

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RAQUEL PEREIRA CRUZ

**EFEITO CITOTÓXICO DE EXTRATOS DE *Smilax aspera* EM MODELOS
CELULARES DE CÂNCER DE MAMA**

PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2019

RAQUEL PEREIRA CRUZ

**EFEITO CITOTÓXICO DE EXTRATOS DE *Smilax aspera* EM MODELOS
CELULARES DE CÂNCER DE MAMA**

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

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

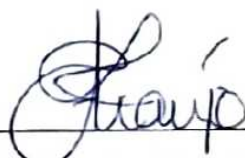
**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2019**

RAQUEL PEREIRA CRUZ

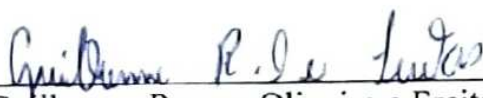
Efeito citotóxico de extratos de *Smilax aspera* em modelos celulares de câncer de mama

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

Banca Examinadora:



Profª. Dra. Thaise Golçalves de Araújo – Instituto de Biotecnologia - UFU
Presidente



Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro



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

Patos de Minas - MG, 05 de dezembro de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a pessoa mais importante da minha vida, a pessoa que lutou e luta comigo em todos os momentos sem perder a fé, dedico a Rosângela, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me conceder o dom da vida e permitir esta conquista.

À Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, pela orientação e acolhimento em seu grupo de pesquisa; pela confiança, paciência e compreensão em todos os momentos e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento científico e pessoal.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia – GBio, por todo auxílio. Desejo para todos muito sucesso em suas caminhadas!

À todos os membros do Laboratório de Cultura de Células Animais – LACCA, pela prestatividade e cooperação.

À MSc. Douglas Brandão e à Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas, pela disponibilidade de participarem da banca examinadora e dividirem comigo este momento tão especial.

À todos os técnicos de laboratórios que me auxiliaram, principalmente à Luciana por tantos ensinamentos.

À todos os docentes, por contribuírem ativamente para minha formação acadêmica.

Aos grandes amigos Paulinha e Douglas que conheci no GBio e se tornaram minha família, levarei vocês em meu coração por onde for. Agradeço pelos ensinamentos, por toda ajuda e pela companhia dentro e fora do laboratório. Desejo muito sucesso a vocês, não há nada que vocês não possam realizar! Amo vocês!

Ao meu namorado Neilon por estar comigo em todos os momentos, por sempre acreditar em mim. Obrigada por ser esse companheiro de vida magnífico. Amo você!

À toda a minha família. Em especial a minha mãe Rosângela e minha avó Odília, pelo amor incondicional e apoio. Amo muito vocês!

À Rita, Valússio e Laís toda minha gratidão por cuidarem de mim.

À todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação pessoal e profissional.

"O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar."

(Albert Einstein)

RESUMO

O câncer é definido como um conjunto de doenças decorrentes do crescimento anormal e desordenado de células. Dentre os diversos órgãos acometidos, o câncer de mama (CM) caracteriza-se por ser a neoplasia mais comum entre as mulheres, sendo uma das principais causas de mortes pela doença em todo o mundo. A quimioterapia é um tratamento sistêmico fundamental e amplamente utilizado, contudo, desencadeia efeitos colaterais por não atingirem somente as células malignas. Nesse contexto, o Brasil se destaca por sua biodiversidade e explorá-la tem se mostrado interessante na busca de novos produtos terapêuticos mais eficazes e menos tóxicos. O presente estudo objetivou avaliar a citotoxicidade dos extratos hexânico, clorofórmico e hidrometanólico de *Smilax aspera* frente as linhagens mamárias MCF 10A (não tumorigênica), MCF7 e T-47D (fenótipo maligno luminal) e MDA-MB-231 (fenótipo maligno basal) utilizando o ensaio de MTT. Os tratamentos foram realizados por 24 e 48 horas em sete concentrações: 7 µg/mL; 15 µg/mL; 31 µg/mL; 62 µg/mL; 125µg/mL; 250 µg/mL e 500 µg/mL. O extrato clorofórmico diminuiu a viabilidade de células tumorais mamárias. Em sua maior concentração, após 48 horas de tratamento, essa fração foi citotóxica às linhagens T-47D, MCF7 e MDA-MB-231, quando comparadas à MCF 10A. Já a fração hexânica foi efetiva em conter apenas a linhagem MCF7, em ambos tempos de tratamento. Nossos resultados, portanto, se mostram promissores e estudos adicionais são necessários para compreender os mecanismos de ação dos compostos presentes nos extratos hexânico e clofórmico de *S. aspera* em impedir a progressão do CM.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Câncer de mama. Linhagens celulares. Produtos naturais.

ABSTRACT

Cancer is a set of diseases caused by abnormal and disordered cell growth. Among the various organs affected, breast cancer (BC) is the most common cancer among women, and the leading cause of death from cancer worldwide. Chemotherapy is a crucial and widely used systemic treatment, that also causes adverse side effects due to lack of specificity. In this context, Brazil has one the most biodiversity and exploit it is interesting in search for new and less toxic therapeutic products. The present study aimed to evaluate the cytotoxicity of hexanic, chlorophormic and hydromethanolic extracts of Smilax aspera against MCF 10A (non-tumorigenic); MCF7 and T-47D (luminal phenotype) and MDA-MB-231 (basal phenotype) cell lines through MTT assay. Treatments were performed in seven concentrations: 7 µg/mL; 15 µg/mL; 31 µg/mL; 62 µg/mL; 125µg/mL; 250 µg/mL and 500 µg/mL for 24 and 48 hours. The chloroformic extract controlled the viability of mammary tumor cells. The treatment with the highest concentration of chloroformic extract, after 48 hours, was cytotoxic for T-47D, MCF7 and MDA-MB-231 cell lines when compared to MCF 10A. The hexanic fraction was effective in containing only the MCF7 cell line in both treatment times. Our results are promising, and additional experiments are needed to understand the mechanisms of action of the majoritarian compounds of hexanic and chloroformic extracts of S. aspera to treat BC.

Keywords: Cytotoxicity. Breast cancer. Cell lines. Natural products.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRCA1: Breast Cancer 1

BRCA2: Breast Cancer 2

CM: Câncer de Mama

CMTN: Câncer de mama triplo negativo

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM/F-12: Meio de Eagle Modificado de Dulbecco

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico

ER: Receptor de estrógeno

FDA: *Food and Drug Administration*

HER2: Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IC₅₀: Concentração de Inibitória de 50%

L15: Meio Leibowitz

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

OMS: Organização Mundial da Saúde

PN: Produto natural

PR: Receptor de progesterona

RPMI-1640: Meio produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 O câncer de mama e seus fatores de risco	12
2.2 Aspectos clínico-patológicos do Câncer de Mama.....	15
2.3 Produtos naturais como perspectivas terapêuticas	18
2.4 <i>Smilax aspera</i>	20
2.5 Modelos celulares para o estudo de compostos antineoplásicos	22
3 OBJETIVO	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Obtenção dos extratos.....	24
4.2 Linhagens celulares	24
4.3 Ensaio de viabilidade celular	25
4.4 Análise estatística.....	26
5 RESULTADOS	26
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação desordenada de células. A transformação maligna decorre de mutações em genes-chave envolvidos com a regulação do crescimento, proliferação, diferenciação, apoptose e resposta imunológica. Células tumorais permanecem, portanto, em divisão, evadindo à morte celular programada e propagando seus erros moleculares.

O Câncer de Mama (CM) é um problema de saúde pública, sendo o mais incidente em mulheres em todo o mundo (INCA, 2019). Essa neoplasia é classificada molecularmente a partir de seu padrão de marcação por imunohistoquímica, sendo dividida, primariamente, em tumores luminais (positivos para receptores hormonais – receptor de estrógeno e/ou progesterona), HER2-enriquecidos (quando apenas superexpressam o Fator de Crescimento Epidérmico Humano do Tipo 2) e triplo-negativos, quando não expressam nenhum desses marcadores (TANG et al., 2016). Estes têm desafiado a comunidade científica por sua agressividade, elevado índice de recidiva e pior prognóstico. A quimioterapia é amplamente empregada para todos os subtipos, contudo, carece de especificidade acometendo também as células normais, o que culmina em sérios efeitos colaterais. Além disso, a resistência terapêutica agrava o quadro clínico e a ausência de resposta aos quimioterápicos e, inclusive, aos hormonioterápicos, compromete a sobrevida das pacientes.

As plantas desempenham importantes papéis para a humanidade. O estudo de diferentes espécies vegetais já se mostrou importante como ferramenta médica e farmacêutica. O conhecimento etnobotânico é o ponto de partida de muitos projetos voltados para a triagem de medicamentos e os ensaios *in vitro* têm fornecido subsídios para a descoberta de drogas naturais para o tratamento oncológico (FARUQUE et al., 2018). De fato, as plantas medicinais são uma rica fonte de moléculas terapêuticas que necessitam ser amplamente exploradas, já que estas oferecem um caminho promissor na descoberta de novos quimioterápicos.

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, sua variedade de biomas reflete a enorme riqueza da flora e da fauna brasileiras. A espécie *Smilax aspera* é empiricamente utilizada para o tratamento de diversas doenças como sífilis, diabetes e reumatismo, sendo empregada também no alívio de sintomas de menopausa, agente de ação depurativa, diaforética, estimulante e antioxidante. Já foram demonstradas, previamente, suas atividades antidiabética, antitumoral, antitussígena e antidemêntica, além de atuar como inibidor da

agregação plaquetária (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004; LONGO; VASAPOLLO, 2006; IVANOVA et al., 2011). Contudo seu efeito sobre células tumorais mamárias ainda é pouco explorado. No presente trabalho, portanto, foi avaliada a ação citotóxica dos extratos hexânico, clorofórmico e hidrometanólico da *Smilax aspera* frente a células mamárias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O câncer de mama e seus fatores de risco

Considerado um problema de saúde pública, o câncer é associado ao aumento populacional, hábitos de vida e industrialização. Segundo a Agência Internacional para Pesquisas do Câncer (IARC – do inglês *International Agency for Research on Cancer*) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência e mortalidade pela doença estão aumentando ao redor do mundo. De acordo com as novas estimativas, é esperado para as próximas duas décadas um total de casos em torno de 22 milhões. Assim, o número de mortes causadas pela patologia deve ultrapassar as 8,2 milhões anuais, chegando a 13 milhões de óbitos por ano (INCA, 2017; IARC, 2017). Nesse sentido, torna-se necessária a mobilização tanto da comunidade científica quanto de profissionais da saúde na busca de uma possível prevenção da doença, diagnóstico precoce e cura, (SANTOS; CRUZ, 2001; FERNANDES; MAFRA, 2005).

O câncer pode ser definido como o crescimento descontrolado e anormal das células, as quais passam a não responder adequadamente aos sinais de diferenciação, proliferação e morte, invadindo limites de células normais (INCA, 2019). Trata-se de uma desordem genética esporádica, que, em alguns casos, possui caráter hereditário. Neste contexto, os genes alterados são aqueles responsáveis pelo crescimento e proliferação celulares, como os oncogenes e genes supressores de tumor. Além disso, os tumores são divididos em malignos e benignos. Os primeiros possuem capacidade de se metastatizar para outros órgãos ou tecidos do corpo, representando uma ameaça à vida. Já os benignos permanecem delimitados e restritos à sua origem (PARSA, 2016).

O CM é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres e a segunda principal causa de mortes por câncer em todo o mundo (BRAY et al., 2018). A OMS estima que o número de casos de câncer pode aumentar para 27,5 milhões até 2040, com 16,3 milhões de

mortes esperadas. Segundo os dados da IARC, o CM é responsável por 25% de todos os cânceres diagnosticados em mulheres em todo o mundo (GARDEZI, et al., 2019). A *American Cancer Society* estima que uma em cada oito mulheres desenvolva CM em algum momento de suas vidas (ROSHAN; SHING; PACE, 2019).

No Brasil, o CM é o mais comumente identificado no sexo feminino, depois do de pele não melanoma, sendo responsável por aproximadamente 29,5% dos diagnósticos a cada ano (Figura 1). São esperados para o biênio de 2018/2019 cerca de 59.700 novos casos, com risco estimado de 56,33 a cada 100 mil mulheres. Considerando a incidência da doença por regiões, é mais frequente nas regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil) e Centro-Oeste (51,96/100 mil), seguidos da região Nordeste (40,36/100 mil). A região Norte apresenta a menor taxa (19,21/100 mil) do país (INCA, 2018) decorrente da desigualdade regional e social que afeta o acesso das mulheres ao exame de mamografia de rastreamento, em consequência, a Pesquisa Nacional de Saúde é prejudicada (INCA, 2019).

Figura 1. Distribuição proporcional dos casos de câncer estimados para o biênio 2018/2019. Estão representados apenas os valores para o sexo feminino, excetuando o câncer de pele não melanoma.



	Localização primária	Casos	%
Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: Adaptado, INCA, 2019.

Os tumores mamários exibem características distintas nos âmbitos molecular, fisiológico, morfológico, clínico e histopatológico, além de diferentes fatores de riscos e resposta à terapia. Portanto, são complexos e heterogêneos (POURTEIMOOR; MOHAMMADI-YEAGANEH; PARYAN, 2016). Quanto aos fatores de risco, muitos não são controláveis, como idade, histórico familiar e predisposição gênica. No entanto, outros estão relacionados diretamente com o comportamento do indivíduo, como obesidade, tabagismo, consumo de álcool, atividade física e dieta (BREAST CANCER, 2016).

A idade é considerada um dos fatores de risco mais significativos para os tumores em geral. A incidência é baixa em mulheres com menos de 30 anos aumentando linearmente com o decorrer do tempo (SINGLETERY, 2003). Quanto à predisposição genética, mulheres com parentes de primeiro grau do sexo feminino com CM apresentam maiores chances de desenvolver a doença. Esta probabilidade cresce à medida que o número de parentes também aumenta (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2001; KLEIBL; KRISTENSEN, 2016). Em termos numéricos, mulheres com parente de primeiro grau com câncer mamário possuem uma chance 3,3 vezes maior do que aquelas que não possuem. Já as com dois parentes apresentam um risco 3,6 vezes maior (SKOL; SASAKI; ONEL, 2016). De modo geral, 5% dos casos de CM e 25% dos tumores hereditários são causados por mutações nos genes de alta penetrância *BRCA1* (*Breast Cancer 1 gene*) e *BRCA2* (*Breast Cancer 2 gene*) (CHEN; GULSEN; SU, 2015).

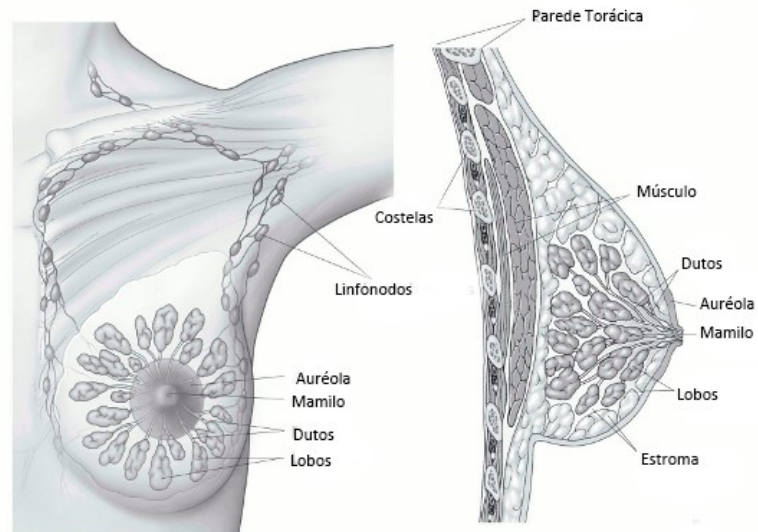
Estar acima do peso ou obeso, assim como o consumo de álcool aumentam consideravelmente o risco à doença (BREAST CANCER, 2016; INCA, 2017). Além disso, a densidade mamária e a nuliparidade têm se destacado nesse cenário (CHEN; GULSEN; SU, 2015). Estudos realizados com mulheres nos Estados Unidos também revelaram que a terapia de reposição hormonal, para atenuar os sintomas da menopausa, está relacionada à ocorrência de acidente vascular cerebral, doença coronária e CM (SINGLETERY, 2003). Por outro lado, atividade física cotidiana, tanto em fase de pré-diagnóstico quanto pós-diagnóstico, associa-se a uma redução na mortalidade (KLEIBL; KRISTENSEN, 2016). A dieta também exerce um papel crucial, já que mudanças na alimentação também alteram a incidência do CM (HOWELL et al, 2005).

No mundo desenvolvido, com mais recursos tecnológicos e maior facilidade de acesso à saúde, 80% a 85% dos tumores na mama são identificados em seu estágio inicial. No entanto, em países em desenvolvimento, as mulheres são, por muitas vezes, diagnosticadas tardiamente, o que compromete seu tratamento e cura (SIMOS et al., 2014). Portanto, há uma premente necessidade de compreender a biologia do CM, a fim de se obter mais informações sobre seu desenvolvimento em nível celular e molecular, fornecendo uma visão mais profunda e uma perspectiva mais ampla sobre alternativas mais eficazes para seu diagnóstico e tratamento (PARSA, 2016).

2.2 Aspectos clínico-patológicos do Câncer de Mama

O conhecimento da estrutura anatômica normal do tecido mamário é essencial para o estudo de suas patologias (Figura 2). A glândula mamária é um órgão par, que se situa na parede anterior do tórax apoiada sobre o músculo peitoral maior, se estendendo da segunda à sexta costela no plano vertical e do esterno à linha axilar anterior no plano horizontal. A mama é composta por lobos, que são as glândulas produtoras de leite, por ductos, pequenos tubos que transportam o leite dos lobos ao mamilo, e por estroma, constituído por tecido adiposo e tecido conjuntivo que envolvem os ductos e lobos, além de vasos sanguíneos e vasos linfáticos (ONCOGUIA, 2019; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Figura 2. Representação da constituição do tecido mamário normal.



Tecido mamário normal

American Cancer Society

Fonte: AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017.

A maioria das neoplasias da mama ocorre em seu tecido epitelial. Histologicamente, são definidos diferentes tipos de CM, sendo os mais comuns: o carcinoma ductal invasivo, que corresponde a 55% dos casos; o carcinoma ductal *in situ* representando 13% do total e o carcinoma lobular invasivo, responsável por 5% dos tumores (POURTEIMOOR; MOHAMMADI-YEGANEH; PARYAN, 2016). Essa neoplasia também apresenta uma classificação molecular baseada em seu padrão de marcação por imunohistoquímica, sendo divididas, primariamente, em luminais (positivos para receptores hormonais), HER2-enriquecidas, quando apenas superexpressam o HER2 e triplo-negativos, quando não

expressam nenhum dos marcadores. Os luminais, positivos para receptor de estrógeno (ER+) e/ou progesterona (PR+), são responsáveis por cerca de 85% dos casos. Podem ainda ser classificados em Luminal A (ER+ e/ou PR+, HER2-) ou Luminal B (ER+ e/ou PR+ e HER2+). Nestes há um elevado índice proliferativo (ki67>14%). Tumores HER2-enriquecidos correspondem a 20% dos diagnósticos e os triplo-negativos a cerca de 15% (TANG et al., 2016).

No estágio inicial, o CM não apresenta sinais ou sintomas. Quando presentes, os principais são o aparecimento de nódulo, geralmente indolor, duro e irregular, linfonodos palpáveis na axila (HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS, 2016), edemas da pele, eritema, retração dos mamilos, liberação de secreção sanguinolenta pelos mamilos, dor na mama ou mamilo e espessamento da pele (ONCOGUIA, 2016). A detecção precoce pode traduzir-se em resultados favoráveis, com um melhor prognóstico da doença (maior sobrevida ou cura) (RAVAIOLI et al, 1998; SIMOS, 2015). Nesse sentido, o rastreio sistemático somado a um melhor acesso à serviços de saúde e a avanços em técnicas terapêuticas são fatores que podem conduzir a um maior sucesso na superação da doença (MOLINA-MONTES et al., 2015).

Um dos métodos de detecção por triagem é a mamografia, implantada primeiramente em países europeus (MYERS, 2016) e atualmente presente em vários outros, sobretudo no Brasil. Quando o câncer forma uma massa distinta a partir do ponto de origem, o tamanho é facilmente avaliado por imagem e exame patológico após biópsia ou cirurgia. O exame através da mamografia ou ultrassom é geralmente suficiente para o estadiamento loco-regional. No entanto, em alguns casos, a ressonância magnética é recomendada, especialmente em pacientes jovens, com doença multifatorial ou resultados inconclusivos na mamografia. A cirurgia é o primeiro passo em casos de tumores operáveis após um diagnóstico positivo na biópsia. Em fase precoce, a cirurgia consiste na ressecção da lesão, com o objetivo de diminuir o risco de recorrência local. Em casos mais avançados opta-se pela remoção completa da mama (mastectomia) (MCDONALD et al., 2016).

Quanto ao tratamento, a terapia neoadjuvante e adjuvante sistêmicas, como a quimioterapia, consiste em uma alternativa-padrão antes ou após a cirurgia, pois objetiva eliminar possíveis micrometastases e, nos casos mais graves, é adotada como medida de controle da doença, visando uma maior sobrevida da paciente (SKOL; SASAKI; ONEL, 2016). Os medicamentos podem ser administrados via oral ou injetados e, apesar de atingirem células cancerosas circulantes, também afetam células normais, promovendo os indesejáveis efeitos colaterais. Já a radioterapia é uma técnica de tratamento local e utiliza feixes e

partículas de radiação de alta energia para matar células comprometidas. A forma como a radiação é administrada depende, sobretudo, das condições da paciente, do estágio e localização do tumor (PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2016).

A terapia hormonal caracteriza-se pela diminuição ou bloqueio da ação do estrógeno, responsável por induzir a proliferação celular. O tamoxifeno é um dos fármacos mais utilizados em tumores ER+, contribuindo para a redução da taxa de recorrência e mortalidade. Também são utilizados os inibidores de aromatase, como Anastrozol, Exemestano e Letrozol. Já a terapia alvo é definida pelo uso de medicamentos que reconhecem marcadores tumorais específicos (PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2016; SAAD et al., 2002). Essa é uma alternativa para pacientes com CM HER2-enriquecido, para os quais se encontra disponível o anticorpo monoclonal trastuzumab. Apesar de seu efeito cardiotóxico, este tem contribuído para um aumento na sobrevida dessas pacientes (MCDONALD et al., 2016). Além disso, anticorpos anti-PARP (polimerases poli (ADP-ribose) também estão sendo utilizados em ensaios clínicos. Estes incluem olaparibe, rucaparibe, niraparibe, talazoparibe e veliparibe (ACC CAMARGO CENTER CANCER, 2019; DZIADKOWIEC et al., 2016; TURK; WISINSKI, 2018). As PARPs estão envolvidas no reparo a danos no DNA e seus inibidores são prescritos para pacientes com CMTN (Câncer de Mama Triplo Negativo) com *BRCA 1* e *BRCA 2* mutados. Nestas pacientes, nas quais há um acúmulo de danos decorrentes dos genes supressores tumorais mutados, o tratamento associado à terapia alvo anti-PARP, culmina com a apoptose das células tumorais.

Finalmente, a imunoterapia tem se mostrado inovadora, associada ao aumento na sobrevida de pacientes com câncer hematológico e tumores sólidos (NAIK; MONJAZEB; DECOCK, 2019). No CM, essa abordagem é promissora, sobretudo para o tratamento do CMTN. No início de 2019, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro anticorpo monoclonal humanizado Atezolizumab (Tecentriq ®) em combinação com quimioterapia para o tratamento de pacientes com CMTN metastático positivo para a proteína ligante de morte celular programada-1 (PD-L1). O PD-L1, frequentemente superexpresso em células tumorais, se liga ao seu receptor PD-1 na superfície das células T, inibindo-as. O anticorpo desenvolvido bloqueia PD-L1 permitindo a ativação das células T e a consequente destruição de células tumorais (HEIMES; SCHMIDT, 2019).

Apesar dos notórios avanços com o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, estas ainda se encontram limitadas. Considerando a quimioterapia, esta configura-se como um dos métodos mais amplamente utilizados, mas que acarretam efeitos colaterais graves. Além disso, a resistência aos quimioterápicos agrava o quadro clínico

(SAFARZADEH; SANDOGHCHIAN SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Desse modo, os produtos naturais (PNs) surgem como perspectiva para o desenvolvimento de novos medicamentos que possam ser empregados no tratamento do CM.

2.3 Produtos naturais como perspectivas terapêuticas

Os PNs são uma fonte de recursos para a produção de fármacos eficazes contra uma multiplicidade de doenças (VEERESHAM, 2012). São definidos como compostos químicos biosintetizados por plantas e microrganismos, nos quais possuem efeitos tóxicos, terapêuticos e/ou biológicos. São caracterizados como metabólitos secundários, ou seja, são moléculas de adaptação que evoluíram distintamente dos metabólitos primários por razões fisiológicas específicas, sociais ou predatórias (O'BRIEN; WRIGHT, 2011; CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012).

As plantas são a principal fonte dos PNs atualmente estudados, entre os quais 36% são classificados como terpenos (identificados principalmente nas famílias Meliaceae, Rubiaceae e Rutaceae), 19% estão associados a derivados aromáticos (encontrados em Rutaceae, Piperaceae e Anacardiaceae), 15% são alcalóides (Rutaceae, Fabaceae e Piperaceae), 13% são flavonóides (em Rutaceae, Lauraceae e Myristicaceae), 10% são lignóides (Lauraceae, Myristicaceae e Rutaceae), e os demais 7% estão distribuídos em 6 classes diferentes (aminoácidos e peptídeos, chalconas, lipídios, fenilpropanóides, policetídeos e taninos) (PILON et al., 2017).

As pesquisas com PNs ganham valioso destaque frente à biodiversidade brasileira, a qual oferece inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de pesquisas que propiciam, simultaneamente, preservação e inovação (PINTO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2013; LEITE; FILHO, 2014). A maioria dos trabalhos está voltada para o isolamento e identificação de substâncias associadas a estudos quimiotaxonômicos (PUPO; VIEIRA; GALLO, 2007). Contudo, a inovação em medicamentos também inclui minuciosas sínteses e modificações, de modo que os PNs são quimicamente adaptados e alterados com base em suas propriedades estruturais e biológicas. Suas conformações podem ser moduladas visando o aumento da sua potência e seletividade, além de aprimorar suas propriedades físico-químicas, bioquímicas, farmacocinéticas, eliminar ou reduzir os efeitos adversos e simplificar a complexidade estrutural incluindo a remoção de átomos redundantes (GUO, 2017).

A pesquisa envolvendo PNs está relacionada a uma abordagem complexa, incluindo técnicas biológicas e analíticas. As análises, portanto, enfrentam diversos desafios,

especialmente na identificação e aquisição de material vegetal reprodutível, reconhecimento de compostos químicos bioativos, seleção e implementação de bioensaios apropriados de triagem, interações potenciais entre os fitoconstituintes em um extrato botânico, estudo *in vivo*, compreensão da resposta metabólica e do perfil de distribuição do composto (PIERSEN et al., 2004; VAN BREEMEN, 2015; DIETZ et al., 2016). Vale ressaltar que potenciais polimorfismos genéticos têm efeitos sobre a absorção e metabolismo das substâncias, consequentemente influenciando sua eficácia. Desse modo, as interações devem ser caracterizadas para abster efeitos colaterais tóxicos e/ou perda da atividade (DIETZ et al., 2016).

Os metabólitos secundários, oriundos dos PNs, são excelentes candidatos ao desenvolvimento de drogas por modularem a sinalização intracelular relacionada com o estresse oxidativo, por interferirem na inflamação, proliferação, apoptose, angiogênese e invasão de células neoplásticas. Entre os já descritos destacam-se genisteína, apigenina, quercetina, licopeno, resveratrol, curcumina, galato de epigallocatequina, isoflavonas e saponinas (BISHAYEE et al., 2011; BOMMAREDDY et al., 2013; WANG et al., 2014). Cerca de 25 mil fitoquímicos já foram identificados em plantas e demonstradas suas propriedades anticancerígenas (ANAND et al., 2008; SHARMA; MCCLEES; AFAQ, 2017). Alguns já são usados rotineiramente na prática clínica no tratamento de diferentes cânceres (Tabela 1).

Tabela 1: Lista de fármacos derivados de plantas usados no tratamento oncológico e suas respectivas espécies, alvo molecular e indicação terapêutica.

Fármaco	Espécie	Alvo Molecular	Indicação Terapêutica
Vimblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina/	Leucemia Linfoblástica
Vincristina		Microtúbulos	Aguda; Câncer de
Vindesina			Testículo; Doença de
Vinorelbina			Hodking
Paclitaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina/	Câncer de Mama
Docetaxel		Microtúbulos	
Podofilotoxina	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de Pulmão,
Etoposídeo			Ovário e Testículo;
Teniposídeo			Leucemia Linfocítica
Camptotecina	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I	Aguda;
Topotecano			Câncer de Colón
Irinotecano			

Fonte: COSTA-LOTUFO et al, 2010.

2.4 *Smilax aspera*

O gênero botânico *Smilax* (*Smilax* spp.), membro da família Smilacaceae, inclui aproximadamente 350 espécies que estão distribuídas em regiões tropicais e temperadas, especialmente no leste da Ásia, América do Norte e Sul. Salsaparrilha, como é conhecida, compõe o elenco de plantas largamente aplicadas na medicina popular. No entanto, suas raízes, caules e folhas também têm sido utilizadas como recurso alimentício e suas fibras na construção civil (WANG et al., 2013; MEDEIROS; SENNA-VALE; ANDREATA, 2007).

No Brasil, a salsaparrilha foi uma grande descoberta para os portugueses. Suas folhas e frutos eram utilizados como condimento na alimentação dos nativos. Sua raiz, órgão de maior atividade, era fonte de substâncias tônicas usadas no tratamento de doenças venéreas, como a sífilis. Além disso, as espécies eram empregadas no tratamento de doenças inflamatórias (MEDEIROS; SENNA-VALE; ANDREATA, 2007).

Estudos anteriores sobre seus constituintes químicos definiram o gênero como uma fonte rica em saponinas esteroides, flavonóides, fenilpropanoides e estilbenoides. Do ponto de vista biológico, o astilbina, um de seus principais flavonóides, demonstrou atividade imunossupressora. Adicionalmente, algumas espécies foram documentadas por exibir

atividade moduladora, antileprósica e, recentemente, antifúngica (BELHOUCHE et al., 2008; TIAN et al., 2017).

Dentre as espécies do gênero, a *Smilax aspera* (Figura 3) caracteriza-se por ser uma planta arbustiva perene extremamente resistente. Suas folhas são lustrosas e em formato de coração e seus frutos exibem coloração avermelhada, quando maduros. Esta espécie é amplamente distribuída no território brasileiro sendo encontrada desde o Rio Grande do Sul ao Ceará, especialmente no estado do Rio de Janeiro (XU et al., 2012; DELGADO-PELAYO; HORNERO-MÉNDEZ, 2012; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2007).

Habitualmente, suas folhas e raízes são usadas como ingrediente de refrigerantes e seus brotos jovens podem ser cozidos e usados como substitutos de aspargos. Na medicina popular, a *S. aspera* é tradicionalmente utilizada para tratamento de sífilis, diabetes, reumatismo, sintomas de menopausa, com ação depurativa, estimulante sexual e antioxidante. Quimicamente foram identificados saponinas esteroidais, trans-resveratrol e antocianinas, atraindo um grande interesse pela comunidade científica frente ao alcance de suas ações biológicas, incluindo antidiabéticas, antitumorais, antitussígenas, antidemênticos e como inibidores da agregação plaquetária (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004; LONGO; VASAPOLLO, 2006; IVANOVA et al., 2011).

Figura 3. Foto representativa da espécie *Smilax aspera*.



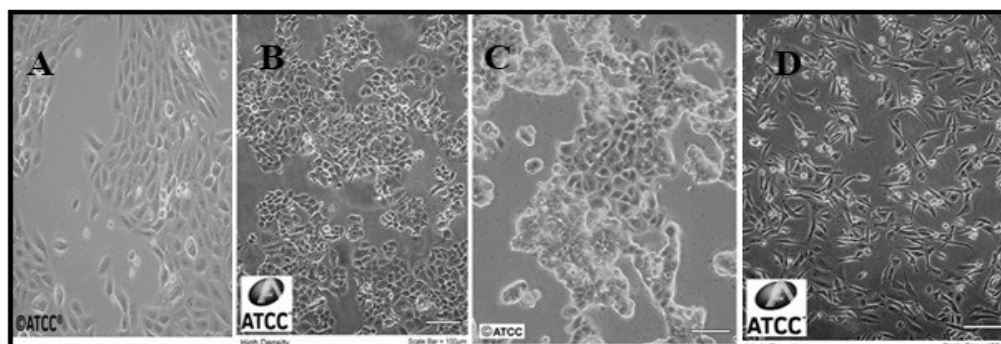
Fonte: JARDIM BOTÂNICO UTAD, 2019.

2.5 Modelos celulares para o estudo de compostos antineoplásicos

As linhagens de células humanas são modelos experimentais simplificados e informativos. O cultivo é caracterizado por permitir a manutenção de células vivas em laboratório (*in vitro*), independentemente do organismo que a originou, mantendo suas características originais (MIGITA, 2012). Esses modelos são responsáveis pelos grandes avanços em oncologia, inclusive no estudo de tumores mamários, destacando-se as linhagens MCF 10A, MCF-7, T-47D e MDA-MB-231 (LACROIX; LECLERCQ, 2004).

Isoladas de uma mulher caucasiana de 36 anos com doença fibrocística, a linhagem MCF 10A (Figura 4A) é caracterizada como células epiteliais não-tumorigênicas imortalizadas, que apresentam características de epitélio mamário normal, sendo negativas para ER, positivas para sialomucinas epiteliais, citoqueratinas e antígeno globular de gordura do leite. A linhagem é responsiva à insulina, glicocorticóides, enterotoxina colérica e fator de crescimento epidérmico (EGF). Por microscopia eletrônica, as células exibem características de células ductais luminiais, mas não de células mioepiteliais mamárias (SOULE et al., 1990; AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION - ATCC, 2019).

Figura 4. Fotos representativas de linhagens celulares mamárias. Em (A) imagem representativa da linhagem MCF 10A. Em (B) imagem representativa da linhagem T-47D. Em (C) imagem representativa da linhagem MCF7. Em (D) imagem representativa da linhagem MDA-MB-231.



Fonte: ATCC, 2019.

A linhagem T-47D (Figura 4B) foi isolada por Keydar et al (1979) a partir de um derrame pleural obtido de uma paciente de 54 anos com carcinoma mamário ductal invasivo. São células epiteliais diferenciadas, caracterizadas por possuírem junções e receptores citoplasmáticos como 17 β - estradiol e outros esteroides, além de calcitonina, receptor de estrógeno, progesterona e andrógeno, sendo modelo para CM luminal. As células, ainda, expressam o oncogene WNT7B (ATCC, 2019).

Derivadas de um adenocarcinoma mamário de uma mulher caucasiana de 69 anos, as células tumorais MCF7 (Figura 4C) são classificadas como luminais, pouco agressivas. Estas são positivas para RE e para marcadores epiteliais como E-caderina, β -catenina e citoqueratina 18, porém, negativas para marcadores mesenquimais, como a vimentina, e HER2. Classificadas molecularmente como luminais, essas mantêm várias características do epitélio mamário diferenciado, incluindo a capacidade de processar estradiol por meio de receptores citoplasmáticos de estrogênio. As células expressam o oncogene WNT7B e seu crescimento é inibido pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (LACROIX; LECLERCQ, 2004; COMÇA; CÎMPEAN; RAICA, 2015; ATCC, 2019).

Provenientes de um sítio metastático, a linhagem celular MDA-MB231 foi estabelecida a partir da efusão pleural de uma mulher caucasiana de 51 anos diagnosticada com adenocarcinoma mamário metastático, sendo caracterizada por não possuir ER, PR e HER2, portanto, triplo negativa (MEADOWS et al., 2008). É positiva para EGFR, para o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) e para o oncogene WNT7B (ATCC, 2019).

Portanto, a crescente incidência do CM atrelado à resistência medicamentosa e efeitos colaterais da quimioterapia demonstram a premente necessidade de alternativas terapêuticas, sobretudo para pacientes que não dispõem de terapias-alvo. Assim, os PNs surgem como uma promissora fonte para novas moléculas antineoplásicas que tenham sua ação eficaz sobre as vias moleculares transformadas, não afetando células normais. Diante disso, o presente estudo propõe avaliar a citotoxicidade dos extratos vegetais de *S. aspera* em modelos representativos de diferentes subtipos moleculares de CM, realizando um *screening* inicial e direcionando ensaios posteriores na busca de compostos com ação antitumoral.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito citotóxico de extratos de *Smilax aspera* sobre as linhagens mamárias MCF7 e T-47D (fenótipo luminal) e MDA-MB-231 (fenótipo triplo-negativo).

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar o efeito citotóxico das frações extrativas hexânica, clorofórmica e hidrometanólica de *Smilax aspera* frente as células tumorais mamárias;
- ✓ Comparar a atividade citotóxica com a linhagem não tumoral de mama (MCF 10A);
- ✓ Determinar as concentrações ótimas para cada um dos extratos no tratamento das linhagens celulares mamárias;
- ✓ Definir a fração promissora enquanto citotóxica as células tumorais de mama.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos extratos

Os extratos de *Smilax aspera* nas frações hexânica, clorofórmica e hidrometanólica foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.2 Linhagens celulares

Para a realização dos ensaios foram utilizadas quatro linhagens celulares: (i) MCF 10A, linhagem não tumorigênica epitelial mamária, (ii) MCF7, proveniente de adenocarcinoma de mama humano com fenótipo luminal, (iii) T-47D, carcinoma ductal invasivo também com fenótipo luminal e (iv) MDA-MB-231, obtida a partir de adenocarcinoma de mama humano com fenótipo triplo-negativo. A linhagem MCF 10A foi cultivada em meio DMEM/F-12 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), 10 µg/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF) (Gibco®), 0,25 µg/mL de hidrocortisona (Sigma®), 10 µg/mL de insulina (Gibco®) e 50 µg/mL de gentamicina (Cultilab®). As células MCF7 e T-47D foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina, sendo a T-47D suplementada também com insulina. Já a MDA-MB-231 foi cultivada em meio L15 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina. Todas foram mantidas em cultura a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Scientific™ Forma

Series 3 Water Jacketed CO₂ Incubator), exceto a MDA-MB-231, e o meio foi trocado em dias alternados, cerca de três vezes por semana, até atingirem 80-90% de confluência, quando foram utilizadas nos experimentos posteriores.

4.3 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade das três frações dos extratos de *S. aspera* para as linhagens celulares foi avaliada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol) -2,5-difenil brometo de tetrazólico) segundo Mosmann, (1983). Logo após a confluência em 80-90%, as células foram lavadas com PBS 1X e desagregadas enzimaticamente. Estas foram então plaqueadas em placas de 96 poços, (4x10³ células/poço) e os extratos, diluídos em DMSO 2% (Êxodo Científica®), foram adicionados nas concentrações finais de: 7 µg/mL; 15 µg/mL; 31 µg/mL; 62 µg/mL; 125 µg/mL; 250 µg/mL e 500 µg/mL.

Após 24 e 48 horas de incubação, o tratamento foi retirado e adicionou-se meio de cultura com MTT (Sigma®) (10% C/V), incubado por 4 horas. Depois deste período, foi retirada a solução de meio com MTT e adicionado 200µL de DMSO por poço, para a diluição dos cristais de Formazan, para posterior leitura a 560 nm em leitora Thermo Plate, TP-Reader. O controle de tratamento (diluente) foi determinado por células diluídas em meio e DMSO, cujas concentrações foram equivalentes às diluições dos extratos. Foi calculada a IC₅₀ (concentração inibitória de 50%) para cada um dos tratamentos. O controle de viabilidade foi definido por apenas células em meio de cultivo. Todos os ensaios foram executados em triplicata experimental. Os cálculos de viabilidade celular foram realizados utilizando a fórmula F1.

(F1)

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

Sendo:

AA = Absorbância da Amostra

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

ADMSO = Absorbância do controle de tratamento (DMSO)

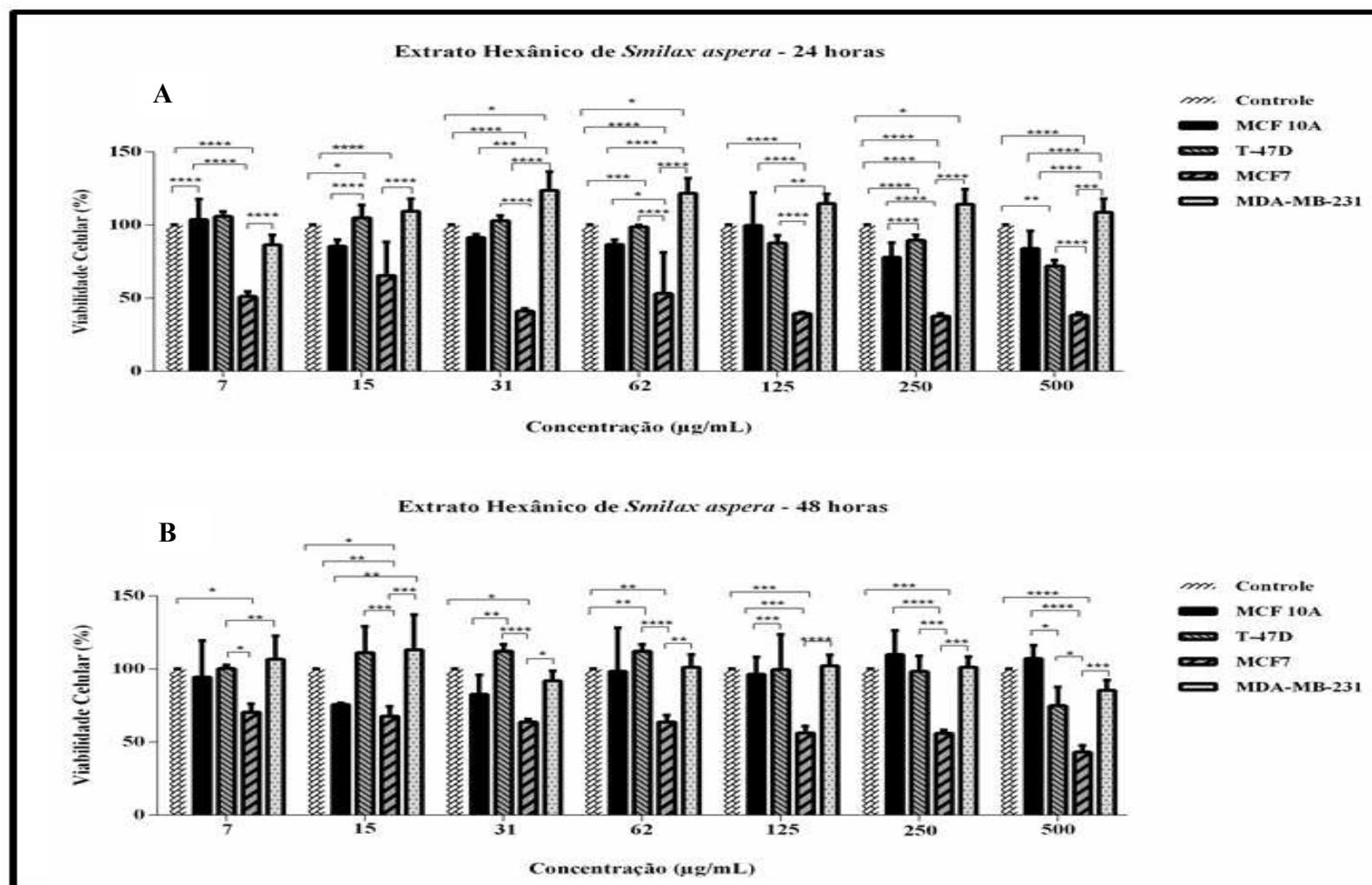
4.4 Análises Estatísticas

As médias e os desvios-padrão foram calculados para cada um dos tratamentos. Os dados obtidos foram analisados pelo software GraphPad Prism 6.0 e a distribuição dos dados foi avaliada. A comparação entre os grupos foi conduzida por meio do teste ANOVA e pós-teste de TUKEY para múltiplas comparações. O cálculo da IC₅₀ foi realizado por regressão linear. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

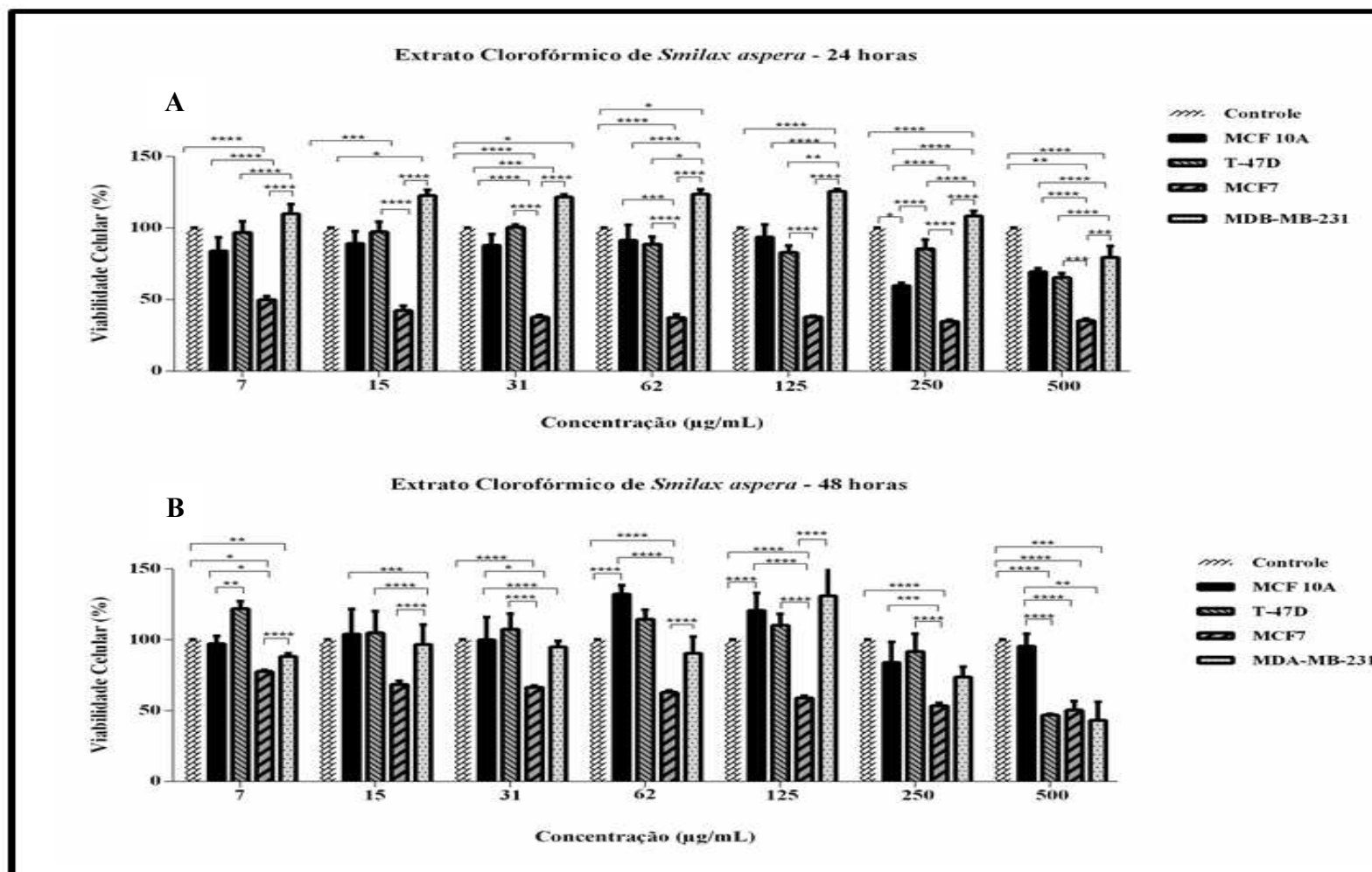
Os efeitos citotóxicos dos extratos hexânico, clorofórmico e hidrometanólico de *S. aspera* sobre as linhagens celulares MCF 10A, T-47D, MCF7 e MDA-MB-231 foram avaliados por meio do ensaio MTT após 24 e 48h de tratamento. Para a fração hexânica (Figura 5) foi verificada maior citotoxicidade para a linhagem MCF7 quando comparada à MCF 10A em todas as concentrações, excetuando a 500 µg/mL, e após 24h. Para o tratamento a 48h esse perfil foi observado apenas nas três maiores concentrações. Considerando a linhagem MDA-MB-231, verificou-se que houve indução de sua proliferação após tratamento por 24 horas com o extrato nas concentrações de 15 µg/mL; 31 µg/mL; 62 µg/mL; 250 µg/mL e 500 µg/mL, quando contrastado ao obtido com a linhagem MCF 10A. Após 48 horas também não foi identificado efeito citotóxico da fração ao modelo de CMTN. Para ambos tratamentos a viabilidade da linhagem não tumorigênica não diferiu do controle de células não tratadas.

Figura 5. Viabilidade celular das linhagens MCF 10A, T-47D, MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com extrato hexânico de *Smilax aspera*. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas Dimetilsulfóxido (DMSO).



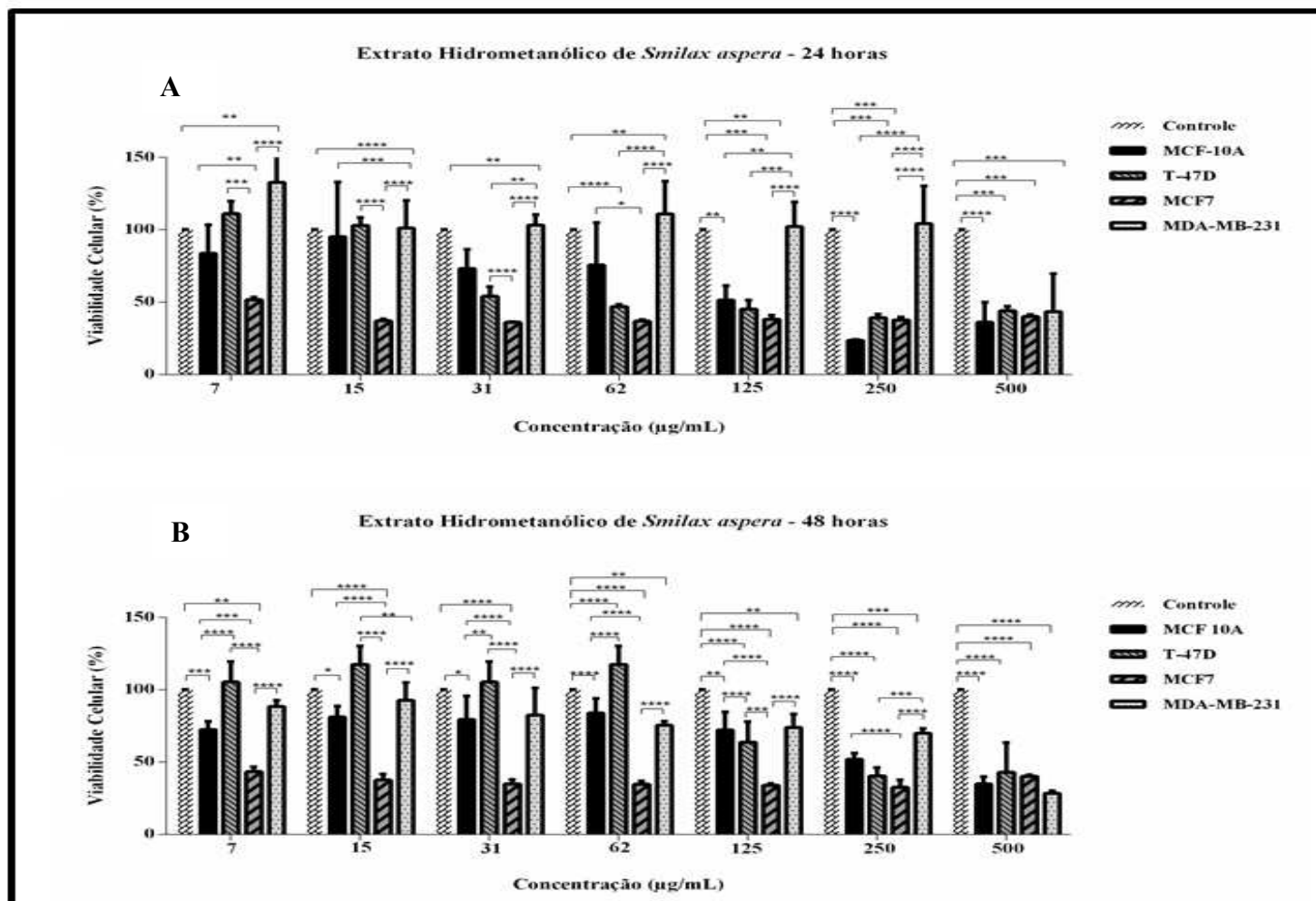
A fração clorofórmica (Figura 6) também se mostrou mais citotóxica à linhagem MCF-7 quando comparada às demais em todas as concentrações após 24 horas de tratamento. Após 48 horas, verificou-se a capacidade do extrato, em sua maior concentração (500 µg/mL), em conter a atividade de todas as linhagens tumorais, comparando-as ao modelo celular não-tumorigênico. Efeito este não observado após 24 horas de tratamento. Além disso, nessas condições, a MCF 10A manteve sua viabilidade em 91,3%. Esses resultados evidenciam a fração clorofórmica como promissora no controle da viabilidade de células tumorais mamárias quando utilizada a 500 µg/mL e após 48 horas de tratamento.

Figura 6. Viabilidade celular das linhagens MCF 10A, T-47D, MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com extrato clorofórmico de *Smilax aspera*. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas Dimetilsulfóxido (DMSO).



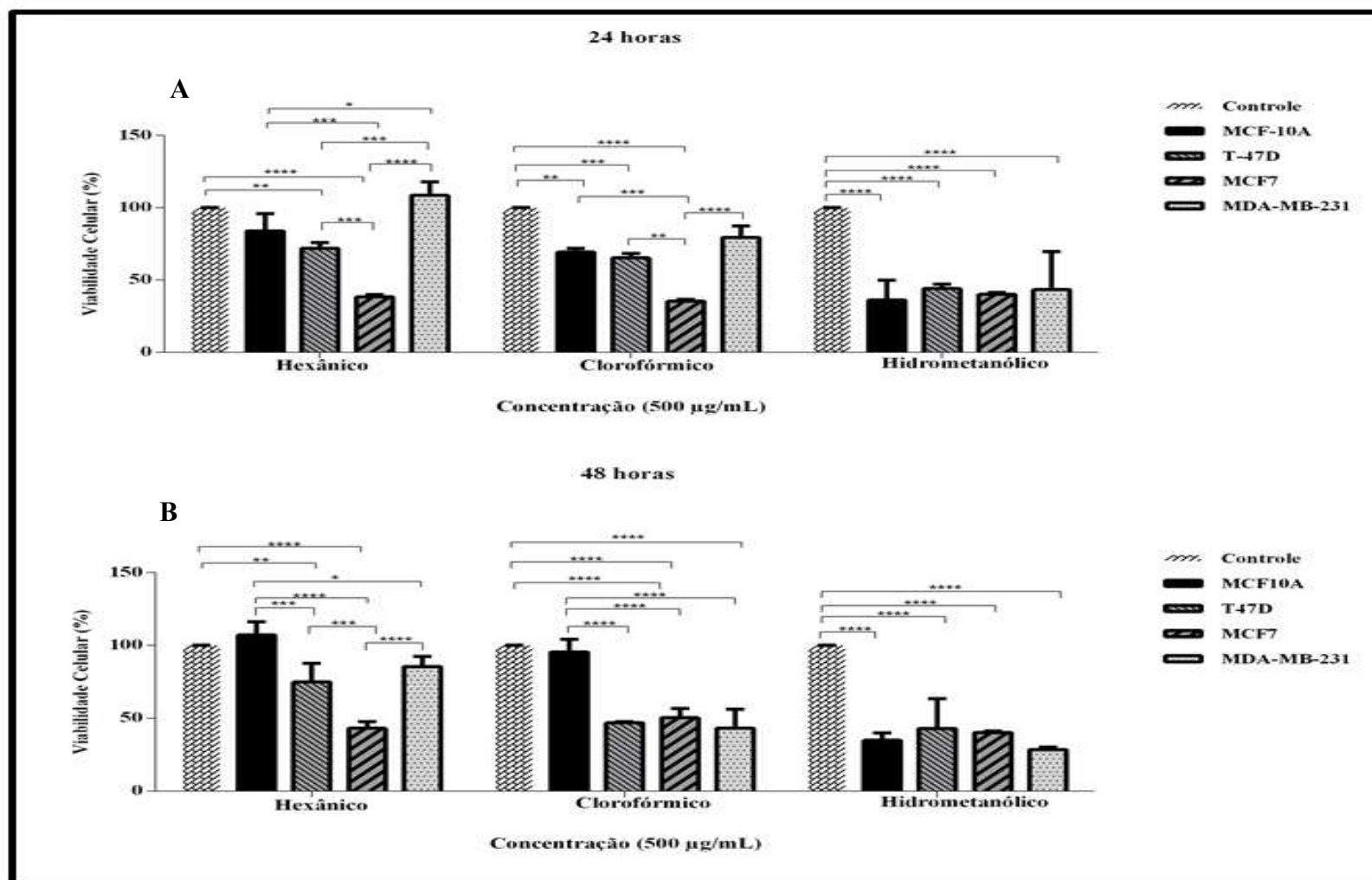
Já para o extrato hidrometanólico (Figura 7) torna-se evidente sua capacidade em induzir a proliferação da linhagem MDA-MB-231 quando a 7 µg/mL após 24 horas de tratamento quando comparadas ao controle de tratamento. Nas demais concentrações não foi verificada a capacidade antitumoral específica dessa fração sobre a linhagem TN, exceto quando tratadas a 500 µg/mL. Durante esse tempo, a atividade citotóxica do extrato só foi identificada nas concentrações de 31 µg/mL e 62 µg/mL para T-47D e MCF7, comparadas à MCF 10A. Após 48 horas, essa fração apresentou atividade antitumoral apenas para a linhagem MCF7 e nas concentrações de 7 µg/mL a 125µg/mL quando comparadas à linhagem não-tumorigênica. Apesar de seu efeito antitumoral em condições experimentais específicas, essa fração foi também citotóxica à linhagem MCF 10A, especialmente nas maiores concentrações.

Figura 7. Viabilidade celular das linhagens MCF 10A, T-47D, MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com extrato hidrometanólico de *Smilax aspera*. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas Dimetilsulfóxido (DMSO).



Como as linhagens tumorais tiveram sua viabilidade reduzida quando tratadas com os extratos na concentração de 500 µg/mL, foi construído um gráfico comparativo (Figura 8) para melhor análise das respostas celulares aos tratamentos. Evidenciou-se o efeito citotóxico do extrato clorofórmico às células tumorais, especialmente ao modelo de CMTN, após 48 horas de tratamento. Já o hexânico foi efetivo contra a linhagem MCF7 em ambos os tempos.

Figura 8. Citotoxicidade comparativa dos extratos hexânico, clorofórmico e hidrometanólico de *Smilax aspera*, todos a 500 µg/mL, aos modelos celulares mamários. Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. O asterisco indica significância estatística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). O controle se refere a células tratadas com apenas Dimetilsulfóxido (DMSO).



Finalmente, foi calculado a IC_{50} para cada um dos tratamentos experimentais. Os extratos hexânico e clorofórmico se mostraram citotóxicos à linhagem MCF7 após 24 horas de tratamento com IC_{50} de 30,71 $\mu\text{g/mL}$ e 20,17 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 2). Após 48 horas, foi possível calcular a IC_{50} para MDA-MB-231 (439,7 $\mu\text{g/mL}$) quando estas foram tratadas com o extrato clorofórmico de *S. aspera*.

Tabela 2. Cálculo da IC_{50} para os extratos hexânico, clorofórmico e hidrometanólico de *Smilax aspera* utilizados no tratamento de células mamárias nos tempos de 24 e 48 horas.

Extrato	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$							
	24 horas				48 horas			
	MCF 10A	T-47D	MCF7	MDA-MB-231	MCF 10A	T-47D	MCF7	MDA-MB-231
Hexânico	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	30,71	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	350	>500 $\mu\text{g/mL}$
Clorofórmico	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	20,17	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	0,4837	470	440
Hidrometanólico	139,8	128,5	>500 $\mu\text{g/mL}$	495,4	330,6	271,4	>500 $\mu\text{g/mL}$	330

6 DISCUSSÃO

Rotineiramente, os agentes quimioterápicos são destinados a eliminar células de rápido crescimento, o que, invariavelmente, afeta células saudáveis altamente replicativas como as do trato digestivo, do sangue e as do folículo piloso. Além dos efeitos colaterais, a resistência medicamentosa e consequente ineficácia terapêutica também comprometem a cura, o que evidencia a necessidade de se identificar e validar novas drogas oncológicas (MACIEL et al., 2013). Nesse cenário, os PNs surgem como alternativa na busca de novas moléculas e compostos, visto que a diversidade de suas estruturas químicas permite múltiplas formulações, ampliando assim sua aplicabilidade no tratamento de doenças complexas como o câncer.

As plantas têm sido utilizadas empiricamente na medicina popular há milhares de anos, sendo inicialmente empregadas em formas brutas, como em chás e emplastos (BALICK; COX, 1997; SAMUELSSON, 2004). Historicamente, a partir do início século XIX, seu uso envolveu o isolamento de compostos, como a morfina, codeína, digitoxina e

quinina. De fato, os princípios ativos obtidos de agentes naturais continuam fornecendo subsídios para a obtenção de medicamentos contra as mais diferentes doenças como câncer, HIV/AIDS, Alzheimer, malária e dor (KINGHORN, 2001; SAMUELSSON, 2004).

A pesquisa atual na descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais envolve uma abordagem multifacetada que combina técnicas botânicas, fitoquímicas, biológicas e moleculares. O Brasil é o país com a maior biodiversidade no mundo, destacando-se por representar 20% de todas as espécies vivas no planeta (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA 2019). Portanto, é uma rica fonte de compostos naturais com estruturas peculiares (WILSON 1999; NOSS 1990), os quais necessitam ser amplamente estudados. Metabólitos secundários desempenham um papel fundamental regulando, equilibrando e protegendo as plantas contra patógenos e predadores (BARREIRO; BOLZANI, 2009). No presente trabalho analisamos a atividade citotóxica de três extratos (hexânico, clorofórmico e hidrometanólico) obtidos de *Smilax aspera*, espécie pertencente à flora brasileira, avaliados em linhagens celulares de CM.

A atividade citotóxica de compostos pode ser verificada morfológicamente, de modo que o tratamento acarreta alterações visíveis e passíveis de visualização em microscópio (SKEHAN, 1995; MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002), ou por métodos baseados na permeabilidade seletiva da membrana, como a exclusão dos corantes azul de tripano e eosina (SKEHAN et al., 1990; MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002). Além destes, também são utilizados compostos que se ligam eletrostaticamente aos íons das macromoléculas contendo cargas opostas como a sulforrodamina B e o azul de bromofenol (WILSON, 1987). No presente estudo foi utilizado o método de MTT. Este baseia-se no metabolismo celular (CARMICHEL, 1987; MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002), sendo amplamente utilizado para se determinar a toxicidade de compostos naturais e sintéticos, especialmente daqueles aplicáveis ao tratamento oncológico (ALEGRE; SYLOS, 2014).

O método descrito por Mosmamm (1983) consiste em um ensaio quantitativo colorimétrico para avaliar a viabilidade celular pela atividade de desidrogenases mitocondriais presentes somente em células metabolicamente viáveis. Essas enzimas clivam o anel de tetrazólio, um sal de coloração amarela solúvel em água, transformando-o em um composto insolúvel de coloração roxa, chamado de formazan [E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan]. Assim, a produção de formazan reflete a atividade mitocondrial (UNIVERSIDADE DE COIMBRA, 2017; GOMES, 2008; BOCHNIE, 2016).

A caracterização da citotoxicidade *in vitro* é uma prática comum na avaliação biológica de compostos destinados à área da saúde. Esse *screening* inicial, especialmente de

extratos vegetais e compostos ativos isolados de plantas, visa identificar componentes com potencial uso farmacológico, principalmente no tratamento de neoplasias. No MTT são utilizadas linhagens tumorais em um método rápido e que direciona os ensaios futuros (RISS; MORAVEC; NILES, 2011; PEREIRA, 2014). Cultivamos as linhagens tumorais MCF7 e T-47D, de fenótipo luminal, e MDA-MB-231, de fenótipo TN. Importante salientar que tumores mamários são classificados molecularmente em Luminais (A e B), HER2-enriquecidos e CMNT. Esta classificação consiste em um aspecto clínico importante que define o prognóstico da paciente e direciona os métodos terapêuticos a serem adotados. Portanto, avaliar o efeito celular em modelos representativos de diferentes subtipos se mostra crucial na caracterização de protótipos. Neste estudo, buscamos mimetizar a heterogeneidade do CM ao cultivarmos os dois principais modelos moleculares. Para o HER2-enriquecido já se encontra disponível terapia-alvo bem estabelecida.

Utilizando essas linhagens também em testes para avaliar a citotoxicidade de PNs, Hu et al (2018) revelaram que a curcumina inibiu significativamente, após 72 horas, a proliferação de T-47D, MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-415, com uma IC_{50} de $2,07 \pm 0,08$, $1,32 \pm 0,06$, $4,69 \pm 0,06$ μ M. Isbilen, Rizaner, Volkan (2018) demonstraram o efeito antiproliferativo do extrato de bulbo de *Allium autumnale* sobre células MCF7 e MDA-MB-231 nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Zhang et al (2015) relataram o potencial citotóxico do extrato aquoso de pimenta dioica sobre as linhagens mamárias MCF7, SKBR3, MDA-MB-231, T-47D e BT474 quando incubadas com composto natural por um período de 72 horas. Segundo Abutaha (2019) o extrato hexânico da raiz de *Ferula hermonis* Boiss foi citotóxico às MDA-MB-231 e células de cólon LoVo, inibindo a viabilidade de maneira dose-dependente, com valores de IC_{50} de 25 e 18,2 μ g/mL, respectivamente. Portanto, nosso desenho experimental encontra-se congruente à produção científica internacional.

No presente estudo avaliamos extratos da espécie *S. aspera* e seu efeito antitumoral sobre linhagens de CM. Apenas algumas espécies do gênero *Smilax* já foram investigadas quanto ao seu efeito farmacológico. Já foram descritas as atividades antiproliferativa, pró-apoptótica e antioxidante de extratos provenientes de plantas desse gênero (WANG et al., 2013). A *Smilax regelii* por exemplo, exibiu atividade antimicrobiana contra *Shigella dysenteriae* e é aplicada principalmente no combate à artrite, reumatismo, psoríase e impotência sexual. A *Smilax spinosa* demonstrou atividade antioxidante e antimicrobiana, sendo eficaz contra *Salmonella typhimurium* e *Trypanosoma cruzi* (SEELINGER et al., 2012). Wang e colaboradores (2013) verificaram que os glicósdeos de fenilpropanóides isolados de *S. china* apresentaram efeitos citotóxicos em linhagens celulares KB, HeLa e

DLD-1. A fração etanólica do rizoma de *S. glabra* Roxb, demonstrou atividade contra o vírus sincicial respiratório (RSV) e o vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1), além de suprimir a proliferação de células MCF7 (GAO et al., 2011). Contudo, a pesquisa voltada quanto a atividade antitumoral de *Smilax aspera* permanece incipiente. Considerando o CM, em estudo anterior, o extrato etanólico de *S. china* L. (SCLE) reduziu a viabilidade das células MDA-MB-231 em 40% com perfil dose e tempo dependentes, além de inibir 50% da migração celular na concentração de 50 µg/mL (NHO; CHUN; KIM, 2015). Nossos resultados também demonstraram um perfil citotóxico do extrato clorofórmico, em sua maior concentração, frente à linhagem MDA-MB-231 (triplo-negativa). Já o extrato hexânico se mostrou efetivo apenas contra a linhagem MCF7 (receptor de estrógeno positivo).

Extratos de plantas medicinais possuem diferentes constituintes químicos, os quais, em geral, apresentam efeitos sinérgicos. De fato, a atividade citotóxica verificada para *S. aspera* pode decorrer da ação de diferentes moléculas e os compostos purificados dos extratos avaliados no presente estudo podem não acarretar os mesmos efeitos celulares. Efetivamente, o isolamento de componentes majoritários e a definição de seus mecanismos de ação continua sendo um dos maiores desafios científicos (MACIEL et al., 2013). Considerando os efeitos dos extratos hexânico sobre a linhagem MCF7 e do clorofórmico sobre a MDA-MB-231, torna-se necessária sua caracterização química para novos desenhos terapêuticos. Sugerimos que, as diferenças em suas composições sejam responsáveis pelos efeitos verificados nas diferentes linhagens tumorais.

Estudos anteriores sobre os constituintes químicos das espécies *Smilax* revelaram a presença de saponinas esteroidais, flavonóides, fenilpropanóides e estilbenoides. Já foi demonstrada a atividade imunossupressora da astilbina, um dos principais flavonóides encontrados nas espécies de *Smilax*, e, portanto, aplicada no tratamento de doenças imunológicas humanas. Além disso, as saponinas esteroidais também já demonstraram atividades antifúngicas, anti-inflamatórias e inibidoras de AMPc fosfodiesterase (BELHOUCHE et al., 2008; TIAN et al., 2017). Nossos resultados, portanto, se mostram promissores na caracterização desses extratos para o tratamento do CM.

O extrato clorofórmico a 500 µg/mL foi citotóxico a todas as linhagens tumorais, comparando-as ao modelo celular não-tumorigênico após 48 horas, uma atividade não observada após 24 horas de tratamento. Sugerimos que os produtos do metabolismo do extrato podem estar associados ao seu efeito citotóxico as células de CM. Existem compostos que somente quando metabolizados apresentam os efeitos esperados. Assim, a elucidação das vias metabólicas dos PNs auxilia na determinação de sua eficácia e segurança. Os PNs exibem

a capacidade de formar metabólitos farmacologicamente inativos, metabólitos reativos que induzem efeitos adversos, e em alguns casos, formar metabólitos ativos que aumentam seu potencial terapêutico. Este último é o que sugerimos para o extrato clorofórmico de *S. aspera*. Um dos metabólitos do gengibre, shogaol, (1E, 4E) -1- (4'-hidroxi-3'-metoxifenil) - deca-1,4-dien-3-ona, por exemplo, foi testado quanto a sua capacidade em inibir o crescimento de células cancerígenas, exibindo maior atividade que o gingerol, seu precursor metabólico (CHEN et al., 2013; ZHAO et al., 2018). Portanto, é necessário desvendar os produtos do metabolismo da *S. aspera* pois estes podem ser os responsáveis pela resposta celular observada.

Por fim, a avaliação do perfil de segurança e toxicidade de novos compostos químicos são partes integrantes do desenvolvimento de medicamentos e nosso estudo encontra-se engajado na descoberta e caracterização de novos quimioterápicos. Os ensaios toxicológicos pré-clínicos são realizados em testes *in vitro* e *in vivo*. Experimentos *in vitro* são essenciais na redução dos custos associados ao manejo animal, já direcionando os tratamentos e reduzindo o número de indivíduos necessários. (SAHOTA; DANHOF; DELLA PASQUA, 2016; LAVANDERIA, 2014). O *screening* presentemente realizado demonstrou a potencialidade do extrato clorofórmico de *S. aspera* e a necessidade de caracterização de seus constituintes na definição de protótipos para o tratamento do CM. Após caracterização, se mostram necessárias novos ensaios funcionais em linhagens celulares como avaliação da atividade pró-apoptótica e proliferativa por citometria de fluxo, capacidade de degradação de DNA por ensaio cometa e definição das vias moleculares envolvidas nas respostas observadas.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito citotóxico das frações extrativas hexânica, clorofórmica e hidrometanólica de *S. aspera* frente as células tumorais mamárias T-47D, MCF7 e MDA-MB-231 no tempo de 24 e 48 horas. Os extratos hexânico e clorofórmico se mostraram efetivos no controle das linhagens tumorais cultivadas. O hexânico foi efetivo contra a linhagem MCF7 em todas as concentrações e o clorofórmico para todas as linhagens tumorais na maior concentração (500 µg/mL). Assim, definimos a fração clorofórmica como promissora para o tratamento dos tumores mamários.

REFERÊNCIAS

ACC CAMARGO CENTER CANCER. **Inibidores de PARP: Estamos vivendo uma mudança de paradigmas?** Disponível em: < <https://accamargo.org.br/noticias/inibidores-de-parp-estamos-vivendo-uma-mudanca-de-paradigma>>. Acesso em: 24 out. 2019.

ABUTAHA, N. et al. Effects of hexane root extract of ferula hermonis boiss. On human breast and colon cancer cells: An in vitro and in vivo study. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

ALEGRE, G. F. S.; SYLOS, C. M. Uso de ensaio MTT para determinação da capacidade antioxidante em sucos de laranja. **Alimentos e Nutrição**, v. 25, n. 1, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What Is Breast Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>>. Acesso em: 05 set. 2019.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION – ATCC. **T-47D**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#characteristics>>. Acesso em 05 set. 2019.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION – ATCC. **MCF7**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#characteristics>>. Acesso em 05 set. 2019.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION – ATCC. **MDA-MB-231**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#characteristics>>. Acesso em 05 set. 2019.

ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 36-42, 2012.

BELHOUCHE, Z. et al. Steroidal saponins from the roots of Smilax aspera subsp. mauritanica. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 9, p. 1324-1327, 2008.

BISHAYEE, A. et al. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, v. 16, p. 980, 2011.

BOMMAREDDY, A. et al. Chemoprevention of prostate cancer by major dietary phytochemicals. **Anticancer Research**, v. 33, n. 10, p. 4163-4174, 2013.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BREAST CANCER. **Breast Cancer Risk Factors**. Disponível em: <http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/risk/factors>. Acesso em: 17 out. 2016.

CARMICHAEL, J. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, v. 47, n. 4, p. 936-942, 1987.

CHEN, J.; GULSEN, G.; SU, M. Imaging Breast Density: Established and Emerging Modalities. **Translational Oncology**, v. 8, n. 6, p. 435-445, 2015.

CHEN, H. et al. Metabolism of ginger component [6] - shogaol in liver microsomes from mouse, rat, dog, monkey, and human. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 5, p. 865-876, 2013.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER et al. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. **The Lancet**, v. 358, n. 9291, p. 1389-1399, 2001.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. O. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.

COMŞA, S.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147-54, 2015.

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

DELGADO-PELAYO, R.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Identification and quantitative analysis of carotenoids and their esters from sarsaparilla (*Smilax aspera* L.) berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 33, p. 8225-8232, 2012.

DIETZ, B. M. et al. Botanicals and their bioactive phytochemicals for women's health. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 4, p. 1026-1073, 2016.

DZIADKOWIEC, K. N. et al. PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. **Przegląd Menopauzalny - Menopause review**, v. 15, n. 4, p. 215, 2016.

FARRAH, T. et al. The state of the human proteome in 2012 as viewed through Peptide Atlas. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 1, p. 162-171, 2012.

FARUQUE, M. O. et al. Quantitative Ethnobotany of Medicinal Plants Used by Indigenous Communities in the Bandarban District of Bangladesh. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 40, 2018.

FERNANDES, A. G.; MAFRA, D. Zinco e câncer: uma revisão crítica. **Revista Saúde**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 144-156, 2005.

GAO, Y. et al. Mitochondrial apoptosis contributes to the anti-cancer effect of *Smilax glabra* Roxb. **Toxicology Letters**, v. 207, n. 2, p. 112-120, 2011.

GARDEZI, S. et al. Breast Cancer Detection and Diagnosis Using Mammographic Data: Systematic Review. **Journal of Medical Internet Research**, v. 21, n. 7, 2019.

GAULTON, A. et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 1, p. 1100-1107, 2011.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 63 f, 2008.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119-136, 2017.

HEIMES, A. S.; SCHMIDT, M. Atezolizumab for the treatment of triple-negative breast cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 28, n. 1, p. 1-5, 2019.

HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS. **Sintomas do câncer de mama e fatores de risco**. Disponível em: < <https://www.hcancerbarretos.com.br/82-institucional/noticias-institucional/436-sintomas-do-cancer-de-mama-e-fatores-de-risco>>. Acesso em: 17 out. 2016.

HOWELL, A. et al. Mechanisms of Disease: prediction and prevention of breast cancer-cellular and molecular interactions. **Journal of Cancer**, v. 2, n. 12, p. 635-46, 2005.

HU, S. et al. Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, n. 2, p. 1266-1272, 2018.

IARC. **Cancer today**. Disponível em: < <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=29&type=0&sex=0>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

INCA. **O que é o câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em 08 dez. 2019.

INCA. **Mortalidade por câncer de mama está abaixo da média mundial, mas país enfrenta desafios na prevenção e redução das desigualdades**. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/imprensa/mortalidade-por-cancer-de-mama-esta-abaixo-da-media-mundial-mas-pais-enfrenta-desafios-na>>. Acesso em 08 dez. 2019.

INCA. **Situação do Câncer de Mama no Brasil**. Disponível em: < https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf>. Acesso em 04 set. 2019.

INCA. **Estimativa**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 27 jul. 2018.

INCA. **Agência de notícias**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2014/oms_diz_que_medidas_efetivas_prevencao_cancer_sao_urgentes>. Acesso em: 17 fev. 2017.

IRWIN, J. J. et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012.

ISBILEN, O.; RIZANER, N.; VOLKAN, E. Anti-proliferative and cytotoxic activities of *Allium autumnale* PH Davis (Amaryllidaceae) on human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 30, 2018.

IVANOVA, A. et al. New furostanol saponins from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 282-287, 2011.

KEYDAR, I. et al. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *European Journal of Cancer*, v. 15, p. 659-670, 1979.

KLEIBL, Z.; KRISTENSEN, V. N. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. **The Breast**, v. 28, p. 136-144, 2016.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 3, n. 83, p. 249-289, 2004.

LAVANDERIA, F. M. F. 2014. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 114f, 2014.

LEITE, W. L. O.; FILHO, A. A. O. Avaliação farmacológica de produtos naturais no combate ao câncer. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, v. 1, n. 2, p. 192-211, 2014.

LONGO, L.; VASAPOLLO, G. Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. **Food Chemistry**, v. 94, n. 2, p. 226-231, 2006.

MACIEL, M. A. M. et al. Aspectos sobre Produtos Naturais na Descoberta de Novos Agentes Antitumorais e Antimutagênicos. **Revista Fitos**, v.3, n. 1, 2007.

MCDONALD, E. S. et al. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 1, p. 9-16, 2016.

MEADOWS, A. L. et al. Metabolic and morphological differences between rapidly proliferating cancerous and normal breast epithelial cells. **Biotechnology**, v. 24, p. 334-341, 2008.

MEDEIROS, M. F. T.; SENNA-VALLE, L.; ANDREATA, R. H. P. Histórico e o uso da “salsaparrilha” (*Smilax* spp.) pelos boticários no Mosteiro de São Bento. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 27-29, 2007.

MIGITA, N. A. **Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares**. Monografia (Título de Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 68f, 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Biodiversidade**. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 10 set. 2019.

MOLINA-MONTES, E. et al. Risk of second cancers cancer after a first primary breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Gynecologic Oncology**, v. 136, n. 1, p. 158-71, 2015.

MOSSMAN, T. A rapid colourimetric assay for cellular proliferation and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-61, 1983.

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

NAIK, A.; MONJAZEB, A. M.; DECOCK, J. The Obesity Paradox in Cancer, Tumor Immunology, and Immunotherapy: Potential Therapeutic Implications in Triple Negative Breast Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. 10, 2019.

NHO, K. J.; CHUN, J. M.; KIM, H. K. Anti-metastatic effect of Smilax china L. extract on MDA-MB-231 cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 1, p. 499-502, 2015.

NOSS, R. F. Indicators for Monitoring Biodiversity: A Hierarchical Approach. **Conservation Biology**, v. 4, p. 355-364, 1990.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 552-8, 2011.

OLIVEIRA, L. G. et al. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1577-86, 2013.

ONCOGUIA. **Sinais e Sintomas do câncer de mama**. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-do-cancer-de-mama/1383/34/>>. Acesso em: 18 out. 2016.

ONCOGUIA. **A mama**. Disponível em: < <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/a-mama/748/12/>>. Acesso em: 05 set. 2019.

PARSA, Y. et al. A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology. **Electronic Physician Journal**, v. 8, n. 5, p. 2416-2424, 2016.

PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD. **Breast Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65969/>>. Acesso em: 5 nov. 2016.

PEREIRA, W. L. **Ação antitumoral in vitro do extrato da folha de oliveira (*olea europaea* L.) e dos flavonoides morina, naringina e rutina em linhagens de células carcinogênicas**. 2014. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 110f, 2014.

PIERSEN, C. E. et al. Chemical and biological characterization and clinical evaluation of botanical dietary supplements: a phase is red clover extract as a model. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1361-1374, 2004.

PILON, A. C. et al. NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POURTEIMOOR, V.; MOHAMMADI-YEAGANEH, S.; PARYAN, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. **Tumour Biology**, v. 37, n. 11, p. 14479-14499, 2016.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais, **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RAVAIOLI, A. et al. Prognosis and prediction of response in breast cancer: the current role of the main biological markers. **Cell Proliferation**, v. 31, n. 3, p. 113-126, 1998.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. **Methods in Molecular Biology**, v. 740, p. 103-114, 2011.

ROSHAN, M. H.; SHING, Y. K.; PACE, N. P. Metformin as an adjuvant in breast cancer treatment. **SAGE Open Medicine**, v. 7, 2019.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-08, 2001.

SAAD, E. D. Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p. 555-567, 2002.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n.1, p. 421, 2014.

SEELINGER, M. et al. Methanol extract of the ethnopharmaceutical remedy Smilax spinosa exhibits anti-neoplastic activity. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 3, p. 1164-1172, 2012.

SHARMA, P.; MCCLEES, S. F.; AFAQ, Farrukh. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 177, 2017.

SIMOS, D. et al. Definition and consequences of locally advanced breast. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 8, n. 1, p. 33-8, 2014.

SIMOS, D. et al. Imaging for metastatic disease in patients with newly diagnosed breast cancer: are doctor's perceptions in keeping with the guidelines? **Journal of Evaluation in Clinical Practice**, v. 21, n. 1, p. 67-73, 2015.

STUDZINSKI, G. **Cell Growth and Apoptosis**. Oxford University Press, 1995, 296 p. ISBN-13: 978-0199635696.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SPARG, S. G; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 219-243, 2004.

SINGLETERY, S. E. Rating the risk factors for breast cancer. **Annals of Surgery**, v. 237, n. 4, p. 474, 2003.

SAHOTA, T.; DANHOF, M.; DELLA PASQUA, O. Pharmacology-based toxicity assessment: towards quantitative risk prediction in humans. **Mutagenesis**, v. 31, n. 3, p. 359-374, 2016.

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

SOULE, H. D. et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF 10A. **Cancer Research**, v. 50, p. 6075-6086, 1990.

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

TAUTENHAHN, R. et al. An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 826-828, 2012.

TIAN, Li-Wen et al. Steroidal Saponins from the genus *Smilax* and their biological activities. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 7, n. 4, p. 283-298, 2017.

TURK, A.; WISINSKI, K. B. PARP Inhibition in BRCA-Mutant Breast Cancer. **Cancer**, v. 124, n. 12, p. 2498, 2018.

UNIVERSIDADE DE COIMBRA. **Estudo Geral – Capítulo 2**. Disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/jspui/bitstream/10316/532/4/Cap%C3%ADtulo2.pdf>>. Acesso em 12 jan. 2017.

VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439-444, 2013.

VALLI, M.; RUSSO H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 763-778, 2018.

VAN BREEMEN, R. B. Development of safe and effective botanical dietary supplements. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 8360-8372, 2015.

VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, n. 4, p. 200-201, 2012.

WANG, Wei-Xin et al. Tumoral cytotoxic and antioxidative phenylpropanoid glycosides in *Smilax riparia* A. DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 527-532, 2013.

WILSON, A. P. **Animal Cell Culture: A Practical Approach**. IRL Press: Oxford, cap. 8, p. 183, 1987.

WILSON, E. **The Diversity of Life**. New York: Harvard University Press, p. 424, 1999.

WISHART, D. S. et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 1, p. 668-672, 2006.

WISHART, D. S. et al. HMDB 3.0-the human metabolome database in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 801-807, 2012.

XU, C. et al. Inhibitory effect of Schisandra chinensis leaf polysaccharide against L5178Y lymphoma. **Carbohydrate Polymers**. n. 88, v.1, p. 21-5, 2012.

ZHANG, L. et al. Polyphenol-rich extract of Pimenta dioica berries (Allspice) kills breast cancer cells by autophagy and delays growth of triple negative breast cancer in athymic mice. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 16379, 2015.

ZHAO, Q. et al. Application of Metabolomics in the Study of Natural Products. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 8, n. 4, p. 321-334, 2018.