

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

MARIÁH OJEDA

**COMPOSTOS CITOTÓXICOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA
COMBINADOS À DOXORUBICINA NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA
EM MODELOS DE CULTURA CELULAR 2D E 3D**

CAMPO GRANDE – MS

2021

MARIÁH OJEDA

**COMPOSTOS CITOTÓXICOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA
COMBINADOS À DOXORUBICINA NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA
EM MODELOS DE CULTURA CELULAR 2D E 3D**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Orientação: Prof^a Dr^a Renata Trentin Perdomo

Coorientação: Prof^o Dr^o Eduardo Benedetti
Parisotto

CAMPO GRANDE – MS

2021

MARIÁH OJEDA

**COMPOSTOS CITOTÓXICOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA
COMBINADOS À DOXORUBICINA NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA
EM MODELOS DE CULTURA CELULAR 2D E 3D**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Orientação: Prof^a Dr^a Renata Trentin Perdomo

Coorientação: Prof^o Dr^o Eduardo Benedetti Parisotto

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu à candidata o conceito

Campo Grande, 15 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Renata Trentin Perdomo – Orientadora

Prof^a Dr^a Elvira Maria Guerra Shinohara – UFMS – membro interno

Prof^a Dr^a Giovanna Barbarini Longato – USF – membro externo

Prof^o Dr^o Saulo Euclides Silva Filho – UFMS – suplente interno

Prof^a Dr^a Ana Tereza Gomes Guerrero – suplente externo

DEDICATÓRIA

Buscando atingir o desenvolvimento e aprimoramento profissional, dedico o presente trabalho à toda sociedade a qual sirvo como farmacêutica bioquímica.

AGRADECIMENTOS

No âmbito acadêmico agradeço à Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pela estrutura de trabalho fornecida, em especial ao laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células; Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e a todos os professores credenciados a ele e à CAPES/CNPq e FUNDECT pelo suporte financeiro ao projeto

À minha orientadora, Professora Doutora Renata Trentin Perdomo e ao meu co-orientador Professor Doutor Eduardo Benedetti Parisotto, por terem me aceito como orientanda, mesmo sabendo do meu contexto profissional, em que eu não poderia me dedicar exclusivamente ao mestrado, e confiado de que desta parceria teríamos resultados positivos.

À minha querida Professora Doutora Maria de Fátima Cepa Mattos, que me acolheu desde 2011, quando ainda era caloura no curso de Farmácia, no laboratório de cultura celular e me guiou por durante toda a graduação como sua aluna de iniciação científica. Os conhecimentos que adquiri neste período vão além do técnico-científico, pois abrangem, além de tudo, o campo do relacionamento social.

À Professora Doutora Fernanda Rodrigues Garcez e ao seu orientando Patrick S. Mirowski pela parceria e orientação no trabalho além do fornecimento dos compostos naturais a serem analisados.

Aos membros da banca de qualificação e defesa por aceitarem participar e pelas contribuições.

À técnica de laboratório Magali pelo apoio técnico; à Lorena e Nathália que me auxiliaram imensamente em experimentos; à Bianca Acácio que foi de enorme ajuda para a realização do ensaio de ciclo celular e a todos e todas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste projeto.

A mim, por ter criado coragem de pôr em prática um sonho há muito tempo guardado e por ter mantido disciplina e foco para conciliar e executar o projeto de mestrado, assistir aulas e me envolver no contexto acadêmico enquanto trabalhava período integral.

No que tange minha área profissional como farmacêutica agradeço à empresa Sabin Medicina Diagnóstica, a qual faço parte do quadro de colaboradores, em especial minha liderança imediata, Bruna Hoff, que permitiu flexibilização de horas para que eu pudesse comparecer às atividades acadêmicas e Thiago Drumond que me acompanhou desde o início desta trajetória e forneceu ideias em momentos essenciais desta jornada acadêmica, além da gestão da regional do Sabin-MS bem como toda a equipe de bioquímicos e técnicos pela compreensão e ajuda nos momentos de ausência no serviço para cumprir com demandas do mestrado.

Por fim, porém não menos essencial, agradeço o suporte familiar dos meus pais Cleidimary e Veliz que me acompanharam por todo o percurso, me acolhendo nos momentos de dificuldade e à Gabriel Cathcart que me deu forças para iniciar este projeto.

Obrigada!

“Disciplina é a ponte entre metas e realizações”.

Jim Rohn

RESUMO

Introdução: O câncer de mama afeta milhões de mulheres em todo o mundo e é o segundo tipo de câncer que mais acomete mulheres (atrás do câncer de pele não melanoma). Estima-se que mais de 600 mil novos casos de câncer ocorrerão anualmente entre 2020 até 2022. O uso de politerapia é comum no tratamento do câncer e tem a vantagem de maior eficácia nas diferentes subpopulações do tumor, além de evitar resistência medicamentosa. A associação de quimioterápicos padronizados com produtos naturais como isoflavonoides e terpenos são de grande importância, tendo em vista o potencial biológico em seus derivados. **Objetivos:** Avaliar a resposta celular à ação de compostos citotóxicos da biodiversidade Brasileira (própolis negra e *Combretum Mellifluum*) combinados ao quimioterápico doxorrubicina usando modelos de culturas celulares 2D e 3D de células de câncer de mama (MCF7). **Métodos e Resultados:** Os resultados de citotoxicidade em modelo 2D na linhagem neoplásica MCF-7 mostram GI_{50} de 4,089 μ g/mL para SBP (isoflavonoide oriundo da própolis negra) e 3,895 μ g/mL para SCM (triterpeno originado da *C. mellifluum*). Avaliou-se a citotoxicidade destes compostos após metabolização hepática *in vitro*. Observou-se que não houve inativação da substância e a atividade antiproliferativa foi preservada. Ambos compostos foram capazes de inibir a migração celular na linhagem potencialmente metastática, além de inibirem a formação de colônias de células neoplásicas ao serem associados com doxorrubicina. As amostras foram capazes de estimular o dano à membrana celular representado através da elevação dos níveis de TBARS e na resposta das defesas antioxidantes. Na investigação realizada em modelo 3D, percebe-se que o composto SCM quando associado a doxorrubicina é capaz de penetrar mais no esferoide formado. SBP e SCM foram capazes de fomentar o dano à membrana celular e interromper o ciclo celular na fase G1, antes que a célula adentrasse a fase S referente à síntese de material genético. **Conclusões:** Ambas substâncias tem efeito antiproliferativo contra câncer de mama em modelos 2D e 3D, *in vitro*, com potencial ainda a ser explorado no campo da biologia molecular.

Palavras-chave: *Combretum mellifluum*, própolis negra, antiproliferativo, esferoides, migração celular, cultura celular

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer affects millions of women worldwide and is the second type of cancer that most affects women (behind non-melanoma skin cancer). It is estimated that more than 600 thousand new cases of cancer will occur annually between 2020 until 2022. The use of polytherapy is common in the treatment of cancer and has the advantage of greater efficacy in the different subpopulations of the tumor, in addition to avoiding drug resistance. The association of standardized chemotherapy with natural products such as isoflavonoids and terpenes is of great importance, considering the biological potential in their derivatives. **Objectives:** To evaluate the action at the cellular level of cytotoxic compounds from Brazilian biodiversity (black propolis and *C. Mellifluum*) combined with chemotherapeutic agents doxorubicin in the **Methodology and Results:** The results of cytotoxicity in 2D model in the neoplastic lineage MCF-7 show an IC_{50} of 4.089 μ g/mL for SBP (isoflavonoid from black propolis) and 3.895 μ g/mL for SCM (triterpene originated from *C. Mellifluum*). The cytotoxicity of these compounds was evaluated after mimicking hepatic metabolism in vitro, observing that there was no inactivation of the substance and the cytotoxic activity was preserved. Both compounds were able to inhibit cell migration in potentially metastatic language, in addition to inhibiting the formation of colonies of neoplastic cells when associated with doxorubicin. The samples were able to stimulate cell membrane damage represented by the elevation of TBARS levels and the response of antioxidant defenses. In the investigation carried out in 3D model, it is noticed that the SCM compound when associated with doxorubicin can penetrate more into the formed spheroid. SBP and SCM were able to promote damage to the cell membrane and interrupt the cell cycle in the G1 phase, before the cell entered the S phase related to the synthesis of genetic material. **Conclusions:** The data found from the evaluation of the isolated compounds corroborate with that described in the literature regarding cytotoxic activity. It is necessary to advance the studies to better understand the mechanism of inhibition of cell migration and how the compounds act in the cell cycle.

Keywords: *Combretum mellifluum*, black propolis, cytotoxicity, spheroids, cell migration, cell culture

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxas de mortalidade por câncer de mama	4
Figura 2 – Fatores intrínsecos e extrínsecos	5
Figura 3 – Anatomia da mama e comprometimento celular	7
Figura 4 – Estrutura DMAPP e IPP	13
Figura 5 – Abelha e corbícula	16
Figura 6 – linhagens celulares aderentes e não aderentes	19
Figura 7 – Zonas celulares e estado nutricional de esferoide <i>in vitro</i>	21
Figura 8 – Estrutura da substância isolada a partir da <i>Combretum mellifluum</i>	32
Figura 9 – Estrutura da substância isolada a partir da própolis negra	33
Figura 10 – Micro molde <i>MicroTissues</i> [®] <i>3D Petri Dish</i> [®] para esferoides	41
Figura 11 – Gráfico de viabilidade celular de SBP nos tempos 24 e 48 horas	48
Figura 12 – Gráfico de viabilidade celular de SCM nos tempos 24 e 48 horas	49
Figura 13 – Gráfico de viabilidade celular da amostra SBP após exposição prévia à HepG2	52
Figura 14 – Gráfico de viabilidade celular da amostra SCM após exposição prévia à HepG2	53
Figura 15 – Gráfico de viabilidade celular da amostra SBP associada à doxorubicina	55
Figura 16 – Gráfico de viabilidade celular da amostra SCM associada à doxorubicina	56
Figura 17 – Imagens e gráficos representativos do ensaio de ranhura (<i>scratch assay</i>) antes e após o tratamento com a amostra SBP e doxorubicina	59
Figura 18 – Imagens e gráficos representativos do ensaio de ranhura (<i>scratch assay</i>) antes e após o tratamento com a amostra SCM e doxorubicina	60
Figura 19 – Imagens representativas do teste clonogênico, com as colônias analisadas após tratamento com SBP, doxorubicina e controles	62
Figura 20 – Imagens representativas do teste clonogênico, com as	64

colônias analisadas após tratamento com SCM, doxorrubicina e controles

Figura 21 – Fotomicrografias dos esferoides nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas	65
Figura 22 – Área do esferoide de acordo com tratamento	66
Figura 23 – Fotomicrografia dos esferoides sob ação de SBP (coloração azul de tripan)	67
Figura 24 – Fotomicrografia dos esferoides sob ação de SCM (coloração azul de tripan)	68
Figura 25 – Fotomicrografia dos esferoides após tratamento com SBP (coloração LA/BE)	69
Figura 26 – Fotomicrografia dos esferoides após tratamento com SCM (coloração LA/BE)	71
Figura 27 – Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes após tratamento dos esferoides com SBP	74
Figura 28 – Estrutura química de flavonoides	74
Figura 29 – Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes após tratamento dos esferoides com SCM	76
Figura 30 – Ação de SBP sobre o ciclo celular de MCF-7	78
Figura 31 – Ação de SCM sobre o ciclo celular de MCF-7	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antiproliferativa das amostras SBP e SCM nos tempos 24 e 48 horas, expressa em GI50 ($\mu\text{g/ml}$)	46
Tabela 2 – Atividade antiproliferativa após exposição a HepG2	51
Tabela 3 – Atividade antiproliferativa de compostos associados a doxorubicina	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Célsius
µL	Microlitro
µg	Micrograma
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAT	Catalase
CO ₂	Gás carbônico
CP	Controle Positivo
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalila
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO(s)	Espécie(s) Reativas de Oxigênio
Fase G _n	Fase GAP
Hep G2	Célula epitelial de carcinoma hepatocelular humano
HFF-1	Fibroblasto humano
GI	<i>Growth Inhibition</i> (Inibição de Crescimento)
GI ₅₀	Inibição de crescimento de 50% da população
INQUI/UFMS	Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
IPP	Pirofosfato de IsoPentenila
IS	Índice de Seletividade
LA/BE	Laranja de Acridina/Brometo de Etídio
MCF-7	Célula epitelial de adenocarcinoma de glândula mamaria humana
MEP	MetilEritritol Fosfato
mL	Mililitros
mg	Miligramas
mM	Micromolar
nm	Nanômetros
N.C.I.	<i>National Cancer Institute</i> dos Estados Unidos da América
P.A.	Pró-análise

R.P.M.	Rotação Por Minuto
S.F.B.	Soro Fetal Bovino
SBP	Substância isolada da própolis negra
SCM	Substância isolada da <i>Combretum mellifluum</i>
SOD	Superóxido dismutase
SRB	Sulforodamina B
TBARS	Substâncias que reagem com Ácido TilBarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Câncer: Definição, epidemiologia, tipos e etiologia	3
2.2. Metástase	6
2.2.1. Mamas – anatomia e fisiopatologia.....	6
2.2.2. Tratamentos e desafios.....	9
2.3. Produtos Naturais	11
2.3.1. Metabólitos secundários.....	12
2.3.1.1. Terpenos.....	12
2.3.1.2. Fenóis	13
2.3.1.3. Alcaloides.....	14
2.3.1.4. Glicosídeos	14
2.4. Produtos naturais com potencial farmacológico	15
2.4.1. Própolis.....	15
2.4.2. <i>Combretum mellifluum</i>	17
2.5. Cultura Celular como de modelo atividade biológica e toxicidade.....	17
2.5.1. Cultura celular primária	17
2.5.2. Cultura celular imortalizada.....	18
2.5.3. Modelos de cultivo celular	19
2.6. Características moleculares	21
2.6.1. Ciclo celular e resíduos metabólicos	21
2.6.1.1. Intérfase	22
2.6.1.1.1. Fase G1	22
2.6.1.1.2. Fase S.....	23
2.6.1.1.3. Fase G2	23
2.6.1.1.4. Fase Mitótica (Fase M) e Citocinese	23
2.6.2. Espécies Reativas de Oxigênio	24
2.6.2.1. Via endógena	24
2.6.2.2. Via exógena.....	27
2.6.3. Defesas antioxidantes	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31

4.1. Obtenção dos isolados	31
4.2. Preparação das amostragens	33
4.3. Ensaio celulares <i>in vitro</i>	33
4.3.1. Linhagens utilizadas	33
4.3.2. Descongelamento e repique celular	34
4.3.3. Ensaio em modelo 2D	35
4.3.3.1. Atividade antiproliferativa por Sulforrodamina B (SRB)- 24 e 48h	35
4.3.3.2. Citotoxicidade após exposição à HepG2	37
4.3.3.3. Associação ao quimioterápico doxorubicina	38
4.3.3.4. Migração celular	38
4.3.3.5. Ensaio clonogênico	39
4.3.4. Ensaio em modelo 3D	40
4.3.5. Estresse oxidativo	41
4.3.5.1. Marcador de dano oxidativo	42
4.3.5.1.1. TBARS – Substância que reagem ao ácido tiobarbitúrico	42
4.3.5.2. Defesas antioxidantes enzimáticas	42
4.3.5.2.1. Catalase	42
4.3.5.2.2. SOD – Superóxido dismutase	43
4.3.6. Ciclo Celular	43
4.3.7. Análise de dados	44
4.3.7.1. GI ₅₀	44
4.3.7.2. Índice de Seletividade (adaptado de Suffness & Pezzuto, 1990)	45
4.3.7.3. Análise estatística	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Citotoxicidade	46
5.1.1. Ensaio de citotoxicidade 24 e 48 horas	46
5.1.2. Metabolismo hepático HepG2	50
5.1.3. Sensibilização celular	53
5.2. Migração celular (via <i>scratch assay</i>)	57
5.2.1. SBP	58
5.2.2. SCM	60
5.3. Ensaio Clonogênico	61
5.3.1. SBP	61
5.3.2. SCM	63
5.4. Esferoides	65

5.4.1. Formação dos esferoides.....	65
5.4.2. Área dos esferoides.....	65
5.4.3. Azul de Tripán.....	67
5.4.4. Laranja de Acridina/Brometo de Etídio (LA/BE)	68
5.4.4.1. SBP	69
5.4.4.2. SCM	71
5.6. Avaliação do ciclo celular	76
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer de maior incidência no mundo. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama feminino ocupa a primeira posição de mais frequente em todas as regiões brasileiras. Segundo as estatísticas da Organização Mundial da Saúde estima-se que mais de 2.770.000 pessoas desenvolverão câncer de mama em todo o mundo até o ano de 2040. Isso significa 700.000 pessoas, no mínimo, a mais do que foi detectado em 2018, ano em que o número de casos foram cerca de 2.000.000. No Brasil mais de 60 mil novos casos de câncer de mama ocorrerão anualmente no triênio de 2020 - 2022 (INCA, 2019; Siegel *et al.*, 2021).

Considerando a incidência do câncer de mama, embora existam terapias que possam ser utilizadas de forma (neo)adjuvante, como radioterapia, imunoterápicos e remoção do tumor por cirurgia, a quimioterapia ainda é a mais utilizada como tratamento, constituindo o principal pilar na condução da patologia (Sledge *et al.*, 2014).

Mesmo com os intensos efeitos colaterais dos quimioterápicos eles continuam em uso clínico pela sua eficácia. Em geral são utilizados em protocolos de combinação ou politerapia. Este esquema é interessante para reduzir a dosagem dos medicamentos, diminuindo os efeitos colaterais, diminuindo a resistência medicamentosa e alcançando maior eficácia nas subpopulações do tumor (Sledge *et al.*, 2014).

Para o desenvolvimento e obtenção de compostos que possam funcionar como suplementação aos tratamentos medicamentosos e adjuvantes já existentes, é possível recorrer ao potencial terapêutico de substâncias encontradas na natureza (Lin *et al.*, 2020).

No contexto deste estudo, após a avaliação de extratos, fases e substâncias isoladas da própolis negra e *Combretum mellifluum*, foi selecionada uma substância de cada fonte natural para ser estudada *in vitro* como suplementação à terapia de combate ao câncer de mama.

A própolis, de forma abrangente, possui rica atividade citotóxica e antimicrobiana devido à diversidade de estruturas químicas encontradas em sua composição, incluindo a presença de flavonoides e outros compostos fenólicos

(Romero *et al.*, 2019; Seyhan *et al.*, 2019; Daikh *et al.*, 2020). Destaca-se o fato que a atual pesquisa trabalhou com substância inédita obtida a partir da própolis negra.

A *Combretum mellifluum* possui os nomes populares como jacarezinho, cipó, cipó-vermelho, dentre outros, pertence ao gênero *Combretum*, e a importância do estudo da espécie *C. mellifluum* está no fato de que o próprio gênero (*Combretum* sp.) apresenta resultados promissores, como antimicrobianos, antileishmania e antioxidantes. Essas atividades são devidas a compostos como triterpenos e flavonoides (Pettit *et al.*, 1987; Mogashoa *et al.*, 2019; Oluyemi *et al.*, 2020).

Portanto, o foco desta pesquisa foi investigar a atividade antiproliferativa e os efeitos no ciclo celular de compostos derivados da própolis negra e do *Combretum Mellifluum* em cultura de células de câncer de mama MCF-7 nos modelos 2D e 3D quando associados, ou não, ao quimioterápico doxorubicina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer: Definição, epidemiologia, tipos e etiologia

Embora a palavra câncer seja comumente utilizada para referir-se à patologias associadas ao crescimento celular desordenado, este é, na verdade, um conjunto de doenças neoplásicas malignas, capaz de originar-se em todo e qualquer tecido do corpo humano (Strayer, 2015).

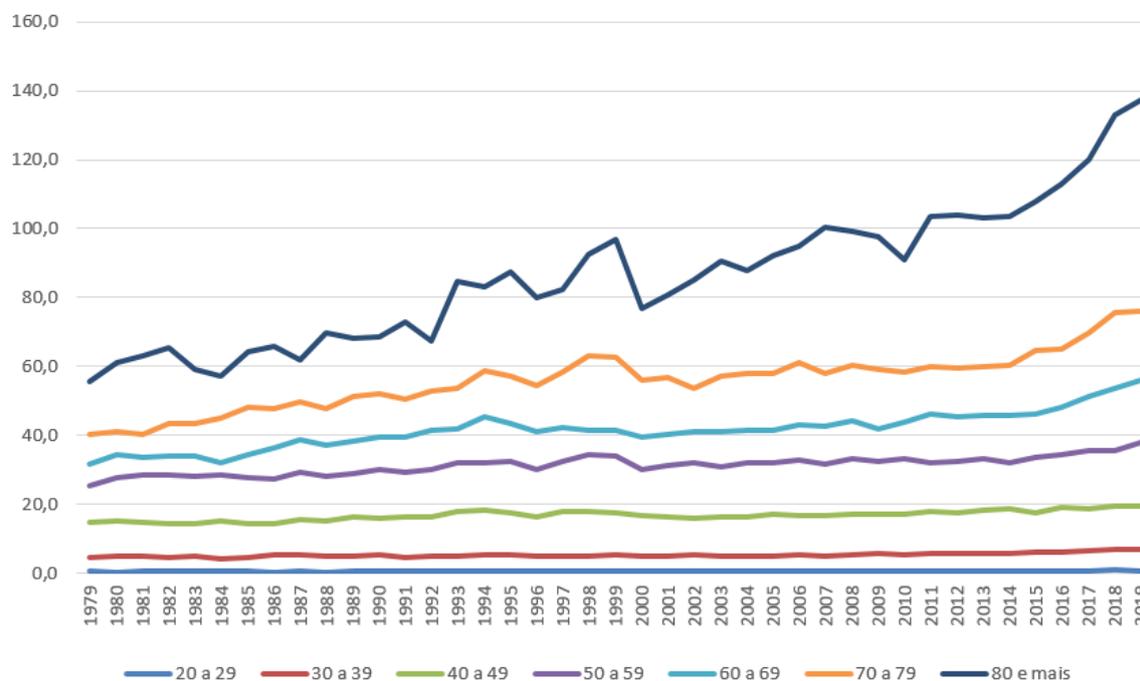
De acordo com as estatísticas do Instituto Nacional do Câncer, em conjunto com a Organização Mundial de Saúde, estima-se que, no Brasil, mais de 60 mil novos casos de câncer ocorrerão anualmente entre 2020 até 2022. No topo da lista de ocorrências, em uma população mista de homens e mulheres, está o câncer de pele não melanoma, seguido sequencialmente, em ordem decrescente, pelo câncer de mama, próstata, cólon e reto, pulmão e estômago (INCA, 2020).

Conforme estatísticas o câncer de mama é classificado como o tipo de câncer com maior incidência em mulheres, atrás apenas do câncer de pele do tipo não-melanoma (INCA, 2019) sendo tópico de relevância para estudo.

Estudos epidemiológicos demonstram alta taxa de mortalidade causada pelo câncer de mama. Em 2015 foram registrados 13,68 óbitos/100 mil mulheres. Já em 2019 tem-se uma taxa de mortalidade por câncer de mama, ajustada pela população mundial, de 14,23 óbitos/100.000 mulheres. Esses índices indicam que o câncer de mama e sua respectiva mortalidade ocupam o primeiro lugar no país, representando 16,1% do total de óbitos (FEMAMA, 2019; INCA, 2019).

A partir dos 40 anos há aumento na incidência do câncer de mama, bem como da mortalidade (Figura 1) (INCA, 2019).

Figura 1 – Taxas de mortalidade por câncer de mama



Fonte: << <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude> >> Taxas de mortalidade por câncer de mama feminina, específicas por faixas etárias, por 100.000 mulheres. Brasil, 1979 a 2019. Acesso em 20 de Abril de 2021.

A classificação histológica remete ao tipo de neoplasia. Quando originado em tecido epitelial é denominado de carcinoma, podendo atingir as células epiteliais basais da pele originando o carcinoma de células basal ou então originar o carcinoma de célula escamosa quando a alteração é advinda do tecido epitelial escamoso. De forma geral, os carcinomas são os tipos mais comum de câncer. As células epiteliais estão presentes no revestimento interno e externo de órgãos, e são de variados tipos, o que leva à uma subclassificação destes carcinomas (Strayer, 2015; Bogliolo, 2016).

Células epiteliais responsáveis pela produção de muco ou fluídos originam os adenocarcinomas. Majoritariamente os adenocarcinomas são predominantes em órgãos como mama, cólon e próstata. (Alam & Ratner, 2001; Rubin *et al.*, 2005; Strayer, 2015).

Se o tecido originário for conjuntivo, tal como músculo e ossos, o termo adequado é sarcoma. (Ottaviani & Jaffe, 2009; Strayer, 2015).

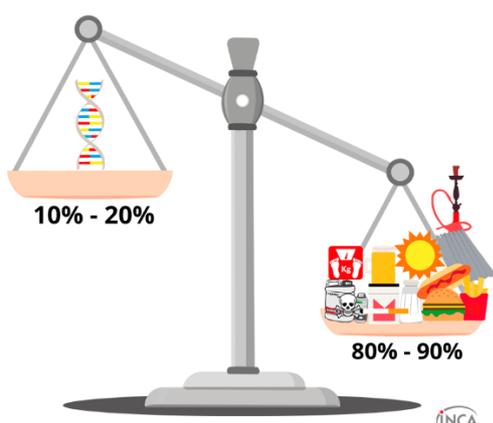
Há ainda as neoplasias de células sanguíneas. Linfomas são aqueles que se iniciam nos linfócitos (do tipo B ou T), e por consequência afetam os linfonodos resultando em inchaço dos nódulos linfáticos. (Frigyesi, 2014; Strayer, 2015; Satou *et al.*, 2019)

Outro tipo de câncer que pode atingir não somente os glóbulos brancos, mas também os vermelhos e plaquetas é a leucemia. Subdividida em diversos tipos, é o câncer que atinge o sangue e medula óssea. A característica principal é que não há a formação de tumor sólido, mas sim desenvolvimento anormal das células sanguíneas, podendo ser aguda ou crônica e do tipo linfoide ou mieloide (Strayer, 2015; Bain, 2017).

Quanto a etiologia destas alterações pode-se afirmar que são complexas, percorrendo os fatores intrínsecos e extrínsecos (Figura 2).

O fator intrínseco refere-se à genética do indivíduo, o predispondo a desenvolver alguma patologia. Porém a expressão deste fator intrínseco é dependente de fatores ambientais. Tem-se como fatores externos o hábito de vida (fumo, sedentarismo e alimentação), idade e exposição à fatores de risco (metais pesados e poluição). Todos estes são gatilhos para perda da função fisiológica celular levando à disrupção do ciclo celular. (Cairns, 1975; Correa *et al.*, 1983; Murnane *et al.*, 2015; Strayer, 2015; Bogliolo, 2016).

Figura 2 – Fatores intrínsecos e extrínsecos



Fatores intrínsecos (10% - 20%) e extrínsecos (80% - 90%) no desenvolvimento de câncer. **Fonte:** <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-cao-causa-cancer>

Por fim, é possível abordar a temática de câncer em relação à capacidade da invasão de células neoplásicas a outros órgãos, próximos ou não, do órgão de origem. Essa capacidade de migração e invasão é denominada metástase.

2.2. Metástase

Para que ocorra a metástase é necessário que o tumor primário receba aporte nutricional o qual é fornecido a partir dos novos vasos sanguíneos criados (angiogênese) exatamente para nutrir o tumor. Portanto em dado momento, o tumor se torna tão complexo que passa a ser permeado e irrigado por diversos vasos sanguíneos garantindo seu desenvolvimento (Meyer & Hart, 1998; Mego *et al.*, 2010).

É nesta etapa de grande irrigação sanguínea tumoral que as células mais agressivas desenvolvem a capacidade invasiva. A partir do momento que as células conseguem atingir a corrente sanguínea, ou até mesmo os vasos linfáticos adjacentes, elas ganham a capacidade de atingir qualquer outro órgão, mesmo que este esteja saudável (Meyer & Hart, 1998; Mego *et al.*, 2010).

Estas células são transportadas primeiramente até o coração e a partir de então tendem a migrar para o pulmão através das artérias pulmonares (Morgan-Parkes 1995, Meyer & Hart, 1998).

2.2.1. Mamas – anatomia e fisiopatologia

O ser humano, homem ou mulher, possui duas mamas localizada na região torácica superior, e, nas mulheres, sua principal função é a produção do leite (Guyton *et al.*, 2006; Moore, Dalley, Agur, 2014).

O órgão se liga ao corpo através de músculos que os prendem as costelas. Externamente à mama é possível visualizar pele íntegra, e bem a frente as aréolas, de coloração diferente da pele que recobre o restante do corpo. Bem ao centro da aréola, localiza-se o mamilo, que é a região onde os ductos lactíferos desembocam (Moore, Dalley, Agur, 2014).

Os tecidos que compõe a mama são o epitelial glandular, conjuntivo, adiposo e glandular. Compondo o tecido glandular há os lobos e cada lobo é constituído por lóbulos, que por sua vez são formados por ácinos. Essa região é onde há produção

de leite, que é direcionado ao mamilo através dos ductos ou canais lactíferos. Os tecidos são irrigados pela veia e aorta torácica interna (Figura 3). (Gartner, 2007).

Localizado por todo o órgão, encontram-se vasos linfáticos que são responsáveis por realizar a drenagem. Esses vasos, que contém pequenos lóbulos, são responsáveis por manter o equilíbrio homeostáticos, bem como auxiliar no processo de imunidade e conectam-se diretamente aos vasos linfáticos subaxilares (Guyton *et al.*, 2006; Moore, Dalley, Agur, 2014).

Figura 3 – Anatomia da mama e comprometimento celular

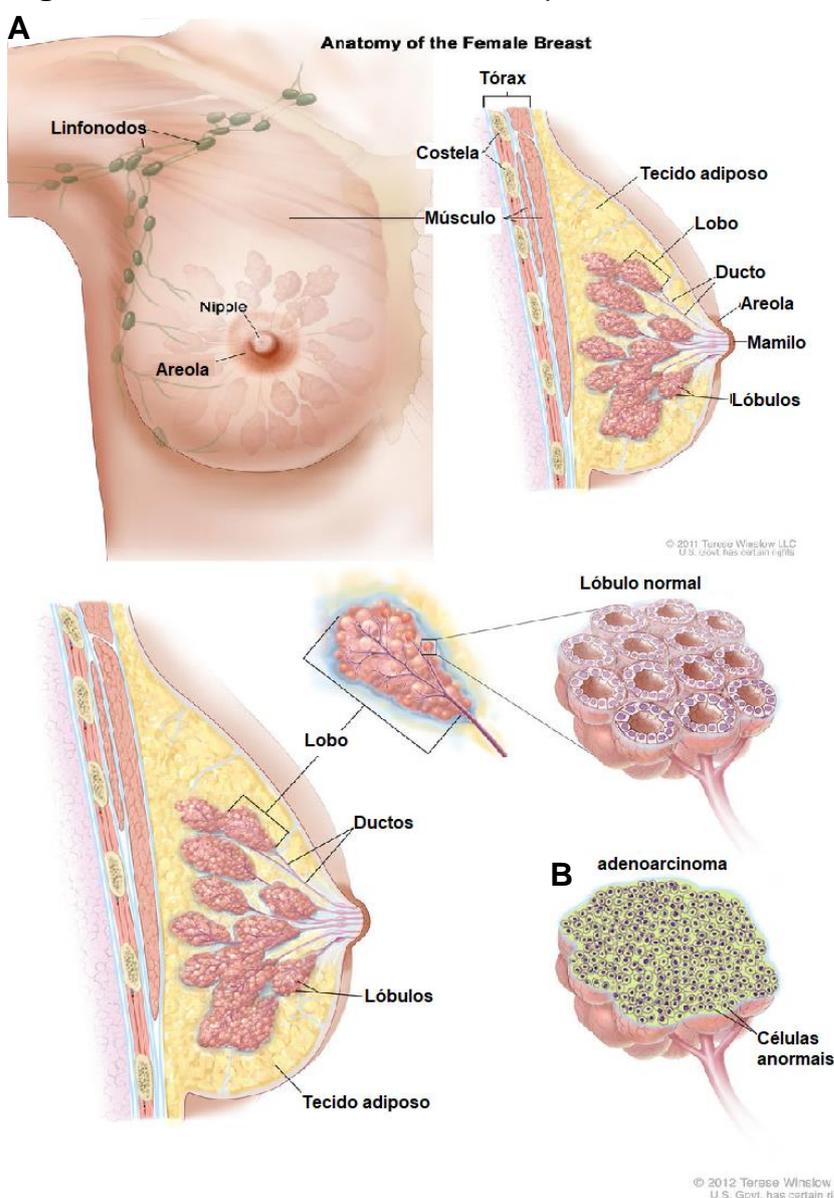


Ilustração esquematizando a anatomia da mama, iniciando com os aspectos externos do órgão seguindo para o detalhamento da anatomia interna, percorrendo toda a estrutura de lobos, ductos e

tecidos. Por fim ilustração de um lobo mamário com aspecto saudável (A) e outro acometido por adenocarcinoma (B). **Fonte:** Adaptado de Terese Winslow, LLC; *Medical and Scientific Illustration*.

Uma vez determinado o tipo de neoplásica mamária existe a possibilidade de seguir três caminhos a depender do momento clínico da paciente: Prevenção, diagnóstico/tratamento e por fim, prognóstico.

Iniciando com a prevenção, mais importante do que atuar no tratamento do câncer é encontrar maneiras de evitá-lo ou ao menos realizar a detecção precoce, de forma a melhorar o prognóstico. Desta forma existem alguns marcadores genéticos que auxiliam o clínico no manejo do paciente.

A nível de prevenção, é possível citar os genes BRCA 1 e 2 que são genes que todo ser humano possui e sua principal função é agir como supressores tumorais (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995).

Embora não sejam específicos para neoplasias de mama, é possível inferir que quando há a presença de alteração nestes genes, o risco para desenvolvimento de tumor é maior (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995).

Outra maneira de atuar preventivamente é a realização de exames de imagem como mamografia e ressonância magnética, associados também com o autoexame (exame de toque da mama) (INCA, 2020).

Em sequência, uma vez estabelecido o diagnóstico de câncer de mama, é importante caracterizá-los quanto a capacidade invasiva e ao fenótipo via expressão de receptores, pois estas informações guiam a terapia.

Quanto a sua origem, pode ser nos ductos lactíferos ou nos lobos, sendo as denominações adenocarcinoma ductal invasivo, adenocarcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular invasivo e carcinoma lobular *in situ*. Mais raramente, quando se origina no tecido conjuntivo dos seios, denomina-se doença de paget (Bland *et al.*, 2009).

Quanto à caracterização histoquímica da célula, há os receptores: de estrogênio (RE), de progesterona (RP) e negativos para amplificação ou superexpressão de HER2 (receptor epidérmico humano tipo 2).

A presença ou ausência destes receptores tem influência quanto ao tratamento de escolha e ao prognóstico. Assim sendo, pacientes que apresentam positividade para receptor de estrogênio (RE) ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação ou superexpressão de HER2 (receptor epidérmico

humano tipo 2) conseguem utilizar de forma benéfica os fármacos tamoxifeno e inibidores de aromatase (hormonioterapia) que são antiestrogênio, inibindo o crescimento tumoral que necessita do hormônio (Bland et al.,2009; Sotiriou & Pusztai, 2009).

Quando há superexpressão de HER2 opta-se pela terapia alvo utilizando trastuzumabe e terapia com inibidores de tirosina quinase (lapatinibe) (Bland et al.,2009; Sotiriou & Pusztai, 2009).

O pior prognóstico ocorre em pacientes que não expressam receptores de estrógeno, progesterona e HER2, conhecidos como triplo negativo, pois as chances de tratamento reduzem drasticamente, juntamente com a sobrevida da paciente (Bland et al.,2009; Sotiriou & Pusztai, 2009).

Por fim, existe a necessidade de realizar o acompanhamento após terapia da paciente, para que seja desenhando o possível prognóstico. Além da clínica, existem marcadores tumorais que auxiliam nesta avaliação. Embora existam outros marcadores, que nem sempre são específicos, o principal na situação de câncer de mama é o CA 15.3, justamente pela sua excelência no quesito especificidade e sensibilidade (De Almeida et al., 2007).

CA 15.3 é uma glicoproteína produzida nas células epiteliais glandulares da mama e tendem a ter seus níveis elevados na corrente sanguínea em pacientes em estadiamento avançado da doença, incluso processo metastáticos. Sendo assim, uma vez estabelecida a terapia, sua dosagem faz-se necessária para acompanhar a resposta do organismo frente ao tratamento (De Almeida et al., 2007).

Existem outros acometimentos da mama, tais como cistos mamários, fibroadenoma, hiperplasia dos seios, calcificação das mamas, mastite dentre outros, porém são classificados como neoplasias benignas, e possuem alta possibilidade de cura (Bland et al.,2009).

2.2.2. Tratamentos e desafios

Pelo fato de os seios serem acometidos tanto por distúrbios malignos quanto benignos é importante que, ao surgir qualquer situação anormal, haja a investigação para diagnóstico.

Os primeiros exames a serem realizados são ultrassonografia de mama e mamografia. A presença de alterações leva a/o paciente a realização de biópsia

para confirmação e diagnóstico. Em algumas situações, a fim de complementar exames de imagem associa-se o exame de ressonância magnética (FEBRASGO, 2017).

Os tratamentos atuais incluem a cirurgia, usualmente utilizada em situações em que o câncer não disseminou para outros tecidos, podendo haver a retirada apenas do tecido afetado ou até mesmo da mama por inteiro, porém tal tratamento implica dentre alguns “efeitos” a baixa de auto-estima (Bland *et al.*,2009).

A radioterapia, em geral indicado para pacientes que já realizaram a cirurgia, consiste na aplicação de radiação no seio para inibir o crescimento de células que possam ter restado no tecido mesmo após a cirurgia (Bland *et al.*,2009; Sedlmayer *et al.*, 2013).

E há também a quimioterapia, que traz consigo, efeitos colaterais, especialmente pelo fato de que quimioterápicos não possuem especificidade para celular cancerígenas apenas (Bland *et al.*,2009; Hassan *et al.*, 2010).

A quimioterapia pode ser indicada como adjuvante, para paciente que passaram pela cirurgia, como neoadjuvante, a ser realizada antes do processo cirúrgico e como terapia principal em casos de metástase (Kennedy, 1965; Bland *et al.*,2009).

Outras opções farmacológicas além da quimioterapia é a hormonioterapia e a terapia alvo, esta última utilizando anticorpos com especificidade as células danosas, reduzindo assim efeitos colaterais por não atingirem de forma agressiva os tecidos saudáveis (Bland *et al.*,2009).

Os protocolos de tratamento são estabelecidos por cada serviço de saúde, porém os medicamentos comumente utilizados na quimioterapia são doxorrubicina, ciclofosfamida e paclitaxel, docetaxel, metotrexato, tamoxifeno, fluoruracila, transtuzumabe, pertuzumabe, carboplatina, capecitabina, vinorelbina e gencitabina (Rang, 2001; Bland *et al.*,2009).

Em algumas situações como em tumores que não expressam receptores hormonais e o HER-2 (também chamados de tumores triplo-negativos) ou em tumores com mutação dos genes BRCA1 ou BRCA2, pode ser utilizada a carboplatina. Esquemas de tratamentos mais antigos incluem medicamentos como metotrexato e 5-fluoruracila, ainda usados em casos selecionados (Pritchard *et al.*, 2006; Bland *et al.*,2009).

Uma alternativa para pacientes triplo-negativos é a imunoterapia. Essa opção de tratamento consiste em terapias-alvo utilizando medicamentos como trastuzumabe e pertuzumabe. Além disso é possível realizar o tratamento com imunoconjugados ao combinar imunoterápicos com quimioterápicos (trastuzumabe-entansina). Essa opção é usualmente utilizada em pacientes com sobre-expressão de HER2 (FEMAMA, 2018).

Diante da dificuldade e agressividade dos tratamentos, é importante que haja a continua pesquisa em busca de substâncias que possam contribuir positivamente com o prognóstico e tratamentos já existentes, mesmo que a nível de suplementação.

2.3. Produtos Naturais

Historicamente, a sociedade busca na natureza a cura para suas enfermidades. Através do conhecimento etnobotânico é possível evidenciar a utilização de plantas no tratamento de doenças, sendo que cada povo e grupo traz consigo tradições e crenças acerca de produtos derivados da natureza (Maciel, 2002).

Portanto, com o conhecimento disseminado de pessoa a pessoa, e relatos de possíveis curas pelo uso de produtos naturais, a ciência e a pesquisa vestem-se de essencialidade para que a informação tida como algo cultural e informal, possa se valer de seriedade técnica, e foi com Richard Evans Schultes, pioneiro no estudo de plantas de utilização popular, que a temática juntou-se à ciência (Schultes, 1962).

Seja através de microrganismos, plantas ou animais, há uma variedade de medicamentos de utilização na prática clínica que se originaram direta ou indiretamente da natureza. Alguns medicamentos utilizados na quimioterapia, que possuem origem em plantas, com mecanismos de ação variados, são os alcaloides da vinca (vincristina, vimblastina, vinorelbina), os taxanos (paclitaxel e docetaxel), os derivados de campotecina (topotecan e irinotecan) e os derivados de epipodofilotoxinas (etoposídeo e teniposídeo) (Da Rocha *et al.*, 2001; Brandão *et al.*, 2010; Prakash *et al.*, 2013).

Alguns fatores do bioma influenciam para que os organismos vivos sejam fonte de agentes farmacológicos, tais como fatores climáticos, nutricionais, protetivos e reprodutivos. Vegetais e outros organismos vivos, possuem complexo

sistema metabólico, e fruto desse metabolismo são os metabólitos que podem ser classificados em primários e secundários (Kabera *et al.*,2014)

Tido como metabólitos primários, compõe este grupo os carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e orgânicos, que estão envolvidos diretamente e essencialmente no crescimento, desenvolvimento, respiração e síntese de proteínas (Hounscome, 2008).

Existem também os metabólitos secundários, que são usualmente os principais fornecedores de compostos ativos com atividade farmacológica.

2.3.1. Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são compostos orgânicos que possuem a função de auxiliar no crescimento, desenvolvimento, reprodução e defesa contra o ambiente externo. O conteúdo de metabólito secundário é variável conforme o contexto em que o organismo vivo está inserido. Isso significa que a mesma espécie que se desenvolva em condições nutricionais e climáticas diferentes terá diferença quanto ao seu conteúdo de metabólitos secundários (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Pagare *et al.*, 2015).

Estes metabólitos podem ser classificados de acordo com características químicas, e são assim diferenciados em variadas classes. A seguir serão abordados os grupos majoritários de metabólitos secundários.

Chama-se atenção para o grupo de terpenos e flavonoides, grupos estes aos quais as substâncias utilizadas no projeto pertencem.

2.3.1.1. Terpenos

A unidade básica que compõe os terpenos é chamada de isopreno e possui a fórmula química de C_5H_8 (Ruzicka, 1953).

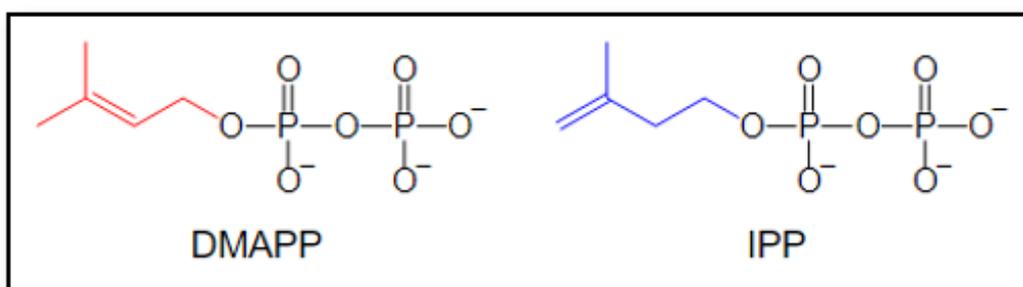
O precursor desta unidade, através da via do mevalonato, é o ácido mevalônico, o qual é originado a partir da reação de duas unidades de acetil-CoA entre si. Outro precursor possível é o metileritritol fosfato (MEP), oriundo de unidades de piruvato e gliceraldeído-3P (Ruzicka, 1953; Dewick, 2002).

O produto, independente do precursor, é constituído por um esqueleto básico de 5 carbonos, que em configurações diferentes podem se apresentar como

pirofosfato de isopentenila (IPP) e como pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (Dewick, 2002).

Estas duas unidades de 5 carbonos podem reagir entre si e dar início a terpenos de maior complexidade, como por exemplo os monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos), triterpenos (30 carbonos) e até mesmo politerpenos com mais de 40 carbonos em sua estrutura (Dewick, 2002).

Figura 4 – Estrutura DMAPP e IPP



Estruturas químicas dos precursores DMAPP e IPP **Fonte:** Adaptado Dewick, 2002.

Possui importância farmacológica, pois compostos químicos desta classe já possuem conhecida atividade biológica, tal como anticancerígenos, antioxidantes, antibacteriano (Cox-Georgian *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2019)

2.3.1.2. Fenóis

Estruturas caracterizadas pela presença de ao menos um anel aromático ligado à uma ou mais hidroxilas (OH). Os fenóis são abundantes e por isso subdividem-se em classes, a depender da complexidade de sua estrutura (Dewick, 2002).

A via de formação dos fenóis depende da classe à qual o referido isolado pertence. Algumas das classes mais usuais são:

- **Flavonóides**

Polifenóis, com esqueleto básico composto pela ligação de C₆-C₃-C₆ (um anel aromático C₆ ligado à 3 outros carbonos, que por sua vez liga-se a outro anel aromático C₆). Essa classe é presente em frutas, flores, mel e em vegetais, e com comprovada ação antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatório e anticancerígena

(Dewick, 2002; Escobar *et al.*, 2019; Maleki *et al.*, 2019; Sankaranarayanan,*et al.*, 2019).

Sua rota biossintética, de forma simplificada, chama-se de mista, variando entre a via do chiquimato e via do acetato. A primeira originando o ácido cinâmico e derivados, contendo a estrutura básica de C_6C_3 . A segunda via, por sua vez, origina os tricetídeos, composto também por 6 átomos de carbono. Quando estes dois produtos reagem, formam uma estrutura básica contendo 15 carbonos, chamada chalcona, a qual é a precursora da classe dos flavonoides (Dewick, 2002).

- **Lignanas e Neolignanas**

Possuem como estrutura básica o esqueleto $(C_6C_3)_2$ e estão presentes em grãos, sementes e no vinho. Trata-se de polifenóis, cuja rota biossintética também envolve a via mista (Dewick, 2002).

Outras classes de fenóis, para menção, são as xantonas, estilbenos, antraquinonas, dentre alguns outros (Dewick, 2002).

2.3.1.3. Alcaloides

Possuem como característica a presença do átomo de nitrogênio. Podem ser classificados em alcaloides heterocíclicos e não heterocíclicos (Dewick, 2002).

Os precursores da maioria dos alcaloides são os aminoácidos e as rotas envolvidas são diversos e nem todas completamente elucidadas. O que se sabe é que há envolvimento de uma base de Schiff e do mecanismo de Mannich (Dewick, 2002).

Amplamente estudados, principalmente pelo potencial anticancerígeno, tem por destaque na medicina, como produto desta classe, os antineoplásicos vincristina e vimblastina e os analgésicos morfina e codeína (Da Rocha *et al.*, 2001; Brandão *et al.*, 2010; Prakash *et al.*, 2013).

2.3.1.4. Glicosídeos

Composta por açúcares ligados à grupos funcionais via ligação glicosídica. As ligações podem ser via Oxigênio, Nitrogênio (glicosaminas), Sulfato e o próprio Carbono (Dewick, 2002).

Pela variedade de compostos de origem natural, uma vertente em crescimento é a associação destes, usualmente *in natura*, através de folhas, raízes e/ou frutos, junto aos medicamentos já estabelecidos para terapias.

É importante atentar-se, no entanto, que a associação pode ser benéfica, auxiliando direta ou indiretamente no prognóstico; pode ser dispensável, pois não interfere em nada na terapia principal, e pode até mesmo tratar-se de uma associação prejudicial ao paciente, inibindo a ação do medicamento principal, ou trazendo interações indesejáveis (Frión-Herrera *et al.*, 2019; Negrette-Guzman, 2019; Simonetti, *et al.*, 2019).

Dentro deste propósito, o trabalho enfoca em duas substâncias puras obtidas de duas fontes distintas:

2.4. Produtos naturais com potencial farmacológico

2.4.1. Própolis

Popularmente conhecido como própolis (derivado da língua Grega, significando defesa (pró) da cidade (polis)) o uso dessa substância remonta os tempos desde antes o nascimento de Cristo, justamente pelas ações farmacológicas.

Comumente presente no cotidiano das pessoas, algumas de suas funções descritas são cicatrizantes e anti-inflamatórias. De origem animal, a própolis é uma resina obtida a partir da coleta substâncias produzidas pelas plantas (materiais lipofílicos, látex, gomas, resinas, compostos balsâmicos) de partes diversificadas de plantas (brotos, flores e exsudatos), misturados ao pólen, cera e saliva da abelha (Marcucci, 1995; Peña, 2008).

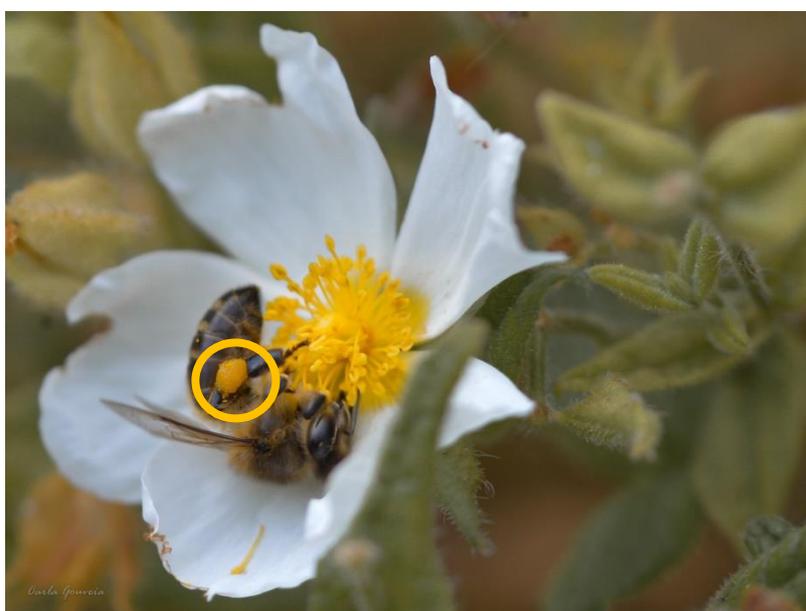
Estudos apontam que própolis possui rica atividade citotóxica, antimicrobiana dentre outras, que o torna um composto válido a ser estudado, principalmente pela variabilidade da composição química, como a presença de flavonoides e outros compostos fenólicos com atividade biológica (Romero *et al.*, 2019; Seyhan *et al.*, 2019; Daikh *et al.*, 2020).

Para as abelhas, a própolis é utilizada como forma de preservação da colmeia. Por ser um produto tido como limpo, é capaz de manter íntegras as paredes, evita invasão de outros insetos ou microrganismos, e caso exista algum organismo morto que as abelhas não consigam retirar da colmeia, elas o envolvem com a própolis para evitar deterioração e consequente contaminação do ambiente.

Nem todas as abelhas, da própria espécie, são responsáveis pela produção e transporte da resina. Aquelas que possuem esta função são chamadas de abelhas coletoras.

Estas abelhas utilizam sua mandíbula para raspar a seiva e outras substâncias da planta de forma semelhante a coleta do pólen e utilizando um par de patas, alocam o material coletado numa estrutura anatômica chamada corbícula (também chamado de cesta de pólen).

Figura 5 – Abelha e corbícula



Corbícula circulada em amarelo **Fonte:** Adaptado de <<
<https://www.casadasciencias.org/imagem/9527> >>

Por depender das resinas coletadas no meio ambiente, a composição da própolis varia de região a região e é importante realizar a determinação da origem botânica de cada um para que seja possível aprofundar a investigação quanto aos compostos químicos encontrados (Park, 2002).

Os tipos mais usuais de própolis são: verde, vermelha e marrom. A coloração da própolis é grandemente influenciada por sua fonte botânica, devido ao fato que diferentes espécies de abelhas optam por diferentes plantas para polinização (Huang *et al.*, 2014).

A própolis utilizada na presente pesquisa é referida como própolis negra a qual é mais difícil de ser encontrada quando comparada aos seus pares, tornando desta forma, um trabalho diferenciado.

2.4.2. *Combretum mellifluum*

A importância do estudo desta espécie é o fato de que o gênero em si (*Combretum sp.*) já vem sendo amplamente estudado e com resultados promissores, como antimicrobiano, anti-leishmania e anti-oxidante, para diversas espécies. Tal fato dá-se aos isolados presentes no gênero, como os triterpenos e flavonoides (Pettit *et al.*, 1987; Mogashoa *et al.*, 2019; Oluyemi *et al.*, 2020).

Pertencente ao gênero *Combretum*, a espécie *Combretum mellifluum* é presente em quase todo território brasileiro, incluso o estado de Mato Grosso do Sul. Popularmente conhecida por alguns nomes, sendo Sipaúba, Mofumbo, Jacarezinho, Caatinga-branca, Cipó-mofumbo, Pajaú, e Cipó vermelho, e apresenta-se na forma de arbustos (De Farias *et al.*, 2015; SiBBr, 2019).

A espécie *C. mellifluum* ainda não conta com grande extensão de publicação científica, permitindo desta forma, explorar seu potencial químico e farmacológico (Farias *et al.*, 2015).

2.5. Cultura Celular como de modelo atividade biológica e toxicidade

Foi com Harrison, em 1906, que a ciência da cultura celular se iniciou. Muito se avançou deste então e a cultura celular se tornou uma ferramenta de aplicação muito ampla, pois permite a pesquisa *in vitro* do metabolismo celular, produção de vacinas e anticorpos, produção hormonal, terapia celular, exames laboratoriais e avaliação toxicológicas (Harrison, 1906; Freshney, 2015).

O primeiro passo na pesquisa para desenvolvimento de novos medicamentos, é realizar a análise da atividade biológica *in vitro*. O método se baseia no cultivo das células em ambiente com temperatura e gás carbônico controlado, para que cresçam em condições adequadas (Freshney, 2015).

2.5.1. Cultura celular primária

As células podem ser originadas diretamente de um tecido, sendo chamadas de cultura primária, possuindo características muito similares aos do tecido de origem (Freshney, 2015).

Para obtê-las, o material passa por desfragmentação física e enzimática, é então colocado em substrato (frasco de cultivo) enriquecido com nutriente (meio de cultura) e suplementado (soro fetal bovino e antibiótico).

As células tendem a migrar do tecido para o novo ambiente. As primeiras células a se manterem vivas e se desenvolverem *in vitro* seguirão para as próximas gerações. No entanto, possuem crescimento limitado *in vitro*, não sendo possível mantê-las após algumas divisões celulares. São utilizadas especialmente em processos de terapia celular, ao cultivar células-tronco, e na realização de exames de citogenética a partir de amostragem de sangue ou medula (Pollard, 1997; Howel *et al.*, 2014; Freshney, 2015).

2.5.2. Cultura celular imortalizada

As células primárias, originadas do tecido, que sobreviverem *in vitro* e conseguirem se multiplicar compõe a cultura celular contínua. Carrel, em 1912, foi o responsável por perceber que ao realizar a troca do meio de cultivo, as células passavam a ter tempo de sobrevida maior (Carrel, 1912).

Com a possibilidade de extensão de vida celular, iniciou-se o processo de subcultivo celular. Através do subcultivo, ou repique (transferência das células de um ambiente para outro) é possível favorecer a imortalização celular (Pollard, 1997; Freshney, 2015).

Conforme o aumento do número de gerações, através dos repiques, e o tecido de origem, as células expressam e/ou passam a expressar alterações genéticas que as tornam resistentes às diversas divisões celulares, sendo possível mantê-las em *in vitro* longinquamente. O primeiro tipo celular imortalizado foi obtido, de forma historicamente controversa, do tecido tumoral da cérvix uterina de uma paciente chamada Henrietta Lacks, batizada de HeLa (Masters, 2002; Freshney, 2015).

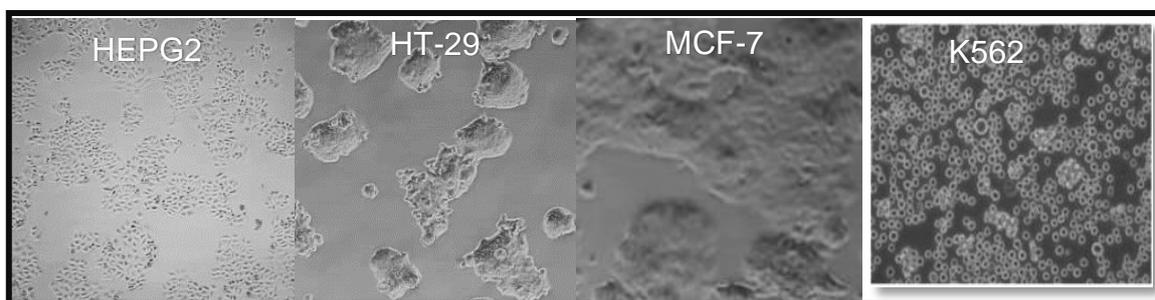
As culturas imortalizadas tendem ser uma escolha inteligente quando se refere à realização de painéis de citotoxicidade, avaliação de processos controlados, como resposta imune, produção de anticorpos, avaliação de ciclo celular e correlatos de patógenos (exemplo: vírus) que dependam de ambiente celular para desenvolvimento. Isto deve-se ao fato de que cada tipo celular imortalizado possui suas características descritas nos bancos de células que as fornecem, sendo a principal referência a ATCC - *American Type Culture Collection*. Algumas destas características são tecido de origem, tipo de paciente-fonte e outros aspectos genéticos e moleculares relevantes.

Independentemente de serem primárias ou secundárias, as células também são classificadas quanto à capacidade de se aderirem ou não ao substrato onde estão sendo cultivadas.

As linhagens celulares aderentes possuem sua origem a partir de tecidos considerados sólidos. *In vitro* dependem de uma superfície de suporte para que possam se desenvolver. Sendo assim, o frasco de cultura que receberá tal tipo de linhagem deve possuir uma camada carregada negativamente (Freshney, 2015). A carga negativa é importante, pois é ela que irá interagir com as proteínas de adesão e proteoglicanos presentes na membrana celular, promovendo a adesão ao fundo do recipiente (Freshney, 2015).

A Figura 6 ilustra quatro tipos diferentes de células humanas aderentes imortalizadas, crescendo em monocamada, sendo: HEPG-2 = hepatocarcinoma; HT-29 = adenocarcinoma de cólon; MCF-7 = adenocarcinoma de mama; K-562 = eritroleucêmica.

Figura 6 – linhagens celulares aderentes e não aderentes



Fonte: autora. Linhagens aderentes: HepG2, HT-29, MCF-7. Linhagem não aderente: K562.

Em contrapartida, as linhagens não aderentes são obtidas de tecido que não precisa de suporte para seu desenvolvimento. Ou seja, são células hematopoiéticas. Por este motivo não necessitam de uma superfície tratada para se desenvolverem *in vitro*. A sobrevivência delas depende da questão nutritiva e de espaço para se desenvolverem (Figura 6) (Freshney, 2015).

2.5.3. Modelos de cultivo celular

A cultura celular pode ser trabalhada de diversas formas, a depender do propósito da pesquisa. A forma mais simples de utilizar as células são em

monocamada (Figura 6), que consistem basicamente em um crescimento bidimensional (2D) das células no recipiente.

Amplamente utilizado para o processo de triagem de avaliação da atividade biológica, possui limitação por não produzir seu próprio ambiente extracelular e desta forma não representar fielmente o ambiente *in vivo* (Ravi *et al.*, 2015; Duval *et al.*, 2017).

Para superar essa barreira, iniciou-se o cultivo celular tridimensional (3D), também chamado de esferoides. Esse modelo consegue mimetizar *in vitro* a relação entre o microambiente e as células de forma mais fiel ao que seria *in vivo* (Mueller-Klieser, 1997; Edmondson *et al.*, 2014; Ravi *et al.*, 2015).

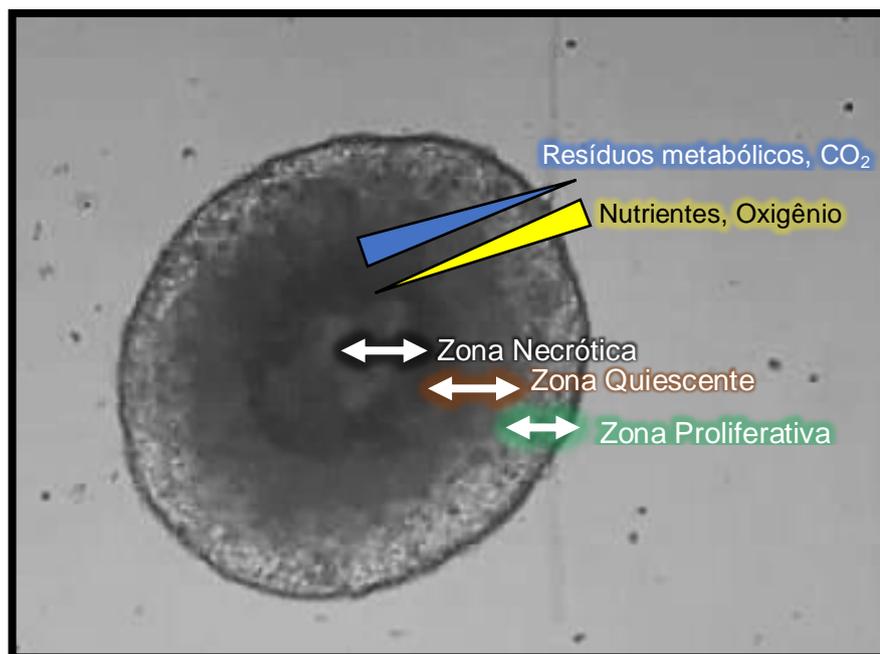
A composição de um esferoide dá-se da seguinte maneira (Figura 6):

De acordo com Edmondson (2014) a camada proliferativa é a camada mais externa, rica em nutrientes do meio e oxigênio. Essa região apresenta contato direto com os compostos, e, portanto, se tornam mais suscetível à morte celular devido à ação destes. *In vivo* é ricamente abastecida devido ao contato próximo a veias e capilares, que alimentam o tumor.

A próxima camada é chamada de quiescente. Nessa região, as células já começam a enfrentar certa privação de oxigênio, e seu ciclo celular não é regular como da região proliferativa.

A camada mais íntima, chamada de zona necrótica, é pobre em oxigênio, rica em resíduos metabólicos, e é a região que apresenta maior desafio de tratamento, seja *in vitro* ou *in vivo* devido à dificuldade de compostos penetrarem nas células. A quantidade que chega às células da zona necrótica muitas vezes é insuficiente e acaba por estimular a resistência celular ao tratamento.

Figura 7 – Zonas celulares e estado nutricional de esferoide *in vitro*



Fonte: autora

A ferramenta de cultura em 3D (Figura 7) é amplamente utilizada devido seu potencial para avaliar o comportamento celular tumoral tanto para tratamento quanto para desenvolvimento tumoral. Algumas utilizações desta ferramenta são avaliação do potencial de penetração de compostos no esferoide, potencial do esferoide invadir outros tecidos e a criação destes próprios tecidos para pesquisas *in vitro* mais avançadas (Ridder *et al.*, 200; Fennema *et al.*, 2013; Priwitaningrum *et al.*,2016).

Unir as técnicas 2D e 3D de cultivo permitem que os resultados obtidos sejam mais similares ao possível resultado *in vivo*, refinando a pesquisa e poupando o uso desnecessário de animais. Uma vez estabelecido o potencial citotóxico, o modelo de cultura celular também permite a investigação de possíveis mecanismos de ação.

2.6. Características moleculares

Um possível mecanismo que leva as células à apoptose é o estresse oxidativo que consiste no desbalanço patológico entre as espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes. Para compreender o processo faz-se necessário a abordagem de conceitos fisiológicos essenciais à vida celular.

2.6.1. Ciclo celular e resíduos metabólicos

O ciclo celular de células eucariontes (que são as que possuem o núcleo celular definido por envoltório como característica principal diferenciando-as de células procariontes) pode ser dividido em interfase, fase mitótica e citocinese.

2.6.1.1. Intérfase

Classificada em fase G1, Fase S e Fase G2.

2.6.1.1.1. Fase G1

Primeira fase da intérfase. Neste período ocorre intensa produção de RNA mensageiro (mRNA) e de proteínas que serão de importância para as fases subsequentes do processo. É, também, durante esse momento que a célula aumenta de tamanho. Um fator determinante para essa etapa é o aporte nutricional presente no meio, temperatura e espaço para crescimento. Usualmente, a temperatura ideal para o desenvolvimento, de células de origem humana, é 37°C (Tyson *et al.*, 2002).

Esta fase tem particular importância pois é nela em que o rumo a ser tomado pela célula será decidido. Existe o caminho para continuar o processo de divisão celular, e por consequência inicia-se a Fase S (síntese), ou a célula pode entrar em estado de “dormência” (Fase G₀) e não se dividir (Tyson *et al.*, 2002)

A regulação no momento de transitoriedade entre Fase G1 e Fase S é delicado. Ocorre basicamente através de duas ciclinas (CDK4/6-cyclin D e CDK2-cyclin E) e um complexo de transcrição. Ao ocorrer a fosforilação das enzimas do complexo de transcrição e das ciclinas ocorre a transcrição de genes de proteínas que permitem o andamento para a fase S (Sherr & Roberts, 1999; Bartek & Lukas, 2001).

Além disso, ocorrem os *checkpoints* que englobam possíveis danos ao DNA (através da expressão de proteínas relativas ao dano deste), presença de fatores de crescimento de células vizinhas e até mesmo a presença de uma matrix extracelular que fornece o suporte necessário para a divisão celular. Qualquer falha nessa regulação, que permita uma célula danificada prosseguir para a Fase S, significa um risco ao equilíbrio do micro-ambiente o qual estas células pertencem, e já existem evidências de que este é um ponto importante na prevenção da proliferação de células cancerígenas (Sancar *et al.*, 2004; Wali *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2011).

2.6.1.1.2. Fase S

Uma vez iniciada a Fase S (Fase de síntese) não há possibilidade de retorno à fase anterior e nem de entrar na fase G_0 , mesmo se não existir todas as condições adequadas para o prosseguimento. Nesta etapa há replicação do material genético do DNA, dos filamentos de cromatina, dos centríolos e síntese de histonas (que são requeridas na produção de nucleossomos, que por sua vez são a unidade básica de DNA em seu formato espiral duplicado). Na Fase S há novos *checkpoints* para verificar a integridade do DNA (Tyson *et al.*, 2002; Bartek *et al.*, 2004; Bertoli *et al.*, 2013).

2.6.1.1.3. Fase G2

O ciclo segue para a *Fase G2*, sendo esta a terceira e última fase da intérfase. Nela, ocorre rápido crescimento celular e síntese proteica, uma vez que antecede o início da mitose (Tyson *et al.*, 2002).

A resposta da célula a um eventual dano ao DNA, neste momento, é através de uma cadeia de sinalização bioquímica. A presença de dano celular (dano este causado via luz ultra-violeta, ação de produtos químicos, estresse oxidativo e até mesmo presença de genes oncogênicos) leva a quebra de um complexo composto pelas proteínas MDM2 e P53 (Maltzman Czyzyk, 1984; Toufektchan & Toledo, 2018).

Uma vez que o P53 se encontra fora do complexo, ou seja, ativado, a célula segue o rumo de conserto ao dano do DNA, para a sua sobrevivência, e entrada na fase mitótica, ou então segue para a morte via apoptose. Estas duas opções ainda não possuem o caminho totalmente elucidado, porém sabe-se que qualquer disfunção nesta proteína (P53) leva ao desequilíbrio do ciclo celular, estando envolvida também no processo cancerígeno (O'Connell *et al.*, 2000; Kurki *et al.*, 2003).

2.6.1.1.4. Fase Mitótica (Fase M) e Citocinese

A etapa subsequente é a Mitótica, que tem período de duração muito rápido, especialmente se comparada à interfase. Característica de células eucarióticas, a mitose é subdividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase (Nicklas, 1971).

Na prófase os fios de cromatina se condensam para a formação de cromossomos. Os cromossomos são compostos por cromátides as quais são classificadas em “braços” curtos e “braços” longos. A conexão de duas cromátides é pelo centrômero e localizado nas extremidades dos braços existem os telômeros que são constituídos de DNA não codificante cuja função é preservar o material genético do cromossomo (Hungerford, 1971; Nicklas, 1971).

Sendo assim, na prófase, microtúbulos se ligam ao centrômero de cada cromossomo, e estes cromossomos, seguindo para a fase de metáfase irão alinhar-se medianamente na célula, em processo denominado placa equatorial. Há o surgimento de linhas do fuso entre os cromossomos. Para análises cromossômicas, esta fase é a ideal (Hungerford, 1971; Nicklas, 1971).

Na anáfase, os centrômeros são rompidos e cada cromátide é separada, migrando para polos opostos da célula. Se houver erro nesta etapa, a célula pode ficar como cromátide a mais em uma situação de Não Disjunção Cromossômica (Hungerford, 1971; Nicklas, 1971; Lamb, 2004).

Por fim, na telófase, as linhas de fuso desaparecem e a célula se reorganiza internamente, descondensando cromossomos, e iniciando, em paralelo, a última etapa do ciclo celular: citocinese. Nesse momento final do ciclo, as duas células filhas são separadas, através da divisão do citoplasma (Hungerford, 1971; Nicklas, 1971).

Como descrito, existe checagem de possíveis danos ao DNA em diversos momentos do ciclo celular, e o dano causado a este pode ser por motivos tais como o estresse oxidativo, tornando-se assim, um possível modo de levar a célula a morte.

2.6.2. Espécies Reativas de Oxigênio

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção as espécies reativas de oxigênio (ERO), radicalares ou não-radicalares, prduzidas por via endógena ou exógena, e as defesas antioxidantes do organismo (Halliwell & Gutteridge, 2007).

2.6.2.1. Via endógena

A respiração aeróbica requer como substrato o oxigênio e são as mitocôndrias as responsáveis por metabolizar os substratos em ATP (adenosina trifosfato) para o consumo energético celular (Ernster & Schatz, 1981).

A mitocôndria é uma organela composta por duas membranas fosfolipídicas. Uma externa, com várias proteínas carregadas energicamente que permitem a passagem de moléculas pela membrana, e outra interna, de forma irregular (crista), que forma uma matriz interna à membrana externa. A irregularidade permite uma maior área de contato das enzimas localizadas na membrana para catalisarem as reações (Ernster & Schatz, 1981).

Os compostos que conseguem atravessar a membrana externa são os carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos. A principal forma de geração de energia é através da glicólise, embora seja possível obter energia através da oxidação de ácidos graxos (Ernster & Schatz, 1981; Chen, 1988).

A glicose, no citoplasma celular, é quebrada em duas moléculas de piruvato, e estes compostos, uma vez dentro da matriz mitocondrial, sob ação do complexo de piruvato desidrogenase é convertido em acetil-CoA, que por sua vez passa pelo Ciclo de Krebs, resultando em duas enzimas de importância, devido a capacidade de carrear elétrons: NADH (Dinucleotídeos de nicotinamida e adenina) e FADH₂ (dinucleotídeo de flavina adenina) (Ernster & Schatz, 1981; Chen, 1988)

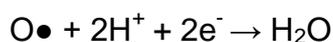
Localizado na membrana interna há a Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) que é composta por vários complexos (NADH redutase, citocromo Q, succinato redutase, citocromo redutase, citocromo C e citocromo oxidase) capazes de realizarem a doação e aceitação de elétrons por via redox. Portanto, NADH e FADH₂ serão oxidados (perda de elétrons (e⁻)) (Ernster & Schatz, 1981; Hatefi, 1985):



e



Os elétrons “perdidos” na reação, irão atravessar a CTE, enzima por enzima, até que atinjam finalmente, a molécula de Oxigênio em seu estado radicalar (O●), o qual é reduzido a água (Ernster & Schatz, 1981; Hatefi, 1985).



A troca de elétrons, por entre as enzimas do CTE, gera um gradiente de membrana, permitindo troca de prótons entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas. Sendo assim, há acúmulo de H⁺ no espaço intermembrana, tornando-o ácido, enquanto a matriz torna-se mais básica (Ernster & Schatz, 1981; Hatefi, 1985).

Para que os elétrons de Hidrogênio possam retornar a matriz mitocondrial, faz-se necessário que passem pela enzima de membrana (interna) chamada ATP Sintase (Ernster & Schatz, 1981; Hatefi, 1985).

A ATP Sintase, possui anexada em sua estrutura, na região da matriz mitocondrial, moléculas de ADP e fósforo. Para que o hidrogênio consiga atravessar a ATP Sintase, ocorre uma alteração espacial desta enzima, fazendo com que o fósforo e ADP reajam entre si levando a formação de ATP. Tal processo é conhecido por quimiosmose, resultando em fosforilação oxidativa do ADP (devido a oxidação do CTE) (Ernster & Schatz, 1981; Hatefi, 1985).

Desta forma, evidencia-se que o oxigênio que estava, então, em forma radicalar é incorporado tornando-se água. No entanto, nem todo oxigênio radicalar é incorporado a água. Parte dele reage entre si formando o radical superóxido O[•]₂, o qual, por ser uma ERO precisa ser evitado, pois caso contrário a célula pode sofrer morte programada (Ernster & Schatz, 1981; Hatefi, 1985; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Outra fonte endógena de ERO é pela transferência de elétrons mediada do NADH para o citocromo P450 em órgãos como ovários e testículos, levando a formação de superóxido, que por sua vez é combatido pela presença de agentes antioxidantes (Hanukoglu *et al.*, 1993).

Uma terceira forma de produção de espécies reativas de oxigênio é através da cadeia imunológica via proteínas de NADH oxidases (NOX). Esta via é ativada quando entra em contato com fatores do crescimento, isquemia e citocinas inflamatórias, e através de processos químicos há a formação de superóxido. As EROs produzidas via proteínas NOX possui um papel importante, quando não em excesso, na defesa do organismo, pois serve como mediador anti-inflamatório (Bedard & Krause, 2007; Halliwell & Gutteridge, 2007; Brown & Griendling, 2009).

2.6.2.2. Via exógena

A produção de EROs pode ter estímulo externo, a partir do contato com metais pesados, poluentes, fumo e radiação. Fatores exógenos, quando presentes em concentrações elevadas, se envolvem em reações redox nas células levando a formação de superóxido (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O ânion superóxido inicia uma cascata de formação de outras EROs. O ânion é convertido, através do superóxido dismutase (SOD), em peróxido de hidrogênio e posteriormente em oxigênio (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Embora o superóxido seja mais reativo que o peróxido de hidrogênio, pelo fato de ser uma estrutura radicalar, este último é mais danoso, pois pela maior estabilidade, consegue atravessar todas as camadas celulares chegando ao DNA para reações (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Acima, foi abordado algumas das EROs mais comuns, devido a processos biológicos e ação externa ao organismo, sendo: ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.

Porém, outra forma radicalar passível de ser formada em reações redox é a radical hidroxila. Este é formado através da reação entre o superóxido ou peróxido de hidrogênio com metais de transição, mais comumente cobre e ferro (reação de fenton) ou até mesmo pela reação entre si (reação de Haber-Weiss). Altamente reativo, pode interagir facilmente com carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e aminoácidos e não é possível eliminá-lo através da SOD ou outra reação enzimática, apenas através de seu sequestro para outra molécula, papel desempenhado principalmente pela glutatona reduzida (GSH) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Outras espécies reativas, não necessariamente apenas de oxigênio, relevantes ao organismo humano são os radicais peroxil e alcoxil, os quais se formam, no decorrer, do processo de lipoperoxidação; Óxido Nítrico radicalar e o ácido hipocloroso, que embora não radicalar, também possui potencial para reagir com o DNA. É produzido em processos inflamatórios via células de defesa (Halliwell & Gutteridge, 2007).

2.6.3. Defesas antioxidantes

As principais defesas enzimáticas são o superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase.

A SOD é a responsável por dismutar o ânion superóxido. Esta enzima pode se apresentar na forma dependente de cobre e zinco ou de manganês. A forma dependente de cobre e zinco está presente em células eucariotas tanto de origem animal quanto vegetal e comparativamente é mais resistente a variações de temperatura e à desnaturação por substâncias (exemplo cloreto de guanidina e ureia) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A catalase, para agir, necessita de coadjuvantes como ferro e a vitamina E. É capaz de converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2) molecular (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Por sua vez, a glutathione peroxidase pode se apresentar na forma dependente ou não de selênio. A forma não dependente de selênio não é capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio, embora seja capaz de reduzir outros peróxidos, enquanto a forma dependente de selênio não possui restrições (Halliwell & Gutteridge, 2007).

As defesas antioxidantes não enzimáticas são constituídas por nutrientes advindo da dieta como as vitaminas hidrossolúveis ou não, sendo as principais a vitamina E, vitaminas do complexo B e vitamina C, além de oligoelementos como zinco, cobre, selênio dentre outros elementos. Constituindo antioxidantes advindos a partir da alimentação também é possível citar os metabolitos secundários, como por exemplo os flavonoides (Lopes-Torres *et al.*, 1993; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Além de fonte dietética, podem ser originados intrinsicamente ao organismo como é o caso da glutathione reduzida e o ácido úrico (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O ácido úrico, embora associado com outras disfunções do organismo é capaz de se complexar com metais pesados, reagir com a radical hidroxila e outras EROs (Halliwell & Gutteridge, 2007; Nery *et al.*, 2015).

A glutathione reduzida é a principal defesa antioxidante não enzimática, sendo o tiol não proteico de maior destaque em organismos vivos e pode ser encontrada na forma reduzida ou oxidada. A razão entre esses dois modos é um indicativo dos estados redox dos sistemas biológicos, pois usualmente a fração oxidada é muito baixa comparada com a reduzida. (Lopes-Torres *et al.*, 1993; Halliwell & Gutteridge, 2007).

É capaz de metabolizar o peróxido de hidrogênio e xenobióticos, e encontra-se presente na mitocôndria como forma de controlar as espécies reativas de

oxigênio que se formam naturalmente nesta organela (Lopes-Torres *et al.*, 1993; Halliwell & Gutteridge, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta celular à ação de substância originada de *Combretum mellifluum* e própolis negra de modo isolado ou de modo combinado ao quimioterápico doxorrubicina no tratamento de câncer de mama em modelos de culturas celulares 2D e 3D.

3.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar o potencial antiproliferativo de compostos obtido da própolis negra e *Combretum mellifluum* frente as linhagens humanas de adenocarcinoma de mama MCF-7 e não neoplásicas HFF-1 e NIH/3T3 em modelo 2D em 48 horas;
- b) Determinar o índice de seletividade dos compostos para as linhagens neoplásicas em relação as não neoplásicas;
- c) Analisar, *in vitro*, possível processamento hepático das amostras utilizando como modelo a cultura celular com Hep G2;
- d) Avaliar a sensibilização celular via utilização dos compostos antes da aplicação do quimioterápico doxorrubicina;
- e) Avaliar a capacidade dos compostos em interferir no processo de migração celular em 2D;
- f) Avaliar a citotoxicidade em MCF-7, no modelo 3D, através de dose selecionada a partir do ensaio em 2D, via integridade de membrana com esferoides corados em Azul de Trypan e em laranja de acridina com brometo de etídio;
- g) Verificar possível mecanismo de ação a partir da avaliação do estresse oxidativo, relacionando a presença de espécies oxidativas e defesas antioxidantes.
- h) Investigar efeito dos compostos sobre ciclo celular por meio de citometria de fluxo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos e fornecidos a partir da parceria com o Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INQUI/UFMS) sob supervisão e orientação da professora doutora Fernanda Rodrigues Garcez e execução do discente Patrick S. Mirowski.

4.1.1. *Combretum mellifluum*

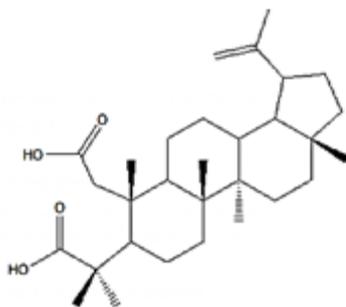
A substância obtida a partir da *Combretum mellifluum* passou pelos seguintes processos: A coleta do material vegetal, extração, isolamento, purificação e determinação estrutural do ácido 2,3-seco-lup-20(29)-eno-2,3-dioico foram realizados por membros do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais Bioativos do INQUI/UFMS.

As folhas de *Combretum mellifluum* foram coletadas na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, em julho de 2014. O material vegetal foi identificado pelo botânico Dr. Arnildo Pott (Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – INBIO/UFMS). Uma exsicata (nº49130) foi depositada no Herbário CGMS-UFMS e cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A5DBC20.

Após secagem à temperatura ambiente, as folhas (5,2 kg) foram moídas e extraídas com etanol à temperatura ambiente. Após concentração sob pressão reduzida, foi obtido o extrato etanólico (1,2 kg). Uma alíquota do extrato etanólico (100,0 g) foi submetida a partições líquido-líquido sucessivas com hexano, diclorometano e acetato de etila.

A fase hexânica obtida (10,0 g) passou por diversos procedimentos cromatográficos que resultaram no isolamento do triterpeno ácido 2,3-seco-lup-20(29)-eno-2,3-dioico (19,0 mg). A determinação estrutural da substância foi feita principalmente com base em dados espectrais de RMN de ¹H e de ¹³C uni-e bidimensionais.

Figura 8 – Estrutura da substância isolada a partir da *Combretum mellifluum*



Ácido 2,3-secolup-20(29)-ene-2,3-dioico

Fonte: INQUI – UFMS

A substância isolada a partir da *C. mellifluum* será identificada como SCM no decorrer do trabalho.

4.1.2. Própolis negra

A obtenção da substância isolada a partir da própolis negra deu-se da seguinte maneira: Os procedimentos de coleta da própolis e de extração, isolamento, purificação e determinação estrutural da odoratina foram realizados por membros do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais Bioativos do INQUI/UFMS.

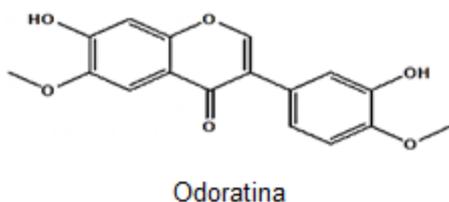
A amostra de própolis proveniente de abelhas da espécie *Apis mellifera* foi obtida de um apiário localizado na cidade de Dois Irmãos do Buriti no estado de Mato Grosso do Sul pelo método de raspagem

A amostra (50,0 g) foi armazenada sob refrigeração e em seguida, triturada com nitrogênio líquido e extraída em etanol por um período de 7 dias em temperatura ambiente. O extrato obtido foi filtrado e mantido em freezer por 24 horas. Em seguida, foi novamente filtrado para a remoção de ceras e posteriormente concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, seguido de liofilização por 24 horas, sendo obtidos 19,75 g de extrato etanólico bruto.

Parte do extrato etanólico (19,1 g) foi submetida a partições líquido-líquido sucessivas com hexano, diclorometano e acetato de etila.

A determinação estrutural da substância foi feita principalmente com base em dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C uni-e bidimensionais.

Figura 9 – Estrutura da substância isolada a partir da própolis negra



Fonte: INQUI – UFMS

A substância isolada a partir da própolis negra será denominada, no decorrer da dissertação como SBP.

A seleção das duas substâncias foi feita a partir de um *screening* antiproliferativo em linhagem neoplásica de câncer de mama MCF-7. A substância, de cada fonte natural, com menor GI₅₀ seguiram para os ensaios posteriores.

4.2. Preparação das amostragens

As amostras foram suspensas em DMSO (Dimetilsulfóxido) na concentração de 0,1 g/mL, alíquotadas e congeladas.

No momento de uso, foram descongeladas e diluídas em meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) para que a maior concentração de DMSO utilizada fosse no máximo 0,25%, de modo a não alterar a viabilidade celular (Iwamoto *et al.*, 2015).

Além disso, DMSO foi utilizado no controle negativo, na mesma concentração utilizada na diluição da amostra para garantir que não houvesse interferência do diluente nos resultados.

4.3. Ensaios celulares *in vitro*

4.3.1. Linhagens utilizadas

MCF7: ATCC® HTB-22™, célula neoplásica epitelial do tipo aderente, originada de adenocarcinoma de glândula mamária humana (local metastático). Apresenta expressão de receptores de estrogênio. Essa linhagem foi doada pelo professor doutor João Ernesto de Carvalho da Universidade Estadual de Campinas.

HepG2: ATCC® HB-8065™, célula neoplásica epitelial do tipo aderente, originada de carcinoma hepatocelular humano. A aquisição da linhagem foi pelo Banco de Células do Rio de Janeiro.

HFF-1: ATCC® SCRC-1041™, fibroblasto humano, não neoplásica aderente, isolado da pele (prepúcio) de recém-nascido. Essa linhagem foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro.

NIH/3T3: ATCC® CRL-1658™, célula epitelial não neoplásica aderente originada de fibroblasto murinho (tecido embrionário). Linhagem doada pelo professor doutor João Ernesto de Carvalho da Universidade Estadual de Campinas.

Todas as linhagens foram cultivadas em meio de cultivo (DMEM ou RPMI), suplementado com 1% de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina) na concentração de 50µg/mL e 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) para as duas linhagens neoplásicas e 15% para a linhagem não neoplásica.

O meio de cultivo (DMEM ou RPMI) suplementado, denomina-se meio completo.

4.3.2. Descongelamento e repique celular

Os criotubos, contendo individualmente uma linhagem celular, armazenados em botijões de nitrogênio líquido (-196°C), foram levados ao banho-maria a 37°C, até completo descongelamento.

O material do criotubo (1mL) foi transferido para um tubo cônico de 15mL, contendo 9mL de meio completo e então levado para centrifugação por 4 minutos a 1.000 RPM.

Após centrifugação, aspirou-se o sobrenadante do tubo cônico, restando ao fundo o *pellet* que foi suspenso em 5mL de meio completo e homogeneizado delicadamente, evitando formação de espuma.

A suspensão celular transferida para 01 frasco de cultivo de 25cm² e incubado a 37°C, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ até formação da monocamada (exemplificado na Figura 6) com aproximadamente 80% de confluência.

Uma vez obtida a confluência celular no frasco de cultivo, as células estavam prontas para o processo de repique, etapa realizada com o propósito de aumentar o número de células até a obtenção de quantidade necessária para os experimentos.

Embora o repique se faça necessário, houve o controle da quantidade de vezes que este processo foi realizado a fim de evitar que as células fossem submetidas à uma quantidade exagerada de passagens/repiques, pois estudos

demonstram que caso isso ocorra as células podem vir a perder suas características originais (Chang-Liu & Woloschak, 1997; Wenger *et al.*, 2004).

O frasco de cultivo foi retirado da incubadora, aspirou-se o meio completo, restando somente as células aderidas ao fundo. Adicionou-se ao frasco 0,5mL de Tripsina-EDTA (Tripsina a 0,25% mais EDTA 1mM) que ficou em repouso na incubadora entre 3 e 4 minutos até o total desprendimento celular.

A suspensão de células em tripsina foi transferida para outro tubo cônico de 15mL contendo meio completo no triplo de volume em comparação à tripsina. O material foi centrifugado por 4 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado, restando apenas o *pellet* que foi suspenso em volume adequado para ser transferido a outros novos frascos de cultivo, conforme demanda.

4.3.3. Ensaio em modelo 2D

A avaliação da citotoxicidade em células neoplásicas e não neoplásicas seguiu protocolo adaptado conforme Mosmann, 1983 e Skehan *et al.*, 1990

Para a contagem do número de células, procedeu-se conforme a etapa do repique descrito no item 4.3.2, porém ao invés de devolver as células a um novo frasco, o *pellet* foi suspenso em 2mL de meio completo, homogeneizado e uma alíquota de 100µL foi transferida a outro recipiente (exemplo: outro tubo cônico ou criotubo) já contendo 400µL de Azul de Trypan (corante que evidencia as células não viáveis corando-as de azul, permitindo a exclusão destas da contagem).

Material foi homogeneizado e transferido para câmara de *Neubauer* para que a contagem celular fosse realizada.

4.3.3.1. Atividade antiproliferativa por Sulforrodamina B (SRB)- 24 e 48h

Para o ensaio de citotoxicidade preparou-se duas placas de 96 poços. A primeira identificada como T0 (Tempo Zero) e a segunda como Teste. As células foram transferidas para ambas placas na concentração de 5.000 células/poço.

Na T0 foi adicionado em três poços distintos o meio completo e em outros três poços semeou-se a suspensão celular na concentração informada. Esta placa foi incubada por 24 horas em incubadora a 37°C e serviu como forma de controle do experimento, para que as células semeadas pudessem ser quantificadas quanto ao crescimento desde o momento do semeio até o momento da adição das amostras.

Em relação a placa Teste, aos poços das linhas A e H acrescentou-se apenas meio completo, equivalendo ao branco do experimento, tendo em vista que a leitura do material é através de espectrofotometria, e aos poços das linhas intermediárias (B a G) semeou-se as células. Esta placa também foi incubada por 24 horas a 37°C.

Após 24 horas de incubação, à placa teste adicionou-se os compostos analisados em quatro diferentes concentrações (0,25 ; 2,5 ; 25 ; 250 µg/mL), sendo cada concentração em triplicata, além de adicionar a amostragem nas linhas do branco (A e H).

Como controle negativo, reservou-se alguns poços que, ao contrário de todos os outros, não recebeu acréscimo de nenhum composto analisado, apenas meio completo e DMSO na mesma concentração máxima utilizada na diluição das amostras, permitindo livre crescimento celular durante o período de 48 horas. Em contrapartida, para controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina (Sigma-Aldrich) nas concentrações 0,025 ; 0,25 ; 2,5 ; 25 µg/mL, também em triplicata.

Incubou-se a placa teste por mais 48 horas a 37°C, e ao completar este período, seguiu para o processo de leitura colorimétrica com SRB (Sulforodamina B – corante que possui afinidade por proteínas de células vivas – Sigma Aldrich). A placa T0 seguiu para a leitura após as primeiras 24 horas de incubação, citada anteriormente, sem passar pela adição dos compostos.

A leitura compôs-se das seguintes etapas:

O sobrenadante de cada cavidade da placa foi aspirado, permanecendo apenas as células aderidas ao fundo. Adicionou-se 100µL de TCA (Ácido tricloroacético) diluído em água destilada na concentração de 20% para que as células aderidas fossem fixadas a placa. Para proteger da ação luminosa, as placas foram envoltas em papel alumínio e acondicionadas em geladeira por 30 minutos.

Em seguida o sobrenadante foi descartado, a placa foi lavada em água corrente e seca sob temperatura ambiente. Assim que completamente seca, adicionouse 50µL de SRB 0,1% diluído em ácido acético 1%. A placa foi envolta novamente em papel alumínio e repousou por mais 30 minutos, desta vez, em temperatura ambiente.

Após decorrido o segundo intervalo de 30 minutos, desprezou-se o sobrenadante de SRB e utilizou-se ácido acético 1% (diluído em água destilada)

para lavagem do excesso de corante. Após cinco lavagens com ácido acético, a placa foi lavada novamente com água corrente e seca a temperatura ambiente. Assim que secas, 100µL de Trizma-Base (10mM, pH 10,5) foram adicionados em todos os poços para que ocorresse a solubilização das células coradas.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm.

Para a realização da citotoxicidade de 24 horas, realizou-se o mesmo processo descrito, com a diferença que a incubação com os isolados foi de 24 horas, e não mais 48 horas. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em duplicata e cada experimento em triplicata intraexperimento.

4.3.3.2. Citotoxicidade após exposição à HepG2

Realizou-se outro ensaio de citotoxicidade frente à MCF7, contando desta vez, com possível metabolismo hepático *in vivo* dos compostos químicos estudados.

Para simular a ação metabólica do fígado *in vitro*, utilizou-se a linhagem HepG2, que expressa proteínas e enzimas metabolizadoras, sendo capaz de biotransformar compostos, conforme evidenciados em estudos (Yoshitomi *et al.*, 2001; Wilkening, Stahl & Bader, 2003; Asai *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2018). É, portanto, um modelo indicado para verificar metabolização hepática e saber se o composto permanece com atividade citotóxica relevante.

O ensaio citotóxico com HepG2 seguiu o mesmo procedimento descrito no item 4.3.3.1. quanto ao semeio, aplicação e concentração (µg/mL) das amostras e controle positivo e incubação por 48 horas da placa. A concentração celular também foi de 5.000 células por cavidade.

A diferença é que após o período de incubação por 48 horas, a placa foi centrifugada de modo que todas as células, inclusive as desprendidas no meio, ficassem ao fundo e ao invés de descartar o sobrenadante, esse foi transferido para outra placa teste contendo MCF7, que já havia sido incubada pelas 24 horas iniciais, juntamente à sua T0 (MCF7).

Uma vez transferido o sobrenadante, a placa teste da MCF7 seguiu para um período de incubação por 48 horas e posteriormente foi lida em espectrômetro a 540nm. A placa T0 da MCF7 deste ensaio de citotoxicidade foi lida após a primeira incubação de 24 horas, conforme descrito em item 4.3.3.1. O ensaio de

citotoxicidade foi realizado em duplicata e cada experimento em triplicata intraexperimento.

4.3.3.3. Associação ao quimioterápico doxorrubicina

As células MCF-7 foram semeadas na concentração de 5.000 células por cavidade da placa de 96 poços e incubadas inicialmente por 24 horas. Após incubação acrescentou-se os compostos testes nas concentrações de (0,25, 2,5, 25, e 250 µg/mL) seguindo para mais 24 horas de incubação.

Ao final deste período a placa foi centrifugada e o sobrenadante retirado. Em seu lugar, acrescentou-se doxorrubicina na concentração de 2,5µg/mL em um volume de 200µL/poço. Uma nova incubação de 24 horas foi realizada, e ao fim procedeu-se com a leitura pelo método colorimétrico SRB.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em duplicata e cada experimento em triplicata intraexperimento.

4.3.3.4. Migração celular

Também conhecido por *scratch assay* ou *wound healing assay* este ensaio tem por objetivo avaliar a migração celular após exposição aos compostos (Rodriguez *et al.*,2005; Liang *et al.*, 2007). Utilizou-se, de forma adaptada, o protocolo de Pinto *et al.*, 2019.

As células MCF7 foram semeadas em placa de 12 poços a uma densidade de 10.000 células/poço e incubadas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ até a obtenção de aproximadamente 95% de confluência. Conforme necessário, eram realizadas trocas periódicas do meio completo de cada poço para manter aporte nutritivo às células até obter a confluência desejada.

Uma vez obtida o crescimento desejado, descartou-se o sobrenadante de cada cavidade da placa e utilizando uma ponteira (do tipo universal de 20 - 200µL) após centrifugação de placa e foi feito um “risco” em linha reta de forma contínua na camada celular, formando assim, um espaço vazio no meio do poço, margeado pelas células confluentes.

Para retirar o excesso de células, agora soltas no microambiente, devido a ação mecânica recém performada, lavou-se a cavidade, delicadamente, com meio de cultura, evitando qualquer disrupção para com as células aderidas.

Aos poços foram acrescentados os isolados da seguinte maneira:

Poço A: SBP na mesma concentração da GI_{50} obtida no ensaio de citotoxicidade, incubado por período total de 48 horas.

Poço B: SBP na mesma concentração da GI_{50} obtida no ensaio de citotoxicidade, incubado por 24 horas. Decorrido este tempo, acrescentou-se doxorrubicina na concentração da GI_{50} obtida no ensaio de citotoxicidade e incubado por mais 24 horas.

Poço C: SCM na mesma concentração da GI_{50} obtida no ensaio de citotoxicidade, incubado por período total de 48 horas.

Poço D: SCM na mesma concentração da GI_{50} obtida no ensaio de citotoxicidade, incubado por 24 horas. Decorrido este tempo, acrescentou-se doxorrubicina na concentração da GI_{50} obtida no ensaio de citotoxicidade e incubado por mais 24 horas.

Poço E: Controle positivo – quimioterápico doxorrubicina – na mesma concentração da GI_{50} obtida no ensaio de citotoxicidade, incubado por período total de 48 horas.

Todos os poços foram visualizados em microscópio invertido e tiveram registros fotográficos no período 0 hora (“risco” recém realizado), 24 horas e 48 horas. As imagens foram avaliadas, no *software* Image J desenvolvido pelo *National Institute of Health*, quanto a migração celular ao espaço vazio criado (Rasband *et al.*, 1997).

4.3.3.5. Ensaio clonogênico

Este ensaio objetiva analisar a capacidade das células em formarem colônias sob ação dos compostos que estão sendo estudados. O protocolo utilizado foi adaptado de Franken *et al.*, 2006.

Utilizando placa de 06 poços, semeou-se em cada poço a linhagem neoplásica de MCF-7 na concentração de 500 células/poço. Esta placa foi incubada a 37°C com 5% de CO_2 tempo suficiente para que as células aderissem ao poço, mas que não tivesse iniciado o processo de replicação. O tempo ideal neste momento foi de 24 horas.

Após a incubação inicial de 24 horas, o meio, no qual as células estavam inseridas, foi aspirado, e o poço lavado, cuidadosamente, três vezes com PBS, para

que então fosse recolocado o novo meio de cultura contendo os compostos e doxorrubicina na concentração da GI_{50} obtida no ensaio antiproliferativo. A placa foi reincubada por 48 horas nas mesmas condições de CO_2 e temperatura.

Finalizada as 48 horas de incubações, o meio foi novamente aspirado, os poços foram lavados com PBS por três vezes, cuidadosamente, evitando desprendimento celular, e no lugar do meio retirado foi adicionado meio completo (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) para que as células pudessem se desenvolver livremente. Nesta etapa, a placa foi incubada por um período de 12 dias, nas mesmas condições de CO_2 e temperatura.

Após o último período de incubação o meio completo foi aspirado, as células foram novamente lavadas com PBS, também por três vezes e aos poços adicionou-se uma mistura de glutaraldeído (6%) e cristal violeta (0,5%) por 30 minutos. A placa descansou em temperatura ambiente neste período.

Utilizando uma pipeta pasteur, retirou-se a mistura de glutaraldeído com cristal violeta, e os poços foram lavados com água corrente, com auxílio, também, de pipeta pasteur, para remover o excesso do corante.

O registro fotográfico foi realizado diretamente com câmera fotográfica, sem o intermédio de microscópio, e as colônias foram contadas e analisadas quanto à quantidade de colônias formadas após o período total de incubação.

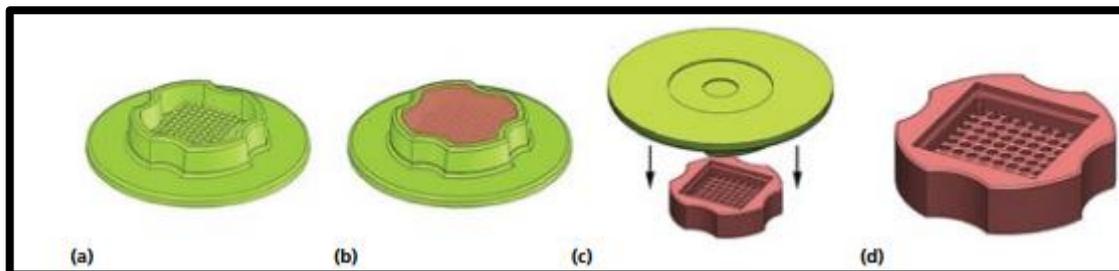
4.3.4. Ensaio em modelo 3D

Utilizou-se o micro molde *MicroTissues*[®] *3D Petri Dish*[®] para esferoides, da Sigma-Aldrich (Figura 10), para a formação de moldes em gel agarose, em placa de 6 poços, que serviram de base para a formação do modelo 3D, sob protocolo embasado e adaptado de Przyborski, capítulo 05, 2017.

O molde em agarose foi transferido para poços individuais de placa de 12 poços e umedecidos em meio de cultura por cerca de 30 minutos, para que não absorvesse posteriormente o meio completo, quando as células fossem semeadas. Cada molde foi semeado com 2 milhões de células.

Realizou o registro fotográfico nos períodos de zero horas (células recém semeadas ao molde), 24, 48, 72 e 96 horas, sendo este último período o início do ensaio, quando o esferoide se apresentou compacto e bem formado.

Figura 10 – Micromolde *MicroTissues*[®] 3D Petri Dish[®] para esferoides



Fonte: Przyborski, Capítulo 05, 2017. (a) micro molde, (b) micro molde preenchido com ágar gel; (c) remoção do ágar gel solidificado do molde; (d) ágar gel solidificado pronto para uso.

Os esferoides, do molde de cada poço da placa, foram tratados com os isolados e controle positivo, nas mesmas concentrações e tempo de incubação conforme descrito no item 4.3.3.4. poços A a E.

Os registros fotográficos ocorreram no tempo 24 horas e 48 horas utilizando o corante Azul de Trypan (1:5), e no tempo de 48 horas utilizando laranja de acridina (Sigma-Aldrich, USA) e brometo de etídio (Invitrogen, USA) na concentração 1:1 para verificação da integridade celular e regiões de apoptose por fluorescência, respectivamente em microscópio Olympus BX41 através do uso de luz ultravioleta. Doxorubicina (Eurofarma, Brasil) foi utilizado como controle positivo.

4.3.5. Estresse oxidativo

Os ensaios de estresse oxidativo em modelo 3D de cultura de células foram realizados conforme Gomes e colaboradores (2019).

Para a análise do estresse oxidativo na cultura *in vitro*, foi utilizado o modelo celular tridimensional. As células foram cultivadas até obter-se a concentração de 2 milhões de células por molde. Para cada amostra foram utilizados 24 moldes, sendo esta a quantidade necessária de célula para o andamento dos ensaios, garantindo um mínimo de 2mg/mL de proteínas totais, as quais foram dosadas em sistema automatizado em equipamento Dimension EXL 200 da Siemens.

Os esferoides uma vez formados foram tratados da seguinte forma:

- Amostra SBP e SCM: 25µg/mL
- Doxorubicina: 2,5µg/mL

O tempo de incubação, a partir do momento em que células foram tratadas, foi de 48 horas. Após este período determinado, os esferoides foram recolhidos dos

moldes e transferidos para tubo cônico de 15mL e centrifugados por 5 minutos a 2.400 RPM e lavados com PBS.

Ao final das duas centrifugações, o sobrenadante foi descartado, restando apenas o *pellet* de células, ao qual foi adicionado 600µL de solução de lise constituída por tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,4, 0,1% triton X-100, 150 mM de NaCl. A solução de lise junto às células foi homogeneizada e centrifugada, e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios.

4.3.5.1. Marcador de dano oxidativo

4.3.5.1.1. TBARS – Substância que reagem ao ácido tiobarbitúrico

As EROs, em especial as radicalares, possuem facilidade em reagir com ácidos graxos poli-insaturados que constituem as membranas celular.

Um dos marcadores possíveis de avaliar o dano causado as membranas é a medida substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O dano a membrana é causado devido a peroxidação lipídica.

Para a realização deste ensaio, 150µL do sobrenadante obtido da lise celular foi adicionado em 500 µL de TCA 12% e a mistura foi homogeneizado. Posteriormente, foi adicionado 450µL de Tris-HCl 60mM em pH 7,4 e a mistura foi novamente homogeneizada, e em seguida, 500µL de ácido tiobarbitúrico. Toda esta solução foi incubada a 98°C por uma hora.

Uma vez decorrido o tempo determinado, as amostras foram levadas ao banho de gelo por dez minutos e em seguida foram centrifugadas por 5 minutos a 10 mil RPM.

O sobrenadante obtido a partir desta centrifugação foi transferido para placas de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 535nm, conforme descrito por Bird e Draper (1984).

O ensaio foi realizado em triplicata, a quantidade de TBARS foi determinada utilizando coeficiente de extinção molar de 153/mM/cm e o resultado foi expresso em nmol/mg de proteínas.

4.3.5.2. Defesas antioxidantes enzimáticas

4.3.5.2.1. Catalase

A catalase é uma enzima que tem por função de converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2) e por esse motivo funciona como defesa antioxidante de organismos vivos. O ensaio foi realizado conforme descrito por Aebi (1984).

Assim, 20 μ L do sobrenadante obtido do lisado celular foi adicionado à placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 200 μ L da solução reagente (tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0 e 10 mM de peróxido de hidrogênio).

A cinética enzimática foi realizada espectrofotometricamente em 240nm por um tempo total de 5 minutos com registro de absorbância a cada 10 segundos. O ensaio foi realizado em duplicata e o resultado foi emitido em mmol/min/mg de proteína.

4.3.5.2.2. SOD – Superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase tem por função dismutar o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), interrompendo desta forma, reações radiculares do superóxido e protegendo o organismo.

O ensaio foi realizado de acordo com Misra & Fridovich (1972), adaptado por Boveris *et al.* (1983), no qual o princípio baseia-se na oxidação da adrenalina formando o cromóforo adrenocromo e o ânion superóxido.

O ensaio é baseado na construção de uma curva de oxidação, utilizando diferentes concentrações do sobrenadante da lise celular (0, 5, 10, 20 e 40 μ L de sobrenadante).

Portanto, em uma placa de 96 poços, adicionou-se a cada poço um volume específico do sobrenadante. A este volume adicionou-se o complementar para atingir 200 μ L de glicina 50nM em pH 10,2 e 50 μ L de adrenalina 60nM. A reação foi lida em espectrofotômetro a 480 nm por 10 minutos com leitura da absorbância sendo realizada a cada 10 segundos.

O ensaio foi realizado em duplicata e o resultado foi emitido em unidades de SOD/mg de proteína.

4.3.6. Ciclo Celular

O ensaio de ciclo celular foi realizado utilizando esferoides na concentração de 2 milhões de células por molde. Foi utilizado um molde por amostra.

Os moldes foram tratados utilizando a concentração de 25µg/mL de amostra-teste e 2,5µg/mL de doxorubicina. Os moldes foram incubados por tempo total de 48 horas a 5% de CO² a 37° C.

No caso dos moldes em que houve associação entre os compostos e doxorubicina, esta foi adicionada ao molde, contendo já a amostra-teste, após as primeiras 24 horas de incubação.

Após término do período de incubação os esferoides foram retirados do molde e transferidos para tubo cônico de 15mL para serem lavados com PBS e centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min.

O *pellet* foi ressuspensado com 1 mL de solução fixadora (previamente preparado 70% de etanol) e incubado a 4°C durante a noite. As células foram então lavadas em PBS frio e ressuspensas em 300 µL de PBS, 45 µL de solução de lise e 5 µL de 7AAD, protegidas da luz, em a 4 ° C durante 20 minutos.

A análise foi por citometria de fluxo (Cytotflex) que representa o número de células versus o conteúdo de DNA indicado pela intensidade de fluorescência. Foram coletados 30 mil eventos para a análise.

4.3.7. Análise de dados

4.3.7.1. GI₅₀

Aplicável aos itens 4.3.3.1, 4.3.3.2. e 4.3.3.3.

A leituras das absorbâncias, obtidas em triplicata para cada concentração, foi usada para calcular a média e o desvio padrão das porcentagens de crescimento de cada linhagem, a fim de obter a dose que inibe 50% do crescimento celular (GI₅₀).

As fórmulas utilizadas para calcular, em *software* Origin (versão 6.0) foram obtidas em Monks *et al.* (1991) associadas aos conceitos citostáticos (inibição de crescimento celular) ou citocida (morte celular).

Se Controle Negativo > Teste ≥ T₀ = efeito citostático, portanto a fórmula utilizada foi:

$$GI_{50} = 100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$$

Se Teste < T0 = efeito citocida, portanto a fórmula utilizada foi:

$$GI_{50} = 100 \times [(T-T_0)/(T_0)]$$

4.3.7.2. Índice de Seletividade (adaptado de Suffness & Pezzuto, 1990)

O índice de seletividade (IS) é uma medida que verifica a seletividade do composto analisado frente a linhagens neoplásicas e não neoplásicas.

É a razão da GI_{50} do composto-teste em linhagem celular não neoplásica com a GI_{50} da linhagem neoplásica. Considera-se que há seletividade significativa quando o resultado obtido é superior a 2.

4.3.7.3. Análise estatística

Para comparar os valores *in vitro* utilizou-se o *software* GraphPad InStat 3 e foi usado o ANOVA *one-way* com pós teste de Turkey.

Em todos os métodos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p obtido for menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Citotoxicidade

5.1.1. Ensaio de citotoxicidade 24 e 48 horas

A classificação de efeito citotóxico é bastante complexa e pouco padronizada. Há citações referentes a efeito antiproliferativo de extratos, que consideram o limite de 30µg/mL para ação com potente efeito citotóxico (Suffness & Pezzuto, 1990). Para substâncias, esse valor de GI₅₀ é cerca de 10 vezes menor podendo ser considerado potente até 5µg/ml, seguindo NCI (ITO et al., 2000). Há ainda revistas internacionais que orientam que o efeito citotóxico seja considerado potente quando a ação for até 4µg/ml (*Guideline da revista Journal of Natural Products*).

Tabela 1 – Atividade antiproliferativa das amostras SBP e SCM nos tempos 24 e 48 horas expressa em GI₅₀ (µg/ml)

	MCF-7 (24h)	MCF-7 (48h)	HFF-1* (48h)	NIH/3T3** (48h)	I.S. * / **
SBP	0,243 ± 0,050	4,089 ± 0,038	0,210 ± 0,009	23,960 ± 1,58	0,051* / 5,85**
SCM	0,244 ± 0,080	3,895 ± 0,438	0,210 ± 0,006	24,580 ± 0,69	0,053* / 6,31**
CP¹	0,024 ± 0,017	0,235 ± 0,011	0,012 ± 0,008	2,510 ± 0,021	0,052* / 10,68**

Atividade antiproliferativa (GI₅₀ ± DP µg/mL) dos compostos SBP, SCM e CP¹ (Controle Positivo – Doxorrubicina) na linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 e nas linhagens não neoplásicas de fibroblasto humano HFF-1 e fibroblasto murino NIH/3T3 nos tempos de 24 e 48 horas de ensaio antiproliferativo. I.S. (Índice de Seletividade) relevante quando >3,0 (Bézivin et al., 2004)

A discussão, baseada na Tabela 1, inicia-se com a análise da SBP e em sequência da SCM.

Para SBP encontrou-se a GI₅₀ de 4,089µg/mL, significando atividade citotóxica potente em 48 horas de tratamento. Esta substância é uma isoflavona dimetoxilada, denominada odoratina.

Não é comum encontrar isoflavonas em própolis, porém há relato de identificação de isoflavonas em própolis vermelha na região nordeste do Brasil que apresentou atividade citotóxica contra células de câncer pancreático (Awale *et al.*, 2008).

Há apenas uma descrição na literatura da obtenção de odoratina em própolis, no Nepal (Shrestha, Narukawa, Takeda, 2007). Sobre a atividade biológica desta substância, é conhecida apenas atividade antioxidante (Yoshiaki *et al.*, 1997) e ação

como agonista em receptores PPAR γ , relacionado com metabolismo de ácidos graxos e energia (Zhang *et al.*, 2012).

Um estudo (Wang *et al.*, 2020) utilizando isoflavonas avaliada em MCF-7, na mesma concentração celular por poço (5.000 células/poço), por 24 e 48 horas, e apresentou atividade citotóxica além de alterações morfológicas como perda da integridade celular, diminuição do volume da célula e aumento do espaço por entre as células.

Por sua vez, a amostra SCM, advinda da espécie *Combretum mellifluum*, apresentou GI₅₀ de 3,895 μ g/mL, potente atividade antiproliferativa. A SCM é um triterpeno e sua atividade citotóxica corrobora com outras pesquisas relacionadas ao gênero *Combretum*, como abordadas a seguir.

Em revisão realizada por Cháirez-Ramírez *et al.*, 2016 reforça que triterpenos do tipo lupeno possuem atividade antineoplásica em diversos tipos de câncer, incluso o composto lupeol no câncer de mama ao induzir apoptose na linhagem de MCF7. Evidências recentes da atividade de triterpenos com ação citotóxica em MCF7 incluem triterpenos isolados de *G. sessiliflora*, análogos de betulina com ação dose tempo-dependente (dosados em 24 horas e 48 horas) e triterpenos isolados do gênero *Bursera* (Myszka *et al.*, 2020; Sanchez-Monroy *et al.*, 2020; Thanasansurapong *et al.*, 2020).

Após a identificação da potente atividade antiproliferativa das substâncias SBP e SCM, foi analisado o perfil antiproliferativo (figuras 11 e 12) destas amostras a fim de determinar a concentração ideal para ser estudada no ambiente tridimensional.

Figura 11 – Gráfico de viabilidade celular de SBP nos tempos 24 e 48 horas

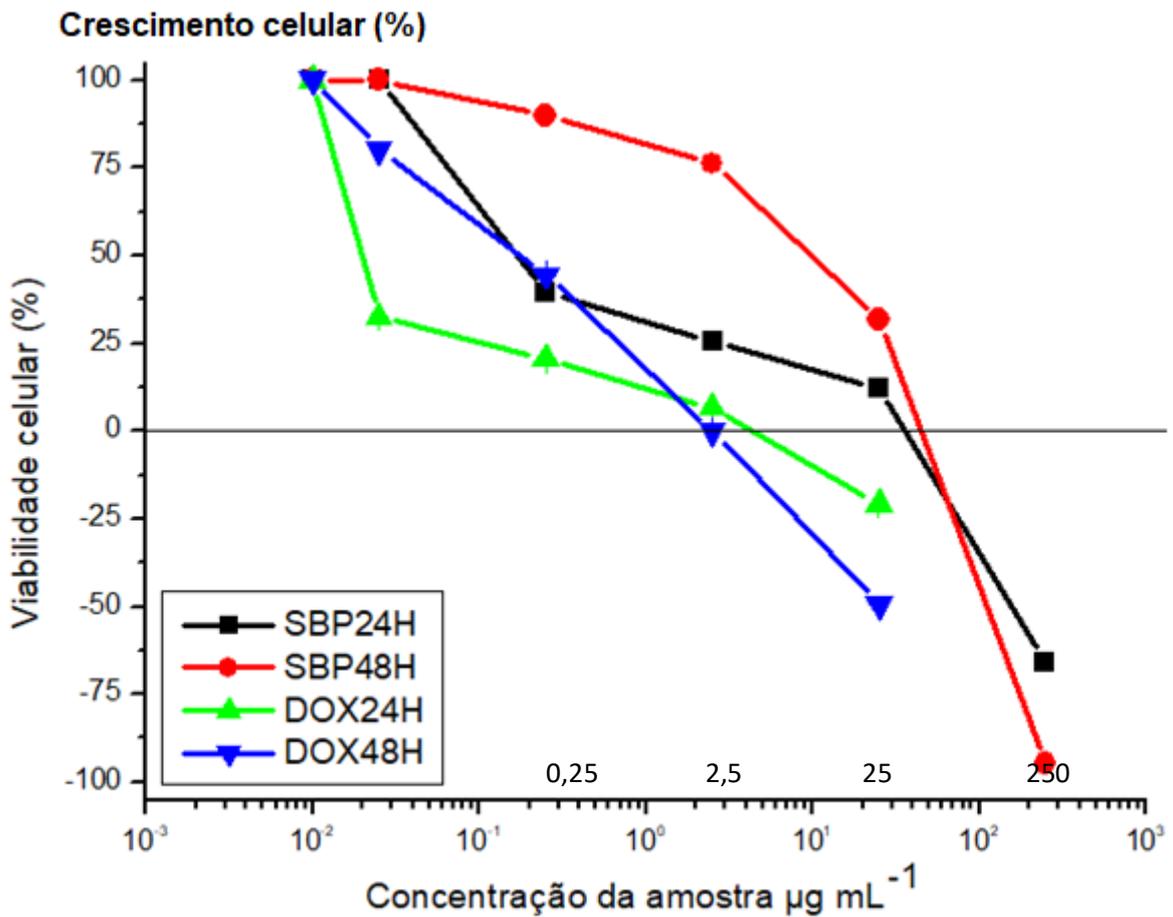


Gráfico de atividade antiproliferativa apresentando o percentual de crescimento celular (com desvio padrão em µg/mL) ponto a ponto das concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL para SBP e 0,025; 0,25, 2,5 e 25µg/mL para doxorubicina (controle positivo) na linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) nos tempos 24 e 48 horas.

Figura 12 – Gráfico de viabilidade celular de SCM nos tempos 24 e 48 horas

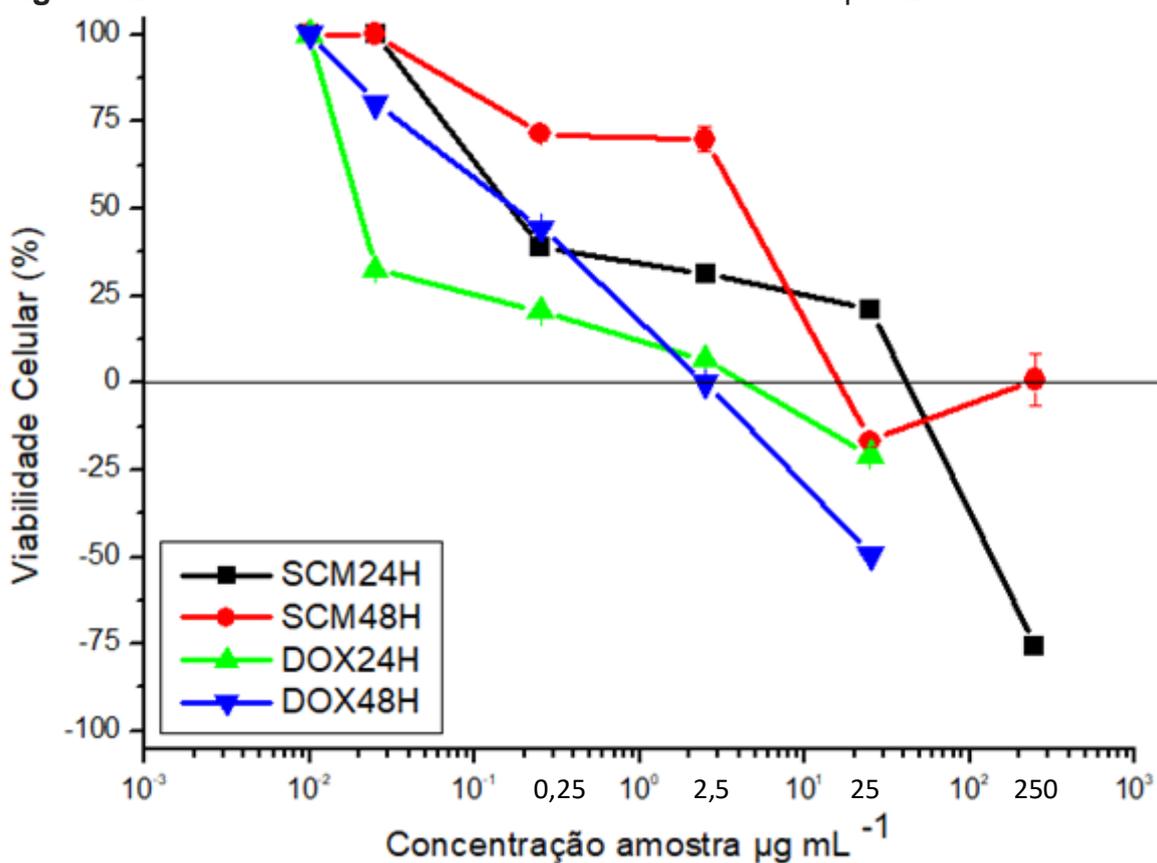


Gráfico de atividade antiproliferativa apresentando o percentual de crescimento celular (com desvio padrão em µg/mL) ponto a ponto das concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL para SBP e 0,025; 0,25, 2,5 e 25µg/mL para doxorubicina (controle positivo) na linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) nos tempos 24 e 48 horas.

A partir da análise dos gráficos de crescimento celular (Figuras 11 e 12), tanto nos ensaios de 24 horas quanto o de 48 horas, é possível averiguar qual concentração é mais viável utilizar nos ensaios em 3D, considerando que a cultura em modelo tridimensional apresenta uma relação mais complexa com o meio o qual está inserido (produção de metabólitos e absorção de nutrientes).

Em ambos gráficos apresentados é possível identificar ao eixo Y o crescimento celular (apresentada em porcentagem) e ao eixo X a concentração da substância testada (apresentada em µg/mL).

Na viabilidade celular, todo valor acima de zero, ou seja, valores positivos, estão relacionados com a atividade citostática (interrupção do ciclo sem causar a morte celular). Em relação aos valores abaixo de zero por cento, ou seja, os valores

negativos de viabilidade celular, equivalem ao momento em que a amostra analisada apresenta efeito citocida (morte celular naquela determinada concentração).

Portanto para ambos compostos testes, escolheu-se a concentração de 25µg/mL para dar andamento os ensaios no modelo tridimensional. Esta concentração equivale aos pontos de viabilidade celular de maior sensibilização, ou seja, que não houve recuperação celular entre 24 e 48 horas de tratamento. Além disso, foi observado que a partir desta concentração a célula ficava inviável e para avaliar as vias de morte celular é necessário avaliar a célula na fase de sensibilização e não de morte.

A mesma lógica foi aplicada para a escolha da melhor concentração de doxorubicina a ser utilizada nos ensaios posteriores em modelo 3D, no entanto em concentração 10 vezes menor (2,5 µg/mL).

Por fim, tem-se o Índice de Seletividade (IS) o qual foi significativo (>3,0) quando comparado aos resultados obtidos em linhagem NIH/3T3 para ambas substâncias. O IS tem importância para que seja identificado um composto o qual não seja citotóxico em linhagem normal, e ao mesmo tempo ativo em linhagem neoplásica (Henriksson et al., 2006) mas não é de se descartar o potencial uso em futuras pesquisas das amostras que não se mostraram seletivas para alguma linhagem neoplásica especificamente, tendo em vista que mesmo os medicamentos utilizados atualmente na terapêutica do câncer são agressivos referente a toxicidade (Komarov et al., 1999)

5.1.2. Metabolismo hepático HepG2

Devido, principalmente, ao citocromo P450, os xenobióticos, incluindo diversas drogas e medicamentos são metabolizadas no fígado. Algumas se tornam ativas apenas após o processamento enquanto outras são inativadas devido ao metabolismo (Wrighton & Stevens, 1992; Miners & Birkett, 1998; Rang, 2001).

Este modelo de metabolização hepática foi realizado pela primeira vez no laboratório do grupo deste estudo e foi padronizado a partir da adaptação de Asai, 2004.

Asai, 2004 investigou a metabolização hepática do composto fucoxantíol em amarouciaxantina A *in vivo* utilizando a linhagem celular HepG2 para o modelo *in*

vitro e *in vitro*. Com a pesquisa foi constatado que houve conversão do composto inicial naquele desejado.

Após o tratamento por 48 horas das células HepG2, o sobrenadante foi utilizado para tratar as células alvo – MCF7 e assim avaliar indiretamente o tipo de metabolização. A doxorrubicina foi usada como controle de teste uma vez que a doxorrubicina precisa ser metabolizada no fígado para ser convertida em seu metabólito majoritário, doxorubicinol, que apresenta efeito citotóxico potencializado (Cusak *et al.*,1993; Rang, 2001; Hilmer *et al.*,2004).

Como resultado deste estudo observamos que o modelo proposto tem aplicabilidade, pois houve metabolização da doxorrubicina após o ensaio apresentou GI_{50} inferior ao do ensaio citotóxico com aplicação direta em MCF-7 (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade antiproliferativa após exposição à HepG2

	MCF-7 (antes da exposição à HepG2)	MCF-7 (após exposição à HepG2)
SBP	4,089 ± 0,038	81,015 ± 0,086
SCM	3,895 ± 0,438	24,810 ± 0,157
CP*	0,235 ± 0,011	0,025 ± 0,097

Atividade citotóxica ($GI_{50} \pm SD$ $\mu\text{g/mL}$) das substâncias SBP e SCM em ensaio de 48 horas na linhagem celular de neoplasia de mama MCF-7 antes e após exposição prévia por 48 horas dos compostos à linhagem hepática neoplásica HepG2. CP* = Controle Positivo (doxorrubicina).

Diferente do observado no perfil de metabolização da doxorrubicina, as substâncias SBP e SCM apresentaram maior valor de GI_{50} após expostas pela HepG2. Para SBP a GI_{50} foi de 4,089 $\mu\text{g/mL}$ para 81,015 $\mu\text{g/mL}$ enquanto para SCM foi de 3,895 $\mu\text{g/mL}$ para 24,810 $\mu\text{g/mL}$.

As figuras 13 e 14 trazem a curva de citotoxicidade das substâncias antes e após estarem em contato com HepG2. A SBP perdeu a característica de ser dose dependente e ficou inativa até próximo da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, mostrando-se potencialmente ativa após esta concentração, confirmando a importância de continuar os estudos com esta concentração.

A substância SCM apresentou perfil diferente, e após exposta ao modelo de metabolização, não ocorre recuperação celular após a dosagem de 25 $\mu\text{g/mL}$, conforme evidenciado na figura 14.

Esta torna-se uma oportunidade futura de investigar eventuais alterações na estrutura química das substâncias após estarem em contato com a linhagem hepática neoplásica através de ensaios complementares.

Figura 13 – Gráfico de viabilidade celular da amostra SBP após exposição prévia à HepG2

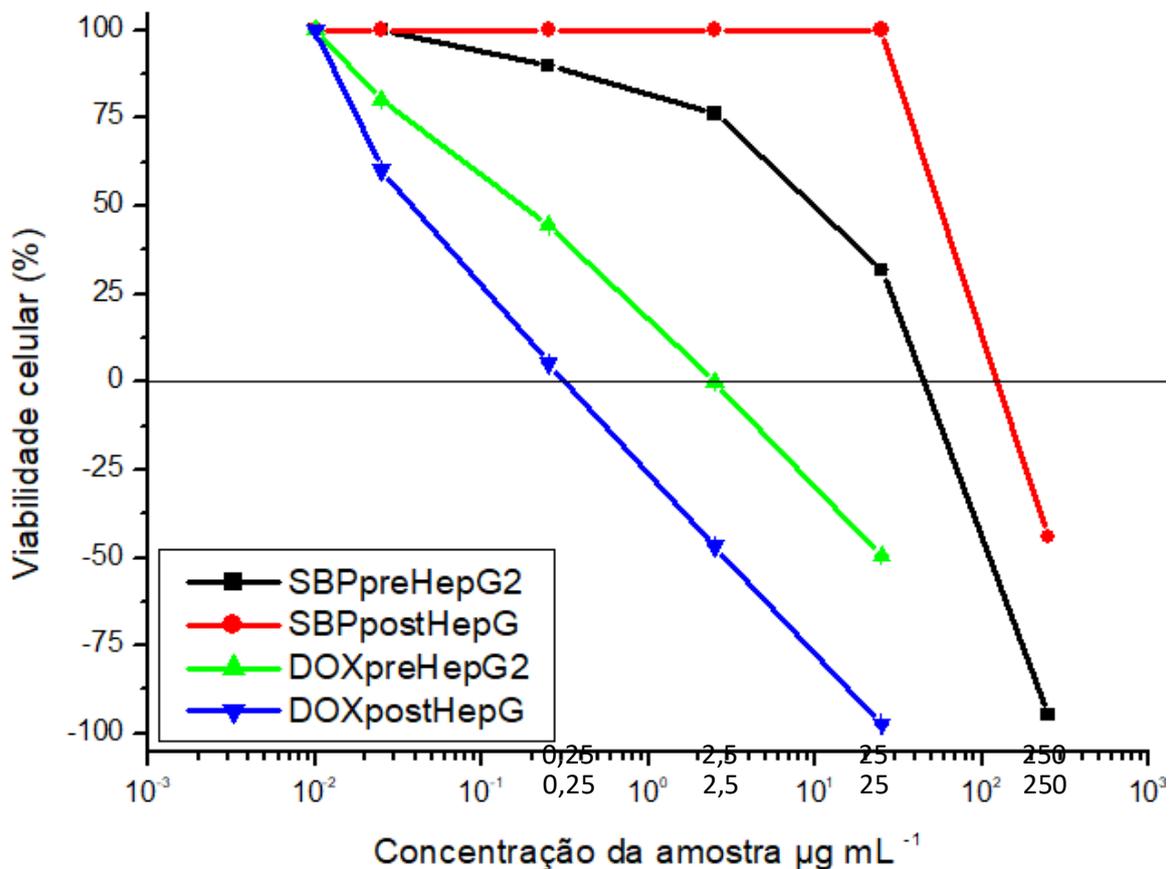


Gráfico apresentando o crescimento celular (com desvio padrão) ponto a ponto das concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL para SBP e 0,025; 0,25, 2,5 e 25µg/mL para doxorubicina (controle positivo) na linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) no tempo 48 horas, comparativamente antes (pre) e após (post) exposição à linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2).

Figura 14 – Gráfico de viabilidade celular da amostra SCM após exposição prévia à HepG2

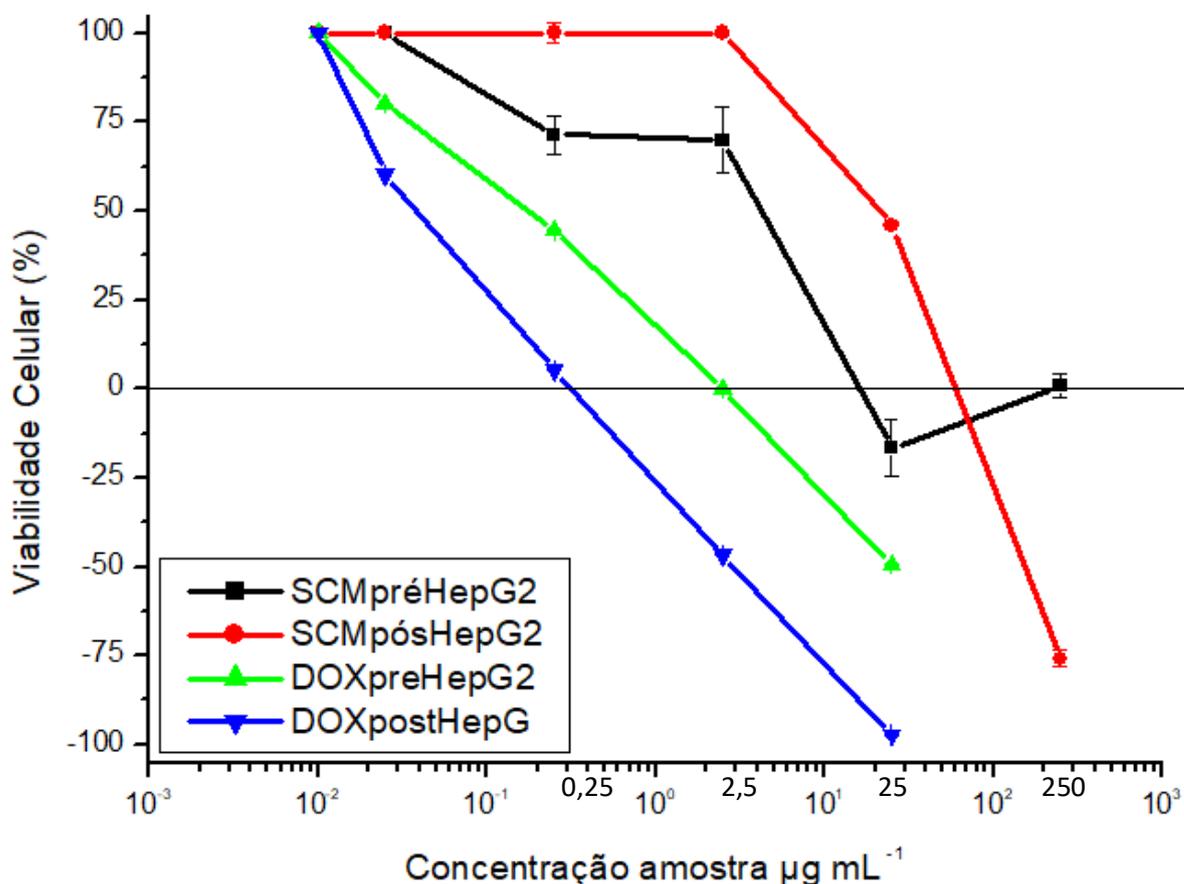


Gráfico apresentando o crescimento celular (com desvio padrão) ponto a ponto das concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL para SBP e 0,025; 0,25, 2,5 e 25µg/mL para doxorubicina (controle positivo) na linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) no tempo 48 horas, comparativamente antes (pre) e após (post) exposição à linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2).

5.1.3. Sensibilização celular

A sensibilização celular refere-se ao processo de injúria celular leve que deixa a célula com menos potencialidade para responder ao segundo e mais potente estímulo de injúria (tratamento com doxorubicina) objetivando-se diminuir a concentração da doxorubicina e obter mesmo efeito antiproliferativo.

Já conhecendo o perfil citotóxico das amostras estas foram usadas para sensibilizar as células MCF-7 aplicando os compostos por 24 horas antes da utilização da doxorubicina. Os valores encontrados (tabela 3) foram considerados

ativos e a avaliação desta associação foi aprofundada nos ensaios de migração, clonogênico e esferoides (cultura 3D).

Tabela 3 – Atividade antiproliferativa de compostos associados à doxorrubicina

	MCF-7*
SBP	24,031 ± 0,155
SCM	29,182 ± 0,124
CP**	0,235 ± 0,011

Atividade citotóxica ($GI_{50} \pm SD$ $\mu\text{g/mL}$) das substâncias SBP e SCM na linhagem celular de neoplasia de mama MCF-7 *em associação (por 24 horas) a doxorrubicina na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. CP** = controle Positivo (doxorrubicina).

As avaliações de citotoxicidade podem ir além do conhecimento da GI_{50} , avaliando o comportamento celular em cada concentração com o objetivo de encontrar um possível composto que quando associado ao medicamento de escolha, resulte em sinergismo ou que ao menos sensibilize as células à ação do medicamento. (Singh *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Chandrika *et al.*, 2016; Minaei *et al.*, 2016).

Abaixo (figura 15) é possível avaliar o comportamento do tratamento das células MCF7 com SBP (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) em associação com a doxorrubicina (2,5 $\mu\text{g/mL}$). Observa-se que a associação influenciou negativamente no efeito da doxorrubicina, uma vez que a resposta da combinação foi menor do que a resposta da doxorrubicina a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, isoladamente. Não é possível identificar qual foi a interação entre a doxorrubicina e a substância, sendo necessário outros estudos para esta avaliação, como o uso de isobogramas para caracterizar o tipo de efeito, conforme Chou, 2006. Ou ainda estudos análises através de HPLC para detectar a possível formação de compostos intermediários.

Figura 15 – Gráfica de viabilidade celular da amostra SBP associada à doxorubicina

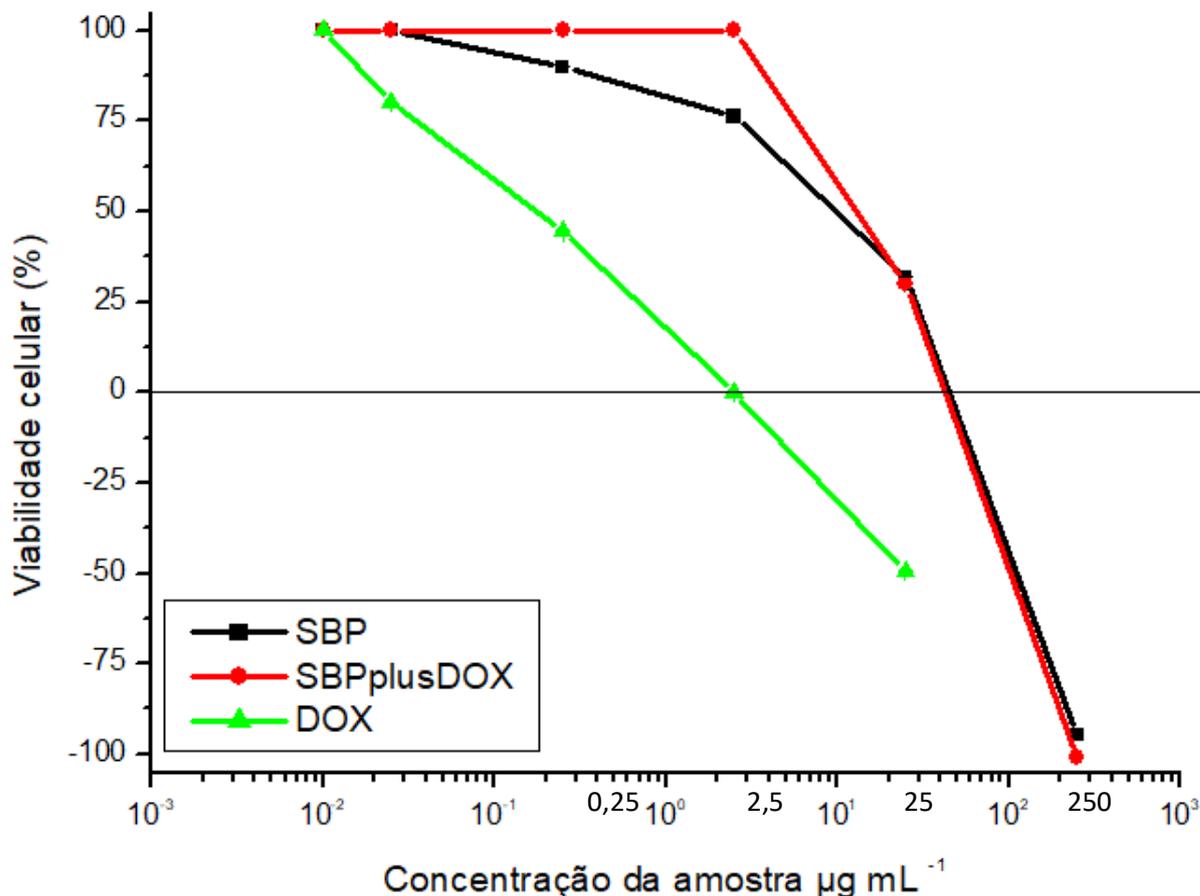


Gráfico apresentando o crescimento celular (com desvio padrão em µg/mL) ponto a ponto das concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL para SBP e 0,025; 0,25, 2,5 e 25µg/mL para doxorubicina (controle positivo) na linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) no tempo 48 horas, comparativamente entre amostra SBP atuando isoladamente em MCF-7 e atuando em associação com quimioterápico doxorubicina (plusDOX) na concentração de 2,5µg/mL.

A avaliação da resposta celular ao tratamento da associação entre a SCM e a doxorubicina foi positiva na concentração de 250 µg/mL de SCM, pois impediu a recuperação celular (Figura 16).

Figura 16 – Gráfico de viabilidade celular da amostra SCM associada à doxorrubicina

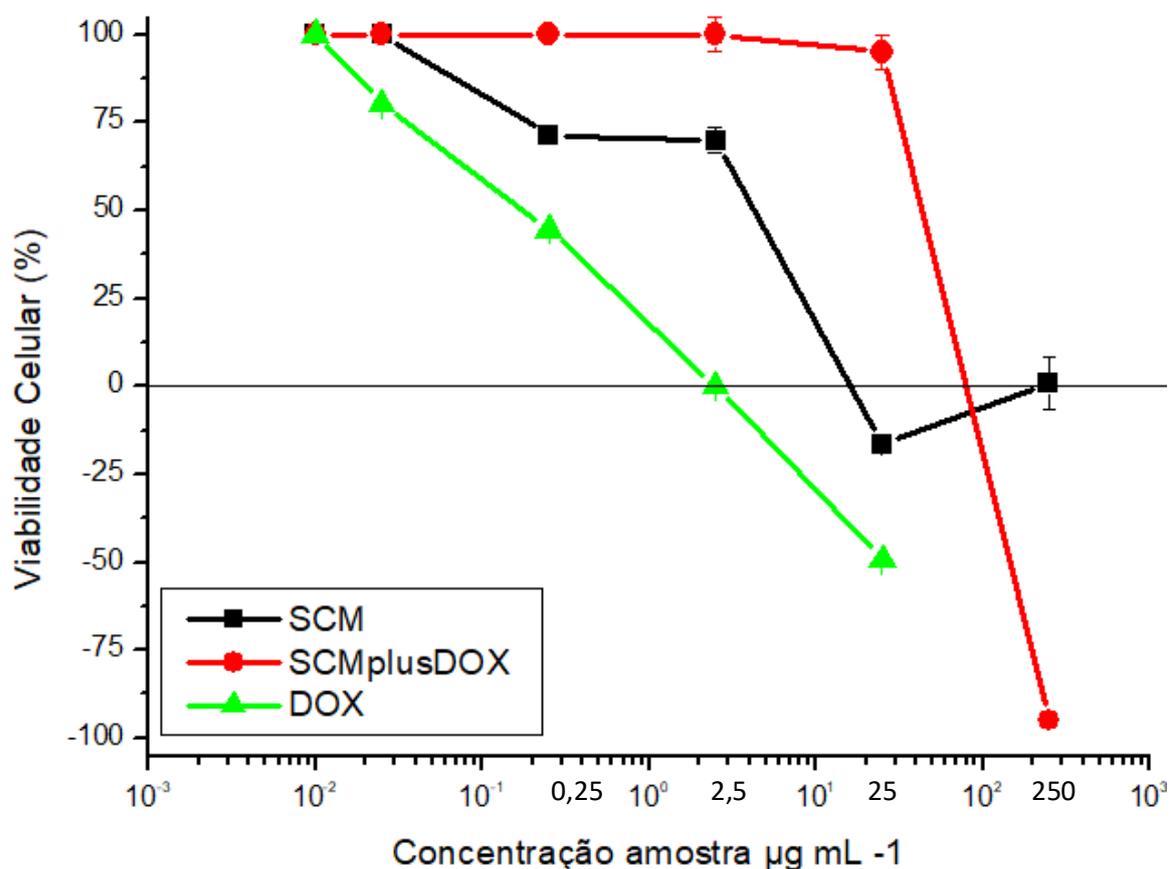


Gráfico apresentando o crescimento celular (com desvio padrão em µg/mL) ponto a ponto das concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL para SBP e 0,025; 0,25, 2,5 e 25µg/mL para doxorrubicina (controle positivo) na linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) no tempo 48 horas, comparativamente entre amostra SBP atuando isoladamente em MCF-7 e atuando em associação com quimioterápico doxorrubicina (plusDOX) na concentração de 2,5µg/mL.

5.2. Migração celular (via *scratch assay*)

O ensaio de migração celular, do inglês *scratch assay* ou até mesmo *wound healing assay*, é um método de relativo baixo custo e fácil execução, capaz de ser performado em modelo de culturas celulares de monocamada. Através deste ensaio é possível inferir a capacidade migratória celular e obter informações das interações celulares de unidades vizinhas e até mesmo das interações com o meio no qual estão inseridas (Liang *et al.*, 2007).

A importância no estudo da capacidade migratória celular abrange uma série de processos, sejam estes fisiológicos ou patológicos. Pontualmente no caso de processos neoplásicos, como o câncer de mama, este ensaio é uma ferramenta importante no auxílio da investigação de metástase. Este pode ser um dos momentos em que a pesquisa *in vitro* começa a encontrar-se com definições clínicas.

Ao tratar de câncer de mama é inevitável a abordagem de metástase. Brevemente, em processos malignos, as células alteradas crescem de forma desenfreada. A tendência é que quando não tratado, ou quando resistente ao tratamento, o tumor cresça de tal forma que seja capaz de atingir vasos sanguíneos ou vasos linfáticos.

As células que apresentem capacidade de se desprender da massa tumoral conseguem atingir outros tecidos através do fluxo sanguíneo ou linfático iniciando, assim, a metástase.

Objetiva-se que as células, sob ação das substâncias, se comportem, minimamente, de forma similar àquelas células sob presença de quimioterápico já conhecido, mesmo que as causas para tal não sejam necessariamente as mesmas.

O resultado do ensaio de migração celular é possível de ser observado nas figuras 17 e 18, para SBP e SCM, respectivamente.

O espaço entre as margens criadas na monocamada foi mensurado em 3 campos distintos obtendo-se a média e o desvio padrão, no tempo total de 48 horas de incubação

Em todos os casos, no tempo 0 (zero) hora percebe-se a total ausência de células desprendidas no meio permitindo inferir que nenhuma célula restou após a correta lavagem do poço. Nota-se, também, que com o decorrer do tempo (24 e 48h) não houve a formação de nenhuma colônia ao centro do poço, onde há o vazio

criado pelo risco na camada celular. Desta forma, tem-se que nenhuma célula se desprende das margens ou então que caso tenha se desprendido não conseguiu manter-se viável a ponto de aderir novamente ao fundo do poço da placa para formar nova colônia.

Faz-se interessante observar que com o decorrer do tempo, as células, especialmente aquelas encontradas às margens, se apresentaram com bordas mais irregulares, menores e com maior espaço por entre elas, diminuindo, portanto, a confluência.

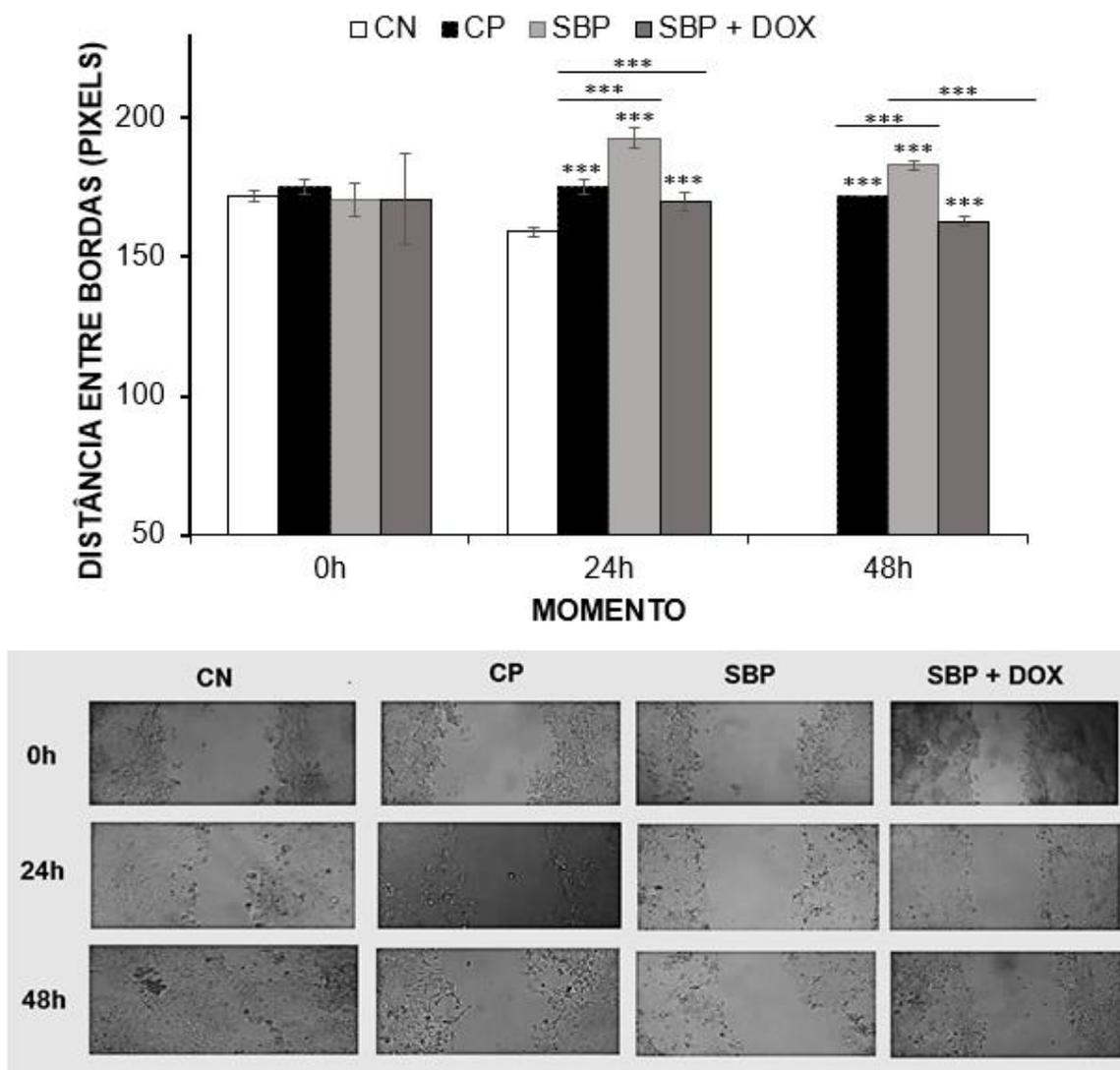
5.2.1. SBP

A ação de SBP sobre o processo de migração celular apresentou diferença significativa quando comparada ao controle negativo.

Quando se associa este mesmo composto a própria doxorrubicina, tem-se a presença de um comportamento similar.

Sugere-se, portanto que o SBP, sozinho ou associado, nesta concentração, é capaz de deter que células neoplásicas escapem da massa tumoral, e criem colônias em localizações distintas (*in vitro*).

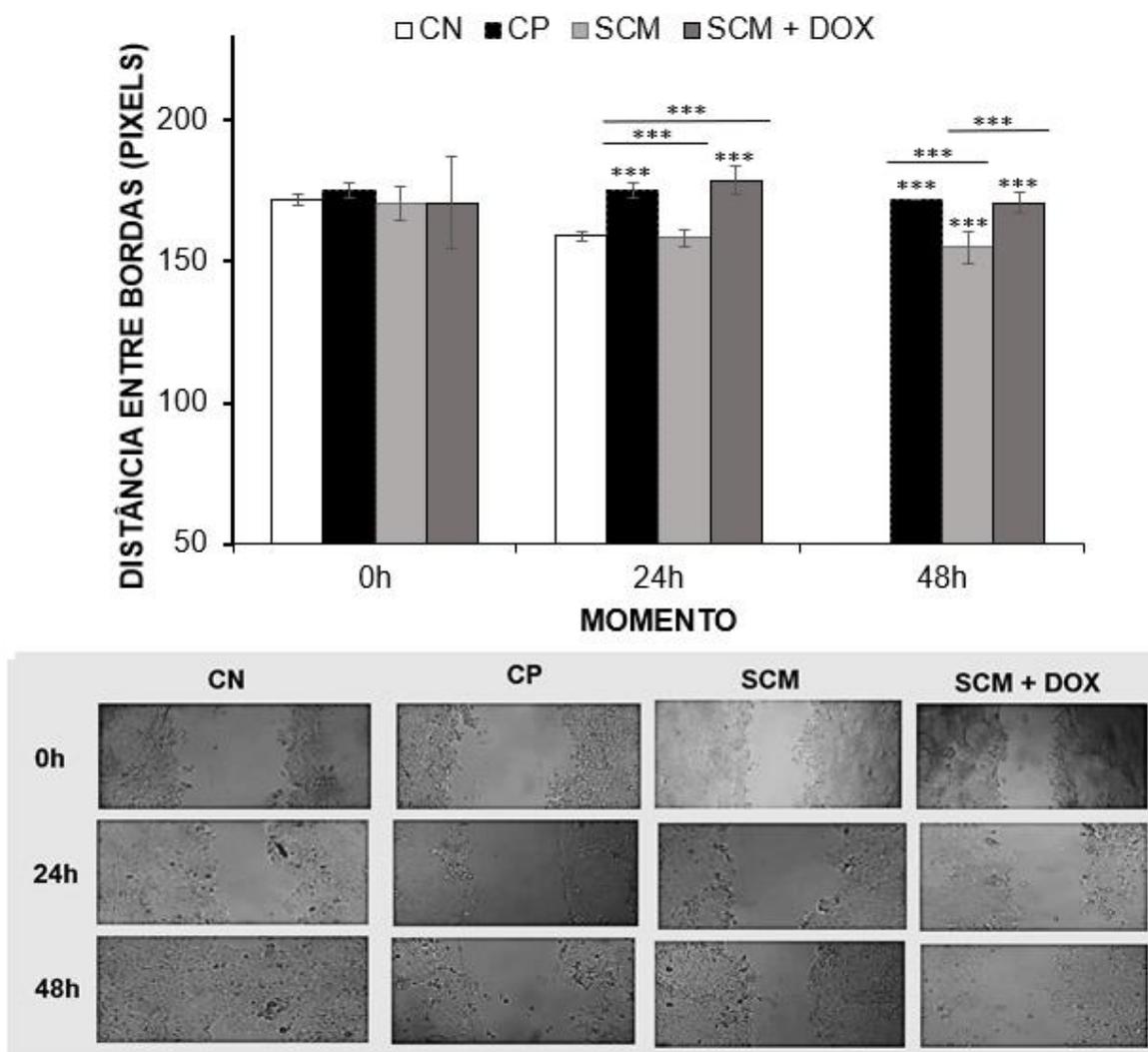
Figura 17 – Imagens e gráficos representativos do ensaio de ranhura (*scratch assay*) antes e após o tratamento com a amostra SBP e doxorrubicina



Acima: gráfico apresentando efeito de SBP (25 µg/mL) associado ou não com doxorrubicina (2,5µg/mL) na migração celular na linhagem MCF-7. *** p < 0,001, ** p<0,01, * p <0,05; Abaixo: compilado de imagens apresentando efeito de SBP isoladamente e associada com doxorrubicina em MCF-7. Registro fotográficos foram feitos nos tempos 0, 24 e 48 horas em microscópio óptico comum em aumento de 40x.

5.2.2. SCM

Figura 18 – Imagens e gráficos representativos do ensaio de ranhura (*scratch assay*) antes e após o tratamento com a amostra SCM e doxorrubicina



Acima: gráfico apresentando efeito de SCM (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) associado ou não com doxorrubicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na migração celular na linhagem MCF-7. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; Abaixo: compilado de imagens apresentando efeito de SCM isoladamente e associada com doxorrubicina em MCF-7. Registro fotográficos foram feitos nos tempos 0, 24 e 48 horas em microscópio óptico comum em aumento de 40x.

SCM, isoladamente e quando associada com a doxorrubicina, apresentou significativa diferença em comparação ao próprio controle negativo e positivo.

Significando, portanto, que há um potencial de ação diferenciado para este composto.

5.3. Ensaio Clonogênico

O ensaio clonogênico permite avaliar a capacidade de formação de colônias mesmo após a ação dos compostos nas células. Este ensaio permite realizar a ponte do *in vitro*, através da fração sobrevivente, com o conceito clínico de recidivas tumoral (Franken *et al.*,2006).

Este conceito representa a capacidade de um tumor, mesmo após o tratamento, voltar a ocorrer no mesmo indivíduo, pois de alguma forma, houve a presença de células que foram resistentes ao tratamento de escolha, e conseguiu manter a capacidade de replicação (Peres *et al.*, 2015).

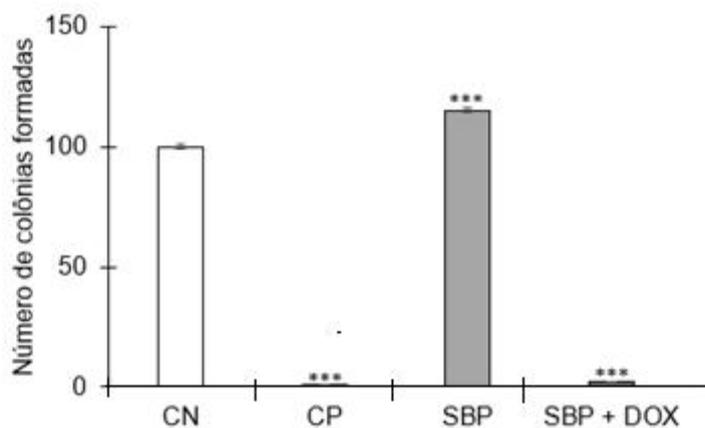
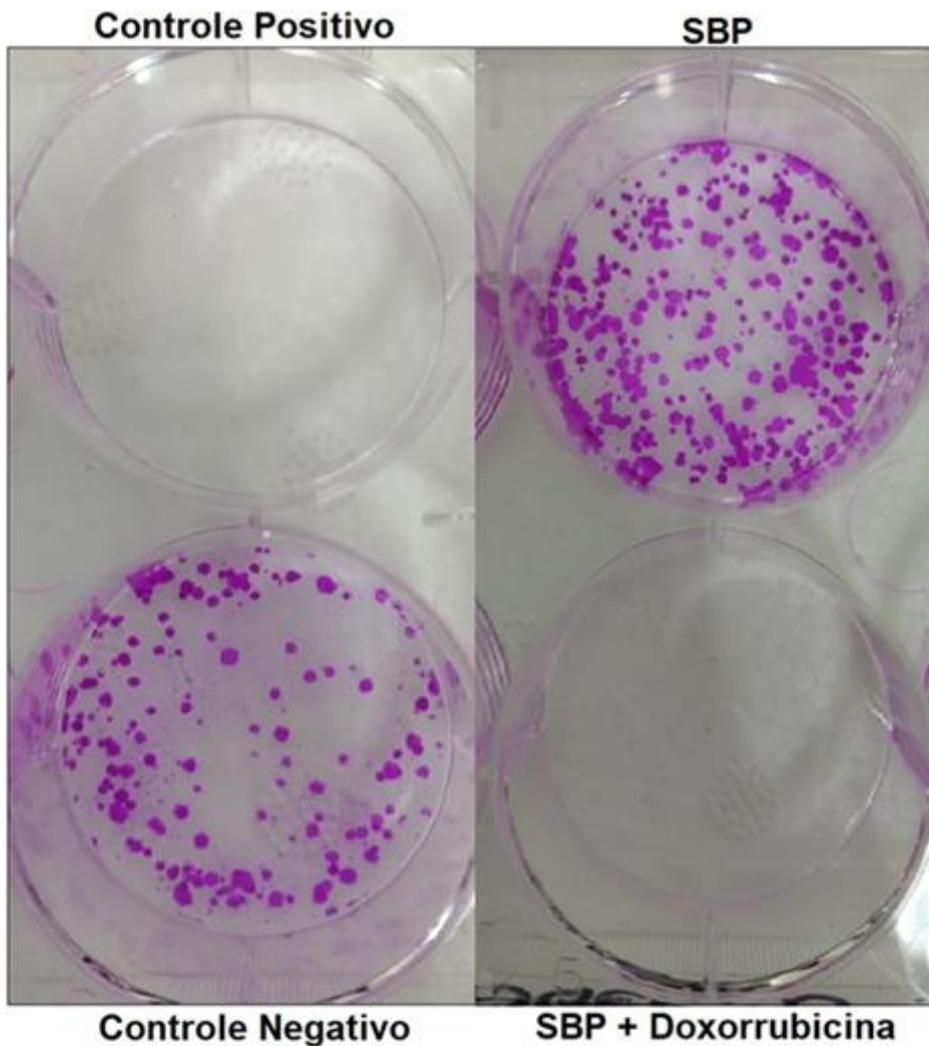
Ao controle negativo evidencia-se o crescimento de colônias, enquanto ao controle positivo não houve formação de colônias. Reforça-se que se considera colônias quando existe mais de 50 células agrupadas. Isso indica que células sob ação do quimioterápico não conseguem se recuperar e formar colônias. Resultado este corroborado com outras pesquisas que também utilizaram MCF-7 e tratamento com doxorrubicina (Zhou *et al.*,2007; Khan *et al.*, 2017).

5.3.1. SBP

Evidencia-se, conforme Figura 19, que SBP em associação com doxorrubicina apresentou comportamento similar ao próprio controle positivo. Esta informação faz-se importante pelo fato de que é bom indicativo de que a substância analisada em conjunto com o quimioterápico continua apresentando atividade biológica.

Em relação à SBP isolada nota-se um possível comportamento de recuperação celular, o qual abre portas para futuras investigações para tentar compreender o comportamento celular frente ao composto-teste.

Figura 19 – Imagens representativas do teste clonogênico, com as colônias analisadas após tratamento com SBP, doxorrubicina e controles

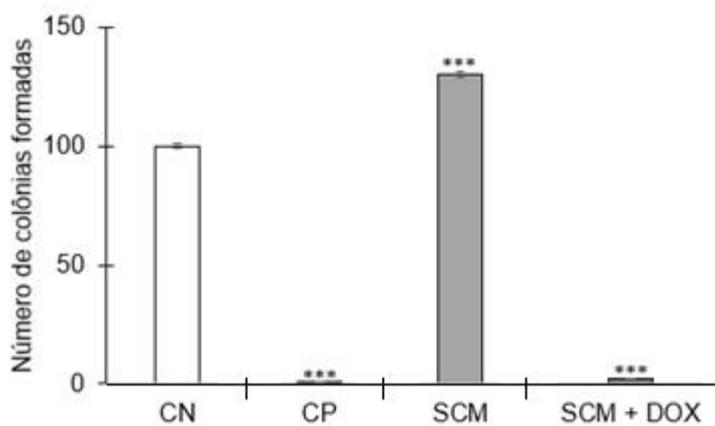
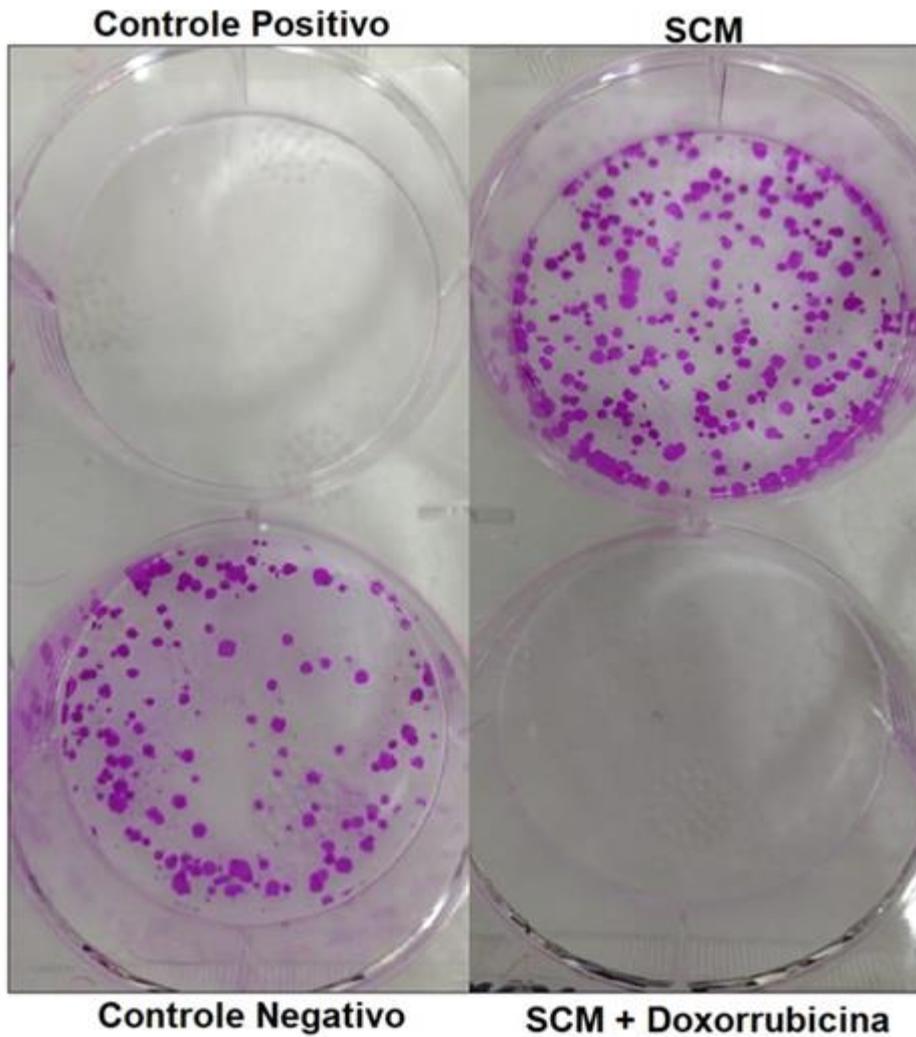


Acima: Registro fotográfico, sem intermédio de microscópio, após os 12 dias finais de incubação pós contato com os compostos-teste. Utilizada a GI_{50} da amostra e da doxorrubicina obtida no ensaio de

citotoxicidade de 48 horas. Controle Negativo: meio completo com DMSO; Abaixo: Gráfico apresentando o número de colônias formadas em cada poço.

5.3.2. SCM

Figura 20 – Imagens representativas do teste clonogênico, com as colônias analisadas após tratamento com SCM, doxorubicina e controles



Acima: Registro fotográfico, sem intermédio de microscópio, após os 12 dias finais de incubação pós contato com os compostos-teste. Utilizada a GI_{50} da amostra e da doxorrubicina obtida no ensaio de citotoxicidade de 48 horas. Controle Negativo: meio completo com DMSO; Abaixo: Gráfico apresentando o número de colônias formadas em cada poço.

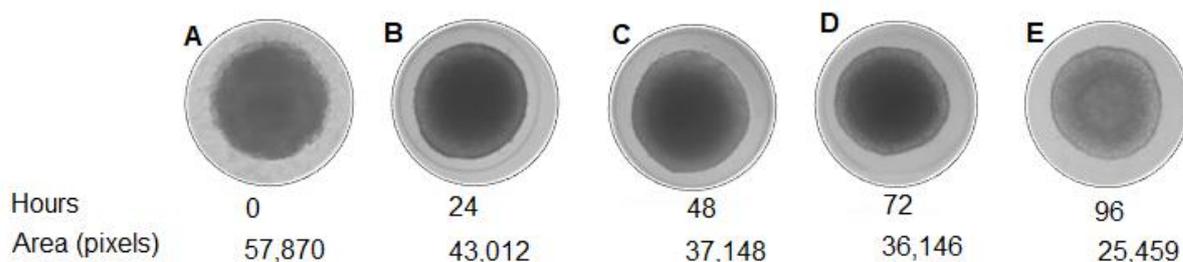
A amostra SCM apresentou comportamento (Figura 20) ao descrito em SBP. Ao se associar com doxorubicina comportou-se de forma similar ao controle positivo, enquanto ao atuar isoladamente na linhagem neoplásica apresentou recuperação celular e formação de colônias.

5.4. Esferoides

5.4.1. Formação dos esferoides

A figura 21 demonstra a formação dos esferoides em uma janela de tempo de 96 horas totais, com registros fotográficos a cada 48 horas em microscópio invertido, campo claro, lente objetiva de 40x.

Figura 21 – Fotomicrografias dos esferoides nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas



Fotografias realizadas em campo claro com lente objetiva de 40x em microscópio invertido. A área foi mensurada em pixels utilizando o *software* ImageJ.

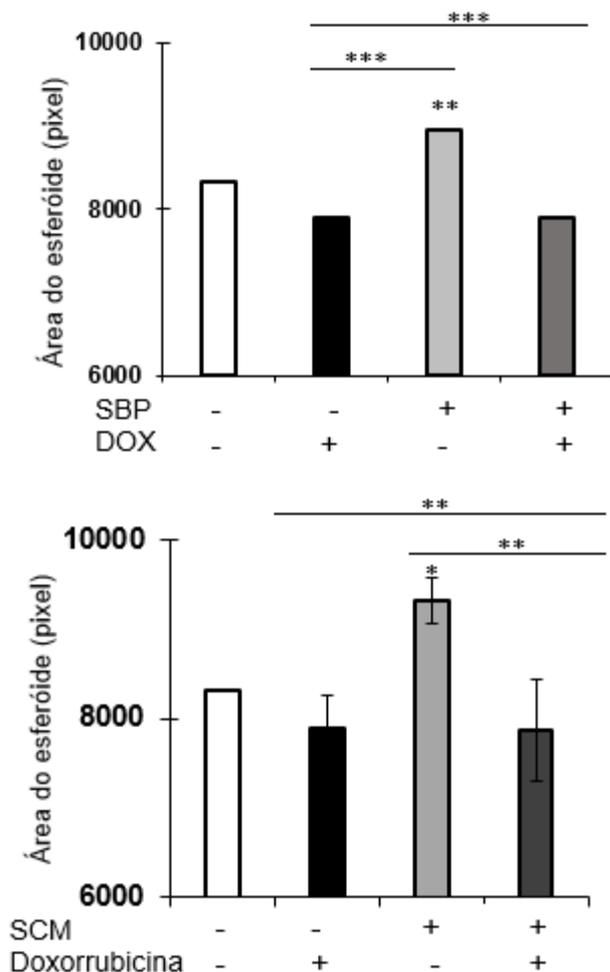
No primeiro momento (Figura 21 - A) não há delimitação da área, e as células estão ainda dispersas na cavidade do molde. Evidencia-se, no decorrer do tempo, a compactação do esferoide, traduzido pela área total (em pixels) e pela delimitação visível deste.

Quando os esferoides atingiram 96 horas, momento de maior compactação celular, estes seguiram para os ensaios descritos (Figura 21 – E).

5.4.2. Área dos esferoides

Os esferoides foram avaliados quanto a sua área total para que fosse determinado se houve ou não redução da estrutura tridimensional.

Figura 22 – Área do esferoide de acordo com tratamento



Área dos esferoides, mensurada em pixels, no tempo final de incubação de 48 horas. Área medida utilizando *software* ImageJ. Houve diferença estatística quando * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Os resultados que indicam aumento da área do esferoide podem ser justificados pelo fato de que as células que compunham os esferoides em questão deixaram de estar tão compactadas como inicialmente.

A perda da compactação celular indica que as substâncias conseguiram adentrar o interior do esferoide. Situação fica evidente ao realizar a coloração dos esferoides com laranja de acridina e brometo de etídio.

5.4.3. Azul de Tripán

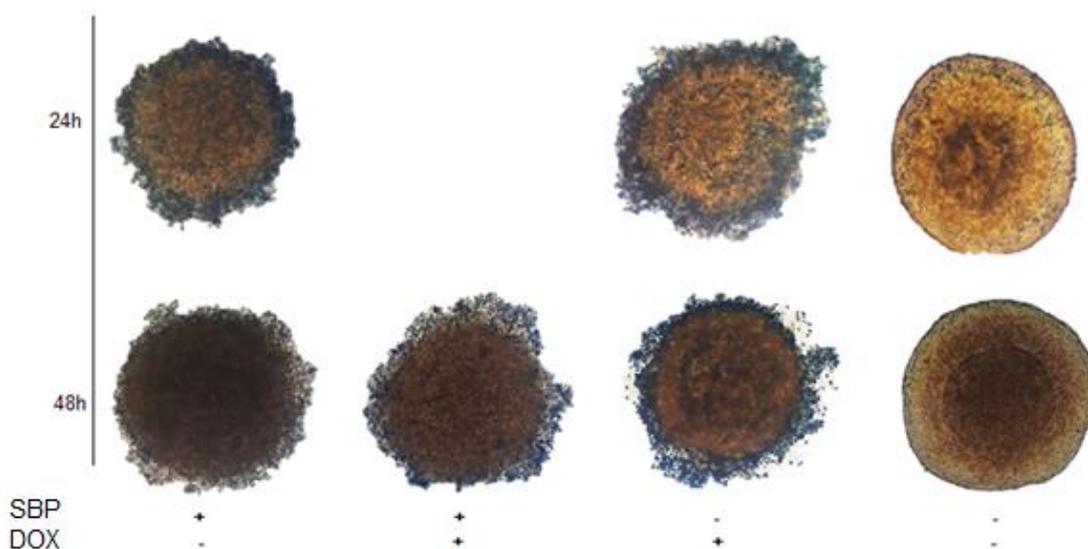
O Azul de Tripán permite evidenciar as células não viáveis, corando-as de azul, enquanto as células viáveis, em campo claro, permanecem com coloração neutra (Tennant, 1964).

Verifica-se que todos os esferoides, sob ação de SBP, SCM e/ou doxorrubicina, com exceção do controle negativo, perderam a integridade de sua forma, e as células encontradas na zona quiescente foram coradas de azul, indicando a não viabilidade celular.

Os padrões analisados são: células inviáveis que se desprendem da matrix extracelular; dimorfismo e tamanho do esferoide.

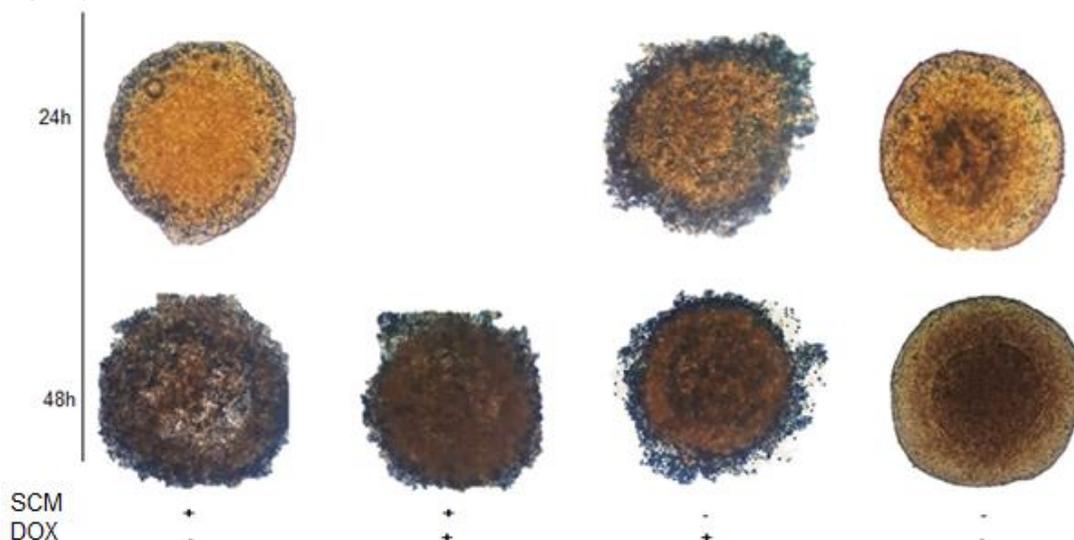
Na figura 24 é possível notar que o esferoide sob ação de SCM perdeu completamente a compactação celular, evidenciando-se que até mesmo a zona necrótica se desfez.

Figura 23 – Fotomicrografia dos esferoides sob ação de SBP (coloração azul de tripan)



Capturas fotográficas realizadas em microscópio invertido de campo claro no aumento de 40x. SBP: 25µg/mL; Doxorrubicina: 2,5µg/mL

Figura 24 – Fotomicrografia dos esferoides sob ação de SCM (coloração azul de tripan)



Capturas fotográficas realizadas em microscópio invertido de campo claro no aumento de 40x. SCM: 25µg/mL; Doxorrubicina: 2,5µg/mL

5.4.4. Laranja de Acridina/Brometo de Etídio (LA/BE)

Os esferoides também foram avaliados na coloração LA/BE. Essa coloração permite que seja evidenciado, em microscópio de fluorescência, a viabilidade do núcleo celular.

O corante laranja de acridina pode ser absorvido tanto por células viáveis quanto não viáveis, e ao se intercalarem ao DNA emitem cor verde em fluorescência. Da mesma forma ocorre com o brometo de etídeo, porém permanece apenas nas células com alteração na integridade de membrana e emitirá coloração alaranjada, marcando células inviáveis.

Associado à LA utilizou-se o brometo de etídeo que é capaz de permanecer apenas nas células que apresentem alteração de membrana (canais de efluxo prejudicados), seja por apoptose ou por necrose assumindo coloração avermelhada (Kasibhatla *et al.*, 2006).

Sendo assim, células viáveis serão coradas de verde. Células em apoptose inicial coram-se em verde com pontos alaranjados no núcleo. Células em processo de apoptose tardia conseguem absorver o brometo de etídeo, devido a perda da integridade de membrana, e irão corar de alaranjado. Células necróticas tendem a apresentar a coloração avermelhada (Kasibhatla *et al.*, 2006).

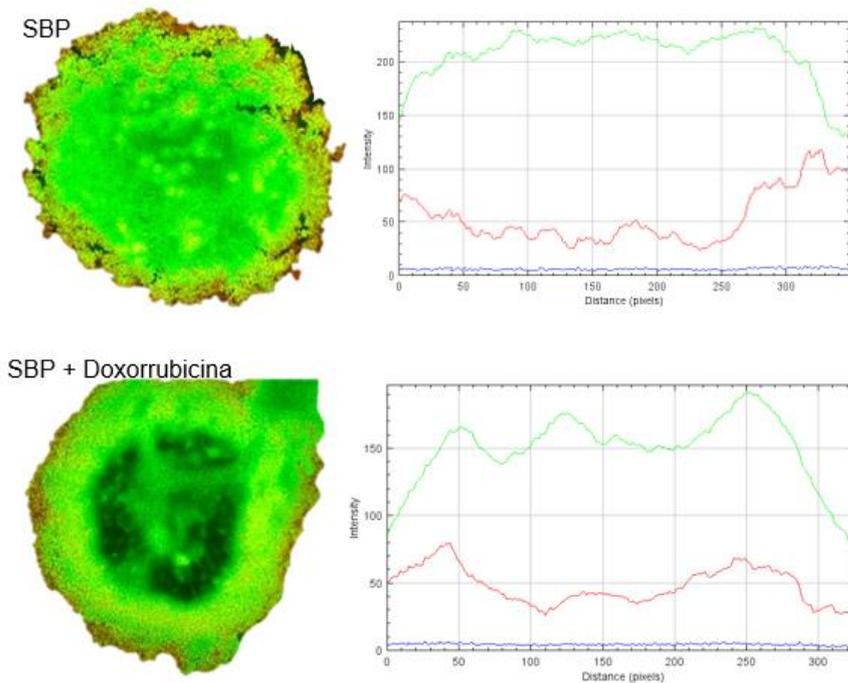
Corroborando com o que foi evidenciado na coloração por azul de Trypan, todos os esferoides, com exceção do controle negativo, apresentaram células não viáveis.

É importante diferenciar o processo de apoptose e necrose. A primeira ocorre de forma programada, e não há necessariamente alteração de membrana. É um processo comum na fase S durante a checagem do DNA e pode ocorrer devido ação de medicamentos, como por exemplo, aqueles utilizados na quimioterapia.

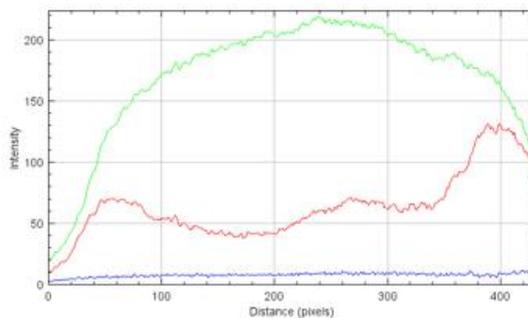
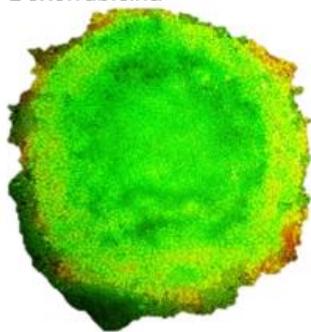
A necrose por sua vez é causada pela ação de enzimas lisossômicas, e ao causar a morte celular, sua membrana sofre desintegração. No entanto não é possível fazer esta distinção com esta metodologia.

5.4.4.1. SBP

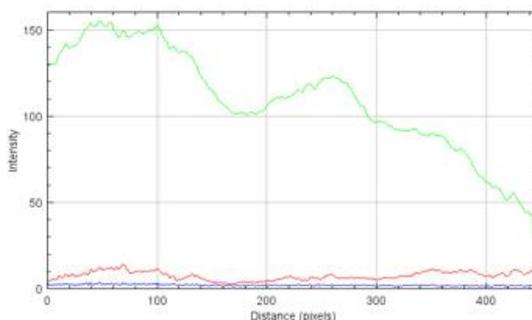
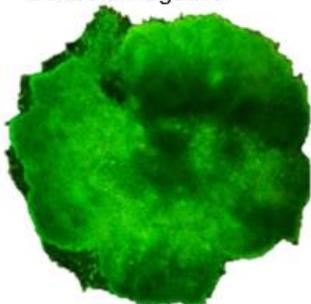
Figura 25 – Fotomicrografia dos esferoides após tratamento com SBP (coloração LA/BE)



Doxorrubicina



Controle Negativo



Capturas fotográficas realizadas em 48 horas de incubação no aumento de 40x m microscópio de fluorescência. Gráfico gerado em *software* ImageJ quantificando a coloração de cada estrutura, que por sua vez indica o dano celular causado: Em verde são células viáveis e em vermelho são células não viáveis. Concentração de amostras: SBP: 25µg/mL; Doxorubicina: 2,5µg/mL

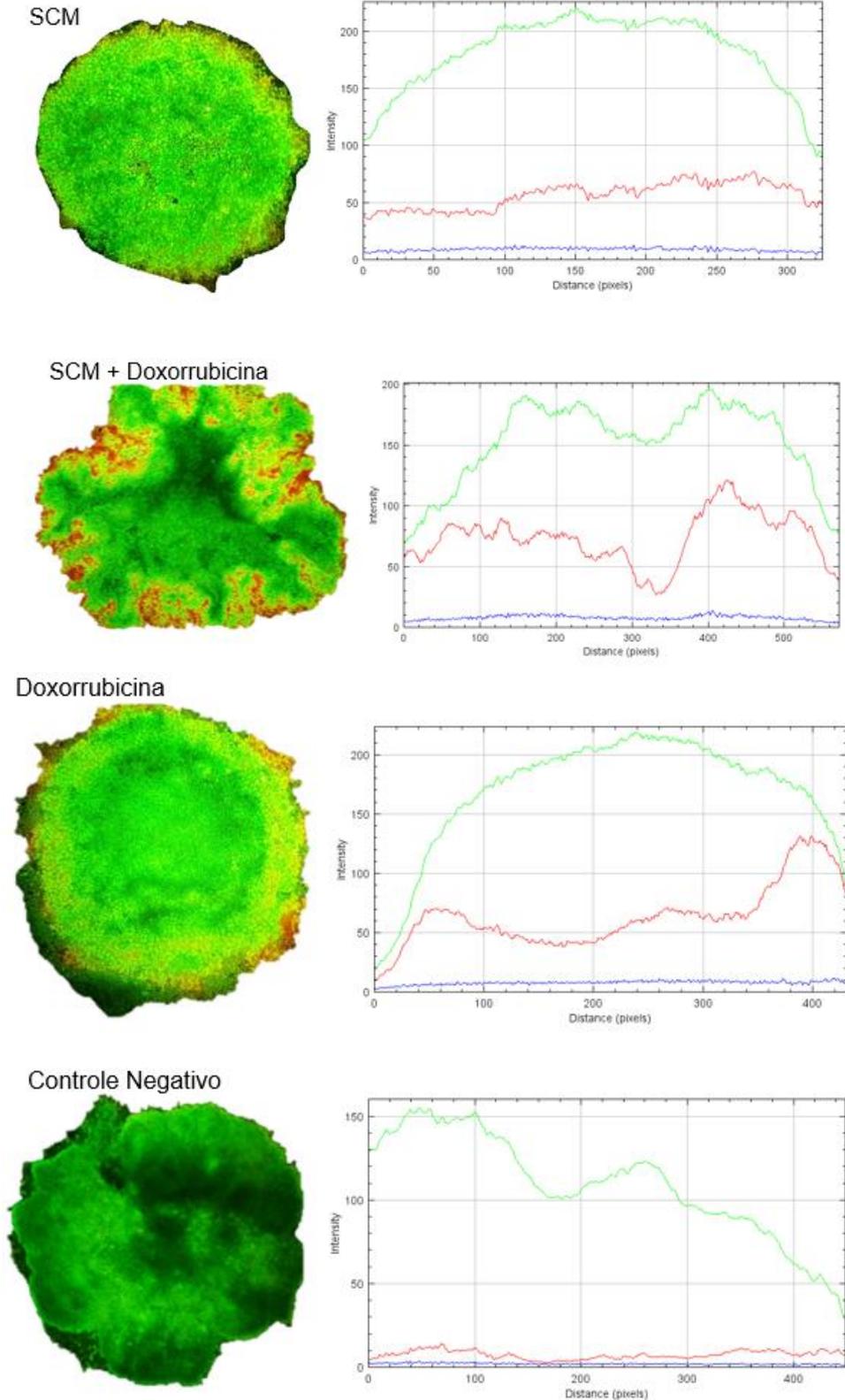
A SBP, apresenta um perfil de efeito superficial e de penetração na massa celular, semelhante ao controle positivo, com células coradas em verde fluorescente e laranjadas tanto na superfície em maior proporção quanto nos pontos visualizados na região interna. De fato, a substância derivada da própolis negra, ao agir sozinha na linhagem MCF-7 conseguiu penetrar ao esferoide e descompactar as células que o formava.

Nota-se na associação de SBP com doxorubicina que a zona necrótica foi acessada pelos compostos, de desfazendo quase que por completo sobrando espaços em vazios no meio do esferoide.

Sendo assim, por avaliação qualitativa e colorimétrica, se fez importante investir na pesquisa de mecanismos de ação de SBP.

5.4.4.2. SCM

Figura 26 – Fotomicrografia dos esferoides após tratamento com SCM (coloração LA/BE)



Capturas fotográficas realizadas em 48 horas de incubação no aumento de 40x m microscópio de fluorescência. Gráfico gerado em *software* ImageJ quantificando a coloração de cada estrutura, que por sua vez indica o dano celular causado: Em verde são células viáveis e em vermelho são células não viáveis. Concentração de amostras: SBP: 25µg/mL; Doxorubicina: 2,5µg/mL

Agindo sozinho, SCM resultou em coloração verde fluorescente na região interna do esferoide, indicando que não houve injúria celular nesta região após o tratamento com a amostra. A ação da amostra foi sobre as células da superfície do esferoide.

Chama-se atenção para SCM associado a doxorubicina que apresentou elevada presença de células inviáveis em comparativo com seus pares. Visualmente, a associação das substâncias contribuiu para maior penetração no esferoide.

Triterpenos são usualmente hidrofóbicos, o que facilita sua passagem pela membrana celular, incluindo a membrana mitocondrial, facilitando sua chegada ao núcleo celular (Molnar *et al.*, 2006). Sendo assim é possível teorizar que SCM tenha capacidade de sensibilizar a célula ao interagir e atravessar as membranas fosfolipídicas, facilitando o acesso do quimioterápico.

5.5. Avaliação dos marcadores de Estresse Oxidativo e defesas antioxidante

Espécies reativas de oxigênio são extremamente instáveis, dificultando a sua mensuração direta. A estratégia para avaliar o dano causado pelo estresse oxidativo é analisar outros marcadores que indiquem esse processo.

O primeiro indicador de dano oxidativo foi a medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, abreviada como TBARS. O ensaio de TBARS permite mensurar a quantidade de ácido malondialdeído (MDA), um dos principais produtos da lipoperoxidação.

Peroxidação lipídica é o processo em que radicais livres reagem com ácidos graxos poli-insaturados, incluso os de membrana celular, de modo a formar produtos denominados radicais lipídicos (Esterbauer *et al.*, 1991).

Esta reação ocorre em três etapas distintas, sendo a iniciação, propagação e finalização:

Iniciação é a etapa em que um ácido graxo é atacado por uma espécie reativa de oxigênio. Os iniciadores mais comuns desta reação são o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e hidroperoxila (HO_2^-) que reagem tomando um hidrogênio de um grupo metileno vizinho a uma ligação insaturada (por isso a preferência por poli-insaturados) formando água e um radical lipídico (Esterbauer *et al.*, 1991).

A etapa de propagação é o momento em que o radical de ácido graxo (o qual não é uma molécula estável) reage prontamente com oxigênio, criando assim um radical peroxilalipídico. Este radical também é instável reagindo com outro ácido graxo livre formando um novo radical livre, um peróxido lipídico ou um peróxido cíclico (reação intra molecular) (Barbin *et al.*, 1981; Esterbauer *et al.*, 1991).

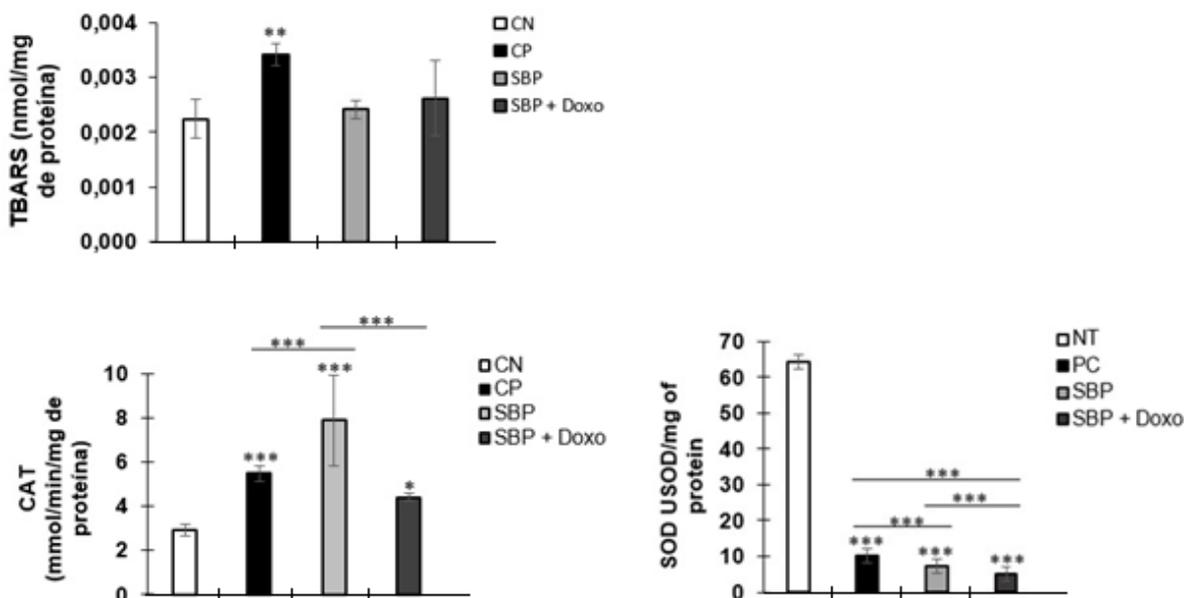
Ao fim, tem-se a etapa de finalização em que dois radicais reagem produzindo um não radical. Isso só acontece quando a concentração de espécies reativas é alta o suficiente para haver a probabilidade de dois radicais interagirem entre si (Barbin *et al.*, 1981; Esterbauer *et al.*, 1991).

Os produtos da peroxidação lipídica são aldeídos reativos, como malondialdeído e 4-hidroxinonenal. Ambos produtos podem apresentar efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Sabe-se que o aldeído MDA reage com desoxiadenosina e desoxiguanosina no DNA formando adutos de DNA, principalmente M1G (Esterbauer *et al.*, 1991; Cerbone *et al.*, 2007).

Com isso, a partir dos resultados obtidos no ensaio de TBARS (figura 27 e 29) tem-se no controle negativo o menor índice de dano à membrana celular. Como esperado, o controle positivo apresentou diferença significativa quando comparado ao controle negativo, indicando que as células que estavam sob ação da doxorubicina foram danificadas, tendo como resposta a produção, dentre outros, de MDA.

Na avaliação dos resultados é visível que a amostra SBP, estando ou não associado ao quimioterápico de escolha, instigou dano celular de forma significativa quando compara ao controle negativo.

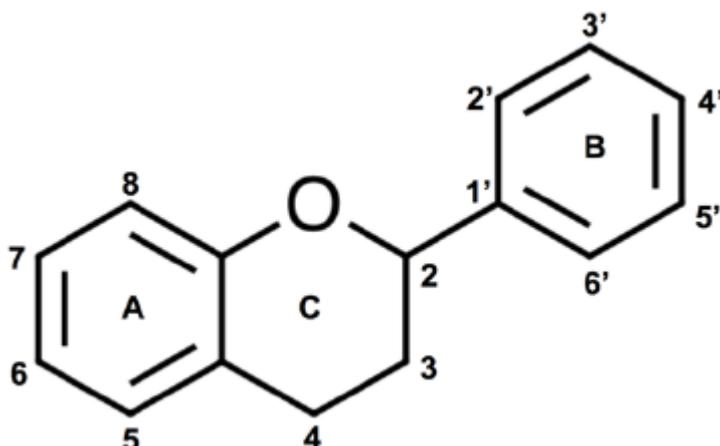
Figura 27 – Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes após tratamento dos esferóides com SBP



Marcador de dano oxidativo e defesas antioxidantes em esferóides (modelo 3D) de células MCF-7 (tumor de mama). Células em 3D foram tratadas com 25ug/mL de amostra SBP e 2,5ug/mL de doxorubicina (também utilizada como controle positivo). O tratamento causou dano celular resultando alteração no conteúdo de TBARS, bem como na atividade da catalase e SOD. As diferenças estatísticas, em relação ao controle negativo, foram consideradas quando $p < 0,05$, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Reforça-se que SBP, derivado da própolis negra, é um flavonoide e a estrutura química de um composto desta classe pode ser definida da seguinte forma, conforme anéis e ligações (Figura 28):

Figura 28 – Estrutura química de flavonoides



Fonte: Teixeira *et al.*, 2013

Justamente pelo arranjo químico, flavonoides podem atuar não somente como antioxidantes, mas como pro-oxidantes. A presença de grupos hidroxilas no anel B pode promover processos reação com radicais livres ao doarem hidrogênio para os radicais, estabilizando-os, através da seguinte reação: $F-OH + R\bullet \rightarrow F-O\bullet + RH$ (Heim *et al.*, 2002; Eghbaliferiz & Iranshahi, 2016).

Ao realizar esta doação, a própria molécula torna-se um radical livre, podendo interagir com lipídeos, proteínas e até mesmo o DNA, da mesma forma que faria uma ERO, justificando o aumento de MDA após exposição ao composto SBP.

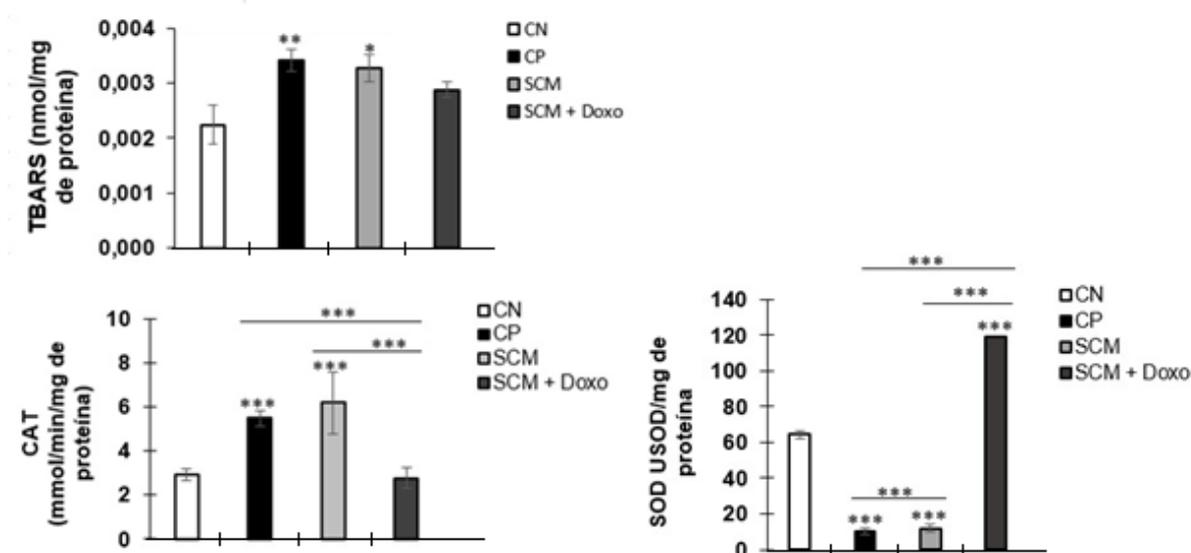
Outros estudos corroboram com os dados encontrados. Asgharpour *et al.*, 2018 também detectou atividade pró-oxidante de extrato etanólico de própolis na linhagem MCF-7. Outro flavonoide com potencial de estimular estresse oxidativo não somente em MCF-7 mas também em MDA MB-231 é apigenina, flavonoide com grupo hidroxila no anel B, conforme descrito por Madunic *et al.*, 2017.

Tsai *et al.*, 2011 também demonstrou a capacidade de diversos flavonoides (pinocembrina, crisina, and galangina) em induzir o estresse oxidativo *in vivo* através da formação de H_2O_2 .

A atividade antiproliferativa estimulada pelo SBP apresentou produção de EROs, o que ficou evidenciado pelos valores elevados da atividade da catalase. Os valores elevados de catalase sugerem elevada produção de peróxido de hidrogênio, uma importante ERO envolvida na sinalização de morte celular, quando em elevadas concentrações. Apesar disso, a atividade superóxido dismutase (SOD), não mostrou aumento nos esferoides tratados com doxorubicina, SBP ou ambos. Somado a isso, o conteúdo de TBARS não mostrou aumento significativo nos tratamentos, quando comparado ao controle negativo.

Em relação à análise do estresse oxidativo da substância SCM (figura 29) os resultados mostraram que a amostra foi capaz de induzir dano oxidativo à membrana celular (lipoperoxidação) conforme verificado no ensaio de TBARS. Novamente, isso pode ser explicado pela elevada produção de EROS (particularmente peróxido de hidrogênio), o que pode ser verificado por elevação da atividade da CAT. Apesar disso, curiosamente não houve alteração na atividade da SOD.

Figura 29 – Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes após tratamento dos esferoides com SCM



Marcador de dano oxidativo e defesas antioxidantes em esferóides (modelo 3D) de células MCF-7 (tumor de mama). Células em 3D foram tratadas com 25ug/mL de amostra SCM e 2,5ug/mL de doxorubicina (também utilizada como controle positivo). O tratamento causou dano celular resultando alteração no conteúdo de TBARS, bem como na atividade da catalase e SOD. As diferenças estatísticas, em relação ao controle negativo, foram consideradas quando $p < 0,05$, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Tem-se registrado na literatura a capacidade antioxidante dos triterpenos (Allouche *et al.*, 2011) porém estes também são capazes de incentivar, sob determinadas situações, a produção de espécies reativas de oxigênio como forma de causar dano celular.

Comparativamente, reforçando-se os dados encontrados, existem triterpenos de diferentes estruturas moleculares, que apresentaram ação oxidante em linhagem neoplásica MCF-7 (Cen *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2020)

Portanto, tem-se que a estrutura triterpenoide estudada no presente trabalho possui a característica de induzir ao dano celular através da produção de espécies reativas de oxigênio e que tal capacidade possa estar vinculada à sua estrutura química.

5.6. Avaliação do ciclo celular

O ensaio de ciclo celular faz-se importante para compreender o modo o qual o composto age no processo de divisão celular.

Com os resultados obtidos é possível verificar que as células não tratadas (controle negativo) tiveram a maior porcentagem de células paradas na etapa G1 do ciclo celular.

A doxorubicina (controle positivo) não é ciclo-celular específico e intercala-se com a dupla fita de DNA. Além disso é capaz de influir na produção de radical livre e na quebra do DNA através da enzima topoisomerase II (Dobson *et al.*, 2008).

A linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 tratada com doxorubicina (controle positivo) apresentou parada predominante de ciclo celular na etapa G2/M.

Corroborando com o encontrado na literatura em que a mesma linhagem celular foi submetida à doxorubicina (Bar-On *et al.*, 2007; Ku *et al.*, 2015).

A Figura 30 traz o gráfico de porcentagem de células versus a fase do ciclo celular das células sob ação de SBP.

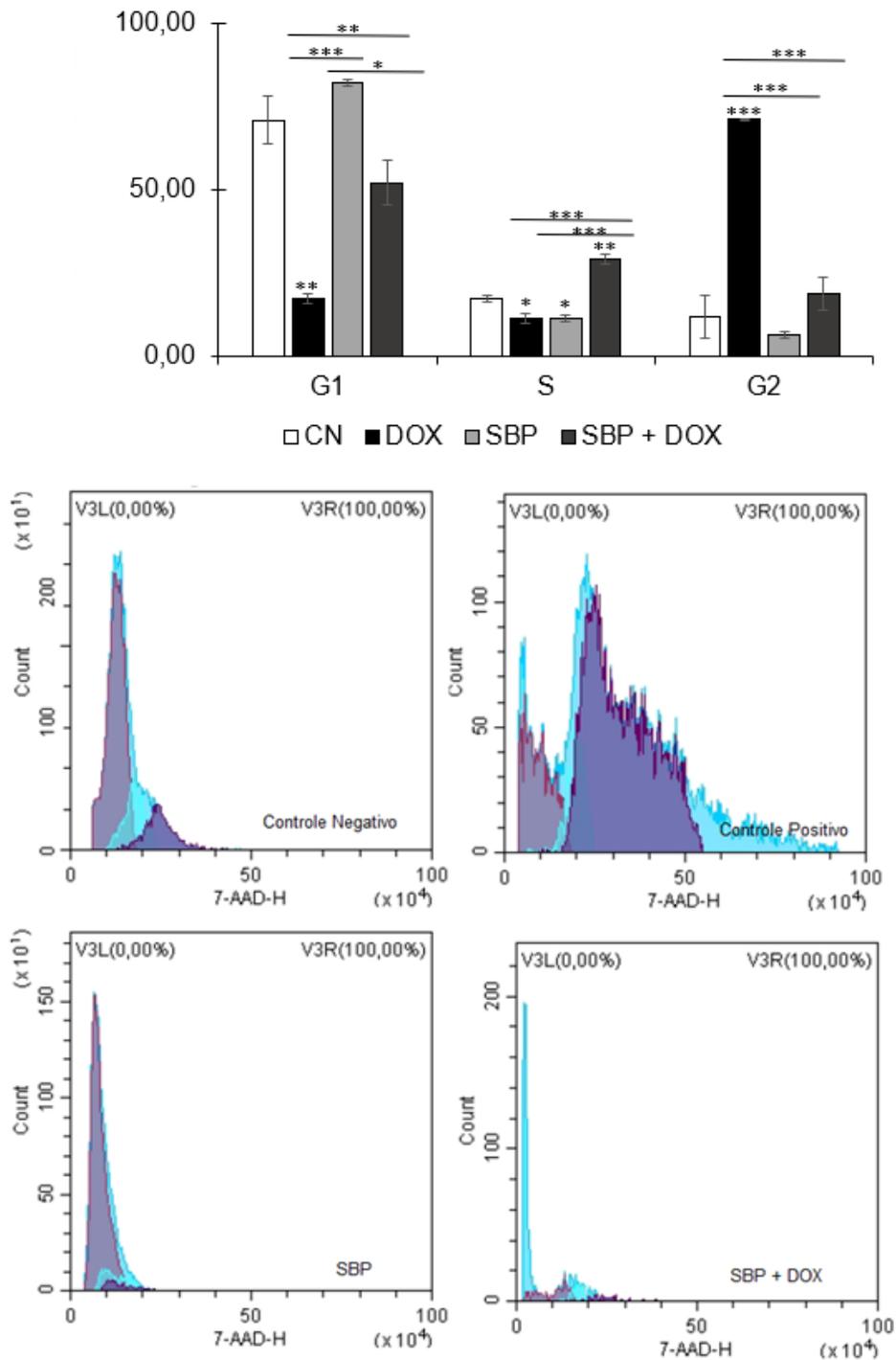
Evidencia-se que a substância SBP promoveu arraste significativo na fase G1 do ciclo celular quando aplicado isoladamente às células. Isso se assemelha ao Controle negativo, apontando que não houve boa penetração da substância no esferoide.

O comportamento dos flavonoides no ciclo celular é relativamente variado. Evidenciado por Hsu *et al.*, (2009), a tricetina (flavonoide) arrastou células na fase G2/M, enquanto que outros estudos mostram a ação de isoflavonas (sub-classe de flavonoides a qual SBP é classificada) atuando no arraste da fase G0/G1 do ciclo celular (Ying *et al.*, 2002; Tsuboy *et al.*, 2014).

Diante do explanado entende-se que o comportamento da substância no ciclo celular possa vir a ser influenciado pela concentração da amostra e até mesmo pela sub-classe de flavonoides.

Em contraste, SBP associado com doxorubicina fomentou o arraste da fase S do ciclo, deixando as três etapas do ciclo celular mais igualitárias, embora ainda com predomínio da fase G1.

Figura 30 – Ação de SBP sobre o ciclo celular de MCF-7



Ciclo celular em esferóides (modelo 3D) de células MCF-7 (tumor de mama). Células em 3D foram tratadas com 25ug/mL de amostra SCM e 2,5ug/mL de doxorubicina (também utilizada como controle positivo). As diferenças estatísticas, em relação ao controle negativo, foram consideradas quando $p < 0,05$, sendo $***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$.

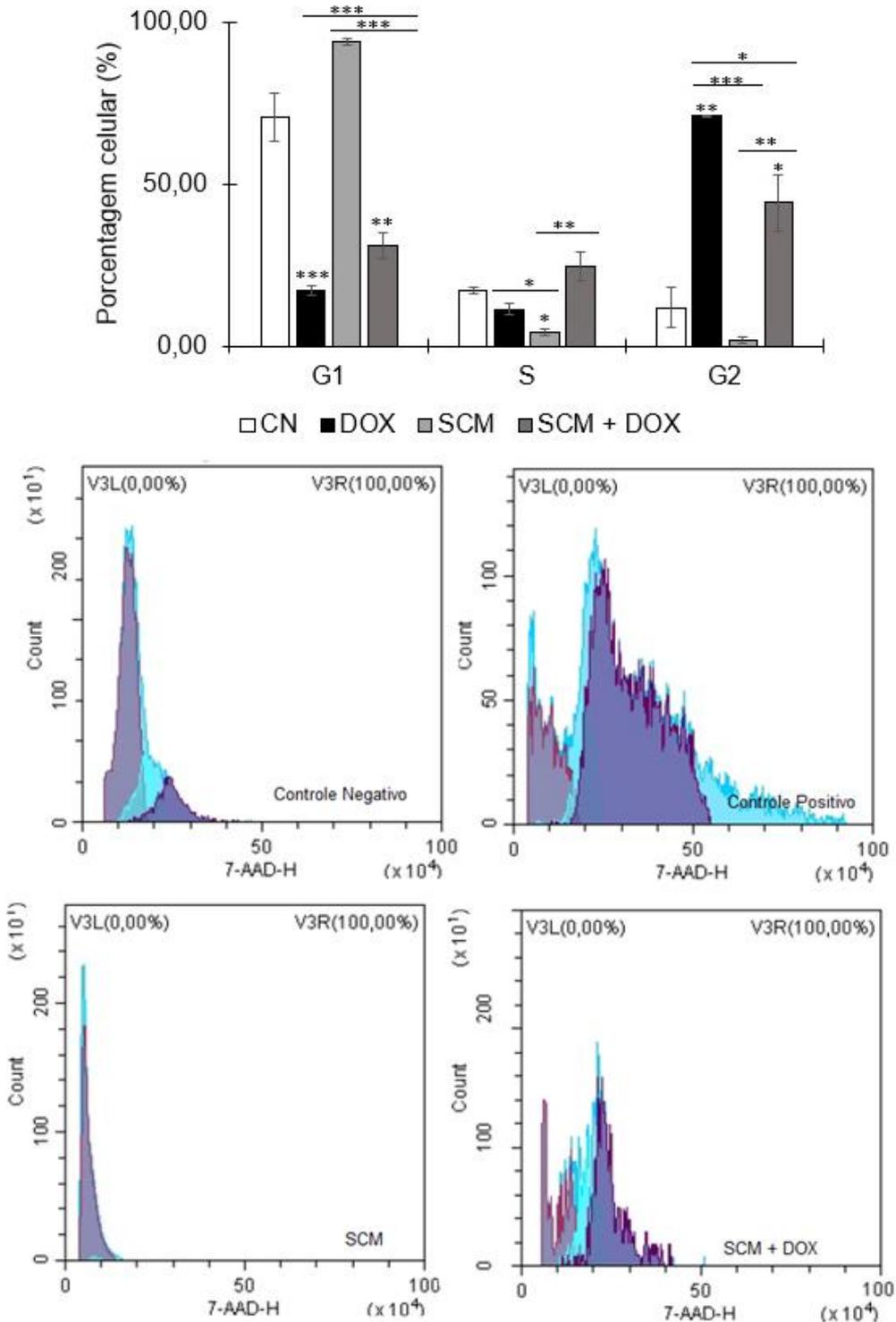
Voltando-se ao composto SCM, tem-se na figura 31 o seguinte cenário: SCM ao agir isoladamente na linhagem MCF-7 promoveu arraste celular na fase G1/G0.

Conforme Sowemimo *et al* (2012) que também estudou substâncias isoladas do gênero *Combretum*, foi identificado que estas substâncias ao agirem em MCF-7 promoveram o mesmo perfil de arraste, ou seja na fase G1/G0 do ciclo celular. Complementar à esta pesquisa, tem-se Shamsee *et al* (2019) que verificou a parada do ciclo celular em MCF-7 na mesma etapa (G1/G0) ao utilizar substâncias da classe de triterpenos.

Tem-se na literatura o relato de triterpenos de esqueleto lupano com ação sobre o ciclo celular em linhagens tumorais de neoplasias mamárias. Foo *et al* (2015) ao estudar uma fração rica em ácido betulínico (triterpeno de esqueleto lupano) verificou que este também promoveu o arraste do ciclo celular na linhagem MCF-7 na fase G1/G0.

Ao associar o composto SCM com doxorrubicina o comportamento altera-se e a célula passa a ter seu ciclo interrompido na fase G2. Essa resposta fica predominante pelo mecanismo de ação da doxorrubicina de inibir a enzima topoisomerase alfa 2. No entanto há uma elevada concentração celular em G1. Isso pode vir a indicar a possibilidade que o composto SCM consiga sensibilizar de forma positiva a célula neoplásica ao quimioterápico.

Figura 31 – Ação de SCM sobre o ciclo celular de MCF-7



Ciclo celular em esferóides (modelo 3D) de células MCF-7 (tumor de mama) realizada em citômetro de fluxo com leitura de 30.000 eventos. Células em 3D foram tratadas com 25ug/mL de amostra SCM e 2,5ug/mL de doxorubicina (também utilizada como controle positivo). As diferenças estatísticas, em relação ao controle negativo, foram consideradas quando $p < 0,05$, sendo $***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a substância isolada da própolis negra (SBP) da classe das isoflavonas metoxiladas e a substância isolada da *Combretum mellifluum* (SCM) pertencente a classe dos triterpenos, ambas oriundas da região centro-oeste do Brasil, apresentaram atividade antiproliferativa e citotóxica (alteração de membrana, ciclo celular e estresse oxidativo) nas células da linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF7).

Os resultados da atividade antiproliferativa foram promissores em modelo 2D na linhagem neoplásica MCF-7 com GI_{50} de 4,089 μ g/mL para SBP e 3,895 μ g/mL para o SCM. Apresentaram significativa seletividade para a linhagem neoplásica quando comparadas a linhagem de fibroblasto murinho. Além disso, os compostos mantiveram atividade biológica mesmo após a possível metabolização hepática.

Ambos compostos foram capazes de inibir a migração celular na linhagem potencialmente metastática.

Referente ao ensaio clonogênico tem-se que as substâncias ao agirem isoladamente na linhagem MCF-7 não foram capazes de inibir a formação de colônias, porém ao associá-las ao quimioterápico doxorrubicina o efeito foi o oposto, evidenciando-se a inibição de novas colônias. Este é um ponto importante e que abre portas para aprofundamento nas investigações sobre a interação da doxorrubicina com cada uma das substâncias analisadas.

Na investigação realizada em modelo 3D, tanto SBP quanto SCM, de forma isolada ou associada à doxorrubicina, inviabilizaram as células formadoras dos esferoides.

Ressalta-se que SCM quando associado a doxorrubicina é capaz de penetrar mais no esferoide formado, atingindo a zona necrótica. Tal capacidade pode ser em decorrência da sua polaridade.

Possível mecanismo de ação destas substâncias na linhagem neoplásica MCF-7 é através da produção de espécies reativas de oxigênio que levam à morte celular por parada do ciclo celular.

Observa-se no estudo de estresse oxidativo que ambas substâncias foram capazes de incentivar o dano à membrana celular devido o aumento do marcador TBARS, que por sua vez estimulou as células a tentarem se defender através da produção das defesas antioxidantes (SOD e CAD).

Por fim, ao avaliar o ciclo celular, evidencia-se que SBP e SCM pararam o ciclo, majoritariamente, na fase G1, impedindo que a célula avançasse para a fase de síntese de material genético.

Muitas oportunidades ainda existem para avançar na pesquisa referente às substâncias aqui apresentadas, valendo a pena, desta forma, o investimento de novas pesquisas na área.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 204, p.234–254; 1984.
2. ALAM, Murad; RATNER, Désirée. Cutaneous squamous-cell carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 13, p. 975-983, 2001.
3. ALLOUCHE, Yosra et al. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 1, p. 121-130, 2011.
4. ASAI, Akira et al. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 2, p. 205-211, 2004.
5. ASGHARPOUR, Fariba et al. Chemical composition analysis and in vitro investigation of cytotoxic and antioxidative activities of Iranian propolis against breast cancer cell line, MCF-7. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 39, p. 10857-10863, 2018.
6. AWALE, Suresh et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-189, 2008.
7. BAIN, Barbara J. **Leukaemia diagnosis**. John Wiley & Sons, 2017.
8. BALDE, E. S. et al. The hypoglycemic and cytotoxic activity of the leave extract of *Combretum glutinosum* Perr ex DC. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 4, p. 2230-2237, 2019.
9. BAR-ON, Ortal; SHAPIRA, Ma'anit; HERSHKO, Dan D. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. **Anti-cancer drugs**, v. 18, n. 10, p. 1113-1121, 2007.
10. BARTEK, Jiri; LUKAS, Jiri. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. **FEBS letters**, v. 490, n. 3, p. 117-122, 2001.
11. BARTEK, Jiri; LUKAS, Claudia; LUKAS, Jiri. Checking on DNA damage in S phase. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 5, n. 10, p. 792-804, 2004.

12. BEDARD, Karen; KRAUSE, Karl-Heinz. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.
13. BERTOLI, Cosetta; SKOTHEIM, Jan M.; DE BRUIN, Robertus AM. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, p. 518-528, 2013.
14. BLAND, Kirby I.; COPELAND, Edward M.; KLIMBERG, V. Suzanne. **The Breast E-Book: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases**. Elsevier Health Sciences, 2009.
15. BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 299–305; 1984.
16. Bogliolo Patologia - Geraldo Brasileiro Filho. 9ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 2016.
17. BOVERIS, Alberto et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 227, n. 2, p. 534-541, 1983.
18. BRANDÃO, Hugo N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
19. BROWN, David I.; GRIENGLING, Kathy K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1239-1253, 2009.
20. BUENO, Norlene Regina et al. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 39-44, 2005.
21. CAIRNS, John. Mutation selection and the natural history of cancer. **Nature**, v. 255, n. 5505, p. 197-200, 1975.
22. CARREL, Alexis. On the permanent life of tissues outside of the organism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 15, n. 5, p. 516-528, 1912.
23. CEN, Juan et al. Triterpenoids from *Aglaia abbreviata* exert cytotoxicity and multidrug resistant reversal effect in MCF-7/ADM cells via reactive oxygen species induction and P-glycoprotein inhibition. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 69465, 2017.

24. CERBONE, Angelo et al. 4-Hydroxynonenal and PPAR γ ligands affect proliferation, differentiation, and apoptosis in colon cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1661-1670, 2007.
25. CHÁIREZ-RAMÍREZ, M. H. et al. Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A review. **EXCLI journal**, v. 15, p. 758, 2016.
26. CHANDRIKA, Bhavya Balan et al. Hesperetin and naringenin sensitize HER2 positive cancer cells to death by serving as HER2 tyrosine kinase inhibitors. **Life sciences**, v. 160, p. 47-56, 2016.
27. CHANG-LIU, Chin-Mei; WOLOSCHAK, Gayle E. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. **Cancer letters**, v. 113, n. 1-2, p. 77-86, 1997.
28. CHEN, Lan Bo. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annual review of cell biology**, v. 4, n. 1, p. 155-181, 1988.
29. CORREA, Pelayo et al. Passive smoking and lung cancer. **The Lancet**, v. 322, n. 8350, p. 595-597, 1983.
30. COX-GEORGIAN, Destinney et al. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. In: **Medicinal Plants**. Springer, Cham, 2019. p. 333-359.
31. CREUTZFELDT, Werner; STÖCKMANN, Fritz. Carcinoids and carcinoid syndrome. **The American journal of medicine**, v. 82, n. 5, p. 4-16, 1987.
32. CUSACK, Barry J. et al. Doxorubicin and doxorubicinol pharmacokinetics and tissue concentrations following bolus injection and continuous infusion of doxorubicin in the rabbit. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 53-58, 1993.
33. DA ROCHA, Adriana B.; LOPES, Rafael M.; SCHWARTSMANN, Gilberto. Natural products in anticancer therapy. **Current opinion in pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 364-369, 2001.
34. DAIKH, Amina et al. Comparative study of antibiofilm, cytotoxic activity and chemical composition of Algerian propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 2, p. 160-169, 2020.
35. FARIAS, Ruth Raquel Soares de et al. Prospecção científica e tecnológica das espécies *Combretum Duarteanum* Cambess e *Combretum Mellifluum*

- Eichler. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 1, p. 1606-1616, 2015.
36. DEWICK, Paul M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.
37. DOBSON, Jane M.; HOHENHAUS, Ann E.; PEASTON, Anne E. Cancer chemotherapy. **Small Animal Clinical Pharmacology 2nd ed.**(Maddison, JE, Page, SW and Church, DB eds.), Saunders Elsevier, Edinburgh, p. 330-366, 2008.
38. DO NASCIMENTO KAUT, Natália Nogueira et al. Baccharis trimera (carqueja) improves metabolic and redox status in an experimental model of type 1 diabetes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.
39. DUVAL, Kayla et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017.
40. EDMONDSON, Rasheena et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and drug development technologies**, v. 12, n. 4, p. 207-218, 2014.
41. EGHBALIFERIZ, Samira; IRANSHAHI, Mehrdad. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 9, p. 1379-1391, 2016.
42. ERNSTER, Lars; SCHATZ, Gottfried. Mitochondria: a historical review. **The Journal of cell biology**, v. 91, n. 3, p. 227s-255s, 1981.
43. ESCOBAR, Stephane J. de M. et al. Anti-proliferative and cytotoxic activities of the flavonoid isoliquiritigenin in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **Chemico-biological interactions**, v. 299, p. 77-87, 2019.
44. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019
45. ESTERBAUER, Hermann; SCHAUR, Rudolf Jörg; ZOLLNER, Helmward. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free radical Biology and medicine**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

46. FENG, Suxiang et al. Anticancer activity of oleiferoside B involving autophagy and apoptosis through increasing ROS release in MCF-7 cells and SMMC-7721 cells. **Natural product research**, p. 1-5, 2020.
47. FOO, Jhi Biau et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from *Dillenia suffruticosa* root in MCF-7 cells involved p53/p21 and mitochondrial signalling pathway. **Journal of ethnopharmacology**, v. 166, p. 270-278, 2015.
48. FRANKEN, Nicolaas AP et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.
49. FRIGYESI, Ildiko et al. Robust isolation of malignant plasma cells in multiple myeloma. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 123, n. 9, p. 1336-1340, 2014.
50. FRIÓN-HERRERA, Yahima et al. Chemosensitizing activity of Cuban propolis and nemorosone in doxorubicin resistant human colon carcinoma cells. **Fitoterapia**, v. 136, p. 104173, 2019.
51. FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. John Wiley & Sons, 2015.
52. GARTNER, Leslie P.; HIATT, J. L. *Tratado de Histologia*. 3a edição. 2007.
53. GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
54. GOMES, Giovana Bicudo et al. Thiopyrimidine derivatives induce cytotoxicity, cell cycle arrest and oxidative stress in breast cancer 3D-spheroids. **Chemical Papers**, v. 75, n. 3, p. 1211-1220, 2021.
55. GUIMARÃES, Aline Cristina et al. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2471, 2019.
56. GUYTON, Arthur Clifton; HALL, John E.; GUYTON, Arthur C. **Tratado de fisiologia médica**. Elsevier Brasil, 2006.
57. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Reactive species can be poisonous. **Free Radicals in Biology and Medicine 4th ed**, eds. By Halliwell, B. and Gutteridge, JMC, Oxford University Press, New York, p. 440-487, 2007.
58. HANUKOGLU, Israel et al. Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain

- cleavage) system. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 305, n. 2, p. 489-498, 1993.
59. HARRISON, Ross G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 4, n. 1, p. 140-143, 1906.
60. HASSAN, M. S. U. et al. Chemotherapy for breast cancer. **Oncology reports**, v. 24, n. 5, p. 1121-1131, 2010.
61. HATEFI, Youssef. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annual review of biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 1015-1069, 1985.
62. HEIM, Kelly E.; TAGLIAFERRO, Anthony R.; BOBILYA, Dennis J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
63. Henriksson, E.; Kjellén, E.; Wahlberg, P.; Wennerberg, J.; Kjellstrom, J. H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v.42, p.320-323, 2006.
64. HILMER, Sarah N. et al. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. **Drug metabolism and disposition**, v. 32, n. 8, p. 794-799, 2004.
65. HOUNSOME, N. et al. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. **Journal of food science**, v. 73, n. 4, p. R48-R65, 2008.
66. HOWE, BRADLEY et al. Chromosome preparation from cultured cells. **Journal of visualized experiments: JoVE**, 83 e50203. 28 Jan. 2014, doi:10.3791/50203
67. HSU, Ya-Ling et al. Tricetin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma mcf-7 cells by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8688-8695, 2009.
68. HUANG, Shuai et al. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610-19632, 2014.
69. HUNGERFORD, D. A. Chromosome structure and function in man. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 10, n. 1, p. 23-32, 1971.

70. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Acesso em: 12 maio 2021.
71. IWAMOTO, Leilane Hesporte et al. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
72. KABERA, Justin N. et al. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **J Pharm Pharmacol**, v. 2, p. 377-392, 2014.
73. KASIBHATLA, Shailaja et al. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 3, p. pdb. prot4493, 2006.
74. KENNEDY, B. J. Hormone therapy for advanced breast cancer. **Cancer**, v. 18, n. 12, p. 1551-1557, 1965.
75. Komarov, P.G., Komarova, E.A, Kondratov, R.V., Christovtsekov K., Coon J.S., Chernov, M.V., Gudkov A.V. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. **Science**, v. 285, p.1733–1737, 1999.
76. KU, Jin Mo et al. Cucurbitacin D induces cell cycle arrest and apoptosis by inhibiting STAT3 and NF- κ B signaling in doxorubicin-resistant human breast carcinoma (MCF7/ADR) cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 409, n. 1, p. 33-43, 2015.
77. KUMAR, Vukoti Kiran et al. Synthesis, anticancer evaluation, and molecular docking studies of benzoxazole linked combretastatin analogues. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 3, p. 528-537, 2020.
78. KURKI, Sari; LATONEN, Leena; LAIHO, Marikki. Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. **J Cell Sci**, v. 116, n. 19, p. 3917-3925, 2003.
79. LAMB, Neil E. Nondisjunction. **Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, 2004.

80. LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329, 2007.
81. LIN, Shian-Ren et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. **British journal of pharmacology**, v. 177, n. 6, p. 1409-1423, 2020.
82. LOPEZ-TORRES, M. et al. A comparative study of free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 105, n. 3-4, p. 757-763, 1993.
83. MACIEL, Maria Aparecida M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
84. MADUNIĆ, Ivana Vrhovac et al. Apigenin, a dietary flavonoid, induces apoptosis, DNA damage, and oxidative stress in human breast cancer MCF-7 and MDA MB-231 cells. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 391, n. 5, p. 537-550, 2018.
85. MALEKI, Soheila J.; CRESPO, Jesus F.; CABANILLAS, Beatriz. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food chemistry**, p. 125124, 2019.
86. MALTZMAN, Warren; CZYZYK, Linda. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. **Molecular and cellular biology**, v. 4, n. 9, p. 1689-1694, 1984.
87. MARCUCCI, Maria Cristina. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.
88. MASTERS, John R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 315-319, 2002.
89. MEGO, Michal; MANI, Sendurai A.; CRISTOFANILLI, Massimo. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer—clinical applications. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 7, n. 12, p. 693-701, 2010.
90. MEYER, T.; HART, I. R. Mechanisms of tumour metastasis. **European journal of cancer**, v. 34, n. 2, p. 214-221, 1998.
91. MINERS, John O.; BIRKETT, Donald J. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. **British journal of clinical pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 525-538, 1998.
92. MISIR, Sema et al. Effect of Turkish Propolis on miRNA Expression, Cell Cycle, and Apoptosis in Human Breast Cancer (MCF-7) Cells. **Nutrition and cancer**, v. 72, n. 1, p. 133-145, 2020.

93. MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
94. MOGASHOA, M. M.; MASOKO, P.; ELOFF, J. N. Different Combretum molle (Combretaceae) leaf extracts contain several different antifungal and antibacterial compounds. **South African Journal of Botany**, v. 126, p. 322-327, 2019.
95. MOLNÁR, Joseph et al. Inhibition of multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids. **Current pharmaceutical design**, v. 12, n. 3, p. 287-311, 2006.
96. MONKS, Anne et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.
97. MOORE, Keith L.; DALLEY, Arthur F.; AGUR, Anne MR. Anatomia Orientada Para a Clínica-7ª Edição. **Rio de Janeiro**, 2014.
98. MORGAN-PARKES, Jacqueline H. Metastases: mechanisms, pathways, and cascades. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 164, n. 5, p. 1075-1082, 1995.
99. MOSMANN, Tim. 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, 1983.
100. MUELLER-KLIESER, Wolfgang. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 273, n. 4, p. C1109-C1123, 1997.
101. MÜLLER, S. M. et al. Arsenic-containing hydrocarbons: effects on gene expression, epigenetics, and biotransformation in HepG2 cells. **Archives of toxicology**, v. 92, n. 5, p. 1751-1765, 2018.
102. MURNANE, A. et al. Adolescents and young adult cancer survivors: exercise habits, quality of life and physical activity preferences. **Supportive Care in Cancer**, v. 23, n. 2, p. 501-510, 2015.
103. MYSZKA, Henryk et al. Design, synthesis and biological evaluation of betulin-3-yl 2-amino-2-deoxy- β -D-glycopyranosides. **Bioorganic Chemistry**, p. 103568, 2020.

104. NEGRETTE-GUZMÁN, Mario. Combinations of the antioxidants sulforaphane or curcumin and the conventional antineoplastics cisplatin or doxorubicin as prospects for anticancer chemotherapy. **European journal of pharmacology**, p. 172513, 2019.
105. NERY, Rodrigo Araldi et al. Uric acid and tissue repair. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 28, n. 4, p. 290-292, 2015.
106. O'CONNELL, Matthew J.; WALWORTH, Nancy C.; CARR, Antony M. The G2-phase DNA-damage checkpoint. **Trends in cell biology**, v. 10, n. 7, p. 296-303, 2000.
107. OLIVEIRA, Fernando de; SAITO, Maria Lucia. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2, p. 170-196, 1989.
108. OLUYEMI, Wande M. et al. Antiplasmodial activity of triterpenes isolated from the methanolic leaf extract of *Combretum racemosum* P. Beauv. **Journal of ethnopharmacology**, v. 247, p. 112203, 2020.
109. OTTAVIANI, Giulia; JAFFE, Norman. The etiology of osteosarcoma. In: **Pediatric and Adolescent Osteosarcoma**. Springer, Boston, MA, 2009. p. 15-32.
110. PAGARE, Saurabh et al. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 3, p. 293-304, 2015.
111. PARK, Yong K.; ALENCAR, Severino M.; AGUIAR, Claudio L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.
112. PEÑA, Raúl C. Propolis standardization: a chemical and biological review. *Cien. Inv. Agr.* 35 (1): 17-26. **International Journal of Agriculture and Natural Resources**, v. 35, n. 1, p. 11-20, 2008.
113. PERES, Valéria Costa et al. Câncer de mama em mulheres: recidiva e sobrevida em cinco anos. 2015.
114. PETTIT, George R.; CRAGG, Gordon M.; SINGH, Sheo Bux. Antineoplastic agents, 122. Constituents of *Combretum caffrum*. **Journal of natural products**, v. 50, n. 3, p. 386-391, 1987.

115. PETTIT, G. R. et al. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. **Experientia**, v. 45, n. 2, p. 209-211, 1989.
116. PINTO, Bronson I. et al. In vitro scratch assay to demonstrate effects of arsenic on skin cell migration. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 144, p. e58838, 2019.
117. POLLARD, Jeffrey W.; WALKER, John M. (Ed.). **Basic cell culture protocols**. Springer Science & Business Media, 1997.
118. PRAKASH, O. M. et al. Anticancer potential of plants and natural products. **Am. J. Pharmacol. Sci.**, v. 1, p. 104-115, 2013.
119. PRITCHARD, Kathleen I. et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 20, p. 2103-2111, 2006.
120. PRZYBORSKI, Stefan (Ed.). **Technology Platforms for 3D Cell Culture: A User's Guide**. John Wiley & Sons, 2017.
121. RANG, Humphrey Peter. **Pharmacology**. Churchill Livingstone, 2001.
122. RASBAND, Wayne S. et al. ImageJ. 1997. Disponível em < <http://www.worldlibrary.in/articles/eng/ImageJ> > Acesso em 09/07/2019.
123. RAVI, Maddaly et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. **Journal of cellular physiology**, v. 230, n. 1, p. 16-26, 2015.
124. RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
125. RODRIGUEZ, Luis G.; WU, Xiaoyang; GUAN, Jun-Lin. Wound-healing assay. In: **Cell Migration**. Humana Press, 2005. p. 23-29.
126. ROE, A. L. et al. HepG2 cells: an in vitro model for P450-dependent metabolism of acetaminophen. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 190, n. 1, p. 15-19, 1993.
127. ROMAGNOLI, Romeo et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-alkoxycarbonyl-3-anilinoindoles as a new class of potent inhibitors of tubulin polymerization. **Bioorganic Chemistry**, v. 97, p. 103665, 2020.
128. ROMERO, Mario et al. Propolis polyphenolic compounds affect the viability and structure of *Helicobacter pylori* in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 325-332, 2019.

129. RUBIN, Adam I.; CHEN, Elbert H.; RATNER, Désirée. Basal-cell carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 21, p. 2262-2269, 2005.
130. RUZICKA, Leopold. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia**, v. 9, n. 10, p. 357-367, 1953.,
131. SALEM, Maha M. et al. Propolis potentiates methotrexate anticancer mechanism and reduces its toxic effects. **Nutrition and Cancer**, p. 1-21, 2019.
132. SANKARANARAYANAN, Ranjini et al. The flavonoid metabolite 2, 4, 6-trihydroxybenzoic acid is a CDK inhibitor and an anti-proliferative agent: A potential role in cancer prevention. **Cancers**, v. 11, n. 3, p. 427, 2019.
133. SANCAR, Aziz et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 39-85, 2004.
134. SÁNCHEZ-MONROY, Ma Beatriz et al. Cytotoxic activity and triterpenes content of nine Mexican species of *Bursera*. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2020.
135. SATOU, Akira; BENNANI, N. Nora; FELDMAN, Andrew L. Update on the classification of T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. **Expert review of hematology**, v. 12, n. 10, p. 833-843, 2019.
136. SEDLMAYER, F. et al. DEGRO practical guidelines: radiotherapy of breast cancer I. **Strahlentherapie Und Onkologie**, v. 189, n. 10, p. 825-833, 2013.
137. SHAMSEE, Zahraa R. et al. Cytotoxic and cell cycle arrest induction of pentacyclic triterpenoides separated from *Lantana camara* leaves against MCF-7 cell line in vitro. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 1, p. 381-390, 2019.
138. SHAPIRO, Charles L.; RECHT, Abram. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 26, p. 1997-2008, 2001.
139. SCHMOLL, Hans Joachim et al. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer

- Consensus Group (EGCCCG). **Annals of oncology**, v. 15, n. 9, p. 1377-1399, 2004.
140. SCHULTES, Richard Evans. ROLE OF ETHNOBOTANIST IN SEARCH FOR NEW MEDICINAL PLANTS. In: **Lloydia**. 1962. p. 257-&.
141. SEYHAN, Mehmet Fatih et al. Different propolis samples, phenolic content, and breast cancer cell lines: Variable cytotoxicity ranging from ineffective to potent. **IUBMB life**, v. 71, n. 5, p. 619-631, 2019.
142. SHERR, Charles J.; ROBERTS, James M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes & development**, v. 13, n. 12, p. 1501-1512, 1999.
143. SHIRATAKI, Yoshiaki et al. Antioxidative components isolated from the roots of *Astragalus membranaceus* Bunge (*Astragali Radix*). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Medical and Scientific Research on Plants and Plant Products**, v. 11, n. 8, p. 603-605, 1997.
144. SHRESTHA, Suraj Prakash; NARUKAWA, Yuji; TAKEDA, Tadahiro. Chemical constituents of Nepalese propolis (II). **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 55, n. 6, p. 926-929, 2007.
145. SiBBr - *Combretum mellifluum* in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/combretum_mellifluum>. Acesso em 26-03-2020
146. SIEGEL, Rebecca L. et al. Cancer statistics, 2021. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7-33, 2021.
147. SIMONETTI, V. et al. Ozone Exerts Cytoprotective and Anti-Inflammatory Effects in Cardiomyocytes and Skin Fibroblasts after Incubation with Doxorubicin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
148. SINGH, Neetu et al. Polyphenols sensitization potentiates susceptibility of MCF-7 and MDA MB-231 cells to Centchroman. **PloS one**, v. 7, n. 6, 2012.
149. SKEHAN, Philip 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.

150. SKEHAN, Philip 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.
151. SLEDGE, George W. et al. Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 19, p. 1979, 2014.
152. SOTIRIOU, Christos; PUSZTAI, Lajos. Gene-expression signatures in breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 790-800, 2009.
153. SOWEMIMO, Abimbola et al. Cytotoxic compounds from the leaves of *Combretum paniculatum* Vent. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 20, p. 4631-4635, 2012.
154. STITOU, Mourad et al. Quantitative structure–activity relationships analysis, homology modeling, docking and molecular dynamics studies of triterpenoid saponins as Kirsten rat sarcoma inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-19, 2020.
155. STRAYER, David S. **Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine**. 2015.
156. SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays Related to Cancer Drug Discovery Hostettmann K. **Mtode In Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity**, 1990.
157. SUN, Wenxia et al. Ophiobolin-O reverses adriamycin resistance via cell cycle arrest and apoptosis sensitization in adriamycin-resistant human breast carcinoma (MCF-7/ADR) cells. **Marine drugs**, v. 11, n. 11, p. 4570-4584, 2013.
158. TEIXEIRA, António et al. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 9, p. 18711-18739, 2013.
159. TENNANT, Judith R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, v. 2, n. 6, p. 685-694, 1964.
160. Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration. Acessado em << <https://www.teresewinslow.com/#/breast/> >> 03/04/2020
161. THANASANSURAPONG, Sariyarach et al. Cytotoxic and anti-HIV-1 activities of triterpenoids and flavonoids isolated from leaves and twigs of *Gardenia sessiliflora*. **Phytochemistry Letters**, v. 35, p. 46-52, 2020.

162. TOUFEKTCHAN, Eléonore; TOLEDO, Franck. The guardian of the genome revisited: p53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. **Cancers**, v. 10, n. 5, p. 135, 2018.
163. TSAI, Yi-Chih et al. Induction of oxidative DNA damage by flavonoids of propolis: its mechanism and implication about antioxidant capacity. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 1, p. 191-196, 2012.
164. TSUBOY, Marcela S. et al. Genistein at maximal physiologic serum levels induces G0/G1 arrest in MCF-7 and HB4a cells, but not apoptosis. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 2, p. 218-225, 2014.
165. TYSON, John J.; CSIKASZ-NAGY, Attila; NOVAK, Bela. The dynamics of cell cycle regulation. **Bioessays**, v. 24, n. 12, p. 1095-1109, 2002.
166. WALI, Vikram B.; BACHAWAL, Sunitha V.; SYLVESTER, Paul W. Combined treatment of γ -tocotrienol with statins induce mammary tumor cell cycle arrest in G1. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 6, p. 639-650, 2009.
167. WANG, Jia et al. Identification of hub genes and potential molecular mechanisms of chickpea isoflavones on MCF-7 breast cancer cells by integrated bioinformatics analysis. **Annals of translational medicine**, v. 8, n. 4, 2020.
168. WILKENING, Stefan; STAHL, Frank; BADER, Augustinus. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. **Drug metabolism and disposition**, v. 31, n. 8, p. 1035-1042, 2003.
169. WENGER, Sharon L. et al. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. **Bioscience reports**, v. 24, n. 6, p. 631-639, 2004.
170. WESTERINK, Walter MA; SCHOONEN, Willem GEJ. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 8, p. 1581-1591, 2007.

171. WRIGHTON, Steven A.; STEVENS, Jeffrey C. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. **Critical reviews in toxicology**, v. 22, n. 1, p. 1-21, 1992.
172. YE, Yan et al. Atractylenolide II induces G1 cell-cycle arrest and apoptosis in B16 melanoma cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 279-282, 2011.
173. YING, Chingwen et al. Growth and cell cycle regulation by isoflavones in human breast carcinoma cells. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 1, p. 55-64, 2002.
174. YOSHITOMI, S. et al. Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 3, p. 245-256, 2001.
175. ZHANG, Man-Li et al. PPAR γ agonist from *Chromolaena odorata*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 12, p. 2076-2081, 2012.