



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NICOLE GREGORIO PINTO**

**EFEITO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE JANAÚBA (*Euphorbia umbellata*) EM  
CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS**

Campinas  
2023

**NICOLE GREGORIO PINTO**

**EFEITO DAS SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DE JANAÚBA (*Euphorbia umbellata*)  
EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para a Saúde.

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO**

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA NICOLE GREGORIO PINTO, ORIENTADA PELO PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

Campinas  
2023

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P658e Pinto, Nicole Gregorio, 1995-  
Efeito das frações do extrato de Janaúba (*Euphorbia umbellata*) em cultura de células tumorais / Nicole Gregorio Pinto. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: João Ernesto de Carvalho.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Janaúba. 2. Neoplasias. 3. Neoplasias da mama. 4. Euphorbia umbellata.  
I. Carvalho, João Ernesto de, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Effect of Janaúba (*Euphorbia umbellate*) extract fractions in tumor cell culture

**Palavras-chave em inglês:**

Janaúba

Neoplasms

Breast neoplasms

Euphorbia umbellata

**Área de concentração:** Ciências Farmacêuticas: insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Guilhermina Rodrigues Noleto

Daniel Fabio Kawano

**Data de defesa:** 02-05-2023

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Farmacêuticas

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8365-5541>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1319816362025276>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Autora:** Nicole Gregorio Pinto

**Orientador:** Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Dissertação aprovada em 2 de Maio de 2023

### **Comissão Examinadora**

Presidente: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Guilhermina Rodrigues Noleto

Prof. Dr. Daniel Fabio Kawano

**A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.**

Campinas, 2 de Maio de 2023.

À minha mãe, Fátima, que por seu exemplo sempre me ensinou  
que a vida pode ser feita de desafios, mas que a resiliência é a  
maneira mais gentil de superá-los,  
Dedico-lhe este trabalho.

À minha avó, Maria Lúcia, por todo cuidado e por todas as orações  
que me deram forças para conquistar meus objetivos,  
Dedico-lhe este trabalho.

À toda minha família, meus tios, primos, cunhados e sobrinhos e  
especialmente meus irmãos Núbia e Eduardo, por sempre  
apoiarem meus sonhos e projetos, por todo cuidado e carinho,  
Dedico-lhes este trabalho.

Ao Gabriel, por todo apoio e amor, por me fazer lembrar do meu  
potencial em todos os momentos em que eu mesma já não era  
capaz.  
Dedico-lhe este trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

**Madre Teresa de Calcutá**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, da inteligência e sabedoria, pela oportunidade de experienciar todas as oportunidades que a vida me oferece.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela oportunidade e por ser sempre aberto a todas as minhas ideias e intenções no âmbito deste projeto;

À Profa. Dra. Mary Ann Foglio, por toda a orientação fitoquímica envolvida neste estudo;

À Profa. Dra. Ana Lúcia, por toda prontidão e suporte em todas as vezes em que nos falámos;

Aos alunos LAFTex, especialmente Kaio e Lucas, que mesmo à distância foram essenciais em etapas deste projeto;

Ao Gustavo Teramatsu, secretário da Pós-Graduação da FCF, por ser infinitamente paciente com todas as minhas questões burocráticas, pelo excelente profissionalismo que influenciou diretamente o decorrer deste estudo;

À Prof. Dra. Filomena Botelho pela oportunidade de fazer parte do iCBR, de desenvolver a maior parte da minha pesquisa em Portugal e por tornar possível a realização de um sonho pessoal;

À Dra. Mafalda Laranjo, por toda orientação e acolhimento, por acreditar no meu potencial e por ter me ensinado tanto;

Ao Prof. Miguel Marto, por ter sempre paciência, disposição e bom humor para me explicar todas as dúvidas que surgiram ao longo deste trabalho;

Aos alunos do iCBR, especialmente a Beatriz, por ter pegado na minha mão desde o primeiro dia em que cheguei e não ter soltado até o meu último experimento;

As minhas colegas, Gabriela e Chrislaura por terem me apoiado e me incentivado na reta final deste trabalho;

Aos meus amigos de longa data, Felipe, Joice, Luciana e Melissa, que no começo desta trajetória me apoiaram e me incentivaram a não desistir diante dos desafios;

À Inês e a Joana, por todos os momentos em que choramos e rimos juntas pelos corredores e salas de cultura do iCBR, por terem se tornado um grande apoio profissional e pessoal;

À minha querida psicóloga, Eleonora Martins, por ter me auxiliado, motivado e me feito descobrir que posso ir muito além do que espero;

À minha sogra, Maria Aparecida, por me incentivar e proporcionar de forma muito direta o meu aprimoramento profissional e pessoal;

As minhas amigas, Laura e Luísa, que compartilharam comigo muito mais do que somente os cômodos da nossa casa, mas também sua amizade e cuidados;

As minhas amigas de Coimbra, Noemí, Maria Lopes, Mariana, Maria Izabel, Ana e Isabel, por serem o meu alívio diante do estresse da rotina e do trabalho;

À minha comunidade em Sto Antônio dos Olivais, especialmente ao Hugo, por serem a minha segunda família quando fisicamente eu mais estive distante da minha própria;

Aos professores membros da banca de qualificação e banca da defesa do Mestrado, pela disponibilidade em avaliar o trabalho e pelas sugestões enriquecedoras que auxiliaram no desenvolver deste projeto;

À Universidade de Coimbra, por ter aberto suas portas a essa parceria;

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

O câncer é uma condição patológica que se caracteriza pelo acúmulo de mutações genéticas que promovem uma proliferação celular descontrolada e o desenvolvimento de características celulares atípicas. Globalmente, o câncer é a doença de maior incidência, com o câncer de mama sendo o mais prevalente em vários países, incluindo o Brasil. O mesmo ocorre nos ductos e lóbulos da mama e pode ser classificado usando um sistema de estadiamento conhecido como TNM (“tumor, nodal spreading and metastasis”) que auxilia na determinação do estágio do câncer e orienta as opções de tratamento. Existem diferentes subtipos moleculares de câncer de mama, incluindo luminal A, luminal B, HER2+ e triplo negativo (TN), e cada subtipo requer abordagens de tratamento específicas. Essa classificação molecular auxilia na escolha dos tratamentos mais adequados para cada paciente, levando em consideração as características biológicas do tumor. A *Euphorbia umbellata*, também conhecida como Janaúba, é uma planta utilizada na medicina popular para o tratamento de várias doenças, incluindo o câncer, por meio da preparação conhecida como garrafada que é composta de uma diluição do látex da planta em água. Em estudos com frações apolares obtidas do látex foi verificada citotoxicidade para diferentes linhagens tumorais, no entanto, ainda não há uma clara compreensão de como os compostos presentes no látex obtido desta planta atuam. Diante disso, o objetivo deste projeto foi investigar os efeitos de frações de extrato obtido conjuntamente de partes do caule, folhas e látex da *E. umbellata* (Pax) Bruyns em diferentes linhagens tumorais, a fim de assimilar os conhecimentos já descritos em literatura, sobre o uso do látex desta planta em estudos antiproliferativos. O fracionamento foi realizado com solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e diclorometano) - sendo a fração Hexano (Hex) a que apresentou melhor efeito antiproliferativo nas linhagens avaliadas. Análises do ciclo celular das células MCF7 e HCC1806 demonstraram uma parada na fase G2/M em ambas as linhagens. A investigação do tipo de morte celular, sugere que a fração Hex possivelmente está envolvida na indução da via de morte por necrose nas células, MCF7, enquanto nas células HCC1806 obteve-se resultados compatíveis com morte celular por apoptose inicial. Os resultados deste estudo comprovaram o potencial citotóxico da fração Hex para linhagens tumorais de câncer de mama, sendo estes achados promissores, uma vez que essas linhagens apresentam genética distinta que afetam à resposta frente a

quimioterapias convencionais. Estudos futuros podem ser empregados para caracterizar o princípio ativo deste extrato e elucidar o seu mecanismo de ação, que em princípio, se mostrou promissor para uso na quimioterapia antitumoral do câncer de mama.

**Palavras-chaves:** Janaúba; Câncer; Câncer de mama; *Euphorbia umbellata*.

## ABSTRACT

Cancer is a pathological condition characterized by the accumulation of genetic mutations that promote uncontrolled cell proliferation and the development of atypical cellular characteristics. Globally, cancer is the most prevalent disease, with breast cancer being the most common in several countries, including Brazil. Breast cancer originates in the ducts and lobules of the breast and can be classified using a staging system known as TNM (tumor, nodal spreading, and metastasis), which helps determine the stage of cancer and guides treatment options. There are different molecular subtypes of breast cancer, including luminal A, luminal B, HER2-positive, and triple-negative (TN), and each subtype requires specific treatment approaches. This molecular classification assists in selecting the most appropriate treatments for each patient, taking into account the biological characteristics of the tumor. *Euphorbia umbellata*, also known as Janaúba, is a plant used in traditional medicine for the treatment of various diseases, including cancer, through a preparation known as "garrafada," which is a dilution of the Janaúba latex in water. Studies using nonpolar fractions obtained from the latex have shown cytotoxicity against different tumor cell lines; however, there is still limited understanding of how the compounds present in the latex of this plant exert their effects. Therefore, the aim of this project was to investigate the effects of extract fractions obtained from the stem, leaves, and latex of *E. umbellata* (Pax) Bruyns on different tumor cell lines in order to build upon the existing knowledge described in the literature regarding the antiproliferative properties of this latex. Fractionation was performed using solvents with different polarities (hexane, ethyl acetate, and dichloromethane), with the hexane fraction (Hex) showing the most potent antiproliferative effect on the evaluated cell lines. Cell cycle analyses of MCF7 and HCC1806 cells demonstrated a G2/M phase arrest in both cell lines. Investigation of the type of cell death suggests that the Hex fraction is possibly involved in inducing necrotic cell death pathway in MCF7 cells, while results in HCC1806 cells were consistent with early apoptotic cell death. The results of this study confirmed the cytotoxic potential of the Hex fraction against breast cancer cell lines, which is promising considering that these cell lines have distinct genetic profiles that affect their response to conventional chemotherapies. Future studies can be employed to characterize the active principle of this extract and elucidate its mechanism of action,

which initially appears promising for use in anti-tumoral chemotherapy for breast cancer.

**Keywords:** Janaúba; Cancer; Breast cancer; *Euphorbia umbellata*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formação do Câncer em tecidos circundantes.....	20
<b>Figura 2.</b> Características anatômicas da mama e crescimento do tumor.....	24
<b>Figura 3.</b> Euphorbia umbellata utilizada na coleta do material vegetal. ....	29
<b>Figura 4.</b> Folhas características da Euphorbia umbellata .....	30
<b>Figura 5.</b> Caule recém cortado, apresentando o látex contido nos tecidos. ....	30
<b>Figura 6.</b> Fluxograma de extração.....	31
<b>Figura 7.</b> Estrutura química do Eufol .....	40
<b>Figura 8.</b> Curvas Dose-resposta da fração Hexano.. ....	41
<b>Figura 9.</b> Curvas Dose-resposta das linhagens testadas.....	42
<b>Figura 10.</b> Curvas Dose-resposta das linhagens testadas.....	43
<b>Figura 11.</b> Estrutura do Estrogênio e Progesterona).....	46
<b>Figura 12.</b> Ciclo celular de células MCF7(A) e HCC1806(B) após de exposição de 24h com a fração HEX na concentração de 7,8125 µg/mL. ....	47
<b>Figura 13.</b> Morte celular de células MCF7(A) e HCC1806(B) após de exposição de 24h com a fração HEX na concentração de 7,8125 µg/mL.. ....	49
<b>Figura 14.</b> Avaliação da produção de radicais superóxidos nas células MCF7(A) e HCC1806(B) após exposição de 24h com a fração HEX na concentração de 7,8125 µg/mL.....	51
<b>Figura 15.</b> Avaliação das características morfológicas da linhagem MCF7 por método de coloração May-Grünwald-Giemsa. ....	52
<b>Figura 16.</b> Avaliação das características morfológicas da linhagem HCC1806 por método de coloração May-Grünwald-Giemsa.. ....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Linhagens celulares utilizadas no screening e suas características. .....	33
<b>Tabela 2.</b> Possíveis compostos encontrados nas frações Hex e Diclorometano em análise por CG/EM. .....	40
<b>Tabela 3.</b> Valores de IC50, R <sup>2</sup> e intervalo de confiança de 95%, dados obtidos das linhagens tratadas com a fração Hexano pelos tempos de exposição de 24h e 48h. .....	44
<b>Tabela 4.</b> Valores de IC50, R <sup>2</sup> e intervalo de confiança de 95%, dados obtidos das linhagens tratadas com a fração Diclorometano pelos tempos de exposição de 24h e 48h. .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A375	- linhagem tumoral de pele
Ac.Et.	- Acetato de Etila
AnV	- Anexina V
CEL	- célula
CG/EM	- cromatografia gasosa com detector de espectros de massa
CO <sub>2</sub>	- gás carbônico ou dióxido de carbono
Diclo	- Diclorometano
DMEM	- Dulbecco's modified Eagle's (meio de cultura)
DMSO	- dimetilsulfóxido
DNA	- ácido desoxirribonucleico (ADN)
ECC1	- linhagem tumoral de endométrio
FITC	- fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
HCC1806	- linhagem tumoral de mama
Hex	- Hexano
HSC3	- linhagem tumoral de boca
HT1376	- linhagem tumoral de bexiga
HER2	- <i>human epidermal growth factor receptor</i>
HuH7	- linhagem tumoral de fígado
IC	- inibição de crescimento
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
MCF7	- linhagem tumoral de mama
MIAPaCa2	- linhagem tumoral de pâncreas
MTT	- sal de tretazólio, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide
NCI	- National Cancer Institute
PBS	- tampão fosfato salino
PC3	- linhagem tumoral de próstata
PI	- iodeto de propídio
RE	-receptor de estrogênio
RL95	- linhagem tumoral de endométrio

ROS	- espécies reativas de oxigênio
RP	-receptor de progesterona
rpm	- rotações por minuto
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
WIDR	- linhagem tumoral de colón
SisGen	-Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 O Câncer e suas estatísticas .....	20
1.2 O Câncer de mama e suas características .....	21
1.2.1 Os sub-tipos moleculares do câncer de mama .....	22
1.3 Classificação clínica e tratamentos do Câncer de mama .....	24
1.4 Tratamentos para o Câncer de mama .....	25
1.5 <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns. ....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
2.1. Objetivo geral .....	28
2.1.1 Objetivo secundário .....	28
2.2. Objetivos específicos primários .....	28
2.2.1 Objetivos específicos secundários .....	28
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1. Material Vegetal.....	29
3.1.1 Obtenção do extrato bruto .....	30
3.1.2 Partição e obtenção das frações do látex de <i>E. umbellata</i> .....	30
3.3.3 Análises Cromatográficas .....	31
3.2 Estudo Farmacológico <i>in vitro</i> :.....	32
3.2.1. Cultivo Celular .....	32
3.2.1.1 Ensaio de atividade metabólica pelo método do MTT .....	33
3.2.2. Citometria de fluxo .....	34
3.2.2.1 Avaliação do ciclo celular.....	34
3.2.2.2 Avaliação de Exposição de resíduos de fosfatidilserina: .....	35
3.2.3 Avaliação do estresse oxidativo.....	36
3.2.3 Avaliação da produção de peróxidos no interior das células tumorais. ....	36
3.2.3 Avaliação da produção de radical superóxido no interior das células tumorais. ....	37
3.2.3 Morfologia.....	37
3.2.4 Análise de dados .....	38
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
4.1 Análises cromatográficas.....	39
4.2. Avaliação da atividade metabólica das frações do extrato bruto obtidas da <i>E. umbellata</i> .....	41

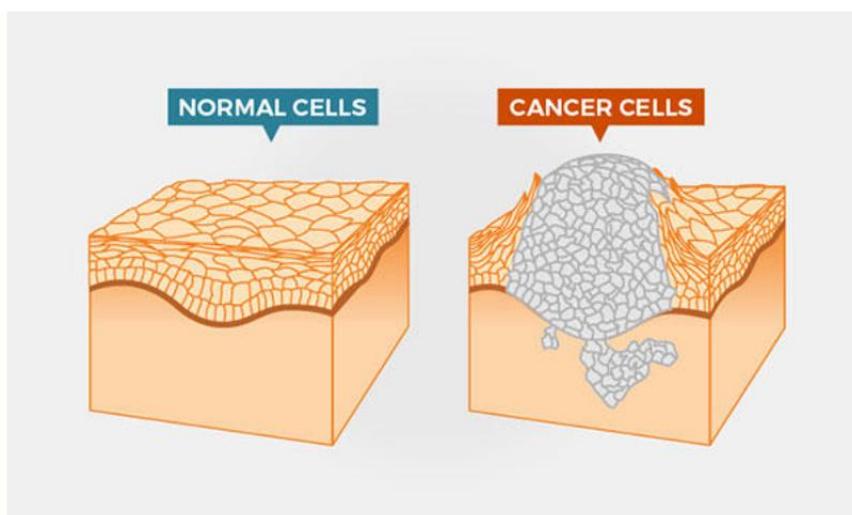
4.3 Avaliação da atividade fração Hex do extrato de <i>E. Umbellata</i> durante o ciclo celular das linhagens MCF7 e HCC1806.....	46
4.4 Avaliação da atividade fração Hex do extrato de <i>E. Umbellata</i> no tipo de morte celular das linhagens MCF7 e HCC1806.....	48
4.5 Efeito da Fração Hex do extrato de <i>E. umbellata</i> na produção de espécies reativas de oxigênio nas linhagens MCF7 e HCC1806 tratadas. ....	51
4.6 Efeito da fração Hex do extrato de <i>E. umbellata</i> na morfologia das células MCF7 e HCC1806. ....	51
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>

## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1 O Câncer e suas estatísticas

O câncer é designado como uma doença que acomete a capacidade de reparação das células, este evento pode causar anomalias que levam à proliferação descontrolada e indiferenciada, favorecendo o surgimento de uma nova população de células com características atípicas, denominada de tumor, que pode ser considerado benigno ou maligno. Os tumores malignos, podem ser invasivos e capazes de sobreviver e proliferar em novos ambientes, produzindo metástases e angiogênese autossustentada (NCI, 2021; ALBERTS et al., 2010).

As células tumorais caracterizam-se por ignorar os sinais externos e internos que regulam a proliferação celular, tendem a evitar os processos de apoptose e diferenciação, além de serem deficientes no reparo de danos ao DNA e na correção de erros de replicação, o que gera acúmulo de mutações (NCI, 2021; ALBERTS et al., 2010).



**Figura 1. Formação do Câncer em tecidos circundantes.**  
Fonte: NCI, 2021.

As estimativas mundiais apontavam que em 2020 ocorreriam no mundo 19,3 milhões de casos novos de câncer (18,1 milhões excluindo casos de câncer de pele não melanoma) e 10 milhões de óbitos, sendo o câncer de mama o mais incidente com 2,2 milhões de ocorrências, correspondendo a 11,7% dos novos casos, seguido

pelo câncer de pulmão com 11,4% (2,2 milhões), cólon e reto 10% (1,9 milhão), próstata (1,4 milhões) e por fim estômago 5,6% (1 milhão) (GLOBOCAN, 2020). Essas estatísticas demonstram como o câncer vem se tornando no maior problema de saúde pública, ficando entre as primeiras causas de morte prematura antes dos 70 anos, na maior parte dos países (INCA, 2023).

Em relação ao Brasil, a estimativa para o triênio 2023-2025 prevê que ocorrerão 704 mil novos casos de câncer (483 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente com 220 mil novos casos, seguido pelos cânceres de mama com 74 mil novos casos; próstata 72 mil casos; cólon e reto 46 mil casos; pulmão 32 mil casos e estômago com 21 mil novos casos (INCA 2023).

Quanto à etiologia, a célula cancerígena é o resultado de várias alterações genéticas que, em conjunto, favorecem o desenvolvimento tumoral. A grande maioria dos cânceres é desencadeada por fatores ou agentes externos ao organismo e, em minoria, estão os cânceres induzidos por diferenças no comportamento reprodutivo e pelos efeitos resultantes do meio hormonal. Tabagismo, maus hábitos alimentares e/ou sexuais, alcoolismo, medicamentos, fatores ocupacionais e exposição prolongada ao sol estão entre os principais fatores externos responsáveis pelo desenvolvimento cancerígeno (INCA, 2023).

## **1.2 O Câncer de mama e suas características**

O câncer de mama é um tipo de câncer que se origina nas células mamárias e pode se manifestar de diferentes formas. O carcinoma ductal invasivo (CDI), como o próprio nome diz, é encontrado nas células do ducto mamário (via por onde o leite materno passa) e representa de 50% a 80% dos casos, já os tumores encontrados nos lóbulos (glândulas onde o leite é produzido durante o período de gestação e lactação), são chamados de carcinoma lobular invasivo (CLI). Os CDIs podem ser classificados como "sem tipo específico" devido à falta de características morfológicas distintas que permitam determinar um tipo histológico específico, no entanto, quando apresentam características distintas suficientes e comportamento celular e molecular particular, podem ser categorizados como "tipos especiais". Dentre os tipos especiais, podemos destacar o carcinoma medular, carcinoma tubular, carcinoma metaplásico,

carcinoma apócrino, carcinoma neuroendócrino, carcinoma mucinoso, carcinoma lobular clássico e carcinoma lobular pleomórfico. (SINGHAL et al.,2021; ALEX, BHANDARY &MCGUIRE, 2020).

### 1.2.1 Os sub-tipos moleculares do câncer de mama

O câncer de mama é uma doença clinicamente heterogênea com diferentes perfis de expressão gênica, que pode ser subdividido em 4 tipos: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER2 (*human epidermal growth factor receptor*) e “*basal-like*” ou basalóide.

Os subtipos luminais A e B possuem esse nome por demonstrar similaridade com as células luminais saudáveis, que são células de contato direto ao lúmen dos ductos mamários, além disso, essas células cancerígenas geralmente exibem a presença de marcadores específicos como citoqueratinas 7, 8, 18 e 19, que são encontradas nas células epiteliais luminais normais. (NASCIMENTO & OTONI, 2020)

O subtipo luminal A é um dos subtipos moleculares mais comuns e caracteriza-se por ter expressão positiva para receptores hormonais de estrogênio (RE+) e progesterona (RP+), porém apresenta baixa expressão do gene HER2 e uma baixa taxa de proliferação celular medida pelo marcador Ki-67. Esse subtipo é associado a um prognóstico favorável, e a terapêutica geralmente inclui um tratamento endócrino com quimioterápicos como tamoxifeno ou inibidores da aromatase, que visam inibir a ação dos hormônios estrogênio e progesterona nos receptores hormonais do tumor. Esse subtipo possui um crescimento mais lento e menor agressividade comparado aos outros, além de apresentar menor envolvimento dos linfonodos e menor probabilidade de metástase. (NASCIMENTO & OTONI, 2020; SINGHAL et. al, 2021)

O subtipo luminal B do câncer de mama corresponde a cerca de 20% a 30% dos casos e pode ser caracterizado pela presença do receptor de estrogênio (RE+), mas com características adicionais que o tornam mais agressivo. Existem duas variantes dentro do subtipo luminal B: o Luminal B (HER2-) e o Luminal B (HER2+). No primeiro caso, o tumor é caracterizado pela ausência de expressão do receptor HER2 e pela alta taxa de proliferação celular mediada pela proteína nuclear Ki-67, já o Luminal B (HER2+) apresenta superexpressão do receptor HER2 e pode ter uma baixa ou alta concentração de Ki-67.

A diferença molecular entre os subgrupos luminais A e B reside na expressão de genes relacionados à proliferação celular, como NSEP1 e a ciclina E1, bem como na ativação de vias alternativas de fatores de crescimento, como PI3K e Src. No subtipo luminal B há uma maior expressão desses genes envolvidos na proliferação celular (NSEP1 e ciclina E1), ativando as vias já citadas que, por sua vez, tornam-se mecanismos que potencializam a agressividade do câncer e aumentam sua resistência ao tratamento. (NASCIMENTO & OTONI, 2020)

O subtipo HER2 apresenta uma expressão aumentada desta oncoproteína que pertence à família das tirosinas quinases, apresenta ausência de RE+ e RP+ e uma altos níveis de Ki-67, colaborando para uma proliferação celular aumentada. Estas características moleculares são encontradas somente no carcinoma lobular invasivo (CLI), que além da alta proliferação, apresenta uma maior tendência à metástase ressaltando um comportamento clínico agressivo. Estudos com esse tipo de célula apontam para uma resistência às terapias endócrinas, no entanto, apresentam boas respostas á terapias que bloqueiam a atividade de HER2, por exemplo, o Trastuzumabe um anticorpo monoclonal humanizado e Lapatinibe, um inibidor de tirosina quinase de receptores moleculares. (SHRIHASTIN et. al, 2021, CIRQUEIRA et. al, 2011)

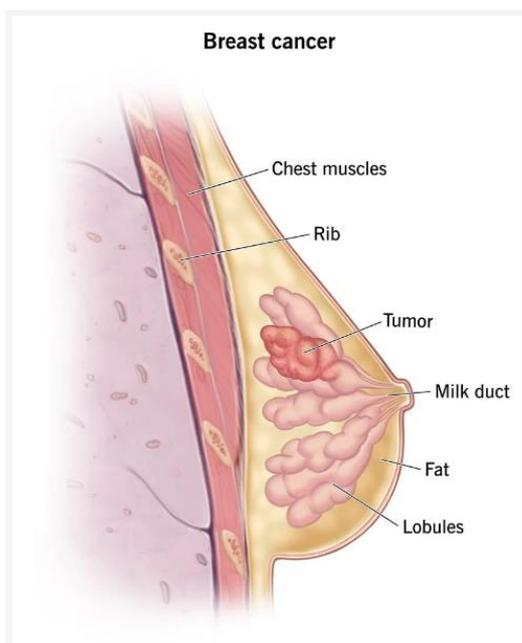
O subtipo triplo negativo de câncer de mama representa de 10% a 20% de todos os casos da doença, caracteriza-se pela falta de expressão dos receptores hormonais ER e PR, além da oncoproteína HER2. Esses tumores são altamente proliferativos, pois possuem altas concentrações de Ki-67 e embora a maioria dos casos se manifeste como carcinoma ductal invasivo sem outra especificação, também incluem variantes de carcinomas medulares, metaplásicos e apócrinos. Os estudos feitos para avaliar o perfil de expressão gênica identificaram sete subtipos distintos de tumores triplo negativos, incluindo tipos semelhantes à basal, luminal com receptor de androgênio, imunomodulatório, claudin-low e mesenquimais, onde cada subtipo apresenta características específicas de expressão gênica e vias de sinalização. (NASCIMENTO & OTONI, 2020; SINGHAL et. al, 2021)

Os tumores triplo negativos ocorrem geralmente em pacientes com mutações nos genes BRCA1 e em mulheres jovens. O tratamento não cirúrgico para tumores triplo negativos é limitado à quimioterapia baseada em platina e inibidores de PARP para pacientes com mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, mas devido à falta de

terapias direcionadas eficazes, o manejo desse subtipo de câncer de mama continua sendo um desafio clínico. (NASCIMENTO & OTONI, 2020; SINGHAL et. al, 2021; CIRQUEIRA et. al, 2011)

### 1.3 Classificação clínica e tratamentos do Câncer de mama

O câncer de mama é classificado primeiramente de acordo com as suas características Histológicas, pode apresentar-se como um tumor invasivo afetando os tecidos adjacentes ou como um tumor “*in situ*” que permanece dentro das células epiteliais. Posteriormente o tumor pode ser classificado conforme seu grau histológico, que avalia a morfologia e proliferação das células tumorais em comparação às células do tecido saudável, onde o grau I apresenta uma diferenciação alta entre ambas e baixa proliferação celular; grau II apresenta diferença moderada entre as células normais e tumorais e o grau III com diferenciação acentuada, onde as células tendem a proliferar mais (INCA,2022; SINGHAL et. al,2021).



**Figura 2. Características anatômicas da mama e crescimento do tumor.**

**Fonte:** [www.clevelandclinic.org](http://www.clevelandclinic.org)

Por fim, o câncer de mama ainda se pode classificar conforme o estágio através do sistema TNM, em que “T” corresponde ao tamanho do tumor, “N” se houve propagação para os linfonodos próximos e “M” a presença ou não de metástases. (Singhal et. al,2021).

#### 1.4 Tratamentos para o Câncer de mama

As terapias atuais do tratamento do câncer de mama variam conforme cada caso, considerando o tipo do tumor e o estágio de seu desenvolvimento. Para pacientes em estágio inicial da doença o método mais recomendado é a cirurgia de remoção completa da mama, chamada de mastectomia total ou pode se limitar a retirada pontual do tumor preservando o restante da mama. (GRAHAME-SMITH & ARONSON, 2004; MOO et. al,2018)

Outras terapias podem ainda ser empregadas em concomitância ou de forma individual, como a radioterapia, que através de uma radiação de onda específica, consegue promover a morte celular das células neoplásicas. A terapia sistêmica chamada de quimioterapia, utiliza uma variedade de medicamentos padronizados para cada tipo de tratamento e é geralmente a opção para pacientes de alto-risco. (MOO et. al,2018)

Sendo assim, novos tratamentos e descobertas de novas drogas são primordiais no auxílio em combate a esta doença.

#### 1.5 *Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns.*

O Brasil possui uma rica diversidade vegetal que têm sido, desde os tempos ancestrais, usadas para tratar uma ampla quantidade de doenças incluindo o câncer. Apesar dessa imensa biodiversidade, uma parte significativa das plantas brasileiras possui pouco ou mesmo nenhum estudo químico ou biológico e podem ser uma importante fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. As espécies vegetais, por serem organismos sem locomoção, produzem princípios ativos tóxicos como forma de defesa aos predadores e patógenos, que podem também apresentar atividade em câncer e em doenças infecciosas e parasitárias (CARVALHO et al., 2010). Neste trabalho será estudada a ação antiproliferativa de uma planta que possui um histórico promissor considerando seu uso pela medicina popular, notoriamente conhecida como Janaúba e cientificamente como *Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns.*

*Euphorbia* é um gênero pertencente à família *Euphorbiaceae*, encontradas principalmente na África tropical e América. Atualmente já foram catalogados cerca de 322 gêneros e 8900 espécies desta família, sendo 72 gêneros e 1.100 espécies encontradas no Brasil, dentre elas podemos destacar alguns exemplos como a *Hevea*

*brasiliensis* M. Arg. Popularmente conhecida como Seringueira, de onde se extrai o látex para a produção de borracha; *Ricinus communis* que possui como fruto a mamona, utilizada na obtenção do óleo de rícino; *Manihot esculenta* Crantz conhecida como mandioca selvagem. (MINOZZO, 2015)

As plantas encontradas na família *Euphorbiaceae* possuem uma variada produção de metabólitos secundários cujos princípios ativos geralmente apresentam atividade citotóxica, com um grande potencial a ser explorado. Partes dessas plantas (látex, caule, raiz, parte aérea ou na sua totalidade) são utilizadas popularmente para tratar diversos tipos de câncer e possuem relevância etnofarmacológica (BHANOT et al., 2011). Nesse sentido, as espécies de *Euphorbiaceae* apresentam alto potencial farmacológico (HARISH & SHIVANANDAPPA, 2006; HIRUMA-LIMA et al., 2000; PERUMAL et al., 2012; YANG et al., 2014).

O látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (sinonímia botânica: *Euphorbia pseudograntii* (Hook. f.) Bruyns; *Synadenium umbellatum* Pax) é usado na medicina popular brasileira para tratar pacientes com diferentes tipos de câncer (DE OLIVEIRA et al., 2013; LUZ et al., 2015; MOTA et al., 2012a, 2012b). Na região Sul (principalmente no Paraná) o látex é utilizado para tratar câncer de intestino, leucemia, câncer de pele etc. Através de uma solução preparada com 18 gotas do látex em 1 litro de água, que denominam como garrafada, ingerem um copo desta três vezes ao dia (ORTÊNCIO, 1997).

Um estudo encontrado evidenciou o potencial farmacológico da *E. umbellata* também no tratamento de complicações gástricas, como úlceras e gastrites utilizando uma fração obtida do extrato metanólico das cascas do caule, que apresentou propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. (MINOZZO. et al., 2016)

Ensaio fitoquímicos preliminares mostraram que os terpenos são as principais substâncias do látex e em vários trabalhos científicos esta classe de substâncias é considerada como fonte promissora de agentes citotóxicos (LIU et al., 2014; LAGE et al., 2010; PEŠIC et al., 2011). Em um estudo anterior, a atividade antitumoral *in vitro* em células de melanoma B16F10 foi comprovada, estando relacionada aos terpenos (DE OLIVEIRA et al., 2013). Outros estudos descreveram a atividade citotóxica do látex em diferentes linhagens celulares e alguns, também atribuíram esses efeitos aos terpenos (ALIABADI et al., 2009; MELO-REIS et al., 2011; MOTA et al., 2012a; SILVA et al., 2011).

O objetivo do presente estudo é avaliar diferentes frações do extrato da *E. umbellata* em modelos experimentais *in vitro* de câncer.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

- Avaliar os efeitos antitumorais do extrato da *E. umbellata* em cultura de células tumorais.

#### 2.1.1 Objetivo secundário

- Avaliar os efeitos antitumorais do extrato da *E. umbellata* em cultura de células tumorais de mama.

### 2.2. Objetivos específicos primários

- Obtenção de extrato bruto e suas frações por particionamento;
- Avaliação do perfil cromatográfico das frações;
- Avaliação do potencial antitumoral das frações de *E. umbellata*;
- Seleção da fração e linhagem tumoral de melhor desempenho;

#### 2.2.1 Objetivos específicos secundários

- Avaliação dos efeitos da fração de *E. umbellata* nos tipos de morte celular das linhagens tumorais do câncer de mama.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material Vegetal

A coleta foi realizada no Viveiro Cipreste, no município de Limeira, em setembro de 2021, com a temperatura ambiente de 25 °C, sendo o material vegetal coletado uma junção de partes da planta como folhas e caules, e também o látex obtido através de incisões feitas com material perfurocortante no tronco da árvore. Este material foi imediatamente imerso em Etanol 70% para dar início ao processo de maceração permanecendo em frasco fechado e ao abrigo da luz por 5 dias, em temperatura ambiente. O presente estudo possui registro na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A8686A7.



**Figura 3.** *Euphorbia umbellata* utilizada na coleta do material vegetal.  
**Fonte:** Acervo da autora.



**Figura 4.** Caule recém cortado, apresentando o látex contido nos tecidos.



**Figura 5.** Folhas características da *Euphorbia umbellata*

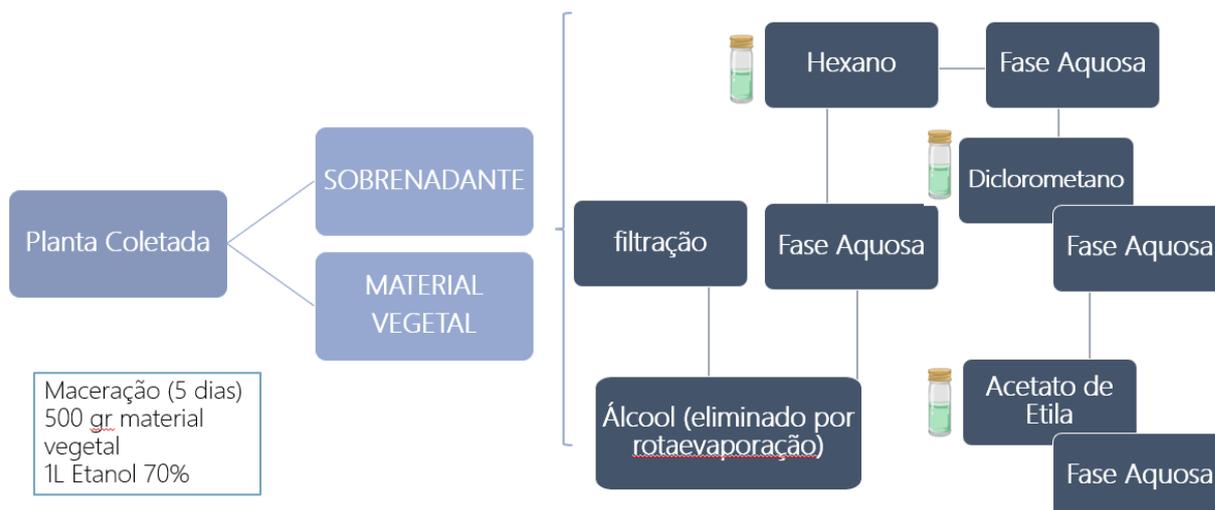
### **3.1.1 Obtenção do extrato bruto**

Os processos de extração e partição foram realizados no Laboratório de Fitoquímica, Farmacologia e Toxicologia Experimental (LAFTex) da UNICAMP sob a supervisão da Profa. Dra. Mary Ann Foglio.

O produto da maceração foi triturado, filtrado e posteriormente extraído em sistema Soxhlet ainda utilizando Etanol 70%. O solvente orgânico foi então eliminado por rotaevaporador (Büchi, modelo R 200) a 38°C associado a um sistema à vácuo, e ao fim da completa evaporação obteve-se então o extrato bruto.

### **3.1.2 Partição e obtenção das frações do látex de *E. umbellata***

As partições foram realizadas com a finalidade de separar os compostos do extrato bruto por polaridade, utilizando Hexano, Diclorometano e Acetato de Etila como solventes orgânicos. Após cada partição, as frações foram colocadas em sistema de rotaevaporação, seu rendimento e perfil cromatográfico foram determinados.



**Figura 6.** Fluxograma de extração

### 3.3.3 Análises Cromatográficas

A cromatografia gasosa é uma técnica utilizada para analisar compostos voláteis e semivoláteis, a partir de uma fase estacionária, que pode ser líquida ou sólida e uma fase móvel gasosa, capaz de fazer uma separação entre as substâncias presentes na amostra. (Lelevic et. al, 2019)

Para este projeto, foi realizada uma análise de Cromatografia Gasosa (CG/EM) acoplada a um detector de massas das frações de Hex, Dclo e Ac.Et, diluídas na proporção de 1:10 em metanol e analisadas em duplicata, sendo a primeira em modo split 1:10 e outra em modo *splitless*.

A análise foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrofotômetro de massas triplo quadrupolo LCMS8060 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Utilizou-se uma coluna cromatográfica DB5MS (30m x 0,25mm x 0,25um) e gás hélio como gás de arraste, com vazão de 1,0 mL/min. As temperaturas da fonte de íons, da interface e do injetor foram mantidas a 280°C. A programação do gradiente de temperatura teve início em 150°C por 2 minutos, com taxa de aquecimento de 10°C/min até 300°C, mantendo essa temperatura por 10 minutos.

Na detecção por espectrometria de massas, adotou-se uma análise de varredura, utilizando-se uma energia de ionização de 70eV. A taxa de aquisição utilizada foi de 0,300 segundos, na faixa de 40,0 a 500,0 Da.

A identificação dos compostos foi realizada pela comparação com os espectros da biblioteca do equipamento, utilizando-se o software GCMSolution (Shimadzu, Kyoto, Japan).

### 3.2 Estudo Farmacológico *in vitro*:

O objetivo do *screening in vitro* é a busca por substâncias que sejam capazes de inibir a proliferação de células tumorais, ou seja, neste projeto os estudos auxiliaram a elucidar qual fração ativa do extrato possui resultados significativos, e qual linha celular demonstrou um efeito antitumoral mais promissor, a fim de, posteriormente serem conduzidos os testes mais específicos.

#### 3.2.1 Cultivo Celular

Para esta técnica foram utilizadas as seguintes linhagens celulares tumorais humanas: ECC1 (câncer de endométrio), A375 (melanoma), MCF7 (câncer de mama), HCC1806 (câncer de mama triplo negativo), HuH7 (câncer de fígado) (Tab.1).

As linhagens tumorais utilizadas foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) e mantidas em frascos médios de 75cm<sup>2</sup> (Corning®), utilizando o meio de cultura apropriado à necessidade de cada linhagem celular (Tab.1) podendo variar entre meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) ou meio DMEM (Sigma-Aldrich®), suplementados de 5 a 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco®) acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina e 0,25% de Piruvato (Sigma-Aldrich®), incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Densidade plaqueamento(cels/mL)</b>	<b>Órgão</b>	<b>Histologia</b>	<b>Meio de cultura</b>
<b>ECC1</b>	100,000	Endométrio	Adenocarcinoma	RPMI 10%
<b>A375</b>	100,000	Pele	Melanoma	DMEM 5%
<b>MCF7</b>	100,000	Mama	Carcinoma	DMEM 5%

<b>HCC1806</b>	100,000	Mama	Carcinoma (variante de acantolítica)	RPMI 10%
<b>HuH7</b>	100,000	Fígado	Carcinoma	DMEM 10%

**Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas no screening e suas características.**

### **3.2.1.1 Ensaio de atividade metabólica pelo método do MTT**

Inicialmente, para investigar a citotoxicidade das frações frente às linhagens celulares optou-se por avaliar a interferência na atividade metabólica. Este ensaio se baseia na redução de sais tetrazólio 3-(4,5-dimethylthia-zolyl-2) 2,5-di-phenylte-trazolium bromide (MTT-amarelo) à cristais de formazana (roxo) por enzimas desidrogenases presentes nas células viáveis. Esses cristais são posteriormente solubilizados com solvente apropriado e quantificados por espectrofotometria, sendo a intensidade da cor proporcional à viabilidade celular (Ferreira et. Al. 2021)

Para esta avaliação, as células foram adicionadas em placas de 48 poços (SPL Life Sciences) a uma densidade de 0,1 à 0,2 x 10<sup>6</sup> células/mL (volume de 5mL por poço) de acordo com a linhagem celular em meio apropriado como descrito na tabela 1 e incubadas à 37 °C, com atmosfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> e umidade constante. Após 24h, as células foram tratadas com as frações do extrato, com o volume de 5uL (1% do volume total). As amostras foram diluídas em DMSO nas seguintes concentrações: 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 µg/mL e incubadas como já descrito. A pós 24h e 48h, os poços foram lavados com PBS e, adicionou-se 100 µL de solução de MTT 1% seguindo-se incubação overnight nas mesmas condições. Os cristais de foram dissolvidos com Isopropanol ácido e a leitura de absorbância foi feita utilizando o EnsPire Multimode Reader(PerkinElmer®) em 570nm e 620nm em software próprio.

Com os dados obtidos, foram gerados gráficos no software GraphPad Prism 9 a fim de obter os valores de IC 50 (concentração inibitória, isto é, a concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%).

### 3.2.2. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica amplamente utilizada, tanto em análises com fins de diagnósticos quanto na pesquisa científica, desempenhando papel fundamental na obtenção de resultados. Neste trabalho foi empregada com o intuito de elucidar os mecanismos de morte celular provocados pelos extratos em estudo, indicando assim a viabilidade celular em resposta ao tratamento aplicado.

A citometria funciona alinhando individualmente as células ou partículas de uma suspensão diante de um fluxo com pressão estabelecida. São então incididos por um feixe de luz, cujo sinais emitidos por essas partículas são captados pelo equipamento e tornam-se dados digitais que podem ser utilizados para avaliar condições morfológicas, danos intra e extracelular, expressão gênica, fisiologia celular, expressão de proteínas de superfície, dentre outras características (Ibrahin & Van den Engh, 2007).

No caso deste trabalho, para esta técnica foram utilizadas apenas duas linhas celulares definidas pelos resultados da triagem obtidos pelo MTT, sendo elas MCF7 e HCC1806 sendo os critérios de escolha mais bem detalhados na parte de resultados e discussão.

#### 3.2.2.1 Avaliação do ciclo celular

O ciclo celular consiste em quatro etapas pelo qual a célula passa com o objetivo de duplicar o seu material genético, gerando duas novas células (chamadas células-filhas) idênticas a célula original (chamada de célula mãe). Iniciando pela fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, seguida da fase S onde as células iniciam a síntese de material genético para a divisão celular e finalizam com G<sub>2</sub>/M, em que, através da citocinese se dividem em duas células idênticas e funcionais ( $G_0/G_1 = 2n$ ;  $2n < S < 4n$ ;  $G_2/M = 4n$ ). Na técnica é utilizado o iodeto de propídio (PI), um intercalante de DNA, que evidencia qual fase do ciclo celular a maior parte das células está presente.

Para execução da técnica, as linhas MCF7 e HCC1806 foram inoculadas em frascos pequenos de 25cm<sup>2</sup> (Corning®) na densidade de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  cel/mL e incubadas por 24h em condições comuns. Após esse período foram tratadas com 1% da fração Hex diluída em DMSO na concentração de 7,8125 µg/mL e incubadas novamente por mais 24h em condições adequadas, em seguida foram gentilmente tripsinizadas, resultando em uma suspensão celular de aproximadamente

três milhões de células. A seguir foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, descartando posteriormente o sobrenadante. Foi então adicionado ao tubo etanol 70% com agitação constante em vórtex e a seguir mantido a 4°C no escuro durante 30 min. Em seguida foram adicionados 2mL PBS, seguida de centrifugação novamente a 2500 rpm durante 5 minutos, descartando posteriormente o sobrenadante. Por fim, foi adicionado 200µL de Iodeto de propídio (PI/Solução de RNase) e homogeneizado suavemente em vórtex e incubado novamente no escuro, em temperatura ambiente por 15 minutos. A solução foi armazenada em 4°C no escuro até o momento da leitura. Como controle negativo foram utilizadas células sem tratamento com o extrato.

### **3.2.2.2 Avaliação de Exposição de resíduos de fosfatidilserina:**

Este teste emprega a marcação dupla utilizando Anexina V acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídio. A anexina possui alta afinidade por fosfatidilserina, um fosfolípido aniônico encontrado no folheto interno da bicamada lipídica, entretanto, em processos de apoptose a fosfatidilserina acaba translocada para a face externa da membrana celular permitindo que a anexina V se ligue a ela, e o sinal possa ser captado pelo citômetro pela emissão de luz gerada pelo FITC. Em contrapartida o iodeto de propídio como intercalante de DNA só pode se ligar ao material genético se houver uma ruptura na membrana celular, já que o mesmo não possui característica capaz de fazê-lo atravessar essa barreira, indicando um processo tardio de morte celular, como a necrose.

Para execução da técnica, as linhagens MCF7 e HCC1806 foram inoculadas em frascos pequenos de 25cm<sup>2</sup> (Corning®) na densidade de aproximadamente 1,5x10<sup>6</sup> cel/mL e incubadas por 24h em condições comuns. Após esse período foram tratadas com 1% da fração Hex diluída em DMSO na concentração de 7,8125 µg/mL e incubadas novamente por mais 24h em condições adequadas, em seguida foram gentilmente tripsinizadas resultando em uma suspensão celular de aproximadamente três milhões de células. Esse material foi centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos, descartando posteriormente o sobrenadante. Foi então adicionado ao tubo tampão de ligação, Anexina V e o Iodeto de propídio, homogeneizado suavemente em vórtex e depois incubados em temperatura ambiente, no escuro durante 15 min. Em seguida adicionou-se novamente o tampão de ligação, homogeneizou-se e manteve-se a

solução armazenada a 4°C no escuro até o momento da leitura. Como controle negativo foram utilizadas células sem tratamento com o extrato.

### **3.2.3 Avaliação do estresse oxidativo**

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da fração Hex no estresse oxidativo das células tumorais do câncer de mama (MCF7 e HCC1806). Para tal, empregou-se a técnica de citometria de fluxo para a análise da produção intracelular de peróxidos, utilizando a sonda DFCH<sub>2</sub>-DA (2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), e a produção intracelular do radical superóxido (O<sub>2</sub>-•), utilizando a sonda DHE (dihydroethidium).

### **3.2.3 Avaliação da produção de peróxidos no interior das células tumorais.**

A produção intracelular de peróxidos foi avaliada através da técnica de citometria de fluxo após o tratamento das linhagens MCF7 e HCC1806 com a Fração Hex, que foram submetidas à amostra por um período de 24h de incubação. Para essa quantificação, utilizou-se a sonda 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH<sub>2</sub>-DA) fornecida pela marca Sigma (EUA). Essa sonda, que é lipossolúvel e não-fluorescente, tem a capacidade de atravessar a membrana celular devido à presença de grupos acetatos. Dentro da célula, esses grupos são removidos por enzimas chamadas esterases, resultando no acúmulo de DCFH<sub>2</sub> no citosol da célula. A presença de peróxidos intracelulares leva à oxidação do DCFH<sub>2</sub>, formando a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), uma molécula altamente fluorescente. A fluorescência emitida pelo DCF é de cor verde, com um comprimento de onda de 530nm, quando estimulada por uma luz com comprimento de onda de 488nm. A intensidade da fluorescência está diretamente relacionada à concentração intracelular de peróxidos, sendo o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) especialmente relevante nesse contexto.

Para realizar essa avaliação, preparou-se uma suspensão de aproximadamente 3 milhões de células que foi posteriormente centrifugada a 1300g por 5 minutos. O pellet resultante foi ressuspenso em PBS 1x e incubado com DCFH<sub>2</sub>-DA (com concentração de 5µM) dissolvido em dimetilformamida a 1mM, pelo período de 45 minutos em ambiente com ausência de luz e à temperatura de 37°C.

Após a incubação, a suspensão celular foi centrifugada novamente a 1300g por 5 minutos, e o pellet foi ressuspenso em 400µL de solução tampão PBS. A detecção por citometria de fluxo foi realizada utilizando um comprimento de excitação de 504nm e um comprimento de emissão de 529nm. Os resultados foram apresentados como a média das intensidades de fluorescência obtidas. (Teixo, 2013)

### **3.2.3 Avaliação da produção de radical superóxido no interior das células tumorais.**

Através do uso da técnica de citometria de fluxo, foi possível investigar a produção intracelular do radical superóxido utilizando a sonda dihidroetídio (DHE, Sigma, EUA). Essa sonda possui a capacidade de atravessar facilmente a bicamada lipídica da membrana celular. Uma vez no interior da célula, a sonda é oxidada pelo radical superóxido, resultando na formação de etídio. O etídio se intercala no DNA e emite fluorescência na cor vermelha, permitindo a quantificação e detecção do radical superóxido. Vale ressaltar que essa reação é altamente específica para o radical superóxido, apresentando pouca ou nenhuma oxidação induzida pelo peróxido de hidrogênio e pelo ácido hipocloroso.

Para este experimento, uma suspensão contendo aproximadamente 3 milhões de células foi submetida a uma centrifugação de 1300g por 5 minutos. O material celular resultante foi reconstituído em um tampão de solução salina tamponada (PBS). Em seguida, a suspensão celular foi incubada com DHE, dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), com concentração final de 5µM, durante um período de 15 minutos a 37°C, em ambiente com ausência de luz. Após a incubação, ocorreu uma nova centrifugação, seguida pela reconstituição do pellet celular em 400µL de tampão PBS. A detecção da fluorescência foi realizada utilizando um comprimento de onda de excitação de 620nm.

### **3.2.3 Morfologia**

Ensaio de morfologia foram realizados com as linhagens MCF7 e HCC1806 com o intuito de perceber como a estrutura celular se comportava mediante a presença dos extratos, tentando identificar se havia características que indicassem o tipo de morte celular.

Para essa análise, as linhagens foram inoculadas em placas de 6 poços na densidade de aproximadamente  $0,8 \times 10^6$  cel/mL e incubadas por 24h em condições comuns. Após esse período, foram tratadas com 1% da fração Hex diluída em DMSO na concentração de 7,8125  $\mu\text{g/mL}$  e incubadas novamente por mais 24h em condições adequadas. A seguir foram gentilmente tripsinizadas e a suspensão celular foi centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos, descartando posteriormente o sobrenadante. O pellet foi ressuspenso com FBS e feito um esfregaço com essa solução, deixado a secagem por pelo menos 30min. As células então foram fixadas com metanol durante 5min. Para fixar o núcleo, as lâminas foram cobertas com solução May-Grünwald (Merck Millipore®) por 4 min, e para fixar o citoplasma as lâminas foram cobertas com solução Giemsa (Merck Millipore®) solubilizada em 5% de PBS, por 15min. As lâminas foram lavadas dos excessos de reagentes e secadas em ambiente arejado.

As amostras foram lidas em microscópio óptico, acoplado a câmera digital, com lente de aumento em 50X.

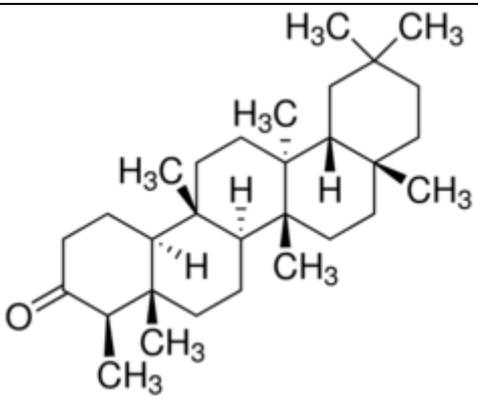
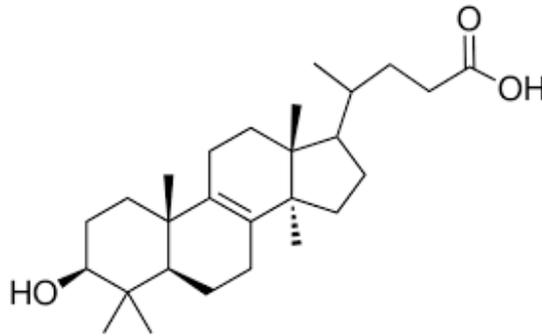
#### **3.2.4 Análise de dados**

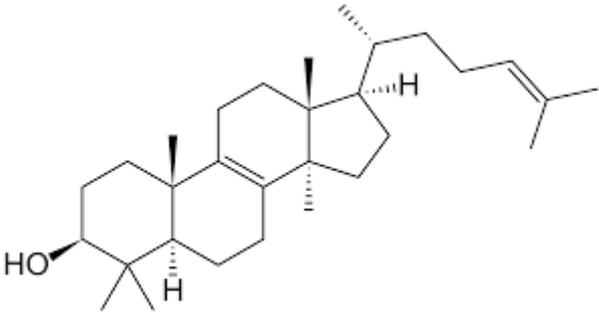
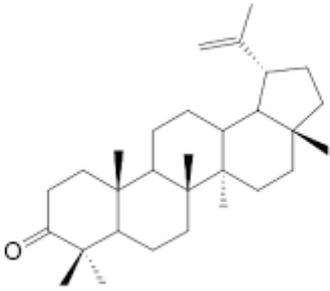
Foi utilizado o software GraphPad Prism 9® para as análises estatísticas. Para todos os ensaios de MTT, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo sigmoidal dose-resposta (regressão não-linear). Para os ensaios feitos por citometria de fluxo, os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Foi realizada uma avaliação da normalidade dos dados utilizando o teste Shapiro-Wilk para determinação de testes paramétricos ou não paramétricos das comparações almejadas. Para distribuições normais, foi realizado o teste t não pareado (Welch's) de uma amostra paramétrico e, para distribuições não normais, foi executado o teste de Mann-Whitney U não paramétrico.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises cromatográficas

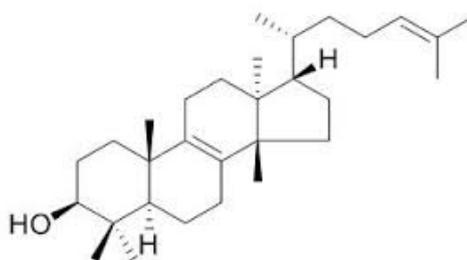
O resultado dos picos mais intensos das análises cromatográficas está representado na tabela a seguir (Tab.2) e foram obtidos com o intuito de elucidar os possíveis componentes dos extratos. Os picos foram atribuídos aos componentes por comparação com a biblioteca de fragmentogramas de substâncias já existentes no equipamento, entretanto, parâmetros como o índice de retenção e padrão autêntico não foram considerados nesta análise.

Tempo de retenção	Extrato	Estrutura sugerida
28 min	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	 <p>The structure is a complex polycyclic steroid-like molecule. It features a central ring system with several methyl groups (CH<sub>3</sub>) attached at various positions. A ketone group (C=O) is present on one of the rings. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes for several methyl groups and hydrogens.</p>
22,49	Hexano	 <p>The structure is a complex polycyclic steroid-like molecule. It features a central ring system with a hydroxyl group (HO) and a long side chain ending in a carboxylic acid group (COOH). The stereochemistry is indicated with wedges and dashes for several methyl groups and hydrogens.</p>

22,86	Hexano	
24,5	Hexano	

**Tabela 2. Possíveis compostos encontrados nas frações Hex e Diclorometano em análise por CG/EM.**

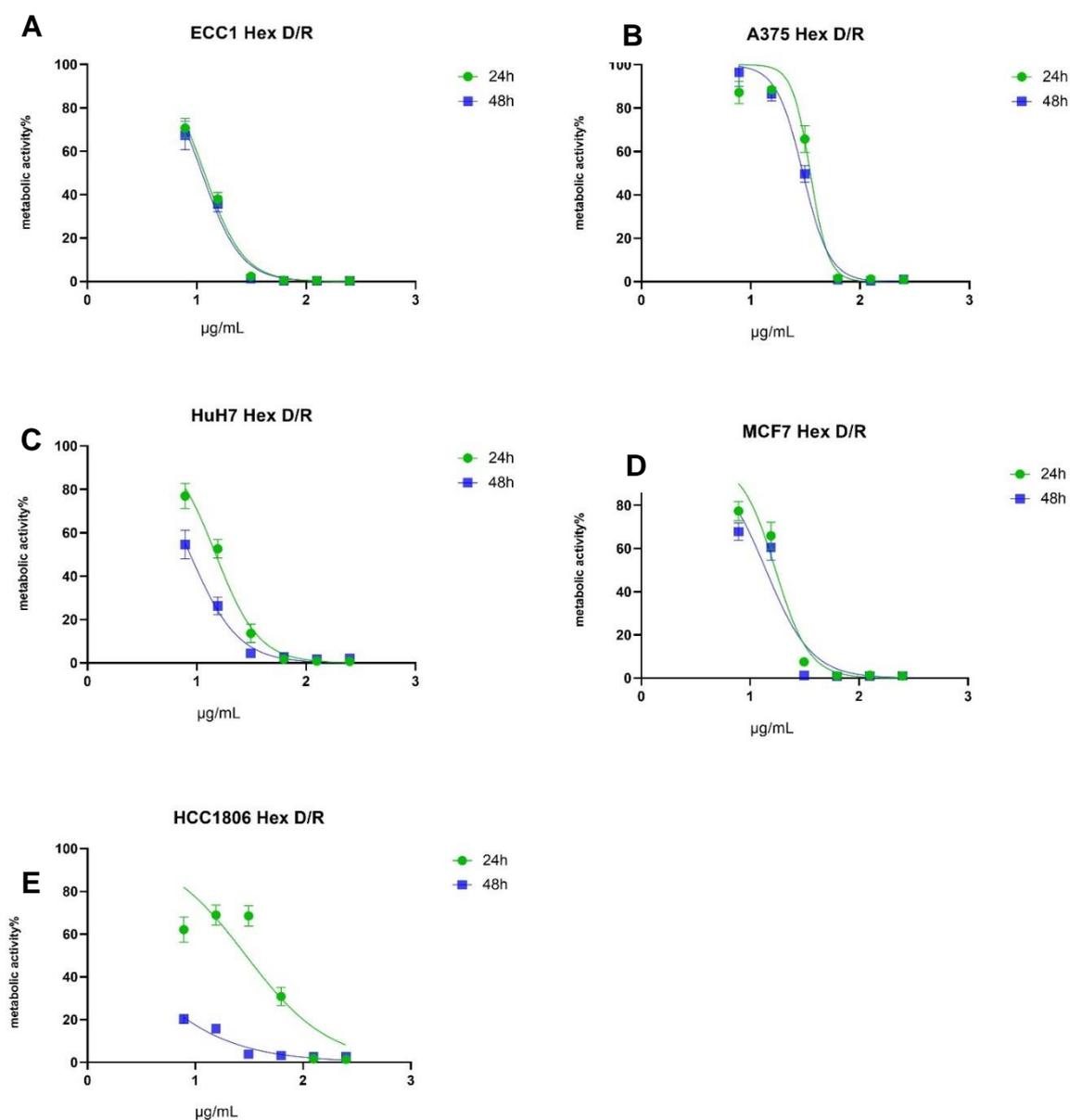
As estruturas sugeridas possuem semelhança a um metabólito secundário comumente encontrado em espécies de plantas da família Euphorbiaceae, o Eufol. Descrito em alguns artigos como um composto promissor em estudos sobre inflamação e câncer, o Eufol é um triterpeno tetracíclico que apresentou propriedades medicinais como: atividade antitumoral; efeito antiproliferativo; capacidade imunomoduladora no sistema complemento (atuando como um amenizador de processos inflamatórios), além de possuir alta citotoxicidade em linhagens celulares tumorais (Cruz et.al.2018; Luz et. al. 2015; Munhoz et al. 2014; De Oliveira et.al., 2021; Wang et al. 2013).



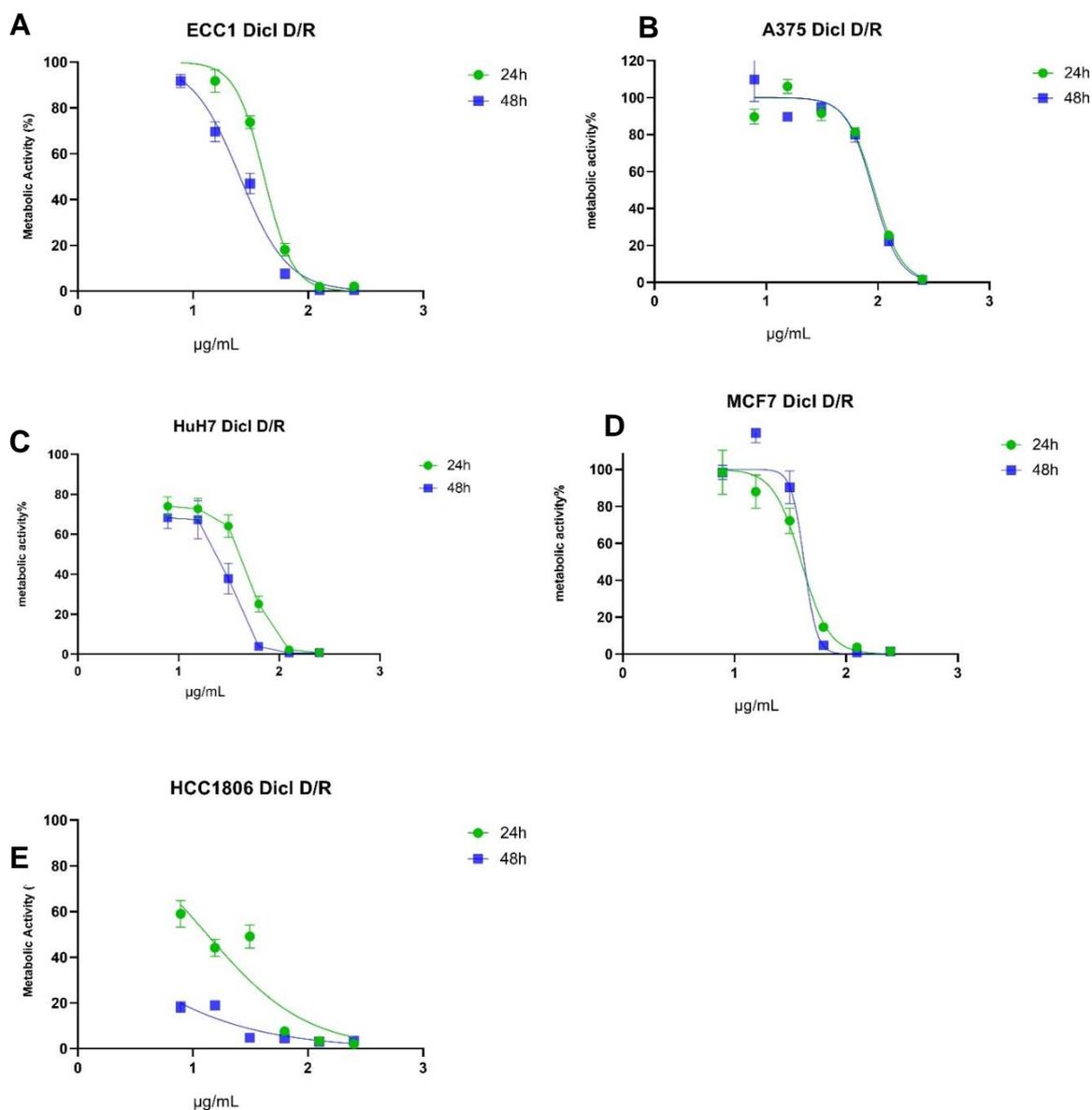
**Figura 7. Estrutura química do Eufol**

## 4.2. Avaliação da atividade metabólica das frações do extrato bruto obtidas da *E. umbellata*

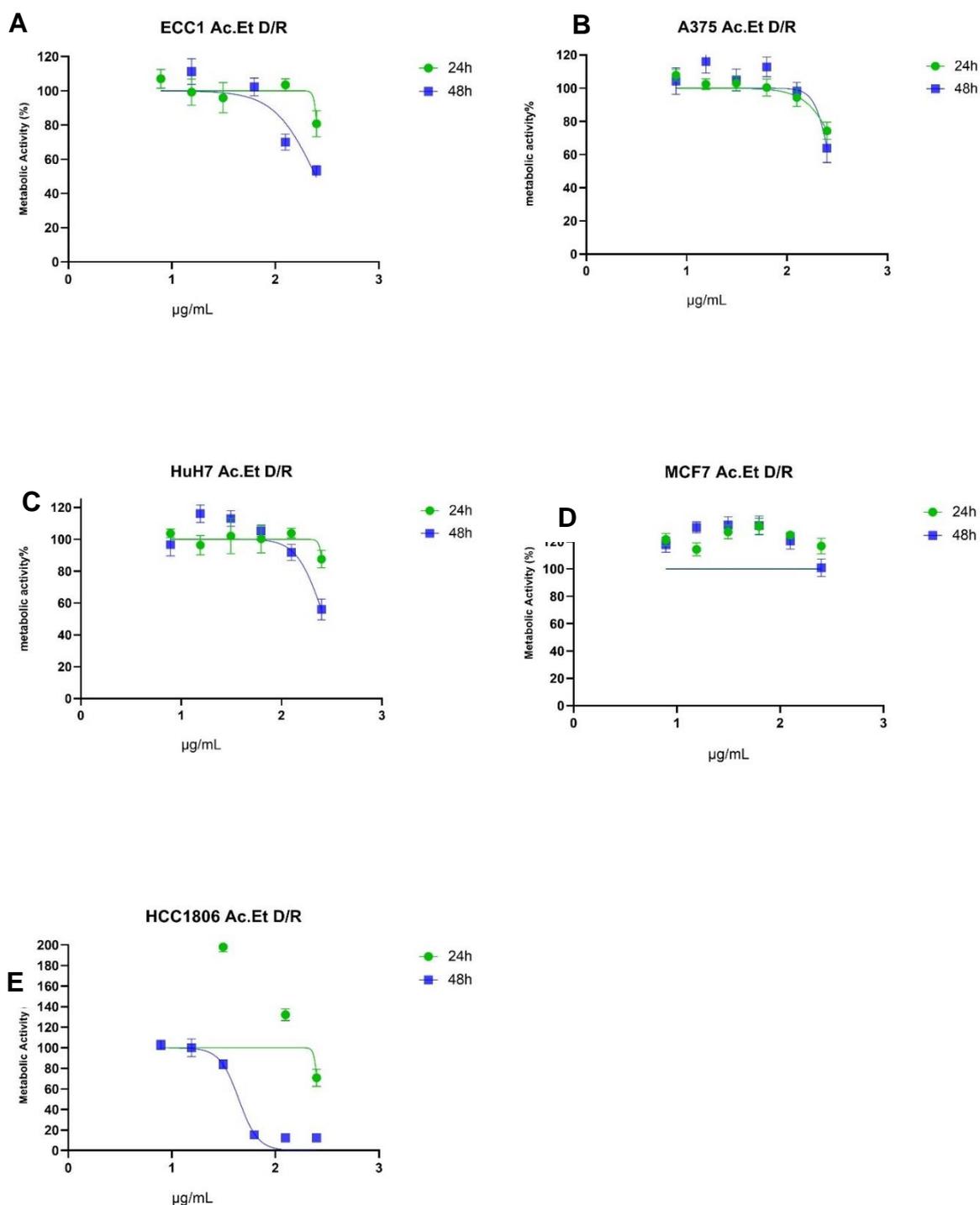
Para determinar a influência das frações do extrato no aumento ou diminuição da atividade metabólica das linhagens celulares testadas, foi utilizada a técnica de MTT onde as células foram expostas as frações diluídas em DMSO numa escala de concentração desde 7,8125 até 250  $\mu\text{g/mL}$  cujos dados obtidos foram representados em gráficos, ajustados a um modelo Dose-resposta sigmoide como é apresentado nas figuras 6,7 e 8, correspondentes às frações Hex, Dicl. e Ac. Etila, respectivamente.



**Figura 8. Curvas Dose-resposta da fração Hexano.** Dados obtidos das linhagens tratadas com a fração Hex do extrato com as concentrações de 7,8125; 15,65; 31,25; 62,5; 125; 250  $\mu\text{g/mL}$  (eixo X), em relação a atividade metabólica celular (eixo Y) com os tempos de exposição de 24h e 48h. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de regressão não linear de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média e ao erro padrão de  $n \geq 3$ . ECC1 (endométrio), A375 (melanoma), MCF7 (mama), HCC1806 (mama triplo negativo), HuH7 (fígado).



**Figura 9. Curvas Dose-resposta das linhagens testadas.** Dados obtidos das linhagens tratadas com a fração Diclorometano do extrato bruto, diluída nas concentrações de 7,8125; 15,65; 31,25; 62,5; 125; 250 µg/mL (eixo X), em relação a atividade metabólica celular (eixo Y) com os tempos de exposição de 24h e 48h. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de regressão não linear de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média e ao erro padrão de  $n \geq 3$ . ECC1 (endométrio), A375 (melanoma), MCF7 (mama), HCC1806 (mama triplo negativo), HuH7 (fígado).



**Figura 10 Curvas Dose-resposta das linhagens testadas.** Dados obtidos das linhagens tratadas com a fração Acetato de etila do extrato bruto, diluída nas concentrações de 7,8125; 15,65; 31,25; 62,5; 125; 250 µg/mL (eixo X), em relação a atividade metabólica celular (eixo Y) com os tempos de exposição de 24h e 48h. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de regressão não linear de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média e ao erro padrão de  $n \geq 3$ . ECC1 (endométrio), A375 (melanoma), MCF7 (mama), HCC1806 (mama triplo negativo), HuH7 (fígado).

Os resultados apresentados evidenciam uma diferença de resposta em relação as frações utilizadas, onde a fração de Ac.Etila apresenta menor efeito na diminuição da atividade metabólica das células (fig. 8) e a fração Hex apresenta a maior taxa de inibição da proliferação celular (fig. 6), que pode ser devido às suas características físico-químicas que retêm os compostos mais apolares presentes no extrato, estando possivelmente dentre eles o eufol, que como visto também em Cruz et al. (2017), foi encontrado majoritariamente na fração extraída com Hexano. No entanto, para a comprovação desta hipótese seriam necessários experimentos futuros com o composto isolado.

Através dos dados obtidos pela avaliação metabólica foram calculados para cada linhagem testada o valor de IC<sub>50</sub>, que corresponde a concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular. Os resultados das frações Hex e Dicl estão apresentados nas tabelas a seguir, com relação aos resultados obtidos pela fração Ac. Etila não foi possível calcular os valores de IC<sub>50</sub> pois os dados obtidos não se adequavam ao modelo matemático proposto.

**Tabela 3.** Valores de IC<sub>50</sub>, R<sup>2</sup> e intervalo de confiança de 95%, dados obtidos das linhagens tratadas com a fração Hexano pelos tempos de exposição de 24h e 48h.

	24h			48h		
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de Confiança	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de Confiança	R <sup>2</sup>
<b>ECC1</b>	<b>11,74</b>	[10,94;2,57]	0,9342	<b>11,13</b>	[10,25;12,04]	0,9158
<b>A375</b>	35,07	[nd;38,08]	0,9186	30	[27,90;32,07]	0,9547
<b>Huh7</b>	<b>14,9</b>	[13,45;16,47]	0,9325	<b>8,68</b>	[7,661;9,646]	0,8224
<b>MCF7</b>	<b>17,11</b>	[15,40;18,86]	0,8848	<b>13,97</b>	[12,21;15,90]	0,8584
<b>HCC1806</b>	29,52	[22,29;38,04]	0,7134	1,908	[1,215;2,656]	0,8041

Os valores em negrito destacam os resultados mais relevantes. ECC1 (endométrio), A375 (melanoma), MCF7 (mama), HCC1806 (mama tripla negativo), HuH7 (fígado)

**Tabela 4.** Valores de IC<sub>50</sub>, R<sup>2</sup> e intervalo de confiança de 95%, dados obtidos das linhagens tratadas com a fração Diclorometano pelos tempos de exposição de 24h e 48h.

	24h			48h		
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de Confiança	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de Confiança	R <sup>2</sup>
<b>ECC1</b>	<b>41,28</b>	[37,85;45,18]	0,9393	25,46	[23,26;27,85]	0,9416

<b>A375</b>	92,57	[85,19;100,5]	0,9511	89,72	[79,33;101,4]	0,8789
<b>Huh7</b>	<b>31,74</b>	[25,87;38,43]	0,8473	<b>19,32</b>	[15,17;24,15]	0,7961
<b>MCF7</b>	<b>39,63</b>	[34,10;46,09]	0,8673	42,07	nd	0,9405
<b>HCC1806</b>	13,27	[10,12;16,67]	0,7577	<b>1,055</b>	[0,3561;2,030]	0,7038

Os valores em negrito destacam os resultados mais relevantes. ECC1 (endométrio), A375 (melanoma), MCF7 (mama), HCC1806 (mama triplo negativo), HuH7 (fígado)

Os resultados obtidos tanto pelo perfil das curvas dose-resposta, quanto pelos valores de IC<sub>50</sub> permite afirmar que na maioria das células tratadas não houve uma variação estatisticamente significativa em relação ao tempo de exposição (24 ou 48h). De modo geral as linhagens testadas apresentaram resultados semelhantes nos dois time-points, porém, o perfil oposto foi verificado quando se avalia a diluição do extrato, isto é, observa-se que existe uma relação concentração-dependente, que diminui a atividade metabólica com o aumento da concentração.

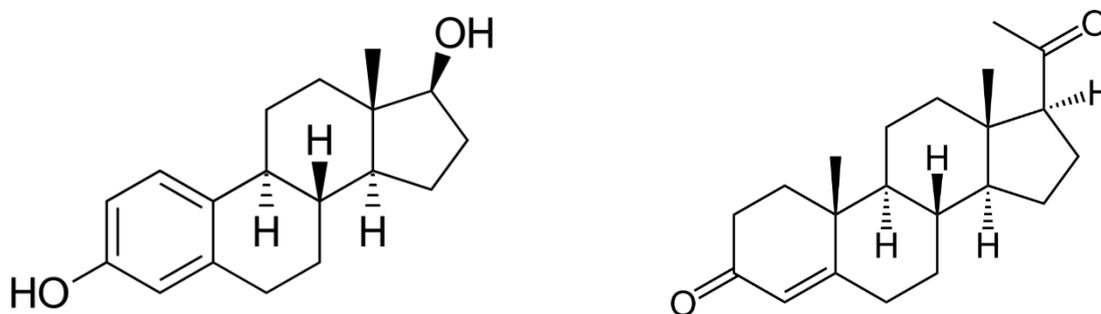
Analisando a fração com maior ação inibitória no metabolismo celular (fração Hex), é possível distinguir dentre as linhagens quais obtiveram resultados mais significativos. ECC1 (endométrio) obteve valores de IC<sub>50</sub> de 11,74µg/mL em 24h e 11,13µg/mL e 48h e MCF7 (carcinoma mamário) com valores de 17,11µg/mL e 13,97µg/mL em 24h e 48h e HUH7 com 14,9µg/mL e 8,68 µg/mL respectivamente.

Para avançar o estudo, através de testes mais específicos, foi escolhida a linhagem MCF7, visto que o câncer de mama é atualmente o mais incidente em mulheres no Brasil. Segundo a estimativa mais recente do INCA (2023), dos novos casos de câncer 30,1% serão câncer de mama somando um total de aproximadamente 73mil casos, além de ser o tipo de câncer líder de mortalidade em mulheres no mundo todo (Trayes e Cokenakes, 2021), o que corrobora para a necessidade de estudos com a obtenção de novos compostos que possam auxiliar nos tratamentos para esta patologia. A quimioterapia, uma das vias de tratamentos convencionais para o câncer, possui algumas medicações com ativos derivados ou análogos de compostos encontrados em plantas como, por exemplo, o paclitaxel (Taxol®), a vincristina e a vimblastina (Cruz et al. 2017), entretanto, estudos sobre o uso da *E. umbellata* como potencial precursora de novos compostos para este tipo de câncer são inexistentes na literatura, o que amplia a necessidade de maiores estudos nesse campo.

A linhagem celular MCF7 é uma das poucas com expressão positiva para receptores de estrogênio, facilitando estudos que necessitem da mimetização de

cânceres invasivos com essa característica (Lee et.al. 2015). Para obter um estudo mais completo foi adicionado posteriormente ao projeto a linhagem HCC1806, um carcinoma de mama com expressão negativa para receptores de estrogênio (RE), com intuito de perceber se essa característica influenciaria nas respostas obtidos pela exposição das linhagens à amostra.

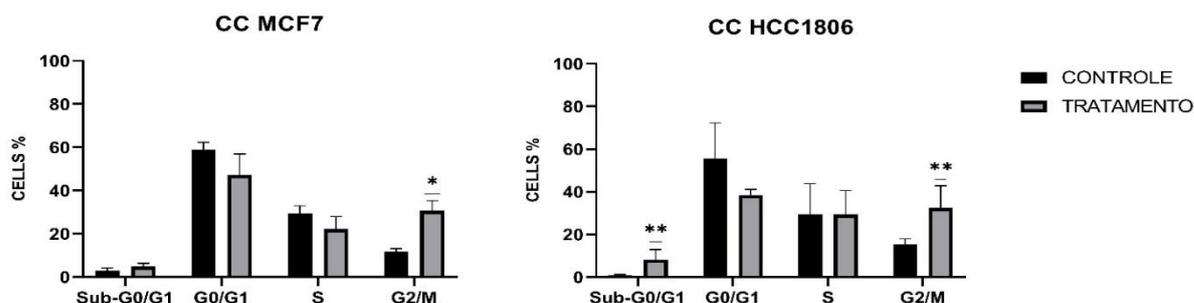
Outro fator importante para a seleção das linhagens a serem estudadas, foi a semelhança em alguns pontos da estrutura química do Eufol (substância presente no extrato, principalmente na fração de Hexano) e dos hormônios femininos Estrogênio e Progesterona, portanto, uma linhagem celular cujo crescimento fosse influenciado pela presença ou ausência desses hormônios poderia apresentar resultados mais elucidativos em relação a possível atuação da amostra.



**Figura 11.** Estrutura do Estrogênio (à esquerda) e da Progesterona (à direita).

#### **4.3 Avaliação da atividade fração Hex do extrato de *E. Umbellata* durante o ciclo celular das linhagens MCF7 e HCC1806**

Os resultados obtidos na avaliação das fases do ciclo celular estão apresentados na figura a seguir (fig12).



**Figura 12. Ciclo celular de células MCF7(A) e HCC1806(B) após de exposição de 24h com a fração HEX na concentração de 7,8125 µg/mL.** Os resultados mostram a porcentagem das células nas fases Sub-G0, G0/G1, S e G2/M do ciclo celular. Os resultados representam a média e o erro padrão da média de  $n \geq 3$  ensaios, realizados em triplicata. Diferenças significativas em relação ao controle são representadas com \*, onde \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .

Nesta etapa as linhagens celulares foram tratadas com a fração Hex a uma concentração de 7,8125 µg/mL em 24h de incubação. Em MCF7 as células do controle apresentaram uma média de  $11,67 \pm 1,43\%$  em fase G2/M já as células tratadas apresentaram um aumento para  $30,6 \pm 4,65\%$  na mesma fase (fig12), ou seja, a fração Hex provocou uma parada nesta fase do ciclo. Na linhagem HCC1806 houve um aumento da porcentagem de células tratadas com média de  $8,16 \pm 1,95\%$  em relação ao controle com média igual a  $0,67 \pm 0,21\%$  na fase Sub-G0/G1, entretanto, o resultado mais estatisticamente significativo foi observado na fase G2/M onde também houve um aumento de células tratadas ( $32,33 \pm 4,31\%$ ) em relação as células do controle ( $15,16 \pm 1,14\%$ ) na mesma etapa.

A fase G2/M do ciclo celular é composta de vários checkpoints para garantir que a célula esteja pronta para entrar no processo de mitose, com relevância maior para a checagem da integridade do DNA, que conta com múltiplos mecanismos para promover essa parada no ciclo caso o DNA esteja danificado, por exemplo, inativando a via de Cdc2 para impedir que a célula progrida para a fase seguinte no ciclo e aumentando níveis de p53, para reparações do material genético e supressão de oncogênese (Stark e Taylor 2004). Os quimioterápicos citostáticos atuam na fase G2/M do ciclo e podem interferir nas etapas de checagem. Por exemplo, o Paclitaxel que se liga às tubulinas presentes nos microtúbulos os estabilizando e impedindo a sua despolimerização, levando a um acúmulo dos mesmos e inibindo a formação do fuso mitótico, o que impede a célula de concluir sua divisão normalmente e passar da fase mitótica (Samaan et al. 2019). Esta e outras vias dos checkpoints em G2/M

podem ser potenciais vias de ação da fração Hex, porém, estudos mais direcionados devem ser feitos para elucidar a hipótese.

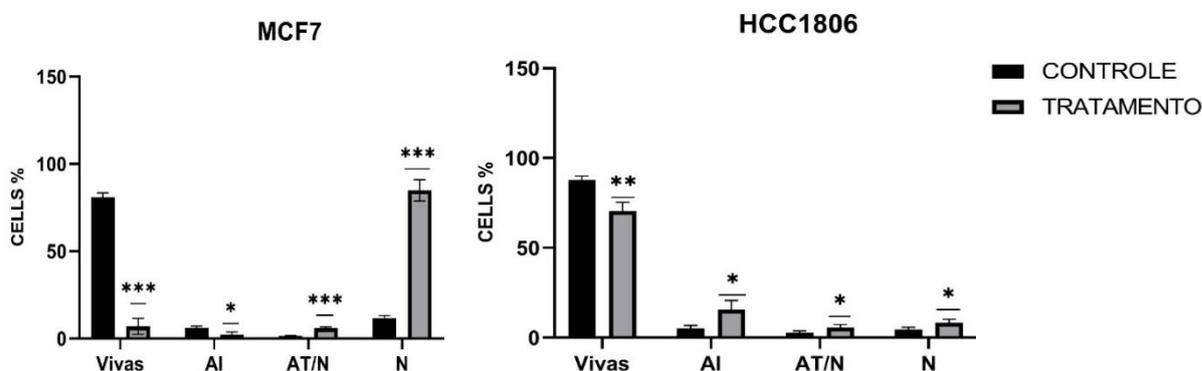
#### **4.4 Avaliação da atividade fração Hex do extrato de *E. Umbellata* no tipo de morte celular das linhagens MCF7 e HCC1806**

Sendo este ensaio feito por uma marcação dupla pela Anexina V e o Iodeto de propídio, em que a AnV é uma proteína anticoagulante com alta afinidade por fosfatidilserina, estando acoplada à ficoeritrina mostram células em via de apoptose inicial, entretanto, o Iodeto de propídio, como um intercalante de DNA, só consegue exercer sua função se houver dano na membrana celular, já que ele não possui características que o permitam atravessá-la sem que haja nenhuma ruptura. Devido a essa marcação dupla é possível distinguir as células em quatro tipos de morte celular, começando pela apoptose inicial onde estariam células marcadas somente com Anv (FICT); apoptose tardia/necrose, com as células marcadas pelas duas sondas; células somente marcadas por Iodeto de propídio que estariam possivelmente em necrose e por fim células não marcadas com nenhuma das sondas, sendo estas as células viáveis que não estariam em nenhum processo de morte celular. (Mafra, 2017; Teixo, 2013).

Os resultados obtidos em MCF7 e HCC1806 foram muito evidentes. Nas células de MCF7 tratadas com a fração Hex, uma média de  $84,88 \pm 6,08\%$  das células apresentaram morte por necrose, comparadas a  $11,63 \pm 1,52\%$  das células do controle. Em apoptose tardia/necrose havia  $5,87 \pm 0,83\%$  das células tratadas e  $1,5 \pm 0,18\%$  de células do grupo controle. Em apoptose inicial as células tratadas eram  $2,25 \pm 1,52\%$  e do controle  $6,13 \pm 1,06\%$ . Nas células viáveis obteve-se um resultado de  $80,75 \pm 2,66\%$  no controle e  $7 \pm 4,59\%$  de células tratadas com a fração Hex (fig 11,A).

Os resultados obtidos, avaliando o tipo de morte celular em HCC1806, mostraram que havia uma média de  $87,75 \pm 1,2\%$  viáveis no controle e  $70,5 \pm 2,4\%$  nas células tratadas. Em apoptose inicial houve um aumento de células tratadas de  $15,5 \pm 2,6\%$  para a média de  $5 \pm 0,9\%$  do grupo controle. O mesmo perfil é visível em apoptose tardia e ou necrose, onde a média das células tratadas é de  $5,75 \pm 0,75\%$  e a média do grupo controle de  $2,75 \pm 0,48\%$ . Por fim, na via de morte celular por necrose

o grupo controle apresentou uma média de  $4,5 \pm 0,65\%$  e o grupo tratado a média de  $8,25 \pm 1,03\%$  (fig 11,B).



**Figura 13. Morte celular de células MCF7(A) e HCC1806(B) após de exposição de 24h com a fração HEX na concentração de 7,8125 µg/mL.** Os resultados mostram a porcentagem de células vivas, em Apoptose inicial (AI), apoptose tardia/necrose e necrose. Os resultados representam a média e o erro padrão da média de  $n \geq 3$  ensaios, realizados em triplicata. Diferenças significativas em relação ao controle são representadas com \*, onde \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

O tipo de morte celular está diretamente ligado ao estímulo que a célula recebe e as vias que ativa ou inibe mediante esse sinal. A morte por necrose, por exemplo, é um tipo de morte celular descontrolada, que ocorre após um dano grave na membrana por fatores como radiação, calor, produtos químicos, hipóxia ou inflamação, que através da regulação de várias proteínas e compostos pró-inflamatórios resulta na ruptura da membrana celular, extravasando o conteúdo citoplasmático nos tecidos circundantes causando danos ao microambiente celular. Em contraste com a apoptose, a necrose é uma forma de morte celular independente de energia, onde a célula é danificada tão severamente que perde suas funcionalidades. A célula geralmente responde inchando, em um processo conhecido como oncosis (Mark S., 2019).

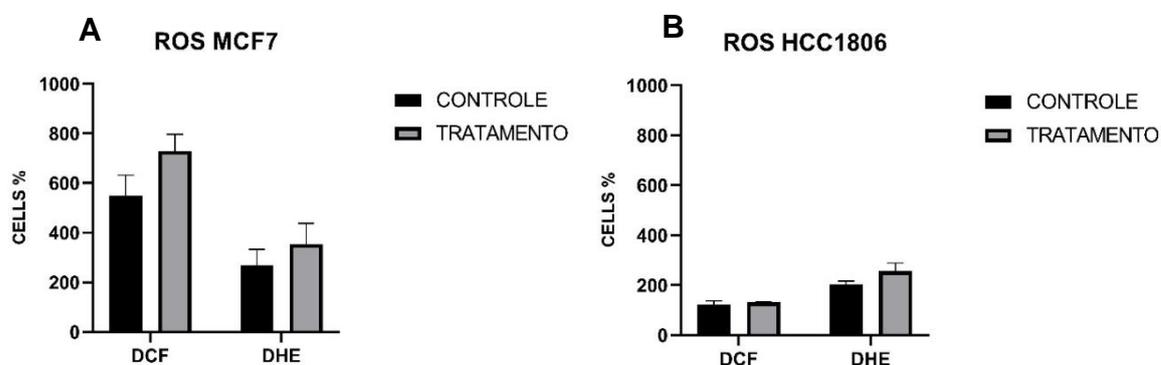
A apoptose é definida como o processo pelo qual uma célula para de crescer e se dividir e, em vez disso, entra em um processo que resulta na morte controlada da célula sem derramamento de seu conteúdo no ambiente circundante, também é chamada de morte celular programada e neste caso, em contraponto à necrose, a apoptose ocorre de forma natural com o intuito de remover células danificadas ou desnecessárias (Mark S., 2019).

Os artigos disponíveis sobre o uso da Janaúba em células de câncer, avaliando o tipo de morte celular, apontam majoritariamente para a via por apoptose, como em Cruz et. al (2018) com as células K-562 onde o estudo mostrou que após 12 horas de tratamento com eufol em uma concentração de 46,9  $\mu\text{M}$ , ocorreu uma progressão significativa das células na fase S e uma redução na população celular na fase G2/M em comparação com o controle negativo, além do aumento da população de células Sub-G0, sugerindo morte celular apoptótica. Em Cruz et. al (2020) as células de leucemia HL-60 tratadas com frações do extrato do látex da Janaúba, foram morfológicamente comparadas ao grupo controle tratado com Doxorubicina e Imatinibe, quando apresentaram características similares. Além de alterações no ciclo celular, aumento da população de células despolarizadas, e ativação das caspases 3/7, o fracionamento guiado por biomarcadores mostrou que amostras do látex de *E. umbellata* aumentaram a atividade do fitocomplexo evidenciando uma via de morte por apoptose. Em Luz e colaboradores (2016) foram utilizadas frações do látex da *E. umbellata*, que apresentaram efeito citotóxico contra as linhagens HRT-18, HeLa e Jukart. Um estudo mais aprofundado foi feito com a fração hexânica nas células Jukart, sugerindo que a citotoxicidade promovida nessas células estaria relacionada ao aumento da fragmentação do material genético, morte celular (apoptose) e interrupção do ciclo celular na fase G0/G1 com redução concomitante nas fases S e G2/M.

Avaliando o resultado obtido em MCF7, com cerca de 85% das células em morte por necrose, vai em contrapartida aos resultados descritos em literatura, entretanto, os estudos feitos previamente utilizaram materiais diferentes dos propostos nesse estudo. Em Cruz et. al (2018) foi utilizado o eufol isolado do extrato hexânico, e em Cruz et. al (2020) e Luz et. al (2016) foi utilizado somente o látex para produção do extrato bruto e suas posteriores frações. Neste estudo foram utilizadas todas as partes do material vegetal coletado (folhas e caules) somados ao látex que havia entre os tecidos nas partes coletadas. Por conseguinte, a gama de substâncias se torna maior, e poderia ser um indicativo de que novas fontes de obtenção do extrato bruto podem alterar os resultados já descritos em literatura, entretanto, para comprovação desta hipótese estudos mais aprofundados sobre estes resultados precisariam ser elaborados.

#### 4.5 Efeito da Fração Hex do extrato de *E. umbellata* na produção de espécies reativas de oxigênio nas linhagens MCF7 e HCC1806 tratadas.

A avaliação da produção de radicais superóxidos foi feita com as sondas DCF e DHE, e os resultados estão dispostos em gráficos na imagem a seguir (fig 12).



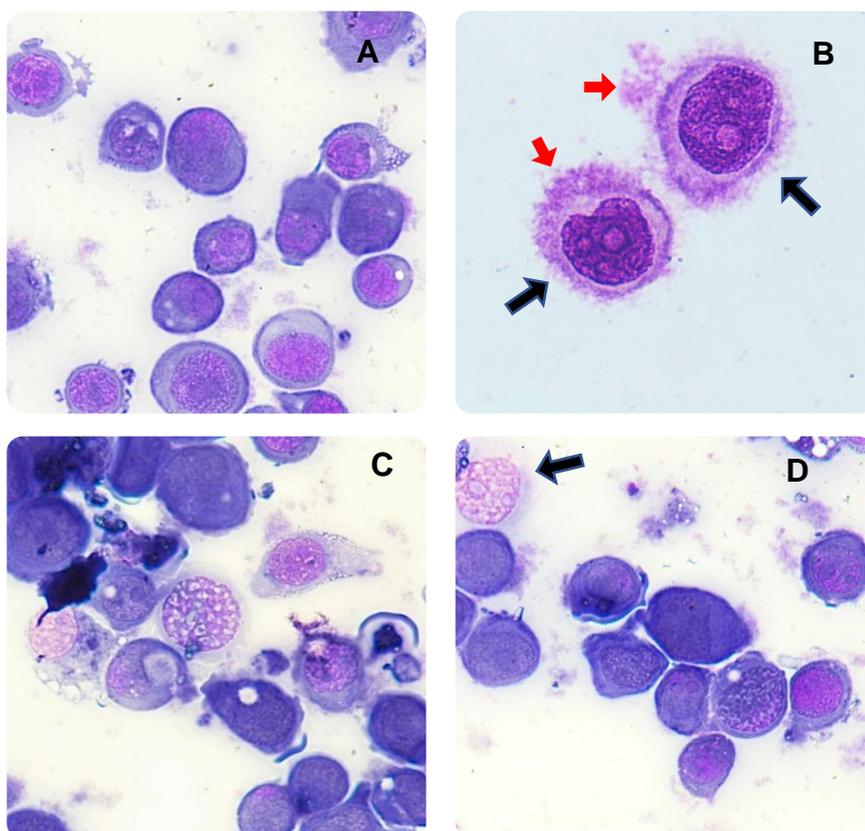
**Figura 14. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio nas células MCF7(A) e HCC1806(B) após exposição de 24h com a fração HEX na concentração de 7,8125 µg/mL.** Os resultados mostram a porcentagem das espécies reativas de oxigênio produzidos pelas linhagens com as sondas DCF e DHE. Os resultados representam a média e o erro padrão da média de  $n \geq 3$  ensaios, realizados em triplicata. Diferenças significativas em relação ao controle são representadas com \*, onde \* significa  $p < 0,05$ , \*\* significa  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Como é possível ver na figura 14, não foram observados resultados estatisticamente significativos nesta análise, o que indica que o caminho pelo qual ocorre a morte celular das linhagens tratadas com a fração Hex não envolve a produção de espécies reativas de oxigênio, que sejam capazes de se identificar com as sondas DCF e DHE.

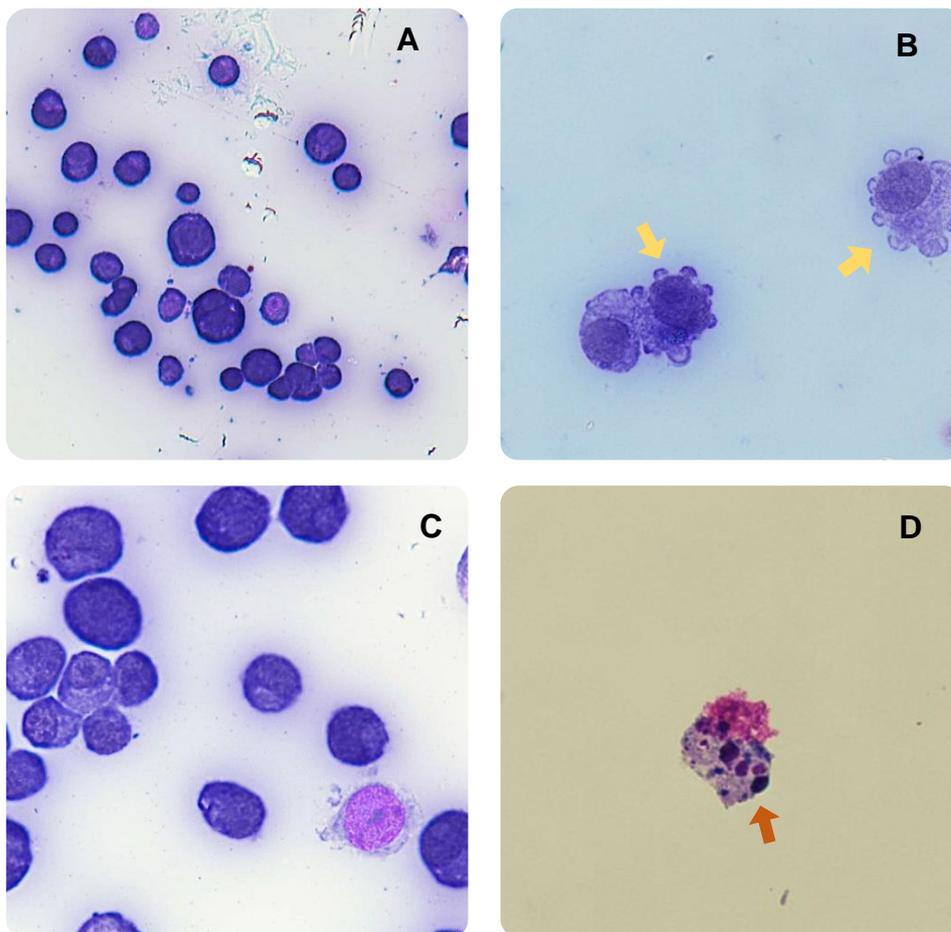
#### 4.6 Efeito da fração Hex do extrato de *E. umbellata* na morfologia das células MCF7 e HCC1806.

O grau de citotoxicidade de determinadas substâncias pode levar a alteração na morfologia celular, o que torna esse parâmetro alvo de investigação complementar na elucidação de indução de morte celular. Neste sentido, as células foram tratadas com a fração Hex e posteriormente processadas para leitura em microscopia ótica. As imagens obtidas por microscopia eletrônica estão apresentadas nas figuras fig. 15 e 16.

Ao contrário da morte celular por apoptose, onde as características mais comuns encontradas são bolhas na membrana, hipercondensação e fragmentação do núcleo, a necrose se apresenta de forma marcante pelo aumento do tamanho da célula, provocado pelo inchaço característico dessa via de morte celular, que por essa razão promove o rompimento da membrana plasmática e, por consequência a liberação do conteúdo intracelular (Martin & Henry, 2013). Como é possível perceber na figura 15, a falta de membrana celular em alguns casos e o extravasamento citoplasmático indica morte por necrose, ao contrário das características morfológicas apresentadas pela linhagem HCC1806 após o tratamento com a fração Hex, onde é possível observar uma diminuição do tamanho da célula (fig 14 D), e as visíveis bolhas na membrana, sendo a característica “blebbing” muito comum em células com via de morte por apoptose. As imagens obtidas complementam os dados discutidos sobre a avaliação de morte celular de cada uma das linhagens sugerem que nas células MCF7 ocorreu morte sugestiva de necrose e em HCC1806 por apoptose.



**Figura 15. Avaliação das características morfológicas da linhagem MCF7 por método de coloração May-Grünwald-Giemsa.** Células MCF7 grupo controle (A) e (C). Células tratadas com a fração Hex a 7,8125 µg/mL (B) e (D). As setas pretas indicam ruptura ou ausência de membrana plasmática, as setas vermelhas indicam extravasamento de material citoplasmático, características de morte necrótica. Lentes 50x10.



**Figura 16.** Avaliação das características morfológicas da linhagem HCC1806 por método de coloração May-Grünwald-Giemsa. Células HCC1806 grupo controle (A) e (C) 20X10. Células tratadas com a fração Hex a 7,8125 µg/mL (B) e (D) 50X10. As setas amarelas indicam bolhas formadas na membrana plasmática (“blebbing”), a seta laranja indica a fragmentação do DNA, características de morte apoptótica.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A fração de Hexano e Diclorometano foram capazes de reduzir a viabilidade celular;
- A fração de Hexano apresentou maior citotoxicidade e menores valores de  $IC_{50}$  em comparação as outras frações;
- A fração Hexano provocou parada no ciclo celular em G2/M em MCF7 e HCC1806;
- A amostra provoca morte celular por necrose em MCF7, diferente do descrito em literatura e uma possível hipótese é o uso ao invés do látex ou substâncias isoladas, de todo o material vegetal que pode gerar sinergia entre os compostos evidenciando uma nova via de morte celular;
- Os resultados sobre as vias de morte celular foram diferentes para as linhagens estudadas, o que pode indicar diferenças na atuação da amostra mediante expressão positiva ou negativa de receptores de estrogênio.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que as frações Hex e Diclorametano possuem a substância Eufol em seu perfil cromatográfico. As frações Hex e Diclorametano mostraram-se citotóxicas para linhagens tumorais, evidenciada pela redução da viabilidade celular, porém a fração Hex apresentou menores valores de  $IC_{50}$ . Esta fração também induziu parada do ciclo celular nas fases G2/M nas linhagens MCF7 e HCC1806 e, sugestivo de morte celular por necrose e apoptose nas células MCF7 e HCC1806, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Biologia molecular da célula*. 5. ed., Artmed, Porto Alegre, 1205-1206, 2010.

Alex, A., Bhandary, E., McGuire, K.P. (2020). Anatomy and Physiology of the Breast during Pregnancy and Lactation. In: Alipour, S., Omranipour, R. (eds) *Diseases of the Breast during Pregnancy and Lactation*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1252. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41596-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41596-9_1)

Aliabadi, H.S., Sajjadi, S.E., Khodamoradi, M., 2009. Cytotoxicity of *Euphorbia macroclada* on MDA-MB-468 breast cancer cell line. *Iran. J. Pharm. Sci.* 5, 103–108.

Andrade, E. Assis de. Efeito citotóxico do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) para modelo de melanoma murino. *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.*

Bhanot, A., Malleshappa, R.S., Noolvi, N., 2011. Natural sources as potential anti-cancer agents: a review. *Int. J. Phytomed.* 3 (1), 09–26.

Carvalho, J.E.; Vendramini-Costa, D. B.; Monteiro, K.M., Possenti, A.; Tinti, S.V.; Ruiz, A. L. T. G. Atividade anticâncer de extratos e princípios ativos obtidos de produtos naturais. *Avances en la investigación de la alimentación funcional*, 2010, p. 91-100.

Cirqueira M. B.; Moreira M.A.R.;Soares L.R.; Freitas-Junior R., Subtipos moleculares do câncer de mama.,2011. *FEMINA*, Outubro 2011, vol 39, nº 10.

Cruz LS, de Oliveira TL, Kanunfre CC, Paludo KS, Minozzo BR, Prestes AP, Wang M, Fernandes D, Santos FAD, Manda VK, Khan SI, Ali Z, de Messias-Reason IJ, Avula B, Khan IA, Beltrame FL. Pharmacokinetics and cytotoxic study of euphol from *Euphorbia umbellata* (Bruyns) Pax latex. *Phytomedicine*. 2018 Aug 1;47:105-112. doi: 10.1016/j.phymed.2018.04.055. Epub 2018 May 11. PMID: 30166094.

Cruz LS, Kanunfre CC, de Andrade EA, de Oliveira AA, Cruz LS, de Faria Moss M, Sasaki GL, Alencar Menezes LR, Wang M, Khan IA, Beltrame FL. Enriched Terpenes

Fractions of the Latex of *Euphorbia umbellata* Promote Apoptosis in Leukemic Cells. *Chem Biodivers.* 2020 Sep;17(9):e2000369. doi: 10.1002/cbdv.202000369. Epub 2020 Sep 2. PMID: 32644295.

D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137. Epub 2019 Apr 25. PMID: 30958602.

De Oliveira T.L, Bavia L., Fontana P.D., Cruz L.S., Paludo K.S., Crisma A.R., Messias-Reason I.J., Flávio, Beltrame F.L., Immunomodulatory and cytotoxic activities of euphol, *Life Sciences*, Volume 280, 2021.

De Oliveira, T.L., Munhoz, A.C.M., Lemes, B.M., Minozzo, B.R., Nepel, A., Barison, A., Fávero, G.M., Campagnoli, E.B., Beltrame, F.L., 2013. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. *J. Ethnopharmacol.* 150 (1), 263–269.

Ferlay, J.; Autier, P.; Boniol, M.; Heanue, M.; Boyle, C.P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*, 18, p.581-592, 2007.

Franco, Y. E.M., Okubo, M. Y., D Torre, A., Paiva, P.P., Rosa, M. N., Silva, V. A. O., Reis, R. M., Ruiz, A. L. T. G., Imamura, P. M, de Carvalho, J. E., B Longato, G. 2019. Coronarin D induces apoptotic cell death and cell cycle arrest in human glioblastoma cell line. *Molecules* 24(24): 4498.

GLOBOCAN (Global Cancer Observatory)

Grahame-Smith, D.G.; Aronson, J.K. *Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia*. 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 398, 2004.

Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-766, 1991.

Harish, R., Shivanandappa, T., 2006. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chem.* 95, 180–185.

Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Rodríguez, J.A., Haun, M., Nunes, D.S., Souza Brito, A.R.M., 2000. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 69 (3), 229–234.

Hollingshead, M.G.; Alley, M.C.; Camalier, R.F.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Malspeis, L.; Grever, M.R. “In vivo cultivation of tumor cells in hollow fibers”. *Life Sci.*, 57: 131, 1995.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *World Cancer Report*. Ed. Stewart B.W and Wild C.P. World Health Organization, 2014.

Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;106:19-39. doi: 10.1007/10\_2007\_073. PMID: 17728993.

INCA (Instituto Nacional de Câncer), Brasil, Ministério da Saúde, <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao#:~:text=A%20mais%20recente%20estimativa%20mundial,c%C3%A2nceres%20de%20pele%20n%C3%A3o%20melanoma> ).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE - *Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura*. v. 25, Rio de Janeiro: 2010.

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol*, v. 27, p. 137a, 1965.

Koepke L, Winter B, Grenzner A, Regensburger K, Engelhart S, van der Merwe JA, Krebs S, Blum H, Kirchhoff F, Sparrer KMJ. 2020. An improved method for high-throughput quantification of autophagy in mammalian cells. *Sci Rep.* 10(1):12241. doi: 10.1038/s41598-020-68607-w.

Kriehoff-Henning E, Folkerts J, Penzkofer A, Weg-Remers S. Cancer – an overview. *Med Monatsschr Pharm.* 2017 Feb;40(2):48-54. English, German. PMID: 29952494.

Lage, H., Duarte, N., Coburger, C., Hilgeroth, A., Ferreira, M.J.U., 2010. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine* 17 (6), 441–448.

Laslo M, Sun X, Hsiao CT, Wu WW Shen R.F, Zou S. 2013. A botanical containing freeze dried açai pulp promotes healthy aging and reduces oxidative damage in sod1 knockdown flies. *Age* 35(4): 1117-1132. doi: 10.1007/s11357-012-9437-3.

Lee A. V., Oesterreich S., Davidson N. E., MCF-7 Cells—Mudando o Curso de Pesquisa e Cuidados do Câncer de Mama por 45 Anos, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* , Volume 107, Issue 7, July 2015, djv073

Lelevic A, Souchon V, Moreaud M, Lorentz C, Geantet C. Gas chromatography vacuum ultraviolet spectroscopy: A review. *J Sep Sci.* 2020 Jan;43(1):150-173. doi: 10.1002/jssc.201900770. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31750981.

Liedo P, Carey J.R, Ingram DK, Zou S. The interplay among dietary fat, sugar, protein and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp in modulating lifespan and reproduction in a Tephritid fruit fly. *Exp Gerontol.* 47(7):536-9. 2012.

Liu, C., Liao, Z.X., Liu, S.J., Qu, Y.B., Wang, H.S., 2014. Two new diterpene derivatives from *Euphorbia lunulata* Bge and their anti-proliferative activities. *Fitoterapia* 96, 33–38.

Luz, L.E.C., Paludo, K.S., Santos, V.L.P., Franco, C.R.C., Klein, T., Silva, R.Z., Beltrame, F.L., Budel, J.M., 2015. Cytotoxicity of latex and pharmacobotanical study of leaves and stem of *Euphorbia umbellata* (Janaúba). *Rev. Bras. Farmacogn.* 25 (4), 344–352.

Mafrá P.A, 2017. “*Croton campestris* A.St.-Hil.: atividades antitumoral e anti-inflamatória”. Tese (Doutorado em biologia) -Universidade Estadual de Campinas.

Martin SJ, Henry CM. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. *Methods.* 2013 Jun 1;61(2):87-9. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.06.001. PMID: 23768793.

Melo-Reis, P.R., Bezerra, L.S.A., Vale, M.A.A.B., Canhête, R.F.R., Chen-Chen, L., 2011. Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.* 71 (1): 169–174.

Mesquita, M.L.; De Paula, J.E.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Costa-Lotufo, L.V.; Grougnet, R.; Michel, S.; Tillequin, F.; Espindola, L.S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against câncer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 123:439-445, 2009.

Minozzo BR, Lemes BM, Justo ADS, Lara JE, Petry VEK, Fernandes D, Belló C, Velloso JCR, Campagnoli EB, Nunes OC, Kitagawa RR, Avula B, Khan IA, Beltrame FL. Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2016 Sep 15;191:29-40. doi: 10.1016/j.jep.2016.06.032. Epub 2016 Jun 11. PMID: 27301616.

Mohanty S, Cock IE. The chemotherapeutic potential of *Terminalia ferdinandiana*: Phytochemistry and bioactivity. 2012. *Pharmacogn Rev.* 6(11): 29-36.

Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Newman, D.J.; Gragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981-2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311-335, 2010.

Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* 2018 Jul;13(3):339-354. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.006. PMID: 30100074; PMCID: PMC6092031.

Mota, M.F. Da, Benfica, P.L., Batista, A.C., Martins, F.S., De Paula, J.R., Valadares, M.C., 2012a. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. *J. Ethnopharmacol.* 139 (2), 319–329.

Mota, M.F., Benfica, P.L., Valadares, M.C., 2012b. *Synadenium umbellatum* Pax. Promotes cell cycle arrest and induces apoptosis in K-562 leukemia cells. *Braz. J. Pharm. Sci.* 48, 497–506.

Munhoz AC, Minozzo BR, Cruz LS, Oliveira TL, Machado WM, Pereira AV, Fernandes D, Manente FA, Velloso JC, Nepel A, Barison A, Beltrame FL. Chemical and pharmacological investigation of the stem bark of *Synadenium grantii*. *Planta Med.* 2014 Apr;80(6):458-64. doi: 10.1055/s-0034-1368300. Epub 2014 Mar 31. PMID: 24687740.

Nascimento, R. G., Otoni, K.M., 2020. Histological and Molecular classification of breast câncer: what do we know?, Brazilian Society of Mastology. doi:10.29289/25945394202020200024.

NCI (NATIONAL CANCER INSTITUTE), Estados Unidos, Governo dos Estados Unidos. (<https://www.cancer.gov/types/breast/hp>)

Ortêncio, W.B., 1997. Medicina Popular do Centro-Oeste, 2nd ed. Thesaurus, Brasília.

Paiva, P. P., Nonato, F. R., Ruiz, A.L.T.G., Sousa, I.M.O., Zafred, R.R.T., Oliveira, D. N., Catharino, R.R., Foglio, M. A., Carvalho, J. E. 2020b. An ethanolic extract of *Boehmeria caudata* aerial parts displays anti-inflammatory and anti-tumor activities. *Planta Medica International Open* 7(01): e17-e25. DOI: 10.1055/a-1111-9907

Paiva, P. P., Nunes, J., Nonato, F. R., Ruiz, A., Zafred, R., Sousa, I., Okubo, M. Y., Kawano, D. F., Monteiro, P. A., Foglio, M. A., Carvalho, J. E. 2020a. In silico, in vitro, and in vivo antitumor and anti-inflammatory evaluation of a standardized alkaloid-enriched fraction obtained from *Boehmeria caudata* Sw. aerial parts. *Molecules* 25(17): 4018. <https://doi.org/10.3390/molecules25174018>.

Perumal, S., Pillai, S., Cai, L.W., Mahmud, r, Ramanathan, S., 2012. Determination of minimum inhibitory concentration of *Euphorbia hirta* (L.) extracts by tetrazolium microplate assay. *J. Nat. Prod.* 5, 68–76.

Pešić, M., Banković, J., Aljančić, I. S., Todorović, N. M., Jadranin, M., Vajs, V. E., Tešević, V. V., Vučković, I., Momčilović, M., Marković, I. D., Tanić, N., Ruždijić, S. 2011. New anti-cancer characteristics of jatrophone diterpenes from *Euphorbia dendroides*. *Food Chem. Toxicol.*, 49(12): 3165–3173.

Samaan T.M.A., Samec M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules*. 2019 Nov 27;9(12):789. doi: 10.3390/biom9120789. PMID: 31783552; PMCID: PMC6995578.

Seamus J. Martin, Conor M. Henry, Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities, *Methods*, Volume 61, Issue 2, 2013, Pages 87-89, ISSN 1046-2023, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.001>.

Shoemaker, R. H. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer*, 6: 813, 2006.

Shrihastini V, Muthuramalingam P, Adarshan S, Sujitha M, Chen JT, Shin H, Ramesh M. Plant Derived Bioactive Compounds, Their Anti-Cancer Effects and In Silico Approaches as an Alternative Target Treatment Strategy for Breast Cancer: An Updated Overview. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 10;13(24):6222. doi: 10.3390/cancers13246222. PMID: 34944840; PMCID: PMC8699774.

Silva, R.M. dos R.J. da, Teixeira, D.F., Sampaio, A.L., Leitão, T.C. de A., 2011. Analysis of in vitro activity of High dilutions of *Euphorbia tirucalli* L. In human melanoma cells. *Int. J. High Dilution Res.* 10 (36), 183–193.

Singhal, S., Singh, M., Singh, R. K., Tiwari, V. K., & Bajpai, S. Chapter 11 - Molecular Mechanisms Underlying Breast Cancer and Role of Plant Products in Targeted Therapy. In: BRAHMACHARI, Goutam (Ed.). *Natural Product Drug Discovery: Discovery and Development of Anti-Breast Cancer Agents from Natural Products*. Elsevier, 2021. p. 295-351. ISBN 9780128212776. DOI: 10.1016/B978-0-12-821277-6.00011-8.

Siu D. Natural products and their role in cancer therapy. *Med Oncol*, 28(3):888-900, 2011.

Smith, J.A.; Ngo, H.; Martin, M.C.; Wolf, J.K. An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecologic Oncology*, 98: 141-145, 2005.

Stark, G.R., Taylor, W.R. (2004). Analyzing the G2/M Checkpoint. In: Schönthal, A.H. (eds) *Checkpoint Controls and Cancer*. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>, vol 280. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-788-2:051>

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

Teixo R.J.M., Terapia Fotodinâmica: Uma Abordagem no Retinoblastoma. 166f. 2013. Dissertação (Mestrado em bioquímica). Universidade de Coimbra.

Terzian, A.C.B.; Zuccari, D.A.P.C.; Pereira, R.S.; Pavam, M.V.; Ruiz, C.M.; Sueiro, F.A.R.; Coelho, J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 44(2):96-102, 2007.

Trayes KP, Cokenakes SEH. Breast Cancer Treatment. *Am Fam Physician*. 2021 Aug 1;104(2):171-178. PMID: 34383430.

Wang L, Wang G, Yang D, Guo X, Xu Y, Feng B, Kang J. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Mol Med Rep*. 2013 Oct;8(4):1279-85. doi: 10.3892/mmr.2013.1650. Epub 2013 Aug 22. PMID: 23969579.

Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., et al. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* 34(8), 828–837.

Yang, D.S., He, Q.X., Yang, Y.P., Liu, K.C., Li, X.L., 2014. Chemical constituents from *Euphorbia tibetica* and their biological activities. *Chin. J. Nat. Med.* 12, 38–42.