



Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,
Pós-Graduação e Internacionalização – AGEUFMA
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO DA CASCA DE
Geissospermum vellosii EM CÂNCER DE MAMA: ESTUDO in vitro
DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTI MIGRATÓRIA E
ANTIPROLIFERATIVA

MONIQUE MARQUES MARTINS

SÃO LUÍS
2026

MONIQUE MARQUES MARTINS

**POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO DA CASCA DE
Geissospermum vellosii EM CÂNCER DE MAMA: ESTUDO in vitro DA
ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTI MIGRATÓRIA E ANTIPROLIFERATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Saúde do Adulto
da Universidade Federal do Maranhão
para obtenção do título de Mestre em
Saúde do Adulto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Silva
de Azevedo dos Santos.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Josélia
Alencar Lima.

**SÃO LUÍS
2026**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Marques Martins, Monique.

POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO DA CASCA DE
Geissospermum vellosii EM CÂNCER DE MAMA: ESTUDO in vitro
DA ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTI MIGRATÓRIA E
ANTIPROLIFERATIVA / Monique Marques Martins. - 2026.
103 f.

Coorientador(a) 1: Josélia Alencar Lima.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2026.

1. Metabólitos Secundários. 2. Apocynaceae. 3.
Câncer Mamário. 4. Potencial Antineoplásico. I. Silva de
Azevedo dos Santos, Ana Paula. II. Alencar Lima, Josélia.
III. Título.

**POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO DA CASCA DE
Geissospermum vellosii EM CÂNCER DE MAMA: ESTUDO *in vitro* DA
ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTI MIGRATÓRIA E ANTIPROLIFERATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Saúde do Adulto
da Universidade Federal do Maranhão
para obtenção do título de Mestre em
Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa da Dissertação de Mestrado
apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado
em: 16/ 01 / 2026

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
(Orientadora) Universidade Federal do Maranhão / PPGSAD

Profa. Dra. Josélia Alencar Lima
(Coorientadora) Centro Universitário Dom Bosco (UNDB)

Profa. Dra. Selma do Nascimento Silva (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão / CCBS

Prof. Dr. Francisco Stefânio Barreto (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão / PPGSAD

Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão / PPGSAD

Prof. Dra. Fernanda Ferreira Lopes (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão / PPGSAD

“Ninguém formou-se grande sem antes ser pequeno.”
(João Evangelista Martins Filho)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sinto que todos os caminhos que trilhei até aqui foram guiados por Suas mãos.

Agradeço à minha família amada, em especial ao meu pai, à minha mãe e à minha irmã, por todo apoio, amor, carinho e compreensão.

Agradeço a todos os meus professores, que, desde os meus anos iniciais de ensino, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Sou profundamente grata à minha orientadora, Professora Dra. Ana Paula e à minha coorientadora Professora Dra. Josélia, pela oportunidade de aprender ao lado delas e por toda dedicação em me ensinar.

Agradeço a Danrley, Rafael, Larissa e Jailene, por todo companheirismo.

Aos amigos que a graduação me deu, Adryano, João Vitor e João Felipe.

Aos colegas de laboratório que se tornaram verdadeiros amigos, Gustavo, Jéssica, Leonardo, Shirley, Gabriel, Lila, Ana Sepa, Larissa, Luna, Mayssa e Davi. Meus agradecimentos também à Professora Dra. Thyare e ao Professor Dr. André.

Agradeço aos laboratórios LIAC, LCC, LPI e LIF pelo suporte com equipamentos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto (PPGSAD), em especial ao Professor Dr. Marcelo Andrade, Professora Dra. Socorro Cartagenes e Sr. José.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMA que possibilitaram a execução desta pesquisa.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é o mais incidente na população feminina mundial e a resistência aos quimioterápicos representa um desafio para o sucesso terapêutico. Nesse contexto, metabólitos secundários de espécies vegetais se apresentam como fontes promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos. *Geissospermum vellosii* (Apocynaceae), de nome popular Pau-Pereira (PP), é uma espécie rica em alcalóides indólicos com atividades antioxidante e antitumoral, mas sem estudos prévios em diferentes linhagens de câncer mamário humano.

Objetivos: Este trabalho avaliou o efeito antitumoral *in vitro* do extrato etanólico da casca do caule do PP em linhagens de mama humano. **Metodologia:** Foram utilizadas as linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 (Receptor hormonal positivo) e MDA-MB-231 (Receptor hormonal negativo, Triplo Negativo), e a linhagem mamária humana não tumoral MCF-10, como controle. A viabilidade celular, a concentração inibitória de 50% (IC_{50}) e o índice de seletividade (IS) foram determinados após 24, 48 e 72 horas de tratamento com o extrato do PP nas concentrações de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$, utilizando o ensaio colorimétrico de redução do MTT. Os aspectos morfológicos foram analisados por microscopia óptica. A capacidade proliferativa foi avaliada pelo ensaio de formação de colônias. A migração celular foi avaliada por meio do ensaio de ranhura. Por fim, o efeito pró-apoptótico foi avaliado por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, sendo avaliado o ciclo celular marcado com iodeto de propídio, por citometria de fluxo.

Resultados: O extrato reduziu a viabilidade celular de forma dependente do tempo e da concentração. A IC_{50} da MCF-7 e da MDA-MB-231 foi em 48h, respectivamente, 19,75 $\mu\text{g/mL}$ e 18,60 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto a MCF-10 apresentou a menor IC_{50} (2,74), sugerindo baixa seletividade para a linhagem controle. Na análise morfológica, o tratamento indicou alterações celulares sugestivas de apoptose após o tratamento. No ensaio de formação de colônias, o resultado exibiu efeito inibitório do extrato em todas as linhagens celulares. No ensaio de ranhura, foi observado a redução da migração celular após 48 horas, de forma concentração-dependente. O efeito inibitório foi mais evidente já em 24h na linhagem MDA-MB-231. A avaliação do efeito pró-apoptótico demonstrou que o extrato induz apoptose de maneira concentração-dependente, tendo como possível mecanismo o bloqueio do ciclo celular em G1 em todas as linhagens. **Conclusão:** O extrato da casca da espécie *G. vellosii* apresentou potencial antitumoral baseados nos efeitos antiproliferativo, antimigratório e pró-apoptótico nas linhagens de mama, confirmando o potencial do extrato como fonte de drogas protéticas na quimioterapia.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; Apocynaceae; Câncer mamário; Potencial antineoplásico.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the most common cancer among women worldwide, and resistance to chemotherapeutic agents represents a major challenge to therapeutic success. In this context, secondary metabolites from plant species emerge as promising sources for the development of new drugs. *Geissospermum vellosii* (Apocynaceae), popularly known as Pau-Pereira (PP), is a species rich in indole alkaloids with antioxidant and antitumor activities, but with no previous studies in different human breast cancer cell lines. **Objectives:** This study evaluated the in vitro antitumor effect of the ethanolic extract from the stem bark of PP in human breast cancer cell lines. **Methodology:** The human breast cancer cell lines MCF-7 (hormone receptor–positive) and MDA-MB-231 (hormone receptor–negative, triple-negative), as well as the non-tumorigenic human mammary cell line MCF-10, were used as controls. Cell viability, half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}), and selectivity index (SI) were determined after 24, 48, and 72 hours of treatment with PP extract at concentrations ranging from 5 to 100 $\mu\text{g/mL}$ using the MTT colorimetric assay. Morphological aspects were analyzed by optical microscopy. Proliferative capacity was evaluated by the colony formation assay. Cell migration was assessed using the scratch assay. Finally, the pro-apoptotic effect was evaluated by flow cytometry and fluorescence microscopy, with cell cycle analysis using propidium iodide staining. **Results:** The extract reduced cell viability in a time- and concentration-dependent manner. The IC_{50} values for MCF-7 and MDA-MB-231 at 48 h were 19.75 $\mu\text{g/mL}$ and 18.60 $\mu\text{g/mL}$, respectively. However, MCF-10 showed the lowest IC_{50} (2.74 $\mu\text{g/mL}$), suggesting low selectivity toward the control cell line. Morphological analysis indicated cellular alterations suggestive of apoptosis after treatment. In the colony formation assay, the extract showed inhibitory effects in all cell lines. In the scratch assay, reduced cell migration was observed after 48 hours in a concentration-dependent manner, with a more pronounced effect at 24 h in the MDA-MB-231 cell line. The evaluation of the pro-apoptotic effect demonstrated that the extract induced apoptosis in a concentration-dependent manner, possibly through cell cycle arrest at G1 in all cell lines. **Conclusion:** The stem bark extract of *G. vellosii* showed antitumor potential based on its antiproliferative, antimigratory, and pro-apoptotic effects in breast cell lines, confirming its potential as a source of prototype drugs for chemotherapy.

Keywords: Secondary metabolites; Apocynaceae; Breast cancer; Antineoplastic potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos três tipos de câncer mais incidentes (taxa ajustada) por UF e sexo, 2023-2025	20
Figura 2. Evolução das características do câncer.....	22
Figura 3. Principais características dos subtipos moleculares do câncer de mama	23
Figura 4. Principais fármacos quimioterápicos de origem vegetal e suas respectivas espécies.....	26
Figura 5. <i>Geissospermum vellosii</i> , popularmente conhecido como Pau-pereira, em destaque no primeiro plano.	27
Figura 6. Alcalóides do <i>Geissospermum vellosii</i>	31
Figura 7. Ilustração representativa das etapas experimentais para avaliação do efeito antitumoral do extrato sobre linhagens mamárias humanas.....	35
Figura 8. Caracterização do estado celular por coloração com laranja de acridina e brometo de etídio, proposto por Smith et al. (2012) com modificações.....	41
Figura 9. Esquema de análise de apoptose e necrose pelo ensaio de Anexina V/PI.....	43
Figura 10. Esquema de análise do ciclo celular.....	44
Figura 11. Ensaio de MTT analisando a viabilidade das células MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10 após o tratamento com o extrato da casca do Pau-pereira.....	47

Figura 12. Curvas dose-resposta das linhagens celulares tratadas com PP.....	49
Figura 13. Alterações morfológicas induzidas extrato do PP em células MCF-10, após o tratamento com o extrato da casca do Pau-pereira.....	51
Figura 14. Alterações morfológicas induzidas extrato do PP em células MCF-7, após o tratamento com o extrato da casca do Pau-pereira.....	54
Figura 15. Alterações morfológicas induzidas extrato do PP em células MDA-MB-231, após o tratamento com o extrato da casca do Pau-pereira.....	57
Figura 16. Ensaio de Formação de Colônias. Efeito do extrato do PP na formação de colônias das linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10	59
Figura 17. O extrato do PP inibe a formação de colônias e a fração sobrevivente das linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10 de forma dose-dependente	60
Figura 18. Ensaio de ranhura em linhagem MCF-7.....	62
Figura 19. Ensaio de ranhura em linhagem MDA-MB-231.....	64
Figura 20. A. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência da linhagem celular MCF-7 tratada com diferentes concentrações de PP por 48h, coradas com Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio (AO/PI).....	67
Figura 21. A. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência da linhagem celular MCF-7 tratada com diferentes concentrações de PP por 48h, coradas com Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio (AO/PI).....	69
Figura 22. A. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência da linhagem celular MDA-MB-231 tratada com diferentes concentrações de PP por 48	

h, coradas com Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio (AO/PI)..
.....72

Figura 23. A. Dot plot das células MCF-10 tratadas com PP, ao final do tratamento, foram coradas com Anexina V. B. O histograma representa os dados plotados das fases viva, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose das células após o tratamento com o extrato PP.....73

Figura 24. A. Dot plot das células MCF-7 tratadas com PP, ao final do tratamento, foram coradas com Anexina V. B. O histograma representa os dados plotados das fases viva, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose das células após o tratamento com o extrato PP.....75

Figura 25. A. Dot plot das células MDA-MB-231 tratadas com PP, ao final do tratamento, foram coradas com Anexina V. B. O histograma representa os dados plotados das fases viva, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose das células após o tratamento com o extrato PP.....77

Figura 26. Distribuição percentual da população celular das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10 nas fases do ciclo celular (G1, S e G2) após tratamento com diferentes concentrações do composto PP (1, 5, 10, 20 e 40 µg/mL), em comparação ao controle negativo (CN) e controle positivo (CP).....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica de *Geissospermum vellosii* (Apocynaceae)...28

Tabela 2. Concentração inibitória média (IC_{50}) do PP nas linhagens MCF-10, MCF-10 e MDA-MB-231 nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas.....48

Tabela 3. Índice de seletividade das linhagens tumorais tratadas com PP.....49

Tabela 4. Análise quantitativa da área e perímetro de células MCF-10 após tratamento com o extrato do PP.....52

Tabela 5. Análise quantitativa da área e perímetro de células MCF-7 após tratamento com o extrato do PP.....55

Tabela 6. Análise quantitativa da área e perímetro de células MDA-MB-231 após tratamento com o extrato do PP.....58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Área
AChE	Acetilcolinesterase
AO	Laranja de acridina (do inglês, Acridine Orange)
Akt	Proteína quinase alfa serina/treonina
ATCC	Coleção De Culturas Tipo Americanas (do inglês, American Type Culture Collection)
BChE	Butirilcolinesterase
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
Bcl-2	Linfoma de célula B 2
BRCA1/2	Breast Cancer gene 2
°C	Graus Celsius
CAR-T	Receptor de antígeno quimérico de célula T
CDDP	cis-Diamminedicloreto de platina (II)
CDKs	Quinases dependentes de ciclina
cm²	Centímetros quadrados
CO₂	Dióxido de carbono
DMEM LG	Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ER	Receptor de estrogênio
ERK1/2	Quinase extracelular reguladora de sinais
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
h	Horas
IC₅₀	Concentração inibitória média
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IP	Iodeto de propídio
IS	Índice de seletividade
Ki67	Antígeno Kiel 67
Log	Logaritmo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7
MCF-10	Michigan Cancer Foundation 10
MDA-MB-231	M. D. Anderson - Metastatic Breast - 231
mg/mL	Miligramas por mililitros
mm²	Milímetros quadrados
mM	Milimolar
mL	Mililitros
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
p38	Proteína quinase ativada por mitógenos 38
p53	Proteína tumoral 53
PARP	Inibidor da poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	Tampão Fosfato Salino
PD-1	Programmed Cell Death 1
PDL-1	Programmed-Death Ligand 1
PP	Pau-Pereira
PR	Receptor de progesterona

RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
SFB	Soro Fetal Bovino
t	Tempo
TILs	Linfócitos infiltrantes de tumor
TME	Microambiente tumoral
TNBC	Triple-negative breast cancer
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1. Câncer de mama	19
2.1.1. Epidemiologia do câncer de mama	20
2.1.2. Classificação molecular do câncer de mama	21
2.2. Modelo in vitro	23
2.3. Produtos Naturais como agentes terapêuticos para o câncer	25
2.3.1. Geissospermum vellosii.....	26
2.3.2. Caracterização química.....	29
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos Específicos	32
4. METODOLOGIAS	33
4.1. Preparação do extrato da casca do Pau-pereira.....	33
4.2. Cultivo celular.....	33
4.3. Desenho experimental	34
4.3.1 Ensaios de triagem para atividade antitumoral.....	36
4.3.1.1 Ensaio de citotoxicidade, determinação da Concentração Inibitória 50% (IC50) e Índice de seletividade	36
4.3.1.2 Análise de alterações morfológica por microscopia de luz invertida	37
4.3.1.3 Ensaio clonogênico	38
4.3.1.4 Ensaio de migração celular	39
4.3.2 Ensaios para avaliação de mecanismo de morte celular.....	40
4.3.2.1 Investigação das vias de morte celular por apoptose e necrose	40
4.3.2.2 Análise do Ciclo celular	43
4.4 Análise estatística	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1. PP reduz a viabilidade das linhagens tumorais.....	45
5.2. PP altera a morfologia das células tumorais	49
5.3. PP reduz a capacidade proliferativa das células tumorais	58
5.5. PP impede a migração de células tumorais	59
5.4. PP induz as células tumorais à apoptose	65
5.6. PP induz a parada do ciclo celular.....	78
6. DISCUSSÃO	80
7. CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, ocupando o segundo lugar entre as doenças que mais matam (American Cancer Society, 2024), sendo caracterizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um problema de saúde pública em escala global.

Desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que, ao longo do triênio (2023-2025), os tipos de câncer mais incidentes entre os brasileiros serão: de mama feminino (73.610 casos por ano), de próstata (71.730), de cólon e reto (45.630), de pulmão (32.560) e de estômago (21.480) (INCA, 2023). Dentre esses, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, correspondendo a aproximadamente 30,1% e a principal causa de morte, constituindo um importante problema de saúde pública (INCA, 2023).

O Câncer de mama é uma doença heterogênea, com vários subtipos moleculares classificados principalmente em Luminal A (positivo para receptores de estrogênio ER e/ou receptor de progesterona PR e negativo para receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 HER2), Luminal B (positivo para receptores hormonais ER e/ou PR, porém pode ser HER2 positivo ou HER2 negativo), HER2-positivo (positivo para receptor HER2) e triplo negativo (negativo para receptor de ER, PR e HER2), este último associado a pior prognóstico e à ausência de terapias-alvo específicas. Esses subtipos apresentam comportamentos biológicos distintos, influenciando diretamente o prognóstico e a resposta ao tratamento (Perou et al., 2000).

As estratégias terapêuticas utilizadas hoje no tratamento do câncer de mama incluem métodos locais e sistêmicos. Os tratamentos locais vão incluir procedimentos cirúrgicos, como mastectomias e radioterapia. A quimioterapia, imunoterapia e a terapia hormonal representam os principais tratamentos sistêmicos (Costa et al, 2020). Entretanto, a resistência aos quimioterápicos, principalmente em cânceres recorrentes, trazem um desafio para a terapêutica oncológica atual (Dakal et al., 2024; Saha et al., 2024).

Assim, torna-se fundamental desenvolver terapias mais eficazes, tanto no câncer de mama triplo negativo (Xiong; Wu; Yu, 2024) quanto nos tumores hormônio-dependentes (Huang et al., 2024), capazes de controlar o crescimento tumoral e reduzir sua capacidade de invasão e resistência terapêutica.

Nesse cenário, os produtos naturais vêm se destacando como uma fonte promissora no desenvolvimento de novos fármacos (Molinari, 2009; Costa-Lotuf et al., 2025; Conrado et al., 2024). Entre a rica diversidade da flora brasileira, destaca-se a espécie *G. vellosii* (Apocynaceae), popularmente conhecida como Pau-Pereira (PP) (Almeida et al., 2009). Essa espécie tem sido amplamente estudada por apresentar grande quantidade de alcalóides indólicos e terpenóides, especialmente nos extratos da casca, já identificados como moléculas bioativas com potencial antineoplásico (Mbeunkui et al., 2011).

Evidências pré-clínicas demonstram que o extrato do PP apresenta atividade antitumoral contra diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de próstata LNCaP (Bemis et al., 2009) e câncer de pâncreas PANC-1, AsPC-1; HPAF-II, BxPC-3 e MiaPaCa-2) (Yu et al., 2013; Dong et al., 2018). Esses estudos indicam que o extrato é capaz de inibir a proliferação celular, induzir apoptose e modular vias de sinalização associadas à progressão tumoral, sugerindo seu potencial como agente terapêutico ou adjuvante no tratamento de neoplasias, além de reforçar sua relevância para investigações em outros tipos de câncer.

Apesar do estudo de Yeh et al. (2019), ter demonstrado a atividade antitumoral *in vitro* da flavopereirina isolada do PP nas linhagens de câncer de mama, destaca-se que no extrato bruto da casca são encontrados outros alcalóides indólicos com atividades farmacológicas relevantes, podendo sinergizar o efeito antitumoral (Pereira et al., 2007; Lorenzi; Matos, 2008).

Ao longo de quinze anos o nosso grupo de pesquisa tem estudado o potencial farmacológico do extrato da casca do PP. A presença dos alcalóides indólicos no extrato demonstrou atividade antiinflamatória e antinociceptiva que, associada ao efeito anticolinesterásico, teve seu estudo farmacológico direcionado à doença de Alzheimer (Lima et al. 2009). Por outro lado, estudos *in silico* que analisaram a estrutura química de outros alcalóides indólicos, como a vimblastina e vincristina, evidenciaram a importância dessas moléculas como fontes de quimioterápicos (Rosales et al., 2019; Omar et al., 2021; Abood et al., 2025).

Considerando os dados já observados pelo nosso grupo e a literatura, o presente trabalho hipotetiza que o extrato da casca de *G. vellosii*, rico em alcalóides indólicos, tem efeito antitumoral em linhagens de células mamárias humanas, evidenciando seu potencial no estudo de novas drogas. Portanto, a estratégia definida foi avaliar o efeito do extrato nas principais características associadas à

tumorigênese, como ferramenta para triagem do potencial antitumoral em células de mama. Além disso, investigar um dos possíveis mecanismos associados a farmacodinâmica dos quimioterápicos na indução da morte celular, como via de ação do extrato.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer de mama

O nome "câncer" tem origem na palavra grega *karkinos*, posterior latinizada *cancer/cancrum*, que significa "caranguejo". Essa denominação faz alusão ao modo como a proliferação das células cancerosas se espalha pelo corpo, semelhante às patas do crustáceo que se estendem a partir do seu cefalotórax (Panegyres, 2024).

O câncer é um grupo complexo de doenças com mais de 100 tipos diferentes, caracterizado pelo crescimento de células anormais e desordenadas (Who, 2021). Essas células adquirem a capacidade de evadir o sistema imunológico, invadir tecidos e se espalhar para outras partes do corpo devido a alterações genéticas e moleculares que conferem vantagens de sobrevivência e proliferação (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011).

No contexto dessa complexidade biológica, o câncer de mama se destaca por sua notável diversidade, englobando tumores biologicamente distintos que exibem diversas manifestações clínicas e morfológicas (Bray et al., 2018).

O tipo histológico mais frequente origina-se nos ductos mamários, com o carcinoma ductal infiltrante respondendo por cerca de 80% dos casos (Kumar; Abbas; Aster, 2020). Outra forma histológica relevante é o carcinoma lobular, que tem origem nos lóbulos mamários (Li; Uribe; Daling, 2005).

A doença pode manifestar-se como tumor *in situ*, quando está confinada ao tecido epitelial, ou como tumor invasivo, quando há ruptura da membrana basal (INCA, 2011). Mesmo dentro de um mesmo subtipo histológico, o comportamento biológico do tumor pode variar consideravelmente, dependendo de elementos como a expressão de receptores hormonais (ER/PR), marcador de proliferação (Ki-67) e perfil molecular (Lüönd et al., 2021).

2.1.1. Epidemiologia do câncer de mama

O câncer constitui um dos mais significativos desafios globais de saúde pública, sendo uma das principais causas de mortalidade. Até 2050, estima-se que o número de casos de câncer atinja 35 milhões, apenas em decorrência do aumento previsto na população (Paho; Who, 2024; Bray et al., 2024). Especificamente no Brasil, o INCA estimou 704 mil novos casos de câncer para o triênio 2023-2025, dos quais 483 mil são câncer de pele não melanoma (Santos et al., 2023).

Entre as mulheres, o câncer de mama é o mais frequente em quase todas as Unidades Federativas, exceto em algumas áreas onde o câncer de colo do útero também apresenta alta incidência (Figura 1) (Santos et al., 2023). Esses dados evidenciam variações importantes na distribuição geográfica e por sexo dos tipos de câncer mais frequentes, refletindo tanto fatores biológicos quanto determinantes socioeconômicos e ambientais (Santos et al., 2023; Wünsch-Filho et al., 2008; Ribeiro; Nardocci, 2013; Azevedo e Silva et al., 2011).

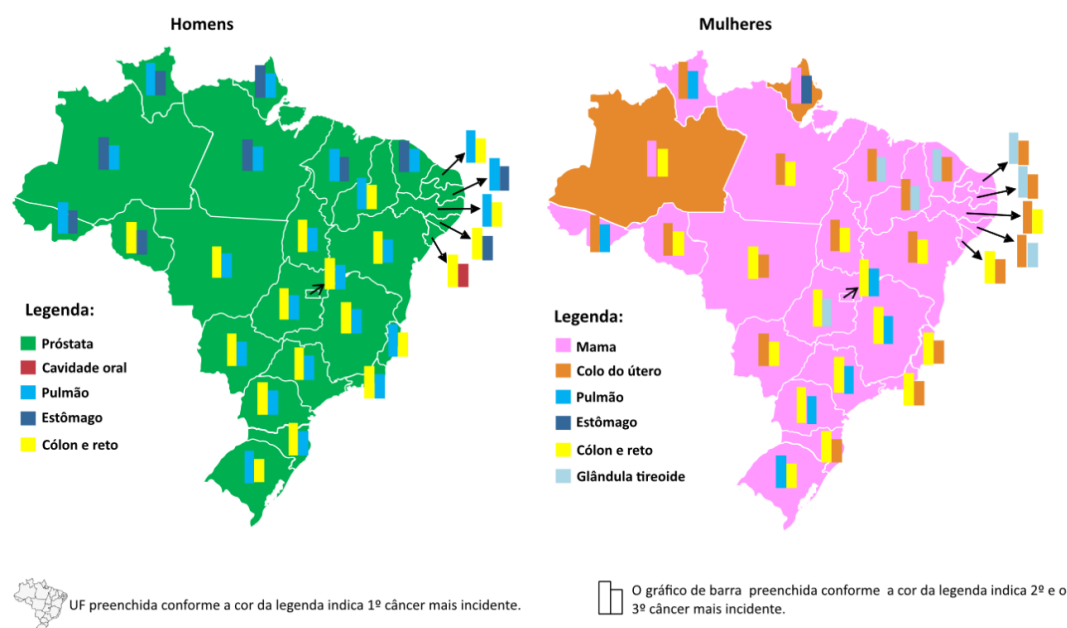


Figura 1. Distribuição dos três tipos de câncer mais incidentes (taxa ajustada) por UF e sexo, 2023-2025. Fonte: Dados extraídos da Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil do INCA4. Nota: pulmão = traqueia, brônquio e pulmão (C33-C34); cólon e reto = cólon, junção retossigmoide, reto e ânus (C18-C21); cavidade oral = lábio, língua, cavidade oral e orofaringe e glândulas salivares maiores (C00-C10).

No Brasil, para 2023-2025, são esperados 73 mil novos casos, sendo o tipo o

câncer de mama o mais incidente em mulheres, e representa 30,1% dos cânceres femininos, excluindo o de pele não melanoma. A prevalência começa a crescer a partir dos 25 anos, atingindo o pico entre os 45 e 50 anos (INCA, 2022).

Os fatores de risco incluem idade (INCA, 2022), predisposição genética (mutações BRCA1 e BRCA2 em 5-10% dos casos) (Cifuentes-C et al., 2019; Briceño-Balcázar et al., 2017), exposição hormonal (menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeira gravidez após 30 anos, uso de terapia de reposição hormonal ou contraceptivos orais) (Colleen; Davey, 2021), e fatores comportamentais como sobrepeso/obesidade pós-menopausa, consumo de álcool e contato à radiação (INCA, 2022).

2.1.2. Classificação molecular do câncer de mama

A origem do câncer é complexa e com diversos fatores envolvidos, tanto extrínsecos quanto intrínsecos, que podem atuar simultaneamente ou em sequência (Wu et al., 2018). O desenvolvimento tumoral ocorre por meio da aquisição progressiva de um conjunto de capacidades biológicas que conferem vantagens às células transformadas, conceitualmente chamadas “Características do Câncer” (Hanahan; Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

Em 2000, Hanahan e Weinberg descreveram inicialmente seis características fundamentais do câncer, às quais foram posteriormente adicionadas a reprogramação do metabolismo celular e a evasão do sistema imunológico (Figura 2 A) (Hanahan; Weinberg, 2000; 2011). Em 2022, a reprogramação epigenética e a inflamação tumoral passaram a ser reconhecidas como características habilitadoras da progressão do câncer (Figura 2 B) (Hanahan, 2022).

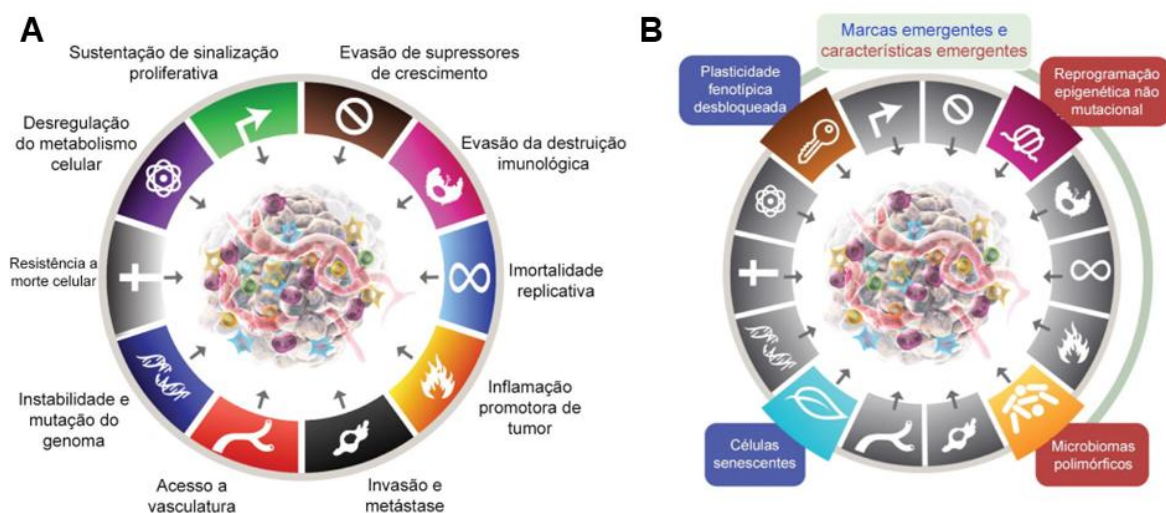


Figura 2. Evolução das características do câncer. (A) Características fundamentais propostas por Hanahan e Weinberg (2011) e (B) Características habilitadoras e promotoras acrescentadas por Hanahan (2022). Adaptado de Hanahan (2022).

Nesse contexto, o câncer de mama exemplifica de maneira evidente a aplicação do conceito das Características do Câncer, uma vez que sua carcinogênese e progressão são marcadas por ampla heterogeneidade molecular (Xiong et al., 2024).

O câncer de mama é uma doença classificada em diferentes subtipos moleculares, dependendo da expressão de receptores hormonais e da presença ou ausência da proteína receptora do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (Figura 3). Essa classificação é essencial para determinar o prognóstico e selecionar a terapia mais apropriada para cada paciente (Perou et al., 2000).

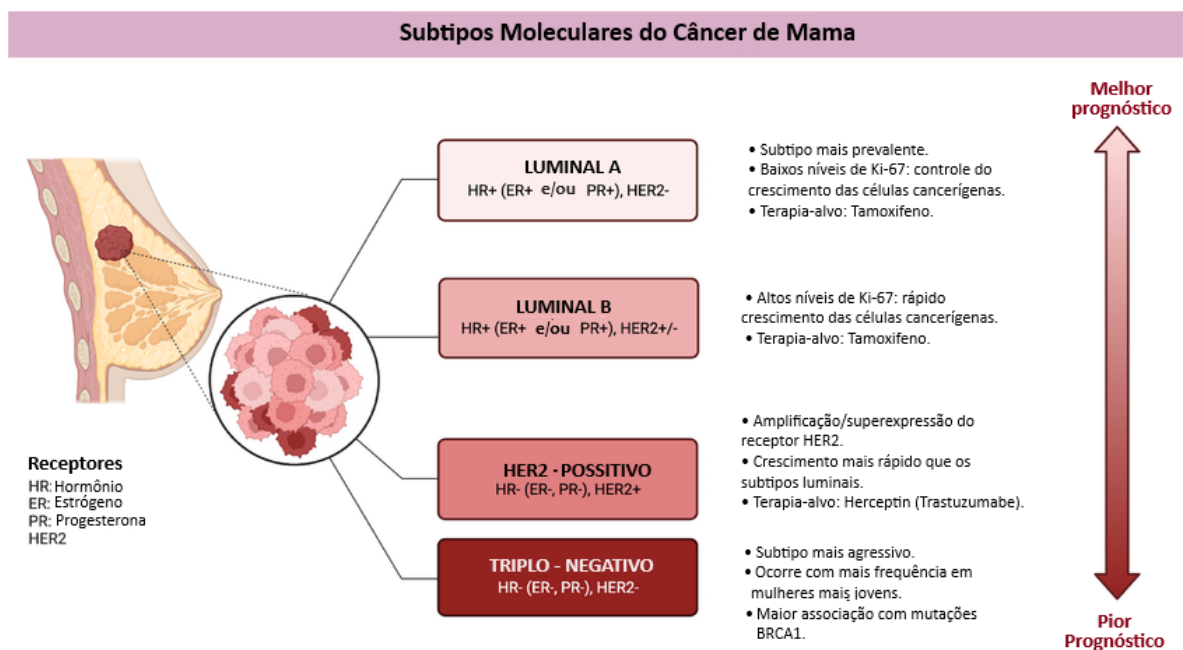


Figura 3. Principais características dos subtipos moleculares do câncer de mama. (Figura criada utilizando o [Biorender.com](https://www.biorender.com)). Adaptado de Ochoa e Hernández-Lemus (2023).

O subtipo Luminal A é definido pela presença positiva dos receptores de estrogênio (ER) e/ou progesterona (PR), ausência de superexpressão de HER2 e baixo índice de proliferação celular (Cheang et al., 2009). O subtipo Luminal B também exibe ER e/ou PR positivos, no entanto, apresenta um índice de proliferação celular mais alto ($Ki-67 \geq 14\%$) e pode ser HER2 positivo ou negativo (Cheang et al., 2009). A superexpressão da proteína HER2, que promove o crescimento das células tumorais, caracteriza o subtipo HER2-positivo (Slamon et al., 1987; Perou et al., 2000).

O subtipo TNBC acontece quando as células tumorais não expressam RE, RP e HER2, correspondendo a cerca de 15% dos casos (Foulkes et al., 2010; Bianchini et al., 2016). Este subtipo é o mais agressivo e tem o pior prognóstico, sendo geneticamente diverso e exibindo instabilidade genômica (Lehmann et al., 2011; Cancer Genome Atlas Network, 2012).

2.2. Modelo *in vitro*

Na pesquisa científica, os modelos *in vitro* baseados em cultura de células

tumorais são instrumentos essenciais, pois possibilitam a investigação de mecanismos celulares e moleculares, bem como o estudo de novas drogas (Mimura et al., 2020). Eles oferecem benefícios como maior reprodutibilidade, diminuição de custos e tempo de desenvolvimento em relação aos modelos *in vivo*, além de reduzirem questões éticas (Hodges et al., 2022; Huh et al., 2011).

As linhagens celulares humanas constituem modelos experimentais amplamente empregados na pesquisa em câncer de mama. Nesse contexto, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram escolhidas para este estudo por representarem os extremos dos subtipos moleculares do câncer de mama e por sua frequente utilização como modelos experimentais para investigar a biologia tumoral e a resposta a diferentes tratamentos, além de permitir a comparação de efeitos farmacológicos em contextos celulares distintos (Phannasil et al., 2023). Além disso, a linhagem não tumorigênica MCF-10 foi incluída como controle.

A linhagem celular MCF-7 é originada de um adenocarcinoma mamário em uma paciente de 69 anos, coletada a partir de uma efusão pleural (Comşa et al., 2015). É considerada um modelo que simula o câncer de mama do tipo luminal A (Mota et al. 2017). Esse subtipo de câncer de mama apresenta baixo grau histológico e bom prognóstico (Kim et al. 2012). Caracterizando-se pela expressão positiva de receptores de estrogênio (ER⁺) e progesterona (PR⁺), além de ausência de superexpressão de HER2. Essas células mantêm p53 funcional, níveis intermediários de Ki-67 e maior permanência na fase G1 do ciclo celular, refletindo o perfil menos agressivo dos tumores luminais (Osborne et al., 1987; Lacroix, Leclercq, 2004; Holliday, Speirs, 2011).

A linhagem celular MDA-MB-231 também é originada de um adenocarcinoma mamário, obtido a partir de uma efusão pleural de uma paciente de 51 anos (Cailleau et al., 1974). É classificada como câncer de mama triplo-negativo (TNBC), ou seja, não apresenta ER, PR e HER2 (Aysola et al., 2013). Essas células apresentam mutação em TP53, o que compromete mecanismos de controle do ciclo celular e resposta ao dano ao DNA. Além disso, exibem alta taxa proliferativa, com elevada expressão de Ki-67, maior proporção de células em fase S e resistência a checkpoints celulares (Cailleau et al., 1974; Neve et al., 2006; Holliday, Speirs, 2011). Esse subtipo de câncer de mama representa um modelo de câncer classificado como altamente agressivo, invasivo, pouco diferenciado e com pior prognóstico (Yin et al., 2020).

A linhagem celular MCF-10 é um modelo frequentemente usado de células epiteliais mamárias humanas que se tornaram espontaneamente imortais (Soule et al., 1990). A linhagem é originada do tecido mamário de uma mulher caucasiana de 36 anos, portadora de doença fibrocística da mama (Soule et al., 1990). Do ponto de vista molecular, as células da linhagem MCF-10 apresentam um perfil característico de epitélio mamário não tumoral (Puleo; Polyak, 2021). Essas células são negativas para receptores hormonais (ER⁻ /PR⁻ /HER2⁻) e apresentam p53 funcional. Além disso, exibem baixa taxa proliferativa, com baixa expressão de Ki-67, refletindo um perfil de crescimento controlado típico de células não transformadas. O ciclo celular nessas células apresenta checkpoints preservados, com maior proporção de células em G0/G1 e progressão restrita para as fases S e G2/M, o que reforça seu caráter não tumoral (Soule et al., 1990; Debnath et al., 2003; ATCC, 2023).

2.3. Produtos Naturais como agentes terapêuticos para o câncer

O interesse em plantas medicinais e produtos naturais como agentes terapêuticos data das civilizações antigas e ainda é um recurso fundamental para o tratamento de várias doenças em diversas comunidades e grupos étnicos (Newman; Cragg, 2020).

Pesquisas sobre a flora brasileira, tanto na perspectiva química quanto farmacológica, têm sido ampliadas desde meados do século passado (Simões et al., 2017). Hoje em dia, uma parcela considerável dos medicamentos da indústria farmacêutica brasileira tem origem em conhecimentos fitoterápicos populares, o que demonstra a combinação entre saberes tradicionais e a ciência moderna (Maciel; Pinto; Veiga Júnior, 2002).

Várias classes de compostos naturais encontrados em plantas têm mostrado atividades biológicas significativas para o avanço de terapias, inclusive no tratamento do câncer (Cragg; Newman, 2013).

A Figura 4 ilustra alguns dos principais fármacos antineoplásicos de origem natural e suas respectivas fontes biológicas, evidenciando a relevância dos produtos naturais no desenvolvimento da quimioterapia. Destacam-se clássicos como o paclitaxel, derivado de *Taxus brevifolia*, e os alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina), obtidos de *Catharanthus roseus* (Newman; Cragg, 2020).

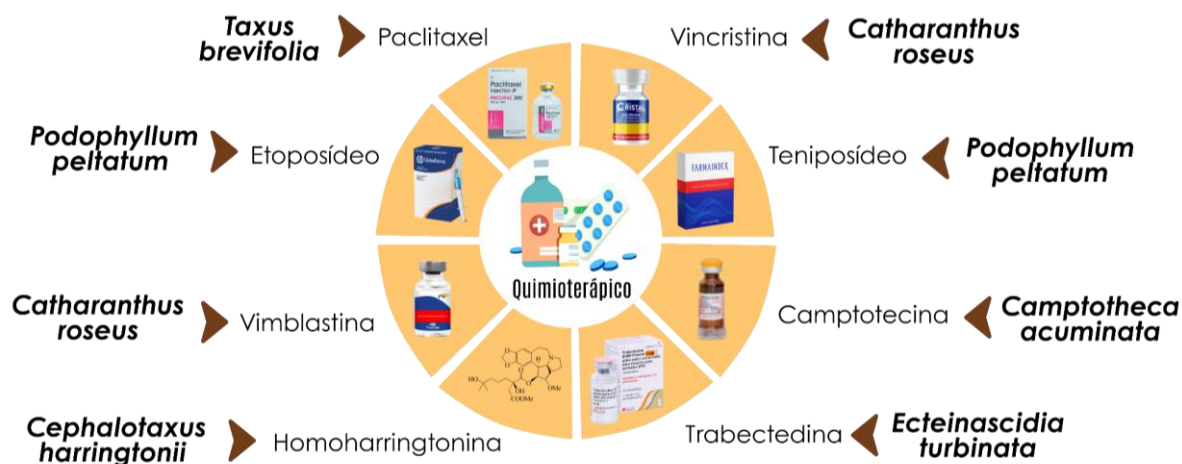


Figura 4. Principais fármacos quimioterápicos de origem vegetal e suas respectivas espécies. Fonte: Autor, 2025.

2.3.1. *Geissospermum vellosii*

A família Apocynaceae engloba numerosas espécies com rica composição fitoquímica, destacando-se pela presença de alcalóides e outras classes de metabólitos secundários, com diversas indicações medicinais registradas no Brasil (Santos et al., 2013). Espécies dessa família, como *Catharanthus*, *Nerium*, *Plumeria* e *Tabernaemontana*, foram descritas por suas características citotóxicas e anticancerígenas (Calderón-Montaña et al. 2013; Elgizawy et al. 2024; Manzoor et al., 2013; Mohsina et al. 2022).

No Brasil, uma espécie de grande relevância é o *Geissospermum vellosii*, árvore que pode atingir entre 8 e 20 metros de altura, conhecida popularmente como Pau-Pereira (PP) (Figura 5) (Lorenzi, 2000; Almeida, 2009)



Figura 5. *Geissospermum vellosii*, popularmente conhecido como Pau-pereira, em destaque no primeiro plano. Fonte: Almeida *et al.*, 2006.

A espécie pertence à família Apocynaceae (Koch *et al.*, 2015). A classificação hierárquica completa do *G. vellosii* é apresentada na Tabela 1, seguindo a nomenclatura adotada pela Flora e Funga do Brasil (Barbosa; Simões, 2020).

Tabela 1- Classificação taxonômica de *Geissospermum vellosii*

(Apocynaceae)

Nível Taxonômico	Classificação
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Gentianales
Família	Apocynaceae
Subfamília	Rauvolfioideae
Gênero	Geissospermum
Espécie	<i>Geissospermum vellosii</i>

A espécie foi formalmente descrita por Francisco Freire Allemão em 1845, sendo a autoria taxonômica frequentemente citada como Allemão. A nomenclatura da espécie possui variações históricas, sendo o sinônimo *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers amplamente utilizado em literatura mais antiga (Barbosa et al., 2019).

O gênero *Geissospermum* é endêmico da América do Sul, com o *G. vellosii* sendo uma das espécies mais relevantes devido à sua importância histórica e medicinal. A relevância histórica da espécie é reforçada pelo fato de a pereirina, um alcalóide isolado de sua casca, ter sido o primeiro alcaloide isolado no Brasil, marcando um marco na química de produtos naturais do país (Almeida et al., 2009).

A espécie *G. vellosii* é encontrada principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, com registros nos seguintes estados: Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima (Norte), Bahia e Maranhão (Nordeste), Distrito Federal (Centro-Oeste) e Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Sudeste). Em termos de domínios fitogeográficos, o *G. vellosii* está associado à Floresta Amazônica, ao Cerrado e à Mata Atlântica (Souza et al., 2021; Barbosa, Simões, 2020).

A espécie *G. vellosii* é rica em alcalóides indólicos e tem sido utilizado na medicina popular como antipirético, inclusive no tratamento da malária, bem como para problemas intestinais, tonturas e má digestão (Muñoz et al., 2000; Jácome, Souza, Oliveira, 2003; Werner et al., 2009).

Entre suas atividades biológicas, destacam-se os seus significativos

mecanismos anti-inflamatórios e antinociceptivos (Lima et al., 2016). Adicionalmente, estudos *in vivo* demonstraram atividade anticolinesterásica, com a inibição das enzimas butirilcolinesterase (BChE) e acetilcolinesterase (AChE), sendo a geissospermina o principal alcalóide responsável por essa ação (Lima et al., 2005). Essa atividade está intimamente ligada à via imunomoduladora "anti-inflamatório-colinérgico", que impede a produção de citocinas pró-inflamatórias e auxilia na redução de processos inflamatórios (Lima, 2016; Lima et al., 2005).

Paralelamente a essas propriedades, a atividade antitumoral do Pau-Pereira tem sido o foco de pesquisas, o que reforça seu potencial como agente terapêutico no combate ao câncer. Estudos recentes com o extrato da casca de *G. vellosii* mostraram um efeito supressor em células de câncer de próstata (Bemis et al., 2009), a inibição da progressão do câncer pancreático (Yu; Drisko; Chen, 2013) e a potencialização dos efeitos da gemcitabina, um quimioterápico de ampla aplicação (Dong; Chen; Chen, 2018).

O extrato também foi descrito como um potencializador da eficácia da carboplatina no tratamento do câncer de ovário (Yu; Chen, 2014). Adicionalmente, estudos *in vitro* mostraram que extratos de *G. vellosii* diminuem a viabilidade celular e a capacidade migratória das células T24 do câncer de bexiga humano, o que reforça sua ação antitumoral (Sousa Neto, 2024).

Dentre seus compostos bioativos, a flavopereirina, um alcalóide isolado da espécie, sobressai-se por sua potente ação anticancerígena. Foi demonstrado que a flavopereirina inibe o crescimento de células de câncer colorretal por meio da sinalização dependente de p53 (Li et al., 2019) e induz a interrupção do ciclo celular e a apoptose em células de câncer de mama humano, ativando as vias de sinalização AKT/p38 MAPK/ERK1/2 (Yeh et al., 2019). Esses achados, em conjunto, consolidam o extrato de *G. vellosii* e seus compostos isolados como uma promissora fonte de novas estratégias para a terapia oncológica.

2.3.2. Caracterização química

A pereirina foi isolada no século XIX, mas logo se percebeu que não era uma substância pura, e sim uma mistura complexa de alcalóides (Almeida, 2009). Estudos posteriores, particularmente durante o século XX, possibilitaram o isolamento e a identificação de vários alcalóides indólicos e β -carbolínicos encontrados na espécie

G. vellosii (Figura 6) (Almeida et al., 2009; Lima et al., 2020).

Extratos da casca de *G. vellosii* e seus alcalóides isolados vêm sendo amplamente estudados, mostrando atividades farmacológicas significativas (Lima et al., 2009; Lima et al., 2016; Costa et al., 2020).

A geissoschizolina (Figura 6 (1)) é caracterizado quimicamente por Mbeunkui et al. (2012), apresenta promissora atividade no sistema nervoso central. Seu principal potencial terapêutico é a neuroproteção contra o Alzheimer, atuando como um inibidor potente e seletivo da butirilcolinesterase (BChE), com baixa citotoxicidade (Lima et al., 2009). Adicionalmente, a literatura indica eficácia na modulação do humor e analgesia, influenciando vias serotoninérgicas e receptores de dor (Passos et al., 2009; Amador et al., 2001).

A geissoschizona (Figura 6 (2)) as pesquisas com essa molécula apresentam atividade bioativa voltada para doenças parasitárias. Seu principal potencial terapêutico reside na atividade antiplasmodial, atuando na inibição do crescimento do *Plasmodium falciparum*, embora apresente citotoxicidade moderada em células de mamíferos (Mbeunkui et al., 2012). Adicionalmente, a literatura indica bioatividade em ensaios de toxicidade geral, influenciando a viabilidade de linhagens celulares como Vero (Células renais de macaco verde africano) e CHO (Chinese Hamster Ovary), o que sugere menor seletividade celular quando comparada a outros alcaloides da espécie (Liberto et al., 2016).

A geissospermina (Figura 6 (3)) é um dos alcaloides mais estudados do gênero *Geissospermum*, destacando-se por sua atividade anticolinesterásica significativa, especialmente contra a acetilcolinesterase, além de efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios, o que direciona seu potencial terapêutico para doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Lima et al., 2009; Rosales et al., 2019).

Por fim, a base anidrônica derivada da geissospermina (Figura 6 (4)), demonstrou atividade anticolinesterásica superior à molécula precursora, além de propriedades antioxidantes e potencial neuroprotetor, reforçando seu interesse como composto promissor para o desenvolvimento de novos fármacos voltados ao tratamento de distúrbios neurodegenerativos (Lima et al., 2009).

Esses resultados confirmam o uso tradicional da planta na medicina popular e destacam a necessidade de pesquisas químicas e farmacológicas contínuas para entender suas propriedades bioativas.

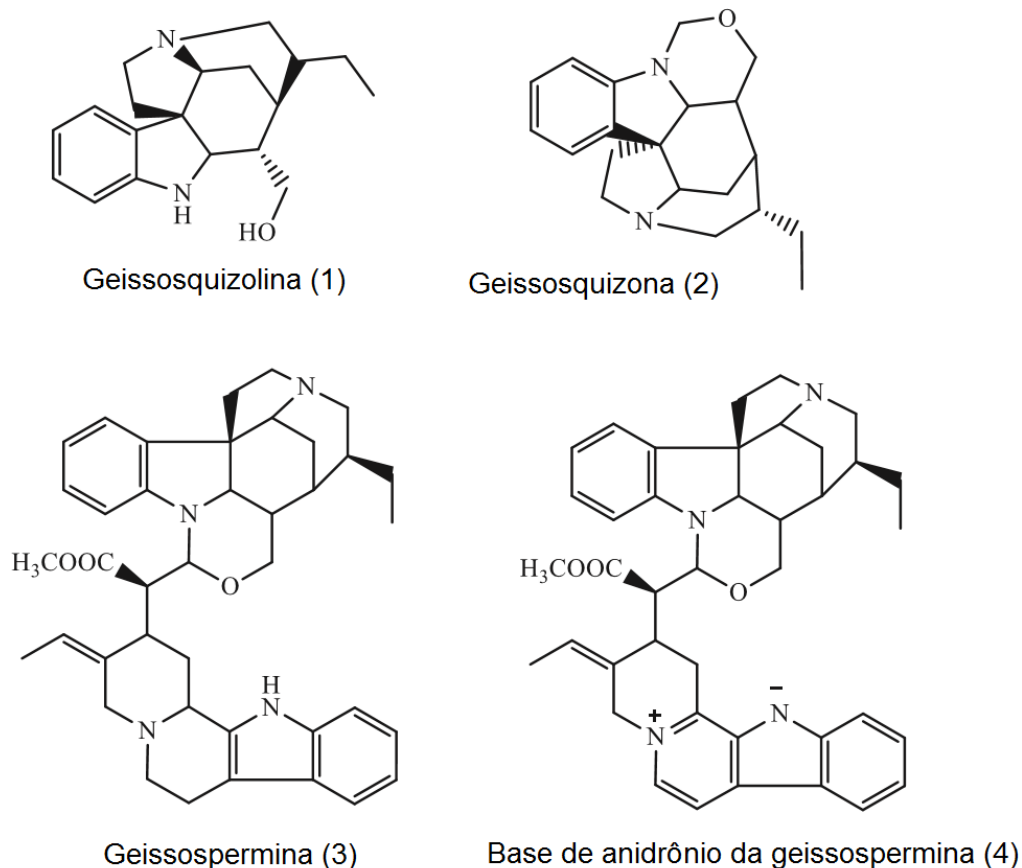


Figura 6. Alcalóides do *Geissospermum vellosii*. Fonte: Lima *et al*, 2020.

Diante da necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas para o câncer de mama e do potencial já demonstrado do Pau-Pereira contra outros tipos de câncer, justifica-se a investigação de sua atividade citotóxica contra células tumorais mamárias. Esse estudo poderá contribuir para a ampliação do conhecimento sobre o potencial terapêutico dessa espécie vegetal, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de novos tratamentos contra o câncer de mama.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade antitumoral *in vitro* do extrato etanólico obtido da casca de *G. vellosii* (Pau-Pereira), em células de câncer de mama humano (MCF-7 e MDA-

MB-231).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato, determinando a IC_{50} e o índice de seletividade (IS);
- Analisar os efeitos morfológicos do extrato sobre as células tumorais;
- Avaliar o efeito do extrato na proliferação, migração e morte celular;
- Investigar o potencial pró-apoptótico do extrato em células tumorais;
- Analisar os mecanismos envolvidos na parada do ciclo celular.

4. METODOLOGIAS

4.1. Preparação do extrato da casca do Pau-pereira

Foi utilizado o extrato etanólico da casca do caule do *G. vellosii* (PP) coletado

no Horto Jardim Botânico do Rio de Janeiro, gentilmente cedido pela Professora Dra. Josélia Alencar Lima e cujo método de preparo e caracterização química já foram descritos anteriormente (Lima et al., 2009). O armazenamento do resíduo seco foi realizado conforme as recomendações, mantido vedado e protegido da luz em freezer a -20°C .

Para a realização dos experimentos, o resíduo seco obtido do extrato foi pesado e diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO PA) para o preparo da solução-estoque (100 mg/mL). A solução-estoque foi conservada em frasco vedado, protegida da luz e a temperatura de -20°C .

Todas as soluções de trabalho foram preparadas no dia do tratamento. Para os ensaios, a solução estoque do PP foi diluída em meio de cultura para obter as concentrações dos ensaios *in vitro*, que variaram entre 1, 5, 10, 20, 40, 60 e 100 $\mu\text{g/mL}$. As Concentrações foram determinadas conforme estudos anteriores (Pinto, 2023; Sousa Neto, 2024).

4.2. Cultivo celular

Foram utilizadas as linhagens celulares tumorais MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano receptor de estrógeno positivo) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano triplo negativo), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Como controle de células não malignas, utilizou-se a linhagem MCF-10 (epitélio de mama não tumorigênico), gentilmente cedida pela Pr^a. Dr^a. Heveline Silva, coordenadora do Laboratório de Síntese e Interações Bioinorgânicas - SIBLAB, da Universidade Federal do Mato Grosso.

As linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm^2 e/ou 75 cm^2 com meio DMEM LG (Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose, GIBCO - Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Antibiótico (Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina B) (GIBCO - Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A linhagem MCF-10, foi cultivada nas mesmas condições, porém utilizando meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), igualmente suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Antibiótico.

As células foram mantidas em atmosfera de 5% de CO_2 , a 37°C (ATCC, 2025). Assim que as células atingiram cerca de 70 a 80% de confluência nas garrafas

de cultura foi obtida uma suspensão celular, a qual foi utilizada na realização para manutenção e realização dos testes experimentais.

Para a manutenção das células *in vitro*, o repique foi realizado lavando as células aderidas na garrafa de cultura com PBS 1X, seguido da adição de Tripsina-EDTA 1X por 3 minutos a 37 °C, para o destacamento das células e obtenção da suspensão celular. A suspensão foi transferida para um tubo cônico de 15mL contendo meio DMEM LG + 10% SFB para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 e de meio RPMI-1640 + 10% SFB para a linhagem MCF-10. Os tubos foram centrifugados a 300 × g durante 5 minutos e as células ressuspensas em 2 mL de meio de cultura suplementado (ATCC, 2025). O número total e a viabilidade das células da suspensão foi obtido pela contagem em câmara de Neubauer com Azul de Tripán a 0,04% (1:1), e a concentração celular ajustada conforme o experimento a ser realizado.

4.3. Desenho experimental

Após o preparo do extrato como descrito acima, as linhagens celulares foram cultivadas e, após o período de confluência, foram usadas nos ensaios experimentais para avaliação da atividade biológica do extrato PP.

Inicialmente, foram investigados o efeito do tratamento com extrato nas principais características associadas ao tumor: viabilidade, migração e proliferação. Para o ensaio de citotoxicidade as células foram cultivadas em 24, 48 e 72h, nas diferentes concentrações do extrato e determinada a citotoxicidade pelo ensaio do MTT. A partir dos dados obtidos, foram calculadas a concentração inibitória 50% (IC₅₀) e o índice de seletividade tendo como referência a linhagem mamária humana não tumoral (MCF-10).

As alterações morfológicas também foram analisadas, por microscopia óptica, para determinar o efeito do tratamento sobre as células. O efeito antiproliferativo do extrato foi determinado pelo ensaio de colônia, sendo observado o número de aglomerados celulares e usando a coloração do cristal violeta para determinar a densidade celular por colorimetria, após o tratamento. A capacidade anti migratória do extrato foi verificada através do ensaio de ranhura e determinado o tempo de fechamento da área na placa de cultura.

Para uma melhor investigação da capacidade do extrato em induzir

citotoxicidade, foram investigadas as vias de morte celular por necrose e apoptose, aplicando a técnica de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

Com base nos resultados obtidos, foi investigado o potencial do extrato em parar o ciclo celular, sendo este um dos principais mecanismos de ação observados nos quimioterápicos. Para este experimento foi aplicada a técnica de citometria para a identificação das fases do ciclo celular. A figura 7 resume as etapas de análise realizadas neste estudo.

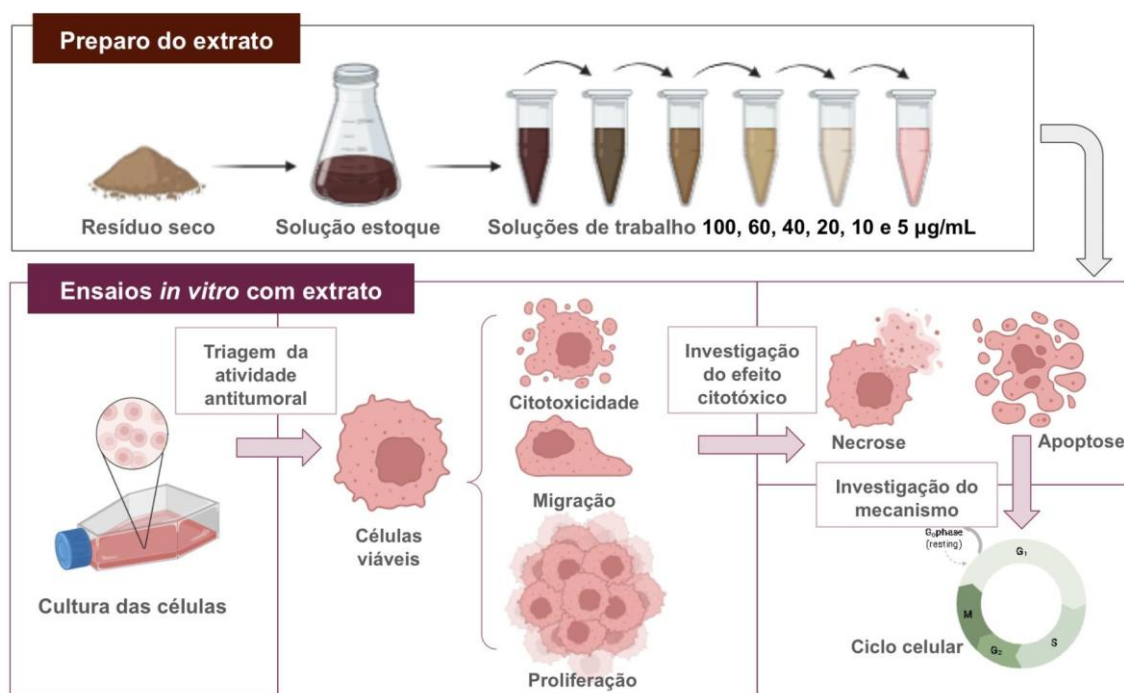


Figura 7. Ilustração representativa das etapas experimentais para avaliação do efeito antitumoral do extrato sobre linhagens mamárias humanas. (Figura criada utilizando o Biorender.com). Fonte: Autor, 2025.

4.3.1 Ensaios de triagem para atividade antitumoral

4.3.1.1 Ensaio de citotoxicidade, determinação da Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) e Índice de seletividade

O ensaio de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)

(Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA) foi realizado para determinar a citotoxicidade, conforme Mosmann (1983), com modificações. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços, fundo chato, na densidade de 1×10^4 células/poço, com volume final de 100 µL/poço de meio suplementado e incubadas por 24h à 5% de CO₂, a 37 °C.

Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de PP (5, 10, 20, 40, 60 e 100 µg/mL) e novamente incubadas por 24, 48 ou 72h. Como controle positivo foi utilizado Cisplatina (cis-diaminodicloroplatina(II) - CDDP) (Sigma-Aldrich, Merck, EUA) na concentração de 1,5 µg/mL. Foram testadas diferentes concentrações do veículo (DMSO a 0,1%, 0,5%, 0,7% e 1%) para assegurar que qualquer mudança percebida na viabilidade celular fosse unicamente atribuída ao extrato, e não ao DMSO usado no preparo da solução estoque.

Ao final de cada tempo de tratamento, o meio de cultivo foi descartado, e adicionado 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) em meio DMEM LG sem suplementação, por poço. As placas foram novamente incubadas por 3h em atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram diluídos com adição de 100 µL de Álcool Etílico P.A. Após, os poços foram homogeneizados e a absorbância de cada tratamento foi analisada em espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTec Instruments, Vermont, EUA), no comprimento de onda de 570 nm (Liu et al., 2014).

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicatas para cada linhagem. Os dados foram plotados em tabelas no Excel e as análises estatísticas feitas no *software* GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, California) para a determinação das médias de viabilidade dos tratamentos e da concentração inibitória média (IC₅₀).

Para obtenção da IC₅₀, após a obtenção dos dados do ensaio de redução do MTT, os valores de viabilidade foram transformados em logaritmos (Log X). Os dados foram normalizados e utilizados para plotar as curvas concentração-resposta, ajustadas por meio de uma curva de regressão não linear (Minho; Gaspar, 2016).

Para verificar a presença de efeito seletivo no tratamento com o PP, foi empregado o cálculo do Índice de Seletividade (IS), por meio da seguinte fórmula:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ da linhagem normal}}{IC_{50} \text{ da linhagem tumoral}}$$

> 1= Seletivo
 ≤ 1= Ausência ou
 baixa seletividade

Conforme proposto por Zingue e colaboradores (2016), um valor de IS maior que 1,0 (IS > 1,0) indica que a substância em estudo apresenta maior seletividade para as células tumorais em comparação com as células normais. O cálculo foi realizado comparando os valores de IC₅₀ da linhagem celular não tumoral (MCF-10) com os das linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231).

4.3.1.2 Análise de alterações morfológica por microscopia de luz invertida

A análise da morfologia celular foi realizada para avaliar a resposta das linhagens ao tratamento com PP. Para isso, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, na concentração de 0,2×10⁴ células por poço.

Após 24h de incubação, as culturas foram tratadas com PP na concentração que inibiu 50% (IC₅₀) da viabilidade celular, além de uma concentração superior e outra inferior à IC₅₀ e com CDDP (1,5 µg/mL) no volume de 200 µl por poço, por 48h. Após o tempo, foram captadas três imagens de cada grupo de tratamento, provenientes de dois experimentos independentes em triplicata, utilizando um microscópio de luz invertida equipado com uma câmera fotográfica com aumento de 200X (Eclipse Ti, Nikon).

As imagens foram adquiridas por meio do *software* OPTHD (Carl Zeiss Inc., Alemanha) e analisadas com o *software* ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, MA).

As análises foram realizadas de forma quantitativa e qualitativa. Na análise quantitativa, foi avaliado a área e perímetro celular de 100 células por tratamento. Já na análise qualitativa, foram observados aspectos como integridade da membrana celular, presença de vacúolos, retração celular, alterações na adesão, presença de blebs na superfície celular e alterações nucleares (Freshney, 2016; Kroemer et al., 2009). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

4.3.1.3 Ensaio clonogênico

De acordo com o protocolo descrito por Rafehi (2011), com modificações, as

células em cultura foram tripsinizadas e contadas. Em seguida, foram adicionadas (60 células/poço) em placas de 96 poços no volume final de 100 µL de meio.

Após 24h de incubação, as culturas foram tratadas com PP na concentração inibitória de 50% da viabilidade celular, além de uma concentração superior e outra inferior e com CDDP (1,5 µg/mL) no volume de 200 µl por poço, por 48h. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio fresco suplementado, sem tratamento. A reposição do meio foi realizada a cada 48h.

As células permaneceram em cultivo por 7 dias. Ao término do experimento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e posteriormente fixadas com Álcool Etílico P.A. durante 15 minutos. Após a fixação, as colônias foram coradas com cristal violeta (0,5% em 25% de metanol) no volume de 100 µL por poço, durante 10 minutos. O corante foi então removido e os poços foram lavados quatro vezes com água destilada.

As placas foram fotografadas com uma câmera fotográfica traseira de um iPhone 11 (Apple Inc., EUA), equipada com lente grande-angular de 12 MP (abertura f/1,8). As imagens foram capturadas no modo padrão, com foco automático, sem zoom digital e com o flash desativado, para posterior contagem das colônias.

Além disso, a densidade óptica do corante retido nas colônias foi avaliada por meio da adição de 100 µL de metanol por poço, durante 5 minutos. Foi realizada a leitura da placa no espectrofotômetro (BioTek Epoch) com comprimento de onda de 595 nm (Reigada; Miettinen; Savijoki; Fallarero, 2018). Realizou-se três experimentos independentes em triplicata.

4.3.1.4 Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular foi realizado segundo Liang e colaboradores (2007), com modificações. As linhagens foram semeadas ($0,2 \times 10^5$ células/poço - MCF-7 e 1×10^5 células/poço - MDA-MB-231) em placas de 96 poços. Antes de plaquear as células, a placa foi marcada no seu verso com um risco horizontal, separando cada poço em duas partes. O objetivo dessa etapa foi estabelecer um padrão para a captura das imagens, garantindo que as fotos fossem tiradas no mesmo lugar, utilizando o encontro da ranhura vertical na monocamada (que posteriormente seria realizada) e o risco horizontal no verso como referência. Devido

ao fato de a linhagem MCF-10 não apresentar perfil migratório, optou-se por não incluí-la neste ensaio.

Após 24h de cultivo, as células atingiram a formação de uma monocamada uniforme. Em seguida, foi realizada a ranhura utilizando uma ponteira de 10 µL. Com a ponteira posicionada a 90° em relação ao fundo do poço, traçou-se uma linha vertical ao longo da monocamada, iniciando na borda superior e deslizando até a borda inferior. Dessa forma, obteve-se uma ranhura central que divide o poço em duas regiões distintas (direita e esquerda).

Após a realização de cada ranhura, a ponta da ponteira foi lavada brevemente em PBS. O meio dos poços foi removido e os poços foram lavados com PBS em temperatura ambiente para remover as células mortas e os detritos do sobrenadante. O meio novo foi adicionado a cada poço utilizando uma micropipeta. Em seguida, as placas foram levadas ao microscópio para a captura das imagens.

As imagens foram obtidas em um microscópio invertido (Opticam O500i) equipado com uma câmera fotográfica (NA0.30 WD72) em um aumento de 100x. As fotos foram tiradas imediatamente após a realização da ranhura e consideradas como t=0 (tempo inicial do experimento).

A placa foi incubada por 24h e repetido o procedimento para obtenção das imagens em um aumento de 100x até o completo fechamento da ranhura tendo como referência o tempo do poço sem tratamento (controle negativo). A área de fechamento da ranhura foi calculada com auxílio do software ImageJ em todos os tempos que foram realizadas as fotomicrografias. A fórmula usada para calcular a taxa de fechamento foi:

$[A(0) - A(t) / A(0)] \times 100\%$, onde A(0) é a área no tempo zero e A(t) é a área após o tempo de incubação (t). Por fim, para analisar os dados obtidos no ensaio, utilizará o software Prism (Almeida et al., 2019). Realizou-se dois experimentos independentes em triplicata.

4.3.2 Ensaio para avaliação de mecanismo de morte celular

4.3.2.1 Investigação das vias de morte celular por apoptose e necrose

Para a avaliação do tipo de morte celular, foram realizados experimentos utilizando microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Para a microscopia de

fluorescência, as linhagens foram cultivadas em placas de 96 poços, na concentração de $0,2 \times 10^5$ células por poço.

Após 24h de incubação, as culturas foram tratadas com PP na concentração que inibiu 50% da viabilidade celular, além de uma concentração superior e outra inferior e com CDDP (1,5 µg/mL) no volume final de 200 µl por poço, por 48 horas. Concluído o período de incubação, o sobrenadante das placas foi cuidadosamente removido após centrifugação por 5 minutos a $300 \times g$. Em seu lugar, foi adicionado meio DMEM LG ou RPMI suplementado com 10% de SFB, laranja de acridina (AO) (50 µg/ml) e iodeto de propídio (50 µg/ml).

As placas foram submetidas à nova centrifugação e incubadas por 2 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram analisadas em um microscópio de fluorescência (Eclipse Ti, Nikon). As imagens foram capturadas em aumento de 200x, utilizando os filtros de fluorescência EGF (emissão na faixa verde) e CY3 (emissão na faixa vermelha). Em seguida, os canais de fluorescência foram combinados, e a análise celular foi realizada por meio do software ImageJ.

As células foram divididas em três grupos: viáveis, apoptóticas e necróticas. As células viáveis foram identificadas pela fluorescência verde uniforme, resultante da entrada do AO em núcleos íntegros, enquanto as células em apoptose exibiram fluorescência verde ou vermelha, podendo apresentar condensação da cromatina ou fragmentação nuclear (corpos apoptóticos). Já as células em necrose apresentaram fluorescência vermelha, devido à penetração do IP em membranas celulares comprometidas, com núcleo não condensado e sem alterações visíveis (Figura 8).

Durante a análise, foram avaliados parâmetros morfológicos e de integridade, incluindo cor da fluorescência, condensação ou fragmentação nuclear, presença de vacúolos citoplasmáticos e retração celular, permitindo a classificação das células como viáveis, apoptóticas ou necróticas (Smith et al., 2012; Costigan; Hollville; Martin, 2023). Para a análise qualitativa, 100 células foram selecionadas aleatoriamente em cada imagem e classificadas conforme os critérios descritos. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

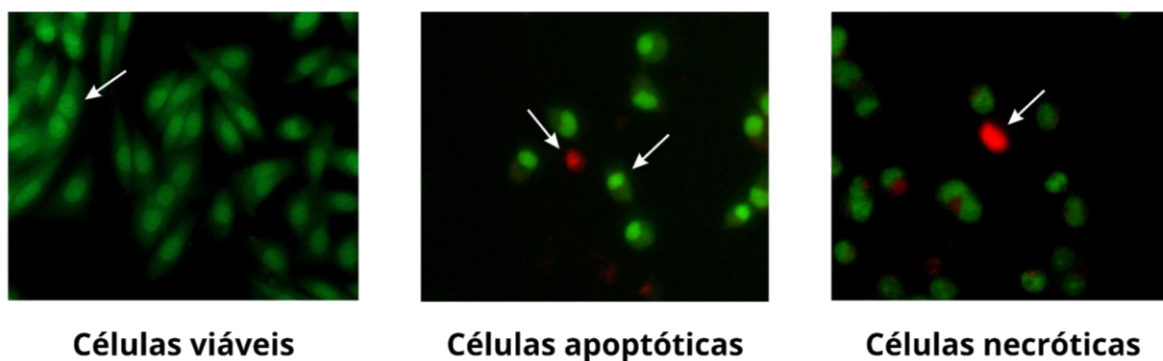


Figura 8. Caracterização do estado celular por coloração com laranja de acridina e iodeto de etídio, proposto por Smith et al. (2012) com modificações.

Para a análise de apoptose por citometria de fluxo, foi realizado o protocolo utilizando o kit Annexin V-FITC/PI (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, com ajustes para o número de células por poço. As linhagens foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 cél/poço em 500 μ l por poço.

Após 24h de incubação, as culturas foram tratadas com PP na concentração inibitória de 50% da viabilidade celular, além de uma concentração superior e outra inferior e com CDDP (1,5 μ g/mL) no volume final de 1000 μ l por poço, por 48h. Após as 48h, as células foram coletadas e transferidas para microtubos estéreis. Em seguida, centrifugadas a $300 \times g$ por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e as células lavadas duas vezes com tampão de coloração celular, conforme as instruções do fabricante (Cell Staining Buffer, BioLegend, Cat. 420201).

Após as lavagens, o pellet celular foi ressuspensionado em 100 μ L de tampão de ligação (Annexin V Binding Buffer). Para a etapa de marcação, preparou-se uma solução-mestra contendo: 12 μ L de Annexin V-FITC (90 μ g/mL), 48 μ L de iodeto de propídio (PI 500 μ g/mL) e 2,4 mL de tampão de ligação, totalizando um volume suficiente para 24 amostras.

As células foram mantidas em gelo durante todo o procedimento. Em seguida, adicionou-se 100 μ L da mistura a cada tubo com as células ressuspensionadas, seguindo-se incubação por 15 minutos à temperatura ambiente (25 °C), protegida da luz para evitar a degradação dos fluoróforos. Após a incubação, adicionou-se mais 100 μ L de tampão de ligação em cada tubo, resultando em um volume final de 200 μ L por amostra.

As amostras foram mantidas no gelo até o momento da aquisição dos dados no citômetro de fluxo. A detecção ocorreu nos canais correspondentes: FITC (fluorescência verde) para Anexina V e PE (fluorescência vermelha) para PI. Para garantir a interpretação adequada dos resultados, foram incluídos os seguintes controles experimentais: células não tratadas (controle negativo), células marcadas apenas com Anexina V, células marcadas apenas com PI e células induzidas à apoptose marcadas com Anexina V.

As amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo Guava easyCyte™ HT System, com a aquisição de 10.000 eventos no canal vermelho. Os dados foram processados utilizando o software FlowJo™ (Versão 10, Becton, Dickinson and Company, 2019) (Jaishy B, et al. 2015).

Realizou-se um experimento em quadruplicatas. Os 10.000 eventos por amostra foram obtidos dentro do gate de interesse, após a verificação da população celular com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e complexibilidade (SSC) em escala linear. Após o isolamento dos gates, a morte celular foi analisada por meio do dotplot dividido em quadrantes com a combinação do canal vermelho (RED-B-HLog) e canal verde (GRN-B-HLog) (Riccardi; Nicoletti, 2006) (Figura 9). Realizou-se um experimento em triplicata.

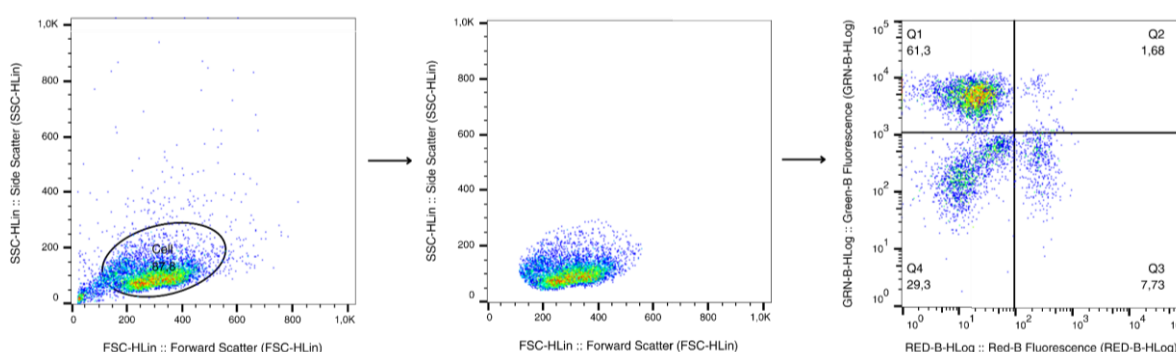


Figura 9. Esquema de análise de apoptose e necrose pelo ensaio de Anexina V/PI. À esquerda, método de identificação da população de interesse a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e complexibilidade (SSC) na escala linear e logarítmica. Ao centro, população de interesse. À direita, a análise foi realizada com base na distribuição das células em quatro quadrantes, de acordo com a marcação por Anexina V e iodeto de propídeo (PI). No quadrante Q4 (Anexina V⁻ /PI⁻), encontram-se as células viáveis, que não apresentam sinais de apoptose ou perda de integridade de membrana. O quadrante Q1 (Anexina V⁺ /PI⁻) corresponde às células em apoptose inicial, caracterizadas pela externalização de fosfatidilserina sem comprometimento da membrana plasmática. O quadrante Q2

(Anexina V⁺ /PI⁺) representa as células em apoptose tardia, já com permeabilidade de membrana aumentada. Por fim, o quadrante Q3 (Anexina V⁻ /PI⁺) reúne as células necróticas, que apresentam perda total de integridade de membrana, permitindo a entrada do PI.

4.3.2.2 Análise do Ciclo celular

Para a avaliação dos efeitos do extrato de PP no ciclo celular, as células foram semeadas na densidade de 1×10^5 células em placas de 24 poços por 24h. Em seguida, as culturas foram tratadas com PP em três concentrações: a concentração que inibiu 50% da viabilidade celular (IC₅₀), uma concentração superior e outra inferior ao IC₅₀. Além disso, utilizará o tratamento com CDDP (1,5 µg/mL), em um volume de 1000 µl por poço, durante 48h.

Após o período de tratamento, os poços foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, realizou-se a desagregação celular enzimática pela adição de 100 µl de tripsina, seguida de incubação de 3 a 4 minutos a 37 °C em estufa.

A suspensão celular obtida foi centrifugada a $300 \times g$ por um minuto, o pellet celular desfeito e as células lavadas uma vez com PBS, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Posteriormente, as células foram incubadas em Álcool 70% sob refrigeração (-20 °C) até o momento da marcação.

Para a marcação, as células foram centrifugadas a $300 \times g$ por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e em seguida, as células ressuspendidas em uma solução contendo 0,1% de Triton, RNase A (20 mg/mL, Thermo Fisher Scientific) e iodeto de propídio (IP) a 50 µg/mL. As células permaneceram incubadas overnight sob refrigeração e protegidas da luz. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo Guava easyCyte™ HT System, com a aquisição de 10.000 eventos no canal vermelho (RED-B).

Os dados foram processados utilizando o software FlowJo™ (Versão 10, Becton, Dickinson and Company, 2019). Os 10.000 eventos por amostra foram obtidos dentro do gate de interesse, após a verificação da população celular com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e complexibilidade (SSC) em escala linear. Após o isolamento dos gates, o ciclo celular foi analisado por meio do histograma do canal vermelho (RED-B-HLin) em escala linear onde foram criados gates lineares que servem como referência para separar regiões do ciclo celular (Riccardi; Nicoletti, 2006) (Figura 10). Realizou-se dois experimentos independentes em quadruplicatas.

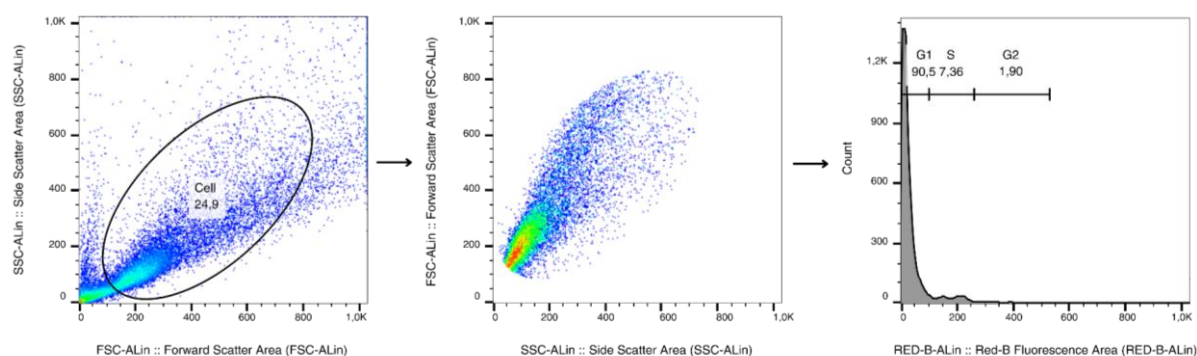


Figura 10. Esquema de análise do ciclo celular. À esquerda, método de identificação da população de interesse a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) na escala linear. Ao centro, população de interesse. À direita, método de análise do ciclo celular com a identificação das fases G1, S e G2 referente à marcação com iodeto de propídeo (IP), na escala linear.

4.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ou média $\pm$ desvio padrão. A distribuição foi avaliada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para a análise estatística, foram aplicados os testes one-way ANOVA para dados com distribuição normal, seguido do pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas, ou o teste de Kruskal-Wallis para dados não gaussianos. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1. PP reduz a viabilidade das linhagens tumorais

A viabilidade celular foi avaliada após o tratamento das linhagens, MCF-10, MCF-7 e MDA-MB-231 com diferentes concentrações do extrato de PP (1, 5, 10, 20, 40, 60 e 100 µg/mL) nos períodos de 24, 48 e 72h (Figura 11).

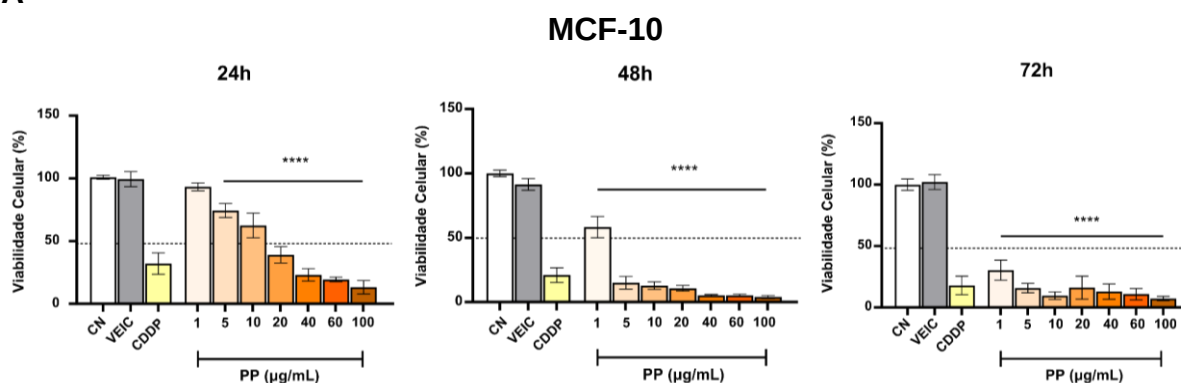
A linhagem MCF-10 (Figura 11 A), em 24h, não mostrou alteração significativa da viabilidade celular na concentração de 5 µg/mL, com redução significativa a partir da concentração de 10 µg/mL. Em 48h, a citotoxicidade foi maior nas concentrações a partir de 10 µg/mL, apresentando uma redução da viabilidade maior que 50%. Após 72h, a toxicidade foi maior em todas as concentrações testadas. Mesmo na concentração mais baixa (1 µg/mL) a viabilidade foi inferior a 50%, em comparação com o CN.

Na linhagem MCF-7 (Figura 11 B), verificou-se que, nas primeiras 24h, não houve alteração significativa da viabilidade celular na concentração de 5 µg/mL. A partir de 10 µg/mL, observou-se redução da viabilidade celular, que se tornou

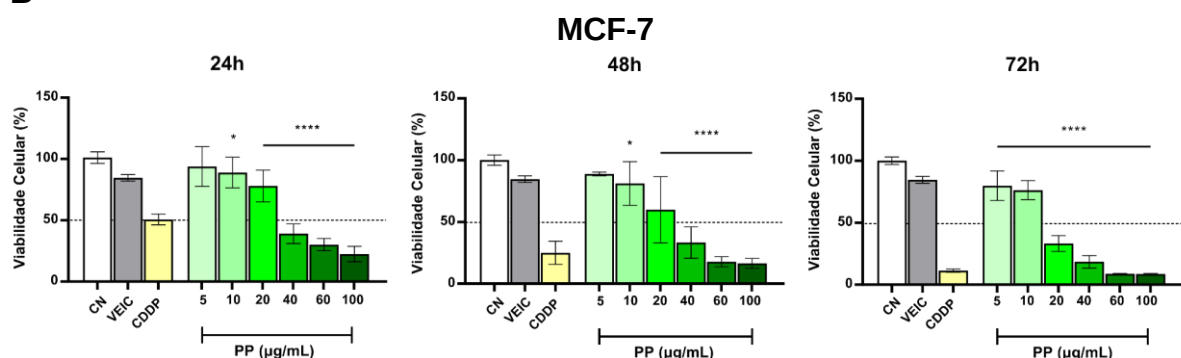
progressivamente maior nas concentrações de 40 e 100 µg/mL. Em 48h, a redução da viabilidade tornou-se mais evidente, inclusive nas concentrações de 10 e 20 µg/mL. Após 72h, a diminuição foi ainda mais acentuada, com viabilidade celular inferior a 50% nas concentrações de 20, 40, 60 e 100 µg/mL, padrão semelhante ao observado no controle positivo (CDDP).

Já na linhagem MDA-MB-231 (Figura 11 C), o extrato também promoveu uma diminuição significativa da viabilidade celular, observada a partir das 24h de tratamento, desde a concentração de 10 µg/mL. Em 48h, as concentrações de 40 a 100 µg/mL reduziram a viabilidade para menos de 30%. Já em 72h, as concentrações de 5 e 10 µg/mL mantiveram a viabilidade acima de 50%, embora a concentração de 10 µg/mL apresentasse redução significativa da viabilidade em relação ao controle. As concentrações de 20 a 100 µg/mL reduziram a viabilidade celular para menos de 20%.

A



B



C

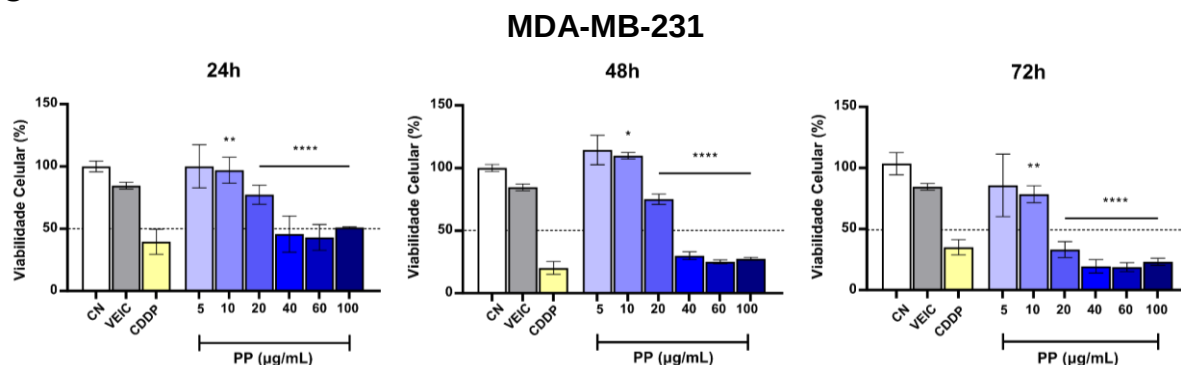


Figura 11. Ensaio de MTT analisando a viabilidade das células MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10 após o tratamento com o extrato da casca do Pau-pereira. Os dados representam a média em porcentagem de viabilidade (%) $\pm$ o desvio padrão (SD). Para a análise da diferença foi utilizado o one-way ANOVA seguida por Dunnett's pos-hoc test, sendo considerado um valor significativo de * $p \leq 0,05$. ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,0001$ em relação ao CN. A linha tracejada representa 50% da viabilidade celular. Os dados são provenientes de 3 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais. Houve diferença estatística entre os grupos CN e CDDP, no entanto, essa diferença não foi representada de forma gráfica. CN: Controle negativo (células com meio), VEIC: Veículo (DMSO 0,1%), CDDP: Cisplatina (1,5 $\mu\text{g/mL}$), PP: Tratamento do extrato do Pau-pereira.

Em todas as linhagens, o controle CN (controle negativo) e VEIC (veículo) mantiveram a viabilidade próxima de 100% em todos os tempos avaliados, indicando ausência de efeito citotóxico do solvente.

De forma geral, os resultados demonstram que o extrato de PP em todas as linhagens promoveu redução significativa da viabilidade celular de forma dependente da concentração e do tempo de tratamento.

Após a análise do ensaio de viabilidade, foi calculado o IC_{50} (concentração inibitória média) para cada linhagem (Tabela 2).

A linhagem MCF-10 apresentou os menores valores de IC_{50} , com destaque para 48h, em que o valor foi de 2,74 $\mu\text{g/mL}$. Na linhagem MCF-7, os valores de IC_{50} diminuíram ao longo do tempo, 25,00 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h, 19,75 $\mu\text{g/mL}$ após 48h e 15,78 $\mu\text{g/mL}$ após 72h. A PP apresentou valores de IC_{50} de 20,32 $\mu\text{g/mL}$, 18,60 $\mu\text{g/mL}$ e 12,42 $\mu\text{g/mL}$, em 24, 48 e 72h, respectivamente, na linhagem celular MDA-

MB-231. Os dados mostraram uma maior citotoxicidade para a linhagem MCF-10, em 48h, comparada às linhagens tumorais.

As curvas dose-resposta evidenciam uma redução progressiva da viabilidade celular em função do aumento da concentração do extrato PP e do tempo de exposição (24, 48 e 72 h) (Figura 12). Os valores do coeficiente de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste das curvas dose-resposta indicam a qualidade do modelo matemático utilizado para descrever a relação entre a concentração do extrato PP e a viabilidade celular nas diferentes linhagens e tempos de exposição.

Tabela 2- Concentração inibitória média (IC_{50}) do extrato do PP nas linhagens MCF-10, MCF-10 e MDA-MB-231, nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas.

	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	24h	48h	72h
MCF-10	11,05	2,74	5,20
MCF-7	25,00	19,75	15,78
MDA-MB-231	20,32	18,60	12,42

Nota: Os dados são provenientes de 3 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais.

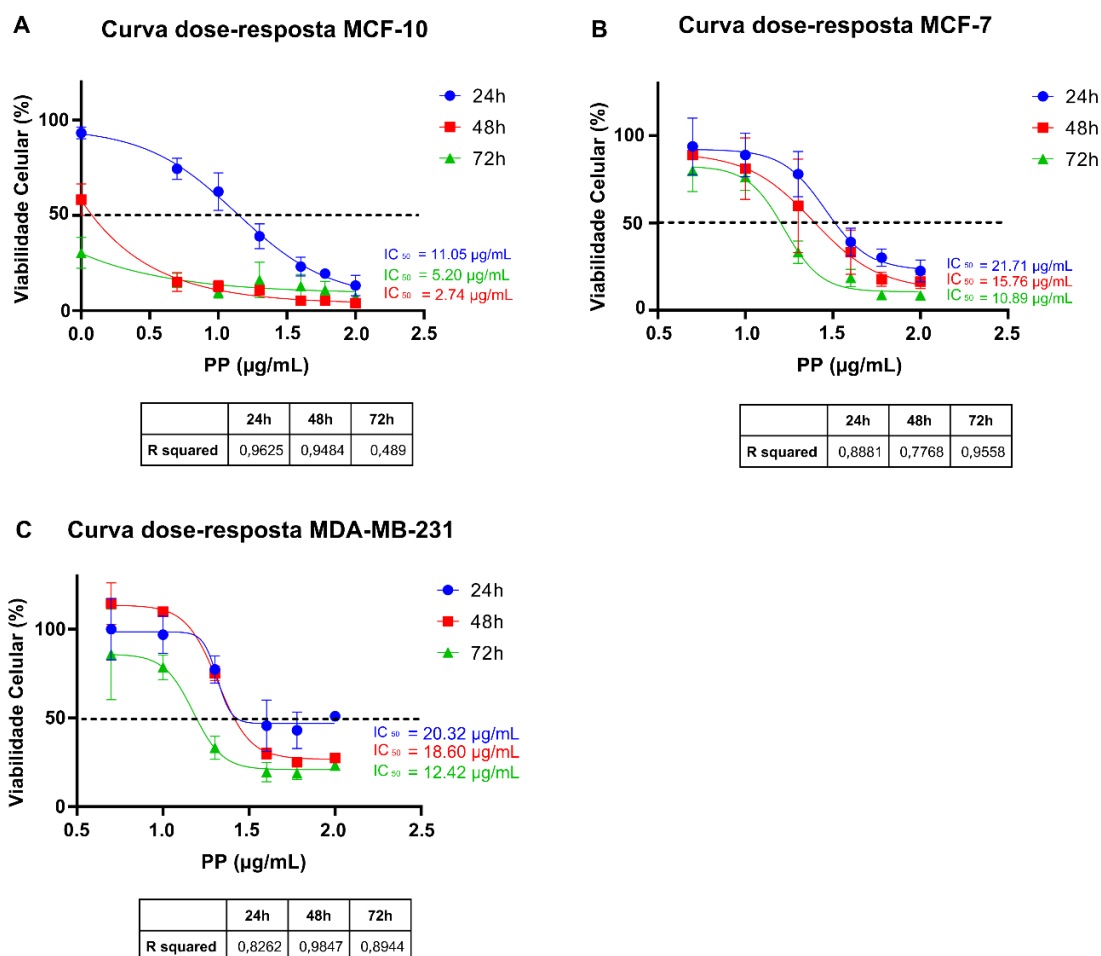


Figura 12. Curvas dose-resposta das linhagens celulares tratadas com PP. Os dados representam a média em porcentagem de viabilidade (%) $\pm$ o desvio padrão (SD). Para a confecção das curvas foi utilizada a regressão não linear do log (inibidor) vs a resposta transformada. A linha tracejada representa a média referente a 50% da viabilidade celular. Os dados são provenientes de 3 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais. Abaixo de cada gráfico encontram-se os valores de R^2 de cada linhagem referentes aos tempos de tratamento.

Tabela 3- Índice de seletividade das linhagens tumorais tratadas com PP.

Índice de Seletividade (IS)			
	24h	48h	72h
MCF-7	0,44	0,14	0,33
MDA-MB-231	0,54	0,15	0,42

Nota: Os dados foram obtidos através da razão entre a IC_{50} da linhagem normal sobre a IC_{50} das linhagens tumorais. As linhagens são consideradas seletivas caso o valor de SI seja maior ou igual a 1.

A partir dos resultados de IC_{50} , foi avaliado o IS do extrato do PP em

comparação com a linhagem MCF-10 (Tabela 3). A análise dos dados nos diferentes tempos de exposição revelou que o extrato testado não apresentou seletividade significativa para nenhuma das linhagens tumorais, uma vez que todos os valores de IS permaneceram inferiores a 1.

Os índices de seletividade do PP para a linhagem MCF-7, foram de 0,44 (24 h), 0,14 (48h) e 0,33 (72h). De forma semelhante, para a linhagem MDA-MB-231, os valores de IS do PP foram 0,54 (24h), 0,15 (48h) e 0,42 (72h).

5.2. PP altera a morfologia das células tumorais

Ao analisar de forma qualitativa a morfologia da linhagem MCF-10, foi possível constatar alterações celulares em resposta ao tratamento com o PP (Figura 13). No grupo CN, as células apresentaram morfologia característica da linhagem, com formato levemente arredondado, contorno regular, citoplasma íntegro, aderidas e com alta confluência. No tratamento com CDDP (1,5 µg/mL), foi possível observar citotoxicidade, evidenciada pela perda acentuada da confluência e da adesão celular. As células remanescentes exibiram formato retraído e arredondado.

O tratamento com extrato de PP, na concentração de 1 µg/mL, foi observada a manutenção das características morfológicas das células, semelhantes ao grupo CN. Na concentração de 5 µg/mL, foram observadas alterações iniciais, com uma retração celular e redução da confluência. Embora a maioria das células permanecesse aderida, foi notável a perda parcial da organização celular típica.

Com 10 µg/mL, as alterações mostraram perda da adesão celular, retração generalizada e perda acentuada da confluência. Por fim, na maior concentração testada (20 µg/mL), o efeito citotóxico foi observado com ausência de células.

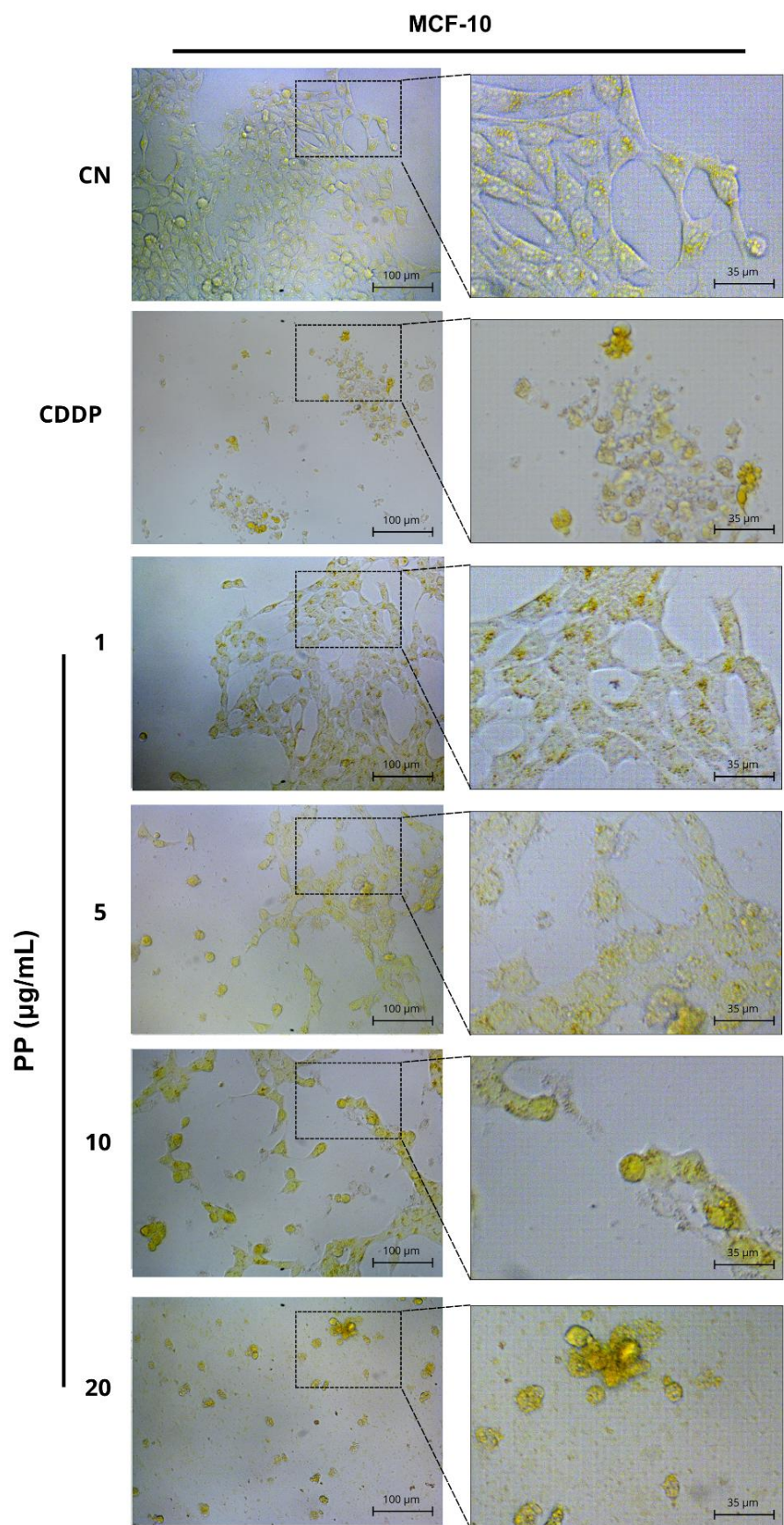


Figura 13. Alterações morfológicas induzidas extrato do PP em células MCF-10, após o tratamento com o extrato da casca do Pau-pereira. As células foram observadas por microscopia de contraste

de fase, sob aumento de 200x, após 48h de tratamento. CN – controle negativo (meio de cultura); CDDP – controle positivo (cisplatina a 1,5 µg/mL); PP 5 – tratamento com 5 µg/mL; PP 10 – tratamento com 10 µg/mL; PP 20 – tratamento com 20 µg/mL; PP 40 – tratamento com 40 µg/mL.

Na análise quantitativa foi observado que na linhagem MCF-10, sofreu alterações significativas nos parâmetros de área e perímetro celulares (Tabela 4).

O grupo CN apresentou os maiores valores de área ($46,59 \pm 19,6 \text{ mm}^2$) e perímetro ($485,6 \pm 28,46 \text{ mm}$). O tratamento com CDDP (1,5 µg/mL) promoveu a redução mais expressiva nos parâmetros morfológicos, com redução da área para $0,68 \pm 0,26 \text{ mm}^2$ e o perímetro para $92,55 \pm 18,22 \text{ mm}$.

Na concentração de 1 µg/mL, observou-se uma redução superior a 50% na área ($46,59 \text{ vs. } 18,41 \text{ mm}^2$) e no perímetro ($485,6 \text{ vs. } 233,39 \text{ mm}$) em comparação ao CN. Com 5 µg/mL, a redução tornou-se mais evidente, com área e perímetro reduzindo para $3,45 \pm 1,31 \text{ mm}^2$ e $204,47 \pm 9,38 \text{ mm}$, respectivamente. Já na concentração de 10 µg/mL, os valores foram de área $2,58 \pm 1,10 \text{ mm}^2$ e do perímetro $179,86 \pm 13,53 \text{ mm}$.

Tabela 4- Análise quantitativa da área e perímetro de células MCF-10 após tratamento com o extrato do PP.

Tratamento	MCF-10	
	Área (mm ²)	Perímetro (mm)
CN	$46,59 \pm 19,6$	$485,6 \pm 28,46$
CDDP 1,5 µg/mL	$0,68 \pm 0,26$ ****	$92,55 \pm 18,22$ ****
PP 1 µg/mL	$18,41 \pm 31,59$ ***	$233,39 \pm 26,65$ ***
PP 5 µg/mL	$3,45 \pm 1,31$ ****	$204,47 \pm 9,38$ ***
PP10 µg/mL	$2,58 \pm 1,10$ ****	$179,86 \pm 13,53$ ****

Para a análise da diferença foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey- Kramer sendo considerado um valor significativo de ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01 e *p < 0,05 em relação ao CN. Os dados são expressos como Média ± Desvio Padrão (DP) provenientes de 2 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais em 48h.

A morfologia das células MCF-7 (Figura 14) em cultura sem tratamento foi de aspecto fusiforme, com citoplasma alongado, liso e aderidas, morfologia característica da linhagem. O tratamento com CDDP induziu nas células retração acentuada, perda da morfologia fusiforme e redução expressiva na adesão e confluência. Também foram observadas formações de grânulos na membrana plasmática.

Na menor concentração de PP testada (5 µg/mL), foram observadas poucas alterações em relação ao grupo CN. A Partir da concentração de 10 µg/mL, embora a maioria das células ainda permanecessem aderidas, houve redução na confluência e sinais de retração celular. Nas concentrações mais elevadas, 20 e 40 µg/mL, foi observado perda de adesão das células e debris, evidenciando perda total da integridade celular, mostrando que o tratamento foi citotóxico.

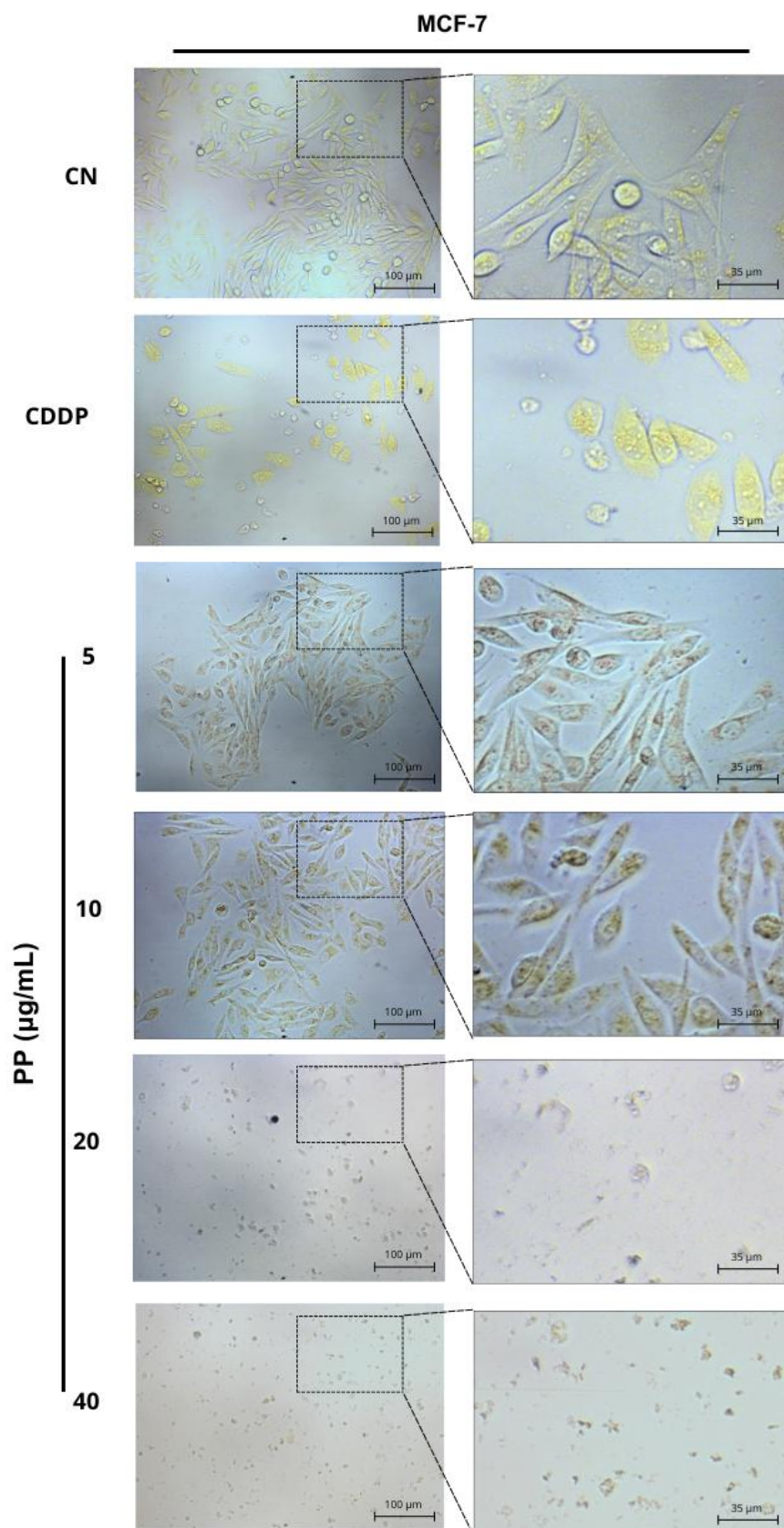


Figura 14. Alterações morfológicas induzidas extrato do PP em células MCF-7 após o tratamento com o extrato da casca do Pau-pereira. As células foram observadas por microscopia de contraste de fase, sob aumento de 200x, após 48h de tratamento. CN – controle negativo (meio de cultura);

CDDP – controle positivo (cisplatina a 1,5 µg/mL); PP 5 – tratamento com 5 µg/mL; PP 10 – tratamento com 10 µg/mL; PP 20 – tratamento com 20 µg/mL; PP 40 – tratamento com 40 µg/mL.

A linhagem MCF-7 sofreu alterações morfológicas nos parâmetros de área e perímetro celulares (Tabela 5) após o tratamento com extrato.

O grupo CN apresentou um valor médio de área igual a $5,88 \pm 6,41 \text{ mm}^2$ e de perímetro de $540,76 \pm 18,9 \text{ mm}$. O tratamento com CDDP (1,5 µg/mL) reduziu significativamente os parâmetros de área e perímetro em $0,68 \pm 0,26 \text{ mm}^2$ e $0,79 \pm 0,28 \text{ mm}$, respectivamente. O tratamento na concentração de 5 µg/mL causou a redução da área ($3,82 \pm 1,07 \text{ mm}^2$) e do perímetro ($348,45 \pm 50,05 \text{ mm}$), em comparação ao grupo CN.

A concentração para 10 µg/mL também apresentou efeito citotóxico com diminuição da área ($1,99 \pm 0,60 \text{ mm}^2$) e do perímetro ($163,64 \pm 23,60 \text{ mm}$).

Da mesma forma, o efeito citotóxico na morfologia foi observado na concentração de 20 µg/mL com área igual a $0,43 \pm 0,17 \text{ mm}^2$ e perímetro de $72,78 \pm 16,89 \text{ mm}$.

Tabela 5- Análise quantitativa da área e perímetro de células MCF-7 após tratamento com o extrato do PP.

Tratamento	MCF-7	
	Área (mm ²)	Perímetro (mm)
CN	$5,88 \pm 6,41$	$540,76 \pm 18,9$
CDDP 1,5 µg/mL	$0,68 \pm 0,26$ ****	$0,79 \pm 0,28$ ****
PP 5 µg/mL	$3,82 \pm 1,07^*$	$348,45 \pm 50,05^*$
PP 10 µg/mL	$1,99 \pm 0,6$ **	$163,64 \pm 23,6$ **
PP 20 µg/mL	$0,43 \pm 0,17$ ****	$72,78 \pm 16,89$ ****
PP 40 µg/mL	$0,69 \pm 0,62$ ****	$92,13 \pm 29,77$ ****

Para a análise da diferença foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey- Kramer sendo considerado um valor significativo de ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01 e *p < 0,05 em relação ao CN. Os dados são expressos como Média ± Desvio Padrão (DP) provenientes de 3 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais em 48h.

No grupo CN da linhagem MDA-MB-231 (Figura 15), as células apresentaram morfologia característica com formato fusiforme ou poligonal, alta confluência e adesão. Já no CP, tratado com CDDP (1,5 µg/mL), observou-se redução na densidade celular, presença de células arredondadas e desprendidas, confirmando o efeito citotóxico esperado para esse fármaco.

Na menor concentração do PP (5 µg/mL), a morfologia celular manteve-se semelhante ao CN. A partir da concentração de 10 µg/mL, foram observadas alterações mais evidentes, caracterizadas por redução da confluência e aumento do número de células arredondadas e parcialmente aderidas, além de apresentar condensamento nuclear.

Em 20 µg/mL, o efeito citotóxico foi acentuado, com diminuição expressiva da densidade celular, predominando células arredondadas, fragmentadas e com presença de debris celulares. Na maior concentração testada (40 µg/mL), observou-se desorganização da membrana celular e presença predominante de fragmentos celulares.

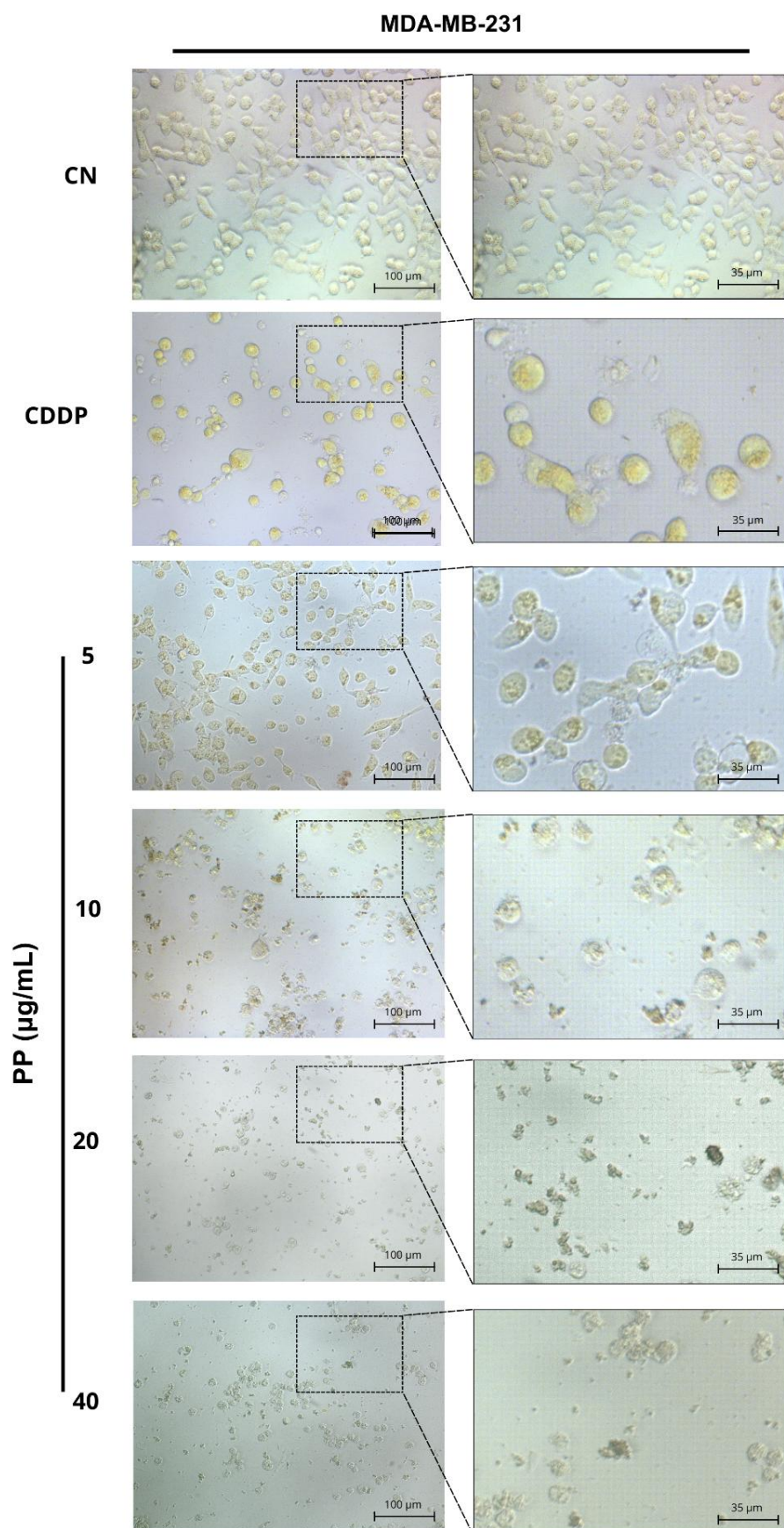


Figura 15. Alterações morfológicas induzidas extrato do PP em células MDA-MB-231 após o tratamento com o extrato da casca do Pau-pereira. As células foram observadas por microscopia de

contraste de fase, sob aumento de 200x, após 48h de tratamento. CN – controle negativo (meio de cultura); CDDP – controle positivo (cisplatina a 1,5 µg/mL); PP 5 – tratamento com 5 µg/mL; PP 10 – tratamento com 10 µg/mL; PP 20 – tratamento com 20 µg/mL; PP 40 – tratamento com 40 µg/mL.

A análise quantitativa da morfologia celular da linhagem MDA- MB- 231 mostrou alterações nos parâmetros de área e perímetro celulares (Tabela 6). No grupo CN, a área média foi de $24,88 \pm 20,2 \text{ mm}^2$ e o perímetro médio de $1925,77 \pm 1429,4 \text{ mm}$. No grupo tratado com CDDP, observou-se redução na área ($3,31 \pm 4,8 \text{ mm}^2$) e no perímetro ($244,77 \pm 5,7 \text{ mm}$).

Nas células tratadas com o composto PP, a 5 µg/mL, a área média foi de $29,05 \pm 25,20 \text{ mm}^2$ e o perímetro de $511,50 \pm 15,14 \text{ mm}$. A partir de 10 µg/mL, houve redução progressiva tanto na área quanto no perímetro: área de $1,68 \pm 0,53 \text{ mm}^2$ (10 µg/mL) e $0,98 \pm 0,36 \text{ mm}^2$ (40 µg/mL); perímetro de $145,68 \pm 16,40 \text{ mm}$ (10 µg/mL) e $113,40 \pm 18,12 \text{ mm}$ (40 µg/mL).

Tabela 6- Análise quantitativa da área e perímetro de células MDA-MB-231 após tratamento com o extrato do PP.

Tratamento	MDA-MB-231	
	Área (mm ²)	Perímetro (mm)
CN	$24,88 \pm 20,2$	$1925,77 \pm 1429,4$
CDDP 1,5 µg/mL	$3,31 \pm 4,8$ ****	$244,77 \pm 5,7$ ****
PP 5 µg/mL	$29,05 \pm 25,20$	$511,50 \pm 15,14$ ***
PP 10 µg/mL	$1,68 \pm 0,53$ ****	$145,68 \pm 16,40$ ****
PP 20 µg/mL	$1,10 \pm 0,50$ ****	$119,42 \pm 22,69$ ****
PP 40 µg/mL	$0,98 \pm 0,36$ ****	$113,40 \pm 18,12$ ****

Para a análise da diferença foi utilizado o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey- Kramer sendo considerado um valor significativo de ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01 e *p < 0,05 em relação ao CN . Os dados são expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão (DP) provenientes de 3 experimentos independentes, com 3 repetições experimentais em 48h.

5.3. PP reduz a capacidade proliferativa das células tumorais

As linhagens foram submetidas ao ensaio de formação de colônias com o objetivo de avaliar a capacidade proliferativa das células viáveis após o tratamento com PP em 48h (Figura 16).

Na linhagem MCF-10 foi observado que, das células mantidas com meio (CN), a formação de colônias celulares foi observada. Entretanto, após o tratamento com o extrato do PP não foi observada formação de colônias. O mesmo efeito foi observado para as células MCF-7.

Assim, o tratamento com o extrato do PP resultou na inibição completa na formação de colônias em todas as concentrações testadas. Na linhagem MDA-MB-231, o tratamento com extrato do PP na concentração de 10 µg/mL reduziu a formação de colônia, com inibição total da proliferação na concentração 20 µg/mL.

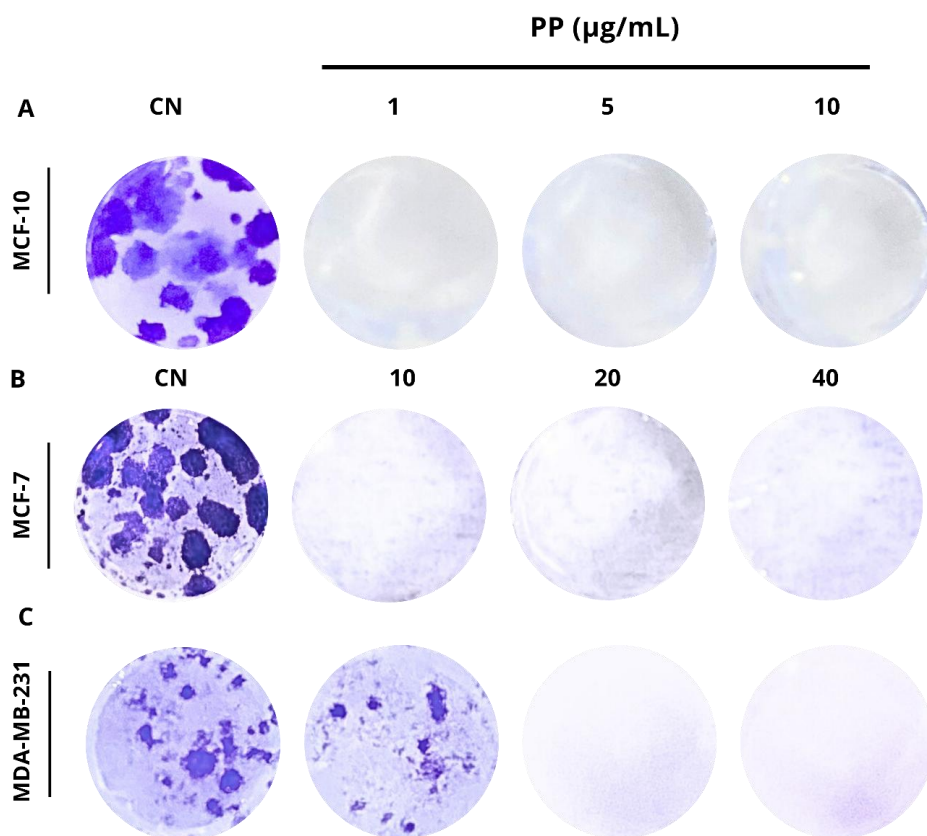


Figura 16. Ensaio de Formação de Colônias. Efeito do extrato do Pau-Pereira (PP) na formação de colônias das linhagens celulares MCF-10 (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C), utilizando tratamento por 48h e cultivo por 7 dias. As colônias foram coradas com cristal violeta, fotografadas e a densidade óptica foi lida em espectrofotômetro a 595 nm.

Na linhagem MCF-10, observou-se que, mesmo em 1 µg/mL, a fração sobrevivente de células caiu para zero, e o mesmo observado em 5 µg/mL e 10

$\mu\text{g/mL}$. Na linhagem MCF-7, a fração sobrevivente foi reduzida para zero em 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando efeito antiproliferativo nas concentrações testadas.

Para a linhagem MDA-MB-231, a fração sobrevivente de células foi reduzida para aproximadamente 10% nas células tratadas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ do extrato, chegando ao percentual de zero em 20 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17).

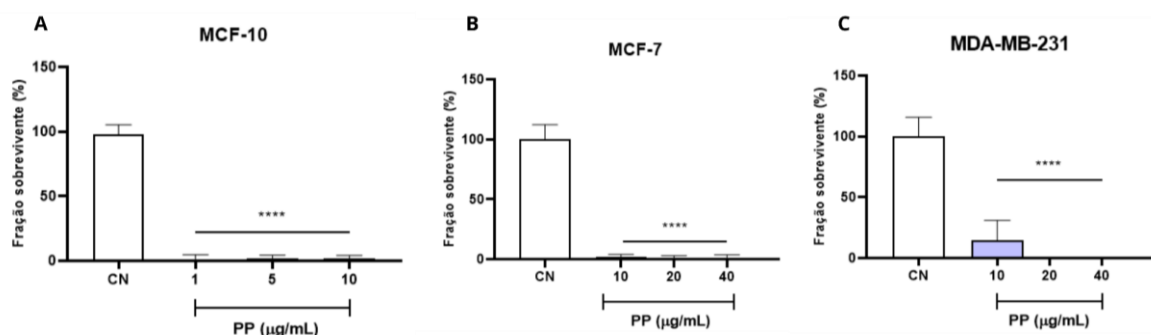


Figura 17. O extrato do PP inibe a formação de colônias e a fração sobrevivente das linhagens celulares MCF-10 (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C) de forma concentração/dependente. Os gráficos de barras representam a média $\pm$ desvio padrão da fração sobrevivente de, no mínimo, três experimentos independentes tratados por 48h de tratamento. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc*. As indicações de significância é: **** $p < 0,0001$ em comparação com o CN.

5.5. PP impede a migração de células tumorais

Após o tratamento com o extrato do PP observou-se diferenças no comportamento migratório das células MCF-7 (Figura 18 A). Inicialmente após 24h, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o CN, apresentando percentuais de fechamento da ranhura próximos a 48-50%, indicando que, nesse período inicial, o PP não exerceu efeito relevante sobre a migração celular.

Entretanto, após 48h, verificou-se uma inibição progressiva e concentração-dependente da migração celular.

No grupo CN, observou-se o fechamento completo da ranhura em 48h. Nos grupos tratados, a presença de uma faixa sem células (ranhura visível) foi notada, indicando redução na migração de células. Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, a ranhura foi completamente fechada, porém, a partir de 20 $\mu\text{g/mL}$, o fechamento não ocorreu, indicando uma migração celular mais lenta em comparação ao grupo CN.

Na concentração de 40 µg/mL, a ranhura permaneceu mais ampla, confirmando o efeito mais acentuado do PP na inibição do fechamento (Figura 18 B)

A

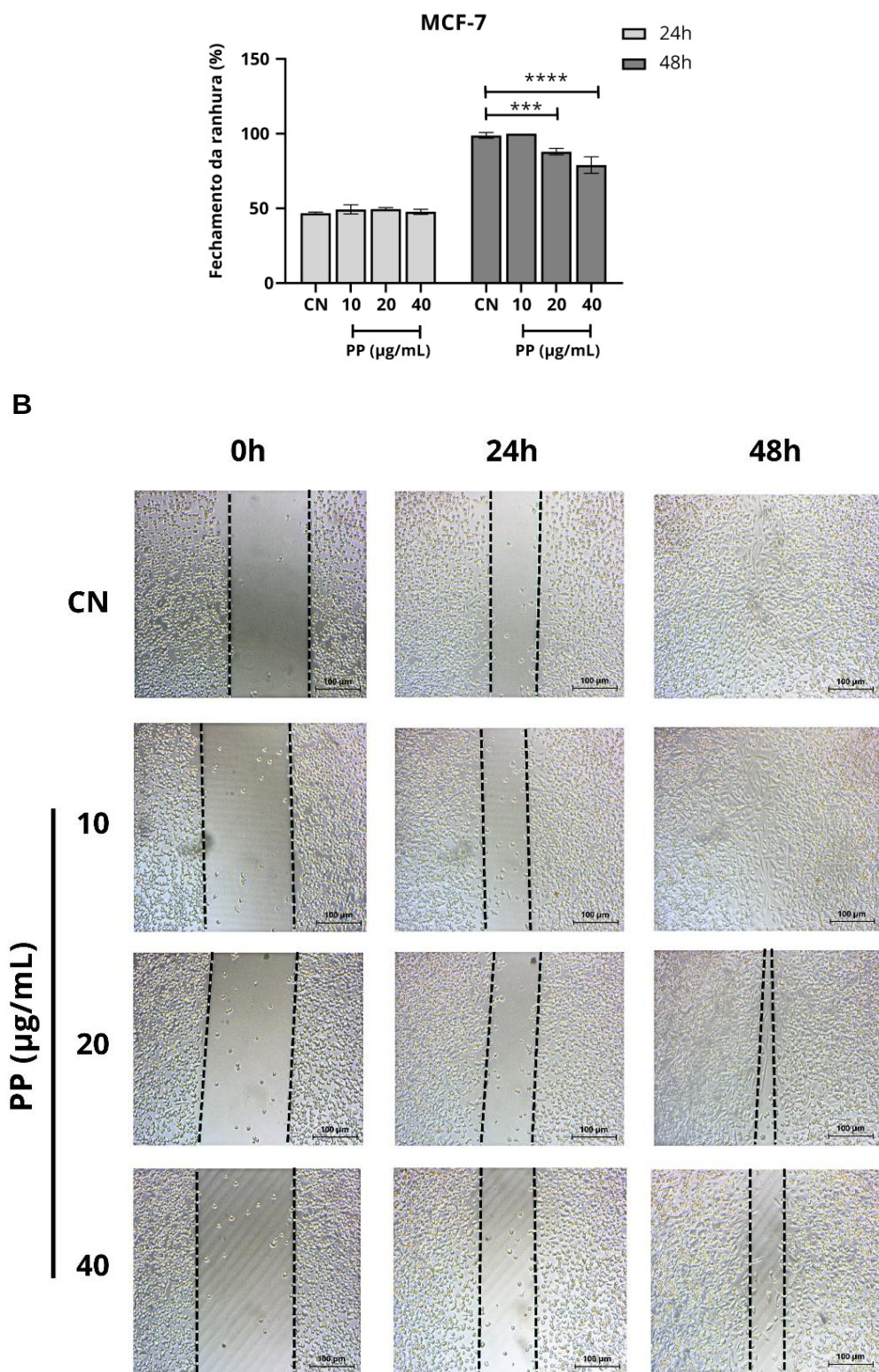


Figura 18. Ensaio de ranhura em linhagem MCF-7. A. Os resultados são expressos como a porcentagem média de crescimento do controle $\pm$ DP de dois experimentos independentes em triplicata. Valor significativo de. *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle (CN). B. Fotomicrografias do ensaio de ranhuras na linhagem celular MCF-7 tratada com concentrações PP

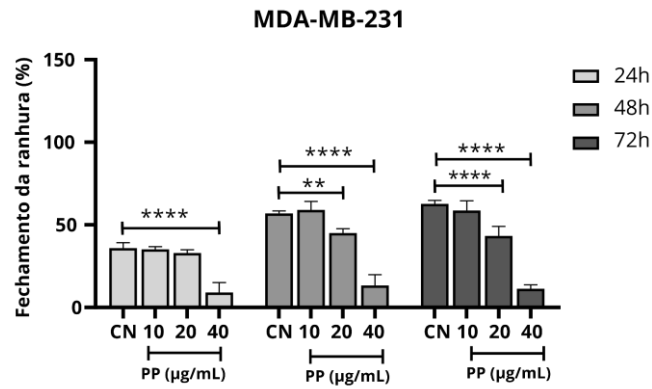
por 48h. Registros feitos com o aumento de 100x.

Para a linhagem celular MDA-MB-231, após 24h, as concentrações de PP avaliadas (10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o CN, entretanto, a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ apresentou redução significativamente maior do fechamento.

Em 48h, o extrato demonstrou efeito inibitório significativo nas concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$ reduziram o fechamento da ranhura para aproximadamente 40–45% e 10%, simultaneamente (Figura 19 A).

Após 72h, o CN apresentou a ranhura significativamente fechada, embora ainda perceptível. No grupo tratado com 10 $\mu\text{g/mL}$ de PP, a ranhura permaneceu similar a do CN. No grupo tratado com 40 $\mu\text{g/mL}$, a ranhura manteve-se praticamente no tamanho inicial (24h) (Figura 19 B).

A



B

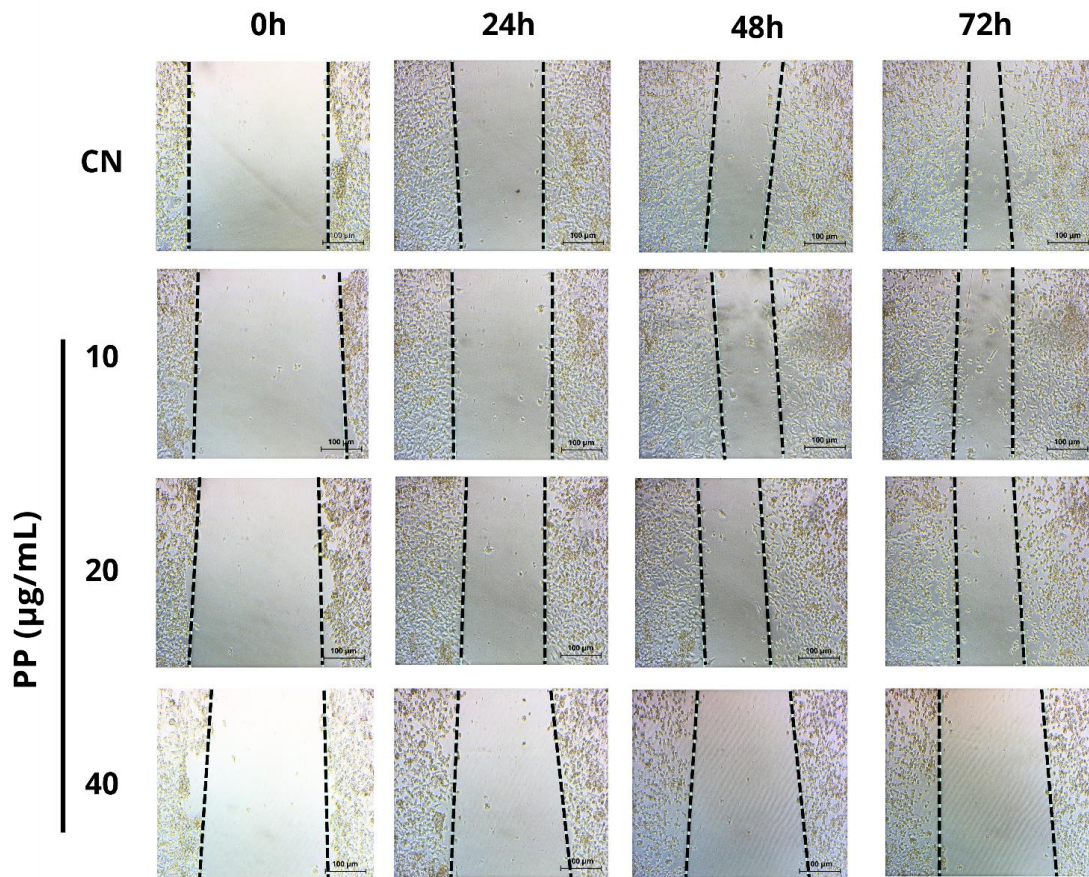


Figura 19. Ensaio de ranhura em linhagem MDA-MB-231. A. Os resultados são expressos como a porcentagem média de crescimento do controle $\pm$ DP de dois experimentos independentes em triplicata. Valor significativo de *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle (CN). B. Fotomicrografias do ensaio de ranhuras na linhagem celular MCF-7 tratada com concentrações PP por 48h. Registros feitos com aumento de 100x.

5.4. PP induz as células tumorais à apoptose

Na linhagem celular MCF-10, os resultados da microscopia de fluorescência (Figura 20 A) demonstraram que as células do CN apresentaram viabilidade, com predominância de núcleos celulares marcados na cor verde e apresentando cromatina bem distribuída. O tratamento com CDDP, induziu a morte celular, visível pela predominância de células vermelhas com cromatina nuclear condensada, onde a maioria das células se apresentavam em apoptose.

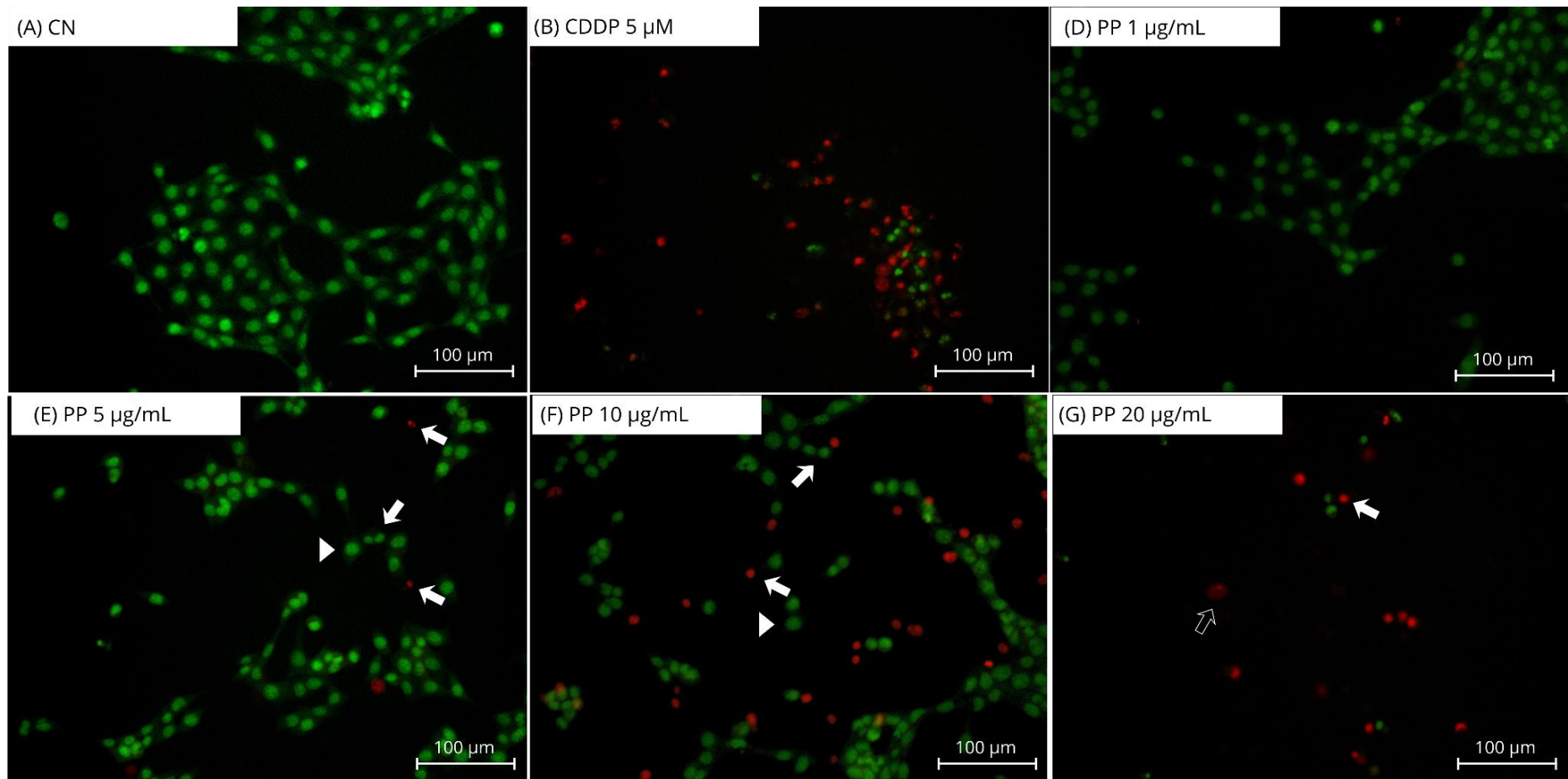
O tratamento com o extrato do PP revelou um efeito citotóxico dependente da concentração. Na concentração mais baixa (1 µg/mL), a viabilidade celular foi semelhante à do CN, indicando baixa toxicidade.

O aumento da concentração para 5 µg/mL demonstrou uma indução de morte celular por apoptose, marcada por células vermelhas com núcleo condensado e células verdes com núcleo condensado ou fragmentado. Nas concentrações mais elevadas, 10 µg/mL e 20 µg/mL, o efeito citotóxico foi acentuado. Na maior concentração avaliada, 20 µg/mL, a indução de morte celular foi bem observada, resultando em uma predominância de células vermelhas no campo, de forma comparável a CDDP, acompanhada de uma redução na densidade celular.

Esta observação visual foi quantificada e confirmada no gráfico de barras. Os resultados demonstram uma diminuição gradual e significativa na porcentagem de células viáveis (barras verdes) e um aumento correlato nas células apoptóticas (barras rosa) à medida que a concentração de PP foi elevada de 1 para 20 µg/mL (Figura 20 B).

MCF-10

A



B

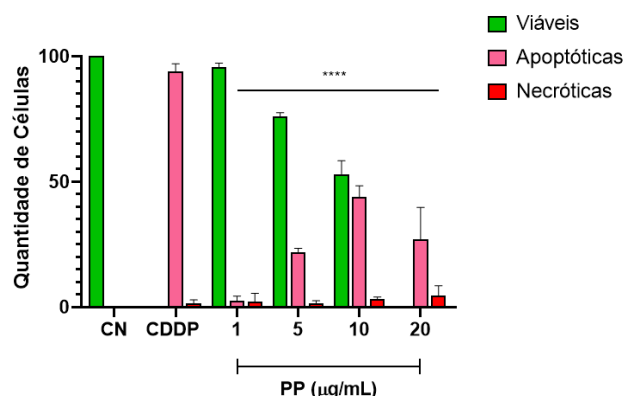


Figura 20. A. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência da linhagem celular MCF-7 tratada com diferentes concentrações de PP por 48h, coradas com Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio (AO/PI). Registros feitos com aumento de 200x. As setas brancas ($\Rightarrow$) indicam células com condensação nuclear (apoptose). As pontas de seta brancas ($\triangleright$) indicam células viáveis. A seta preta ($\rightarrow$) indica célula necrótica. B. Os resultados são expressos como a porcentagem média de células viáveis, apoptóticas e necróticas em relação ao controle $\pm$ DP de dois experimentos independentes em triplicata. Valor significativo de **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle (CN).

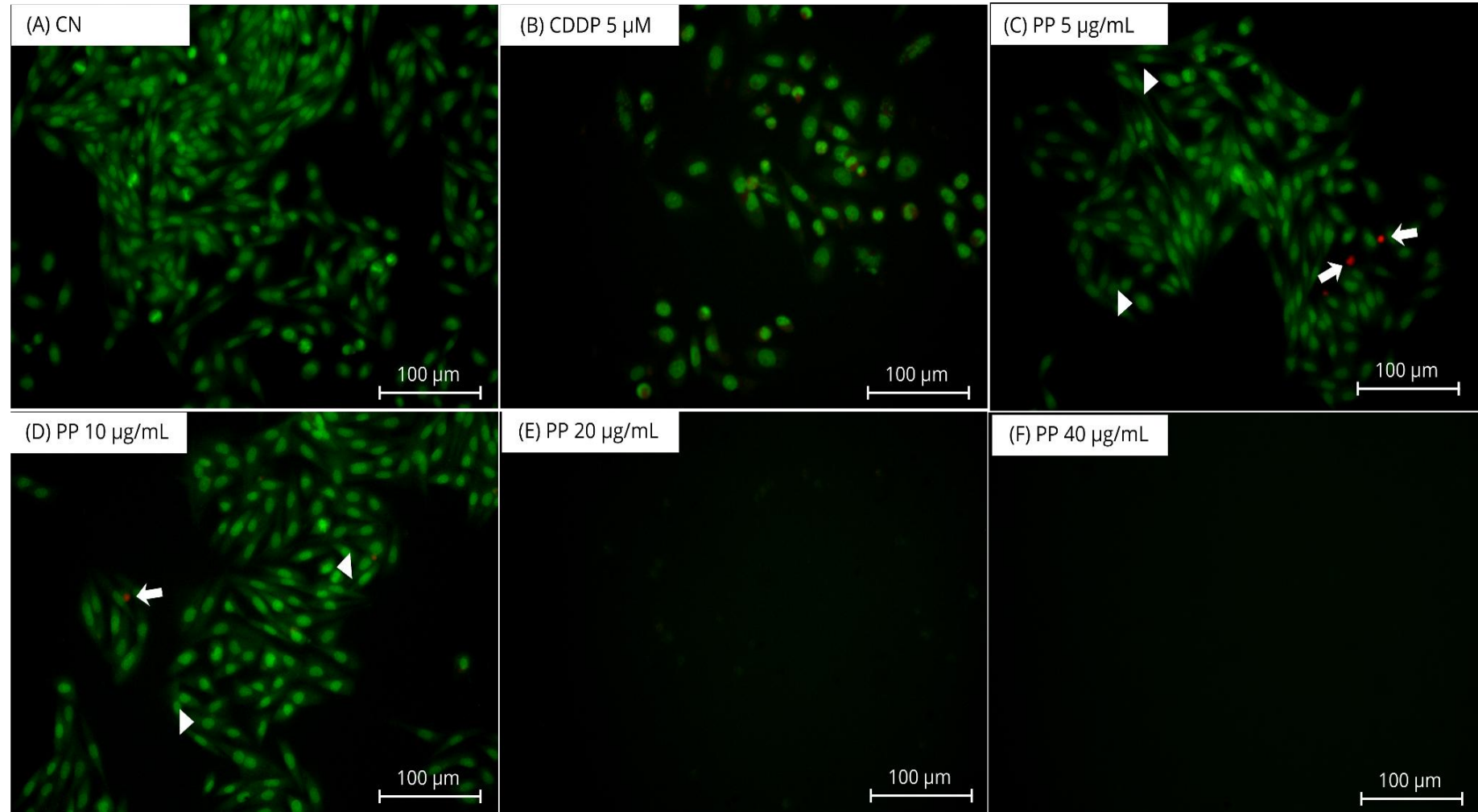
Na linhagem celular MCF-7 (Figura 21 A), as células do CN apresentaram alta viabilidade. Em contraste, o tratamento com CDDP resultou na presença de algumas células verdes com núcleo condensado, característico de apoptose, bem como de células que apresentavam o núcleo mais expandido.

O tratamento com o PP demonstrou um efeito citotóxico dependente da concentração. Na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular foi semelhante à do CN, indicando baixa toxicidade. Ao elevar a concentração para 10 $\mu\text{g/mL}$, observou-se início da indução de morte celular, com a presença de núcleos condensados, mas majoritariamente as células se apresentaram viáveis. Não foram observadas células viáveis, pois a marcação não permitiu evidenciá-las.

Essa observação qualitativa das imagens foi confirmada pelo gráfico de barras (Figura 21 B).

MCF-7

A



B

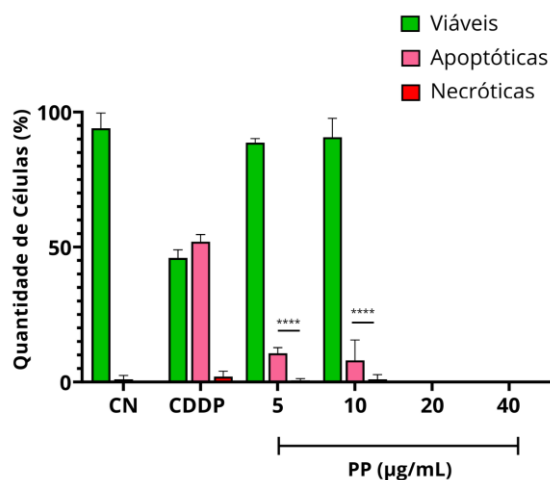


Figura 21. A. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência da linhagem celular MCF-7 tratada com diferentes concentrações de PP por 48h, coradas com Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio (AO/PI). Registros feitos com aumento de 200x. As setas brancas ($\Rightarrow$) indicam células com condensação nuclear (apoptose). As pontas de seta brancas ($\triangleright$) indicam células viáveis. A seta preta ($\blackrightarrow$) indica célula necrótica. B. Os resultados são expressos como a porcentagem média de células viáveis, apoptóticas e necróticas em relação ao controle $\pm$ DP de dois experimentos independentes em triplicata. Valor significativo de **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle (CN).

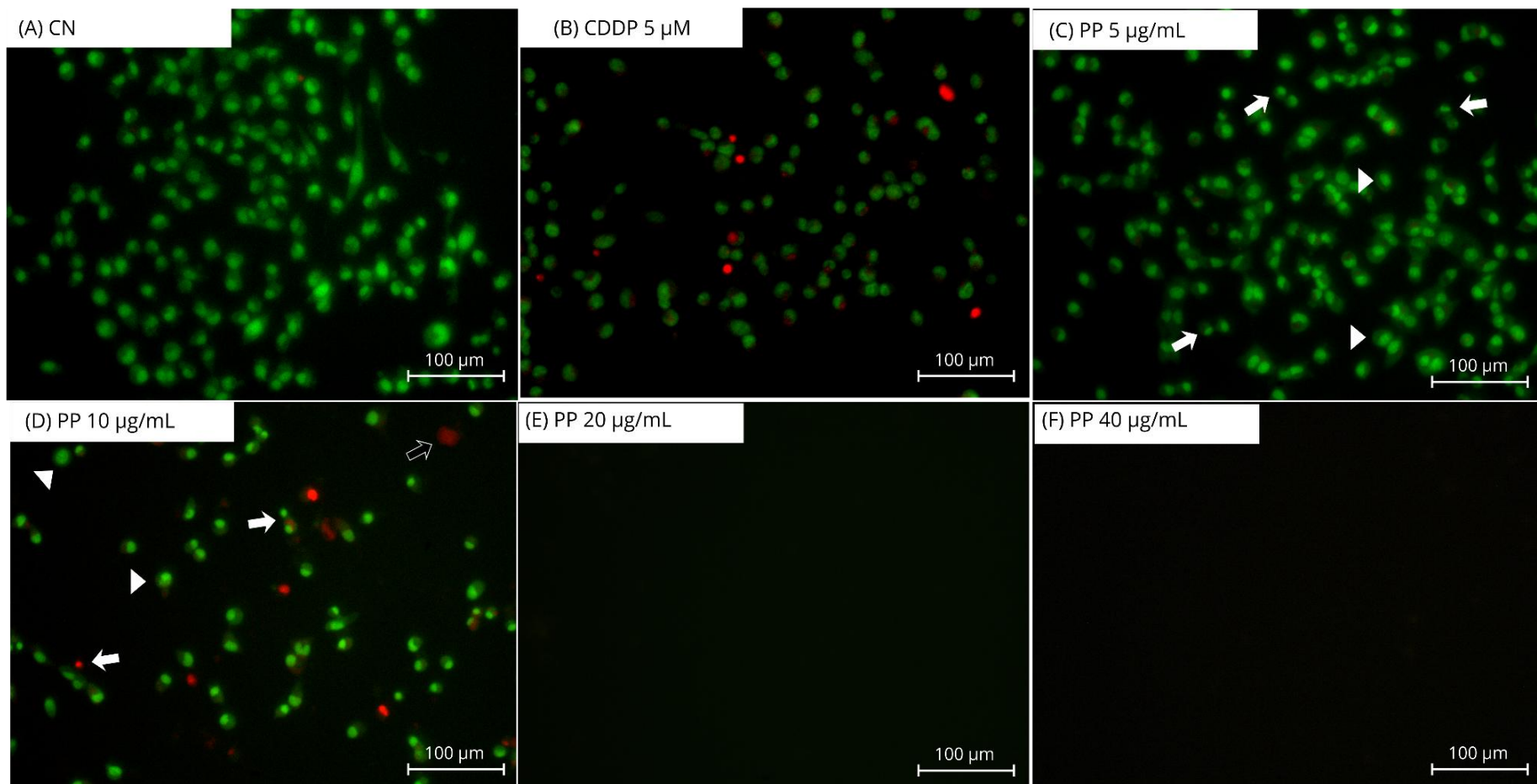
Na linhagem MDA-MB-231 os dados mostraram que no CN, a maioria das células apresentava morfologia normal, boa confluência e fluorescência verde uniforme, indicando viabilidade. O tratamento com CDDP 1,5 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade e aumentou a proporção de células vermelhas e núcleos condensados, indicando morte celular. Para PP em baixa concentração (5 $\mu\text{g/mL}$), as células permaneceram majoritariamente verdes, com alguns focos de células com núcleo condensado, indicando início da citotoxicidade e morte celular.

Para o PP em baixa concentração (10 $\mu\text{g/mL}$), as células permaneceram majoritariamente verdes com núcleo condensado, com alguns focos de células vermelhas dispersas, sugerindo aumento da apoptose e morte celular. Nas concentrações mais elevadas testadas, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$, toda a população celular foi eliminada, não sendo observadas células para marcação com os corantes (Figura

22 A). Esta observação visual foi quantificada e confirmada no gráfico de barras. Os resultados demonstram uma diminuição gradual e significativa na porcentagem de células viáveis (barras verdes) e um aumento correlato nas células mortas/apoptóticas (barras rosa) à medida que a concentração de PP foi elevada de 5 para 40 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22 B).

MDA-MB-231

A



B

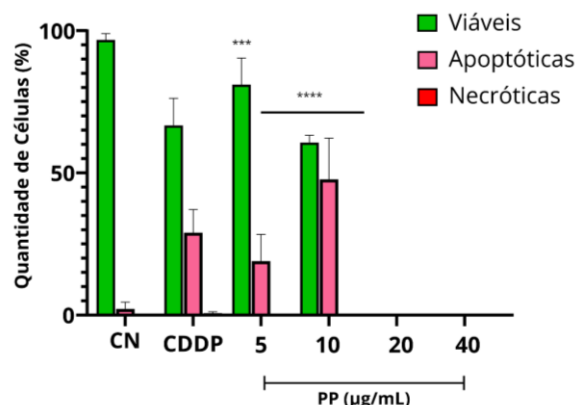


Figura 22. A. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência da linhagem celular MDA-MB-231 tratada com diferentes concentrações de PP por 48 h, coradas com Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio (AO/PI). Registros feitos com aumento de 200x. As setas brancas ($\Rightarrow$) indicam células com condensação nuclear (apoptose). As pontas de seta brancas ($\blacktriangleright$) indicam células viáveis. A seta preta ($\rightarrow$) indica célula necrótica. B. Os resultados são expressos como a porcentagem média de células viáveis, apoptóticas e necróticas em relação ao controle $\pm$ DP de dois experimentos independentes em triplicata. Valor significativo de **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle (CN).

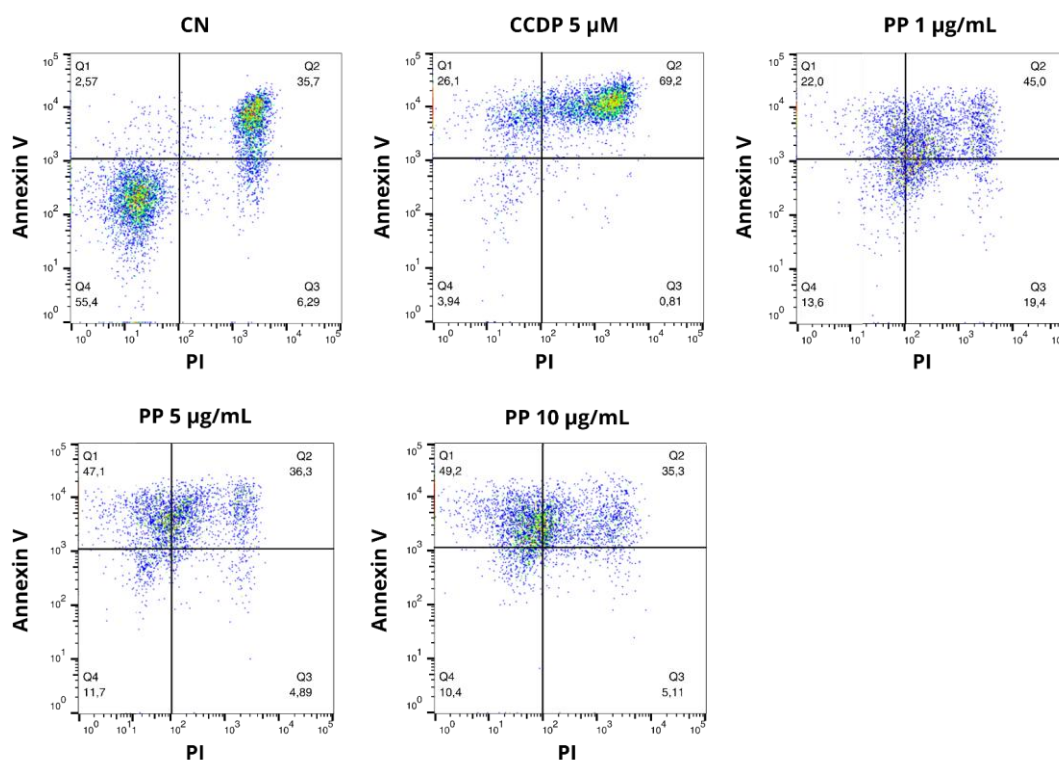
Na análise por citometria, a figura 23 A mostra que no grupo CN, a maior parte das células permaneceu viável, com 55,4%, apresentando proporções baixas de apoptose inicial (2,57%), apoptose tardia (35,7%) e necrose (6,29%). O tratamento com CDDP 1,5 µg/mL promoveu redução da viabilidade celular para 3,94%, com a morte celular total atingindo 96,11%, sendo a apoptose a via predominante de morte (26,1% em apoptose inicial e 69,2% em apoptose tardia), enquanto a necrose permaneceu baixa (0,81%).

O tratamento com PP 1 µg/mL reduziu a viabilidade celular para 45,0%, além de necrose em 19,4% da população. Já o tratamento com PP 5 µg/mL reduziu a viabilidade celular para 11,7%, acompanhada de um aumento da apoptose total (83,4%), distribuída em 47,1% de apoptose inicial e 36,3% de apoptose tardia, além de necrose em 4,89% da população.

O tratamento com PP 10 $\mu\text{g/mL}$ levou a uma queda ainda mais acentuada da viabilidade para 10,4%, simultaneamente um aumento da apoptose total para 84,5% (49,2% em apoptose inicial e 35,3% em apoptose tardia), com necrose representando 5,11%. Esses resultados foram quantificados e confirmados no gráfico de barras (Figura 23 B).

MCF-10

A



B

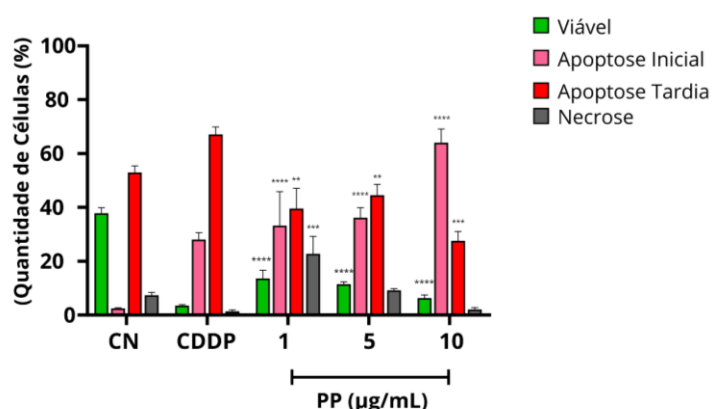


Figura 23. A. Dot plot das células MCF-10 tratadas com PP, ao final do tratamento (48h), foram coradas com Anexina V. B. O gráfico representa a frequência das células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após o tratamento com o extrato PP. Os níveis de significância estatística são indicados por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. O efeito do tratamento foi

comparado, respectivamente, ao efeito no controle negativo. O grupo tratado com CDDP foi utilizado apenas como controle positivo, não sendo considerado nas comparações estatísticas.

Na figura 24 A resultado da análise na linhagem MCF-7, observou-se que no grupo CN, a maioria das células permaneceu viável (83,0%), com baixas proporções de apoptose inicial (1,61%), apoptose tardia (1,03%) e necrose (15,3%). O tratamento com CDDP 1,5 µg/mL induziu uma redução significativa na viabilidade celular (29,3%), com apoptose sendo a via dominante (62,88%), enquanto a necrose primária permaneceu em níveis residuais (7,73%).

De forma semelhante, o tratamento com PP 20 µg/mL reduziu a viabilidade celular para 18,4%, com um aumento da apoptose (74,7% do total, sendo 64,4% em apoptose inicial e 10,3% em apoptose tardia), além de necrose em apenas 5,89% da população.

Na concentração mais elevada, PP 40 µg/mL, a viabilidade foi reduzida para 4,1%, enquanto a apoptose atingiu 91,8%, distribuída em 74,8% de apoptose inicial e 17% de apoptose tardia, com necrose em torno de 4,08%. Esses resultados foram quantificados e confirmados no gráfico de barras (Figura 24 B).

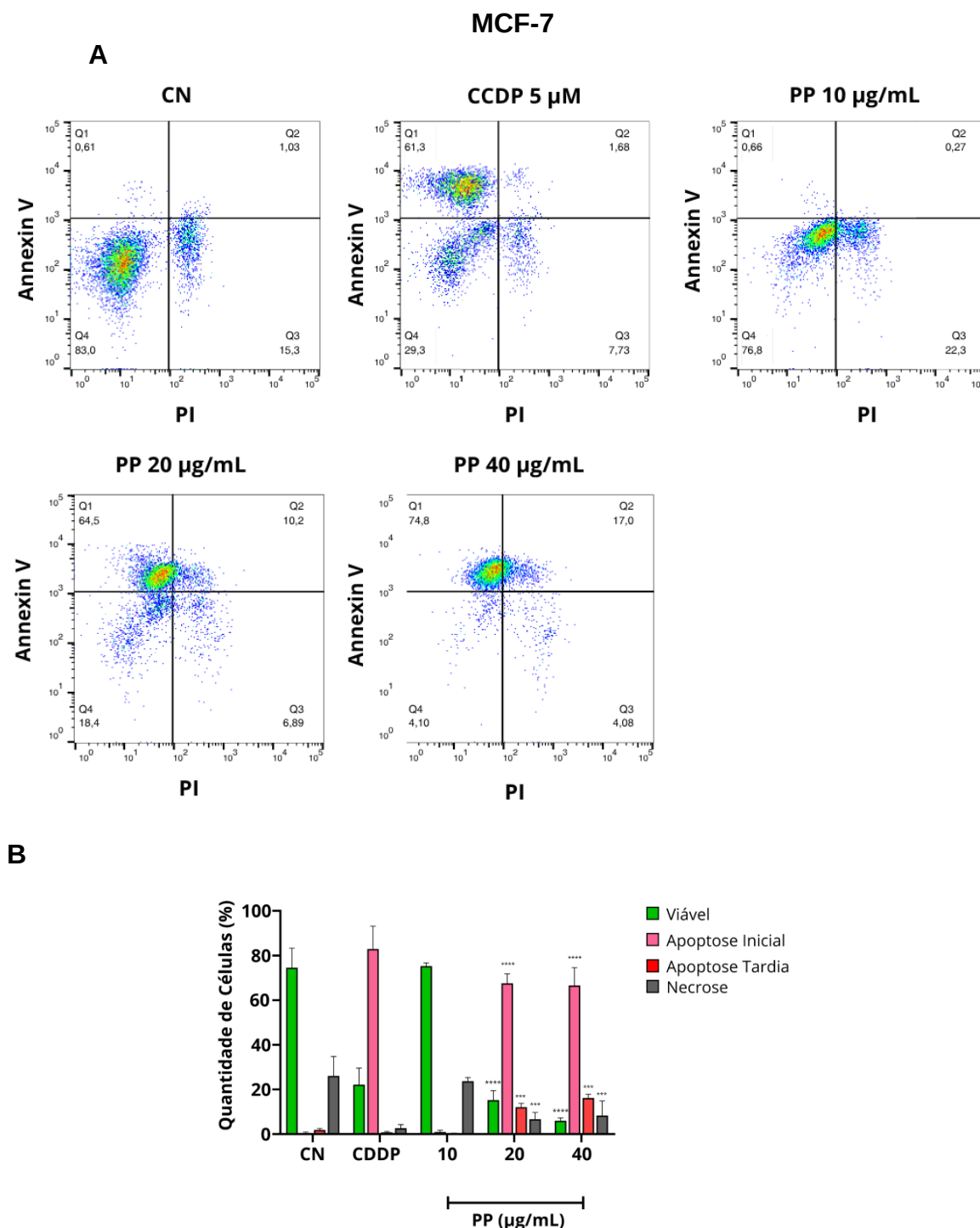


Figura 24. A. Dot plot das células MCF-7 tratadas com PP, ao final do tratamento (48h), foram coradas com Anexina V. B. O gráfico representa a frequência das células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após o tratamento com o extrato PP. Os níveis de significância estatística são indicados por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. O efeito do tratamento foi comparado, respectivamente, ao efeito no controle negativo. O grupo tratado com CDDP foi utilizado

apenas como controle positivo, não sendo considerado nas comparações estatísticas.

A figura 25 A mostra que no grupo CN, a maior parte das células permaneceu viável 68,5%, com proporções baixas de apoptose inicial 12,3%, apoptose tardia 17,2% e necrose 2,05%. O tratamento com CDDP 1,5 µg/mL reduziu a viabilidade celular para 57,1%, com apoptose representando a via predominante de morte (19,9% em apoptose inicial e 21,2% em apoptose tardia), enquanto a necrose se manteve em níveis baixos (1,75%).

Já o tratamento com PP 20 µg/mL reduziu a viabilidade celular para 28,7%, simultaneamente um aumento expressivo da apoptose (68,3% do total, sendo 54,4% em apoptose inicial e 13,9% em apoptose tardia), além de necrose em 3,07% da população. Na concentração mais elevada, PP 40 µg/mL, a viabilidade celular foi praticamente eliminada (2,54%), com apoptose atingindo valores máximos (93,74%), distribuída em 92,8% de apoptose inicial e 0,94% de apoptose tardia, enquanto a necrose permaneceu em 3,67%.

Na MDA-MB-231, o tratamento com PP também apresentou efeito concentração-dependente, com indução significativa de apoptose, especialmente na forma inicial, e em concentrações elevadas supera a eficácia da cisplatina em promover morte celular programada. Esses resultados foram quantificados e confirmados no gráfico de barras (Figura 25 B).

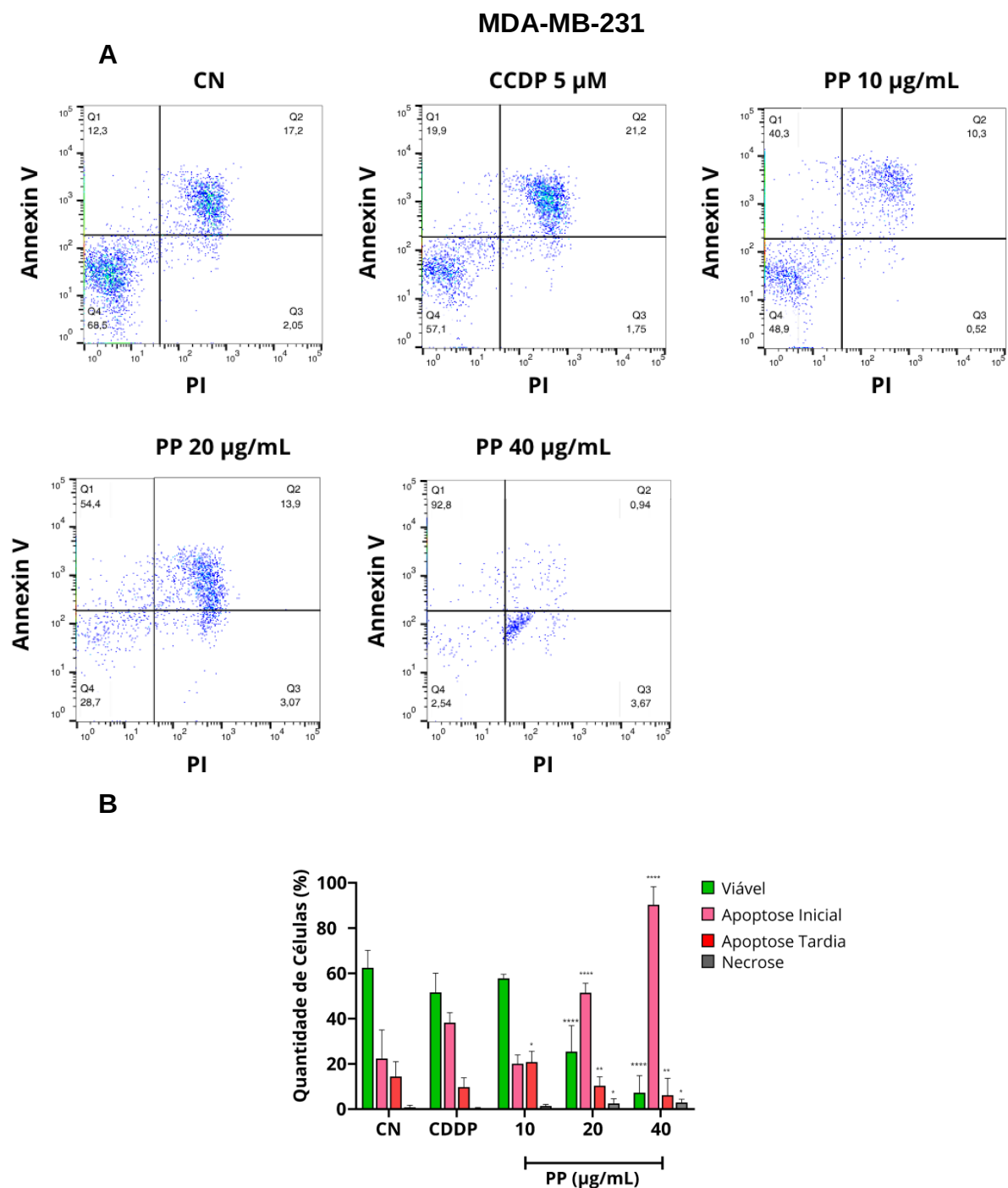


Figura 25. A. Dot plot das células MDA-MB-231 tratadas com PP, ao final do tratamento (48h), foram coradas com Anexina V. B. O gráfico representa a frequência das células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após o tratamento com o extrato PP. Os níveis de significância estatística são indicados por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. O efeito do tratamento foi comparado, respectivamente, ao efeito no controle negativo. O grupo tratado com CDDP foi utilizado apenas como controle positivo, não sendo considerado nas comparações

estatísticas.

5.6. PP induz a parada do ciclo celular

O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo, considerando as fases G1, S e G2, nas linhagens celulares MCF-10, MCF-7 e MDA-MB-231.

Na linhagem não tumoral MCF-10 (Figura 26 A), observou-se que o tratamento com PP promoveu um aumento gradual e concentração-dependente da população de células na fase G1. Esse efeito foi especialmente evidente nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL, que apresentaram valores superiores ao CN e ao CP. A elevação da fração celular em G1 foi acompanhada por uma leve redução da população na fase S.

Na linhagem MCF-7 (Figura 26 B), observou-se que o tratamento com PP promoveu um acúmulo de células na fase G1, de forma concentração-dependente.

Nas concentrações mais elevadas (20 µg/mL e 40 µg/mL), a população celular em G1 atingiu valores próximos de 100%, com praticamente redução completa das fases S e G2, evidenciando forte efeito citostático

O tratamento com CDDP 1,5 µg/mL induziu acúmulo em G1, embora em menor intensidade quando comparado às concentrações mais altas de PP.

Já na linhagem MDA-MB-231 (Figura 26 C), o tratamento com PP não promoveu alterações na distribuição das fases do ciclo celular. Houve apenas um discreto aumento na população em G1, enquanto as fases S e G2 permaneceram semelhantes ao grupo CN e ao CP na concentração de 40 µg/mL.

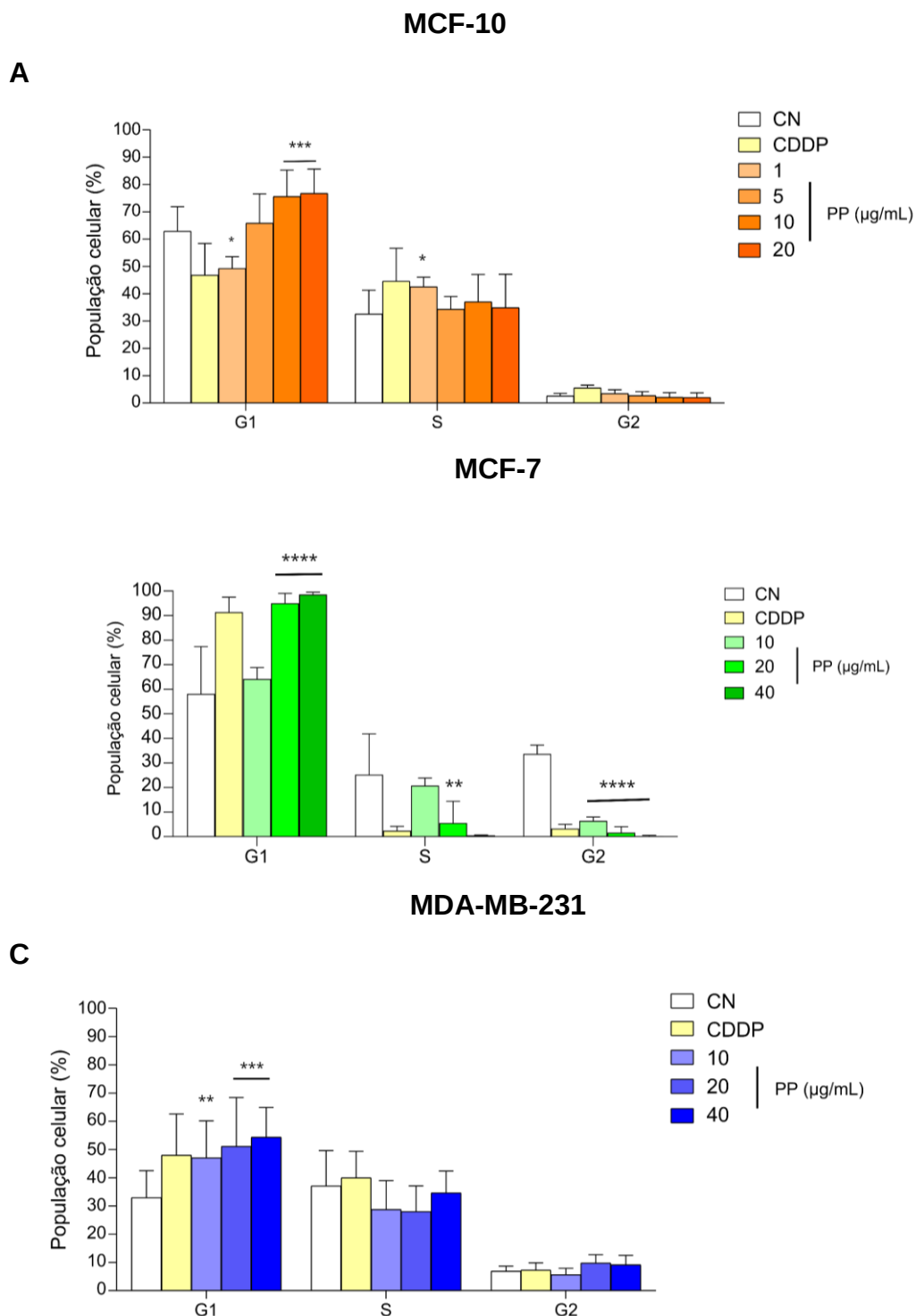


Figura 26. Distribuição percentual da população celular das linhagens MCF-10 e MCF-7, MDA-MB-231 nas fases do ciclo celular (G1, S e G2) após tratamento com diferentes concentrações do composto PP (1, 5, 10, 20 e 40 µg/mL) por 48h. Os dados representam a média $\pm$ Desvio Padrão (DP) de 2 experimentos independentes em quadruplicatas. A significância estatística foi determinada por Análise de Variância de Uma Via (One-way ANOVA), seguida pelo Teste post-hoc de Tukey. O

nível de significância é representado por: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao Controle Negativo (CN).

6. DISCUSSÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum e a principal causa de morte por câncer entre mulheres no Brasil e no mundo (American Cancer Society, 2024), demandando pesquisas para buscas de novas terapias. Neste contexto, o extrato alcoólico da casca de *G. vellosii*, rico em alcalóides indólicos, já demonstrou atividade antineoplásica em diferentes tipos de câncer (Bemis et al., 2009; Dong; Chen; Chen, 2018; Yu; Drisko; Chen, 2013; Sousa Neto, 2023) indicando potencial para o câncer de mama.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o extrato de *G. vellosii* apresenta atividade citotóxica significativa *in vitro* nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-10, MCF-7 e MDA-MB-231, de maneira concentração e tempo-dependente, sugerindo que o dano celular não é apenas agudo, mas se acumula ao longo do tempo, compatível com mecanismos como estresse oxidativo, comprometimento mitocondrial e ativação de morte celular (Yen et al., 2015; Marques et al., 2023; Trachta; Dickinson; Forman, 2012; Green; Reed, 1998; Mosmann, 1983). Diante disso, a determinação da concentração inibitória média (IC_{50}) mostrou-se necessária para quantificar a citotoxicidade do extrato e permitir a comparação da sensibilidade entre as diferentes linhagens celulares e delineamento dos ensaios seguintes.

Na linhagem não tumoral MCF-10, o extrato exibiu os menores valores de IC_{50} (2,74 μ M em 48h) em nossa pesquisa, indicando que tem baixa seletividade para MCF-7 e MDA-MB-231. Apesar de serem consideradas não tumorais, a MCF-10 é uma linhagem imortalizada, o que lhe confere propriedades proliferativas. Essa particularidade faz com que, em certos contextos, sua taxa de crescimento e plasticidade biológica se aproximem ou até superem as registradas em algumas células cancerígenas (Neve, et al., 2006), essa condição pode justificar o menor IC_{50} encontrado. Além disso, considera-se que células tumorais possuem melhores mecanismos de sobrevivência e resistência, como reprogramação metabólica, ativação de vias de sinalização pró-sobrevivência (PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B, MAPK/ERK, JAK/STAT e Nrf2), resistência ao estresse citotóxico e manutenção da atividade mitocondrial residual, que poderiam reduzir a citotoxicidade determinada

pelo ensaio de MTT (Berridge; Tan, 1993; Gottesman et al., 2002; Hanahan; Weinberg, 2011; van Meerloo et al., 2011; Riss et al., 2016).

O fato dos valores de IC₅₀ terem se mostrado semelhantes entre a linhagem MCF-7, que é sensível a hormônios, e a MDA-MB-231, um subtipo triplo-negativo altamente agressivo e desprovido de receptores hormonais, sugere que o PP atua por mecanismos que não dependem exclusivamente da via hormonal para exercer seu efeito citotóxico. Essa observação corrobora estudos anteriores que demonstraram que alcaloides isolados do PP, como a flavopereirina, exercem efeitos antiproliferativos e indutores de apoptose em ambas as linhagens de forma comparável (Yeh, 2019). O mecanismo comum identificado reside na capacidade do extrato de modular vias de sinalização de sobrevivência e proliferação conservadas, como a cascata AKT/p38 MAPK/ERK1/2, independentemente do status de receptores hormonais (Yeh, 2019).

Apesar desses achados isso não exclui completamente uma possível interação com vias hormonais na MCF-7, mas indica que o PP de certa forma é capaz de modular processos celulares essenciais mesmo em linhagens que não respondem a hormônios, reforçando seu potencial terapêutico em contextos onde as opções atuais são mais limitadas.

O maior efeito citotóxico do extrato em células não tumorais, embora limite sua seletividade, é semelhante ao perfil de muitos quimioterápicos, que também afetam células saudáveis por atuarem em processos celulares fundamentais (Devita, Lawrence e Rosenberg, 2019). O nosso extrato é um candidato para investigações adicionais, principalmente pensando na identificação de compostos bioativos mais seletivos, otimização de doses e desenvolvimento de estratégias que minimizem efeitos adversos.

A redução da viabilidade celular foi acompanhada por alterações morfológicas em todas as linhagens celulares. Entre as alterações morfológicas observadas destacaram-se a retração da membrana plasmática, a formação de vacúolos citoplasmáticos e a condensação nuclear, características classicamente associadas à apoptose (Wyllie, Kerr e Currie, 1980; Elmore, 2007). Observou-se também redução significativa da área e do perímetro celulares, sugerindo perda de integridade estrutural, reforçando a ação citotóxica do extrato sobre as células tratadas, indicando que as células não apenas sofrem dano, mas ativam vias reguladas de morte (Wyllie, Kerr e Currie, 1980; Elmore, 2007).

Diante desses achados iniciais, foram conduzidos ensaios subsequentes para investigar os efeitos do extrato sobre a capacidade migratória e proliferativa, bem como para confirmar e caracterizar os mecanismos de morte celular e alterações no ciclo celular.

No que diz respeito ao ensaio clonogênico o mesmo mostrou que, nas concentrações testadas a partir de 1 µg/mL para MCF-10, 10 µg/mL para MCF-7 e 20 µg/mL para MDA-MB-231, o extrato teve efeito antiproliferativo. O ensaio clonogênico é capaz de avaliar se as células mantêm sua capacidade de se reproduzir indefinidamente, indicando crescimento ou remissão do tumor (Rafehi, 2011; Matsui, 2019). Alcalóide indólicos de diferentes espécies foram associados a atividade anticlonogênica (VIWATPINYO, JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, 2023; ALGHAMDI, 2024), sugerindo que os compostos do extrato atuam nas vias associadas a proliferação celular. Esse efeito é especialmente significativo no contexto terapêutico, uma vez que a recidiva no câncer de mama está intimamente associada a mecanismos de resistência que asseguram a sobrevivência celular após o tratamento inicial. Ao comprometer a sobrevivência e a capacidade clonogênica das linhagens testadas, o PP atua sobre a população de células que, em um cenário terapêutico, seriam responsáveis pela manutenção da doença e posterior progressão clínica (Clemons; Cole; Pritchard, 2001).

Outro resultado importante do nosso estudo diz respeito à inibição da migração celular. Os resultados obtidos demonstraram que, na linhagem MDA-MB-231, foi possível observar redução na migração após 24h de ensaio, quando comparado ao controle. Por outro lado, na linhagem MCF-7 esse mesmo efeito foi evidente apenas após 48h, indicando diferenças no comportamento migratório e na resposta ao tratamento entre as linhagens avaliadas. A habilidade de migrar é um indicador da agressividade tumoral, especialmente em células triplo-negativas como a MDA-MB-231, que exibem um fenótipo altamente invasivo (Xiong; Wu; Yu, 2024). Os dados sugerem um importante efeito, pois mecanismos de migração celular estão associados a características de metástase (Friedl; Wolf, 2003; Hanahan; Weinberg, 2011).

Com relação aos mecanismos de morte celular, os ensaios de apoptose e necrose, realizados por meio de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (Annexina V/PI), confirmaram a suspeita levantada a partir da análise morfológica, mostrando que o PP induz a morte celular principalmente por apoptose.

Observou-se um predomínio significativo de eventos apoptóticos dependente da concentração. Na linhagem celular MCF-10 a maior concentração resultou em 84,5% de apoptose. Na MCF-7, o tratamento com 40 µg/mL aumentou a taxa de apoptose para 91,8%. Enquanto na linhagem MDA-MB-231, o mesmo tratamento levou a uma taxa de apoptose de 93,74%. Esses achados corroboram o papel do PP como um possível agente que ativa mecanismos apoptóticos, contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese e elucidar de forma mais precisa as vias moleculares envolvidas.

Ao comparar as técnicas de avaliação de apoptose por microscopia e por citometria de fluxo, foram observadas diferenças nos resultados obtidos. Essas diferenças estão relacionadas, principalmente, às características e limitações próprias de cada técnica. Na análise por microscopia, nas maiores concentrações do tratamento, observou-se a ausência de células marcadas, inclusive na concentração correspondente ao IC₅₀.

Esse achado pode ser explicado pelo uso de uma menor densidade celular inicial, adotada com o objetivo de facilitar a visualização da morfologia e da disposição das células no poço. Em contrapartida, a citometria de fluxo utiliza um número significativamente maior de células, permitindo a detecção e quantificação de populações celulares remanescentes, o que contribui para diferenças na sensibilidade e no perfil dos resultados entre as duas abordagens.

A análise do ciclo celular mostrou que o PP interfere na progressão do ciclo celular, causando o acúmulo de células na fase G1 na linhagem MCF-7, bem como um aumento significativo dessa população à medida que se aumenta as concentrações de tratamento nas linhagens MCF-10 e MDA-MB-231. Esse resultado principalmente na linhagem MCF-7 indica que o PP conseguiu induzir um bloqueio na fase inicial do ciclo celular, o que diminui a entrada na síntese de DNA (fase S) e afeta a replicação celular.

As concentrações mais elevadas do PP causam danos celulares graves que as células não conseguem reparar, levando-as à morte. Isso obriga a célula a deixar de proliferar e morrer (Yeh *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

Os resultados do ensaio de MTT nos levaram a hipótese de comprometimento da função mitocondrial pelo extrato, uma vez que esse método avalia a viabilidade celular com base na atividade de desidrogenases mitocondriais, refletindo diretamente o metabolismo energético celular (Mosmann, 1983). A redução da

viabilidade observada sugere diminuição da atividade mitocondrial, o que está de acordo com evidências de que compostos que afetam a mitocôndria levam à queda na produção de ATP, desequilíbrio redox e ativação de checkpoints do ciclo celular (Wallace, 2012), culminando no bloqueio em G1 e induzindo a apoptose (Weinberg, 2014), o que se observou nesta pesquisa.

Os efeitos observados neste estudo podem estar relacionados à presença de alcalóides indólicos já descritos em *G. vellosii*, como geissospermina, vellosimina e flavopereirina, compostos reconhecidos por sua atividade biológica, incluindo propriedades citotóxicas, antiproliferativas e moduladoras de vias celulares relacionadas à sobrevivência tumoral (Marques, Zanchi, Evaristo, 2023).

Além disso, estudos relatam que alcaloides do gênero *Geissospermum* são capazes de interferir na função mitocondrial, promover alterações no ciclo celular e induzir apoptose, mecanismos compatíveis com a redução da viabilidade celular observada nos ensaios de MTT e com o bloqueio em G1 identificado neste estudo (Mors et al., 2000; Rodrigues et al., 2016). Esses dados sugerem que os compostos bioativos presentes no extrato bruto possam atuar de forma sinérgica, potencializando seus efeitos citotóxicos e antiproliferativos.

Portanto, os resultados obtidos são coerentes com o perfil farmacológico previamente descrito para os metabólitos secundários de *G. vellosii*, reforçando o potencial dessa espécie como fonte promissora de compostos bioativos com aplicação antitumoral.

Destaca-se o caráter inovador do presente estudo, uma vez que não foram encontrados, na literatura científica, trabalhos que investiguem os efeitos do extrato bruto da casca do *G. vellosii* em linhagens celulares de câncer de mama humana aqui estudadas.

Apesar dos resultados promissores observados, faz-se necessária a realização de estudos adicionais, especialmente voltados à identificação dos compostos bioativos responsáveis pelos efeitos observados e à elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos. Nesse sentido, pretende-se dar continuidade a esta linha de pesquisa no âmbito do doutorado, aprofundando a caracterização fitoquímica, a avaliação dos alvos moleculares e o potencial terapêutico dos compostos isolados do extrato.

A ampliação desses estudos poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas ou complementares no tratamento do câncer de

mama, considerando a busca por agentes com maior eficácia e menor toxicidade em relação às terapias convencionais atualmente disponíveis.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta dados relevantes do potencial antitumoral do extrato da casca de *G. vellosii* em linhagens celulares de mama humano. Nos ensaios de triagem o tratamento com extrato apresentou citotoxicidade, alterações morfológicas sugestivas de morte celular, associadas ao efeito antiproliferativo e antimigratório. Esses achados indicam o potencial do tratamento com extrato nas principais características associadas à carcinogênese.

Considerando que esses efeitos estão associados a vias biológicas de sobrevivência celular, foi investigado se o extrato teria efeito na indução de morte. Os dados mostraram que o extrato apresentou efeito pró-apoptótico mediado pelo mecanismo de parada do ciclo celular.

Assim, este estudo contribui significativamente para o conhecimento científico sobre as propriedades antineoplásicas de *G. vellosii* e abre novas perspectivas para sua exploração no combate ao câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOD, R. G. et al. Anti-breast cancer potential of new indole derivatives: Synthesis, in-silico study, and cytotoxicity evaluation on MCF-7 cells. **Journal of Molecular Structure**, v. 1326, p. 141176, 2025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022286024036810?via%3Dihub>. Acesso em: 29 dez. 2025.

AMADOR, T. A. et al. Antinociceptive profile of *Geissospermum vellosii* and its major alkaloid, geissospermine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2001.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Global Cancer Burden. Atlanta: American Cancer Society, 2024. Disponível em: <https://www.cancer.org/about-us/our-global-health-work/global-cancer-burden.html>. Acesso em: 30 dez. 2025.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Radiation therapy for breast cancer. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/radiation.html> . Acesso em: 21 abr. 2025.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). MCF-7. ATCC; 2025. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/htb-22>. Acesso em: 21 out. 2025.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). MCF- 10 A (CRL- 10317). ATCC; 2025. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/CRL-10317>. Acesso em: 21 out. 2025

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). *MDA - MB-231 (HTB- 26)*. ATCC; 2025. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/htb-26>. Acesso em: 01 out. 2025.

ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. P. dos; PINTO, A. C. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 942–952, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600026>. Acesso em: 19 abr. 2025.

ALMEIDA, V. M.; BEZERRA JR., M. A.; NASCIMENTO, J. C.; AMORIM, L. M. F. Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura in vitro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 6, p. 606–619, 2019. DOI: 10.5935/1676- 2444.20190054. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/JQXQPtwT8ZWLGcfhvVPqVVK/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 22 mar. 2025.

ALGHAMDI, Ali Hendi et al. In-vitro cytotoxicity investigations for phytoconstituents of saudi medicinal plants with putative ocular effects. **Integrative Cancer Therapies**, v. 23, p. 15347354241256649, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38819027/> . Acesso em: 04 jan. 2026.

AYSOLA, K.; DESAI, A.; WELCH, C.; XU, J.; QIN, Y.; REDDY, V.; MATTHEWS, R.; OWENS, C.; OKOLI, J.; BEECH, D. J.; PIYATHILAKE, C. J.; REDDY, S. P.; RAO, V. N. Triple Negative Breast Cancer - An Overview. **Hereditary Genetics**, 2013, v. 2013, n. S2, p. 1-6, 2013. DOI: 10.4172/2161-1041.S2-001. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/triple-negative-breast-cancer--an-overview-2161-1041.S2-001.pdf>. Acesso em: 21 set. 2025.

ATCC. MCF-10A Cell Line Description. American Type Culture Collection, 2023.

AZEVEDO E SILVA, G. A.; GAMARRA, C. J.; GIRIANELLI, V. R.; VALENTE, J. G. Cancer mortality trends in Brazilian state capitals and other municipalities between 1980 and 2006. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, p. 1009-1018, 2011, DOI: 10.1590/s0034-89102011005000076. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-89102011005000076>. Acesso em: 06 out. 2025.

BARBOSA, C. V. O.; SIMÕES, A. O. Geissospermum in Flora e Funga do Brasil. **Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB4605> . Acesso em: 03 dez. 2025.

BARBOSA, C. V. O. et al. A taxonomic revision of Geissospermum (Apocynaceae, rauvolfioid). **Phytotaxa**, Auckland, v. 420, n. 2, p. 157-178, 2019. DOI: 10.11646/phytotaxa.420.2.3. Disponível em: <https://phytotaxa.mapress.com/pt/article/view/phytotaxa.420.2.3> . Acesso em: 03 dez. 2025.

BEMIS, D. L.; CAPODICE, J. L.; DESAI, M.; KATZ, A. E.; BUTTYAN, R. β -carboline alkaloid-enriched extract from the Amazonian rain forest tree *Pao Pereira* suppresses prostate cancer cells. **Journal of the Society for Integrative Oncology**, v. 7, n. 2, p. 59–65, 2009, PMID: 19476740; PMCID: PMC6358020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19476740/>. Acesso em: 10 out. 2025.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–482, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8390225/> . Acesso em: 1 jan. 2026.

BIANCHINI, G.; BALKO, J.; MAYER, I. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, p. 674–690, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2016.66> . Acesso em: 03 out. 2025.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30207593/>. Acesso em: 10 out. 2025.

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229- 263, May/June 2024. DOI: 10.3322/caac.21834. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21834>. Acesso em: 04 ago. 2025.

BRICEÑO-BALCÁZAR, I., GÓMEZ-GUTIÉRREZ, A., DÍAZ-DUSSÁN, N. A., NOGUERA-SANTAMARÍA, M. C., DÍAZ-RINCÓN, D., & CASAS-GÓMEZ, M. C. (2017). Mutational spectrum in breast cancer associated BRCA1 and BRCA2 genes

in Colombia. **Colombia Médica**, 48(2), 58-63. Disponível em: <https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/download/1867/6900/15975> . Acesso em: 04 ago. 2025.

CAILLEAU, R.; OLIVE, M.; CRISSMAN, J. L.; LEE, M. V.; YOUNG, R.; HURST, B. S. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 5, p. 661–674, 1974 PMID: 4412247; PMCID: PMC7364228.. DOI: 10.1093/jnci/53.3.661 . Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/53/3/661/908749?redirectedFrom=fulltext&login=false> . Acesso em: 21 set. 2025.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; BURGOS-MORÓN, E.; ORTA, M. L.; MATEOS, S.; LÓPEZ-LÁZARO, M. A hydroalcoholic extract from the leaves of *Nerium oleander* inhibits glycolysis and induces selective killing of lung cancer cells. **Planta Medica**, v. 79, n. 3–4, p. 190–195, 2013. DOI: 10.1055/s-0032-1328715. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23824549/>. Acesso em: 26 set. 2025.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012. DOI: 10.1038/nature11412. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11412>. Acesso em: 25 set. 2025.

CHEANG, M. C. U.; CHIA, S. K.; VODUC, D.; GAO, D.; LEUNG, S.; SNIDER, J.; WATSON, M.; DAVIES, S.; BERNARD, P. S.; PARKER, J. S.; PEROU, C. M.; ELLIS, M. J.; NIELSEN, T. O. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, [S.l.], v. 101, n. 10, p. 736–750, 2009. DOI: [10.1093/jnci/djp082](https://doi.org/10.1093/jnci/djp082). Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>. Acesso em: 28 set. 2025.

CHEN, P.; DONG, R.; CHEN, Q. Extracts of the medicinal plants *Pao Pereira* and *Rauwolfia vomitoria* inhibit ovarian cancer stem cells in vitro. **Scientific Reports**, v. 12, p. 10087, 2022. DOI: 10.1177/15347354221123019. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/15347354221123019> . Acesso em: 07 out. 2025.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1–10, 2013. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>. Acesso em: 26 out. 2025.

CHEN, W. Y. Exogenous and endogenous hormones and breast cancer. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 573–585, ago. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2008.08.001>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521690X08000870>. Acesso em: 01 out. 2025.

CIFUENTES-C, L.; RIVERA, A. L.; BARRETO, G.; GÓMEZ, S. C.; MILLÁN, E.; NAVARRO, A.; RAMOS, M.; AGUDELO, A. E.; OSSA, M. C. BRCA1 and BRCA2 mutations in a sample of breast cancer patients in Colombia. PMCID: PMC7141151 PMID: [32284662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32284662/) **PMC**, 2019. Disponível em:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7141151/>. Acesso em: 21 set. 2025.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013 1830(6):3670-95. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008. Epub 2013 Feb 18. PMID: 23428572; PMCID: PMC3672862. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416513000512?via%3Dihub> . Acesso em: 21 set. 2025.

COSTIGAN, C.; HOLLVILLE, M.; MARTIN, S. J. BCL-2 family proteins and the regulation of programmed cell death. **Cell Death & Disease**, v. 14, n. 2, p. 105–118, 2023.

COLLEEN, C.; DAVEY, G. Hormonal risk factors for breast cancer. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 5, p. 647–657, 2021.

COSTA, B.; AMORIM, I.; GARTNER, F.; VALE, N. Understanding breast cancer: from conventional therapies to repurposed drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 151, p. 105401, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105401>. Acesso em: 12 set. 2025.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de

novos fármacos anticâncer. **Revista Virtual de Química**, 2025. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/65>. Acesso em: 19 dez. 2025.

COMŞA, Ş. et al. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of progress in cancer research and drug discovery. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 94, n. 3, p. 280–290, 2015. Disponível em: <https://ar.iiarjournals.org/content/anticanres/35/6/3147.full.pdf> . Acesso em: 01 set. 2025.

CONRADO, G.G., DA ROSA, R., REIS, R.D. et al. Building Natural Product–Based Libraries for Drug Discovery: Challenges and Opportunities from a Brazilian Pharmaceutical Industry Perspective. **Rev. Bras. Farmacogn.** 34, 706–721 (2024). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43450-024-00540-9>. Acesso em: 10 set. 2025.

DAKAL, T. C. et al. Revisiting the challenges and opportunities in cancer drug resistance. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s. l.], v. 150, n. 10, p. 1-25, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11471640/> . Acesso em: 10 dez. 2025.

DEBNATH, J.; MUTHUSWAMY, S. K.; BRUGGE, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, v. 30, n. 3, p. 256–268, 2003. Disponível em: Acesso em: 10 dez. 2025.

DEVITA, Vincent T.; LAWRENCE, Theodore S.; ROSENBERG, Steven A. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 11. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2019.

DONG, R. et al. Extract of the medicinal plant Pao Pereira inhibits pancreatic cancer stem-like cells in vitro and in vivo. **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 5, p. 1491–1500, 2018. DOI: 10.1177/1534735418786027. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29985062/> Acesso em: 02 out. 2025.

ELGIZAWY, H.; ELZANATY, S.; ELGHALY, E.; SEIF-ELDEIN, N. Polyphenolics of *Plumeria rubra* L. and cytotoxic activities against lung, colon, and breast carcinoma. **Journal of Modern Research**, v. 6, n. 1, p. 42–46, 2024. DOI: 10.21608/jmr.2023.220245.1114. Disponível em: https://journals.ekb.eg/article_334039.html. Acesso em: 26 set. 2025.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938–1948, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389> . Acesso em: 01 set. 2025.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.339> . Acesso em: 1 jan. 2026.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc706> . Acesso em: 1 jan. 2026.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1309–1312, 1998. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.281.5381.1309> .Acesso em: 1 jan. 2026.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(00\)81683-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400816839%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(00)81683-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400816839%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 01 abr. 2025.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>. Acesso em: 10 mar.

2025.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>. Acesso em: 16 jun. 2025.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, v. 13, n. 4, p. 215, 2011.

HUANG, X.; HUA, Y.; SUN, C.; YIN, Y. Strategies for the treatment of hormone receptor-positive HER2-low breast cancer based on clinical practice: a round table discussion. **Translational Breast Cancer Research**, v. 5, p. 30, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/tbcr-24-40> . Acesso em: 10 out. 2025.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER . Ações para controle do câncer – Capítulo 2: Neoplasias epiteliais escamosas e glandulares. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/acoes_cap2.pdf . Acesso em: 01 nov. 2025.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Dados e números sobre câncer de mama. INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/relatorios/dados-e-numeros-sobre-cancer-de-mama-relatorio-anual-2022>. Acesso em: 10 set. 2025.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 17 set. 2025.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 21 set. 2025.

JÁCOME, R. L. R. P.; SOUZA, R. A.; OLIVEIRA, A. B. 2003. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidospema parvifolium* e o fitoterápico “pau-pereira”. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 39-41. DOI: 10.1590/S0102-695X2003000300015. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/deteccao-precoce-do-cancer.pdf>. Acesso em: 21 set. 2025.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, Víctor et al. Nature’s green potential: anticancer properties of plants of the Euphorbiaceae family. **Cancers**, v. 16, n. 1, p. 114, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/1/114>. Acesso em: 10 set. 2025.

KIM, H.-S.; PARK, I.; CHO, H. J.; GWAK, G.; YANG, K.; BAE, B. N.; KIM, K. W.; HAN, S.; KIM, H.-J.; KIM, Y.-D. Analysis of the potent prognostic factors in luminal-type breast cancer. **Journal of Breast Cancer**, v. 15, n. 4, p. 401–406, 31 dez. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4048/jbc.2012.15.4.401>. Acesso em: 02 mar. 2025.

KOCH, I. et al. Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB4605> . Acesso em: 20 abr. 2025.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENBERGHE, T.; et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, Jon C. Robbins Basic Pathology. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2020.

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

LEHMANN, B. D.; BAUER, J. A.; CHEN, X.; SANDERS, M. E.; CHAKRAVARTHY,

A. B.; SHYR, Y.; PIETENPOL, J. A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 2011. DOI: 10.1172/JCI45014. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/45014> . Acesso em: 25 set. 2025.

LI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 93, p. 1046–1052, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2361680/> . Acesso em: 30 dez. 2025.

LI, J.-M.; HUANG, Y.-C.; KUO, Y.-H.; CHENG, C.-C.; KUAN, F.-C.; CHANG, S.-F.; LEE, Y.-R.; CHIN, C.-C.; SHI, C.-S. Flavopereirine suppresses colorectal cancer growth via p53-dependent signaling. **Phytomedicine**, v. 52, p. 258–267, jan. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/1034> . Acesso em: 10 out. 2025.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>. Acesso em: 08 out. 2025.

LIBERTO, M. C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Geissospermum vellosii*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, n. 2, p. 257-261, 2016. (Nota: Este artigo foca mais nos extratos e frações, mas discute a citotoxicidade que é atribuída aos alcaloides como a geissoschizona e flavopereirina).

LIMA, J. A.; COSTA, R. S.; EPIFÂNIO, R. A.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; PINTO, A. C. *Geissospermum vellosii* stem bark: Pharmacology and biochemistry. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, p. 508–513, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.01.024> . Acesso em: 10 out. 2025.

LIMA, J. A.; COSTA, T. W. R.; SILVA, L. L.; MIRANDA, A. L. P.; PINTO, A. C. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 1, p. 237–248, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140374> . Acesso

em: 10 out. 2025.

LIMA, J. A.; PINTO, A. da C. **Estudo químico e farmacológico do *Geissospermum vellosii*: isolamento da Geissospermina, um inibidor de Acetilcolinesterase**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

LIMA, J. A.; COSTA, T. W. R.; FONSECA, A. C. C. da; AMARAL, R. F. do; NASCIMENTO, M. D. D. S. B.; SANTOS-FILHO, O. A.; MIRANDA, A. L. P. de; FERREIRA NETO, D. C.; LIMA, F. R. S.; HAMERSKI, L.; TINOCO, L. W. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104215, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045206820315121?via%3Dihub>. Acesso em: 14 out. 2025.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LÜÖND, F.; et al. Heterogeneity within a tumour increases its ability to adapt. *British Journal of Cancer*, v. 124, p. 1338–1348, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41416-021-01328-7>. Acesso em: 01 mar. 2025.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/26352461> Plantas medicinais a necessidade de estudos multidisciplinares. Acesso em: 16 set. 2025.

MOLINARI, G. Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. In: Guzmán, C.A., Feuerstein, G.Z. (eds) **Pharmaceutical**

Biotechnology, 2009. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 655. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1132-2_2 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20047031/>. Acesso em: 19 dez. 2025.

MANZOOR, T. A.; BORRALHO, P. M.; DEWANJEE, S.; MULHOVO, S.; RODRIGUES, C. M. P.; FERREIRA, M.-J. U. Monoterpene bisindole alkaloids, from the African medicinal plant *Tabernaemontana elegans*, induce apoptosis in HCT116 human colon carcinoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 324- 330, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.051> . Acesso em: 21 out. 2025.

MARQUES, D. A. et al. Ethnopharmacological review, phytochemistry and biological activities of *Geissospermum* species. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 3, e4001234047, 2023. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/40047> . Acesso em: 1 jan. 2026.

MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LILA, M. A. Isolation and structural elucidation of indole alkaloids from *Geissospermum vellosii* by mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 7–8, p. 511–520, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.12.018>. Acesso em: 01 out. 2025.

Mbeunkui F, Grace MH, Lategan C, Smith PJ, Raskin I, Lila MA. Isolation and identification of antiplasmodial indole alkaloids from the bark of *Geissospermum vellosii*. *J Ethnopharmacol*. 2012;139(2):471-7.

MIMURA, S. et al. Advances in cell culture systems for drug discovery and cancer research. *Cells*, v. 9, n. 6, p. 1-18, 2020.

MINHO, A. P.; GASPAR, E. B. Guia prático para determinação de curva dose-resposta e concentração letal em bioensaios com extratos vegetais. **Bagé: Embrapa Pecuária Sul**, 2016. (Comunicado Técnico, 93). ISSN 1982-5382. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1074446/guia-pratico-para-determinacao-de-curva-dose-resposta-e-concentracao-letal-em-bioensaios-com-extratos-vegetais> . Acesso em: 21 set. 2025.

MOTA, A. L.; EVANGELISTA, A. F.; MACEDO, T.; OLIVEIRA, R.; SCAPULATEMPO-NETO, C.; VIEIRA, R. A.; MARQUES, M. M. C. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. **Oncology Letters**, v. 13, n. 6, p. 4708–4712, 25 abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6093>. Acesso em: 10 out. 2025.

MOHSINA, F. P.; QUAZI, A.; P., F. I.; ANURADHA, M.; MUKIM, M.; PATIL, A. Botanical, ethnopharmacological, phytochemical & pharmacological standards of plant *Ichnocarpus frutescens*. **Research & Review: Drugs and Drugs Development**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2022. Disponível em: <https://matjournals.co.in/index.php/RRDDD/article/view/156>. Acesso em: 26 set. 2025.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4). Acesso em: 30 dez. 2025.

MUÑOZ V, SAUVAIN M, BOURDY G, CALLAPA J, BERGERON S, ROJAS I, BRAVO JA, BALDERRAMA L, ORTIZ B, GIMENEZ A, DEHARO E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **J Ethnopharmacol**. 2000 Feb;69(2):127-37. doi: 10.1016/s0378-8741(99)00148-8. PMID: 10687869. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10687869/>. Acesso em: 21 ago. 2025.

NEVE, R. M.; CHIN, K.; FRIDLYAND, J.; YEH, J.; BAEHNER, F. L.; FEVR, T.; ET AL. Uma coleção de linhagens celulares de câncer de mama para o estudo de subtipos de câncer funcionalmente distintos. **Cancer Cell**, v. 10, n. 6, p. 515–527, 2006. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.10.008. Disponível em: [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(06\)00314-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS153561080600314X%3Fshowall%3Dtrue#tblfn2](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(06)00314-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS153561080600314X%3Fshowall%3Dtrue#tblfn2). Acesso em: 10 out. 2025.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>. Acesso em: 12 abr. 2025.

OMAR, F. et al. Plant-based indole alkaloids: A comprehensive overview from a pharmacological perspective. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2297, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/8/2297> . Acesso em: 29 dez. 2025.

OSBORNE, C. K. et al. Estrogen receptor in breast cancer: its role in predicting response to therapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 10, p. 197–209, 1987.

PAHO/WHO – Pan American Health Organization / World Health Organization. Cancer in the Americas: Statistics and projections 2022–2045. **Washington, D.C.: PAHO**, 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/cancer>. Acesso em: 19 set. 2025.

PANEGYRES, K. *The story of how cancer got its name*. **Cancer**, v. 130, n. 20, p. 3401–3403, 15 out. 2024. DOI: 10.1002/cncr.35428. Disponível em: <https://www.ovid.com/journals/canc/pdf/10.1002/cncr.35428~the-story-of-how-cancer-got-its-name> ovid.com. Acesso em: 24 jun. 2025.

Passos CS, Simoes-Pires A, Nurisso A, Soldi C, Henriques AT, Carrupt PA, et al. Psychoactive activity of the alkaloidal fraction from the bark of *Geissospermum vellosii*. *J Ethnopharmacol*. 2009;125(1):11-6.

PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLEY, M.- Y.; WILLEY, D.; DENG, S.; THOR, A.; ET AL. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35021093> . Acesso em: 10 out. 2025.

PHANNASIL, P.; AKEKAWATCHAI, C.; JITRAPAKDEE, S. MicroRNA expression profiles associated with the metastatic potential of breast cancer cells. **Oncology Letters**, v. 25, n. 2, p. 1–10, 2023. Disponível em:

<https://doi.org/10.3892/ol.2023.13926>. Acesso em: 21 set. 2025.

PINTO, V. B. P. **Efeitos dos extratos de Euterpe oleracea e Geissospermum vellosii em linhagens celulares de câncer cervical**: Universidade Federal do Maranhão, 2023. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/4615>. Acesso em: 21 set. 2025.

PULEO, J.; POLYAK, K.. The MCF10 model of breast tumor progression. **Cancer Research**, v. 81, n. 16, p. 4183–4185, 2021. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1939. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/81/16/4183/670266/The-MCF10-Model-of-Breast-Tumor-ProgressionThe> . Acesso em: 21 set. 2025.

RAFEHI, H.; ORLOWSKI, C.; GEORGIADIS, G. T.; VERVERIS, K.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. C. Clonogenic Assay: adherent cells. **Journal of Visualized Experiments**, [S.l.], n. 49, p. 1, 13 mar. 2011. Disponível em: <https://app.jove.com/t/2573/clonogenic-assay-adherent-cells> . Acesso em: 21 set. 2025.

REIGADA, Inés; MIETTINEN, Ilkka; SAVIJOKI, Kirsi; FALLARERO, Adyary. Orthogonal approaches for studying bacterial biofilms using photometric detection with a Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer and brightfield imaging with an EVOS FL Auto Imaging System. Vantaa: **Thermo Fisher Scientific**, 2018. Application Note. Disponível em: https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Application-Notes/orthogonal-approaches-bacterial-biofilms-photometric-detection-application-note.pdf?utm_source=chatgpt.com . Acesso em: 21 set. 2025.

RIBEIRO, A. A; NARDOCCI, A. C. Desigualdades socioeconômicas na incidência e mortalidade por câncer: revisão de estudos ecológicos, 1998-2008. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 878-891, set. 2013. DOI: 10.1590/S0104-12902013000300020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-12902013000300020> . Acesso em: 21 nov. 2025.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006. DOI:

<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238> . Acesso em: 21 set. 2025.

RISS, T. L. et al. Cell viability assays. In: Assay Guidance Manual. Bethesda: Eli Lilly & Company; **National Center for Advancing Translational Sciences**, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> . Acesso em: 1 jan. 2026.

ROSALES, P. F. et al. Bio-guided search of active indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: Antitumour activity, toxicity in silico and molecular modelling studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 66-74, 2019. Disponível em: linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004520681831232X . Acesso em: 29 dez. 2025

SAHA, S. et al. Decoding breast cancer treatment resistance through genetic, epigenetic, and immune-regulatory mechanisms: from molecular insights to translational applications. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s. l.], v. 151, n. 1, p. 1-30, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12366494/> . Acesso em: 01 dez. 2025.

SANTOS, M. O.; LIMA, F. C. S.; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P.; ALMEIDA, L. M.; CANCELA, M. C. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1: e-213700, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700> . Acesso em: 21 set. 2025.

SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **Botucatu**, v. 15, n. 3, p. 487–500, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/QCqxmGb3Jh8fqhBH4h7ZGKK>. Acesso em: 26 set. 2025.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SLAMON, D. J.; CLARK, G. M.; WONG, S. G.; LEVIN, W. J.; ULLRICH, A.;

McGUIRE, W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, n. 4785, p. 177–182, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.3798106> . Acesso em: 10 out. 2025.

SMITH, A. B. et al. Characterization method used to identify the state of cells stained in the fluorescence assay with acridine orange and ethidium bromide. **Journal of Fluorescence Studies**, v. 12, n. 3, p. 234-245, 2012.

SOULE, H. D. et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer Research**, v. 50, n. 18, p. 6075–6086, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2368877/> . Acesso em: 30 dez. 2025.

SOUSA NETO, P. I. **Câncer de bexiga: diagnóstico não invasivo e ação dos extratos de *Euterpe oleracea* Mart. e *Geissospermum vellosii* in vitro contra células T24**. 2023. 81 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2024.

SOUZA, N. C. G. de; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico de frações da espécie *Geissospermum vellosii* (Apocynaceae). Arigó - **Revista do Grupo PET e Acadêmicos de Geografia da UFAC**, v. 3, n. 2, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/arigoufac/article/view/5502> . Acesso em: 21 set. 2025.

TRACHTA, J. R.; DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Redox regulation of cell signaling and apoptosis in cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1857–1871, 2012. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4529979/> . Acesso em: 1 jan. 2026.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 237–245, 2011. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-080-5_20 . Acesso em: 1 jan. 2026.

VIWATPINYO, Kittikun; MUKDA, Sujira; WARINHOMHOUN, Sakan. Effects of

mitragynine on viability, proliferation, and migration of C6 rat glioma, SH-SY5Y human neuroblastoma, and HT22 immortalized mouse hippocampal neuron cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 166, p. 115364, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37639746/> Acesso em: 10 mar. 2025.

WALLACE, Douglas C. Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 10, p. 685–698, 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc3365>. Acesso em: 24 jan. 2026.

WERNER, J. A. T.; OLIVEIRA, S. M.; MARTINS, D. F.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S. 2009. Evidence for a role of 5-HT1A receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 163-169. DOI: 10.1016/j.jep.2009.05.026. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109003158?via%3Dihub> . Acesso em: 10 mar. 2025.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast cancer is now the most common form of cancer. 2021.

WEINBERG, Robert A. *The Biology of Cancer*. 2. ed. New York: Garland Science, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21784/>. Acesso em: 24 jan. 2026.

WU, S.; ZHU, W.; THOMPSON, P.; H. Y. A. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature Communications**, v. 9, n. 3490, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05467-z>. Acesso em: 1 out. 2025.

WÜNSCH-FILHO, V.; *et al.* Perspectivas da investigação sobre determinantes sociais em câncer. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, v. 18, p. 427–450, 2008.

XIONG, N.; WU, H.; YU, Z. Advancements and challenges in triple-negative breast cancer: a comprehensive review of therapeutic and diagnostic strategies. **Frontiers in Oncology**, v. 14, p. 1405491, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1405491>. Acesso em: 10 out. 2025.

YEH, H.-T.; TSAI, Y.-S.; CHEN, M.-S.; LI, Y.-Z.; LIN, W.-C.; LEE, Y.-R.; TSENG, Y.-

S.; SHEU, S.-M. Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 862, 172641, 2019.

YIN, Li; DUAN, Jiang-Jie; BIAN, Xiu-Wu; YU, Shi-Cang. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and therapeutic targets. **Breast Cancer Research**, v. 22, p. 96, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>. Acesso em: 21 set. 2025.

YU, J.; CHEN, Q. The plant extract of pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer, **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 1, p. 36-43, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.808232> . Acesso em: 21 set. 2025.

YU, J.; DRISKO, J.; CHEN, Q. Inhibition of pancreatic cancer and potentiation of gemcitabine effects by the extract of Pao Pereira. **Oncology Reports**, v. 30, n. 1, p. 149- 156, jul. 2013. DOI: 10.3892/or.2013.2461. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2013.2461> . Acesso em: 21 set. 2025.

ZINGUE, S.; CISILOTTO, J.; TUECHE, A. B.; BISHAYEE, A.; MEFEGUE, F. A.; SANDJO, L. P.; NDE, C. B. M.; WINTER, E.; MICHEL, T.; NDINTEH, D. T. *Crateva adansonii* DC, an African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity in vitro and prevents experimental mammary tumorigenesis in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 190, p. 183-199, ago. 2016.