

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

ANA NOGUEIRA

EFEITOS BIOLÓGICOS IN VITRO DE EXTRATOS DA ESPÉCIE DE
Renealmia petasites **EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO-**
NEGATIVO

PATOS DE MINAS – MG
MARÇO 2026

ANA NOGUEIRA

**EFEITOS BIOLÓGICOS IN VITRO DE EXTRATOS DA ESPÉCIE DE
Renealmia petasites EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO-
NEGATIVO**

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

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

**PATOS DE MINAS – MG
MARÇO 2026**

ANA NOGUEIRA

Efeitos biológicos in vitro de extratos da espécie de *Renealmia Petasistes* em células de câncer de mama triplo-negativo.

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

Dra. Paula Marynella Alves Pereira Lima - Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Dra. Enyara Rezende Moraes- 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, março de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por estar sempre presente em minha vida e, em cada uma de Suas decisões, ter me conduzido até aqui.

À minha família, por todo o apoio e ensinamentos, essenciais para que eu me tornasse quem sou hoje. Vocês me mostraram que, com Deus, somos capazes de tudo. Obrigada, mãe, vó, vô e padrinho, por trilharem essa linda jornada ao meu lado. Amo vocês! Vencemos!

À minha orientadora, Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, por acreditar e confiar na minha capacidade como aluna. Ainda que talvez não saiba, cada comentário em vermelho em minhas escritas e cada orientação para refazer experimentos que não saíram como o esperado me tornaram uma pesquisadora mais cuidadosa e persistente.

Aos meus amigos, que foram fundamentais para tornar essa longa caminhada mais leve e divertida. Em especial, Henrique, por ser esse grande amigo, pelos incontáveis lanches na padaria e, principalmente, por ter sido meu apoio no laboratório e na vida. Catarina, por, além de dividirmos o mesmo dia de aniversário, me ensinar que às vezes sobrevivemos, e muito bem, apenas de frango desfiado e whey.

André, meu amigo, mentor, instrutor e exemplo! Sou grata por todas as vezes que atravessou a cidade para me ajudar nos experimentos, pelos puxões de orelha, ensinamentos, cantorias no laboratório e pelos muitos bolos. Muito do que sei hoje carrega seu esforço e dedicação. Minha admiração e gratidão são imensas.

Aos docentes da UFU, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e esclarecer minhas inúmeras dúvidas. Cada um de vocês foi, e continuará sendo, uma inspiração para mim.

À banca examinadora, por gentilmente disponibilizar seu tempo para participar desse momento tão importante, contribuindo para enriquecer ainda mais o meu trabalho.

Ao meu grupo do GBio, que, com a união e o conhecimento de cada integrante, tornou minha trajetória de aprendizado muito mais rica. Agradeço também aos técnicos e ao Raoni, que partiu para novas oportunidades, mas deixou seu legado em todos nós, inclusive em mim.

Ao Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, do Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais da UFJF, pela valiosa parceria.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro ao meu projeto.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte deste ciclo, meu profundo agradecimento. Levo cada um no coração e na história que construo daqui para frente.

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender”.

Clarice Lispector

RESUMO

O Câncer de Mama permanece como um importante desafio para os sistemas de saúde, especialmente em razão da agressividade do subtipo triplo-negativo, que apresenta taxas de mortalidade de 30 a 40% em cinco anos após o diagnóstico. Embora a quimioterapia seja o tratamento principal para esses tumores, problemas como a resistência tumoral limitam sua eficácia. Assim, produtos naturais emergem como promissores, superando não somente a falha terapêutica, mas também a toxicidade associada. Este estudo objetivou avaliar o efeito de extratos de *Renealmia petasites* no controle de células tumorais mamárias. Para isso, as linhagens MDA-MB-231 (câncer de mama triplo-negativo), MCF-7 (câncer de mama luminal), MCF-10A (não tumorigênica) e HFF (fibroblastos humanos) foram tratadas com o extrato bruto da folha seca da planta (EAT 25) e suas frações (EAT 39-EAT 44), e diferentes respostas biológicas avaliadas. Foram conduzidos ensaios de citotoxicidade, clonogenicidade, migração e qPCR para quantificação de *IL6*, *IL1-β* e *TGF-β*. O extrato bruto EAT 25 apresentou concentração inibitória média (IC₅₀) de 123,1 µg/mL na linhagem MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento, enquanto as frações EAT 40 a 43 não reduziram significativamente a viabilidade (IC₅₀ > 500 µg/mL). Já as frações EAT 39 e EAT 44, com IC₅₀ de 24,81 µg/mL e 47,63 µg/mL e índice de seletividade de 2,49 e 3,0, respectivamente, foram utilizadas nos experimentos subsequentes. Foi observada uma redução dose-dependente da migração da linhagem MDA-MB-231 após 24 horas de tratamento com EAT 39 e EAT 44, sendo que apenas EAT 44 inibiu esse comportamento após 48 horas. A clonogenicidade, também após 48 horas, foi inibida para ambas as frações. Tanto EAT 39 quanto EAT 44 reduziram os transcritos de *IL6* e *IL1-β*. Portanto, a espécie *R. petasites* se mostra promissora no controle de células de câncer de mama triplo-negativo, de modo que a purificação e caracterização dos componentes majoritárias de EAT 39 e EAT 44 são essenciais para a validação de seus efeitos antitumorais, sobretudo em modelos animais.

Palavras-chave: Bioprospecção. Câncer de Mama. *Renealmia petasites*. Tratamento.

ABSTRACT

Breast cancer remains a significant challenge for healthcare systems, especially due to the aggressiveness of the triple-negative subtype, which has mortality rates of 30 to 40% within five years of diagnosis. Although chemotherapy is the primary treatment for these tumors, problems such as tumor resistance limit its effectiveness. Thus, natural products emerge as promising, overcoming not only therapeutic failure but also associated toxicity. This study aimed to evaluate the effect of Renealmia petasites extracts in controlling breast tumor cells. To this end, the MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer), MCF-7 (luminal breast cancer), MCF-10A (non-tumorigenic), and HFF (human fibroblast) cell lines were treated with the crude extract of the plant's dried leaf (EAT 25) and its fractions (EAT 39-EAT 44), and different biological responses were evaluated. Cytotoxicity, clonogenicity, migration, and qPCR assays were conducted to quantify IL-6, IL-1 β , and TGF- β . The crude extract EAT25 showed a mean inhibitory concentration (IC₅₀) of 123.1 μ g/mL in the MDA-MB-231 cell line after 48 hours of treatment, while fractions EAT40 to 43 did not significantly reduce viability (IC₅₀ > 500 μ g/mL). Fractions EAT39 and EAT44, with IC₅₀s of 24.81 μ g/mL and 47.63 μ g/mL and selectivity indices of 2.49 and 3.0, respectively, were used in subsequent experiments. A dose-dependent reduction in the migration of the MDA-MB-231 cell line was observed after 24 hours of treatment with EAT 39 and EAT 44, with only EAT 44 inhibiting this behavior after 48 hours. Clonogenicity, also after 48 hours, was inhibited for both fractions. Both EAT 39 and EAT 44 reduced IL6 and IL1- β transcripts. Therefore, the species R.petasites shows promise in controlling triple-negative breast cancer cells, so the purification and characterization of the major components of EAT 39 and EAT 44 are essential for validating their antitumor effects, especially in animal models.

Keywords: Bioprospecting. Breast Cancer. Renealmia petasites. Treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC: Conjugados anticorpo-fármaco
ATCC: American type culture collection
B2M: Beta-2-microglobulina
BCL-2: Proteína antiapoptótica
BH3: Domínio de homologia Bcl-2 3
BRCA1: Breast Cancer 1
BRCA2: Breast Cancer 2
CD22: Aglomerado de Diferenciação 22
CD30: Aglomerado de Diferenciação 30
CD33: Aglomerado de Diferenciação 33
CDIS: Carcinoma ductal in situ
cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementar
CM: Câncer de mama
CMTN: Câncer de Mama Triplo Negativo
CSC: Célula-tronco cancerígena
DMEM: Meio de Eagle Modificado de Dulbecco
DMEM-F12: Meio de Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EGF: Fator de crescimento epidérmico
EMT: Transição epitélio-mesenquimal
Formazan: E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan
HER2: Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HFF: Célula de fibroblastos do prepúcio humano
HPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
IC₅₀: Concentração Inibitória média
IDH: Índice de Desenvolvimento Humano
IL-1: Interleucina-1
IL-6: Interleucina-6
IS: Índice de Seletividade
LCIS: Carcinoma lobular in situ
L15: Meio Leibowitz
mAb: Anticorpo monoclonal
MCF-10A: Célula não tumorigênica
MCF7: Célula tumoral mamária com fenótipo luminal
MDA-MB-231: Célula tumoral mamária com fenótipo basal
M-MLV RT: Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
ncRNA: Ácido ribonucleico não codificante
PALB-2: Parceiro e localizador de BRCA2
PARP: poli [adenosina difosfato-ribose] polimerase
PARP-1: poli [adenosina difosfato-ribose] polimerase 1
PARP-2: poli [adenosina difosfato-ribose] polimerase 2

PBS: Tampão fosfato salino
P53: Gene supressor tumoral
PDGF-B: Fator de crescimento derivado de plaquetas B
PD-L1: Ligante 1 de morte celular programada
qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real
 R^2 : Coeficiente de regressão
RE: Receptor de estrógeno
RNA: Ácido ribonucleico
RP: Receptor de progesterona
RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute medium
TGF- β : Fator de Transformação de Crescimento Beta
TME: Microambiente tumoral
TP53: Gene codificante de P53
TROP-2: Antígeno 2 do trofoblasto
VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
1.1 Câncer: definição e mecanismos.....	4
1.2 Câncer: dados epidemiológicos	9
1.3 Câncer de Mama: definição, biologia mamária e subtipos.....	10
1.4 Desafios no tratamento do CMTN.....	13
1.5 Produtos naturais e <i>Renealmia petasites</i>	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Extratos de <i>R. petasites</i>	20
3.2 Cultivo celular.....	20
3.3 Ensaio de MTT	20
3.4 Formação de colônias.....	22
3.5 Ensaio de Migração.....	22
3.6 Quantificação dos transcritos por RT-qPCR em tempo real	22
3.7 Análises Estatísticas	24
4 RESULTADOS	24
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: definição e mecanismos

O câncer é definido como um grupo de doenças em que ocorre uma multiplicação exagerada e sem controle de células anormais que podem invadir tecidos e órgãos distantes. São nomeados conforme sua origem, denominados carcinomas quando acometem tecidos epiteliais (como pele ou mucosas) e sarcomas quando atingem tecidos conjuntivos (como osso, músculo ou cartilagem) (INCA, 2022).

O surgimento do câncer, denominado carcinogênese ou oncogênese, é caracterizado pela presença de mutações genéticas, ou seja, de alterações no DNA da célula, apesar de existirem mecanismos regulatórios que asseguram a integridade genômica (INCA, 2022). Genes supressores de tumor, por exemplo, estão envolvidos em pontos de verificação do ciclo celular, em sistemas de reparo de danos, no processo de ubiquitinação e degradação de proteínas, na sinalização mitogênica e na diferenciação celular. São, em geral, recessivos, e sofrem inativação bialélica nos tumores (NHGRI, 2024; SHERR, 2004). Os proto-oncogenes, por sua vez, controlam a diferenciação e proliferação celulares, atuando como fatores de crescimento, transdutores de sinais e fatores de transcrição. No câncer, esses genes são denominados oncogenes após ocorrerem eventos mutacionais de translocação cromossômica, alteração de nucleotídeos e amplificação genética. Modificações estruturais da proteína codificada e a desregulação da expressão proteica também são relatadas (KONTOMANOLIS *et al.*, 2020). Adicionalmente, alterações epigenéticas, como modificações em resíduos de histonas ou adição de grupamentos químicos ao DNA, também precisam ser considerados, de modo que a transformação molecular envolve uma miscelânea entre processos genéticos e epigenéticos (RECILLAS-TARGA, 2022; SARKAR *et al.*, 2013).

Células tumorais, portanto, expressam características fenotípicas peculiares, destacando-se: capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, de inibir supressores de crescimento, de resistir à morte celular, de ativar a imortalidade replicativa, de induzir a vasculatura, de promover invasão e metástase, de reprogramar o metabolismo celular e de evadir ao controle imunológico. Importante destacar o papel da instabilidade genômica, da plasticidade celular, da reprogramação epigenética não mutacional, da

inflamação e das variações polimórficas nos microbiomas de tecidos, definidas como facilitadoras do processo de carcinogênese. Para além desses aspectos, observa-se, também, a contribuição funcional que o microambiente tumoral (TME), juntamente com as células senescentes, possuem na tumorigênese e sua progressão (HANAHAHAN, 2022).

A capacidade de sustentar a sinalização proliferativa é uma das características fundamentais expressa por células transformadas. Os tecidos normais apresentam um controle altamente regulado sobre a produção e liberação de sinais promotores de crescimento, os quais são responsáveis por induzir e sustentar o ciclo e a divisão celulares. Já os tumores são capazes de se autossustentarem, produzindo seus próprios fatores de crescimento, os quais desencadeiam uma sinalização autócrina, além de modularem o comportamento de células vizinhas. Mutações nos receptores de superfície também são relatadas, o que torna as células cancerígenas hiper-responsivas aos sinais estimulatórios, ou, em função de alterações estruturais, são capazes de ativar as vias independentemente do ligante (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Supressores de crescimento também são inibidos. O gene *TP53* é um supressor tumoral amplamente conhecido que codifica a proteína p53, um fator de transcrição expresso quando há danos no DNA e estresse celular. Sua ativação contínua é crucial para a regulação do ciclo celular, uma vez que desempenha uma função de verificação, promovendo paradas na fase G1. Além disso, também é um ativador de morte celular. Na grande maioria dos cânceres, esse gene supressor é mutado promovendo aneuploidia e descontrole da proliferação (FETT-CONTE; SALLES, 2002; SHERR, 2004).

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada essencial na eliminação de células alteradas, preservando a homeostase dos tecidos. Contudo, no câncer, encontra-se inibida. A apoptose é ativada por duas vias: (i) a intrínseca, induzida por estresse interno, como privação de nutrientes, danos ao DNA e hipóxia e (ii) a extrínseca com a ativação de receptores de morte presentes na superfície celular, estimulados por ligantes liberados, principalmente, pelo sistema imunológico (SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019). Ademais, é relatado um tipo particular de mecanismo, nomeado de “anoikis”. Essa via está relacionada com a perda da adesão celular, fazendo com que as células se dissociem da matriz extracelular, desencadeando a apoptose (ADESHAKIN *et al.*, 2021). A resistência à apoptose é derivada de diversas mutações, como, por exemplo, aquelas que promovem a regulação positiva das proteínas BCL-2 anti-apoptóticas e a perda de proteínas BH3 pró-apoptóticas e de p53 (ADESHAKIN *et al.*, 2021; SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019).

Assim, células cancerosas proliferam continuamente, permitindo que o tumor cresça rapidamente e de forma autônoma. Nesse contexto, a imortalidade replicativa é induzida, com a manutenção do comprimento dos telômeros pela expressão de fatores reguladores de telômeros, pelo aumento da atividade da telomerase ou pela ativação do mecanismo de alongamento alternativo de telômeros (CLAUDE; DECOTTIGNIES, 2020; YASWEN *et al.*, 2015). Contudo, é evidente um aumento na demanda de suplementação vascular pelas células tumorais, uma vez que necessitam de uma quantidade maior de nutrientes e oxigênio, em comparação com as normais. Por conseguinte, novos vasos sanguíneos são formados, em um processo denominado de angiogênese. A indução da vasculatura pode ocorrer por diferentes mecanismos. Na angiogênese germinativa, novos vasos são formados a partir de vasos sanguíneos já existentes, sendo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) o principal mediador. Já na angiogênese intussusceptiva, também conhecida como angiogênese *splitting*, um vaso sanguíneo existente se divide em dois novos vasos através da formação de pilares transvasculares, sendo induzido por angiopoietinas e fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B). Mais de 30 fatores estão envolvidos no processo de angiogênese, liberados pelas células tumorais com efeitos parácrino e autócrino, fomentando assim, a solidez e progressão do câncer (PRIYA *et al.*, 2016).

Células tumorais são capazes de se desprenderem do tecido de origem, invadindo progressivamente outros órgãos, processo este definido como metástase. O início dessa cascata é relacionado com a perda da capacidade de adesão célula-célula e célula-matriz, atingindo o estroma circundante. As células passam a expressar fenótipo mesenquimal, com morfologia fibroblastoide, alterações na expressão de genes e aumento do potencial de motilidade. Atingem os vasos sanguíneos e formam tumores secundários. Portanto, a cascata metastática é dependente da angiogênese (MARTIN *et al.*, 2017). Contudo, para que tantos eventos ocorram e para que as células cancerosas possam absorver, utilizar e sintetizar carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos para a sua sobrevivência, adaptação e proliferação, é necessária uma reprogramação de seu metabolismo. Além disso, o acúmulo de oncometabólitos, como o lactato e glutamato, também é observado para suprir a demanda energética (NAVARRO *et al.*, 2022). Por fim, a eficácia de todo esse processo depende da evasão ao sistema imunológico. Células cancerígenas conseguem induzir ativamente a tolerância de linfócitos T, resultando em um processo de imunoeedição, que facilita a redistribuição e o crescimento do tumor. Macrófagos também são induzidos ao fenótipo M2, impactando significativamente na progressão e na

resistência do câncer. Assim, pacientes oncológicos se tornam imunossuprimidos (KIM; CHO, 2022).

Hanahan e Weinberg em 2011 também descreveram características facilitadoras. A instabilidade genômica presente em células transformadas é uma delas, decorrente da ineficácia dos mecanismos de vigilância (AMORIM *et al.*, 2011; LI, 2008). Diferentes mutações acometem os sistemas de proteção e reparo do DNA. Além disso, a perda dos telômeros resulta na eliminação de segmentos cromossômicos específicos, promovendo instabilidade. Essas alterações estão associadas a vantagens seletivas, impulsionando o crescimento e progressão tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Logo, a heterogeneidade intratumoral está presente na maioria dos tipos de câncer, caracterizada pela presença de diversas subpopulações celulares com padrões genéticos únicos. Nesse contexto, a plasticidade celular viabiliza uma mudança dinâmica na identidade fenotípica e funcional das células entre um estado diferenciado, com capacidade tumorigênica limitada, e um estado indiferenciado ou de células-tronco cancerígenas (CSC), que estimula a propagação contínua do tumor e sua resistência (SILVA-DIZ *et al.*, 2018). A plasticidade celular tumoral é controlada pela ativação ou inativação de diferentes mecanismos, altamente adaptável e susceptível a estímulos internos, como mutações genéticas, alterações epigenéticas e fatores transcrição, ou por fatores externos derivados do TME. Neste sentido, muitas células diferenciadas não transformadas são capazes de alterar o seu estado e adquirir um comportamento plástico em resposta à inflamação, lesão, senescência e estresse oncogênico (BHAT *et al.*, 2024; SILVA-DIZ *et al.*, 2018).

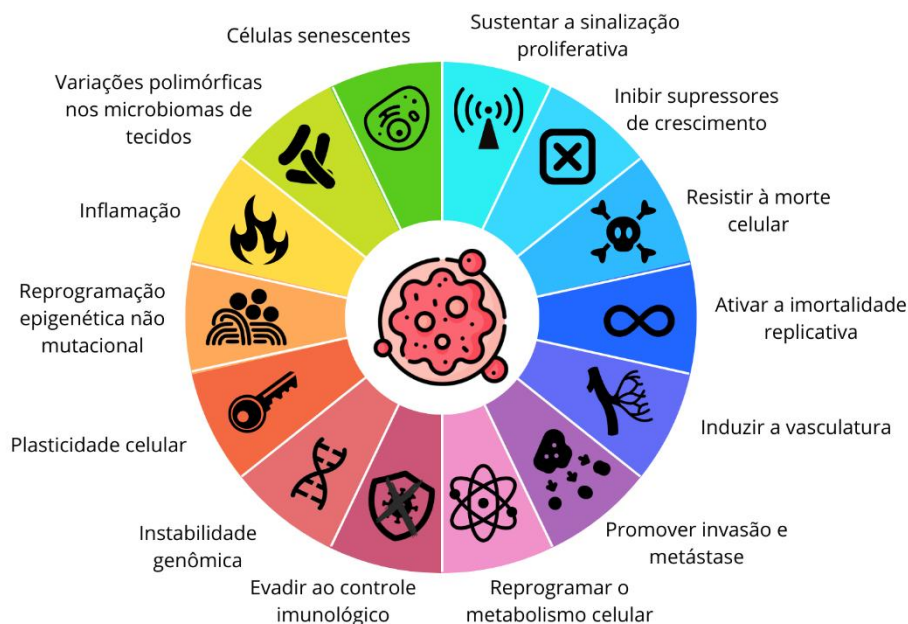
A reprogramação epigenética não mutacional, também facilitadora, é predominante em cânceres com poucas mutações, influenciando o crescimento celular e as vias de diferenciação. Mudanças no padrão de metilação do DNA, modificações de histonas e expressão de RNAs não codificantes (ncRNAs) são características presentes nas células cancerosas. A hipermetilação das ilhas CpG é um evento amplamente reconhecido, o qual promove a oncogênese ao silenciar genes que controlam a diferenciação ou a apoptose. Por outro lado, a hipometilação em outras regiões do genoma tumoral pode levar à instabilidade genômica, facilitando rearranjos cromossômicos e danos ao DNA. Adicionalmente, histonas podem ser metiladas e acetiladas, o que pode resultar na ativação ou supressão da transcrição de genes específicos. Modificações não convencionais, como desaminação, sumoilação, formilação e propionilação também são relatadas. Por último, os ncRNAs desempenham um papel importante na regulação da transcrição, influenciando a expressão gênica de forma precisa e complexa, além de afetar

a tradução e a função de outros ncRNAs em uma intrincada rede de interações (COSTA *et al.*, 2023; SUVÀ; RIGGI; BERNSTEIN, 2013).

A inflamação também é reconhecida como uma característica precursora da malignidade, embora paradoxal. Durante a resposta inflamatória associado ao tumor, observa-se uma progressão da doença, relacionada, principalmente, ao sistema inato, que fornece moléculas bioativas ao microambiente tumoral. Essas moléculas incluem fatores de crescimento e sobrevivência, fatores proangiogênicos, enzimas modificadoras da matriz extracelular, sinais relacionados à transição epitélio-mesenquimal (EMT) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (SINGH *et al.*, 2019; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Contudo, a imunossupressão também é uma característica facilitadora. Em pacientes imunossuprimidos, existe um ambiente favorável para o crescimento e avanço do câncer. Terapias imunossupressoras associadas a transplantes de órgãos, por exemplo, elevam a probabilidade de desenvolvimento de tumores malignos em 5-6% (PENN; STARZL, 1972; YUREKLI; ERBA, 2021).

Por fim, os complexos ecossistemas microbianos, incluindo bactérias, fungos e vírus, que se associam simbioticamente ao corpo humano, impactam na carcinogênese. Estudos indicam que a interação direta do microbioma pode influenciar tanto positiva quanto negativamente a inflamação tumoral, o status imunológico, a estabilidade genômica e a resposta terapêutica. Em cerca de 15-30% dos cânceres, patógenos microbianos estão associados ao seu desenvolvimento e progressão. O microbioma intestinal, assim como o microbioma intratumoral, vêm sendo extensivamente explorados. Entretanto, a composição da microbiota é altamente dinâmica e depende de muitos aspectos, como sexo, idade e ambiente. Dessa forma, a variação na população de microrganismos entre indivíduos afetados, juntamente com as demais características funcionais e facilitadoras do câncer, impactam diretamente no fenótipo da doença (BHATT; REDINBO; BULTMAN, 2017; LYTHGOE *et al.*, 2022). A Figura 1 sumariza as características associadas ao desenvolvimento e progressão de tumores descritas por Hanahan e Weinberg em 2011.

Figura1. Representação esquemática das principais características associadas ao desenvolvimento e progressão de tumores, baseado no modelo dos *hallmarks of cancer* descrito por Hanahan e Weinberg em 2011.



Fonte: Própria autora.

1.2 Câncer: dados epidemiológicos

O câncer encontra-se em escala epidêmica. Mundialmente, são esperados 35 milhões de novos casos em 2050, um aumento de 77% em relação aos 20 milhões estimados em 2022. Os mais incidentes são de pulmão, mama, colorretal, próstata, estômago, fígado, tireoide, colo do útero, bexiga e linfoma não-Hodgkin. Além disso, é a segunda principal causa de morte no mundo, com aproximadamente 1 em cada 9 homens e 1 em cada 12 mulheres morrendo pela doença. De acordo com estimativas mundiais, em 2022, houve 20 milhões de novos casos de câncer e 9,7 milhões de mortes. O câncer de pulmão é o que mais mata, com 1,8 milhão de mortes, representando 18,7% do total. Em seguida estão o câncer colorretal (900 mil mortes; 9,3%), de fígado (760 mil mortes; 7,8%), de mama (670 mil mortes; 6,9%) e de estômago (660 mil mortes; 6,8%). As estimativas globais revelam que há diferenças na progressão do câncer conforme o índice de desenvolvimento humano (IDH) dos países. No caso do câncer de mama (CM), por exemplo, em países com IDH altos, 1 em cada 12 mulheres será diagnosticada durante a vida e 1 em cada 71 morrerá pela doença. Já em países com IDH baixo, 1 em cada 27 mulheres é diagnosticada e 1 em cada 48 virá à óbito (IARC, 2022).

No Brasil, foram estimados, para cada ano do triênio de 2026-2028, 571 mil novos diagnósticos, sendo 255 mil em homens e 261 mil em mulheres. Com exceção do câncer de pele não melanoma, os tumores malignos mais incidentes no país são o CM e o câncer de próstata, ambos representando 30% dos casos mais frequentes em seus respectivos sexos. Na região Sudeste são esperados os maiores números, com 48,4% dos diagnósticos, seguida da Região Nordeste com 22,8%, Região Sul com 17,1%, Centro-Oeste com 7,3% e Norte com 4,4%. As regiões Sul e Sudeste concentram 65,5% dos casos no Brasil. Nos homens, o câncer de próstata é mais predominante em todas as regiões, com 77.920 mil casos novos previsto por ano até 2028, atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Já nas mulheres, o CM é o mais incidente, com 78.610 mil casos novos previstos no triênio, com exceção apenas do câncer de pele não melanoma (INCA, 2026).

1.3 Câncer de Mama: definição, biologia mamária e subtipos

O CM é a neoplasia maligna mais comumente diagnosticada em mulheres no mundo. Alguns fatores de riscos estão associados ao seu surgimento como idade, mutações genéticas, histórico familiar da doença, obesidade, aspectos reprodutivos, consumo excessivo de álcool, tabagismo e exposição à radiação (AKRAM *et al.*, 2017). A idade se destaca, visto que o envelhecimento acarreta um aumento na ocorrência de erros durante a replicação e reduz a eficácia dos mecanismos de reparo, o que prejudica o funcionamento das células a nível molecular (WHITE *et al.*, 2014). Nesse contexto, mutações são preponderantes, especialmente quando identificadas nos genes *BRCA1* (*Breast Cancer 1*), *BRCA2* (*Breast Cancer 2*) e *PALB-2* (*Partner and Localizer of BRCA2*) (FOUNTZILAS *et al.*, 2020). De fato, a prevalência do CM em portadoras dessas alterações é 10 a 30 vezes maior do que naquelas que não as possuem. O risco é ainda mais expressivo em mulheres com variantes nesses genes e com histórico familiar da doença (AKRAM *et al.*, 2017).

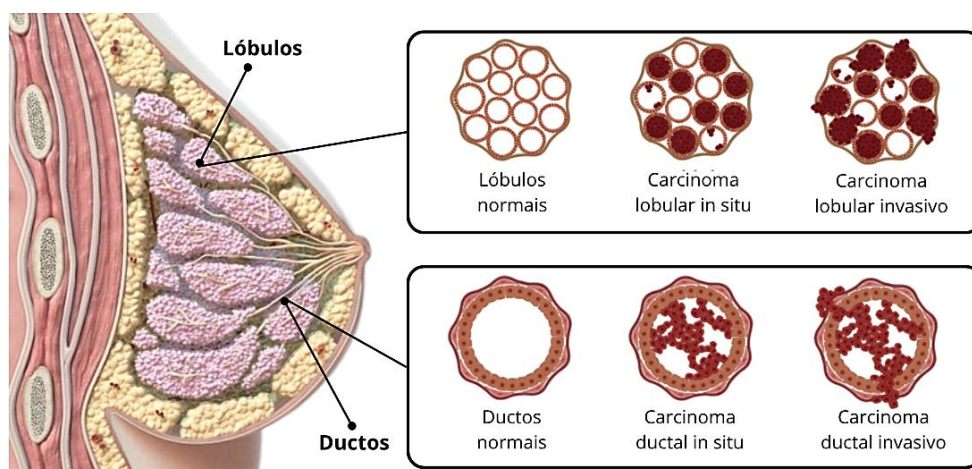
A obesidade também é preocupante, uma vez que o excesso de gordura no corpo provoca um estado de inflamação crônica e um aumento nos níveis hormonais, contribuindo para o surgimento do câncer. Associado com os aspectos reprodutivos, quanto maior o ganho de peso na idade adulta, maior o risco do CM na pós-menopausa (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2024). Finalmente, a exposição a substâncias cancerígenas, assim como o comportamento também precisam ser considerados. O

consumo de álcool, por exemplo, eleva os níveis de alguns hormônios, como o estrogênio, responsável por aumentar as chances de CM. Por outro lado, a nicotina presente nos cigarros é mutagênica e estimula uma rápida multiplicação celular (SUN *et al.*, 2017).

Quanto ao CM, é de suma importância entender as características histofisiológicas da glândula mamária e seu comportamento ao longo do desenvolvimento e avanço da doença. A mama é formada por tecido glandular, fibroso e adiposo. O primeiro compõe os lobos e ductos mamários, suportados pelo tecido fibroso. Já o tecido adiposo é responsável por preencher os espaços, influenciando diretamente no tamanho dos seios. Cada mama é composta por 15 a 20 lobos dispostos circularmente, de modo que cada um é subdividido em lóbulos menores. Nestes estão localizados os alvéolos, compostos por células secretoras responsáveis pela produção de leite. Após a secreção, o leite é conduzido pelos ductos lactíferos, que se estendem até os ductos mamários para alcançar a abertura do mamilo feminino. Vasos sanguíneos e linfáticos se estendem por toda a região fornecendo sangue e nutrientes e atuando na proteção e na remoção de resíduos, respectivamente. De fato, a mama é um órgão dinâmico, sofrendo alterações morfológicas durante a puberdade, gravidez, lactação e regressão. Essas modificações são influenciadas pelos níveis de estrogênio, progesterona e prolactina. É importante destacar que esses hormônios, apesar de essenciais à homeostase da glândula, encontram-se diretamente relacionados com o surgimento e progressão de tumores (BREAST CANCER UK, 2024; NCI, 2024).

Assim, o CM é um grupo diversificado de doenças que acometem ductos (CM ductal) e lóbulos (CM lobular), os quais contabilizam 85% e 15% dos casos, respectivamente (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática dos principais tipos histológicos de câncer de mama, incluindo Carcinoma ductal invasivo, Carcinoma lobular invasivo, Carcinoma ductal in situ e Carcinoma lobular in situ, evidenciando suas origens no tecido mamário e diferenças morfológicas.



Fonte: Própria autora.

Além disso, podem ser invasivos, quando as células transformadas atingem o tecido circundante (KATSURA *et al.*, 2022; BREAST CANCER UK, 2024). O mais incidente é o CM invasivo sem tipo especial (NST), que se origina nos ductos e é responsável por 70-75% dos diagnósticos de carcinoma de mama invasivo. Apresenta um padrão de células tumorais altamente agressivas e pouco diferenciadas. Em geral, é formado por extensas camadas irregulares de células transformadas confluentes, juntamente com um estroma fibroso escasso e com infiltrado linfocitário proeminente (SURABHI *et al.*, 2023). O não invasivo, por sua vez, é descrito como um tumor inicial e localizado. Os mais comuns são o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma lobular *in situ* (LCIS), embora o LCIS seja considerado não-maligno, mas correlacionado a uma maior chance de desenvolver a doença. Os sinais e sintomas são indefinidos, incluindo a presença de nódulos mamários e axilares, inchaço no seio ou alterações na forma/tamanho, além de mudanças na pele e nos mamilos, como a inversão e secreção (KATSURA *et al.*, 2022; BREAST CANCER UK, 2024).

Contudo, a complexidade dessa doença tem exigido uma classificação mais precisa, para além dos aspectos histológicos. Assim, Charles M. Perou em 2000, contribuiu para uma compreensão mais aprofundada da biologia molecular do CM ao evidenciar a importância da presença ou ausência de receptores de estrogênio (RE), de progesterona (RP) e do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) (KATSURA *et al.*, 2022). Essa classificação molecular é crucial para determinar o

prognóstico e a abordagem terapêutica adequada de modo que tumores que expressam RE e/ou RP são considerados positivos para receptores hormonais (RH+), aqueles que expressam apenas HER2 são definidos com o HER2 enriquecidos e os que não possuem RE, RP ou HER2 são considerados tumores triplo-negativo (CMTN). Cerca de 77% dos CMs são RH+ e respondem à terapia hormonal, que visa bloquear ou diminuir os efeitos do estrogênio e da progesterona no crescimento das células cancerígenas, independente do status de HER2 (HARBECK *et al.*, 2019).

Tumores RE+ e/ou RP+ e HER2-, com baixo índice proliferativo (ki67 < 14%) são classificados como luminal A. Representam cerca de 50% dos casos, com melhor prognóstico e com uma sobrevida em 5 anos de 80%. Os luminal B acometem de 10-20% das pacientes sendo RE+ e/ou RP+ e HER2-, mas com ki67 > 14%. Quando positivos para HER2 são denominados luminal híbrido. A sobrevida em 5 anos é de, aproximadamente, 70%, com prognóstico inferior comparado ao luminal A (BONILLA; TABANERA; MENDOZA, 2017). Os HER2-enriquecidos contabilizam 15-20% dos diagnósticos. A superexpressão deste receptor na superfície das células cancerígenas ativa vias de sinalização que promovem a multiplicação celular. Portanto, são considerados tumores altamente proliferativos, com aproximadamente 60% de sobrevida em cinco anos (IQBAL, 2014; BONILLA; TABANERA; MENDOZA, 2017). Por fim, o CMTN é altamente heterogêneo e mais agressivo, afetando, principalmente, mulheres jovens com mutações no gene *BRCA1*. A falta de receptores o torna não responsivo a terapias hormonais e a medicamentos direcionados ao HER2. A maioria é de origem ductal, embora outros tipos agressivos, como metaplásico, apócrino e adenóide cístico, também são frequentemente encontrados. Possuem uma maior propensão para metastatizar para órgãos distantes, como os pulmões e o cérebro. Assim seu prognóstico é mais desfavorável, o que resulta em uma taxa de sobrevivência inferior a 2 anos. No caso de CMTN metastático, apenas 12% dos pacientes sobrevivem em 5 anos (LU *et al.*, 2023; BONILLA; TABANERA; MENDOZA, 2017).

1.4 Desafios no tratamento do CMTN

Pacientes com CMTN não são tratados com terapia hormonal, tampouco com anti-HER2. Além disso, apresentam peculiaridades no curso clínico e prognóstico, sendo necessárias intervenções e tratamentos mais ativos e sistêmicos. A escolha do tipo de cirurgia considera não apenas a sobrevida e o risco de recorrência local, mas também

fatores como estética, qualidade de vida, tamanho e localização do tumor. Com base nisso, pode ser realizada a lumpectomia, com remoção do tumor e margem de tecido saudável, ou mastectomia, com remoção completa da mama. Também há a possibilidade de remover os linfonodos (LEONE *et al.*, 2023). Para tumores grandes e multicêntricos, a mastectomia radical é a principal operação realizada. Porém, está associada a um frequente desenvolvimento de linfedema e outras complicações pós-cirúrgicas. Ademais, essa intervenção é associada a distúrbios psicoemocionais, levando a uma diminuição da qualidade de vida, especialmente em pacientes jovens. Nesse cenário, para casos de tumores pequenos e com boa proporção tumor/mama, houve o aumento das indicações de cirurgia com preservação de órgãos, reconstrutivas e restauradoras. No entanto, devido à agressividade da doença, a mastectomia ainda predomina em relação à lumpectomia, representando 67% e 33% dos casos, respectivamente (BARANOVA *et al.*, 2022). Atualmente, a cirurgia conservadora da mama seguida de radioterapia é considerada o padrão ouro para o tratamento local do CMTN. Como resultado, apresenta sobrevida comparável aos da mastectomia, especialmente para tumores detectados precocemente (LEONE *et al.*, 2023).

A radioterapia é essencial no manejo do CMTN, particularmente naqueles portadores de mutações *BRCA 1*. A deficiência funcional desse gene leva à perda da capacidade de reparo ao DNA, aumentando a instabilidade genômica causada pela radiação. Após a cirurgia conservadora, a radioterapia reduz em 50% o risco de recorrência em um período de 10 anos e diminui em 20% a mortalidade por CM em 15 anos. Contudo, devido à natureza altamente proliferativa e agressiva do CMTN, suas taxas de recorrência permanecem elevadas (OFFERSEN; OVERGAARD, 2020). Contudo, a radioterapia pode estar associada a reações adversas. Em pacientes com CM, os sintomas iniciais mais comuns são irritação da pele, fadiga, inchaço da mama, perda de cabelo na área tratada, problemas para mover o braço e o ombro, cansaço e fraqueza. À medida que o tratamento avança, há o risco de desenvolver doença cardíaca e linfedema. Além disso, é descrito o risco de surgimento de neoplasias secundárias, devido à exposição prolongada à radiação, com maior ocorrência em mulheres diagnosticadas com CM em idade jovem. Problemas menos frequentes após a radioterapia incluem fraturas de costelas, dor crônica, trombose da veia axilar e necrose óssea (SENKUS-KONEFKA *et al.*, 2006).

A quimioterapia, administrada tanto de forma intravenosa e/ou oral, pode ser adotada em sistemas isolados ou em combinações. Pode ser realizada na forma

neoadjuvante, reduzindo o tumor antes do tratamento principal, e/ou adjuvante, administrada após o tratamento principal para eliminar possíveis células neoplásicas restantes. As antraciclinas e taxanos têm sido utilizadas como regime de quimioterapia padrão para o CMTN. As antraciclinas, como doxorrubicina e epirrubicina, são intercalantes de DNA e inibidoras da topoisomerase II, impedindo a replicação e transcrição gênicas, o que conduz a quebras nas fitas de DNA e indução de apoptose, potencializada pela geração ROS. Além disso, estudos apontam que são capazes de ativar células T CD8+, aumentando as taxas de resposta e sobrevida dos pacientes. Os taxanos, como paclitaxel e docetaxel, por sua vez, promovem a estabilização dos microtúbulos e inibem sua despolarização, comprometendo a dinâmica do fuso mitótico e interrompendo a divisão celular. Quando administrados em conjunto, esses agentes associam mecanismos de ação complementares, potencializando a eficácia terapêutica e reduzindo o risco de recidiva e com taxas de resposta patológica completa de pelo menos 40% no CMTN. Além dessas drogas, existem outros quimioterápicos que podem ser utilizados, como os derivados de platina, antimetabólitos e alquilantes (OBIDIRO *et al.*, 2023).

Entretanto, a quimioterapia pode ser severa para os pacientes. Entre os efeitos agudos mais comuns, destacam-se náuseas, vômitos, mucosite oral, fadiga e mielossupressão, o que pode levar a anemia e trombose, aumentando o risco de infecções e sangramentos. Efeitos cumulativos e de longo prazo incluem neuropatia periférica, cardiotoxicidade (particularmente com o uso de antraciclinas), alterações cognitivas e disfunções hormonais. É relatado também, problemas dermatológicos, alterações gastrointestinais e imunossupressão persistente, impactando significativamente a qualidade de vida durante e após o tratamento. Outro ponto a ser mencionado é a resistência tumoral aos quimioterápicos, especialmente no CMTN. A presença de mecanismos como expressão aumentada de proteínas de efluxo, alterações em vias de sinalização de apoptose e ativação de fatores de reparo do DNA, reduzem a eficácia do tratamento, aumentando a probabilidade de recidiva e progressão da doença (WAHBA; EL-HADAAD, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

A imunoterapia também vem sendo utilizada no manejo do CMTN, com os inibidores de *checkpoint* imunológico (ICI), em especial os inibidores do ligante 1 do receptor de morte programada (PD-L1). Essa proteína, ativamente expressa na superfície da célula tumoral, ao se ligar no seu receptor PD-1 nos linfócitos T citotóxicos, inibe a resposta imune promovendo a progressão tumoral. Os ICI's, como o atezolizumabe e avelumabe, agem bloqueando a ligação PD-1/PD-L1, restaurando a atividade antitumoral

dos linfócitos T e aumentando a resposta imune contra o tumor (LI *et al.*, 2025). Em pacientes com CMTN metastático, observa-se que o tratamento apresenta uma atividade antitumoral duradoura e toxicidade controlável. Contudo, ainda não há uma compreensão completa dos fatores moleculares envolvidos no escape imunológico das células tumorais, o que está diretamente relacionado com a resistência à imunoterapia. Alguns pacientes PD-L1 positivos, por exemplo, não respondem aos ICIs (LI *et al.*, 2025). Ademais, o CMTN é considerado altamente heterogêneo, com subtipos moleculares distintos e com imunogenicidade variável (ESSALIHI *et al.*, 2025).

Os inibidores da poli (ADP-ribose) (PARP) também são uma nova classe de moléculas utilizadas no tratamento de pacientes com CMTN que apresentam mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2*. As enzimas PARP pertencem a uma extensa família de proteínas que desempenha um papel crucial no processo de reparo por excisão de bases. A PARP-1 participa do reparo de quebras de fita simples no DNA (SINGH *et al.*, 2021) e, pacientes com CMTN com mutações em *BRCA1* ou *BRCA2*, são deficientes nesse sistema. Portanto, com a adição de inibidores de PARP, ocorre um acúmulo de erros, o que leva à ativação do processo de apoptose nas células tumorais. Para o tratamento do CMTN metastático foram aprovados o olaparib e talazoparib. Comercialmente, encontram-se disponíveis também o rucaparibe, niraparibe e veliparibe (BARCHIESI *et al.*, 2021; PAPADIMITRIOU; MOUNTZIOS; PAPADIMITRIOU, 2018).

Finalmente, vem se destacando os conjugados de anticorpos e fármacos (ADC), atualmente testados em tumores sólidos avançados e metastáticos, como o CMTN. Sua estrutura é composta por um agente citotóxico, um anticorpo monoclonal (mAb) e um ligante estável, responsável pela liberação do fármaco nas células-alvo. Atualmente, para o CMTN o Sacituzumab Govitecan (SG) está sendo utilizado como tratamento. Esse ADC é composto por um mAb contra o antígeno de superfície de células trofoblásticas humanas 2 (TROP-2) ligado ao SN-38, um derivado ativo do irinotecano (inibidor da topoisomerase 1) (DRI *et al.*, 2024). Em comparação à quimioterapia padrão, pacientes com CMTN metastático tratado com SG apresentaram um aumento de sobrevida livre de progressão de 1,7 para 5,6 meses e a sobrevida global praticamente dobrou de 6,7 para 12,1 meses (SCHIPILLITI *et al.*, 2024). Apesar dos resultados promissores, observa-se toxicidades específicas, como neutropenia, diarreia e alopecia, além de risco de resistência tumoral (LI *et al.*, 2025).

Assim, o CMTN continua sendo um dos subtipos mais agressivo e de difícil manejo clínico. Possui uma maior heterogeneidade biológica comparado aos outros subtipos de CM, o que se relaciona a baixa eficácia das opções terapêuticas existentes. Para os inibidores de PARP, apenas 15% dos casos de CMTN possuem as mutações germinativas em *BRCA1/2*, sendo a maioria não elegível ao tratamento. Para a imunoterapia ser bem-sucedida, o tumor deve possuir uma carga mutacional tumoral alta, o que não ocorre na maioria dos pacientes (CHAPDELAINE *et al.*, 2023). Nesse cenário, os produtos naturais, principalmente de origem vegetal, vêm se destacando. São capazes de modular vias alternativas, diferentes das já conhecidas e utilizadas, influenciando no comportamento, sobrevivência e *hallmarks* tumorais (QIAN *et al.*, 2026).

1.5 Produtos naturais e *Renealmia petasites*

Em virtude da marcante diversidade química presente na natureza, os produtos naturais são vistos como um valioso estoque de compostos bioativos. Por esta razão, diferentes fitoconstituintes vem sendo investigados quanto à sua aplicabilidade clínica. No campo da oncologia, cerca de 60% dos agentes anticâncer atualmente em uso e com eficácia relevante são provenientes de produtos naturais. Os derivados de plantas são os mais explorados. Seus metabólitos secundários, como flavonoides, taninos, alcaloides e terpenoides, são reconhecidos por suas significativas propriedades medicinais, incluindo potencial antitumoral. São responsáveis por ativar e modular vias metabólicas influenciando na proliferação, migração e apoptose. Portanto, são uma importante fonte de novos quimioterápicos (ABDALLA *et al.*, 2022; HUANG; LU; DING, 2021).

O gênero *Renealmia* L.f., que pertence à família Zingiberaceae, possui aplicações, medicinais e alimentares. Abriga várias espécies que se distinguem por suas características morfológicas e suas distribuições nas regiões neotropicais e africanas, sendo a maioria encontrada em áreas com florestas tropicais úmidas. Geralmente, as plantas desse gênero são terrestres, variando de 1 a 3 metros de altura, podendo atingir até 6 metros, e se caracterizam como herbáceas com rizomas de ramificação simpodial, frequentemente espessos e com uma textura quase lenhosa, além de apresentarem raízes carnosas finas (WFO, 2025). No aspecto alimentar, espécies como *R. petasites* e *R. alpinia* produzem frutos frescos que são considerados comestíveis, especialmente pela presença de arilo em suas sementes, além de serem utilizados como temperos ou condimentos. Do ponto de vista medicinal, destacam-se *R. alpinia* e *R. exaltata*, usadas

tradicionalmente por comunidades indígenas da América do Sul no tratamento de dores de cabeça e musculares, além do uso da infusão de sementes de *R. exaltata* no manejo do bruxismo (NEGRELLE, 2015). Poucas espécies desse gênero foram estudadas em relação à sua composição química. No entanto, pelo menos 14 espécies são mencionadas na medicina popular por suas propriedades como analgésicos, anticancerígenos, antifúngicos, antimaláricos, antiofídicos, anti-inflamatórios e antioxidantes (FRANZOI, 2020).

Entre as espécies que receberam pouca atenção em estudos, encontra-se a *R. petasites*, popularmente chamada de pacová (Figura 3). Essa planta é nativa do Brasil e cultivada principalmente nas regiões Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul do Brasil (Paraná e Santa Catarina), tendo como principal bioma, a Mata Atlântica. Suas sementes são tradicionalmente usadas como vermífugo, no tratamento de problemas estomacais, diarreia e infertilidade (CNCFLORA, 2012). Além disso, seu óleo essencial é usado por comunidades locais em São Paulo para problemas cardíacos (SANTOS *et al.*, 2021). Estudos químicos preliminares identificaram oito compostos em seu perfil fitoquímico, incluindo cinco diarilheptanoides, um flavonoide e dois álcoois graxos. A concentração total de flavonoides, fenólicos e taninos foram encontrados em maiores quantidades nos rizomas, seguido pelo caule e folhas, sendo esta última, particularmente rica em flavonoides. Esses constituintes se associam a um potencial antioxidante e anti-inflamatório significativo, com a diminuição de radicais livres e/ou inibindo suas ações intracelulares e inibição da produção de importantes mediadores do processo inflamatório, como TNF- α e IL-6 (SOARES *et al.*, 2021). Apesar do uso tradicional e dos resultados iniciais promissores, ainda são escassos os estudos que investigaram as atividades biológicas de extratos de *R. petasites*. Diante desse contexto, a investigação do potencial antitumoral de extratos dessa espécie contra o CM representa uma estratégia promissora (NEGRELLE, 2015).

Figura 3. Planta adulta da *Renealmia petasites*.



Fonte: (FRANZOI, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos celulares de extratos das folhas secas de *R. petasites* em células mamárias, especialmente em linhagens tumorais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial de diferentes extratos de *R. petasites* (EAT 25, EAT 39, EAT 40, EAT 41, EAT 42, EAT 43 e EAT 44) em alterar a viabilidade de células mamárias;
- Estabelecer concentração inibitória média dos extratos para o controle seletivo de células tumorais mamárias;
- Determinar o potencial antiproliferativo dos extratos;
- Identificar alterações no perfil transcricional das células tratadas com os extratos;
- Identificar o(s) extrato(s) mais promissor(es) para estudos detalhados sobre seu(s) mecanismo(s) de ação em neoplasias mamárias malignas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extratos de *R. petasites*

R. petasites foi coletada no Herbário Medicinal da Faculdade de Farmácia, 21°46'38.7"S 43°22'00.5"W, Juiz de Fora, MG, Brasil. A coleta, processamento, obtenção das frações foram realizados pelo Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho e gentilmente cedidos para análise de suas ações em células tumorais mamárias. Foi utilizado o extrato bruto da planta seca (EAT 25) e suas frações hexânica (EAT 39), diclorometano (EAT 40), acetato de etila (EAT 41), hidrometanólica (EAT 42), hexano/ácido acético (EAT 43) e metanol/ácido acético (EAT 44). Este estudo foi conduzido em conformidade com a Lei Federal Brasileira número 13.123/2015 de Acesso ao Patrimônio Genético, registrado sob o número AC249C3.

3.2 Cultivo celular

Foram utilizadas quatro linhagens celulares adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC): MCF-10A (epitelial mamária não tumorigênica), MCF7 (CM luminal), MDA-MB-231 (CMTN) e HFF (fibroblasto humano). A linhagem MCF-10A foi cultivada em meio DMEM-F12 (Gibco®), 20 ng/mL do fator de crescimento epidérmico (EGF) (Gibco®), 0,5 µg/mL de hidrocortisona (Sigma®) e 10 µg/mL de insulina (Gibco®). As células MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®) e a linhagem MDA-MB-231 foi mantida em meio L15 (Gibco®). As células HFF foram cultivadas em meio DMEM-HG (Gibco®). Todas as linhagens foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% da solução de antibiótico e antimicótico (Gibco®) e mantidas a 37°C. Apenas as células MDA-MB-231 não foram cultivadas em atmosfera de 5% de CO₂. Para a realização dos experimentos as células foram utilizadas em 80% de confluência.

3.3 Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5difeniltetrazólio (MTT). Inicialmente, foi conduzido um *screening* inicial apenas nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, as quais foram semeadas em placas de 96 poços nas densidades: 3×10^3 e $1,5 \times 10^4$ células/poço, respectivamente. Os extratos e frações foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO-0,5%) (Êxodo Científica®), obtendo-se uma concentração de estoque de 50 mg/mL. Em seguida, foram diluídos em série no meio de cultivo até as concentrações finais de 20 µg/mL, 100 µg/mL e 500 µg/mL. Como controle negativo, foi utilizado apenas células com o meio. Após 48 horas de tratamento, o MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado à cultura e mantido por 4 horas. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de DMSO foram acrescentados em todos os poços para a diluição dos cristais de formazan.

O valor de absorbância de cada poço a 570 nm foi detectado por um leitor de microplacas (Thermo Plate, TP-Reader, Waltham, MA, EUA). A viabilidade foi apresentada em percentagem conforme a seguinte fórmula:

$$\%viabilidade\ celular = \frac{AA - ABSC}{ADMSO - ABSC} \times 100 \quad (F1)$$

AA = Absorbância da Amostra

ABSC = Absorbância do controle negativo (células não tratadas)

ADMSO = Absorbância do controle de solvente (DMSO)

Após o cálculo do percentual de viabilidade, o ensaio de MTT foi novamente realizado com as amostras mais promissoras, EAT 39 e EAT 44, nas linhagens tumorais e nas linhagens não-tumorigênicas MCF-10A e HFF, plaqueadas em 96 poços na densidade de $1,5 \times 10^4$ e 8×10^3 células/poço respectivamente. Os procedimentos foram os mesmos descritos acima e os tratamentos ajustados para as seguintes concentrações finais de: 1,35 µg/mL, 4,1 µg/mL, 12,5 µg/mL, 37 µg/mL, 111 µg/mL, 333,5 µg/mL e 1.000 µg/mL. Com base nos resultados da absorbância a 570 nm, foi calculado a concentração inibitória média (IC₅₀) dos extratos e o índice de seletividade (IS), considerando a razão entre o IC₅₀ das células MCF-10A e HFF (não tumorigênicas) e o IC₅₀ de cada linhagem de células tumorais. Valores de $IS \geq 2$ foram considerados significativos (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021).

3.4 Formação de colônias

O ensaio de formação de colônias foi realizado utilizando as frações com os melhores valores de IC_{50} nas células MDA-MB-231: EAT 39 e EAT 44. Para isso, as células foram semeadas em placas de 6 poços (5×10^2 células/poço) e mantidas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, foram tratadas com as concentrações de $IC_{50/4}$ e $IC_{50/2}$ das frações EAT 39 (6,20 µg/mL e 12,4 µg/mL) e EAT 44 (11,9 µg/mL e 23,8 µg/mL). Como controle, um grupo sem tratamento foi incluído no experimento. Após 48 horas de exposição às frações, o tratamento foi retirado e adicionado um novo meio de cultura completo. As placas foram incubadas por 15 dias, com troca de meio a cada 3 dias. Ao término do período, as colônias foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x), fixadas com formaldeído a 4% (v/v) por 20 minutos e coradas com solução violeta cristalina (0,5% m/v) em metanol (25% v/v) por 5 minutos. A quantificação da formação de colônias foi realizada por meio da diluição do corante em ácido acético a 33% (v/v) e as imagens de cada poço foram obtidas utilizando o equipamento iBright (ThermoFisher). A leitura da absorbância foi medida a 570 nm em um leitor de microplacas (Thermo Plate, TP-Reader, Waltham, MA, EUA).

3.5 Ensaio de Migração

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Lanna e colaboradores (2021), com algumas modificações. Monocamadas confluentes de células MDA-MB-231 (2×10^5), em placas de 12 poços, foram riscadas com uma ponta de ponteira de 200 µL. As células foram então tratadas com concentrações correspondentes a $IC_{50/4}$ e $IC_{50/2}$ das frações EAT 39 e EAT44. As imagens foram capturadas no tempo 0, 24 e 48 horas usando o microscópio específico invertido EVOSTM XL Core (ThermoFisher) com aumento de 100x em diferentes campos por poço. A área de fechamento do arranhão foi medida usando o software ImageJ, e a migração celular foi determinada como a porcentagem de fechamento em comparação com a largura inicial da ranhura, referente ao tempo 0 de tratamento.

3.6 Quantificação dos transcritos por RT-qPCR em tempo real

A linhagem MDA-MB-231 foi tratada por 48 horas com uma concentração equivalente a $IC_{50/4}$ das frações EAT 39 e 44. Após esse período, o RNA total das células foi extraído utilizando Trizol Reagent® (Invitrogen), tendo como base as instruções do fabricante. A integridade e concentração do RNA foram determinadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific - NanoDrop Lite) nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A partir de 1 µg de RNA total, foi sintetizado o cDNA (DNA complementar) com o kit M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase – Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, utilizando primers hexâmetros (Invitrogen). Para a quantificação dos transcritos dos genes *IL6*, *IL1-β* e *TGF-β*, ensaios de qPCR foram otimizados. As reações foram preparadas utilizando Power Syber Green (Applied Biosystems) contendo 4,5 µL de master mix e 0,5 µM dos iniciadores em um volume final de 10 µL. A ciclagem foi realizada em equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) incluindo aquecimento inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificação, alternando 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C para *IL-6* e *IL1-β* e 62°C para *TGF-β*. A especificidade dos iniciadores foi confirmada pela análise da curva de dissociação do amplificado. Como normalizadores, foram utilizados os genes *B2M* (Beta-2-Microglobulina) e *HPRT* (Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase), aplicando-se o método Cq comparativo. Os iniciadores utilizados nesse estudo estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.

Gene	Sequência (5' - 3')	Fragmento (pb)
<i>IL6</i>	F: GATTCCAAAGATGTAGCCGCC	242
	R: ATTTTCACCAGGCAAGTCTCCTC	
<i>IL1-β</i>	F: CAGGATATGGAGCAACAAGTGG	136
	R: GGGCTTATCATCTTTCAACACGC	
<i>TGF-β</i>	F: GTACCTGAACCCGTGTTGCTC	107
	R: CAGGAATTGTTGCTGTATTCTGG	
<i>HPRT</i>	F: GCTGAGGATTTGGAAAGGGTG	94
	R: GGCCTCCCATCTCCTTCATC	
<i>B2M</i>	F: CCTGCCGTGTGAACCATGT	94
	R: GCGGCATCTTCAAACCTCC	

Fonte: Própria autora.

3.7 Análises Estatísticas

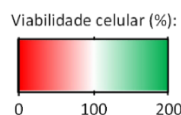
As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, Califórnia, EUA). Inicialmente, todos os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de desvios. O teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey foi empregado para a comparação de grupos. A determinação do IC₅₀ foi feita por regressão não linear. Foram conduzidos três ensaios independentes em triplicata. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

A viabilidade das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foi avaliada pelo ensaio de MTT após 48 horas de incubação com o extrato EAT 25 e suas frações EAT 39, EAT 40, EAT 41, EAT 42, EAT 43 e EAT 44 para um *screening* inicial das amostras com maior potencial em inibir células de CM. De acordo com a Tabela 2, foi possível selecionar as amostras EAT 25, EAT 39 e EAT 44, uma vez que as frações EAT 40, EAT 41, EAT 42 e EAT 43 não apresentaram um significativo efeito citotóxico sobre as linhagens tumorais, mantendo valores de viabilidade celular acima de 50% mesmo na maior concentração de 500 µg/mL.

Tabela 2- Ensaio de citotoxicidade apresentando o percentual de viabilidade das linhagens celulares tumorais mamárias MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com diferentes concentrações dos extratos de *R. petasites* (20, 100 e 500 µg/ml) por 48 h.

Concentração (µg/mL)	MDA-MB-231			MCF-7		
	20	100	500	20	100	500
EAT 25	109,3 ± 5,3	80,78 ± 5,1	34,39 ± 2,2	94,40 ± 3,7	65,44 ± 11,8	31,25 ± 5,5
EAT 39	80,78 ± 1,9	23,03 ± 1,1	18,96 ± 0,5	99,39 ± 5,1	39,94 ± 9,1	11,28 ± 0,2
EAT 40	87,53 ± 4,0	40,07 ± 0,8	54,96 ± 2,8	139,7 ± 20,4	68,99 ± 7,1	72,43 ± 16,7
EAT 41	103,7 ± 9,4	109,8 ± 2,6	121,1 ± 11,4	107,18 ± 1,3	118,4 ± 10,6	87,36 ± 19,3
EAT 42	106,8 ± 9,3	100,9 ± 8,0	124,9 ± 3,7	100,59 ± 5,6	101,7 ± 5,5	65,24 ± 14,3
EAT 43	90,64 ± 3,9	92,78 ± 0,5	95,57 ± 3,2	118,2 ± 13,8	106,3 ± 6,4	88,46 ± 10,9
EAT 44	92,41 ± 3,8	40,61 ± 0,4	19,82 ± 0,8	85,96 ± 11,6	66,54 ± 5,0	10,23 ± 0,6



Fonte: Própria autora.

Já o extrato bruto EAT 25 reduziu significativamente a viabilidade das células tumorais mamárias, que se manteve em apenas $34,39 \pm 2,2\%$ para MDA-MB-231 e $31,25 \pm 5,5\%$ para MCF-7. O EAT 39 se destacou, com acentuada citotoxicidade na linhagem MDA-MB-231 (viabilidade de $18,96 \pm 0,5\%$), sugerindo maior atividade nessas células. Seguindo o mesmo perfil de destaque, as células de CMTN mantiveram sua viabilidade em apenas $19,82 \pm 0,8\%$ após o tratamento com EAT 44. Portanto, os resultados evidenciam que o extrato EAT 25 e as frações EAT 39 e EAT 44 foram os mais promissores, com efeito dose-dependente e maior atividade sobre a linhagem do CMTN.

Após tratamentos também das células não-tumorigênicas MCF-10A e HFF com EAT 25, EAT 39 e EAT 44, os valores de IC_{50} foram calculados utilizando um maior intervalo de concentrações (1,35 µg/mL a 1.000 µg/mL) por um período de 48 horas (Tabela 3). As linhagens não tumorais foram menos sensíveis aos extratos. Nota-se que o EAT 39 apresentou os menores valores de IC_{50} (24,81 µg/mL para MDA-MB-231 e 49,43 µg/mL para MCF-7), indicando maior potência citotóxica. O EAT 44 também mostrou um efeito significativo, com IC_{50} de 47,63 µg/mL para MDA-MB-231 e 122,4 µg/mL para MCF-7. Já o extrato bruto EAT 25 apresentou os maiores valores de IC_{50} em todas as linhagens, especialmente na MCF-7 (247,6 µg/mL).

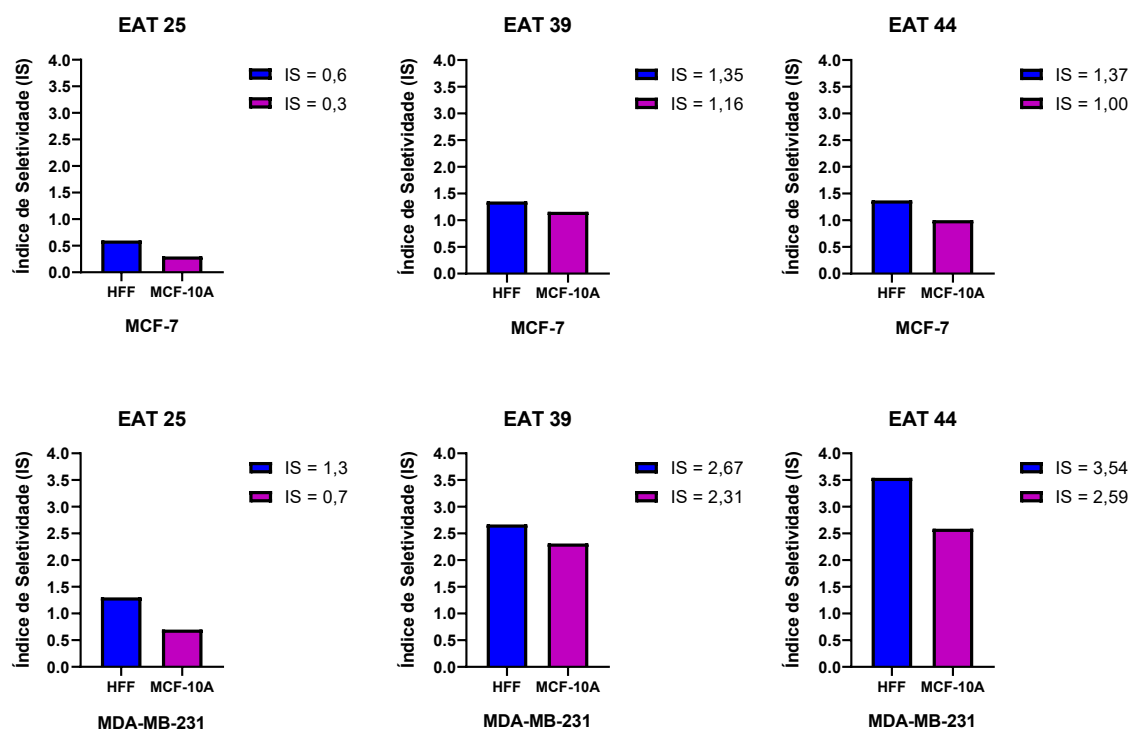
Tabela 3- Concentrações inibitórias médias (IC_{50} - $\mu\text{g/mL}$) do extrato EAT 25 e frações EAT 39 e EAT 44, estimadas pelo ensaio MTT. Células não tumorigênicas (MCF-10A e HFF) e células tumorais mamárias (MDA-MB-231 e MCF-7) foram tratadas por 48 horas.

Extratos/Frações	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	MDA-MB-231	MCF-7	HFF	MCF-10A
EAT 25	123,1	247,6	160,9	95,78
EAT 39	24,81	49,43	66,46	57,39
EAT 44	47,63	122,4	168,7	123,5

Fonte: Própria autora.

A seletividade também foi calculada (Figura 4). A fração EAT 44 se destacou, com valores de IS maiores, especialmente na linhagem MDA-MB-231, sendo de 3,54, quando comparada à HFF e de 2,59 quando comparada à MCF-10A. Para a linhagem MCF-7, essa fração não se mostrou seletiva ($IS < 2,0$). O EAT 39 demonstrou comportamento semelhante, tendo $IS = 2,67$ e $2,31$ para MDA-MB-231 e $1,35$ e $1,16$ para MCF-7 (não seletivo). Assim, as frações mais citotóxicas também apresentaram menor atividade nas linhagens não tumorais, evidenciando, mais uma vez, seu caráter promissor.

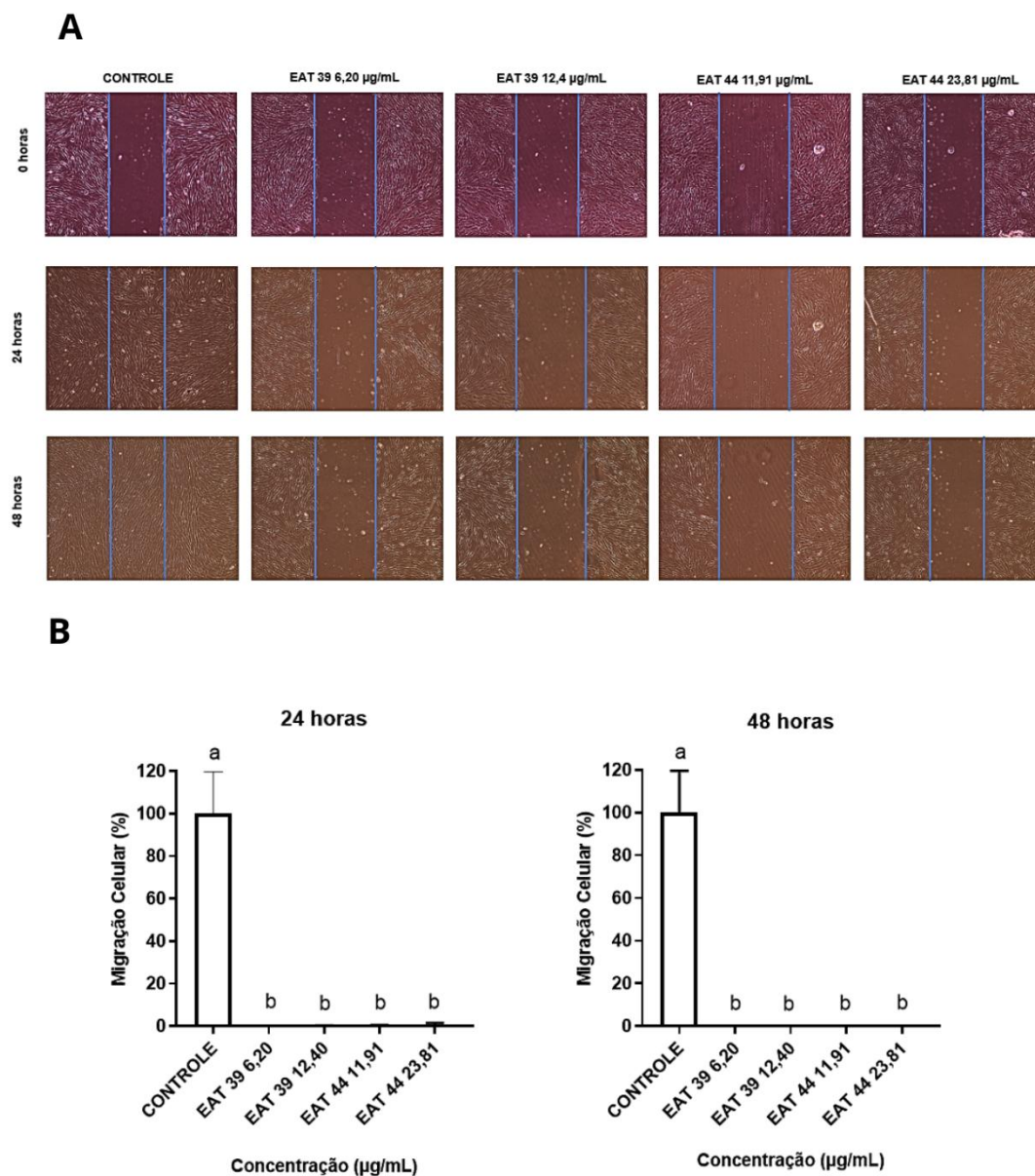
Figura 4- Gráficos dos índices de seletividade (IS) do extrato EAT 25 e das frações EAT 39 e EAT 44 frente as linhagens tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7), comparadas as linhagens não tumorigênicas (HFF e MCF-10A).



Fonte: Própria autora.

Ensaio relacionados a mecanismos associados à tumorigênese como migração e clonogenicidade foram, então, realizados nas células de CMTN MDA-MB-231 utilizando os valores de $IC_{50/2}$ e $IC_{50/4}$ correspondentes ao tratamento com EAT 39 e EAT 44. No experimento de migração, como controle, células de fibroblasto humano foram tratadas para comparar o perfil migratório fisiológico com o comportamento altamente invasivo observado na linhagem tumoral MDA-MB-231. Como resultado, o grupo controle (células HFF não tratadas) apresentou progressão do fechamento da ferida em 100% nas primeiras 24 horas. Já todos os tratamentos inibiram o processo migratório sem fechamento da ferida. A análise quantitativa confirmou diferença estatística significativa entre o controle e todos os tratamentos ($p < 0,05$) (Figura 5).

Figura 5- Ensaio de migração celular na linhagem HFF tratada com os extratos EAT 39 e EAT 44 (A) Imagens representativas do fechamento da ferida nos tempos de 0, 24 e 48 horas. As linhas azuis indicam as bordas da área inicial da lesão (B) Gráficos da porcentagem de fechamento da área de ferida após 24 e 48 horas. A linhagem HFF foi tratada com as frações EAT 39 nas concentrações de 6,20 ($IC_{50/4}$) e 12,40 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50/2}$), e EAT 44 nas concentrações de 11,91 ($IC_{50/4}$) e 23,81 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50/2}$). Diferentes letras sobre as barras indicam grupos estatisticamente distintos pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

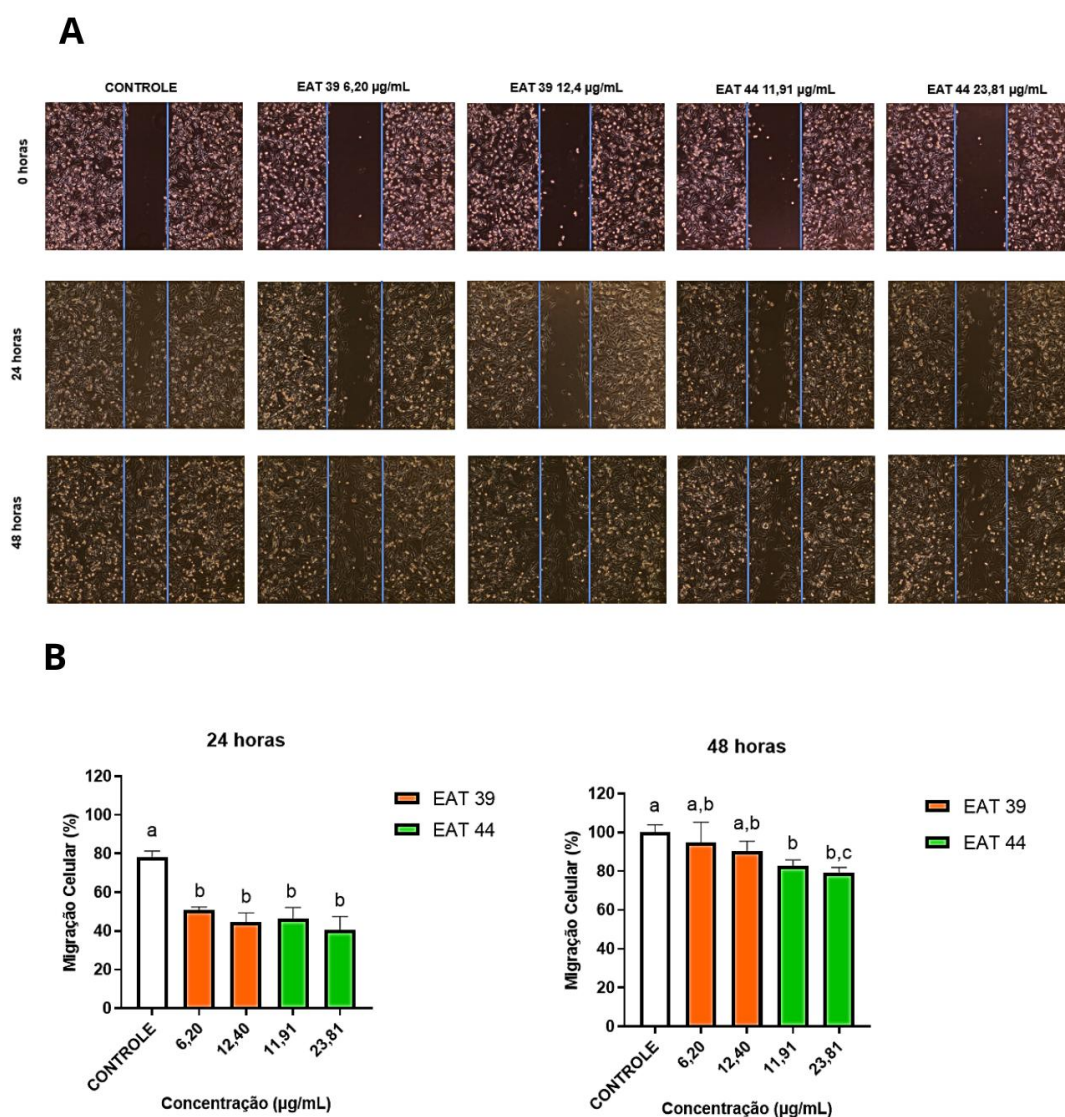


Fonte: Própria autora.

Nas células MDA-MB-231, como esperado, foi observado um elevado percentual migratório ao longo de 48 horas (Figura 6). Nos tratamentos com o EAT 39 e EAT 44 houve uma redução da migração de forma dose-dependente após 24 horas, sendo que,

após 48 horas, apenas o EAT 44 diminuiu significativamente a taxa de migração em relação ao controle ($p < 0,05$) e apresentou diferença entre as concentrações testadas.

Figura 6- Ensaio de migração celular na linhagem MDA-MB231 tratada com os extratos EAT 39 e EAT 44 (A) Imagens representativas do fechamento da ferida nos tempos de 0, 24 e 48 horas. As linhas azuis indicam as bordas da área inicial da lesão (B) Gráficos da porcentagem de fechamento da área de ferida após 24 e 48 horas. A linhagem MDA-MB-231 foi tratada com as frações EAT 39 nas concentrações de 6,20 ($IC_{50/4}$) e 12,40 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50/2}$), e EAT 44 nas concentrações de 11,91 ($IC_{50/4}$) e 23,81 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50/2}$). Diferentes letras sobre as barras indicam grupos estatisticamente distintos pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

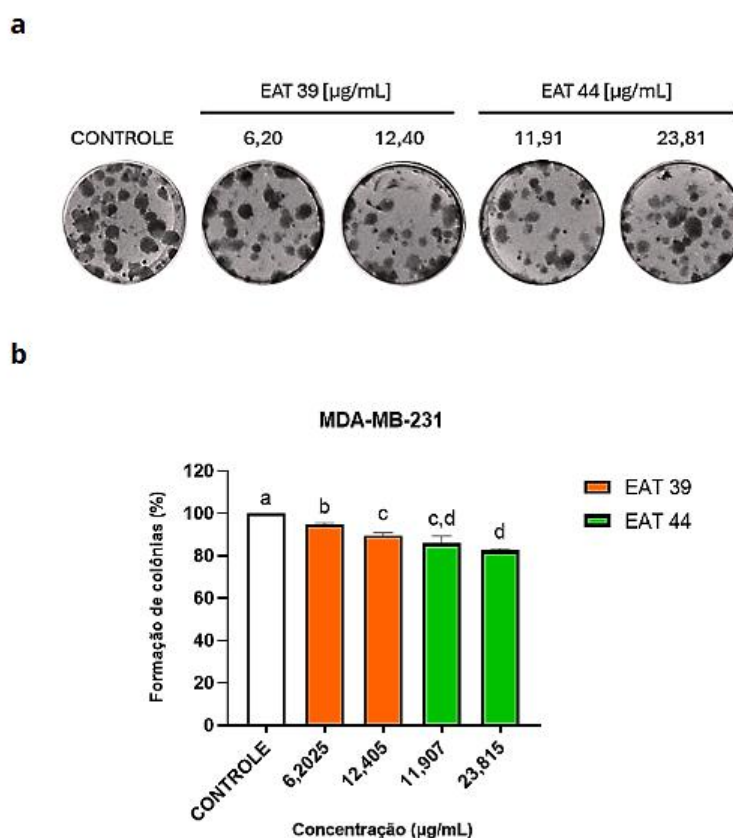


Fonte: Própria autora.

Em relação ao ensaio clonogênico (Figura 7), EAT 39 reduziu significativamente em 5% e 10% a formação de novas colônias quando as células MDA-MB-231 foram tratadas com 6,20 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50/4}$) e 12,40 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50/2}$) da fração, respectivamente. Uma

resposta semelhante foi observada para EAT 44, com redução de migração próxima de 12% e 20% nas concentrações 11,91 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{IC}_{50/4}$) e 23,81 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{IC}_{50/2}$). Estatisticamente, houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle. Apenas para EAT 39 foi verificada diferença entre as concentrações testadas.

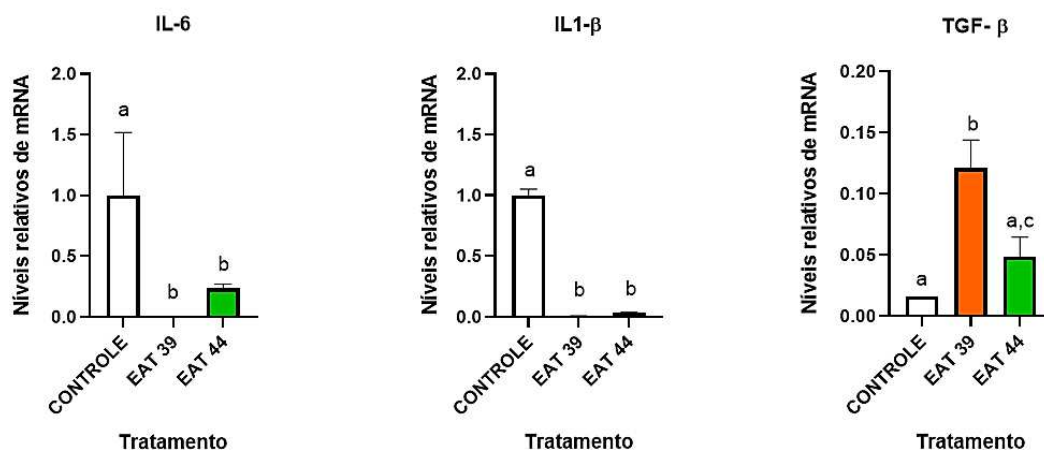
Figura 7- Clonogenicidade das células MDA-MB231 após tratamento por 48 horas com as frações EAT 39 e EAT 44 (A) Imagens representativas das colônias. (B) Gráfico do percentual de colônias formadas. A linhagem MDA-MB-231 foi tratada com as frações EAT 39 nas concentrações de 6,20 ($\text{IC}_{50/4}$) e 12,40 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{IC}_{50/2}$), e EAT 44 nas concentrações de 11,91 ($\text{IC}_{50/4}$) e 23,81 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{IC}_{50/2}$). Diferentes letras sobre as barras indicam grupos estatisticamente distintos pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Própria autora.

Por fim, expressão dos transcritos de *IL-6*, *IL-1 β* e *TGF- β* foram quantificados por qPCR (Figura 8). Ambas as frações, EAT 39 e EAT 44, reduziram significativamente a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias *IL-6* e *IL-1 β* em relação ao controle. No entanto, os transcritos de *TGF- β* aumentaram, sendo esse aumento mais expressivo quando as células foram tratadas com EAT 39.

Figura 8- Expressão relativa dos genes *IL-6*, *IL-1 β* e *TGF- β* em células MDA-MB-231 tratadas com os valores de IC_{50/4} das frações EAT 39 e EAT 44. Os níveis de expressão gênica foram determinados por RT-qPCR após 48 horas de tratamento, normalizados pelo gene de referência B2M. Diferentes letras sobre as barras indicam grupos estatisticamente distintos pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Própria autora.

5 DISCUSSÃO

O CM é reconhecido como uma doença altamente complexa e heterogênea. Entre seus subtipos, o CMTN se destacada por apresentar comportamento extremamente agressivo e elevada capacidade metastática. Devido à ausência de receptores hormonais (ER, PR) e da superexpressão de HER2, o tratamento atual se baseia, principalmente, no uso de quimioterápicos citotóxicos. Contudo, a elevada taxa de resistência, aliada aos efeitos adversos expressivos, fomenta a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes e menos agressivas aos pacientes (LI *et al.*, 2025). Nesse contexto, compostos de origem natural vêm sendo explorados, sobretudo diante de sua composição fitoterápica diversa e efeitos antitumorais já relatados. Os extratos vegetais se destacam por modularem vias relacionadas à apoptose, angiogênese, migração celular, expressão de genes envolvidos no reparo do DNA e resposta imunológica. Ademais, são capazes de inibir vias metabólicas essenciais para a sobrevivência e progressão tumoral (HOŁOTA *et al.*, 2025).

O gênero *Renealmia* (família Zingiberaceae) é composto por diversas espécies ricas em metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, terpenos e fenólicos com propriedades citotóxicas e moduladoras de vias inflamatórias. Contudo, seu efeito

antitumoral ainda é desconhecido, com ausência de dados relativos ao CMTN. No caso específico de *R. petasites*, a literatura disponível concentra-se principalmente no isolamento e caracterização de seus metabólitos (NEGRELLE, 2015), com poucos estudos que analisam, de forma sistemática, sua citotoxicidade ou sua capacidade de modular fenótipos celulares relacionados à progressão tumoral. Diante disso, o presente estudo avaliou, pela primeira vez, as atividades citotóxica e funcional de um extrato bruto da folha seca de *R. petasites* e de suas frações em células de CMTN.

Inicialmente, as linhagens MCF-7 (CM luminal) e MDA-MB-231 (CMTN) foram tratadas com os extratos e a viabilidade determinada pelo método descrito por Mosmann em 1983, no qual o sal tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) é clivado pelas enzimas desidrogenases mitocondriais de células viáveis. Assim, a reação parte de uma coloração amarelada e solúvel em água para um composto insolúvel de coloração roxa, o formazan [E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan], refletindo os status de células metabolicamente ativas (MOSMANN *et al.*, 1983). Dentre os extratos avaliadas neste estudo, seus efeitos citotóxicos foram mais expressivos na linhagem MDA-MB-231, CMTN, do que nas células MCF-7, luminais. Essa diferença pode ser explicada pelas características peculiares dos subtipos moleculares de CM. As vias de sobrevivência da MDA-MB-231, por exemplo, são menos dependentes de regulação hormonal, apresentando uma maior instabilidade genética, o que a torna mais susceptível ao estresse metabólico, oxidativo e apoptótico. Em contrapartida, a MCF-7 expressa vias de sinalização associadas ao ER, além de expressar níveis elevados de Bcl-2, que bloqueiam a apoptose intrínseca. Além disso, não expressa caspase-3 funcional (CALAF *et al.*, 2025; ROSAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2020). Portanto, sugerimos que a viabilidade das células após tratamento reflete o envolvimento de mecanismos distintos e relacionados às características moleculares das linhagens. EAT 25 (extrato bruto) e as frações EAT 39 e EAT 44 se destacaram, com menor percentual de viabilidade das células cancerígenas em estudo após o tratamento.

Em um segundo momento, foi avaliada a seletividade das amostras, calculada a partir da citotoxicidade observada para a linhagem HFF, de origem fibroblástica dérmica humana, e MCF-10A, um modelo epitelial mamário não tumoral. Neste momento, as frações EAT 39 e EAT 44 se mostraram superiores em relação ao extrato bruto, EAT 25. De fato, extratos brutos são misturas altamente heterogêneas, compostas por uma ampla diversidade de metabólitos primários e secundários, incluindo substâncias bioativas, mas também componentes inertes, interferentes ou com possível ação antagonista. Com o

processo de fracionamento, ocorre uma concentração seletiva de classes químicas específicas, enriquecendo metabólitos de maior atividade e removendo moléculas indesejáveis (MONAGAS *et al.*, 2022). Sendo assim, a menor eficiência do EAT 25 pode ser explicada pela menor concentração dos princípios ativos e a presença de substâncias que diminuem permeabilidade, reduzem solubilidade, competem por alvos celulares ou sequestram moléculas ativas.

Para além da citotoxicidade e seletividade, tornou-se fundamental investigar se os efeitos de EAT 39 e EAT 44 também se estendiam a outros fenótipos diretamente associados à agressividade tumoral. Isso se justifica, já que o subtipo CMTN, representado pela linhagem MDA-MB-231, apresenta intensa capacidade proliferativa, invasiva e alto potencial migratório (ZAGAMI *et al.*, 2022). Na linhagem não tumoral HFF, tanto o EAT 39 quanto o EAT 44 foram capazes de impedir totalmente a migração dessas células, mesmo não sendo citotóxicos para fibroblastos, uma vez que são mais sensíveis a compostos que interferem em adesão e organização do citoesqueleto (PARSONS *et al.*, 2010). Dessa forma, a completa inibição migratória observada nos fibroblastos sugere que EAT 39 e EAT 44 possam interferir em alvos associados ao citoesqueleto ou à formação de adesões focais, atuando de maneira funcional, mas não citotóxica.

Na linhagem MDA-MB-231, ambas as frações reduziram significativamente a capacidade migratória, porém sem impedir totalmente o fechamento da ferida. Após 24 horas de tratamento, foi possível identificar avanço da migração celular, comportamento que se estendeu até as 48 horas. Esse padrão é esperado, considerando que o subtipo TN possui uma alta ativação basal de vias pró-migratórias (Rho-GTPases, PI3K/AKT, MAPK), as quais promovem reestruturação do citoesqueleto, resistência à apoptose e manutenção da motilidade. Além disso, essas vias estão diretamente associadas a um estado inflamatório crônico, característico da linhagem MDA-MB-231, na qual citocinas como *IL-6* e *IL-1 β* , atuam amplificando o fenótipo de migração e invasão tumoral (ROSADO-SANZ *et al.*, 2025). Dessa forma, mesmo submetidas a estresse, essas células ativam mecanismos compensatórios que preservam parcialmente a migração, sustentados pela comunicação inflamatória autócrina e parácrina (KCIUK *et al.*, 2022). Esse fato ficou ainda mais evidente para EAT 39, uma vez que após 48 horas não foi verificada diferença em relação ao controle. Já EAT 44 manteve uma resposta semelhante entre os tempos avaliados, sugerindo que seus compostos bioativos mantêm sua ação ao longo do tempo.

O ensaio clonogênico, por sua vez, permitiu avaliar a capacidade proliferativa de longo prazo da linhagem MDA-MB-231, fornecendo informações complementares à citotoxicidade e à migração horizontal observadas. De fato, a formação de colônias reflete não apenas viabilidade, mas também autorrenovação, integridade do citoesqueleto, adesão, comunicação célula-célula e sinalização inflamatória sustentada (JONES *et al.*, 2019). Após 48 horas, tanto o EAT 39 quanto o EAT 44 reduziram significativamente a capacidade da MDA-MB-231 de formar colônias, apesar de não apresentarem citotoxicidade imediata nas concentrações avaliadas. Esse resultado é altamente relevante já que o TN é reconhecido por sua expansão clonal, fortemente modulada por citocinas inflamatórias que impulsionam a progressão do ciclo celular e a resistência ao estresse. (MASSIHNIA *et al.*, 2016; ROSADO-SANZ *et al.*, 2025). A clonogenicidade depende de diversos fatores como a proliferação sustentada, integridade da maquinaria de replicação, complexos para reparar danos no DNA, adesão e dinâmica do citoesqueleto. Dessa forma, sugerimos que os metabólitos presentes nas frações sejam capazes de interferir nesses processos, os quais necessitam ser sistematicamente avaliados.

Por fim, foi, então, conduzida a análise de expressão gênica por qPCR para as citocinas pró-inflamatórias *IL-6*, *IL-1 β* e *TGF- β* , marcadores essenciais do microambiente tumoral no CMTN. A linhagem MDA-MB-231 apresenta alta ativação basal de vias inflamatórias como NF- κ B, STAT3 e AP-1, que sustentam os níveis aumentados de *IL-6* e *IL-1 β* , promovendo proliferação, sobrevivência e migração. Além disso, o *TGF- β* é reconhecido por exercer um efeito pleiotrópico no CM, atuando como supressor tumoral em estágios iniciais, mas assumindo função pró-tumoral em tumores avançados (ROSADO-SANZ *et al.*, 2025). Ambas as frações (EAT 39 e EAT 44) reduziram a expressão de *IL-6* e *IL-1 β* . A diminuição do *IL-6*, acompanhada por *IL-1 β* , é de suma importância, já que essa citocina ativa STAT3, responsável pelo crescimento tumoral, evasão de apoptose e indução de EMT. Em contrapartida, houve um aumento na expressão do *TGF- β* para ambas as frações, especialmente o EAT 39. Esse comportamento pode refletir em uma resposta compensatória frequentemente descrita em tumores altamente agressivos, incluindo o CMTN (LASKAR *et al.*, 2025; ROSADO-SANZ *et al.*, 2025). Assim, o aumento do *TGF- β* pode indicar que as células tumorais ao terem suas vias inflamatórias clássicas (*IL-6* e *IL-1 β*) reduzidas, ativaram outras para manter a adaptação e reorganização do citoesqueleto.

Portanto, o perfil de citocinas modulado pelo EAT 44 explica sua melhor atividade nos ensaios de migração, clonogenicidade e viabilidade, reforçando a maior

eficácia de seus princípios ativos. Estudos adicionais de seus componentes majoritários em organismos vivos (*in vivo*) serão conduzidos para aprofundar e estabelecer sua aplicabilidade farmacológica e seu potencial no tratamento do CMTN.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foram avaliadas as atividades citotóxica e funcional do extrato bruto de *R. petasites* e de suas frações em células do CMTN. O extrato bruto apresentou menor eficiência quando comparado às frações, evidenciando a importância da concentração seletiva de metabólitos bioativos. Dentre as amostras avaliadas, destacaram-se EAT 39 e, principalmente, EAT 44, que apresentaram menores valores de IC_{50} e maior seletividade para a linhagem MDA-MB-231. Nos ensaios funcionais, ambas as frações reduziram significativamente a migração das células MDA-MB-231, sendo que EAT 44 manteve o efeito até 48 horas. EAT 39 e EAT 44 também reduziram a formação de colônias de células TNs. Nos ensaios de qPCR, foi observada uma diminuição da expressão das citocinas pró-inflamatórias *IL-6* e *IL-1 β* , destacando-se, novamente, EAT 44, por induzir um menor aumento de *TGF- β* . Portanto, o estudo alcançou os objetivos propostos, de modo que a fração EAT 44 de *R. petasites*, representa uma fonte promissora de compostos bioativos com atividade antitumoral. Esse fato reforça a necessidade da purificação dos componentes bioativos das frações, prosseguindo com estudos adicionais em modelos *in vivo*, a fim de elucidar e aprofundar seus efeitos no CMTN.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, Yasir Osman Ali. *et al.* Natural Products for Cancer Therapy: a review of their mechanism of actions and toxicity in the past decade. **Journal Of Tropical Medicine**, v. 2022, p. 1-20, 11 mar. 2022. Hindawi Limited. DOI:10.1155/2022/5794350.

ADESHAKIN, Funmilayo O. *et al.* Mechanisms for Modulating Anoikis Resistance in Cancer and the Relevance of Metabolic Reprogramming. **Frontiers In Oncology**, v. 11, p. 1-15, 29 mar. 2021. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fonc.2021.626577.

AKRAM, Muhammad. *et al.* Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1-23, 2 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1186/s40659-017-0140-9.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treatment of Triple-negative Breast Cancer**. 2022. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/treatment-of-triple-negative.html>. Acesso em: 30 jul. 2024.

AMORIM, Gelbert Luiz Chamon do Carmo. *et al.* Molecular aspects of bladder cancer. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 1, p. 95-99, mar. 2011. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s1679-45082011rb1593.

ARAÚJO, Thaise G. *et al.* Dynamic dialog between cytokeratin 18 and annexin A1 in breast cancer: a transcriptional disequilibrium. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 7, p. 1178-1184, set. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.acthis.2014.06.008.

BARCHIESI, Giacomo. *et al.* Emerging Role of PARP Inhibitors in Metastatic Triple Negative Breast Cancer. Current Scenario and Future Perspectives. **Frontiers In Oncology**, v. 11, p. 1-16, 25 nov. 2021. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fonc.2021.769280.

BHAT, Gh Rasool. *et al.* Cancer cell plasticity: from cellular, molecular, and genetic mechanisms to tumor heterogeneity and drug resistance. **Cancer And Metastasis Reviews**, v. 43, n. 1, p. 197-228, 8 fev. 2024. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s10555-024-10172-z.

BHATT, Aadra P; REDINBO, Matthew R; BULTMAN, Scott J. The role of the microbiome in cancer development and therapy. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 4, p. 326-344, 8 maio 2017. DOI: 10.3322/caac.21398.

BONILLA, J.A. Merino; TABANERA, M. Torres; MENDOZA, L.H. Ros. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. **Radiología**, v. 59, n. 5, p. 368-379, set. 2017. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.rx.2017.06.003.

BREAST CANCER UK. **About breast cancer**: the biology of breast cancer. The biology of breast cancer. 2024. Disponível em: <https://www.breastcanceruk.org.uk/about-breast-cancer/biology-of-breast-cancer/>. Acesso em: 08 maio 2024.

BREASTCANCER.ORG. **Mastectomy vs Lumpectomy**. 2024. Disponível em: <https://www.breastcancer.org/treatment/surgery/mastectomy-vs-lumpectomy>. Acesso em: 30 jul. 2024.

CALAF, Gloria M. *et al.* Genes Associated with Apoptosis in an Experimental Breast Cancer Model. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 26, n. 19, p. 9735, 7 out. 2025. MDPI AG. DOI: 10.3390/ijms26199735.

CHAPDELAINE, Abygail G. *et al.* Challenges and Opportunities in Developing Targeted Therapies for Triple Negative Breast Cancer. **Biomolecules**, v. 13, n. 8, p. 1207, 1 ago. 2023. MDPI AG. DOI: 10.3390/biom13081207.

CLAUDE, Eloise; DECOTTIGNIES, Anabelle. Telomere maintenance mechanisms in cancer: telomerase, alt or lack thereof. **Current Opinion In Genetics & Development**, v. 60, p. 1-8, fev. 2020. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.gde.2020.01.002.

CNCFlora • **Renealmia petasites Gagnep.** Disponível em: https://proflora.jbrj.gov.br/html/Renealmia%20petasites_2012.html. Acesso em: 10 mar. 2026.

COSTA, Pedro Mikael da Silva. *et al.* Epigenetic reprogramming in cancer: from diagnosis to treatment. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, v. 11, p. 1-16, 14 fev. 2023. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fcell.2023.1116805.

ESSALIHI, Amina *et al.* Immunotherapy for triple-negative breast cancer: current trends and future prospects. **Journal Of The Egyptian National Cancer Institute**, v. 37, n. 1, p. 51, 17 jun. 2025. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1186/s43046-025-00295-x.

FETT-CONTE, Agnes C; SALLES, Andréa B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p. 85-89, abr. 2002. Elsevier BV. DOI: 10.1590/s1516-84842002000200004.

FOUNTZILAS, E. *et al.* Pathology of BRCA1- and BRCA2-associated Breast Cancers: Known and Less Known Connections. **Clinical Breast Cancer**, v. 20, n. 2, p. 152–159, abr. 2020. DOI: 10.1016/j.clbc.2019.08.003.

FRANZOI, Pedro Arcanjo Petenuce. **SUBSÍDIOS AO USO DE Renealmia petasites Gagnep. COMO FONTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS**. 2020. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

HANAHAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022. American Association for Cancer Research (AACR). DOI: 10.1158/2159-8290.cd-21-1059.

HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HARBECK, Nadia. *et al.* Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1-31, 23 set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2.

HOŁOTA, Marcin *et al.* Nature-Inspired Strategies in Cancer Management: the potential of plant extracts in modulating tumour biology. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 26, n. 14, p. 6894, 18 jul. 2025. MDPI AG. DOI: 10.3390/ijms26146894.

HUANG, Min; LU, Jin-Jian; DING, Jian. Natural Products in Cancer Therapy: past, present and future. **Natural Products And Bioprospecting**, v. 11, n. 1, p. 5-13, 3 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s13659-020-00293-7.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Chapter Six - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. Em: AL-MAJED, A. A. (Ed.). Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. **Academic Press**, v. 46, p. 273–307, 2021.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Como surge o câncer?** Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>. Acesso em: 12 maio 2024.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Estimativa 2026:** incidência de câncer no brasil. Rio de Janeiro: Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica, 2026. 168 p. ISBN 978-65-88517-52-9.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). **O que é câncer?** Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 12 fev. 2024.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Cancer today**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/en>. Acesso em: 20 mar. 2024.

IQBAL, Nida; IQBAL, Naveed. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: overexpression and therapeutic implications. **Molecular Biology International**, v. 2014, p. 1-9, 7 set. 2014. Hindawi Limited. DOI: 10.1155/2014/852748.

JONES, Matthew C. *et al.* Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1779, p. 20180227, jul. 2019. The Royal Society. DOI: 10.1098/rstb.2018.0227.

KATSURA, Chie. *et al.* Breast cancer: presentation, investigation and management. **British Journal Of Hospital Medicine**, v. 83, n. 2, p. 1-7, 2 fev. 2022. Mark Allen Group. DOI: 10.12968/hmed.2021.0459.

KCIUK, Mateusz *et al.* Metastasis and MAPK Pathways. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3847, 31 mar. 2022. MDPI AG. DOI:10.3390/ijms23073847

KIM, Seong Keun; CHO, Sun Wook. The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. **Frontiers In Pharmacology**, v. 13, p. 1-16, 24 maio 2022. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fphar.2022.868695.

KONTOMANOLIS, Emmanuel N. *et al.* Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: a review. **Anticancer Research**, v. 40, n. 11, p. 6009-6015, 27 out. 2020. Anticancer Research USA Inc. DOI: 10.21873/anticancer.14622.

LANNA, Elisa Gomes. *et al.* Lipid-based nanocarriers co-loaded with artemether and triglycerides of docosahexaenoic acid: effects on human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 134, p. 111114, fev. 2021. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111114.

LASKAR, Tanjima Tarique *et al.* Decoding breast cancer: insights into molecular pathways & therapeutic approaches. **Discover Oncology**, v. 16, n. 1, p. 2103, 14 nov. 2025. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s12672-025-03764-w.

LEONE, Alba di. *et al.* Local Treatment of Triple-Negative Breast Cancer: is mastectomy superior to breast-conserving surgery?. **Journal Of Personalized Medicine**, v. 13, n. 5, p. 865, 21 maio 2023. MDPI AG. DOI: 10.3390/jpm13050865.

LI, Guo-Min. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 85-98, jan. 2008. DOI: 10.1038/cr.2007.115.

LI, Qingzhou *et al.* Natural Products as Novel Therapeutic Agents for Triple-Negative Breast Cancer: current evidence, mechanisms, challenges, and opportunities. **Molecules**, v. 30, n. 6, p. 1201, 7 mar. 2025. MDPI AG. DOI: 10.3390/molecules30061201.

LU, Boya. *et al.* Molecular Classification, Treatment, and Genetic Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: a review. **Technology In Cancer Research & Treatment**, v. 22, p. 1-10, jan. 2023. SAGE Publications. DOI: 10.1177/15330338221145246.

LYTHGOE, Mark P. *et al.* Polymorphic microbes: a new emerging hallmark of cancer. **Trends In Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 1131-1134, dez. 2022. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.tim.2022.08.004.

MARK, Cynthia. *et al.* Antibody-Drug Conjugates in Breast Cancer: current status and future directions. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 13726, 06 set. 2023. MDPI. DOI: 10.3390/ijms241813726.

MARTIN, Tracey A. *et al.* **Madame Curie Bioscience Database**. Austin (Tx): Landes Bioscience, 2000. (Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/#ch5379.s2>. Acesso em: 16 abr. 2024.

MASSIHNIA, Daniela *et al.* Triple negative breast cancer: shedding light onto the role of pi3k/akt/mtor pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, p. 60712-60722, 26 jul. 2016. Impact Journals, LLC. DOI: 10.18632/oncotarget.10858.

MONAGAS, Maria *et al.* Understanding plant to extract ratios in botanical extracts. **Frontiers In Pharmacology**, v. 13, p. 981978, 30 set. 2022. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fphar.2022.981978.

MOSMANN, Tim *et al.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983. Elsevier BV. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Breast Cancer**: anatomy. Anatomy. 2024. Disponível em: <https://training.seer.cancer.gov/breast/anatomy.html>. Acesso em: 08 maio 2024.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Types of Cancer Treatment**: immunotherapy to treat cancer. Immunotherapy to Treat Cancer. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>. Acesso em: 07 ago. 2024.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE (NHGRI). **Tumor Suppressor Gene**. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Tumor-Suppressor-Gene>. Acesso em: 02 mar. 2024.

NAVARRO, Carla. *et al.* Metabolic Reprogramming in Cancer Cells: emerging molecular mechanisms and novel therapeutic approaches. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 6, p. 1303, 19 jun. 2022. MDPI AG. DOI: 10.3390/pharmaceutics14061303.

NEGRELLE, R.R.B. Renealmia L.f.: aspectos botânicos, ecológicos, farmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 274-290, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/1983-084x/13_049.

OBIDIRO, Onyinyechi *et al.* Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: future outlook. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 1796, 23 jun. 2023. MDPI AG. DOI: 10.3390/pharmaceutics15071796.

OFFERSEN, Birgitte Vrou; OVERGAARD, Jens. Breast cancer radiation therapy. **The Lancet**, v. 396, n. 10262, p. 1558, nov. 2020. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0140-6736(20)32322-9.

PAPADIMITRIOU, Marios; MOUNTZIOS, Giannis; A PAPADIMITRIOU, Christos. The role of PARP inhibition in triple-negative breast cancer: unraveling the wide spectrum of synthetic lethality. **Cancer Treatment Reviews: Anti-Tumour Treatment**, v. 67, p. 34-44, jun. 2018. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.04.010.

PARSONS, J. Thomas *et al.* Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 633-643, set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/nrm2957.

PENN, Israel; STARZL, Thomas e. The Effect of Immunosuppression on Cancer. **Proceedings Of The National Cancer Conference**, v. 7, p. 425-436, 1972. NHI-PA. PMID: 4587653.

PRIYA, S Krishna. *et al.* Tumour angiogenesis-Origin of blood vessels. **International Journal Of Cancer**, v. 139, n. 4, p. 729-735, 15 ago. 2016. Wiley. DOI: 10.1002/ijc.30067.

QIAN, Ruimiao *et al.* Natural Products in Cancer Prevention and Therapy: current challenges and future directions. **Medcomm**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 70585, 28 jan. 2026. Wiley. DOI: 10.1002/mco2.70585.

RECILLAS-TARGA, Félix. Cancer Epigenetics: an overview. **Archives Of Medical Research**, v. 53, n. 8, p. 732-740, dez. 2022. Elsevier. DOI: 10.1016/j.arcmed.2022.11.003.

ROSADO-SANZ, María *et al.* Cytokine Networks in Triple-Negative Breast Cancer: mechanisms, therapeutic targets, and emerging strategies. **Biomedicines**, v. 13, n. 8, p. 1945, 8 ago. 2025. MDPI AG. DOI: 10.3390/biomedicines13081945.

ROSAS-GONZÁLEZ, Vida Celeste *et al.* Differential effects of alliin and allicin on apoptosis and senescence in luminal A and triple-negative breast cancer: caspase, $\delta\Psi_m$, and pro :apoptotic gene involvement. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 34, n. 6, p. 671-686, 11 maio 2020. Wiley. DOI:10.1111/fcp.12559.

SANTOS, Luana Cristina dos *et al.* Comparison of different extraction methods of Brazilian “pacová” (*Renealmia petasites* Gagnep.) oilseeds for the determination of lipid and terpene composition, antioxidant capacity, and inhibitory effect on neurodegenerative enzymes. **Food Chemistry: X** v. 12, p. 100140, dez. 2021. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.fochx.2021.100140.

SARKAR, Sibaji. *et al.* Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 21087-21113, 21 out. 2013. MDPI. DOI: 10.3390/ijms141021087.

SCHIPILLITI, Francesca Matilde. *et al.* Datopotamab deruxtecan: a novel antibody drug conjugate for triple-negative breast cancer. **Heliyon**, v. 10, n. 7, p. 28385, abr. 2024. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e28385.

SENKUS-KONEFKA, E. *et al.* Complications of Breast-cancer Radiotherapy. **Clinical Oncology**, v. 18, n. 3, p. 229-235, abr. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.clon.2005.11.004.

SHARMA, Aditi; BOISE, Lawrence; SHANMUGAM, Mala. Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1144, 9 ago. 2019. MDPI AG. DOI: 10.3390/cancers11081144.

SHERR, Charles J. Principles of Tumor Suppression. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 235-246, jan. 2004. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)01075-4.

SOARES, Aline Keller Couto *et al.* In vitro and in vivo anti-inflammatory activity and chemical composition of *Renealmia petasites* Gagnep. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 451-465, 16 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s10787-020-00786-4.

SILVA-DIZ, Victoria da. *et al.* Cancer cell plasticity: impact on tumor progression and therapy response. **Seminars In Cancer Biology**, v. 53, p. 48-58, dez. 2018. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.08.009.

SINGH, Desh Deepak *et al.* Role of PARP in TNBC: mechanism of inhibition, clinical applications, and resistance. **Biomedicines**, v. 9, n. 11, p. 1512, 21 out. 2021. MDPI AG. DOI:10.3390/biomedicines9111512.

SINGH, Nitin. *et al.* Inflammation and cancer. **Annals Of African Medicine**, v. 18, n. 3, p. 121-126, 18 set. 2019. Medknow. DOI: 10.4103/aam.aam_56_18.

SUN, Yi-Sheng. *et al.* Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal Of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387-1397, 01 nov. 2017. Ivyspring International Publisher. DOI: 10.7150/ijbs.21635.

SURABHI, Divya Meher. *et al.* Recognizing invasive breast carcinoma of no special type with medullary pattern. **Radiology Case Reports**, v. 18, n. 5, p. 1788-1792, maio 2023. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.radcr.2023.01.052.

SUVÀ, Mario L; RIGGI, Nicolo; BERNSTEIN, Bradley E. Epigenetic Reprogramming in Cancer. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1567-1570, 29 mar. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS). DOI: 10.1126/science.1230184.

WAHBA, Hanan Ahmed; EL-HADAAD, Hend Ahmed. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. **Cancer Biology & Medicine**, v. 12, n. 2, p. 106-116, jun. 2015. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030.

WHITE, Mary C. *et al.* Age and Cancer Risk. **American Journal Of Preventive Medicine**, v. 46, n. 3, p. 7-15, mar. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.amepre.2013.10.029.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. **What affects your risk of getting cancer?: weight and cancer.** Weight and cancer. 2024. Disponível em: <https://www.wcrf.org/preventing-cancer/topics/weight-and-cancer/page/3/>. Acesso em: 01 jun. 2024.

YASWEN, Paul. *et al.* Therapeutic targeting of replicative immortality. **Seminars In Cancer Biology**, v. 35, p. 104-128, dez. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.semcancer.2015.03.007.

YUREKLI, Ayse; ERBA, Oytun. Cancer and Immunosuppression. **Journal Of Experimental And Basic Medical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 116-121, 29 set. 2021. DOI: 10.5606/jebms.2021.75646.

ZAGAMI, Paola *et al.* Triple negative breast cancer: pitfalls and progress. **Npj Breast Cancer**, v. 8, n. 1, 20 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/s41523-022-00468-0.