterogêneos e as chances de CM em mulheres com mutação nesses genes são de 80% (PETRUCCELLI *et al.*, 2022; COELHO *et al.*, 2018).

A atividade física regular é considerada um comportamento protetor, reduzindo a exposição aos hormônios sexuais, alterando as respostas do sistema imunológico e, inclusive, modificando os níveis de fatores de crescimento. Por outro lado, a obesidade está associada a uma maior probabilidade de desenvolver a doença por aumentar o estado inflamatório e os hormônios circulantes. A ingestão de álcool também altera os níveis de estrogênios, resultando em desequilíbrio hormonal. Já o tabaco induz mutações nos genes supressores de tumor e alimentos ultraprocessados são ricos em sódio, gordura e açúcar, os quais conduzem à obesidade e ao estresse oxidativo. Observou-se que um aumento de 10% de alimentos ultraprocessados na dieta está associado a um risco 11% maior de CM. Por outro lado, uma dieta rica em vegetais, frutas, legumes, grãos integrais e proteínas magras reduz significativamente essa chance (ŁUKASIEWICZ *et al*, 2021).

Os números crescentes dos casos de CM no Brasil são associados às mudanças demográficas, como envelhecimento populacional, aumento da expectativa de vida e redução da fecundidade, somadas à obesidade. Embora a incidência do CM no Brasil seja menor do que nos EUA e em outros países europeus, a mortalidade pela doença é maior em todas as faixas etárias, em consequência do número de diagnósticos tardios (SILVA *et al.*, 2020). De fato, o CM, quando detectado nos estágios iniciais, possui 98% de chance de cura em cinco anos e, quando mais avançado, esse número cai para apenas 22%. O diagnóstico precoce, portanto, deve ser prioritário como estratégia de controle da doença, pois, quando avançado, há significativo comprometimento do sucesso terapêutico (ROY; SAIKIA, 2017).

A detecção do CM pode ser realizada através de exames de rotina, como a mamografia, associada a programas de rastreamento populacional. Consultas de rotina também são importantes, uma vez que o médico especialista faz a apalpação das mamas para verificar, clinicamente, alterações suspeitas. A sensibilidade da mamografia é de 46 a 80%, enquanto a especificidade atinge 82 a 99%. A ressonância magnética também pode ser realizada (NAZÁRIO *et al*, 2015). Contudo, o diagnóstico do CM depende da biópsia do tecido afetado. A avaliação patológica, assim como ensaios de imuno-histoquímica e citogenéticos são realizados a fim de se estabelecer as características do tumor (PARK *et al.*, 2022)

1.4 As classificações histológicas e moleculares dos tumores mamários

Histologicamente, tumores mamários podem ser classificados em carcinoma ductal e lobular. Carcinoma ductal é aquele originado nos ductos de leite, sendo o tipo mais comum de CM, contabilizando a cerca de 75% dos casos. Já o carcinoma lobular corresponde a cerca de

15% dos casos, sendo menos visível em mamografias quando comparado com o ductal. Ambos podem ser classificados em *in situ* ou invasivo. A expressão *in situ* vem do latim e quer dizer “no local natural”. O tumor nesse estágio não ultrapassa a membrana basal, ficando restrito ao seu local de origem. Os carcinomas invasivos são aqueles em que as células tumorais penetram nos tecidos vizinhos e são passíveis de metastização. A maioria dos carcinomas invasivos se desenvolvem nos ductos mamário, correspondendo a 75% dos casos, sendo que apenas 5-15% se originam nos lóbulos (VO *et al.*, 2019). Osso, pulmão, fígado e cérebro são os quatro sítios metastáticos mais comuns. A metástase cerebral prejudica as funções cognitivas e sensoriais dos pacientes, levando a uma qualidade de vida seriamente limitada, com baixa sobrevivência (WANG *et al.*, 2021).

O CM pode ser dividido em cinco estágios, indo de 0 a 4. O 0 é considerado inicial e corresponde ao tumor *in situ*. Em 1 as células cancerígenas ainda se limitam ao tecido glandular mamário, sem atingir os linfonodos, com menor chances de metástase. No estágio 2, as células transformadas podem atingir os linfonodos. O CM de estágio 3 é considerado localmente avançado, com comprometimento de nódulos linfáticos e podendo atingir parede torácica ou pele. Por fim, no estágio 4 o CM já se encontra metastatizado (TEICHGRAEBER *et al.*, 2021).

No tecido biopsiado, também é avaliada a expressão de diferentes marcadores como o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), os receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP) e o marcador de proliferação Ki67 (LIU *et al.*, 2020). Esses dados possibilitam qualificar os tumores em um dos quatro principais subtipos moleculares do CM, quais sejam: Luminal A, Luminal B, HE2-enriquecido (HER2E) e triplo-negativo (TN) (BUDNY *et al.*, 2019).

Carcinomas luminais representam a 75% dos tumores de mama, sendo positivos para RE e/ou RP. O subtipo luminal A é o mais comum, correspondendo de 50 a 60% dos casos, sendo menos agressivo e com baixo índice proliferativo (ki67<14%), não expressando HER2. O luminal B atinge de 15 a 20% das pacientes e são mais agressivos que o subtipo A. As lesões luminal B possuem menor expressão de receptores hormonais, ki67 > 14% e genes de proliferação celular superexpressos como *CCNB1* e *MYBL2*. Alguns expressam HER2 e são denominados luminal híbrido (ERBER *et al.*, 2020; TRAN *et al.*, 2011). O subtipo HER2E superexpressa apenas esse receptor, sendo negativo para RE e RP. Assim, o fator de crescimento epidérmico (EGF) estimula, de forma exacerbada, a proliferação de células malignas, sendo um indicador de pior prognóstico (ENSENYAT-MENDEZ *et al.*, 2021). No subtipo TN as células tumorais não expressam RE, RP e HER2 (AL-THOUBAITY, 2020; TSANG; TSE, 2019).

O subtipo TN abrange tumores com características heterogêneas, apresentando diferenças genéticas, transcricionais, histológicas e clínicas marcantes. São caracterizados por elevada instabilidade genética, genomas complexos e mutações recorrentes no gene *TP53* (DERAKHSHAN; REIS-FILHO, 2022). Dados epidemiológicos apresentados no artigo de Yin *et al.*, 2020 mostram que o CMTN ocorre principalmente em mulheres jovens, com menos de 40 anos. Além disso, em comparação com os outros subtipos, o tempo de sobrevida é mais curto, com mortalidade de 40% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. O CMTN é altamente invasivo e as metástases atingem, em geral, cérebro e órgãos viscerais (YIN *et al.*, 2020).

1.4.1 Os desafios no tratamento de tumores mamários

O principal desafio encontrado no controle do CM é quando este já se encontra metastatizado, de modo que a taxa de sobrevida das pacientes reduz para cerca de 29%, frente a 90,3% quando tratado em outros estágios (BURGUIN; DIORIO; DUROCHER, 2021). Dentre as estratégias de tratamento destacam-se a cirurgia e radioterapia, realizadas localmente, e os métodos sistêmicos de hormonioterapia, terapia-alvo, imunoterapia e quimioterapia.

A cirurgia é um procedimento que consiste em remover o tumor, sendo a técnica mais antiga e ainda amplamente utilizada. No século XIX, a prática predominante consistia na remoção radical e desfigurante da mama. Atualmente, a cirurgia conservadora é amplamente empregada, sem comprometimento do prognóstico da paciente (MAGNONI *et al.*, 2021). Com o avanço técnico, a cirurgia oncoplástica vem sendo disseminada. Contudo, adiciona uma complexidade extra ao processo, o que impacta na tomada de decisões de terapias subsequentes (adjuvantes) (CAZIUC *et al.*, 2021; METZ *et al.*, 2022).

A radioterapia é utilizada para controlar o crescimento de tumores, sendo uma técnica adjuvante comprovadamente importante para a sobrevida das pacientes (METZ *et al.*, 2022). A radioterapia, contudo, pode causar efeitos adversos no organismo, pois aumenta a carga mutacional e induz o estresse celular, bem como a morte celular imunogênica, expondo o organismo a uma ineficiência imunológica (ALFONSO *et al.*, 2019).

A hormonioterapia controla o estímulo hormonal e, por conseguinte, a proliferação celular. Dentro do CM, a hormonioterapia pode ser utilizada como adjuvante ou paliativa, sendo elegíveis as pacientes positivas para RE e/ ou RP, portanto, para o subtipo luminal. Além disso, para mulheres com alto risco de desenvolver a doença, a hormonioterapia pode ser usada como prevenção (PADILHA *et al.*, 2013). No CM, os medicamentos utilizados bloqueiam a ligação dos hormônios aos seus receptores nas células cancerígenas (como o Tamoxifeno e o

Toremifeno) ou diminuem a produção de hormônios no organismo (como Letrozol, Anatozol e Exesmetano), para retardar ou interromper o crescimento das células malignas que possuem receptores hormonais (DRĂGĂNESCU; CARMOCAN, 2017).

Na terapia alvo adotam-se estratégias baseadas no perfil molecular do tumor. Lesões que superexpressam HER2, por exemplo, são tratadas com anticorpos monoclonais específicos a esse oncogene. Também podem ser utilizados inibidores da enzima Poli Adenosina difosfato Ribose Polimerase (PARP) para pacientes com CM portadoras de mutações no gene *BRCA*. Esses genes são supressores tumorais e as PARP são responsáveis por reparar o DNA danificado. Assim, células multadas em *BRCA* e tratadas com os inibidores acumulam danos de forma exacerbada, sinalizando para a apoptose (SHIEN; IWATA, 2020).

Já a imunoterapia é um tratamento inovador que modula dinamicamente o sistema imunológico para atacar as células cancerígenas. É utilizada, principalmente, para regular o microambiente tumoral (TAN *et al*, 2020). O tumor consegue evitar o reconhecimento e consequente eliminação pelo sistema imunológico ao expressar proteínas de *checkpoint* como antígeno-4 de linfócitos T citotóxicos (CTLA-4). No CM podem ser empregados inibidores de PD-1 (proteína de morte programada 1) que é codificada pelo gene *PDCD1*. PD-1 se liga aos receptores PD-L1 de células tumorais e imunológicas, funcionando como um sinal para que os linfócitos T não ataquem aquelas células transformadas. Assim, ao bloquear PD-1, o organismo consegue aumentar a resposta imunológica contra essas células cancerígenas. Adicionalmente, nos últimos anos, vacinas direcionadas ao CM vêm sendo testadas em ensaios clínicos. Há um esforço em se produzir vacinas peptídicas derivadas de HER2 para imunoterapia ativa, visando redefinir o sistema imunológico para um estado de vigilância antitumoral. A imunoterapia com o uso de vacinas baseia-se na capacidade do sistema imunológico de diferenciar entre autoantígenos, expressos normalmente na superfície das células, e aqueles superexpressos em células transformadas, como HER2 (HUANG *et al.*, 2022; ARAB *et al.*, 2020).

Finalmente, a quimioterapia é um tratamento em que se utilizam medicamentos tóxicos às células tumorais, indicada para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia ou radioterapia e para tratar cânceres localmente avançados antes da intervenção cirúrgica (quimioterapia neoadjuvante). Também é adotada após esses procedimentos para destruir células tumorais circulantes (quimioterapia adjuvante) (WANG; MAO, 2020). Pode ser administrada de forma intravenosa ou por via oral (PROVENZANO, 2021). Suas principais limitações são o baixo acúmulo de medicamentos no tumor, a indução de resistência das células cancerígenas contra múltiplas drogas e os efeitos colaterais adversos como náuseas e vômitos, perda de cabelo,

fadiga, diarreia, perda do apetite, hematomas, pele seca, anemia, entre vários outros (WEI *et al*, 2021).

É importante ressaltar a importância de se descobrir novos tratamentos para o CM que sejam menos tóxicos para as células saudáveis e que tenham menos efeitos colaterais. Apesar das terapias anteriormente citadas melhorarem a sobrevivência das pessoas a longo prazo, alguns pacientes não são elegíveis, as células tumorais se tornam resistentes ao tratamento ou os efeitos adversos são severos. As plantas têm uma grande variedade de compostos bioativos com amplo potencial terapêutico, sendo exploradas desde os tempos mais antigos. Flavonóides, carotenóides, alcalóides e fenólicos são alguns dos componentes vegetais mais pesquisados com atividade antitumoral. Portanto, pesquisar e estudar novos extratos naturais é imprescindível para a descoberta de novos tratamentos para o CM (KARAMANOU *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2018).

1.5 Produtos naturais no controle de tumores

Historicamente, produtos naturais e seus análogos estruturais contribuem de forma decisiva no tratamento de doenças crônicas e infecciosas (ATANASOV *et al.*, 2021). De fato, há uma relação entre dieta, nutrição e prevenção/tratamento do câncer. O consumo de soja, frutas e vegetais (especialmente vegetais crucíferos), por exemplo, é associado à redução do risco de CM (LI *et al*, 2017). Além disso, componentes bioativos de uma dieta rica em produtos naturais podem auxiliar na regulação negativa da expressão e atividade do RE, inibindo a proliferação, metástase e angiogênese, além de sensibilizar células tumorais mamárias à radioterapia e quimioterapia (LI *et al*, 2017).

Extratos vegetais são fontes interessantes de compostos biologicamente ativos (MAJTAN *et al*, 2021), desempenhando um papel muito importante no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos. A morfina, por exemplo, é derivada do ópio produzido por vagens de sementes cortadas da papoula *Papaver somniferum* (GUO *et al*, 2021). Na oncologia, esses compostos também têm se mostrado preponderantes para os avanços na área sendo que, em 70 anos, foram introduzidos cerca de 175 fármacos antitumorais, dos quais 49% são de fontes naturais. Um exemplo a ser citado é o Paclitaxel, de nome comercial Taxol®, um importante fármaco utilizado no tratamento de CM, isolado da casca do Teixo do Pacífico (RODRIGUES, 2018). O alcaloide vincristina é derivado da espécie da flora brasileira *Catharanthus roseus*, também é utilizado no tratamento do câncer (AYOB *et al*, 2017). Além disso, produtos naturais apresentam diferentes estruturas químicas e amplo espectro de ação,

sendo aplicáveis a situações clínicas adversas, incluindo no tratamento da resistência terapêutica (YANG *et al*, 2022).

A flora brasileira possui uma imensa diversidade de espécies. O gênero *Eremanthus*, da família *Asteracea* tem recebido especial atenção. A *Eremanthus erythropappus* (Figura 4), conhecida popularmente como Candeia, ocorre em áreas de solo pouco fértil, normalmente campos com altitude variando entre 900 e 1.700 m. Seu caule possui um indumento aveludado de cor cinza; as folhas são pecioladas com formato elíptico e cor verde escura; suas flores possuem corola indumento ápice (DUTRA *et al*, 2010). Ela é encontrada no Brasil, Argentina e Paraguai. No Brasil ocorre principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. É utilizada para produção de óleos essenciais com alfa-bisabolol, um de seus compostos ativos com propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antimicóticas, dermatológicas e espasmódicas. Além disso, esse componente aparece na literatura como tendo propriedades antitumorais. Já foi descrita sua atividade citotóxica em células tumorais de fígado, pulmão, pancreático e em leucemia. Sendo assim, o extrato de *Eremanthus erythropappus* se torna promissor na área oncológica (LIMA FILHO *et al*, 2020; SALUSTIANO *et al*, 2006).

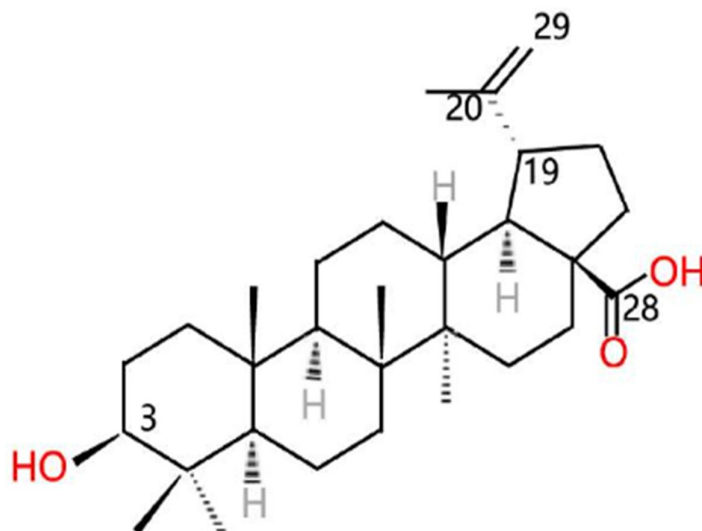
Figura 4- *Eremanthus erythropappus*.



Fonte: (Loeuille, 2016).

O ácido betulínico é um triterpenoide pentacíclico do tipo lupano (3-beta-hydroxy-lup20(29)-en-28-oic acid) (Figura 5), amplamente distribuído no reino vegetal (LOU *et al*, 2021). Possui atividade antitumoral, anti-inflamatório, antiviral, antibacteriano, antimalárico, imunomodulatório, hepatoprotetor e antidepressivo (Csuk *et al*, 2006). Além disso, pode aumentar a sensibilidade a drogas quimioterápicas e é menos tóxico para células não tumorais (JIANG *et al*, 2021).

Figura 5- Estrura do ácido betulínico.



Fonte: (LOU et al, 2021)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade *in vitro* do extrato clorofórmico e do ácido betulínico obtidos de *E. erythropappus* em células de CM.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos a células mamárias não-tumorigênica e tumorais;
- Definir sua seletividade;
- Determinar o potencial do extrato clorofórmico e do ácido betulínico em alterar a viabilidade de células representativas de diferentes subtipos tumorais;
- Avaliar a clonogenicidade de células de CMTN após tratamento com o composto mais promissor;
- Definir o potencial dos extratos enquanto estratégia para o tratamento do CM.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos extratos e linhagens celulares

O extrato clorofórmico (EAT21) foi obtido das folhas de *E. erythropappus* e o ácido betulínico (EAT22) posteriormente isolado conforme protocolo estabelecido pelo laboratório pelo Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho. Assim, foram gentilmente cedidos para a realização dos ensaios celulares.

Para este trabalho foram utilizadas quatro linhagens celulares. A MCF-10A (não tumorigênica) foi cultivada em meio DMEM/F-12, suplementada com 10 ng/mL de EGF, 500 ng/mL de hidrocortisona e 10 µg/mL de insulina. A MCF-7 (luminal) foi cultivada em meio RPMI. A MDA-MB-453 (HER2+) foi mantida em meio IMDM e, finalmente, a linhagem MDA-MB-231 (TN) foi cultivada em meio L15. Em todos os cultivos foram adicionados 10% de soro fetal bovino (FBS) e 50µg/mL de gentamicina. As linhagens foram incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida de 5% de CO₂. Apenas as células MDA-MB-231 foram mantidas sem CO₂. Os meios foram trocados em dias alternados e quando as células atingiram 80% de confluência foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

3.2 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando o reagente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) em placa de 96 poços, conforme estabelecido por Mosmann, (1983), com algumas modificações (Figura 6). Após confluência, as células foram desagregadas enzimaticamente e solubilizadas em azul de tripano, para que, assim, aquelas viáveis fossem contadas em câmara de Neubauer. Foram plaqueadas $1,5 \times 10^4$ células MCF-10A; $3,0 \times 10^3$ MCF7; $5,0 \times 10^3$ MDA-MB-453 e $1,5 \times 10^4$ MDA-MB-231. As placas foram incubadas por 16 horas para aderência.

Os dois compostos foram diluídos em DMSO (Dimetilsulfóxido), adicionados em diferentes concentrações finais (7 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL, 62 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL) e incubados durante 24 h e 48 h em condições ideais. Após cada incubação, 150 µl do MTT a 0,5 mg/mL foram acrescentados e as placas novamente incubadas por 4 horas, quando, então, 200 µl de DMSO foram pipetados para solubilização dos cristais de

formazan. Finalmente, os poços foram lidos a 570 nm em leitora Thermo Plate TP-Reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). A viabilidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

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

Sendo:

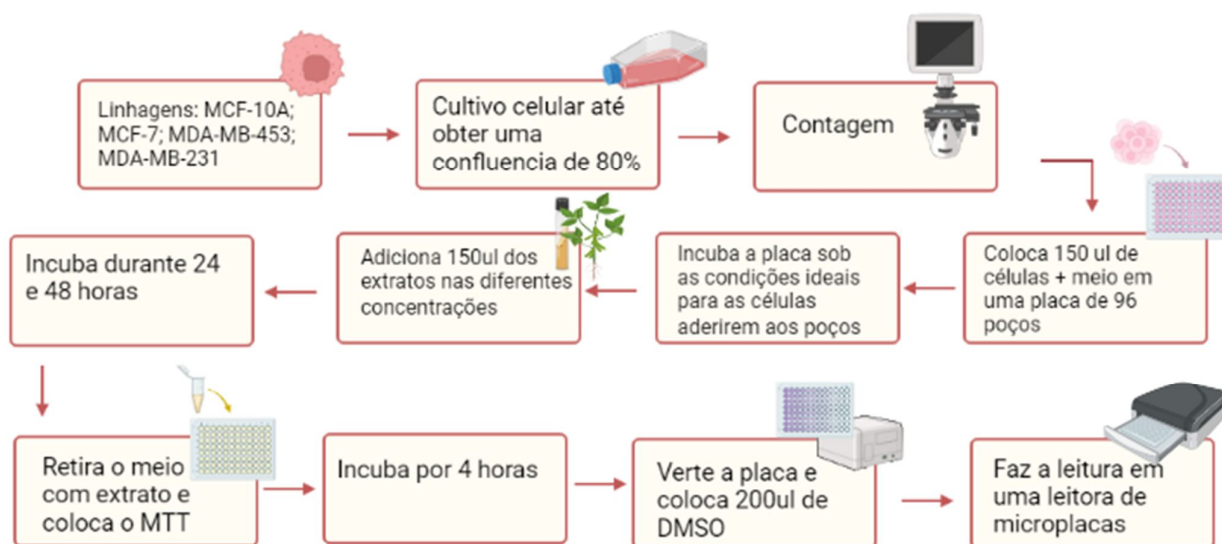
AA = Absorbância da Amostra

ABSC = Absorbância do controle negativo (células não tratadas)

ADMSO = Absorbância do controle de tratamento (células tratadas com DMSO)

Foi calculada a concentração capaz de inibir em 50% o crescimento celular (IC_{50}) e determinado o índice de seletividade (IS), pela razão entre o IC_{50} das células MCF-10A e o IC_{50} das células tumorais. Os valores de $IS \geq 2$ foram considerados significativos (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

Figura 6- Diagrama representativo do ensaio de citotoxicidade realizado no presente estudo.



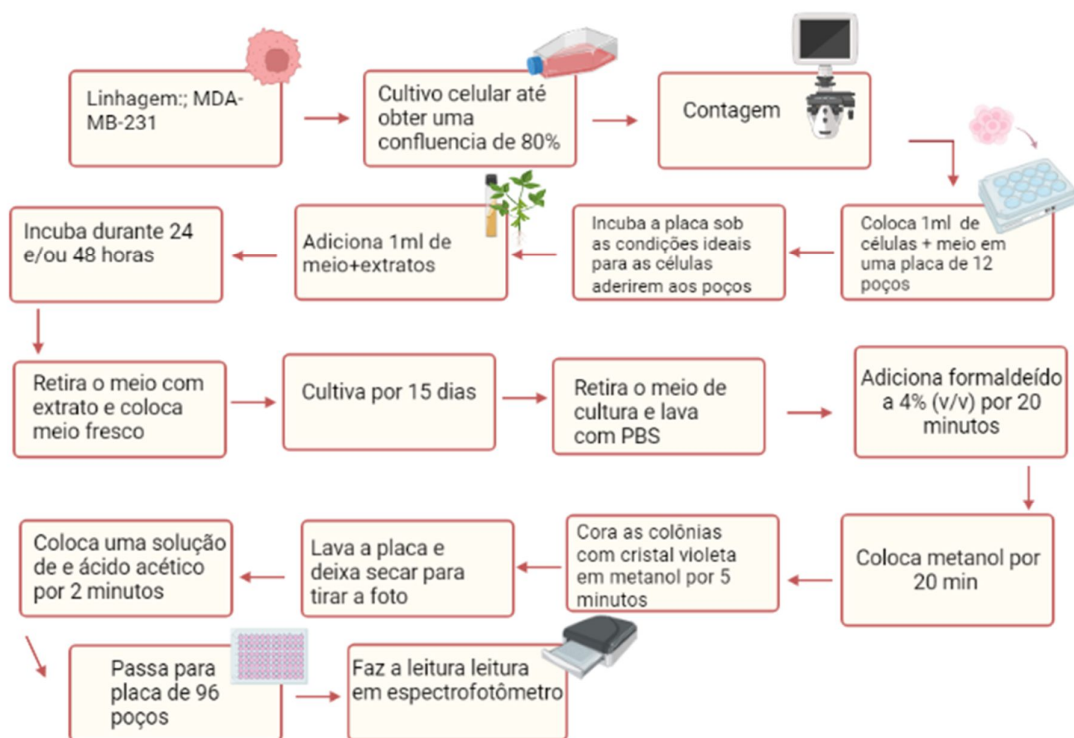
Fonte: autoria própria.

3.3 Ensaio clonogênico

A capacidade proliferativa das células foi mensurada pelo ensaio clonogênico (Figura 7). Os tratamentos foram estabelecidos a partir da IC_{50} , calculado a partir do ensaio de MTT. O ensaio clonogênico avalia a capacidade de uma única célula de formar colônias, estimando seu potencial ilimitado de divisão (FRANKEN *et al.*, 2006), estabelecendo uma relação entre a dose do tratamento e a fração de células que mantem sua capacidade reprodutiva (RAFEHI *et al.*, 2011; MUNSHI *et al.*, 2019). Este ensaio foi conduzido apenas na linhagem de CMTN, conhecidamente mais agressiva (DERAKHSHAN *et al.*, 2022).

Foram plaqueadas 500 células MDA-MB-231 por poço em uma placa de 12 poços, mantida em condições ideais para aderência. Posteriormente, as células foram tratadas por 48 horas com o composto EAT22, a 7 $\mu\text{g/mL}$. Após esse tempo, o meio contendo tratamento foi trocado por meio novo completo e o cultivo mantido por 15 dias, com trocas a cada três dias. Transcorrido o período total, o meio de cultivo foi retirado, os poços lavados com tampão fosfato salino (PBS) para remoção de debris celulares e adicionado formaldeído a 4% (v/v) por 20 minutos para fixação das colônias nos poços. Por fim, estas foram coradas com cristal violeta (0,5% m/v) diluído em metanol (25% v/v) por 5 minutos. A placa foi, então, lavada com água ultrapura e, após secagem em temperatura ambiente, fotos das colônias foram capturadas em fotodocumentador IBright (Invitrogen). Posteriormente, foi adicionada uma solução de ácido acético 33% (v/v) por 2 minutos nos poços e realizada a leitura na Thermo Plate, TP-Reader no comprimento de onda de 570 nm.

Figura 7- Diagrama representativo do ensaio clonogênico realizado neste estudo.



Fonte: Autoria própria.

3.4 Análises estatísticas

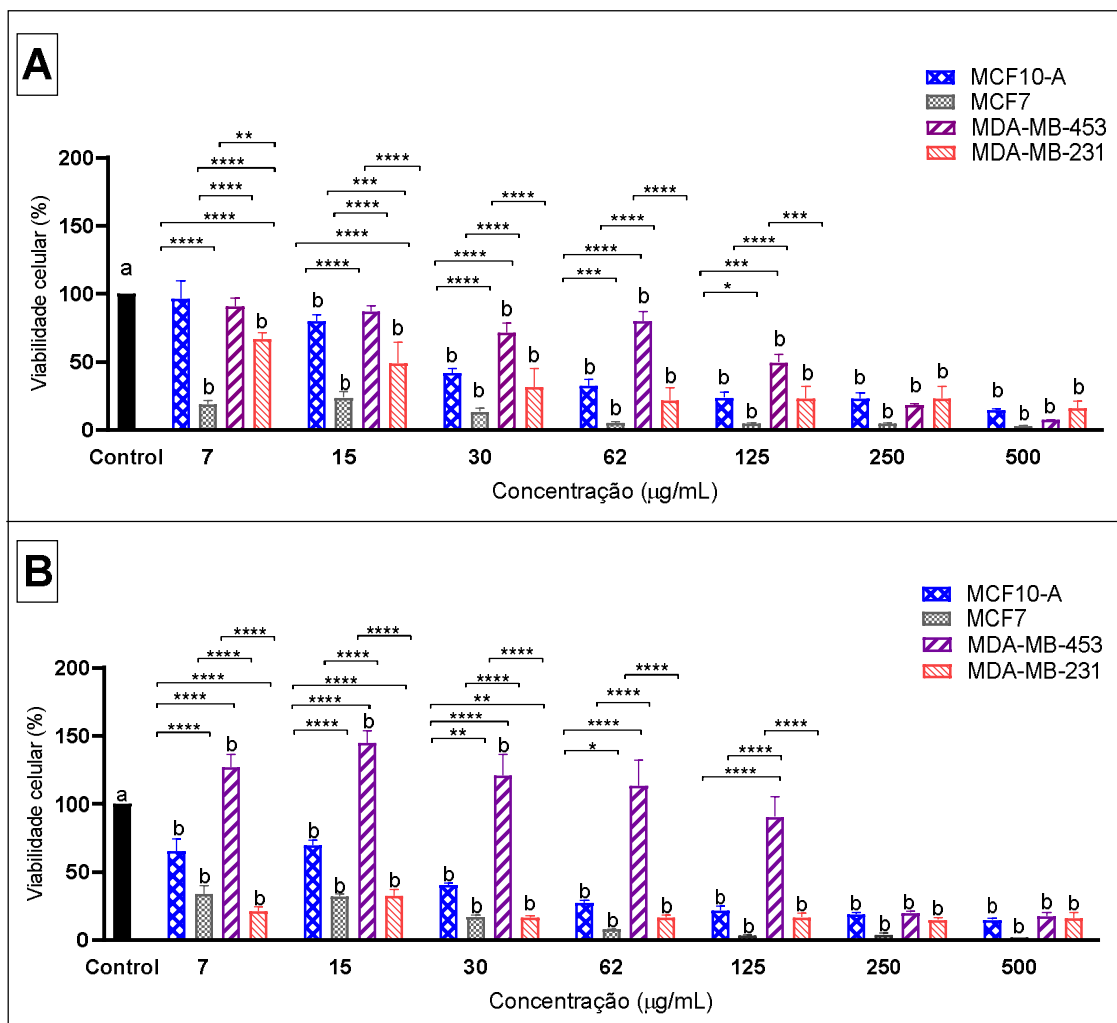
Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 7.0. A distribuição dos dados foi avaliada por Shapiro-Wilk e, então, aplicado o teste ANOVA – pós-teste de Tukey para a comparação dos grupos referentes ao ensaio de citotoxicidade. Para o ensaio de clonogenicidade foi utilizado o teste *t* de Student. Os dados foram representados com média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicata. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O IC_{50} foi calculado por regressão não linear.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade do extrato EAT21 às linhagens mamárias encontra-se representada na Figura 7. Após 24 horas (Figura 8A), houve uma diminuição em mais de 80% da viabilidade da linhagem luminal, MCF7, já na concentração de 7 μ g/mL. A linhagem TN apresentou uma resposta dose-dependente ao tratamento, com citotoxicidade de 50% observada quando o extrato foi introduzido a partir de 30 μ g/mL. A linhagem não tumorigênica seguiu o mesmo perfil de resposta que a linhagem tumoral MDA-MB-231. Após 48 horas (Figura 8B), EAT21 não se mostrou mais citotóxico às células MCF7, as quais mantiveram o percentual de viabilidade do tempo anterior. O extrato se tornou mais citotóxico às células TN, com redução em 80% da viabilidade já na concentração de 7 μ g/mL. A linhagem não tumoral foi ainda mais sensível ao tratamento após 48 horas. A linhagem MDA-MB-453 não foi responsiva aos tratamentos em nenhum dos períodos estabelecidos no estudo.

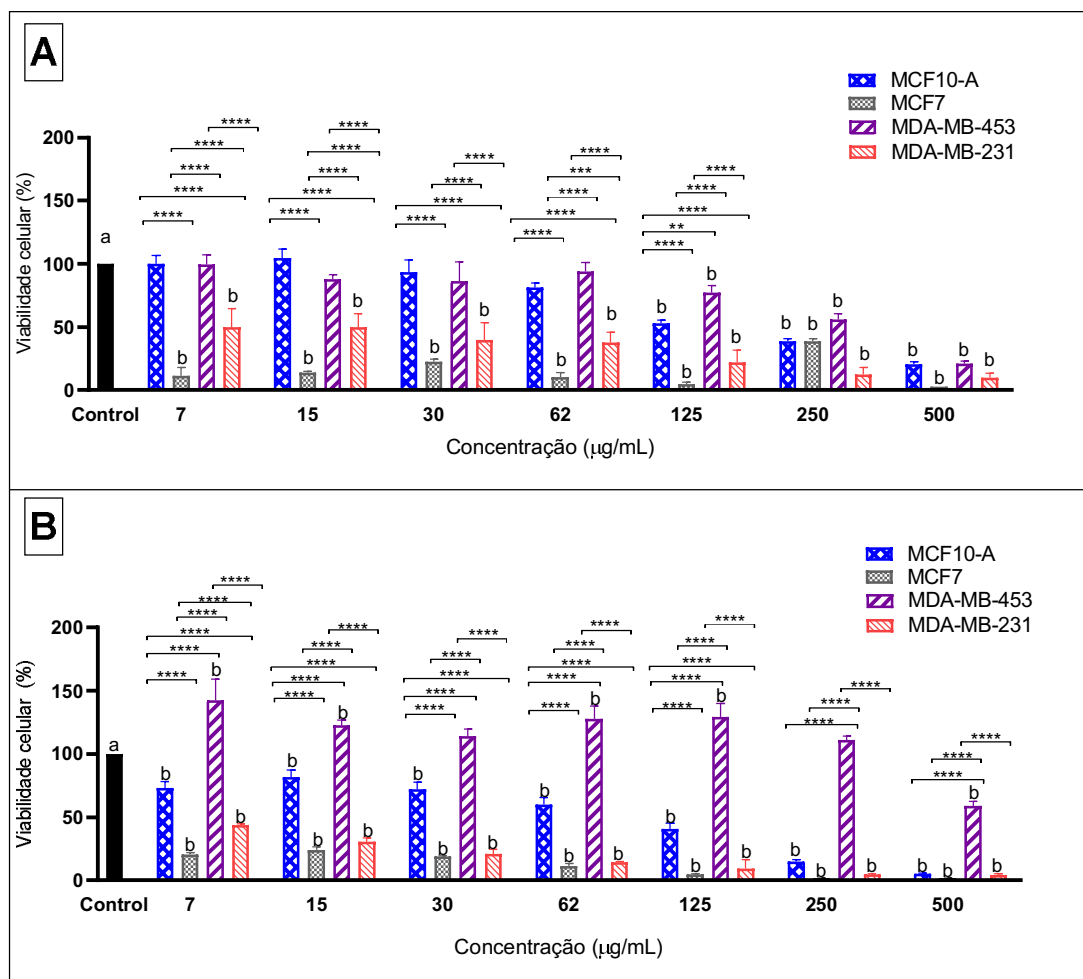
Figura 8- Viabilidade das linhagens mamárias MCF10-A (não-tumorigênica), MCF7 (câncer de mama luminal), MDA-MB-231 (câncer de mama triplo-negativo) e MDA-MB-453 (câncer de mama HER2-positivo) após tratamento com o extrato clorofórmico de *E. erythropappus* (EAT21). (A) tratamento por 24 horas. (B) tratamento por 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas apenas com meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



A citotoxicidade do ácido betulínico (EAT22) foi avaliada nas mesmas linhagens. Após 24 horas (Figura 9A), o composto foi mais ativo tanto para a linhagem MCF7 quanto para MDA-MB-231. Quando utilizado a 7µg/mL, reduziu em 80% a viabilidade da linhagem luminal e 40% da TN. Não foi observada citotoxicidade na linhagem não tumoral até a concentração de 125µg/mL. Após 48 horas (Figura 9B), a citotoxicidade para as células MCF7 e MDA-MB-231 foi ainda mais expressiva, chegando a mais de 50% já na primeira concentração na linhagem TN enquanto reduziu em apenas 20% da viabilidade da linhagem

não tumoral. Novamente, não foi observada citotoxicidade significativa para a linhagem MDA-MB-453 após 24 e 48 horas.

Figura 9- Viabilidade das linhagens mamárias MCF10-A (não-tumorigênica), MCF7 (câncer de mama luminal), MDA-MB-231 (câncer de mama triplo-negativo) e MDA-MB-453 (câncer de mama HER2-positivo) após tratamento com ácido betulínico de *E. erythropappus* (EAT22). (A) tratamento por 24 horas. (B) tratamento por 48 horas. O asterisco indica significância estatística (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas apenas com meio de cultivo. Tratamentos identificados com a letra b diferiram do controle.



A Tabela 1 apresenta os dados de IC_{50} e IS referentes aos tratamentos realizados. A linhagem luminal foi nitidamente a mais sensível aos tratamentos e, por conseguinte, nessas células, os compostos apresentaram maior seletividade, a qual não foi calculada por seu IC_{50} ser inferior a 7 µg/mL após 24 e 48 h. Já a linhagem MDA-MB-231, ao ser tratada com EAT21, apresentou IC_{50} de 14,99 µg/mL após 24h com IS = 2,4. Após 48h, a seletividade aumentou,

uma vez que seu IC_{50} foi menor que $7 \mu\text{g/mL}$. Quando essas células TNs foram tratadas com EAT22, o IC_{50} foi menor que $7 \mu\text{g/mL}$ tanto em 24 h quanto em 48 h. Foi possível observar que EAT22 foi mais ativo e seletivo às células MDA-MB-231 do que EAT21.

Tabela 1- Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento celular (IC_{50}) e índice de seletividade (IS) do extrato clorofórmico de *E. erythropappus* e ácido betulínico nas células mamárias MCF10-A (não-tumorigênica), MCF7 (câncer de mama luminal), MDA-MB-231 (câncer de mama triplo-negativo) e MDA-MB-453 (câncer de mama HER2-positivo).

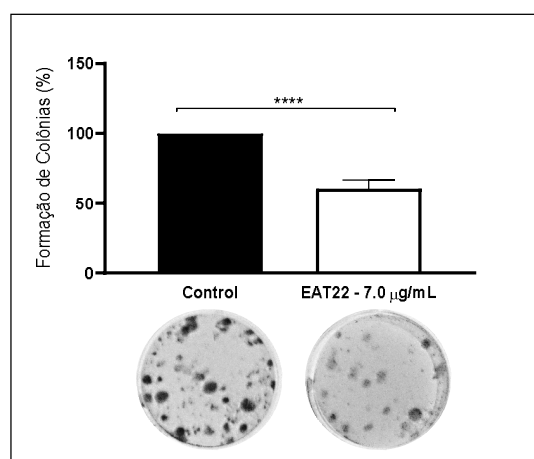
Extratos	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)							
	24 h				48 h			
	MCF10-A	MCF7	MDA-MB-453	MDA-MB-231	MCF10-A	MCF7	MDA-MB-453	MDA-MB-231
EAT21	36,09	< 7,0*	126,07	14,99#	26,48	< 7,0*	144,9	< 7,0*
EAT22	117,1	< 7,0*	289,7	< 7,0*	96,12	< 7,0*	272,2	< 7,0*

IS = 2,4; *IS > 2,0 (não calculado devido ao $IC_{50} < 7 \mu\text{g/mL}$)

4.2 Ensaio clonogênico

O teste clonogênico foi realizado nas células MDA-MB-231, representativas do subtipo TN. Estas foram tratadas com EAT22 por 48 horas, na concentração de $7 \mu\text{g/mL}$. Novamente, o ácido betulínico foi ativo nessas células reduzindo em 40% a sua capacidade de formar colônias (Figura 10)

Figura 10- Clonogenidade das células MDA-MB-231 (câncer de mama triplo-negativo) após tratamento com ácido betulínico (EAT22) por 48 horas. O asterisco indica significância estatística (**** $p < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas apenas com meio de cultivo.



4 DISCUSSÃO

Células tumorais são capazes de sustentar a sinalização proliferativa, não responder a supressores de crescimento; resistir à morte celular, manter a imortalidade replicativa; ativar mecanismos de invasão e metástase; desregular o metabolismo celular e evitar a destruição imunológica (HANAHAN; MONJE, 2023). O CM é o mais comum em mulheres em todo o mundo, além de ser a principal causa de morte relacionada à doença (BODEWES *et al.*, 2022). Seu subtipo TN é agressivo, sendo que cerca de 30% dos pacientes com esses tumores em estágio inicial desenvolvem metástases. A quimioterapia permanece como o tratamento sistêmico indicado para o CMTN, com efeitos colaterais preocupantes e com quadros de resistência terapêutica (WON; SPRUCK, 2020). No presente estudo, investigamos a citotoxicidade de EAT21 e EAT22, obtidos da espécie *E. erythropappus*, em células de CM, esperando verificar uma ação potencial em células representativas do subtipo TN.

Os produtos naturais são utilizados desde a antiguidade como forma de tratar diversas doenças, inclusive o câncer. Atuam por diferentes mecanismos e, em geral, apresentam baixa toxicidade sistêmica (SVOLACCHIA *et al.*, 2023). Interessantemente, produtos naturais são capazes de modular, por exemplo, o metabolismo de estrogênio em CM Luminal A, sinalização de HER-2 em CM HER2E e a sinalização associada ao gene para retinoblastoma (RB) no CNTN (TELANG, 2023). Portanto, são fontes interessantes de compostos bioativos (MITRA; DASH, 2018) de modo que sua caracterização inicial é baseada em ensaios de citotoxicidade, como o ensaio de MTT utilizado em nosso estudo. De fato, o MTT é um dos métodos colorimétricos mais populares para o *screening* inicial de compostos potencialmente antitumorais (NGA *et al.*, 2020).

O MTT é um sal que possui um núcleo de anel tetrazólico quaternário que é reduzido pelas enzimas oxidoredutases dependentes de NADPH presentes nas mitocôndrias. Essa reação resulta na formação de uma molécula insolúvel em água azul-violeta chamada formazan. (GHASEMI *et al.*, 2021). É um teste preciso e fácil, que direciona ensaios subsequentes (ROMIJN *et al.*, 1988). Observamos que o extrato EAT21 foi mais ativo na linhagem de CMTN após 48 horas de tratamento. Isso sugere um papel importante de sua metabolização para a obtenção dos efeitos biológicos esperados. Ao ser metabolizado, os componentes do extrato têm sua química alterada, o que pode melhorar seus efeitos citotóxicos (LI *et al.*, 2020). O ácido betulínico, por sua vez, se mostrou ativo já na menor concentração e no menor tempo de

tratamento (24 horas). Nesse contexto, sugerimos que o efeito observado em EAT21 decorre da sua metabolização e a possível liberação do ácido betulínico após 48 horas.

Assim, o ácido betulínico se mostrou altamente citotóxico à linhagem MDA-MB-231 e diminuiu a clonogenicidade dessas células. Nossos resultados encontram-se alinhados a estudos prévios. Zheng *et al.* (2019) testaram o ácido betulínico nas linhagens MDA-MB-231 e BT-549 e observaram a inibição da invasão e migração dessas células. Zeng *et al.* (2018) também relataram uma diminuição no número de colônias da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com o composto. Güttler *et al.* (2022) verificou que o ácido betulínico aumenta a radiosensibilização das linhagens MCF7 e MDA-MB-231, aumentando a hipóxia e regulando genes. Já Weber *et al.* (2014) descreveram seu potencial em inibir a angiogênese. O ácido betulínico é uma saponina triterpenóide pentacíclica e, conforme dados da literatura, regula fatores de transcrição, além de ciclina D1 e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) (POTZE *et al.*, 2014). Nossos dados também demonstraram que o ácido betulínico é altamente seletivo, o que indica menos efeitos adversos no organismo. Assim, nossos dados corroboram a importância de se explorar o ácido betulínico no tratamento de neoplasias malignas.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos citotóxicos e a seletividade do extrato clorofórmico de *E. erythropappus* e do ácido betulínico nas linhagens MCF10, MCF7, MDA-MB-453 e MDA-MB-231, após 24 e 48 horas de tratamento. O ácido betulínico se mostrou mais ativo para a linhagem de CMTN, sendo significativamente seletivo e inibindo sua capacidade formação de colônias. Portanto, o ácido betulínico é potencialmente promissor no tratamento de tumores de mama agressivo e necessita ser amplamente explorado na oncologia.

REFERÊNCIAS

ALABDULKAREEM, H.; PINCHINAT, T.; KHAN, S.; LANDERS, A.; CHRISTOS, P.; SIMMONS, R.; MOO, T. The impact of molecular subtype on breast cancer recurrence in young women treated with contemporary adjuvant therapy. *The Breast Journal*, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 148-153, 14 jul. 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/tbj.12853>.

ALEX, A.; BHANDARY, E.; MCGUIRE, K. Anatomy and Physiology of the Breast during Pregnancy and Lactation. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, [S.L.], p. 3-7, 2020. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-41596-9_1.

ALFONSO, J.; POLESZCZUK, J.; WALKER, R.; KIM, S.; PILON-THOMAS, S.; CONEJO-GARCIA, J.; SOLIMAN, H.; CZERNIECKI, B.; HARRISON, L.; ENDERLING, H. Immunologic Consequences of Sequencing Cancer Radiotherapy and Surgery. *Jco Clinical Cancer Informatics*, [S.L.], n. 3, p. 1-16, dez. 2019. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/cci.18.00075>

AL-THOUBAITY, F. Molecular classification of breast cancer: a retrospective cohort study. *Annals Of Medicine And Surgery*, [S.L.], v. 49, p. 44-48, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amsu.2019.11.021>

ARAB, A. et al. HER2-Positive Breast Cancer Immunotherapy: A Focus on Vaccine Development. *Vaccines for HER2-positive Breast Cancer*, [s. l.], 9 jan. 2020. DOI 10.1007/s00005-019-00566-1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7223380/>. Acesso em: 21 abr. 2023.

ARRAES, C. Os dados sobre câncer no mundo e no Brasil em 2020 e projeção para 2040: dados do GLOBOCAN. 8 mar. 2021. Disponível em: <https://realinstitutedeoncologia.com.br/os-dados-sobre-cancer-no-mundo-e-no-brasil-em-2020-e-projecao-para-2040-dados-do-globocan/#:~:text=Os%20dados%20publicados%20de%20expectativa,70%25%20de%20todas%20as%20mortes>. Acesso em: 30 mar. 2022.

ATANASOV, A. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. [s. l.], 28 jan. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7841765/>. Acesso em: 2 maio 2022.

BAZIRA, P. et al. Anatomy and physiology of the breast. [s. l.], fev. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026393192100260X>. Acesso em: 17 set. 2022.

BISTONI, G.; FARHADI, J. Anatomy and physiology of the breast. *Plastic And Reconstructive Surgery*, [S.L.], p. 477-485, 27 mar. 2015. John Wiley & Sons, Ltd.
<http://dx.doi.org/10.1002/9781118655412.ch37>.

BODEWES, F.T.H.; VAN ASSELT, A.A.; DORRIUS, M.D.; GREUTER, M.J.W.; BOCK, G.H. de. Mammographic breast density and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *The Breast*, [S.L.], v. 66, p. 62-68, dez. 2022. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2022.09.007>.

BORGES, Larissa et al. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS SECONDARY PLANT METABOLITES. [s. l.], fev. 2020.

BREWER, H. et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. [s. l.], 3 jun. 2017. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-017-4325-2>. Acesso em: 7 jan. 2023

BUDNY, A. et al. Epidemiology and diagnosis of breast cancer. [s. l.], 27 maio 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31152530/>. Acesso em: 9 jan. 2023.

BURGUIN, A.; DIORIO, C.; DUROCHER, F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *Common Treatments for All Breast Cancer Subtypes*, [s. l.], 19 ago. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8399130/>. Acesso em: 17 jun. 2022.

CAVALIERI, Elisabetta et al. α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. [s. l.], 12 mar. 2004. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14975741/>. Acesso em: 15 out. 2023.

COELHO, A. et al. Hereditary predisposition to breast cancer and its relation to the BRCA1 and BRCA2 genes: literature review. *Câncer de mama hereditário*, [s. l.], 12 abr. 2018. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/predisposicao-hereditaria-ao-cancer-de-mama-e-sua-relacao-com-os-genes-brca1-e-brca2-revisao-da-literatura/#:~:text=Os%20mais%20importantes%20genes%20supressores,de%20o%20v%C3%A1rio%20em%20sua%20vida>. Acesso em: 15 set. 2022.

CSUK, René; Schmuck, Kianga; Schäfer, Renate. A practical synthesis of betulinic acid. *Tetrahedron letters*, v. 47, n. 49, p. 8769-8770, 2006.

DAI, Xiaoshuo et al. Dihydroartemisinin: A Potential Natural Anticancer Drug. [s. l.], 16 jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33613116/>. Acesso em: 24 out. 2023.

DERAKHSHAN, Fatemeh et al. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. [s. l.], 24 jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35073169/>. Acesso em: 23 out. 2023.

DUTRA, R.; FERRAZ, S.; PIMENTA, D.; SOUSA, O. Caracterização morfoanatômica das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeisch, Asteraceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 818-824, dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000003>.

DRĂGĂNESCU, M.; CARMOCAN, C. Hormone Therapy in Breast Cancer. Hormone therapy, [S.L.], v. 112, n. 4, p. 413, 2017. Celsius Publishing House. <http://dx.doi.org/10.21614/chirurgia.112.4.413>. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28862117/>.

EMENS, L. et al. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. Recent Clinical Advances in Breast Cancer Immunotherapy, [s. l.], 8 ago. 2017. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/24/3/511/81112/Breast-Cancer-Immunotherapy-Facts-and-HopesBreast>. Acesso em: 9 mar. 2023.

ENSENYAT-MENDEZ, M. et al. Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. The Origins of TNBC Subtyping, [s. l.], 16 jun. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.681476/full>. Acesso em: 28 fev. 2023.

ERBER, R. et al. Histology of Luminal Breast Cancer. Histology of Luminal Breast Cancer, [s. l.], 15 jul. 2020. DOI <https://doi.org/10.1159/000509025>. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/509025>. Acesso em: 28 fev. 2023.

FILHO, Orlando. Evaluation of the cytotoxicity of the essential oil of *eremanthus erythropappus* on breast cancer cells MCF-7. 1.3 EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS, [s. l.], 19 maio 2020. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/10252/8573>. Acesso em: 15 out. 2023.

FILHO, V.; MONCAU, J. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. 1 abr. 2002. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.scielo.br%2Ffj%2Framb%2Fa%2Fx5hZ8r5ttxvkcNrmwvScYZL%2F%3Fformat%3Dpdf%26lang%3Dpt&clen=122420&chunk=true>. Acesso em: 10 mar. 2022.

FONSECA, A. et al. *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish in natural stand. Resgate e propagação vegetativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish em povoamentos naturais, [s. l.], jul-set 2021. DOI 10.1590/1519-6984.225119. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/qNdq4jFMVWvvJwGs7LBkx5K/?lang=en>. Acesso em: 2 maio 2022.

FRANKEN, Nicolaas et al. Clonogenic assay of cells in vitro. [s. l.], 21 dez. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406473/>. Acesso em: 23 out. 2023.

GEURTS, Veerle et al. Immunotherapy for Metastatic Triple Negative Breast Cancer: Current Paradigm and Future Approaches. [s. l.], 20 abr. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37079257/>. Acesso em: 13 out. 2023.

GHASEMI, Mahshid; TURNBULL, Tyron; SEBASTIAN, Sonia; KEMPSON, Ivan. The MTT Assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312827>.

GÜTTLER, Antje; WEINHOLDT, Claus; RUFF, Elisabeth; REIDT, Judith; DARNSTAEDT, Elisa; WILDEMANN, Alicia; PETRENKO, Marina; KEßLER, Jacqueline; KAPPLER, Matthias; GROSSE, Ivo. SESN2 Knockdown Increases Betulinic Acid-Induced Radiosensitivity of Hypoxic Breast Cancer Cells. *Cells*, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 177, 31 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells12010177>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. 4 mar. 2011. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.cell.com%2Faction%2FshowPdf%3Fpii%3DS0092-8674%252811%252900127-9&cien=2173792&pdfilename=PIIS0092867411001279.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2022.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. 12 jan. 2022. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of>. Acesso em: 6 abr. 2022.

HANAHAN, Douglas; MONJE, Michelle. Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 573-580, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.012>.

HIEKEN, T. The breast tissue microbiome, stroma, immune cells and breast cancer. [s. l.], maio 2022. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147655862200015X?via%3Dihub>. Acesso em: 7 jan. 2023.

HUANG, L. et al. Engineered exosomes as an in situ DC-primed vaccine to boost antitumor immunity in breast cancer. Antitumor efficacy of HELA-Exos in mice with orthotopic TNBC in vivo, [s. l.], 11 fev. 2022. DOI 10.1186/s12943-022-01515-x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8831689/>. Acesso em: 21 abr. 2023.

INCA. Câncer de mama. 2 set. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em: 30 mar. 2022.

INCA. Estimativa 2020. 12 maio 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao#:~:text=Para%20o%20Brasil%2C%20a%20estimativa,c%3%A2ncer%20de%20pele%20n%3%A3o%20melanoma>). Acesso em: 10 mar. 2022.

INCA. Fatores de risco. 20 ago. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/fatores-de-risco#:~:text=Mulheres%20mais%20velhas%2C%20sobretudo%20a,2005%3B%20WHO%2C%202018>). Acesso em: 6 abr. 2022.

JEFFREY, A. et al. Improved Formazan Dissolution for Bacterial MTT Assay. [s. l.], 9 dez. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34937171/>. Acesso em: 14 out. 2023.

JIANG, Wenkai; LI, Xin; DONG, Shi; ZHOU, Wence. Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: application and research progress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [S.L.], v. 142, p. 111990, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111990>.

JIN, H.; DU, W.; HUANG, W.; YAN, J.; TANG, Q.; CHEN, Y.; ZOU, Z. LncRNA and breast cancer: progress from identifying mechanisms to challenges and opportunities of clinical treatment. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, [S.L.], v. 25, p. 613-637, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.005>.

KARAMANOU, K. et al. Plant Derived Bioactive Compounds, Their Anti-Cancer Effects and In Silico Approaches as an Alternative Target Treatment Strategy for Breast Cancer: An Updated Overview [s. l.], 10 dez. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8699774/>. Acesso em: 21 abr. 2023.

KOH, J. et al. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Changes in the Anatomic Stage*, [s. l.], 27 dez. 2018. DOI

<https://doi.org/10.3348/kjr.2018.0231>. Disponível em:
<https://synapse.koreamed.org/articles/1110407>. Acesso em: 25 fev. 2023.

LI , Jiaqi et al. Targeting Metabolism in Cancer Cells and the Tumour Microenvironment for Cancer Therapy. [s. l.], 25 out. 2020. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33092283/>. Acesso em: 26 out. 2023.

LI, Y.; LI, S.; MENG, X.; GAN, R.; ZHANG, J.; LI, H. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Nutrients*, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 728, 8 jul. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu9070728>.

LIMA , O.; PEREIRA, A.; SILVA, C.; SILVA, A.; VALADARES, M.; CORTEZ, A.; PARISE, M. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *eremanthus erythropappus* sobre células de câncer mamário MCF-7. *Brazilian Journal Of Health Review*, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 4699-4727, 2020. *Brazilian Journal of Health Review*.
<http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv3n3-062>.

LIU, N. et al. The prognostic role of Ki-67/MIB-1 in meningioma. The prognostic role of Ki-67/MIB-1 in meningioma, [s. l.], 1 fev. 2020. DOI 10.1097/MD.00000000000018644. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7478528/>. Acesso em: 28 fev. 2023.

Loeuille, B.F.P. 2020. *Eremanthus* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB80635>).

LOPES, V. et al. Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish (Asteraceae). [s. l.], 18 dez. 2018. Disponível em:
<http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1984>. Acesso em: 4 maio 2022.

LOU, Hanghang; LI, Hao; ZHANG, Shengliang; LU, Hongyun; CHEN, Qihe. A Review on Preparation of Betulinic Acid and Its Biological Activities. *Molecules*, [S.L.], v. 26, n. 18, p. 5583, 14 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26185583>.

MACHADO, Fernanda et al. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. [s. l.], 12 mar. 2010. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/vCZfJbrQcJFJTJKpMjDhTM/?lang=pt#>. Acesso em: 24 out. 2023.

MANOUCHEHRI, E. et al. Understanding breast cancer risk factors: is there any mismatch between laywomen perceptions and expert opinions. çççç, [s. l.], 23 mar. 2022. Disponível

em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-022-09372-z#citeas>. Acesso em: 14 set. 2022.

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. *Current Cancer Epidemiology*. 9 dez. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7310786/>. Acesso em: 11 abr. 2022.

MITRA, Sarmistha; DASH, Raju. *Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer. Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, [S.L.], v. 2018, p. 1-23, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/8324696>.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 55-63, 1983.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic Cell Survival Assay. *Chemosensitivity*, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3197314/>. Acesso em: 10 out. 2023.

NAZÁRIO, A. Câncer de mama: novidades no diagnóstico e no tratamento. [s. l.], dez. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/d9Q4TFj4ntLdC9ZxsmvJRjL/?lang=en#>. Acesso em: 15 set. 2022.

NGA , N.T.H. et al. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. [s. l.], 1 dez. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269720304693>. Acesso em: 14 out. 2023.

ONCOGUIA. Estimativas de câncer no Brasil. 6 fev. 2020. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-brasil/1705/1/>. Acesso em: 10 mar. 2022.

ONCOGUIA. Terapia Alvo para Câncer de Mama. Terapia alvo para o câncer de mama HER2+, [s. l.], 25 jul. 2020. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/terapia-alvo-para-cancer-de-mama/1771/265/>. Acesso em: 4 mar. 2023.

PERNAR, C. et al. The Epidemiology of Prostate Cancer. [s. l.], 8 dez. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6280714/>. Acesso em: 2 maio 2022.

PETRUCCELLI, N. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. BRCA1- and BRCA2-Associated HBOC, [s. l.], 26 maio 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>. Acesso em: 15 set. 2022.

PHD, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 4 fev. 2021. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 13 abr. 2022.

POTZE, L et al. Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response. [s. l.], abr. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24722294/>. Acesso em: 15 out. 2023.

PROVENZANO, E. Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Moving Beyond Pathological Complete Response in the Molecular Age. çççç, [s. l.], 1 abr. 2021. DOI 10.5644/ama2006-124.328. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34075766/>. Acesso em: 11 mar. 2023.

RAFEHI, Haloom *et al.* Clonogenic Assay: Adherent Cells. **Cell Culture and Experimental Set-up**, [s. l.], 13 mar. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21445039/>. Acesso em: 21 ago. 2023.

RIVARD, A. et al. Anatomy, Thorax, Breast. Structure and Function, [s. l.], 26 jul. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519575/>. Acesso em: 17 set. 2022.

RODRIGUES, A. Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos. Produtos naturais usados no desenvolvimento de novos fármacos, [s. l.], 2018. Disponível em: file:///C:/Users/anal/Downloads/PPG_%2032022.pdf. Acesso em: 28 set. 2022.

RODRIGUES, J. et al. Uma análise da prevenção do câncer de mama no Brasil. out. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/FhNNWR8rXswhXgnL7QYzk7F/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 13 abr. 2022.

ROY, P.; SAIKIA, B. Cancer and cure: A critical analysis. 24 fev. 2017. Disponível em: <https://www.indiancancer.com/article.asp?issn=0019-509X;year=2016;volume=53;issue=3;spage=441;epage=442;aulast=Roy>. Acesso em: 10 mar. 2022.

SALUSTIANO, M. et al. EXTRATOS DE CANDEIA (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) NA INIBIÇÃO IN VITRO DE *Cylindrocladium scoparium* E DE QUATRO ESPÉCIES DE FERRUGENS [s. l.], 25 jan. 2006. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.redalyc.org/pdf/744/74412210.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2023.

SCOLFORO, J. et al. MANEJO SUSTENTADO DAS CANDEIAS *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch e *Eremanthus incanus* (Less.) Less. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfefindmkaj/http://www.nucleoestudo.ufla.br/nemaf/candeia/manual_completo.pdf. Acesso em: 2 maio 2022.

SIEGEL, R.; MILLER, K.; WAGLE, N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2023. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 17-48, jan. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21763>.

SHIEN, T.; IWATA, H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Japanese Journal Of Clinical Oncology*, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 225-229, 28 jan. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jjco/hyz213>.

SILVA, Gulnar Azevedo et al. Cancer mortality in the Capitals and in the interior of Brazil: a four-decade analysis. 23 nov. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7688260/>. Acesso em: 11 abr. 2022.

SILVEIRA, A.; BASTOS, F. IMPACTOS DA PANDEMIA DE COVID-19 NOS TRABALHOS DE CAMPO DAS PESQUISAS GEOGRÁFICAS. MPACTS OF THE COVID-19 PANDEMIC ON THE FIELDWORK OF GEOGRAPHICAL RESEARCH, [s. l.], 2022. Disponível em: <file:///C:/Users/analu/Downloads/15727-Texto%20do%20artigo-83914-1-10-20210525.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2022.

SVOLACCHIA, Fabiano et al. Natural Products for the Prevention, Treatment and Progression of Breast Cancer. [s. l.], 30 maio 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37296944/>. Acesso em: 13 out. 2023.

SUN, Y. et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. 1 nov. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715522/>. Acesso em: 12 abr. 2022.

TAN, S.; LI, D.; ZHU, X. Cancer immunotherapy: pros, cons and beyond. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [S.L.], v. 124, p. 109821, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109821>.

TEICHGRAEBER, D. et al. Breast Cancer Staging: Updates in the AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition, and Current Challenges for Radiologists, From the AJR Special Series on Cancer Staging. *Tumor*, [s. l.], 17 fev. 2021. DOI 10.2214/AJR.20.25223. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33594908/>. Acesso em: 25 fev. 2023.

TELANG, Nitin. Natural products as drug candidates for breast cancer (Review). [s. l.], 28 jun. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37427344/>. Acesso em: 13 out. 2023.

TRAN, B. et al. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. Defining luminal-B breast cancer, [s. l.], 30 nov. 2011. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2904>. Acesso em: 20 abr. 2023.

TSANG, J.; TSE, G. Molecular Classification of Breast Cancer. Advances In Anatomic Pathology, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 27-35, 30 abr. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/pap.0000000000000232>.

VO, D.; NGUYEN, N.; LEE, S. Classification of breast cancer histology images using incremental boosting convolution networks. Information Sciences, [S.L.], v. 482, p. 123-138, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ins.2018.12.089>.

WANG, H.; MAO, X. Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. Drug Design, Development And Therapy, [S.L.], v. 14, p. 2423-2433, jun. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s253961>.

WANG, Lingling et al. The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis. [s. l.], 7 jan. 2021. DOI 10.3389/fonc.2020.602416. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7817624/>. Acesso em: 26 out. 2023.

WEBER, Daniel; ZHANG, Mixia; ZHUANG, Pengwei; ZHANG, Yanjun; WHEAT, Janelle; CURRIE, Geoffrey; AL-EISAWI, Zaynab. The efficacy of betulinic acid in triple-negative breast cancer. Sage Open Medicine, [S.L.], v. 2, p. 205031211455197, 1 jan. 2014. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/2050312114551974>.

WON, Kwang-Ai; SPRUCK, Charles. Triple-negative breast cancer therapy: current and future perspectives (review). International Journal Of Oncology, [S.L.], v. 57, n. 6, p. 1245-1261, 16 out. 2020. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2020.5135>.

YANG, C.; MAI, Z.; LIU, C.; YIN, S.; CAI, Y.; XIA, C. Natural Products in Preventing Tumor Drug Resistance and Related Signaling Pathways. Molecules, [S.L.], v. 27, n. 11, p. 3513, 30 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27113513>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9181879/#B5-molecules-27-03513>

YANG, Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. Journal Of Clinical Investigation, [S.L.], v. 125, n. 9, p. 3335-3337, 1 set. 2015. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci83871>.

YAP, K.; SEKAR, M.; FULORIA, S.; WU, Y.; GAN, S.; RANI, N.; SUBRAMANIYAN, V.; KOKARE, C.; LUM, P.; BEGUM, M. Drug Delivery of Natural Products Through Nanocarriers for Effective Breast Cancer Therapy: a comprehensive review of literature.

International Journal Of Nanomedicine, [S.L.], v. 16, p. 7891-7941, dez. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s328135>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8648329/>

YIN, Li et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. [s. l.], 9 jun. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32517735/>. Acesso em: 14 nov. 2023.

ZENG, An-Qi et al. Betulinic acid impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer models. [s. l.], 9 jan. 2018. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5790500/>. Acesso em: 16 out. 2023.

ZHAO, Hui; REN, Shan; YANG, Han; TANG, Shun; GUO, Chenyang; LIU, Maolun; TAO, Qiu; MING, Tianqi; XU, Haibo. Peppermint essential oil: its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [S.L.], v. 154, p. 113559, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113559>.

ZHENG, Yifeng; LIU, Pengxi; WANG, Neng; WANG, Shengqi; YANG, Bowen; LI, Min; CHEN, Jianping; SITU, Honglin; XIE, Meiqi; LIN, Yi. Betulinic Acid Suppresses Breast Cancer Metastasis by Targeting GRP78-Mediated Glycolysis and ER Stress Apoptotic Pathway. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, [S.L.], v. 2019, p. 1-15, 19 ago. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/8781690>.

ZHDAN, Vyacheslav M.; HOLOVANNOVA, Iryna A.; VOVK, Orest Ya.; KOROSH, Maksym V.. RELATIONSHIP BETWEEN CERVICAL CANCER AND THE LEVEL OF PREVENTIVE ONCOLOGICAL EXAMINATIONS. *Wiadomości Lekarskie*, [S.L.], v. 74, n. 6, p. 1428-1432, 2021. ALUNA. <http://dx.doi.org/10.36740/wlek202106126>.

ZHOU, R. et al. Extract from *Astragalus membranaceus* inhibit breast cancer cells proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [s. l.], 9 mar. 2018. Disponível em: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-018-2148-2>. Acesso em: 22 abr. 2023.

ZUBAIR, M. et al. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Breast Cancer Heterogeneity*, [s. l.], 26 fev. 2021. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7952319/>. Acesso em: 16 set. 2022.