



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



HEIVILA MONIQUE DA SILVA ALEXANDRE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE
***Solanum jabrense* Agra & M. Nee**

JOÃO PESSOA - PB

2024

HEIVILA MONIQUE DA SILVA ALEXANDRE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE
Solanum jabrense Agra & M. Nee**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves

JOÃO PESSOA – PB

2024



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 507ª (quingentésima sétima) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Heivila Monique da Silva Alexandre**, candidato(a) ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas e trinta minutos (14h30) do dia vinte e dois de novembro do ano de dois mil e vinte e quatro (22/11/2024), no Auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Heivila Monique da Silva Alexandre**, candidato(a) ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Demetrius Antônio Machado de Araújo, Ph.D em Bioquímica e Imunologia, Márcia Regina Piuvezam, Ph.D em Microbiologia, e Juan Carlos Ramos Gonçalves, Ph.D em Farmacologia. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Juan Carlos Ramos Gonçalves, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Heivila Monique da Silva Alexandre**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "**Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de *Solanum jabrense* Agra & M. Nee**". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Heivila Monique da Silva Alexandre** legalmente habilitado(a) a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves (Orientador)

Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo (Examinador)

Prof.ª Dr.ª Márcia Regina Piuvezam (Examinadora)

Heivila Monique da Silva Alexandre
Heivila Monique da Silva Alexandre (Discente)



Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A381a Alexandre, Heivila Monique da Silva.

Avaliação da atividade antitumoral in vitro de
Solanum jabrense Agra & M. Nee / Heivila Monique da
Silva Alexandre. - João Pessoa, 2024.
146 f. : il.

Orientação: Juan Carlos Ramos Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Produtos naturais. 3.
Citotoxicidade. 4. Estresse oxidativo. 5. Docking
molecular. 6. Antitumoral. I. Gonçalves, Juan Carlos
Ramos. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)

Dedico este trabalho, com amor e saudade, à memória de minha avó Estela e de minha mãe. A lembrança do afeto que me deram permanecerá eternamente viva em meu coração. Sinto sua presença e proteção em cada passo que dou, e a força e o cuidado que sempre me ofereceram são o que me impulsionam a seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis. A ausência delas é sentida todos os dias, e guardo no meu coração a doce esperança de um reencontro.

Com minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por me guiar pelos melhores caminhos e ter sido providencial, me permitindo encontrar as pessoas certas, sem as quais eu não chegaria tão longe.

Aos meus avós (*in memoriam*), em especial a minha avó Estela, que não está aqui fisicamente, porém tenho certeza de que me acompanha em cada passo, e me dá forças para prosseguir quando eu acredito não ser capaz. Ela quem mais me amou e demonstrou, em todos os momentos dos breves vinte anos em que estivemos juntas.

À minha mãe, Maria Gorete (*in memoriam*), cuja partida precoce deixou uma lacuna em nossas vidas, mas uma memória de amor e generosidade. Seu carinho será para sempre a lembrança mais preciosa que guardarei em meu coração.

Aos meus pais, Marcileide e Rafael, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Vocês são meu maior exemplo de amor e dedicação, e me ensinam, todos os dias, o verdadeiro significado de família. Agradeço profundamente por todos os sacrifícios feitos em nome do meu bem-estar, por nunca medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus sonhos e por serem o meu maior incentivo.

Aos meus irmãos Rafaela e Rafael Filho, que mesmo estando distantes se fazem presente em minha vida e estão sempre ao meu lado, sou grata a Deus por ter vocês comigo, e teremos sempre uns aos outros.

Agradeço profundamente à minha tia Lúcia, a quem carinhosamente chamo de mãe, por sempre estar ao meu lado, me apoiando incondicionalmente. Às minhas primas Amanda e Lara, por acreditarem em mim e se alegrarem em cada conquista, por menor que ela seja. Ao meu tio Francisco e à Márcia, por todo o carinho e dedicação.

A Rubens, por se tornar um irmão para mim. Sou imensamente grata pelos momentos de alegria, tristeza e até de desespero que compartilhamos. Agradeço por estar ao meu lado todos os dias, mesmo com nossas brigas diárias, sempre sendo uma presença constante em minha vida.

Aos meus amigos, que o curso de Farmácia me presenteou: Larissa Alves, Larissa Xavier e Mylenne. Vocês se tornaram essenciais para mim, e sou grata por estarem sempre ao meu lado, apesar das rotinas diferentes que cada um tem.

À minha amiga-irmã, Laryssa Mylenna, a quem conheci por acaso ao vir morar em João Pessoa. Laryssa não foi apenas uma colega de apartamento, mas uma irmã com quem pude

contar ao longo dos anos de graduação e até hoje. Mesmo estando em outro estado, ela sempre encontra uma forma de me ajudar e estar presente quando preciso. Minha eterna gratidão.

Agradeço também às minhas amigas Mari e Isione, por me acolherem nos dias mais difíceis e por estarem sempre dispostas a ajudar. Agradeço por compartilharem comigo a rotina e os trabalhos no laboratório, tornando-se uma parte essencial da minha vida.

À toda equipe do Oncofar, sem a qual este trabalho não teria sido possível, pois cada um contribuiu de alguma forma. Em especial, à Karinne, a quem chamei carinhosamente de minha “coorientadora” pelas diversas vezes que me ajudou e ensinou, e ao meu IC Pablo, que trabalhou comigo todos os dias para que esse trabalho se tornasse possível. À Júnior, Ramon e à Érika, que se tornou minha amiga para além do laboratório.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Juan Carlos Ramos Gonçalves, por ter acreditado em mim há dois anos e por me proporcionar a oportunidade de trabalhar e aprender ao seu lado. Serei eternamente grata pela confiança, empatia, ensinamentos e atenção. Agradeço também pela paciência ao me ensinar, e o incentivo a continuar melhorando.

Por fim, agradeço à minha banca, composta pela professora Márcia Regina Piuvezam, a quem tenho um carinho enorme. Ela que assistiu à minha primeira apresentação de seminário na iniciação científica e agora faz parte da minha banca de mestrado. É uma honra contar com sua contribuição. Agradeço também ao professor Demetrius Antônio Machado de Araújo, pela atenção e por se disponibilizar a contribuir com a realização deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) por terem sido minha casa e fonte constante de aprendizado durante minha jornada acadêmica.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

Heivila Monique

RESUMO

O câncer é caracterizado por alterações genéticas que levam ao crescimento celular descontrolado, evasão do sistema imune e invasão tecidual, sendo a segunda principal causa de mortalidade global. Entre os tipos, o câncer de mama destaca-se como o mais prevalente representando aproximadamente 11,7% dos novos casos diagnosticados anualmente. *Solanum jabrense*, uma planta endêmica do Brasil, é rica em metabólitos bioativos, especialmente alcaloides com atividade antitumoral. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral *in vitro* da *Solanum jabrense*. Para a análise, foram utilizados dois extratos derivados dessa planta: o hidroalcolólico (ESJ) e sua fração alcaloídica (FSJ). Inicialmente, o ESJ foi testado quanto à citotoxicidade pelo ensaio de MTT em linhagens celulares tumorais (MCF-7, MDA-MB-231, PC-3, SK-MEL-28), apresentando maior citotoxicidade nas linhagens de adenocarcinoma mamário. Diante disso, essas linhagens foram selecionadas para avaliações subsequentes e determinação da CI_{50} e índice de seletividade nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Observou-se que a linhagem MCF-7 apresentou a maior seletividade do ESJ no período de 48 horas, com uma concentração inibitória média (CI_{50}) de $27,72 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$, enquanto em células HEK-293 foi de $78,56 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$. Assim, a linhagem MCF-7 e o período de tratamento de 48 horas foram selecionados para investigar o efeito antitumoral da fração alcaloídica do extrato (FSJ). O FSJ mostrou-se mais seletivo para MCF-7 quando comparado a outras linhagens não tumorais. Em relação à HEK-293, foi cerca de quinze vezes mais seletivo e aproximadamente cinco vezes mais seletivo em relação à MCF-10A. Além disso, apresentou maior seletividade do que a droga padrão doxorrubicina. Em seguida, foram avaliados os mecanismos de ação antitumoral na linhagem MCF-7. A análise do ciclo celular revelou que, após 48 horas de tratamento com o FSJ, houve um aumento significativo na fração sub-G1. A marcação com anexina V FITC/IP indicou um aumento no percentual de células em apoptose, o que foi corroborado por observações de características morfológicas de apoptose em microscopia confocal a laser. Nos estudos de alterações mitocondriais utilizando o marcador JC-1, foi observada uma redução do potencial de membrana mitocondrial, indicando a ativação da via intrínseca de apoptose. Além disso, a avaliação da citotoxicidade em modelo de cultura 3D de esferoides revelou que o FSJ foi eficaz na redução do tamanho dos esferoides, bem como teve efeito antimigratório. A citotóxicidade do composto majoritário do extrato, solamargina, foi avaliada em 48 horas, com IC_{50} de $8,65 \pm 0,04 \mu\text{M}$. Ainda, a citotoxicidade do FSJ foi prevenida pelo pré-tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC), sugerindo a participação do estresse oxidativo. No *docking* molecular, observou-se que a solamargina, interagiu com os sítios ativos das proteínas ERK2, JNK1, p38 α MAPK e IKK β . Em resumo, o FSJ demonstra efeito antitumoral *in vitro*, induzindo apoptose, estresse oxidativo e inibindo as proteínas p38 MAPK, ERK2, JNK1 e IKK β .

Palavras-chave: Citotoxicidade, estresse oxidativo, docking molecular, antitumoral

ABSTRACT

Cancer is characterized by genetic alterations that lead to uncontrolled cell growth, immune system evasion, and tissue invasion, making it the second leading cause of global mortality. Among cancer types, breast cancer stands out as the most prevalent, accounting for approximately 11.7% of new cases diagnosed annually. *Solanum jabrense*, an endemic plant of Brazil, is rich in bioactive metabolites, particularly alkaloids with antitumor activity. This study aimed to evaluate the in vitro antitumor activity of *Solanum jabrense*. For the analysis, two extracts derived from this plant were used: the hydroalcoholic extract (ESJ) and its alkaloid fraction (FSJ). Initially, the ESJ was tested for cytotoxicity using the MTT assay in tumor cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, PC-3, SK-MEL-28), showing higher cytotoxicity in breast adenocarcinoma cell lines. Consequently, these cell lines were selected for subsequent evaluations and determination of IC₅₀ and selectivity index over 24, 48, and 72-hour treatment periods. It was observed that the MCF-7 cell line exhibited the highest selectivity for ESJ at 48 hours, with a mean inhibitory concentration (IC₅₀) of $27.72 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$, compared to $78.56 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ in HEK-293 cells. Thus, the MCF-7 cell line and the 48-hour treatment period were selected to investigate the antitumor effects of the alkaloid fraction of the extract (FSJ). FSJ was found to be more selective for MCF-7 compared to other non-tumoral cell lines. Regarding HEK-293, it was approximately 15 times more selective and about five times more selective compared to MCF-10A. Moreover, it exhibited greater selectivity than the standard drug doxorubicin. Subsequently, the antitumor mechanisms of action were evaluated in the MCF-7 cell line. Cell cycle analysis revealed a significant increase in the sub-G1 fraction after 48 hours of treatment with FSJ. Annexin V FITC/PI staining indicated an increase in the percentage of apoptotic cells, which was corroborated by observations of apoptotic morphological characteristics under laser confocal microscopy. Mitochondrial alterations studied using the JC-1 marker revealed a reduction in mitochondrial membrane potential, indicating the activation of the intrinsic apoptosis pathway. Furthermore, the evaluation of cytotoxicity in a 3D spheroid culture model revealed that FSJ was effective in reducing spheroid size and exhibited antimigratory effects. The cytotoxicity of the extract's major compound, solamargine, was evaluated at 48 hours, with an IC₅₀ of $8.65 \pm 0.04 \mu\text{M}$. Additionally, FSJ cytotoxicity was prevented by pre-treatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC), suggesting the involvement of oxidative stress. Molecular docking analysis showed that solamargine interacted with the active sites of ERK2, JNK1, p38 α MAPK, and IKK β proteins. In summary, FSJ demonstrates in vitro antitumor effects by inducing apoptosis, oxidative stress, and inhibiting p38 MAPK, ERK2, JNK1, and IKK β proteins.

Keywords: Cytotoxicity, oxidative stress, molecular docking, antitumor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Marcas do câncer	25
Figura 2- Progressão do ciclo celular direcionado por cinases dependentes de ciclina (CDKs)	28
Figura 3 Vias intrínseca e extrínseca da apoptose	31
Figura 4 - Formação e Regulação de ROS e Seus Efeitos nas Funções Celulares.....	35
Figura 5 Cascatas de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK).....	38
Figura 6 Cascata de sinalização das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK)	40
Figura 7 Ativadores e Alvos da Via de Sinalização JNK.....	43
Figura 8 Via de sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK)	45
Figura 9 Vias mediadas por NF- κ B.....	48
Figura 10 Solanum jabrense Agra & M. Nee	55
Figura 11 Estrutura química do glicoalcaloide Solamargina.....	56
Figura 12 Citotoxicidade ESJ em linhagem de células de adenocarcinoma mamário, MCF-7 e MDA-MB-231, ou rim embrionário humano, HEK, após 24, 48 e 72h de tratamento.....	77
Figura 13 Citotoxicidade da fração alcaloide do extrato hidroalcoólico de Solanum jabrense (FSJ) em célula tumoral MCF-7 e não tumorais HEK e MCF-10A.....	79
Figura 14 Citotoxicidade da doxorrubicina em células MCF-7 e MCF-10A após um período de 48 horas de tratamento.....	80
Figura 15 Efeito do FSJ na distribuição de células de adenocarcinoma mamário nas diferentes fases do ciclo celular após 48h de tratamento	82
Figura 16 Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração com Hoechst em células de adenocarcinoma mamário incubadas com FSJ por 48 h.....	83
Figura 17 Indução de apoptose pelo FSJ analisada por coloração com Hoechst em células de adenocarcinoma mamário após 48h de tratamento.....	84
Figura 18 Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo de propídeo (IP) de células adenocarcinoma	85
Figura 19 Indução da apoptose pelo FSJ ou doxorrubicina (DXR) analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de adenocarcinoma mamário após 48h de tratamento	86

Figura 20 Efeito do FSJ ou doxorrubicina (DXR) em células de adenocarcinoma mamário MCF-7 marcadas com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP) após 48 h de tratamento.....	88
Figura 21 Imagens representativas da avaliação da despolarização mitocondrial por coloração de JC-1, em células adenocarcinoma mamário (MCF-7) incubadas com o FSJ ou CCCP por 48h	89
Figura 22 Efeito do FSJ na despolarização mitocondrial de células MCF-7	90
Figura 23 Citotoxicidade do FSJ ou doxorrubicina (DXR) na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) após 48 h de tratamento	91
Figura 24 Imagens representativas dos esferoides de células MCF-7 tratados com FSJ em diferentes concentrações após 0 e 48 horas de tratamento	92
Figura 25 Efeito do FSJ sobre a migração celular e o tamanho dos esferoides de células MCF-7 após 48 horas de tratamento	93
Figura 26 Citotoxicidade da solamargina em células MCF-7 após 48 h de tratamento.....	94
Figura 27 Interações moleculares entre a Solamargina ou o ligante do Protein Data Bank (PDB) e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 2 (ERK2).....	97
Figura 28 Interações moleculares entre a solamargina, ou ligante do Protein Data Bank (PDB) e a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1)	99
Figura 29 Interações moleculares entre a Solamargina ou o ligante do Protein Data Bank (PDB) e a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK)	100
Figura 30 Interações moleculares entre a Solamargina ou o ligante do Protein Data Bank (PDB) e o Inibidor da subunidade beta da cinase do fator nuclear kappa B (IKK β).....	102
Figura 31 Mecanismos de ação da fração alcaloídica do extrato hidroalcoólico de Solanum jabrense (FSJ) em células MCF-7	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Alvos e ligantes utilizados no docking molecular	72
Tabela 2 Viabilidade celular (%) das linhagens tratadas com o ESJ (200 µg/mL) após 72 horas de incubação	75
Tabela 3 Valores de CI50 e índices de seletividade do extrato hidroalcólico de Solanum jabrense para as linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e HEK	78
Tabela 4 Valores de CI50 e índices de seletividade do FSJ e doxorrubicina (DXR) para as linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e HEK.....	81
Tabela 5 Valores de energia de ligação (kJ/mol) entre Solamargina ou outros ligantes e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK2), a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1), a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38α (p38α MAPK), a Proteína Caspase 3, 7 e 8, e o IKKβ	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Classes de quimioterápicos para câncer de mama: exemplos de fármacos e efeitos adversos comuns.....	52
Quadro 2 - Linhagens celulares e suas características.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A1BFL-1: linfoma de células B

A549: carcinoma pulmonar de células não pequenas

AKT: proteína cinase B

Apaf-1: fator 1 de ativação da protease da apoptose

BAK: proteína antagonista/killer Bcl-2

BAX: proteína X Associada ao Bcl-2

Bcl-2: proteína linfoma de células B2

BID: proteína agonista da morte com domínio de interação BH3

BIK: assassino interagente da Bcl-2

BIM: mediador da Morte Celular Interagente com Bcl-2

BMF: fator Modificador de Bcl-2)

BRCA: gene do Câncer de Mama

CAT: catalase

CCCP: cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona

CCNS: ciclo celular não específico

CCS: ciclo celular específico

CDK: cinases dependentes de ciclinas

CDKI: inibidores de cinases dependentes de ciclinas

CI₅₀: concentração inibitória média

CO₂: dióxido de carbono

DAPK: cinase associada à morte celular

DED: domínio efetor de morte

DISC: complexo indutor de morte

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DUSP: fosfatases de Especificidade Dupla

DXR: doxorubicina

E2F: fator de transcrição

ERK: cinase Regulada por Sinal Extracelular

EROs: espécies reativas de oxigênio

ERO1: oxirredutina 1

ESJ: extrato hidroalcólico de Solanum jabrense

FADD: domínio de morte associado a Fas

Fas: receptor de morte de superfície celular

FasL: ligante de receptor Fas

FOXA1: proteína da caixa forkhead A1

FOXO3a: proteína da caixa forkhead O3a

FSJ: fração alcaloidica do extrato hidroalcólico de *Solanum jabrense*

GATA3: proteína de ligação GATA 3

GPX: glutathione peroxidase

Grb2: Proteína de ligação ao receptor de crescimento associado à proteína 2

HEK-293: células humanas de rim embrionário

Hep3B: carcinoma hepatocelular

HER2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HIC1: gene hiper metilado em câncer 1

HRK: proteína da morte HRK

HT-29: Adenocarcinoma colorretal

IKB: inibidor de kappa B

IKK: cinase de IκB

IP: iodeto de propídeo

IS: índice de seletividade

JC-1: cloreto de 5,5',6,6'-tetracoloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

LA: laranja de acridina

MAOA: monoamina oxidase A

MAPK: proteínas cinases ativadas por mitógeno

MCF-10A: linhagem celular de mama saudável humana

MCF-7: **linhagem celular de** adenocarcinoma mamário humano

MDA-MB-231: adenocarcinoma mamário humano triplo negativo

MGMT: metilguanina-DNA metiltransferase

mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

NAC: N-acetilcisteína

NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NF-κB: fator nuclear kappa B

NIK: cinase Induzida por NF-κB

P38: cinase de proteína ativada por mitógeno (MAPK p38)
p53: proteína envolvida no ciclo celular
PC-3: carcinoma prostático
PC-3: linhagem celular de câncer de próstata humana
PCL: policaprolactona
PDI: proteína dissulfeto isomerase
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase
PRDX: peroxirredoxina
PTEN: fosfatase e homóloga de Tensina
PUMA: modulador de Apoptose Regulada por p53
RASF1: membro 1 da Família de Domínio Associado ao RAS
RB: retinoblastoma
RNS: espécies reativas de nitrogênio
RTK: receptor de tirosina cinase
SDS: dodecil sulfato de sódio
SK-MEL-28: melanoma
SMAC: segundo membro da família de antagonistas de inibidores de apoptose
SOD: enzima superóxido desmutase
TNF: fator de necrose tumoral
TNFR: receptor do fator de necrose tumoral
TP53: gene supressor tumoral P53
TRAF3: fator relacionado ao receptor TNF 3
TRAIL: ligante da Morte de Células Induzida por Tumor
UPLC: cromatografia líquida de ultra performance
UV: radiação ultravioleta
VEGF: crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1 Câncer: aspectos gerais.....	24
2.2 Bases moleculares do câncer.....	26
2.2.1 Ciclo celular	26
2.2.2 Apoptose	29
2.2.3 Estresse oxidativo e câncer	33
2.2.4 Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs).....	36
2.2.4.1 Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK).....	39
2.2.4.2 Proteínas Cinases c-Jun N-Terminal (JNK)	41
2.2.4.3 Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK).....	44
2.2.5 Fator Nuclear kappa B (Nf-kb) e o câncer	47
2.3 Câncer de mama: características gerais e tratamento	49
2.4 Produtos Naturais no câncer	53
2.4.1 <i>Solanum Jabrense</i> e seu potencial farmacológico	54
3 OBJETIVOS	59
3.1 Objetivo geral.....	59
3.2 Objetivos específicos.....	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1 Local da pesquisa.....	61
4.2. Material	61
4.2.1 Substâncias e reagentes	61
4.2.2 Equipamentos	62
4.2.3 Material botânico.....	62
4.2.4 Linhagens celulares	62
4.3 Métodos	63
4.3.1 Obtenção dos extratos e composto majoritário da <i>solanum jabrense</i>	64
4.3.1.1 Preparo das amostras.....	64
4.3.2 Cultivo celular.....	64
4.3.3 Triagem e avaliação da citotoxicidade do ESJ em linhagens de células tumorais humanas.....	65

4.3.4 Avaliação da citotoxicidade de ESJ, FSJ em linhagens de adenocarcinoma mamário e não tumorais humanas.....	65
4.3.4.1 Determinação do índice de seletividade do ESJ e FSJ e comparação com a droga padrão.....	66
4.3.5 Investigação dos mecanismos de ação antitumoral <i>in vitro</i> da FSJ	67
4.3.5.1 Avaliação do efeito do FSJ sobre a progressão do ciclo celular	67
4.3.5.2 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo FSJ	67
a) Análise nuclear por coloração com Hoechst	67
b) Avaliação do tipo de morte celular por dupla coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo (LA/IP)	68
c) Marcação da Anexina V e Iodeto de propídeo para investigação da apoptose celular	69
d) Determinação do potencial de membrana mitocondrial por coloração com JC-1	69
4.3.5.3 Avaliação do envolvimento da via de ROS no efeito de FSJ	70
4.3.5.4 Avaliação do efeito do FSJ em modelo de cultura celular 3D (esferoides).....	70
4.3.5.5 Avaliação da citotoxicidade de Solamargina sobre células MCF-7	71
4.3.5.6 Estudos <i>in silico</i> por docagem molecular	71
4.4 Análises estatísticas	73
5. RESULTADOS	75
5.1 Citotoxicidade do ESJ sobre células tumorais humanas: triagem inicial	75
5.2 Citotoxicidade do ESJ em linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231) e rim embrionário humano (HEK-293) após 24, 48 e 72h de tratamento	76
5.2.3 Citotoxicidade da fsj em linhagem celular de adenocarcinoma mamário (MCF-7), rim embrionário humano (HEK) e tecido glandular mamário (MCF-10A) após 48h de tratamento.	78
5.2.4 Curvas de concentração da doxorrubicina (DXR) em células tumorais de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e não tumorais de tecido glandular mamário (MCF-10A) após um período de tratamento de 48 h	79
5.2.5 Efeito do FSJ sobre a progressão do ciclo celular	81
5.2 Morte celular induzida pelo FSJ	82
5.2.1 Efeito do FSJ sobre a morfologia de células MCF-7 após coloração com Hoechst 34580 por microscopia confocal	82
5.2.2 Tipo de morte celular envolvida no efeito de FSJ em células MCF-7 por coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP).....	84

5.2.3 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo	87
5.2.4 Efeito do FSJ sobre a despolarização mitocondrial após marcação com JC-1.....	89
5.3 Efeito do FSJ sobre o estado redox celular	90
5.3.1 Citotoxicidade do FSJ ou doxorrubicina (DXR) na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	91
5.4 Avaliação do efeito citotóxico do FSJ em modelo de cultura 3D em células de adenocarcinoma mamário (MCF-7)	92
5.4.1 Efeito do FSJ na migração celular e no tamanho dos esferoides de células MCF-7, após 48 h de tratamento	92
5.5 Citotoxicidade da Solamargina em células MCF-7 após 48 h de incubação.....	94
5.6 Estudos <i>in silico</i> por docagem molecular	94
6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÃO.....	118
8 PERSPECTIVAS.....	121
REFERÊNCIAS	123

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma condição caracterizada por alterações genéticas que resultam em crescimento descontrolado de células, capacidade de evadir do sistema imunológico e habilidade de invadir tecidos e órgãos circundantes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer representa um significativo desafio de saúde pública, sendo a segunda principal causa de mortalidade global (Allemani *et al.*, 2018; Patel, 2013; Hanahan, 2022).

Nesse sentido, o câncer de mama é o mais prevalente globalmente, e o mais diagnosticado entre as mulheres, representando cerca de 11,6 % do total de casos no ano de 2022 (Bray *et al.*, 2024). No Brasil, este é o mais incidente em todas as regiões, evidenciando sua importância como problema crítico de saúde pública e a necessidade da busca por estratégias terapêuticas eficazes (Allemani *et al.*, 2018; INCA, 2022).

As principais modalidades de tratamento para o câncer de mama incluem a radioterapia, imunoterapia, terapia-alvo, procedimentos cirúrgicos, hormonioterapia, e quimioterapia, sendo essa última a mais amplamente utilizada (Yang *et al.*, 2023). Entretanto, concomitantemente à capacidade dos quimioterápicos existentes de reduzir o tamanho do tumor e prolongar a vida dos pacientes, estão o desenvolvimento de resistência das células cancerígenas, as taxas de respostas insatisfatórias e o potencial de causar danos significativos à saúde das células não cancerígenas, devido à sua alta toxicidade (Xie; Chen; Fang, 2020).

Trabalhos com produtos naturais e seus derivados, como as substâncias isoladas, têm sido conduzidos visando a obtenção de novas terapias para o tratamento do câncer (Soto *et al.*, 2023; Bae *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2023). O crescente interesse em explorar esses compostos visa obter terapias mais seletivas, o que tem resultado no desenvolvimento de uma série de medicamentos derivados de recursos naturais, como Vimblastina®, Vincristina®, Etoposídeo®, Paclitaxel®, Docetaxel®, Irinotecano®, entre outros (Newman; Cragg, 2020).

Nesse contexto, o Brasil destaca-se por sua extensa biodiversidade. A variedade de espécies vegetais oriundas das florestas tropicais do país, oferece um repertório rico e inexplorado de compostos bioativos com potencial terapêutico, de modo que, diversos estudos têm sido conduzidos com plantas que apresentam atividade antitumoral, incluindo várias espécies da família Solanaceae (Newman; Cragg, 2016; Soto *et al.*, 2023).

O gênero *Solanum L.*, mais extenso dessa família, é notável por abranger mais de duas mil espécies de plantas conhecidas por sua variedade de metabólitos bioativos e atividades farmacológicas, incluindo suas propriedades anticancerígenas. Aproximadamente dezessete espécies desse gênero demonstraram resultados positivos na inibição do câncer, incluindo o

câncer de mama, com efeitos observados tanto no uso de extratos brutos quanto de compostos isolados dessas plantas (Jain *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2016; Kaunda; Zhang, 2019).

Nesse cenário, a *Solanum jabrense*, ganha destaque. Endêmica do Brasil, sua distribuição é limitada a região nordeste, incluindo os estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba e Bahia, sendo encontrada especificamente em regiões de brejos de altitude, como o Pico do Jabre, Serra Branca e Brejo dos Cavalos (De Fátima Agra; Nee, 1997; Porto *et al.*, 2004; Agra *et al.*, 2009). *Solanum jabrense* é rica em metabólitos secundários, incluindo flavonoides naturais, como retusina, que apresentaram atividade na inibição da resistência à proteína do câncer de mama, além de outros compostos, como ombuína, 3,7,8,4'-tetra-O-metilgossipetina, 3,7,8,3',4'-penta-O-metilgossipetina e 3-O-metilquercetina (Silva; Carvalho; Braz-filho, 2009; Pick *et al.*, 2011; Kaunda; Zhang, 2019). Em adição, a solasodina, um alcaloide esteroidal encontrado nos frutos dessa planta, demonstrou atividades farmacológicas, como anticancerígena, especialmente contra osteosarcoma e células leucêmicas, além de induzir apoptose em células cultivadas (modelos *in vitro*) (Patel; Singh; Patel, 2013; Hameed *et al.*, 2017).

Assim, o câncer representa um grave problema de saúde pública global, onde quimioterapia leva a efeitos tóxicos significativos e desenvolvimento de resistência, e considerando o potencial biológico dos fitoquímicos presentes em espécies de solanáceas, este trabalho avaliou a atividade antitumoral do extrato hidroalcolico, fração e o composto majoritário, isolados das partes aéreas de *Solanum jabrense*, sobre linhagens celulares tumorais e não tumorais humanas.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer: aspectos gerais

O câncer abrange mais de 100 doenças caracterizadas por alterações nos mecanismos de proliferação e diferenciação celular, resultando em crescimento descontrolado. Modificações genéticas e epigenéticas em células normais podem levar à formação de neoplasias malignas, que possuem crescimento rápido, células indiferenciadas e a capacidade de invadir tecidos e órgãos, culminando em metástase (Patel, 2020; Hanahan, 2022).

A homeostase celular mantém um controle rigoroso sobre a proliferação das células. Quando esse sistema é desregulado, ocorre o crescimento descontrolado de células indiferenciadas. Esse descontrole, associado a mutações, leva a alterações morfológicas e à transformação dessas células em tumores, que podem ser benignos ou malignos (Todoric; Karin, 2019). Ambos os tipos de tumores perdem a capacidade de diferenciação e exibem alterações estruturais e funcionais em comparação com as células normais. No entanto, os tumores benignos formam massas com morfologia semelhante ao tecido de origem, crescem lentamente e podem comprimir órgãos adjacentes, mas não os invadem (Yasmin *et al.*, 2015; Kogure *et al.*, 2017).

As neoplasias malignas podem ser classificadas de acordo com o local de origem. Entre elas estão os carcinomas, como o câncer de mama, que se originam de células epiteliais e representam mais de 90% dos cânceres humanos (Ahmad; Ahsan, 2020, Khoury, 2023); adenocarcinomas, que se desenvolvem a partir de tecido epitelial glandular; sarcomas, que surgem do tecido conjuntivo, como os osteossarcomas; e leucemias, linfomas e mielomas, que se originam das células brancas do sangue, como o linfoma de Hodgkin (Shields, 2017; Ahmad; Ahsan, 2020; Ullah *et al.*, 2023).

Apesar da heterogeneidade entre os tipos de câncer, todos compartilham características comuns que os diferenciam das células saudáveis (Smith *et al.*, 2020). Essas características, conhecidas como "marcas do câncer", incluem reprogramação do metabolismo celular, evasão da morte celular programada, sustentação da proliferação infinita, angiogênese, invasão e metástase, evasão da resposta imunológica, instabilidade e mutação genômica, inflamação promotora de tumores, desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos, células senescentes, evasão da supressão tumoral e ativação da via de sinalização tumoral (Hanahan, 2022), conforme Figura 1.

Figura 1 Marcas do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

Nesse contexto, a carcinogênese é um processo dinâmico pelo qual se origina o câncer, e é estruturado em três fases: iniciação, promoção e progressão. A primeira, envolve a ocorrência de danos ao DNA das células, que são provocados por fatores como carcinógenos químicos, exposição à radiação ou erros naturais durante a replicação do DNA, levando a mutações que alteram o funcionamento normal das células. Na promoção, as células que sofreram essas alterações iniciais proliferaram de maneira desordenada, estimuladas por fatores que favorecem a sobrevivência e a expansão das células mutantes. Por fim, a etapa de progressão é marcada por mutações e alterações genéticas adicionais nas células, que se tornam ainda mais malignas e invasivas. Neste estágio, as células tumorais desenvolvem a capacidade de invadir tecidos vizinhos e se disseminar para outras partes do organismo, perpetuando a natureza agressiva do câncer (Ahmad; Ahsan, 2020; Lopez; Bleich; Arthur, 2020; Majumder *et al.*, 2020).

Nesse sentido, o surgimento do câncer é influenciado por fatores exógenos (ambientais) e endógenos (hereditários). Enquanto os fatores hereditários representam somente 10% dos casos de câncer, os outros 90% estão ligados a fatores externos relacionados ao indivíduo, como infecções virais, bacterianas, hábitos alimentares, tabagismo, sedentarismo e envelhecimento,

além de fatores como exposição aos raios ultravioletas e inalação de poluentes (Shankar *et al.*, 2019; Urrego *et al.*, 2021).

Atualmente, o câncer é uma séria preocupação em termos de saúde pública, sendo uma das principais causas de óbito globalmente. Em 2020, foram registrados aproximadamente 19,3 milhões de novos diagnósticos e 10 milhões de mortes por câncer (Sung *et al.*, 2021). No contexto brasileiro, conforme as projeções do Instituto Nacional do Câncer (INCA), espera-se que o país registre mais de 704 mil novos casos da doença no triênio de 2023 a 2025 (INCA, 2022).

Dentre estes, excluindo o câncer de pele não melanoma, estima-se que o câncer de mama será o mais incidente, com 74 mil novos casos (10,5%) nesse período. As demais neoplasias com alta incidência incluem o câncer de próstata, com 72 mil novos casos (10,2%); câncer de cólon e reto, com 46 mil casos (6,5%); e câncer de pulmão, com 32 mil casos (4,6%) (INCA, 2022). Essas estimativas destacam a necessidade de estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento eficaz para enfrentar o crescente desafio do câncer no Brasil.

2.2 Bases moleculares do câncer

2.2.1 Ciclo celular

O ciclo celular é o responsável pelo controle da replicação do DNA genômico e sua subsequente segregação em células eucarióticas. Esse processo é executado por uma rede complexa de mecanismos reguladores, verificações e equilíbrio para garantir que nenhum erro seja cometido antes que uma célula possa entrar e progredir através do ciclo celular para se dividir (Matthews; Bertoli; Bruin, 2022).

O ciclo celular mitótico é dividido em dois estágios distintos: interfase e mitose (M). A interfase inicia-se com a fase G1 (gap 1), durante a qual a célula cresce e se prepara para a replicação do material genético, em seguida, na fase S (fase de síntese), ocorre a replicação do DNA, essa etapa é seguida por um segundo intervalo, a fase G2 (gap 2), onde as células se preparam para a mitose, fase M, que resulta na segregação do conteúdo celular em duas células-filhas geneticamente idênticas. Após a fase M, a célula pode seguir para uma nova fase G1 ou entrar em um estado de repouso denominado G0 (Urrego *et al.*, 2014; Sánchez-Martínez *et al.*, 2015).

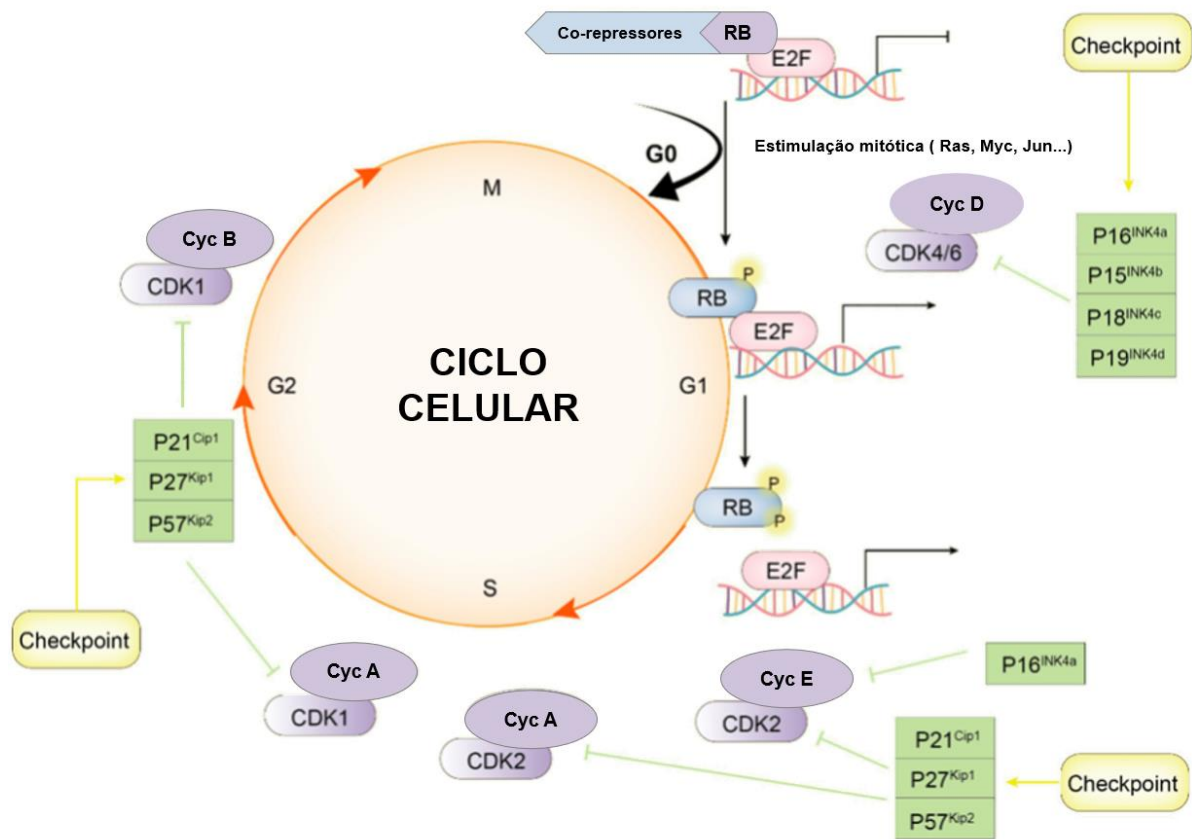
Nesse sentido, as fases de intervalo são essenciais para a regulação do ciclo. Durante a fase G1, a célula toma a decisão de iniciar o ciclo celular, enquanto na fase G2, prepara-se para a segregação dos cromossomos. Esse processo é rigorosamente controlado para garantir que falhas sejam identificadas e corrigidas (Brandmaier; Hou; Shen, 2017).

Diante disso, proteínas dos centros de controle, conhecidas como *checkpoints*, interrompem o ciclo celular para promover o reparo do DNA quando necessário. Essa regulação é governada por uma rede dinâmica de fatores, que inclui proteínas regulatórias chamadas ciclinas, que são pertencentes à família das quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (Moreno-Layseca; Streuli, 2014).

As ciclinas interagem com quinases dependentes de ciclinas (CDKs) para formar complexos que regulam as fases do ciclo celular. O primeiro ponto de verificação ocorre na fase G1, onde estímulos relacionados ao crescimento celular aumentam a síntese de ciclina D, resultando na formação do complexo CDK4/6-ciclina D (Wang; Jiang; Zhang, 2024). Este complexo facilita a fosforilação e a inativação da proteína retinoblastoma (Rb), liberando o fator de transcrição E2F, crucial para a produção das ciclinas A e E na fase S, que são fundamentais para a replicação do DNA.

Durante a fase S, a ciclina E se combina com CDK2 para formar o complexo CDK2-ciclina E, promovendo a hiperfosforilação do Rb e a transição para a fase G2. Em seguida, a ciclina A se associa com CDK2, facilitando a progressão da fase S para a fase G2. Na fase G2, a ciclina A se liga à CDK1, o que possibilita a transição para a fase M. O segundo ponto de verificação, G2-M, é rigorosamente controlado pelo complexo CDK1-ciclina B, que regula a continuidade da mitose durante a fase M (Bonelli *et al.*, 2019) (Figura 2).

Figura 2- Progressão do ciclo celular direcionado por cinases dependentes de ciclina (CDKs)



Legenda: As ciclinas e as CDKs formam complexos que regulam rigorosamente a progressão do ciclo celular nas fases G1, S, G2 e M. O complexo ciclina D-CDK4/6 promove a fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb), liberando o fator de transcrição E2F e ativando genes essenciais para a síntese de DNA. Na fase G2, o complexo ciclina A-CDK2 prepara a célula para a mitose, enquanto o complexo ciclina B-CDK1 coordena eventos mitóticos como a desintegração da membrana nuclear. Inibidores de CDK, como p16, p21 e p27, atuam como pontos de verificação, garantindo o controle adequado da divisão celular. Ras, Myc, Jun são proto-oncogenes envolvidos na estimulação mitótica, e G0 refere-se ao estado de quiescência celular. P15, P18, P19 são inibidores adicionais de CDKs

Fonte: Adaptado de Wang; Jiang; Zhang (2024)

Nesse contexto, os pontos de checagem exercem um controle rigoroso sobre a progressão celular pelas fases do ciclo, garantindo a efetividade da divisão celular. Em contraste, no câncer, as células frequentemente enfrentam uma segregação descontrolada devido a defeitos nos pontos de checagem, particularmente no *checkpoint* de dano ao DNA, o que resulta em uma divisão celular desregulada e contínua (Otto; Sicinski, 2017).

Os agentes antineoplásicos desempenham papel essencial no tratamento do câncer, direcionando fases específicas do ciclo celular para inibir o crescimento tumoral. Esses medicamentos são classificados em duas categorias: específicos do ciclo celular (CCS) e não específicos do ciclo celular (CCNS) (Mendonça *et al.*, 2018).

Os agentes CCS, como os antimetabólitos (por exemplo, metotrexato e fluorouracil), atuam principalmente durante a fase S do ciclo celular. Eles interrompem a síntese de DNA, afetando, assim, as células cancerígenas em rápida divisão. O metotrexato, por exemplo, inibe a diidrofolato redutase, uma enzima essencial para a replicação do DNA. Por sua vez, o fluorouracil interfere na síntese de RNA e DNA (Schweitzer; Dicker, Bertino; 1990; Sramek *et al.*, 2016).

Em contraste, os agentes CCNS, que incluem agentes alquilantes (como a ciclofosfamida) e antraciclinas (como a doxorrubicina), exercem seus efeitos durante todo o ciclo celular, tornando-os eficazes tanto contra células em divisão quanto em repouso. Esses medicamentos induzem danos ao DNA por meio de quebras de fita, visando tumores que podem ter uma proporção significativa de células na fase G0 (Sousa, 2016).

Avanços recentes introduziram inibidores de CDK (como o palbociclib), que visam especificamente as cinases dependentes de ciclina envolvidas na transição da fase G1 para a S, levando à parada do ciclo celular em células de câncer de mama positivas para receptores hormonais (Romão, 2022). Essa abordagem direcionada aumenta a eficácia terapêutica enquanto minimiza os danos às células normais, ressaltando a importância de entender a dinâmica do ciclo celular na terapia do câncer.

2.2.2 Apoptose

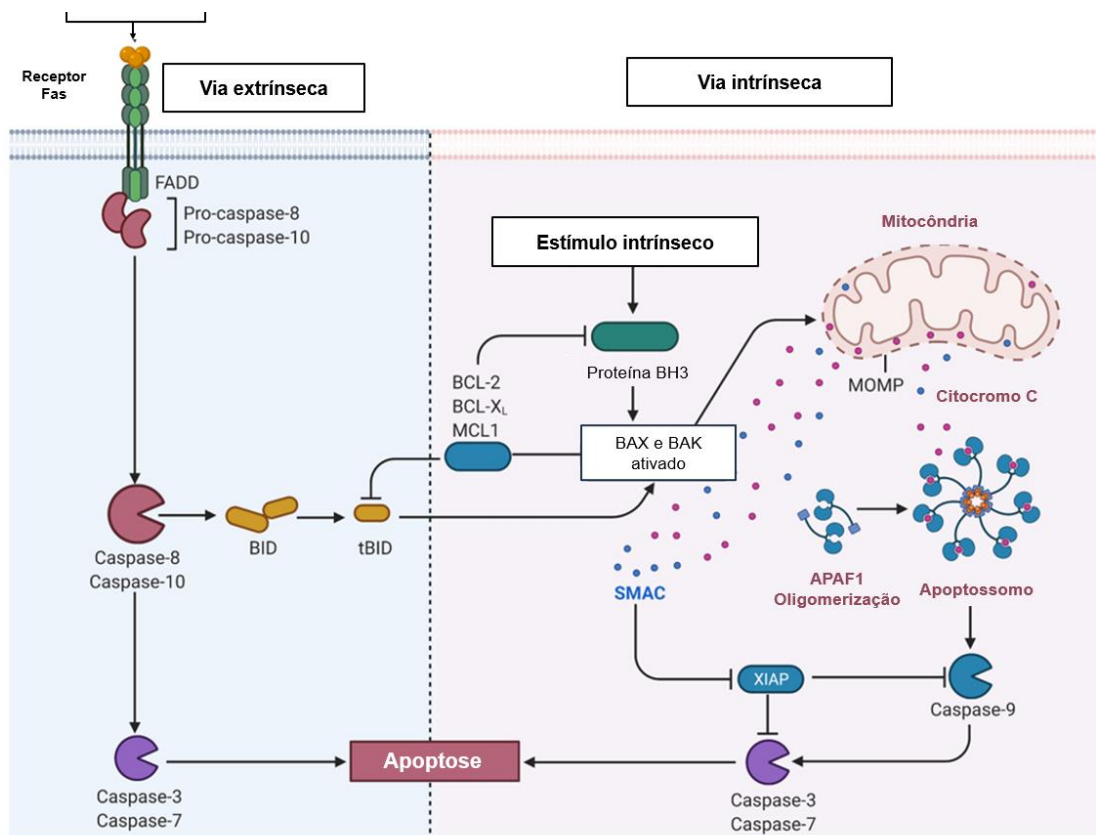
Os mecanismos de morte celular são essenciais para manter a homeostase do organismo, eliminando células danificadas de forma controlada. Entre as principais formas de morte celular estão a apoptose e necrose, que desempenham papéis distintos nesse processo. A apoptose, também chamada de morte celular programada, é fundamental para a manutenção do equilíbrio tecidual, removendo células defeituosas sem causar inflamação, ao contrário da necrose, que está associada a danos patológicos. Sendo, a apoptose, um mecanismo essencial na remodelação tecidual, regulação do sistema imune e remoção de células com danos no DNA (Voss; Strasser, 2020; Yan; Elbadawi; Efferth, 2020).

Nesse contexto, a morte celular programada é um processo altamente regulado, distinguido por uma sequência de eventos moleculares, que incluem o encolhimento celular e a picnose, manifestados pela fragmentação do DNA, condensação da cromatina e compactação do citoplasma. Posteriormente, ocorre a formação de *blebs* na membrana plasmática e a cariorrexe, culminando na separação das células dos tecidos adjacentes e na fragmentação em corpos apoptóticos, que são, então, removidos por células fagocíticas, em um processo facilitado pela exposição de fosfatidilserina na superfície celular, prevenindo uma necrose secundária (Obeng, 2020; Kalinin *et al.*, 2020).

As caspases são proteases de cisteína fundamentais na execução da apoptose, ativando uma cascata de clivagem proteica que resulta na morte celular (Yarychkivska; Shaham, 2020). Elas são classificadas em caspases iniciadoras (2, 8, 9, 10), que desencadeiam a apoptose, e caspases efetoras (3, 6, 7), que executam a destruição celular. Além disso, as caspases inflamatórias (1, 4, 5) participam do processamento de citocinas inflamatórias (Boice; Bouchier-Hayes, 2020; Opdenbosch; Lamkanf, 2019; Obeng, 2020). Essas enzimas são inicialmente sintetizadas como proenzimas inativas e, ao serem ativadas, promovem a amplificação da resposta apoptótica, assegurando a eliminação controlada das células (Boice; Bouchier-Hayes, 2019; Deng; Shah, 2020).

Este processo pode ser desencadeado através de duas principais vias de sinalização: (I) a via extrínseca, mediada por receptores de morte na superfície celular; e (II) pela via intrínseca, também conhecida como mitocondrial, que é regulada por sinais intracelulares (Yan; Elbadawi; Efferth, 2020; Boice; Bouchier-Hayes, 2019) (Figura 3).

Figura 3 Vias intrínseca e extrínseca da apoptose



Legenda: Esquema das vias de apoptose extrínseca e intrínseca. Na via extrínseca, um estímulo externo liga-se ao receptor Fas, que recruta a proteína adaptadora FADD. Isso resulta no recrutamento e ativação das pró-caspases 8 e 10, em caspases 8 e 10. Essas caspases, por sua vez, clivam a proteína BID em tBID, contribuindo para a ativação da via intrínseca. A caspase-8 também ativa diretamente as caspases executoras 3 e 7. Na via intrínseca, um estímulo intracelular ativa proteínas BH3-only, cuja ação sobre as proteínas anti-apoptóticas permite a ativação das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK. Estas promovem a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), resultando na liberação de citocromo C no citoplasma. O citocromo C se liga à proteína APAF1, formando o apoptossomo, que recruta e ativa a pró-caspase-9. A caspase-9 ativa as caspases-3 e 7, levando à morte celular. SMAC também é liberado da mitocôndria e inibe a proteína anti-apoptótica XIAP, que bloqueia a atividade das caspases e morte.

Fonte: Adaptado de Huang *et al.* (2022).

A via intrínseca da apoptose é ativada por estresses celulares que aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial. Esse processo é regulado por um equilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. As proteínas pró-apoptóticas, incluindo BIM, PUMA, BID, BMF, NOXA, BIK, BAD e HRK (denominadas BH3-only), induzem a formação de poros na membrana mitocondrial, facilitando a liberação de citocromo c e SMAC para o

citossol. Em contraste, proteínas anti-apoptóticas como BCL-2, MCL-1, BCL-XL, BCL-W e A1/BFL-1 inibem a ação das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK na ausência de estímulos apoptóticos (Carneiro; El-Deiry, 2020).

O mecanismo de sinalização molecular da via intrínseca inicia-se com a ativação de proteínas pró-apoptóticas, como Bid e Bim, que estimulam efetores como Bax e Bak. Esses efetores formam oligômeros na membrana mitocondrial, criando poros que permitem a liberação de citocromo c e SMAC para o citossol. O citocromo c se associa ao fator 1 ativador de protease apoptótica (APAF-1) e à pró-caspase 9, formando o apoptossomo. A pró-caspase 9 é então ativada por autoclivagem, o que resulta na ativação subsequente das caspases efetoras. Proteínas como SMAC/DIABLO e Ht-A2/Omi desempenham o papel de neutralizar inibidores da apoptose, facilitando a progressão do processo apoptótico (Obeng, 2020; Voss; Strasser, 2020).

A apoptose induzida pela via extrínseca é mediada pela interação entre ligantes de morte e seus respectivos receptores, pertencentes à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), que inclui TNFR1, Fas e receptores do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) (TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5) (Boice; Bouchier-Hayes, 2019). A ativação desses receptores de morte facilita a associação com proteínas adaptadoras como FADD e TRADD. Esta interação resulta na formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC), no qual a caspase 8 ou 10 é recrutada e ativada através do seu domínio efetor de morte (DED). A caspase 8, uma vez ativada, propaga o sinal de morte para caspases efetoras subsequentes, desencadeando a apoptose (Obeng, 2020; Voss; Strasser, 2020).

Em adição, ocorre comunicação entre as vias apoptóticas que leva à amplificação do sinal de morte celular (Voss; Strasser, 2020). Durante esse processo, a caspase 8 é capaz de clivar a proteína BID, gerando o fragmento truncado tBID. Este fragmento, por sua vez, ativa as proteínas BAX e BAK, o que leva à permeabilização da membrana mitocondrial externa (Verma; Singh, 2020).

Nesse contexto, a desregulação dos processos de morte celular é essencial para a tumorigênese. As células tumorais conseguem evitar a apoptose por meio da regulação negativa ou do bloqueio das vias de sinalização apoptótica. O acúmulo de alterações genéticas pode levar a um desequilíbrio na expressão de genes que regulam a apoptose, resultando em um aumento ou diminuição na atividade de genes pró-apoptóticos ou antiapoptóticos (Patergnani *et al.*, 2017).

Modificações epigenéticas, como a metilação dos genes DAPK, ASC/TMS1 e HIC1, têm sido associadas à capacidade das células de evitar a apoptose (Ilango *et al.*, 2020), e essa evasão da morte celular permite que células potencialmente prejudiciais persistam e proliferem, sendo então a apoptose um processo de morte celular essencial para a eliminação de células danificadas ou desnecessárias (Yan; Elbadawi; Efferth, 2020).

No câncer de mama, é comum a presença de mutações no gene supressor tumoral p53, além de alterações epigenéticas específicas. A metilação do gene RASSF1A (isoforma A da família de domínio de associação Ras 1) e do promotor do gene BRCA1 é frequentemente observada. O desenvolvimento do câncer de mama está estreitamente associado a modificações epigenéticas que afetam genes essenciais, com ênfase na metilação das regiões promotoras de genes como BRCA1 e BRCA2, TP53, RASSF1, MGMT e PTEN. Essas alterações epigenéticas desempenham papéis críticos na regulação da expressão gênica e na progressão da doença (Nolan, Lindeman, Visvader, 2023).

Os principais agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama induzem a apoptose, que é essencial para a eliminação de células tumorais. Entre eles estão os antimetabólitos, como a 5-fluorouracila e o metotrexato, que inibem a síntese de DNA e RNA, resultando em danos genéticos e subsequente apoptose. Os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, adicionam grupos alquil ao DNA, levando à apoptose. Os inibidores de topoisomerase, como a doxorrubicina, afetam a resolução dos superenrolamentos do DNA, facilitando a morte celular. Além disso, os taxanos, como o paclitaxel, estabilizam microtúbulos e bloqueiam a mitose, promovendo a morte celular (Zhao *et al.*, 2022; Özerkan, 2023).

2.2.3 Estresse oxidativo e câncer

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e a capacidade antioxidante do organismo. Esse processo resulta na formação excessiva de moléculas altamente reativas, que são geradas em resposta a diferentes estímulos. Quando a produção dessas espécies reativas excede a capacidade de neutralização do sistema antioxidante, ocorre um acúmulo de danos nas macromoléculas celulares, e isso pode comprometer a integridade celular (Huang; Nan, 2019; Kruk *et al.*, 2019).

Nesse contexto, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas derivadas do oxigênio que possuem elétrons desemparelhados em sua camada externa, tornando-as altamente

reativas. Entre as principais ROS estão o ânion superóxido, o radical hidroxila e o óxido nítrico, bem como moléculas não radicais como o peróxido de hidrogênio (Milkovic *et al.*, 2019).

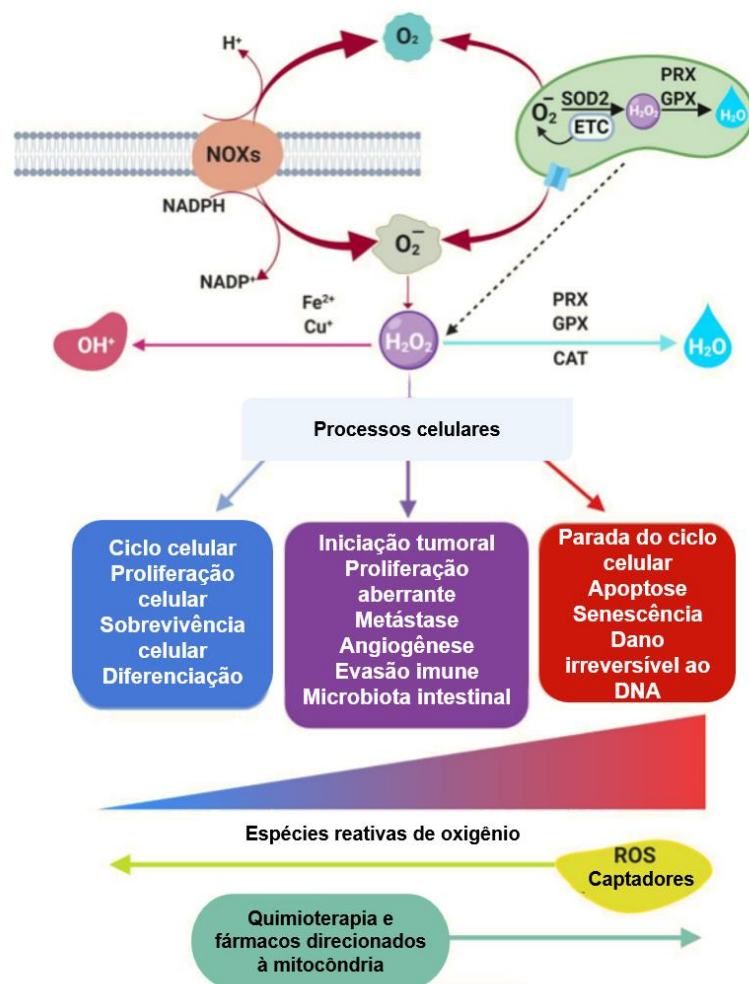
O ânion superóxido é gerado principalmente pela oxidação mediada pela NADPH oxidase e pelo vazamento de elétrons nas mitocôndrias durante a respiração aeróbica. Dentro das células, o superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase, que pode, então, oxidar resíduos de cisteína em proteínas, iniciando cascatas de sinalização redox essenciais para diversas funções celulares (Milkovic *et al.*, 2019; Chatterjee; Chatterjee, 2020).

As ROS/RNS são provenientes de fontes endógenas e exógenas. Entre as principais fontes endógenas, destacam-se as mitocôndrias, o retículo endoplasmático, os peroxissomos, o citosol e o espaço extracelular (Snezhkina *et al.*, 2019; Perillo *et al.*, 2020). Por outro lado, as fontes externas incluem fatores como a exposição à luz ultravioleta, radiação gama, campos eletromagnéticos, e produtos químicos ambientais (Bodega *et al.*, 2019).

É reconhecido que, em concentrações baixas ou moderadas, as ROS e RNS desempenham papéis fundamentais na sinalização celular. Em contraste, quando em níveis elevados, podem causar danos significativos às macromoléculas celulares, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. Assim, essas moléculas têm o potencial de atuarem como importantes reguladores entre processos de sobrevivência e morte celular (Milkovic *et al.*, 2019; Perillo *et al.*, 2020; Prasad; Srivastava, 2020).

Nesse sentido, como o equilíbrio entre ROS/RNS e moléculas antioxidantes é essencial para a manutenção da função celular, estas desenvolveram mecanismos que regulam a eliminação dessas espécies reativas. Nas mitocôndrias, por exemplo, essa proteção é mediada por sistemas de defesa antioxidantes, como a glutathione peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SODs), catalase (CAT) e a peroxirredoxina (PRDX) (Figura 4), além de antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o caroteno. Contudo, níveis elevados de ROS podem exceder a capacidade celular antioxidante, levando ao estresse oxidativo e ao desenvolvimento de doenças como o câncer (Bodega *et al.*, 2019; Snezhkina *et al.*, 2019; Perillo *et al.*, 2020).

Figura 4 - Formação e Regulação de ROS e Seus Efeitos nas Funções Celulares



Legenda: Mitocôndrias e NADPH oxidases geram O₂⁻, HO• e H₂O₂ (ROS). A superóxido dismutase (SOD1 ou SOD2) converte o O₂⁻ em H₂O₂, que é então convertido em água (H₂O) por peroxirredoxina (PRX), glutatona peroxidase (GPX) e catalase (CAT). Níveis baixos de ROS (azul) mantêm a proliferação e sobrevivência celular normais. Níveis moderados a altos de ROS (vermelho claro) favorecem o crescimento tumoral, metástase e angiogênese. Níveis extremamente altos de ROS (vermelho escuro), produzidos por quimioterapia, causam apoptose e danos ao DNA.

Fonte: Adaptado de Kirtonia; Sethi; Garg (2020).

No câncer, as ROS e RNS exercem um papel dual, em baixas concentrações, podem promover a progressão tumoral, causando alterações genéticas moleculares, bem como aumentar a resistência a tratamentos. No entanto, essas espécies reativas podem também inibir o crescimento tumoral, induzindo citotoxicidade através do aumento do estresse oxidativo, que conduz essas células à morte (Kumari; Badana; Malla, 2018; Yang; Chen; Shi, 2019).

Entretanto, as células tumorais podem adaptar-se a esse estresse oxidativo utilizando mecanismos antioxidantes presentes também nelas, o que facilita sua sobrevivência (Galadari *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020)

No câncer de mama, a desregulação das espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenha papel essencial na progressão da doença (Kumari; Badana; Malla, 2018). A atividade desregulada de NADPH oxidase (NOX) resulta em níveis elevados de ROS, contribuindo para a tumorigênese. Adicionalmente, foi evidenciado no câncer de mama, níveis elevados de monoamina oxidase A (MAOA), bem como da proteína dissulfeto isomerase (PDI), oxidoredutina-1 do RE (ERO1) e o sistema microsomal monooxigenase (MMO), provenientes do estresse oxidativo do retículo endoplasmático (Snezhkina *et al.*, 2019; Chatterjee; Chatterjee, 2020).

A via de sinalização PI3K/PTEN, crucial para o crescimento e sobrevivência tumoral, tem sua regulação influenciada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). O superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem hiperativar a via PI3K/AKT/mTOR ao oxidar e inativar fosfatases como PTEN, PTP1B e PP2A. Ademais, as ROS promovem a degradação de PTEN por proteassomas e ativam a via PI3K/AKT ao interagir com estrogênio e fatores de crescimento, favorecendo a tumorigênese e a sobrevivência das células cancerosas no câncer de mama (Garg *et al.*, 2017).

Em contrapartida, alguns quimioterápicos utilizam o aumento do estresse oxidativo para induzir a apoptose nas células tumorais. Drogas como antraciclinas e inibidores de topoisomerase, incluindo doxorubicina e epirrubicina, bloqueiam a síntese de DNA e a atividade de topoisomerase II, resultando em aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial e estresse oxidativo (Garg *et al.*, 2017; Mikuła-pietrasik *et al.*, 2019). Além dessas, drogas baseadas em platina, como cisplatina, são eficazes ao manter altos níveis de ROS, o que leva à morte celular. E o 5-fluorouracil, sensibiliza tumores ao aumentar o estresse oxidativo de forma dependente de p53. Essas estratégias exploram a vulnerabilidade celular aos danos oxidativos (Yang, 2018; Kirtonia; Sethi; Garg 2020).

Nesse contexto, o desenvolvimento de fármacos que promovam a morte das células tumorais por meio do aumento dos níveis de ROS e estresse oxidativo revela-se uma abordagem promissora no tratamento do câncer.

2.2.4 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

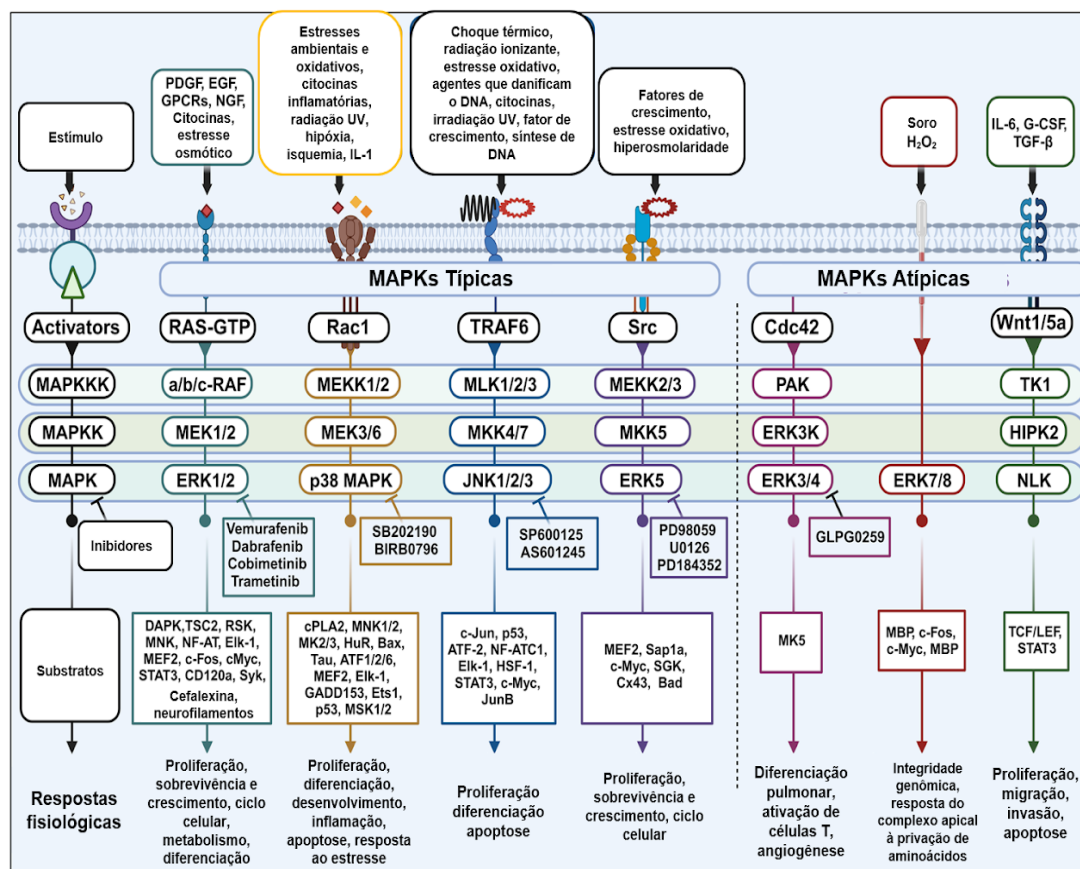
Os organismos vivos possuem a capacidade intrínseca de reagir a estímulos provenientes do ambiente externo. A célula, sendo a unidade fundamental da resposta a esses estímulos, converte sinais recebidos do meio extracelular, como fatores de crescimento, citocinas e hormônios, em complexas cascatas de sinalização intracelular (Ma; Nicolet, 2023; Park; Baek, 2022). Esses sinais são processados por vias de sinalização que possibilitam a transdução dessas informações para respostas celulares específicas e adaptativas. A transdução eficiente e precisa desses sinais é necessária para a regulação das funções celulares e a manutenção da homeostase do organismo (Ma; Nicolet, 2023).

Nesse sentido, as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) constituem uma família de proteínas de sinalização que desempenham papel central na regulação de diversos processos celulares, como a proliferação, diferenciação e resposta ao estresse. A disfunção na regulação dessas cinases está associada ao desenvolvimento de patologias, incluindo câncer, processos inflamatórios, distúrbios no desenvolvimento e várias doenças neurológicas (Bahar; Kim; Kim, 2023).

As cascatas de MAPKs são ativadas por estímulos extracelulares, transmitindo sinais que regulam distintos processos celulares (Kciuk *et al.*, 2022). Entretanto, cada cascata exerce um papel predominante em processos específicos. Nos mamíferos, foram identificados 14 tipos de MAPK que estão agrupadas em três categorias: (I) Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares 1 e 2 (ERK1/2); Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno p38 (p38 α MAPK, p38 β MAPK, p38 γ MAPK e p38 δ MAPK); e as Cinases c-Jun N-terminal 1, 2 e 3 (JNK1, JNK2 e JNK3, respectivamente) (Wu; Becker; Park, 2020; Maik-Rachline; Wortzel; Seger, 2021).

Nesse contexto, a ativação destas vias ocorrem através de um modelo em cascata, envolvendo três componentes principais: MAPKKK (MAP cinase cinase cinase), MAPKK (MAP cinase cinase) e MAPK (MAP cinase). O processo inicia-se com a ativação de uma MAPKKK, que fosforila e ativa uma MAPKK subsequente. Posteriormente, a MAPKK fosforila uma MAPK, que, por sua vez, fosforila diversos alvos celulares, como a Proteína Cinase Ativada por ERK (RSK), e o fator de transcrição c-JUN (García Hernández *et al.*, 2022). (Figura 5).

Figura 5 Cascatas de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK)



Legenda: As cascatas de proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) desempenham papéis importantes em processos fisiológicos. Cada cascata é composta por uma via sinalizadora de três camadas, na qual cada cinase é ativada em sequência, sendo os componentes MAPK altamente conservados. A primeira camada inclui as cinases MAPKKK (ou MEKKs), ativadas por estímulos específicos, que fosforilam e ativam as MAPKK (ou MEKs). As MAPKKs, por sua vez, são cinases com especificidade dupla, capazes de fosforilar resíduos de treonina ou tirosina, ativando a MAPK terminal de serina/treonina. Esse processo culmina na ativação de diversas proteínas citoplasmáticas e nucleares, as quais participam de várias funções biológicas.

Fonte: Adaptado de Bahar, Kim, Kim (2023)

Nos últimos anos, a interação entre as famílias JNK e p38 tem sido investigada de forma mais detalhada, revelando seu complexo papel em diversos tipos de câncer. As vias de cinase Jun N-terminal (JNK) e p38, classificadas como cinases ativadas por estresse (SAPKs), frequentemente apresentam desregulação em contextos oncológicos (Lavoie; Gagnon; Therrien, 2020).

No câncer de mama, a via das MAPKs, desempenha papel essencial na regulação de processos que afetam o desenvolvimento e progressão do tumor. MicroRNAs (miRNAs),

pequenos RNAs não codificantes conservados, modulam a sinalização da via p38 MAPK em resposta a diversos ativadores, exercendo funções tanto na oncogênese quanto na inflamação. Assim, foi demonstrado que o cluster miRNA-17-92 está frequentemente superexpresso em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, onde promove funções pró-tumorais e contribui para a progressão da doença (García Hernández *et al.*, 2022).

2.2.4.1 Proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK)

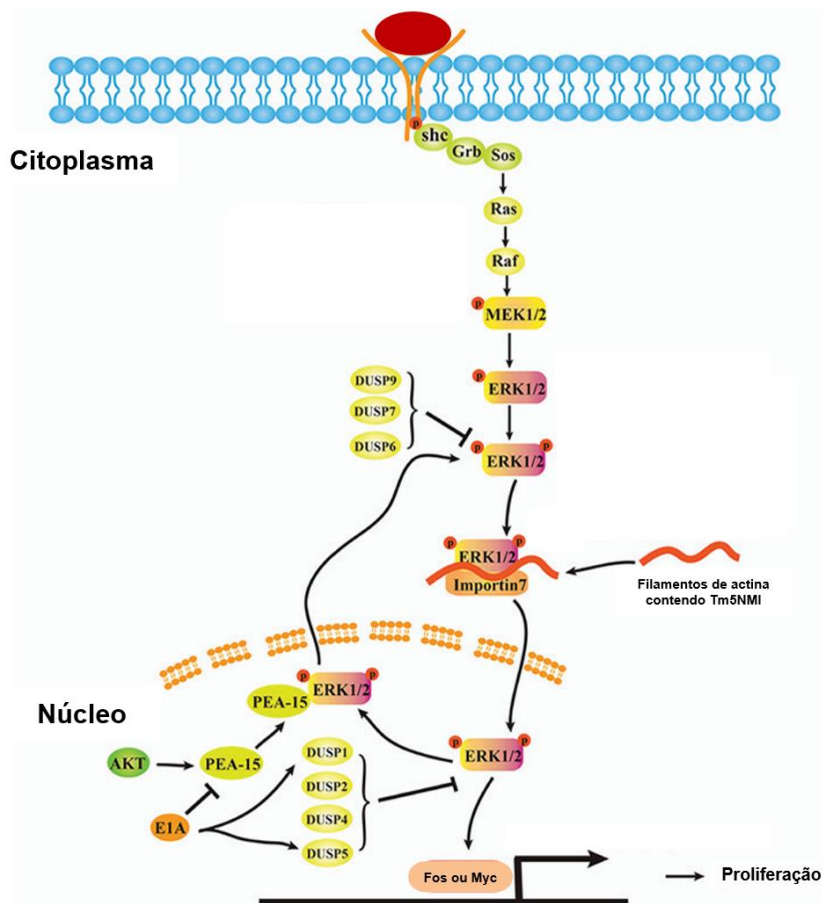
A Proteína Cinase Regulada por Mitógeno (ERK) é essencial para a regulação de várias funções celulares, como crescimento, diferenciação e sobrevivência (Lavoie; Gagnon; Therrien, 2020). A ERK integra a via de sinalização das MAPKs (Cinases Ativadas por Mitógeno), desempenhando um papel central na conversão de sinais extracelulares em respostas celulares específicas (Maik-Rachline; Wortzel; Seger, 2021).

Essa via de sinalização é iniciada quando ligantes extracelulares interagem com os Receptores de Tirosina Cinase (RTKs). Essa interação leva a dimerização do receptor e à transfosforilação dos resíduos de tirosina em seus domínios intracelulares. Como consequência, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras, destacando-se a Proteína Ligada ao Receptor do Fator de Crescimento 2 (Grb2) (Sabbah; Hajjo; Sweidan, 2020; Cordover *et al.*, 2020; Cordover *et al.*, 2020).

A partir dessa interação (Grb2/RTKs) fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) são recrutados, a exemplo da proteína *son of sevenless* (SOS) e promovem a troca do difosfato de guanosina (GDP) pelo trifosfato de guanosina (GTP) na proteína Ras, ativando-a e, com isso, estimulando a formação de dímeros das proteínas Raf (A-Raf, B-Raf e C-Raf) (Júnior, 2019; Baltanás *et al.*, 2020; Park; Baek, 2022; Seiler *et al.*, 2022).

As proteínas Raf fosforilam e ativam as Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos 1 e 2 (MEK1/2) e estas, agora ativadas, fosforilam uma sequência de resíduos treonina-glutamato-tirosina no segmento de ativação das proteínas ERK1/2, tornando-as ativas e capazes de fosforilar diversos alvos, tanto citoplasmáticos, quanto nucleares, incluindo os fatores de transcrição (Ullah *et al.*, 2022; (Zhang *et al.*, 2022) (Figura 6).

Figura 6 Cascata de sinalização das Proteínas Cinasas Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK)



Legenda: Representação esquemática da via de sinalização MAPK/ERK, destacando sua importância na proliferação celular. A ativação desta via se inicia com a ligação de um fator de crescimento ao receptor de tirosina quinase na membrana plasmática, levando à ativação da proteína Ras. Ras ativa a cascata de fosforilação que envolve Raf, MEK1/2 e ERK1/2. As proteínas ERK1/2 fosforiladas translocam-se para o núcleo através de importinas (como Importin7) ou interagem com os filamentos de actina contendo Tm5NMI no citoplasma. No núcleo, ERK1/2 regula a transcrição de genes como Fos e Myc, promovendo a proliferação celular. Diversas proteínas reguladoras, como DUSPs (fosfatases que desfosforilam ERK1/2) e PEA-15, modulam a atividade dessa via em diferentes pontos, garantindo um controle adequado da resposta proliferativa.

Fonte: Adaptado de Zou *et al.* (2019).

A regulação desta via é fundamental para a preservação da homeostase celular e é realizada pelas fosfatases de dupla especificidade 5 e 6 (DUSP5 e DUSP6), que promovem a desfosforilação e a inativação das ERK1/2 (Júnior, 2019; Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021).

No câncer, a via de sinalização MAPK/ERK é fundamental para o desenvolvimento da doença, uma vez que promove a proliferação e a migração celular, ativada predominantemente por fatores de crescimento (Guo *et al.*, 2020). Especificamente no câncer de mama, a sinalização ERK1/2, em interação com o TGF β , é crucial para induzir a transição epitelial-mesenquimal (EMT), facilitando o surgimento de características invasivas e metastáticas nas células epiteliais mamárias (Yuan *et al.*, 2020).

Em contrapartida, a sinalização ERK1/2 também pode induzir a morte celular em determinadas circunstâncias. Tal efeito pode ocorrer através da via intrínseca, mediada pela liberação de citocromo c e ativação da caspase-9, ou pela via extrínseca, dependendo da ativação da caspase-8. Diversos estímulos têm sido associados à indução da morte celular mediada pela ERK1/2, incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e agentes quimioterápicos como a doxorrubicina (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021).

Nesse contexto, estudos com produtos naturais têm evidenciado essa relação. Potočnjak e colaboradores (2020) demonstraram que o efeito citotóxico do flavonoide luteolina se dava pela provável ativação da via ERK1/2 e a forkhead box O3a (FOXO3a), resultando em aumento da apoptose e supressão da autofagia em células tumorais

Diante do exposto, considerando o papel dual da ativação de ERK, que pode tanto promover características típicas do câncer, como a proliferação desregulada e resistência à morte celular programada, quanto induzir efeitos citotóxicos, a estratégia de direcionar e inibir a via de sinalização ERK é considerada uma abordagem promissora para combater os fenótipos malignos.

2.2.4.2 Proteínas cinases c-jun N-terminal (JNK)

A proteína cinase JNK (c-Jun N-terminal kinase) apresenta três principais isoformas: JNK1, JNK2 e JNK3, cada uma codificada por genes distintos localizados em cromossomos diferentes. Essas isoformas são conhecidas por nomes alternativos, como JNK1 (p46 ou SAPK γ), JNK2 (p54 ou SAPK α) e JNK3 (p493F12 ou SAPK β), e estão envolvidas na regulação da expressão gênica. Especificamente, JNKs ativam a proteína c-Jun por meio da fosforilação de resíduos específicos de serina na extremidade N-terminal (Nakano; Nakayama; Sugiya, 2020; Maik-rachline; Wortzel; Seger; 2021; Latham; O'donnell; Croucher, 2022).

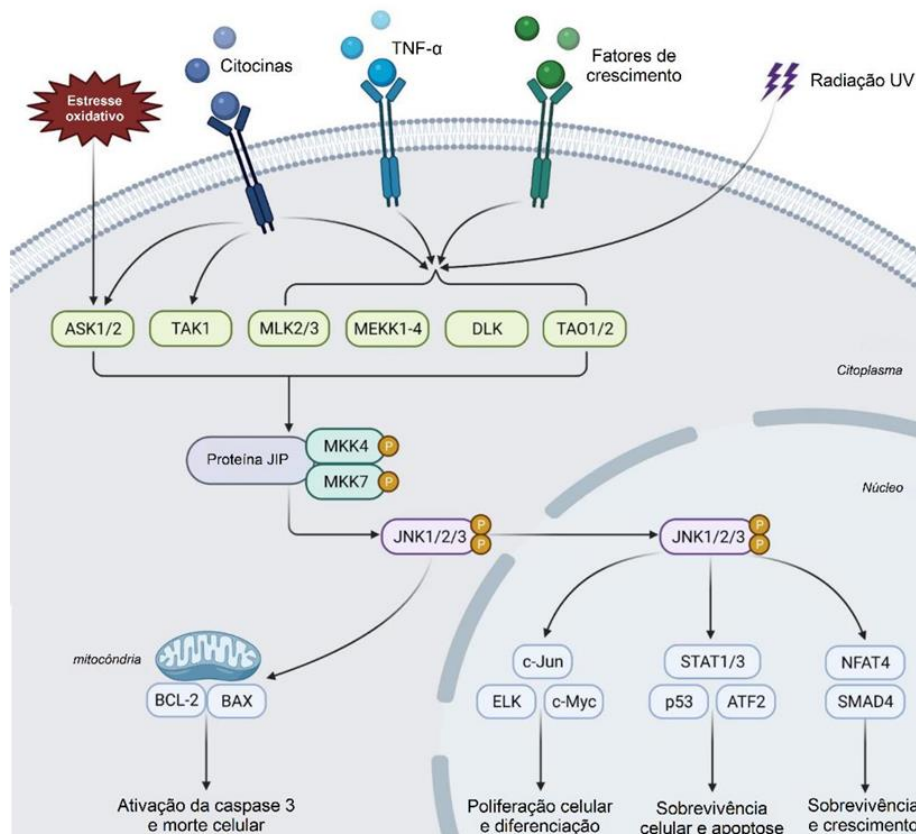
Nesse contexto, a JNK, uma proteína da família MAPK, é predominantemente ativada em resposta a estímulos de estresse. Sua ativação ocorre por meio da fosforilação de seus

resíduos de tirosina (Tyr) e treonina (Thr), em um processo mediado pelas MAPKKs (MKK4 e MKK7), que atuam como reguladores *upstream* da JNK (Bubici; Papa, 2014; Gkouveris; Nikitakis, 2017).

Uma vez ativada, a JNK promove a fosforilação das proteínas Jun (JunB, JunD e c-Jun), o que leva à sua dimerização com proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra-1/2), formando o fator de transcrição AP-1 (activator protein-1). Esta formação resulta na ativação do programa transcricional dos genes-alvo (Bubici; Papa, 2014; Gkouveris; Nikitakis, 2017).

As JNKs ativadas são importantes reguladoras da transcrição de p53 e das proteínas da família BCL2, como BCL2, BCL-xL, BAD, BIM e BAX (Figura 7). Essas vias de sinalização são essenciais para a modulação de processos celulares, incluindo a apoptose e proliferação celular, a resposta imunológica, a sinalização de insulina e as funções neuronais (Maik-rachline; Wortzel; Seger; 2021).

Figura 7 Ativadores e Alvos da Via de Sinalização JNK



Legenda: Ativadores upstream e alvos downstream da via JNK. Diversos estímulos, como citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fatores de crescimento, ativam as MAPKKKs, enquanto estresse oxidativo e radiação UV também podem ter esse efeito. A proteína JNK-interacting protein-1 (JIP1) conecta as MAPKKKs e MAPKKs às JNKs, facilitando sua ativação. JNKs ativadas podem induzir apoptose mitocondrial por meio das proteínas BCL-2 e BAX, ou promover a transcrição de genes relacionados à proliferação, diferenciação, crescimento e apoptose celular por meio da fosforilação de seus alvos downstream.

Fonte: Adaptado de Pua *et al.* (2022)

Ademais, a via JNK está implicada em processos patológicos, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como fibrose pulmonar idiopática (Popmihajlov *et al.*, 2022), doenças neurodegenerativas, psoríase e câncer (Hammouda *et al.*, 2020; Corrales; Losada-Pérez; Casas-Tintó, 2021). Por outro lado, sua atividade é rigorosamente regulada por fosfatases, incluindo as DUSP (DUSP1, DUSP2 e DUSP3) (Ha *et al.*, 2019).

As proteínas JNK podem ser ativadas por uma variedade de estímulos, resultando em respostas celulares complexas e, por vezes, contraditórias. No contexto do câncer de mama, JNK tem sido associada à promoção da doença. Estudos indicam que, particularmente no subtipo triplo-negativo (TNBC), a via JNK/c-Jun está associada ao aumento da invasividade das células tumorais (Han *et al.*, 2022). Além disso, essa via de sinalização tem sido implicada na tumorigênese de vários tipos de câncer, incluindo fígado, mama, pele, e tumores cerebrais, destacando seu papel crucial na progressão tumoral (Wu *et al.*, 2020).

Em contrapartida, evidências sugerem que a JNK também possui um papel antitumoral, tornando-a um alvo atrativo para o tratamento do câncer (Abdelrahman *et al.*, 2021). Por exemplo, em células de carcinoma ovariano, Dou e colaboradores (2019) demonstraram que a ativação positiva da JNK pode promover a morte celular dependente de autofagia.

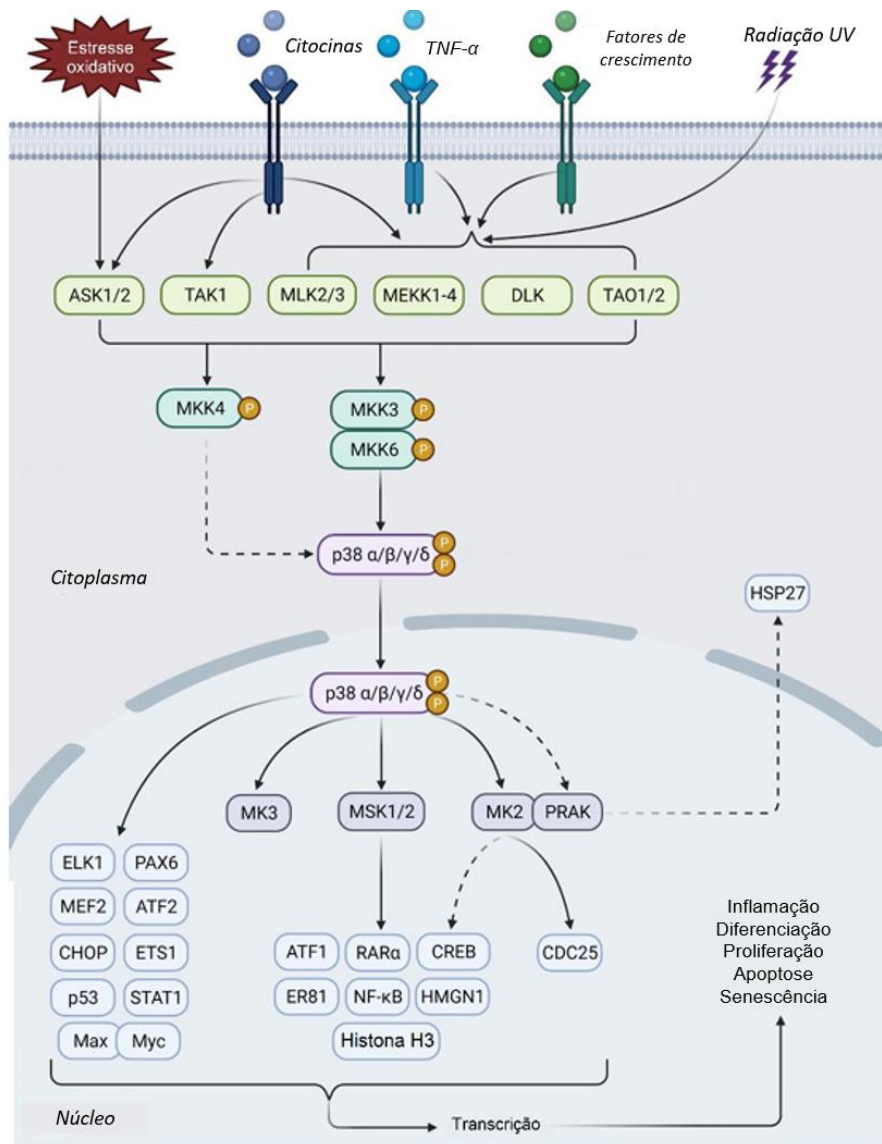
Pesquisas envolvendo produtos naturais têm evidenciado o papel duplo dessa via como perspectiva no tratamento do câncer. Em um estudo conduzido por Wang e colaboradores (2019), foi demonstrado que um análogo da curcumina, o WZ35, pode promover a morte celular ao induzir a ativação da JNK mediada por estresse oxidativo em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231). Em contraste, Zhang e colaboradores (2019) mostraram que o tratamento com TAN-II, um composto isolado da *Salvia miltiorrhiza*, inibiu a via JNK, resultando na morte de células de câncer de ovário.

2.2.4.3 Proteínas cinases ativadas por mitógenos p38 (P38 MAPK)

A p38 MAPK (Cinase Proteica Ativada por Mitógeno) é uma serina/treonina cinase que faz parte da família das MAPKs. Possui quatro isoformas principais: p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ . Enquanto a p38 α (MAPK14) é amplamente expressa em praticamente todos os tipos celulares, as demais isoformas apresentam distribuição mais específica (Corre; Paris, 2017, Canovas; Nebreda, 2020).

As isoformas desta proteína são ativadas em resposta a uma variedade de estresses ambientais, como a liberação de citocinas inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Além destes, são ativadas em condições de estresse oxidativo associadas à exposição à radiação UV, situações hipóxicas e episódios de isquemia (García-hernández *et al.*, 2021) (Figura 8).

Figura 8 Via de sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK)



Legenda: A via de sinalização da p38 MAPK é ativada por estresse oxidativo, citocinas, TNF- α , fatores de crescimento e radiação UV. Após a ativação de receptores na membrana, quinases iniciadoras (como ASK1/2, TAK1, MLK2/3) fosforilam MKK3, MKK4 e MKK6, que ativam as isoformas da p38 (α , β , γ , δ). A p38 ativada regula fatores de transcrição (como ATF2, p53, CREB e NF- κ B) e proteínas citoplasmáticas (como MK2, MSK1/2), influenciando processos como inflamação, proliferação, apoptose e senescência celular, além de ativar HSP27 (proteína de choque térmico 27 kDa), importante na resposta ao estresse celular.

Fonte: Adaptado de Pua *et al.*, (2022).

Nesse contexto, a ativação dessa via inicia quando proteínas da família Rho GTPase, (Rac e Cdc42), que atuam a montante da cascata de sinalização, são ativadas. Estas proteínas ativam as MAPKKKs (MAP3Ks), como MEKK3, MEKK4 e TAK1 (cinase 1 ativada por

TGFβ) e ASK1 (cinase 1 reguladora do sinal de apoptose), que, por sua vez, ativam as MAPKKs (MAP2Ks) MKK3 e MKK6, estas duas fosforilam os resíduos Thr180 e Tyr182 da p38 MAPK, tornando-a ativa. Além desta, existe uma via de ativação não canônica, que ocorre em células T. Nessa via, a p38 MAPK é ativada pela fosforilação no resíduo Tyr323 mediada pela ZAP70 (proteína cinase associada à cadeia ζ da célula T) (De nicola *et al.*, 2013; García-hernández *et al.*, 2021).

No câncer, a via p38 MAPK exerce influência sobre diversos aspectos. Ela está envolvida na regulação da inflamação crônica, a qual favorece a sobrevivência das células tumorais, angiogênese, invasão celular e metástase. A p38 MAPK também atua sobre a expressão de mediadores inflamatórios, como proteases e citocinas, que facilitam o desenvolvimento e a progressão tumoral. Além disso, no microambiente tumoral (TME), a p38 MAPK impacta as interações entre células normais e imunes, moléculas como citocinas e quimiocinas, e a matriz extracelular, que sustenta e contribui para a complexidade do TME (Barker *et al.*, 2015; Roche *et al.*, 2020; García-hernández *et al.*, 2021).

A via p38 MAPK exerce um efeito dual no tratamento do câncer de mama, influenciando tanto a resistência ao tratamento quanto a eficácia dos quimioterápicos. De um lado, a p38 MAPK contribui para a resistência a vários agentes, como a cisplatina, ao promover a sobrevivência das células tumorais. Por outro lado, a inibição dessa via tem demonstrado potencial para aumentar a eficácia de quimioterapias convencionais, como 5-fluorouracil (5-FU) e irinotecano (Igea; Nebreda, 2015), além de reduzir a resistência ao tamoxifeno ao interferir na atividade do VEGF (Lee; Rauch; Kolch, 2020). A p38 MAPK também desempenha papel na resposta a medicamentos genotóxicos, como a doxorrubicina, induzindo a senescência das células estromais associadas ao tumor, oferecendo uma estratégia promissora para potencializar o tratamento do câncer (Bent; Gilbert.; Hemann, 2016).

Nesse contexto, estudos recentes têm demonstrado que tanto compostos naturais quanto sintéticos exercem efeitos antitumorais por meio da ativação da via de sinalização p38 MAPK. Zhang e colaboradores (2019) investigaram o efeito da lobaplatina em células de adenocarcinoma pulmonar A549 e encontraram que a indução de apoptose nessas células é mediada pelo estresse oxidativo e pela ativação da via p38 MAPK. De maneira análoga, Kim e colaboradores (2015) mostraram que a berberina induz apoptose em células de câncer oral (KB) através da ativação desta mesma via.

Assim, a regulação da via p38 MAPK destaca-se como uma abordagem potencialmente eficaz no desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer.

2.2.5 Fator nuclear kappa B (NF-κB) e o câncer

A família NF-κB é composta por cinco fatores de transcrição distintos que formam dímeros homólogos ou heterólogos: c-Rel, RelA (p65), RelB, NF-κB1 (p105/p50) e NF-κB2 (p100/p52). Estes fatores são essenciais na regulação de processos celulares como inflamação, sobrevivência celular e resposta imune, desempenhando papéis críticos em diversas patologias, incluindo câncer e doenças inflamatórias (Han *et al.*, 2023).

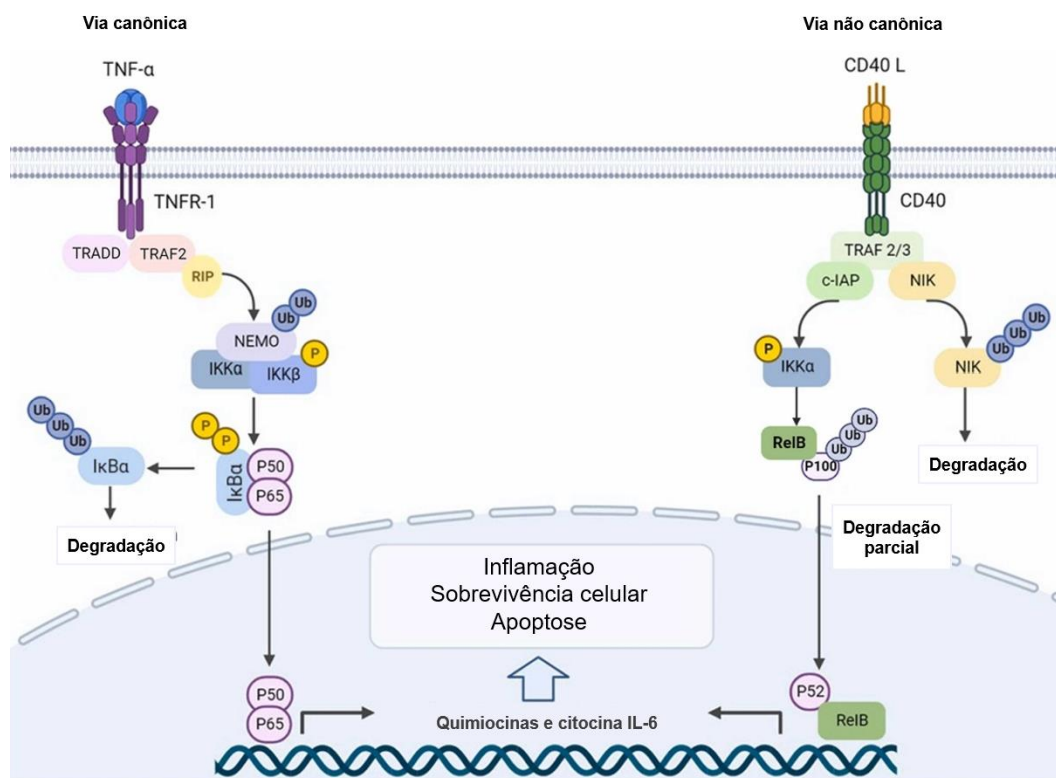
A ativação da sinalização do NF-κB ocorre através de duas rotas: a via canônica e a via não canônica, cada uma ativada por diferentes estímulos e conduzindo à ativação de conjuntos distintos de genes. O complexo de proteínas cinases IKKs, que inclui as subunidades IKKα (IKK1), IKKβ (IKK2) e IKKγ (NEMO), desempenha papel central na mediação dessas vias (Cheng *et al.*, 2023; Mussbacher *et al.*, 2023).

A primeira, a mais estudada, pode ser ativada por citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e componentes microbianos, bem como pela ativação de receptores como o do receptor do fator de necrose tumoral α (TNFR), dos receptores de interleucina-1 (IL-1R) e dos receptores Toll-like (TLR), e depende da participação essencial de IKKβ (Shih; Wang; Yang, 2015; Kim *et al.*, 2022).

Quando ativada, IKKβ fosforila a proteína IκB, formado pelas subunidade IKKα, IKKβ e pelo modulador essencial de NF-κB (NEMO/IKKγ), que normalmente mantém o NF-κB inativo no citoplasma. Uma vez fosforilada, a IκB é ubiquitinada e degradada pelo proteassoma, liberando o NF-κB para translocar-se ao núcleo. No núcleo, o NF-κB se liga a regiões específicas do DNA, ativando a transcrição de genes relacionados à inflamação, sobrevivência celular e respostas imunes (Xu; Lei, 2021; Mussbacher *et al.*, 2023).

Por outro lado, na via não canônica, o evento-chave é o processamento da proteína precursora p100, em vez da degradação de IκBα. Essa via responde a estímulos específicos, como ligantes para receptores TNF, incluindo o receptor β da linfotóxina (LTβR), CD40, o fator de ativação de células B (BAFF) e o receptor ativador de NF-κB (RANK). A ativação desses receptores leva à degradação do TRAF3 (fator associado ao receptor TNF 3), que normalmente estabiliza a cinase NIK. A redução do TRAF3 permite a estabilização e ativação de NIK, que, junto com IKKα, fosforila p100. A p100 é então ubiquitinada e processada para gerar p52, que se associa com RelB para formar o heterodímero p52/RelB. Esse complexo transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes específicos (Grondona *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019) (Figura 9).

Figura 9 Vias mediadas por NF- κ B



Legenda: NF- κ B atua por duas vias principais: canônica e não canônica. Na via canônica, a ligação do TNF α ao TNFR-1 recruta TRADD, TRAF2 e RIP, formando um complexo que ativa IKK β . IKK β fosforila e degrada I κ B α , liberando o complexo p50-p50 para translocar ao núcleo e ativar genes de NF- κ B. Na via não canônica, a ligação de ligantes ao CD40 recruta TRAF2 e TRAF3, que ativam NIK. NIK fosforila e ativa IKK α , resultando na conversão de p100 em p52. O p52-RelB transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes regulados por NF- κ B.

Fonte: Adaptado de Pavitra *et al.* (2023).

A desregulação das vias de sinalização do NF- κ B está associada a condições patológicas como inflamação crônica, doenças autoimunes e neoplasias malignas (Zhang *et al.*, 2021). Evidências recentes indicam uma correlação entre processos inflamatórios e o desenvolvimento do câncer (Hanahan, 2022). No contexto oncológico, a via de sinalização NF- κ B desempenha papel fundamental na progressão tumoral ao promover a transcrição de genes envolvidos em processos críticos, como a proliferação celular e a resistência à apoptose, a invasão tecidual, a formação de metástases e a angiogênese (Deka; Li, 2023).

NF- κ B é um fator de transcrição que conecta a inflamação ao câncer, desempenhando um papel fundamental na tumorigênese do câncer de mama e na resistência à terapia endócrina.

Em tipos agressivos de câncer de mama, como os inflamatórios e o câncer de mama triplo-negativo (TNBC), foi relatado uma superexpressão de NF- κ B e alterações como mutações em p53, que modificam a interação entre p53 e NF- κ B, modulando sua atividade transcricional e contribuindo para a progressão tumoral (Liu *et al.*, 2017; Finlay-schultz *et al.*, 2020; Pavitra *et al.*, 2023).

A ativação de NF- κ B neste câncer pode ocorrer como resultado da superexpressão de EGFR e Her2, que ativam NF- κ B via PI3K/Akt. Além disso, mutações em p53 também favorecem a ativação de NF- κ B, facilitando a angiogênese (Divella *et al.*, 2009). NF- κ B regula a expressão do fator de transcrição FOXC1, importante para o câncer de mama basal. Dessa forma, a inibição da via EGFR-NF- κ B surge como uma estratégia promissora para o tratamento de diversos tipos de câncer (Jin *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2017).

Entretanto, apesar de o efeito pró-tumoral da via NF- κ B ser amplamente documentado, alguns estudos indicam que a citotoxicidade de determinados fármacos antitumorais pode depender da ativação dessa via. Por exemplo, Riganti e colaboradores (2008) demonstraram que a ativação da via NF- κ B pela sinvastatina potencializa a citotoxicidade da doxorubicina em células malignas da linhagem HT-29, um modelo de câncer colorretal. Esses achados sugerem que a via NF- κ B pode representar um alvo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas direcionadas ao tratamento do câncer.

2.3 Câncer de mama: características gerais e tratamento

O câncer de mama é resultante da multiplicação desordenada de células malignas originadas das glândulas mamárias. É o tipo mais frequentemente diagnosticado entre as mulheres, com cerca de 2,3 milhões de novos casos e mais de 685.000 mortes registradas no ano de 2020 (Sung *et al.*, 2021). Sua incidência está associada tanto a fatores genéticos quanto a fatores não genéticos, como exposição à radiação, estilo de vida, densidade mamográfica e influência de hormônios femininos (Chamorro *et al.*, 2021; INCA, 2022).

A apresentação patológica do câncer de mama é heterogênea, resultante da interseção entre alterações genômicas, expressão gênica e comunicação com o ambiente tumoral. Esses aspectos influenciam coletivamente o comportamento clínico e a resposta ao tratamento. Para entender melhor este câncer e escolher a estratégia terapêutica mais adequada, realiza-se a categorização com base na presença ou ausência de receptores hormonais, características

moleculares, histológicas e capacidade de disseminação (Schultz., 2012; Prat *et al.*, 2014 Tarantino *et al*, 2020; Nolan, Lindeman, Visvader, 2023).

Nesse sentido, de acordo com a classificação por receptores, ele pode ser subdividido em três categorias principais: aqueles que expressam receptores hormonais, como o receptor de estrogênio (ER+) ou progesterona (PR+); aqueles que apresentam o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2+); e o câncer de mama triplo-negativo, que não exibe nenhum desses receptores. Ademais, este último, é classificado em subtipos adicionais, como basal-like 1 (BL-1), basal-like 2 (BL-2), imunomodulatório (IM), mesenquimal (M), semelhante a células-tronco mesenquimais (MSL) e receptor de andrógeno luminal (LAR) (Tarantino *et al*, 2020; Nolan, Lindeman, Visvader, 2023).

Na classificação molecular o câncer de mama é agrupado em cinco categorias: Lumial A (ER+PR+) apresentando melhor prognóstico devido a alta expressão de genes lumiais; Lumial B (ER+) que, apesar de expressar o receptor de estrogênio, apresenta uma menor expressão de genes lumiais e maior proliferação, resultando em um prognóstico mais desfavorável em relação ao anterior; HER2-enriquecido (HER2-E), que possui o gene HER2 amplificado; Basal-like, altamente proliferativo e frequentemente triplo negativo. Finalmente, Claudina-baixo, geralmente triplo-negativo e com menor sensibilidade à quimioterapia. Este tipo de classificação baseia-se na expressão de genes lumiais, como o ESR1 (receptor de estrogênio), GATA3, XBP1 e FOXA1, cuja presença está associada a tumores menos agressivos e resposta mais favorável a terapias hormonais (Schultz., 2012; Prat *et al.*, 2014; Thennavan *et al.*, 2021).

A classificação histológica dos cânceres de mama é baseada no padrão de crescimento das células tumorais. O mais prevalente é o carcinoma ductal invasivo do tipo não especial (IDC-NST), responsável por aproximadamente 70% a 80% dos casos de câncer invasivo de mama. O carcinoma lobular invasivo (CLI) é o segundo mais comum, representando cerca de 10% dos cânceres invasivos. Além desses, existem outros tipos histológicos menos frequentes, como carcinomas mucinosos, cribiformes, micropapilares, papilares, tubulares, medulares, metaplásicos e apócrinos (Tsang; Tse, 2019).

Já com base na capacidade de disseminação, o câncer de mama pode ser *in situ*, quando está localizado, não se expandiu para tecidos adjacentes, a exemplo do carcinoma ductal *in situ* (CDI); Invasivo, quando se espalha para além do ducto mamário ou lóbulo, podendo atingir outros tecidos, sendo o carcinoma ductal invasivo (IDC) e o carcinoma lobular invasivo (CLI) os principais dessa classe. O IDC é o tipo mais comum, representando cerca de 60%–75% dos

casos, e começa nas células dos ductos de leite, podendo se espalhar para tecidos próximos e outras partes do corpo (Nolan, Lindeman, Visvader. 2023).

No câncer de mama, mutações genéticas e alterações epigenéticas desempenham papéis essenciais na progressão da doença, assim, genes frequentemente mutados, como BRCA1, BRCA2 e HER2, impactam vias cruciais de reparo do DNA e sinalização de crescimento celular (Coelho *et al.*, 2018; De talhouet *et al.*, 2020). Dessa forma, entender esses mecanismos pode revelar novos alvos terapêuticos, e promover abordagens terapêuticas mais eficazes (Nolan, Lindeman, Visvader, 2023).

De modo geral, o tratamento do câncer pode envolver abordagens farmacológicas e não farmacológicas, a depender do local da doença, do estado de saúde do paciente e das características do tumor (Niculescu; Grumezescu, 2022). As estratégias terapêuticas mais comuns incluem terapias locais, como cirurgia e radioterapia; e terapias sistêmicas, como terapia alvo, imunoterapia e quimioterapia (Wang *et al.*, 2023). Esses métodos podem ser aplicados isoladamente ou combinados, dependendo do estágio do câncer, da capacidade de infiltração e da resposta do paciente (Tomazelli, 2017; Sousa, 2019; Goethals; Rosa *et al.*, 2022).

A radioterapia é um método terapêutico que utiliza radiação ionizante, geralmente na forma de radiação eletromagnética, para penetrar nos tecidos e eliminar células cancerígenas, bloqueando sua capacidade de se multiplicar. No contexto do câncer de mama, ela é comumente usada como tratamento adjuvante após a mastectomia (Kaur; Bhardwaj; Gupta, 2023). Além disso, também pode ser empregada para cuidados paliativos em situações de metástases e como terapia neoadjuvante quando outras formas de tratamento não são eficazes (Kerr *et al.*, 2022).

A terapia alvo e imunoterapia têm se destacado em pesquisas recentes por serem direcionadas especificamente a alvos moleculares, diferenciando-se da quimioterapia, ao interferir nas vias que controlam o crescimento e a sobrevivência das células tumorais. Entre os principais fármacos estão os inibidores da tirosina quinase (TKIs) e os anticorpos monoclonais (mAbs), como lapatinibe, neratinibe, trastuzumabe e pertuzumabe, que são direcionados aos receptores HER2 no câncer de mama. Adicionalmente, os inibidores de angiogênese, que atuam sobre o VEGF ou seu receptor, como bevacizumabe, desempenham um papel crucial na prevenção da formação de novos vasos sanguíneos que alimentam o tumor (Cascetta, 2021; Zerdan *et al.*, 2021; Matthews, 2022).

A quimioterapia é uma das principais opções terapêuticas no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o de mama. Esses medicamentos atuam principalmente sobre células de

rápida proliferação, como as cancerosas, mas também podem afetar tecidos saudáveis, e ocasionar efeitos tóxicos. Entre os principais quimioterápicos estão os agentes alquilantes, os antimetabólitos e os produtos naturais, como os alcaloides da vinca e os taxanos, que alteram a dinâmica dos microtúbulos, inibem a divisão celular e promovem a apoptose (Bailly; Thuru; Quesnel, 2020). No quadro 1 estão representados os principais quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama e os principais efeitos adversos associados.

Quadro 1 Classes de quimioterápicos para câncer de mama: exemplos de fármacos e efeitos adversos comuns

Classe	Quimioterápicos	Principais efeitos adversos
Taxanos	Paclitaxel, docetaxel	Mielossupressão, mucosite, neuropatia periférica, neurotoxicidade
Antraciclinas	Doxorrubicina, epirubicina, Doxorrubicina lipossomal	Mielossupressão, cardiotoxicidade, alopecia, mucosite, hepatotoxicidade
Agentes de platina	Cisplatina, carboplatina	Mielossupressão, náusea, vômito, ototoxicidade, neuropatia motora e sensitiva, alopecia
Antimetabólitos	Gencitabina, Capecitabina, metotrexato, fluorouracil	Mielossupressão, trombocitopenia, alopecia, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade

Legenda: principais classes de quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama, incluindo exemplos de fármacos em cada classe e seus respectivos efeitos adversos mais comuns.

Fonte: Bruton e Hilal-Dandan (2018, p. 1476)

Embora a quimioterapia seja, na maioria dos casos, o tratamento de escolha para tumores, está frequentemente associada a efeitos tóxicos significativos e ao desenvolvimento de resistência. Entre os agentes quimioterápicos, destaca-se a doxorrubicina, amplamente utilizada na terapia contra neoplasias mamárias. No entanto, seu uso está associado a uma série de efeitos adversos graves, especialmente cardiotoxicidade, além de ulcerações e necroses nos locais de administração. Esses efeitos adversos podem resultar em danos teciduais irreversíveis, impactando diretamente o prognóstico e, em alguns casos, levando à necessidade de interrupção do tratamento. Dessa forma, a busca por terapias mais específicas e menos tóxicas tem se intensificado, com o objetivo de minimizar os danos colaterais e melhorar a qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento (Xie; Chen; Fang, 2020).

2.4 Produtos Naturais no câncer

Os produtos naturais destacam-se como uma fonte valiosa no desenvolvimento de fármacos, dada sua vasta diversidade de metabólitos bioativos. Nos últimos anos, esses compostos têm sido amplamente investigados na busca por terapias mais seletivas e eficazes no tratamento de neoplasias malignas (Sairazi, sirajudeen, 2020; Wilson *et al.*, 2020)

A utilização de compostos naturais no desenvolvimento de quimioterápicos têm sido amplamente explorada devido ao potencial terapêutico de certas espécies vegetais. Atualmente, cerca de 60% dos medicamentos utilizados em ensaios clínicos para tratamento do câncer são de origem natural, ressaltando a importância da biodiversidade vegetal no avanço das terapias oncológicas (Vieira *et al.*, 2020).

Entre os compostos derivados de plantas mais utilizados destacam-se os taxanos, alcaloides da vinca, podofilotoxinas e camptotecinas, extraídos de espécies como *Taxus brevifolia*, *Catharanthus roseus*, *Podophyllum peltatum* e *Camptotheca acuminata*. Esses agentes antineoplásicos agem por meio da interferência em processos celulares essenciais, como a divisão celular e a síntese de DNA, promovendo a apoptose em células tumorais (Chu; Rubin, 2018).

O paclitaxel e o docetaxel, derivados da *Taxus brevifolia*, por exemplo, são amplamente utilizados em tratamentos de câncer de mama, ovário e pulmão. Eles agem estabilizando os microtúbulos celulares, o que impede a divisão celular e induz a apoptose, sendo administrados frequentemente em combinação com outros agentes quimioterápicos para maximizar a eficácia terapêutica (Thurston, 2006).

Os alcaloides da vinca, como vincristina e vimblastina, extraídos de *Catharanthus roseus*, são indicados para o tratamento de linfomas, leucemias e câncer de mama. Esses compostos inibem a formação dos microtúbulos, interferindo na divisão celular durante a mitose, o que leva à morte das células cancerígenas (Schneider *et al.*, 2017).

A podofilotoxina, obtida de *Podophyllum peltatum*, e seus derivados semissintéticos, como o etoposídeo e o teniposídeo, são utilizados em terapias para câncer de pulmão e testículo. Eles atuam inibindo a enzima topoisomerase II, essencial para a manutenção da estrutura do DNA, causando quebras na molécula e, consequentemente, a morte celular (Kúsz, 2016).

Por fim, a camptotecina e seus derivados, como irinotecano e topotecano, extraídos de *Camptotheca acuminata*, também são usados no tratamento de cânceres de pulmão, ovário e

cólon. Esses compostos inibem a topoisomerase I, prejudicando a replicação do DNA e levando as células tumorais à apoptose (Zhao *et al.*, 2017).

A investigação de quimioterápicos derivados de produtos naturais é uma área promissora essencial para o avanço das terapias contra o câncer, sustentado pela riqueza de metabólitos bioativos que as plantas e outros organismos oferecem (Vieira *et al.*, 2020). Compostos como paclitaxel, vincristina, podofilotoxina e camptotecina são exemplos de agentes que, por meio de mecanismos específicos, atuam diretamente nas células tumorais, promovendo sua morte programada (Chu; Rubin, 2018).

Os metabólitos bioativos não apenas ampliam as possibilidades terapêuticas, mas também permitem o desenvolvimento de fármacos com perfis de toxicidade diferenciados, muitas vezes mais toleráveis aos pacientes (Thurston, 2006; Schneider *et al.*, 2017). Nesse contexto, a continuidade da pesquisa focada em compostos naturais como fontes de quimioterápicos é fundamental para identificar novos alvos moleculares e explorar combinações terapêuticas que maximizem a eficácia e segurança dos tratamentos oncológicos (Kúsz, 2016; Zhao *et al.*, 2017).

2.4.1 *Solanum jabrense* e seu potencial farmacológico

As plantas da família Solanaceae são ricas em diversos compostos biologicamente ativos, como os alcaloides, que destacam-se por sua bioatividade e importância farmacológica. Por exemplo, a atropina, encontrada na beladona (*Atropa belladonna* L.), atua como um antagonista dos receptores muscarínicos, enquanto a nicotina, presente no tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), funciona como um agonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina (Winkiel; Chowański; Słocińska, 2022), ambas pertencentes à mesma família.

Nesse sentido, o gênero *Solanum* L., o maior da família Solanaceae, inclui mais de duas mil espécies de plantas ricas em metabólitos secundários, que são amplamente estudados devido à sua atividade farmacológica significativa. Até o momento, cerca de 17 espécies de *Solanum* demonstraram propriedades antitumorais, observadas tanto em extratos brutos quanto em compostos isolados, exibindo efeitos citotóxicos sobre diversas linhagens de câncer, incluindo mama, pulmão e fígado (Kaunda; Zhang, 2019).

No Brasil, o gênero *Solanum* é amplamente representado, com cerca de 350 espécies distribuídas por todo o país. No Nordeste, aproximadamente 80 dessas espécies são utilizadas na medicina popular (Simões *et al.*, 2016). Entre as espécies medicinais de *Solanum*, já foram

identificados cerca de 670 constituintes químicos isolados, dos quais 63 são alcaloides esteroidais e 31 outros tipos de alcaloides, como os glicoalcaloides, que desempenham um papel central em suas propriedades terapêuticas (Kaunda; Zhang, 2019).

Nesse cenário, a espécie *Solanum jabrense* Agra & M. Nee, (Figura 10) pertencente à família Solanaceae e ao gênero *Solanum* L., destaca-se por ser uma planta endêmica do Brasil. Sua distribuição é restrita ao Nordeste, ocorrendo nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Bahia, especificamente em áreas de brejos de altitude, como o Pico do Jabre; Serra de Jabitacá e Serra Branca (De fátima agra; Nee, 1997; Agra, 2009; CNCFlora, 2012).

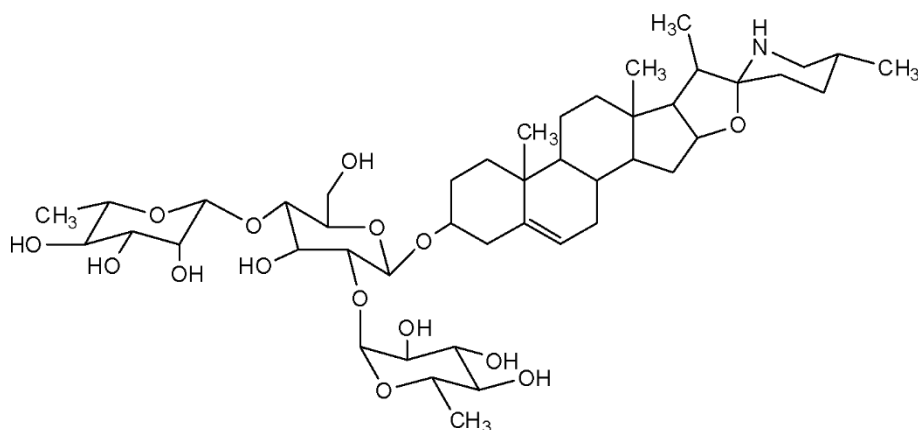
Figura 10 *Solanum jabrense* Agra & M. Nee



Fonte: INATURALIST. *Solanum jabrense*: Observações (2024); Solanaceae source (2024)

Pesquisas anteriores revelaram que *S. jabrense* é rica em metabólitos secundários, como flavonoides naturais e glicoalcaloides. Estes últimos são metabólitos secundários que resultam da combinação de açúcares com alcaloides esteroides. Esses compostos possuem características anfifílicas, consistindo em uma cadeia de carboidratos hidrofílica unida à posição 3-OH, além de uma parte aglicona, que apresenta uma estrutura de colastano com 27 carbonos e um átomo de nitrogênio no anel. A solamargina (Figura 11), é um glicoalcaloide encontrado em diversas espécies do gênero *Solanum* L., incluindo a *Solanum jabrense*, e é composta por um aglicon denominado solasodina (Milner *et al.*, 2011).

Figura 11 Estrutura química do glicoalcaloide Solamargina



Fonte: Dados da autora

A solamargina (SM) tem demonstrado propriedades anticancerígenas notáveis em diferentes tipos de câncer. Em células de câncer de mama humano Bcap-37, SM induziu apoptose e despolarização mitocondrial, além de aumentar a expressão de Bax e caspase 3, ao mesmo tempo em que regula negativamente Bcl-2 e Bcl-xL (Li *et al.*, 2016). Em comparação com a cicloheximida, SM exibiu maior citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (Aker *et al.*, 2015). Em adição, demonstrou efeitos citotóxicos contra adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), câncer de pulmão (A549), carcinoma hepatocelular (Hep3B) e câncer de próstata (PC3) (Tai *et al.*, 2018). Por fim, esse glicoalcaloide também suprime o crescimento de células de melanoma humano (WM239 e WM115), promovendo a permeabilização lisossomal (Al *et al.*, 2017).

Além destes compostos, foi demonstrado que flavonoides como retusina, que demonstrou atividade na inibição da proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP), bem como outros compostos bioativos, como ombuína, 3,7,8,4'-tetra-O-metilgossipetina, 3,7,8,3',4'-penta-O-metilgossipetina e 3-O-metilquercetina (Silva; Carvalho; Braz-filho, 2009; Pick *et al.*, 2011; Kaunda; Zhang, 2019) estão presentes nessa espécie. Ainda, a solasodina, um alcaloide esteroidal encontrado nos frutos da planta, demonstrou atividades farmacológicas, como antifúngica, anti-inflamatória e anticancerígena, especialmente contra osteosarcoma e células leucêmicas, além de induzir apoptose em modelos *in vitro* (Patel; Singh; Patel, 2013; Hameed *et al.*, 2017).

Em síntese, o gênero *Solanum* L. tem se destacado na busca por novas fontes naturais de medicamentos anticancerígenos, e a espécie *S. jabrense*, destaca-se como um ativo pouco explorado nesse contexto. Embora *S. Jabrense* tenha mostrado promissora atividade bioativa,

até o momento não existem estudos farmacológicos robustos acerca de seu potencial citotóxico e antitumoral de forma sistemática, o que destaca a necessidade de investigação mais profunda sobre os efeitos terapêuticos dessa planta.

Portanto, este estudo investigou o potencial efeito antitumoral do extrato hidroalcólico das partes aéreas da *S. Jabrense* (ESJ), bem como da fração alcaloide desse extrato (FSJ) e a Solamargina (SM) em linhagens celulares tumorais e não tumorais humanas.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de *Solanum jabrense* Agra & Nee

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (ESJ) e fração alcaloídica do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (FSJ) em diferentes linhagens de células tumorais humanas (MCF-7, MDA-MB-231, PC-3, SK-MEL-28);
- Avaliar a citotoxicidade do ESJ e FSJ em células não tumorais humanas (HEK-293 e MCF-10A);
- Determinar o índice de seletividade (IS) de ESJ e FSJ e comparar com a droga padrão doxorrubicina;
- Investigar o efeito do FSJ sobre a progressão do ciclo celular em células MCF-7;
- Avaliar o tipo de morte celular induzido pelo FSJ em células MCF-7;
- Investigar o efeito do FSJ sobre o estado redox celular em células MCF-7;
- Avaliar os efeitos de FSJ em modelo de cultura celular tridimensional (3D);
- Avaliar o efeito do composto majoritário do FSJ sobre a viabilidade celular de células MCF-7;
- Determinar os valores de energia de ligação e os encaixes 2D e 3D entre o composto majoritário do FSJ e as estruturas cristalográficas das Proteínas Caspases, MAPKs, e IKK β em modelo *in silico*.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

Os ensaios envolvendo o cultivo celular e citotoxicidade foram conduzidos no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)/ João Pessoa, PB, Brasil.

Os procedimentos de microscopia confocal e citometria de fluxo foram realizados nos laboratórios de Biofotônica (CBiotec/UFPB) e no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (IPeFarM/UFPB), respectivamente. Os estudos de docagem molecular foram realizados no Laboratório de Quimioinformática do IPeFarM.

4.2. Material

4.2.1 Substâncias e reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); soro bovino fetal (SBF) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); solução fosfato tamponada (PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil); tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); azul de tripan (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); N acetilcisteína (NAC) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); dodecil sulfato de sódio (SDS) (Êxodo Científica®, Sumaré, São Paulo, Brasil); doxorubicina (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); iodeto de propídio (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA); anexina V-FITC (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA); RNase (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); cloreto de sódio (NaCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); cloreto de potássio (KCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); cloreto de cálcio (CaCl₂) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); sulfato de magnésio (MgSO₄) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); sulfato de sódio (Na₂SO₄)

(GIBCO®, Grand Island, New York, EUA); cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA); Hoechst 34580 (Invitrogen®, Waltham, Massachusetts, EUA) e cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' 60 tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA). As drogas e as soluções reagentes foram preparadas imediatamente antes do uso.

4.2.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: centrífuga Rotina 380R (Hettich®, North Rhine-Westphalia, Alemanha), microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Olympus®, Tóquio, Japão), balança analítica eletrônica SHI-AUW220D (Shimadzu®, São Paulo, Brasil), cabina de fluxo de ar laminar vertical Aeolus V (Telstar®, São Paulo, Brasil), incubadora de CO₂ MCO-18ACL-PA (Panasonic®, Osaka, Japão), leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek®, Vermont, EUA), autoclave vertical linha CS-A (Primatec®, São Paulo, Brasil), estufa de secagem (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil), citômetro de fluxo FacsCanto II (Becton Dickinson®, New Jersey, EUA), microscópio confocal de varredura a laser (Leica®, Hesse, Alemanha), banho 70 maria AQUAline (LAUDA®, São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Eletrolux®, Paraná, Brasil), agitador MS 3 digital (IKA®, Baden-Württemberg, Alemanha).

4.2.3 Material botânico

O material botânico, partes aéreas (folhas e galhos), foi coletado na cidade de Matureia, Paraíba, Brasil, e identificado pela Professora Dra. Maria de Fátima Agra (CBiotec, UFPB). O código de acesso do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) pode ser verificado sob o número: AD609FD. Uma parte desse material foi utilizada para a produção de uma exsiccata, que será depositada no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB), localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (Anexos 1).

4.2.4 Linhagens celulares

As linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade foram: MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano triplo

negativo), SK-MEL-28 (melanoma humano), PC-3 (câncer de próstata humano). Dentre as células não tumorais humanas, foram utilizadas as linhagens HEK-293 (rim embrionário humano) e MCF-10A (epitélio glandular mamário imortalizado) (Quadro 2). Todas as linhagens celulares utilizadas no estudo foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil).

Quadro 2 - Linhagens celulares e suas características

Linhagem celular	Origem	Tecido	Tipo celular	Doença	Tumoral
MCF-7	Humano	Glandular mamário	Epitelial	Adenocarcinoma	Sim
PC-3	Humano	Próstata	Epitelial	Adenocarcinoma Grau IV	Sim
MCF-10A	Humano	Glandular mamário	Epitelial	Fibrocística	Não
HEK-293	Humano	Rim embrionário	Epitelial	-	Não
MDA-MB-231	Humano	Glandular mamário	Epitelial	Adenocarcinoma	Sim
SK-MEL-28	Humano	Pele	Melanoma	Melanoma maligno	Sim

Legenda: A tabela apresenta linhagens de células tumorais e não tumorais humanas, identificando a linhagem celular, a origem das células, o tecido, tipo celular, doença e classificação tumoral. As linhagens incluem MCF-7 (adenocarcinoma mamário), PC-3 (próstata), SK-MEL-28 (melanoma), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário), MCF-10A (glândula mamária imortalizada) e HEK-293 (rim embrionário). Os meios de cultura utilizados variam entre DMEM e RPMI, de acordo com as necessidades de cada linhagem.

Fonte: Elaborado pela autora

4.3 Métodos

4.3.1 Obtenção dos extratos e composto majoritário da *solanum jabrense*

O extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (ESJ), a fração alcaloídica do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (FSJ) e a solamargina (SM) foram gentilmente cedidos e caracterizados pelo Prof. Dr. Josean Fechine Tavares e pela Me. Anauara Lima e Silva. As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA/UFPB).

4.3.1.1 Preparo das amostras

Antes da realização dos procedimentos experimentais, o ESJ e FSJ foram pesados (1 mg) e diluídos em 10 μ L de DMSO (100%) para obtenção de uma solução inicial a 100.000 μ g/mL. A partir da solução inicial foram preparadas diluições para a obtenção das diferentes concentrações dos extratos e posterior tratamento das células. A quantidade de DMSO por poço não ultrapassou a concentração de 0,5%, e a solução foi utilizada imediatamente após o preparo. A solamargina foi armazenada sob refrigeração a -20°C, protegida da luz, em forma de solução-mãe em alta concentração (40 mM), a partir da qual foram preparadas diluições para obtenção das diferentes concentrações de tratamento, de modo que a quantidade de DMSO por poço também não ultrapassou 0,5%.

4.3.2 Cultivo celular

As linhagens celulares foram cultivadas nos meios Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (MCF-7, MDA-MB-231, HEK-293, e SK-MEL-28) ou Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (HCT-116 e PC-3) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina e estreptomicina a 37 °C, 5% de CO₂. As células foram manipuladas em fluxo laminar e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de CO₂ a 5%. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24h e, ao atingirem 80% de confluência, foi realizado o repique celular. Para isso, foram adicionados 2 mL de solução de tripsina, durante 5 minutos, para o deslocamento da monocamada das células aderentes da parede do frasco. Após esse período, foi adicionado meio suplementado com SBF, na mesma proporção de tripsina, para interromper sua ação. As células foram centrifugadas a 500 $\times$ g por 5 minutos e ressuspensas em meio suplementado para a contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade

celular foi avaliada usando o corante azul de tripan e a concentração celular ajustada para 1×10^5 células/mL, considerando-se um valor mínimo de 90% de viabilidade.

4.3.3 Triagem e avaliação da citotoxicidade do ESJ em linhagens de células tumorais humanas

A citotoxicidade do ESJ foi avaliada em linhagens de adenocarcinoma mamário humano e em células tumorais e não tumorais, utilizando o ensaio de MTT, que é um sal amarelo que atravessa as membranas celulares. Em células viáveis, ele é convertido em cristais de formazan, roxos e insolúveis, que podem ser quantificados por espectrofotometria, de modo que a densidade óptica obtida é proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983; Duarte *et al.*, 2022).

Para a triagem, a fim de avaliar se a ESJ apresentava efeitos citotóxicos em células tumorais, foram utilizadas as linhagens de células humanas MCF-7 (adenocarcinoma mamário), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário), PC-3 (câncer de próstata) e SK-MEL-28 (melanoma), que foram mantidas em estufa a 37°C, conforme descrito no item 4.3.2.

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3×10^5 células/mL (SK-MEL-28, PC-3 e MDA-MB-231), 2×10^5 células/mL (MCF-7) (100 µL por poço). Após 24h, foram adicionados 100 µL da solução de ESJ (200 µg/mL)

Após o período de incubação de 72 h, retirou-se 110 µL do sobrenadante, e foi adicionado a solução de MTT (5 mg/mL) em seguida, a placa foi incubada por mais 4 h (37 °C, 5% de CO₂). O formazan depositado foi dissolvido com 100 µL de uma solução de SDS 0,1% (p/v) e HCl (0,037%) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em $\lambda = 570$ nm.

4.3.4 Avaliação da citotoxicidade de ESJ e FSJ em linhagens de adenocarcinoma mamário e não tumorais humanas

Para este ensaio, as linhagens de células humanas MCF-7 e MDA-MB-231, ambas de adenocarcinoma mamário, e as linhagens não tumorais HEK-293 (rim embrionário) e MCF-10A (glandular mamário imortalizado), foram mantidas sob condições descritas no item 4.3.2.

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^5 células/mL (MCF-7 e MDA-MB-231) ou 3×10^5 células/mL (HEK-293 e MCF-10A) (100 µL

por poço). Após 24 h, foram adicionados 100 µL da solução de ESJ ou FSJ (0,4, 4, 40, 80, 200 e 400 µg/mL) e doxorrubicina (DXR) (20 µM) dissolvidos em DMSO (0,5%). Após incubação por 24, 48 ou 72 h, as placas foram centrifugadas (500 × g, 24 °C, 5 min) e 110 µL do sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h (37 °C, 5% de CO₂). O formazan depositado foi dissolvido com SDS/HCl (100 µL) (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em λ = 570 nm. Para cada linhagem celular, foram realizados três experimentos em triplicata.

4.3.4.1 Determinação do índice de seletividade do ESJ e FSJ e comparação com a droga padrão

Para avaliar a seletividade dos extratos hidroalcoólicos de *Solanum jabrense* (ESJ), de sua fração alcaloídica (FSJ), e da droga padrão utilizada, doxorrubicina, foi determinada a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) da viabilidade celular para cada um nas linhagens celulares testadas. A CI₅₀, uma medida comumente utilizada em estudos de citotoxicidade, representa a concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular em comparação com o controle (Oliveira *et al.*, 2015; Pilon *et al.*, 2020; Duarte *et al.*, 2022). Para determinar a CI₅₀, as células das linhagens MCF-7 (tumoral), HEK-293 e MCF-10A (não tumorais) foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos ou doxorrubicina. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi quantificada por meio do ensaio de MTT, conforme descrito no item 4.3.4, para um período de incubação de 48h e os dados de viabilidade foram plotados em gráficos de concentração-resposta, permitindo o cálculo da CI₅₀ a partir de análise de regressão não-linear.

O índice de seletividade é uma medida importante para indicar a seletividade de um composto para células tumorais, sendo um parâmetro essencial para avaliar seu potencial como agente terapêutico seguro e específico. De acordo com estudos prévios, valores de IS superiores a 2 indicam uma boa seletividade para células tumorais (Muhamad; Plengsuriyakarn; Na Bangchang, 2018). O índice de seletividade (IS) foi calculado com base na relação entre a CI₅₀ obtida para as células não tumorais e a CI₅₀ para as células tumorais, conforme equação abaixo:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ da linhagem celular não tumoral}}{CI_{50} \text{ da linhagem celular tumoral}}$$

4.3.5 Investigação dos mecanismos de ação antitumoral *in vitro* da FSJ

Para uma caracterização mais detalhada do efeito antitumoral do FSJ, foram conduzidos ensaios para investigar os possíveis mecanismos de ação da fração alcaloídica do extrato hidroalcoólico da *Solanum jabrense* (FSJ) na linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

4.3.5.1 Avaliação do efeito do FSJ sobre a progressão do ciclo celular

Para avaliar o efeito do FSJ na progressão do ciclo celular, células MCF-7 foram marcadas com iodeto de propídeo (IP) e analisadas por citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência emitida pelo IP ligado ao DNA permite a quantificação do DNA nas células em cada fase do ciclo celular (Jayat; Ratinaud, 1993).

Assim, as células MCF-7 foram plaqueadas (1×10^5 células/mL) em placas de 24 poços e incubadas com o FSJ nas concentrações de 35 ou 17 $\mu\text{g/mL}$ (correspondentes a CI_{50} e metade, respectivamente) ou DXR (4 μM , correspondente a CI_{50}) por 48 h. Após o período de incubação, as células foram coletadas e centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS, fixadas cuidadosamente com etanol 70% previamente gelado, em agitador, e congeladas (-20 °C) até a análise. No momento da análise, as células foram recuperadas por centrifugação ($400 \times g$, 10 min, 4 °C), lavadas em PBS e Triton X-100 (0,1%), incubadas com RNase (0,1 mg/mL) e IP (0,05 mg/mL), no escuro (25 °C, 30 minutos). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Foi determinado o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular, bem como células subdiploides (sub-G1). Os dados foram obtidos com o software FACSDiva 6.0 (BD, EUA). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata (Sousa *et al.*, 2024).

4.3.5.2 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo FSJ

a) Análise nuclear por coloração com Hoechst

O Hoechst é um corante fluorescente que é permeável à membrana celular e se liga especificamente ao DNA, emitindo coloração azul. Esse corante é utilizado para identificar alterações nucleares características de células apoptóticas, como a condensação da cromatina e

a fragmentação do DNA (Kabakov e Gabai, 2017; Medeiros, 2021). Para este ensaio, as células da linhagem MCF-7 foram plaqueadas (1×10^5) em placas de 24 poços e incubadas por 24 h em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após o período de incubação, foram tratadas com o FSJ (35 ou 17 µg/mL, correspondendo a CI₅₀ e a metade, respectivamente), e doxorubicina (4 µM), e incubadas novamente, por um período de 48h. Após o período de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas (500 x g, 25°C, 5 minutos), ressuspensas em PBS e marcadas com 20 µL de Hoechst (10 µg/mL). Em seguida foram incubadas por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidas da luz. As células marcadas foram então observadas sob um microscópio confocal de varredura a laser (Sousa *et al.*, 2023). A análise dos resultados foi realizada utilizando o software ImageJ (NIH, EUA) e a porcentagem da intensidade de fluorescência foi obtida pela normalização dos dados, considerando a média do controle como 100%. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

B) Avaliação do tipo de morte celular por dupla coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo (LA/IP)

Células da linhagem MCF-7 foram plaqueadas (1×10^5) em placas de 24 poços e incubadas por 24 h em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após o período de incubação, foram tratadas com o FSJ (35 ou 17 µg/mL), e doxorubicina (4 µM), e incubadas novamente, por um período de 48 h. Após o período de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas (500 x g, 25°C, 5 minutos), ressuspensas em PBS e marcadas com 20 µL de uma solução contendo laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP). As células coradas foram então observadas sob um microscópio confocal de varredura a laser (Sousa *et al.*, 2023). Para análise foram considerados os seguintes pontos: células viáveis apresentavam núcleo verde claro e estrutura intacta; células em apoptose precoce tinham núcleo verde brilhante com cromatina condensada; células em apoptose tardia exibiam áreas densas alaranjadas (coradas em verde e vermelho) de condensação da cromatina e formação de bolsas apoptóticas (blebs) na membrana; células necróticas ou mortas eram coradas apenas em vermelho (Robbins, Marcus, 1963; Renviosé *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2018). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

c) Marcação da Anexina V e Iodeto de propídeo para investigação da apoptose celular

Para avaliar se a via de morte por apoptose está envolvida no efeito de FSJ em células MCF-7, foi realizado um ensaio de marcação com anexina V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídeo (IP). As células MCF-7 foram plaqueadas (1×10^5 células/mL) em placas de 24 poços e incubadas com FSJ (35 ou 17 $\mu\text{g/mL}$) ou DXR (4 μM , correspondente a CI_{50}), por 48 horas. Após esse período, as células foram coletadas e centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos) e ressuspensas em tampão de ligação. Em seguida, foram marcadas com anexina V-FITC e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos, no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão de ligação, centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em tampão de ligação e marcadas com IP (20 $\mu\text{g/mL}$). A leitura foi então realizada em citômetro de fluxo adquirindo-se 10.000 eventos/amostra, usando detectores de fluorescência vermelha (IP, 325/488 nm) e verde (FITC, 493/525 nm), adquirindo-se 10.000 eventos por amostra. Os dados foram obtidos com o software FlowJo (BD, EUA), foram realizados três experimentos independentes em duplicata (Sousa *et al.*, 2023).

d) Determinação do potencial de membrana mitocondrial por coloração com JC-1

Em células saudáveis, o corante JC-1 acumula-se na matriz mitocondrial e forma oligômeros (agregados) resultando na emissão de fluorescência vermelha (590 nm). Por outro lado, em situações de despolarização, que levam à diminuição do potencial de membrana mitocondrial, como ocorre em células apoptóticas, o JC-1 se apresenta na forma de monômeros, emitindo fluorescência verde (529 nm). Assim, a alteração no potencial da membrana mitocondrial é refletida pela transição da fluorescência do vermelho para o verde (Sivandzade; Bhalerao; Cucullo, 2019). Para esta análise, as células MCF-7 foram plaqueadas (1×10^5) em placas de 24 poços e incubadas por 24 h em estufa de CO_2 5% a 37°C. Após o período de incubação, foram tratadas com o FSJ (35 ou 17 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a CI_{50} e a metade, respectivamente), e CCCP (50 $\mu\text{g/mL}$), e incubadas novamente, por um período de 48h. Após o período de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas ($500 \times g$, 25°C, 5 minutos), ressuspensas em PBS e marcadas com 20 μL de uma solução contendo JC-1 (2,5 μM). Em seguida, foram incubadas por vinte minutos, a uma temperatura ambiente e protegidas da luz. As células marcadas foram então observadas sob um microscópio confocal de varredura a laser.

A análise dos resultados foi realizada utilizando o software ImageJ e a porcentagem da intensidade de fluorescência foi obtida pela normalização dos dados, considerando a média do controle como 100%. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.3.5.3 Avaliação do envolvimento da via de ROS no efeito de FSJ

Para avaliar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito citotóxico do FSJ, as células MCF-7 foram pré-tratadas com N-acetilcisteína (NAC), uma molécula antioxidante que atua neutralizando ROS, bem como servindo de precursora para a síntese de glutathione (Di Marco; Foti; Corsico, 2022). Para isto, as células MCF-7 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/mL. Após 24 h, as células foram incubadas na presença ou ausência da NAC (10 μ M) por mais 3 h. Ao final deste período, as células foram tratadas com 35 ou 17 μ g/mL do FSJ (correspondentes a CI_{50} e a metade, respectivamente) ou 4 μ M de DXR (correspondente a CI_{50}) dissolvidos em DMSO a 0,5%. Após incubação por 48 h, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h. O formazan depositado foi dissolvido com SDS overnight (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em 570 nm e usadas para determinar a viabilidade celular (%). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.5.4 Avaliação do efeito do FSJ em modelo de cultura celular 3D (esferoides)

Neste ensaio foram depositadas gotas contendo 25 μ l de uma suspensão celular, a uma concentração de 6×10^4 células/ml, na tampa de placas de petri estéril. Em seguida, a tampa foi invertida sobre as placas, permitindo o acúmulo de células na interface líquido/ar. As placas foram incubadas por três dias em estufa a 5% de CO_2 e 37 °C, para a formação dos esferoides. Após o período de incubação, os esferoides foram transferidos para uma placa de 24 poços, um esferoide por poço, e a placa foi incubada por quarenta minutos em estufa de CO_2 5% a 37°C, a fim de garantir a adesão do esferoide à placa (Hamilton; Rath, 2018; Coelho, 2020). Ao término da incubação, adicionou-se 500 μ l de solução contendo meio e FSJ (35 e 70 μ g/mL). Como controle positivo foi utilizado uma solução de meio contendo o dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%.

Para este ensaio, dois parâmetros foram analisados: o tamanho (diâmetro) dos esferoides e o raio de migração celular, nos tempos 0 e 48 h após exposição aos tratamentos. As análises foram realizadas a partir de imagens obtidas em microscópio invertido com o programa ZEN 2 Pro (versão 2.0.0.0). Os dados foram analisados utilizando o software Image J. Os valores foram expressos em porcentagem (%), considerando a média do controle como 100%. Ao todo, foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.3.5.5 Avaliação da citotoxicidade de Solamargina sobre células MCF-7

A partir de estudos de análise fitoquímica realizada no LMCA (dados não publicados), foi demonstrado que o constituinte majoritário do ESJ trata-se do alcaloide Solamargina (SM) (Anexo 3). Dessa forma, o presente estudo propôs-se a investigar se SM estaria relacionado com o efeito citotóxico de FSJ em células MCF-7. Para tanto, realizou-se o ensaio de MTT, no qual as células da linhagem MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^5 células/mL. Após 24 h, foram adicionados 100 µL da solução de solamargina (100- 50- 25- 12,5- 6,25- 3,12 e 1.56 µM) dissolvida em DMSO (0,5%). Após incubação por 48h as placas foram centrifugadas ($500 \times g$, 24 °C, 5 min) e 110 µL do sobrenadante foi descartado, por fim, a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h (37 °C, 5% de CO₂). O formazan depositado foi dissolvido com SDS/HCl (100 µL) (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em $\lambda = 570$ nm. Para cada linhagem celular, foram realizados três experimentos em triplicata.

4.3.5.6 Estudos *in silico* por docagem molecular

A molécula solamargina foi modelada utilizando o software MarvinSketch v.23.14 (Chemaxon, Hungria), o qual foi utilizado para desenhar, exibir e caracterizar estruturas químicas, subestruturas e reações. A otimização foi realizada com o método semi-empírico MMFF implementado no Spartan '14' (Wavefunction, Japão). A estrutura cristalográfica de oito alvos envolvidos na apoptose foi obtida do Banco de Dados de Proteínas (RCSB PDB, EUA) (Tabela 1). Para analisar a interação da solamargina com esses alvos, foram utilizados ligantes co-cristalizados com as enzimas selecionadas.

Tabela 1 Alvos e ligantes utilizados no *docking* molecular

Alvo	PDB ID	Resolução	Ligante
Caspase 3	1RHK	2.50 Å	PRD_000231
Caspase 7	8DGZ	2.80 Å	PRD_000422
Caspase 8	1QTN	1.20 Å	Ac-IETD-aldehyde
JNK1	2G01	3.50 Å	73Q
p38α MAPK	7BDO	2.70 Å	TBK
ERK2	6SLG	1.33 Å	LHZ
IKKβ	4KIK	2.83 Å	KSA_700

Legenda: Alvos moleculares, identificadores do Protein Data Bank (PDB) e seus respectivos ligantes co-cristalizados, utilizados no estudo de docagem molecular para a análise das interações da solamargina com proteínas envolvidas na apoptose.

Fonte: Elaborado pela autora

O software Molegro Virtual Docker 6.0 foi utilizado para realizar o docking molecular. Todas as moléculas de água e cofatores foram excluídos do espaço de trabalho. Antes do docking molecular, foi realizado um passo de “redocking” para avaliar a precisão e confiabilidade dos resultados, sendo calculado o Desvio Quadrático Médio (RMSD). O RMSD é uma etapa crucial para verificar se o algoritmo foi capaz de gerar a pose correta, e valores ≤ 2 Å são considerados aceitáveis.

A simulação foi conduzida utilizando os parâmetros padrão. A função MolDock Score foi utilizada para avaliar as poses dos ligantes, considerando contribuições de energia interna, ligações de hidrogênio e energia torsional. Vinte execuções independentes de docking foram realizadas usando o algoritmo MolDock SE, e as cinco melhores poses foram retidas. Uma grade com raio de 15 Å e resolução de 0,30 Å foi gerada, centrada nas posições dos ligantes cristalográficos nas proteínas selecionadas. As poses resultantes foram subsequentemente analisadas usando o Discovery Studio Visualizer.

4.4 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.2 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). Para a comparação dos grupos, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) one-way, ou two-way, seguida do teste de Tukey e Dunnett, considerando o grau de significância quando $p < 0,05$. As concentrações inibitórias de 50% da viabilidade celular (CI_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram determinadas por meio de regressão não-linear.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade do ESJ sobre células tumorais humanas: triagem inicial

O tratamento com o ESJ (200 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a viabilidade celular em todas as linhagens testadas, com variações na resposta dependendo da linhagem celular (Tabela 2). A linhagem de adenocarcinoma mamário, MCF-7, apresentou maior efeito citotóxico, com uma maior redução de viabilidade celular ($10,90\% \pm 0,21$), seguida pela MDA-MB-231 ($13,40\% \pm 0,15$), e PC-3 ($13,40\% \pm 0,33$), enquanto a linhagem SK-MEL-28 apresentou a menor redução de viabilidade celular ($42,31\% \pm 1,35$). Diante desses resultados, as linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e adenocarcinoma mamário triplo negativo (MDA-MB-231) foram escolhidas para dar continuidade aos experimentos de citotoxicidade.

Tabela 2 Viabilidade celular (%) das linhagens tratadas com o ESJ (200 $\mu\text{g/mL}$) após 72 horas de incubação

Grupos Testes	Linhagens celulares			
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	SK-MEL-28
Controle	$99,96\% \pm 5,20$	$99,98\% \pm 4,68$	$99,97\% \pm 0,93$	$100\% \pm 0,65$
ESJ	$10,90\% \pm 0,21$	$13,40\% \pm 0,15$	$13,40\% \pm 0,3$	$42,31\% \pm 1,3$
DMSO	$9,70\% \pm 0,34$	$12,18\% \pm 1,19$	$7,01\% \pm 0,36$	$8,55\% \pm 0,45$

Legenda: Médias e desvios padrões foram calculados a partir de um único experimento. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle negativo (sem tratamento). As linhagens celulares testadas incluíram MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário triplo negativo), MCF-7 (adenocarcinoma mamário), PC-3 (carcinoma de próstata) e SK-MEL-28 (melanoma).

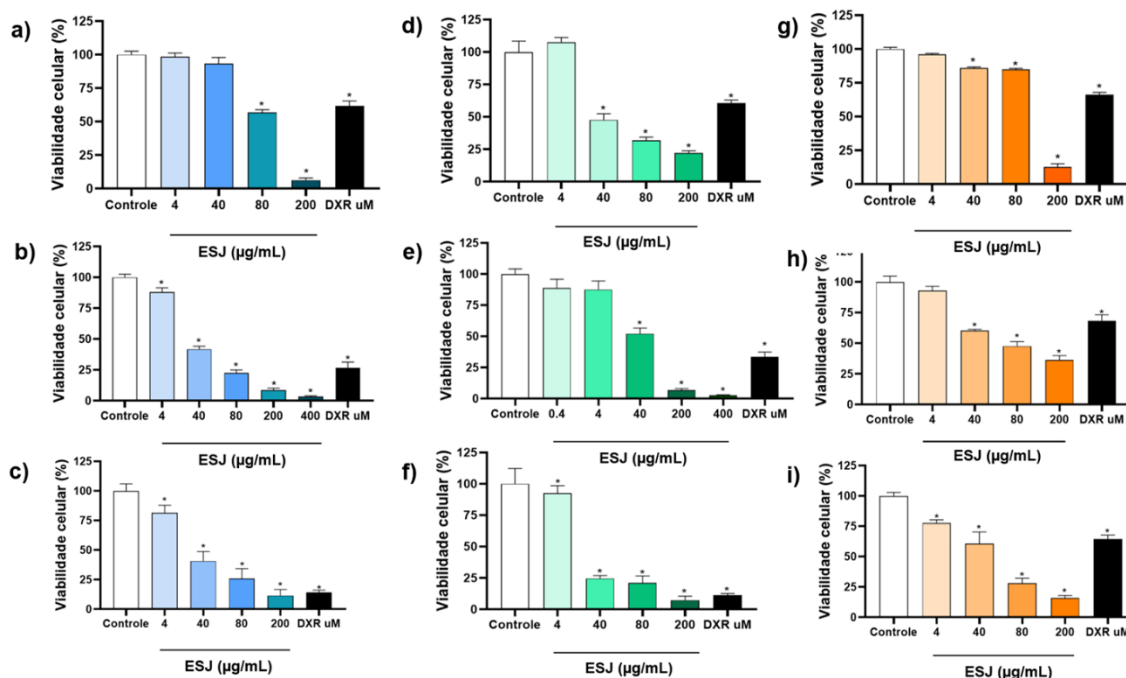
Fonte: Elaborado pela autora

5.2 Citotoxicidade do ESJ em linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231) e rim embrionário humano (HEK-293) após 24, 48 e 72h de tratamento

Foi empregado o ensaio de MTT para avaliar o efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* nas linhagens de adenocarcinoma mamário MCF-7 e MDA-MB-231, bem como na linhagem de células não tumorais HEK-293 (células de rim embrionário humano), utilizando concentrações de 0,4; 4; 40; 80; 200 e 400 µg/mL, em períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada em comparação ao grupo controle negativo (sem tratamento) e ao grupo controle positivo doxorrubicina (DXR) 20 µM.

Os resultados, expressos nos gráficos que mostram a porcentagem de viabilidade celular em função das diferentes concentrações de tratamento para cada linhagem (Figura 12), indicaram redução do tipo concentração-dependente da viabilidade em ambas as linhagens tumorais MCF-7 (Figura 12 a-c) e MDA-MB-231 (Figura 12 d-f) em comparação à linhagem não tumoral, HEK-293 (Figura 12 g-i). As concentrações mais altas resultaram em uma diminuição mais acentuada da viabilidade celular nas linhagens tumorais, especialmente no período de 72h.

Figura 12 Citotoxicidade ESJ em linhagem de células de adenocarcinoma mamário, MCF-7 e MDA-MB-231, ou rim embrionário humano, HEK, após 24, 48 e 72h de tratamento



Legenda: Gráficos de viabilidade celular para as linhagens de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e MDA-MB-231 e de células renais não tumorais HEK-293. As figuras (a-c) representam a viabilidade celular da linhagem MCF-7 após 24h (a), 48h (b) e 72h (c) de tratamento com o ESJ; as figuras (d-f) mostram a viabilidade celular para a linhagem MDA-MB-231 após 24h (d), 48h (e) e 72h (f) de tratamento; e as figuras (g-i) ilustram a viabilidade celular da linhagem HEK-293 após 24h (g), 48h (h) e 72h (i) de tratamento. Em cada gráfico, é apresentada a porcentagem de viabilidade celular em função das concentrações do extrato (0,4; 4; 40; 80; 200 µg/mL) após os períodos de incubação. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes realizados em triplicata, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida do teste de Dunnett.

Fonte: elaborado pela autora

Na Tabela 3 estão compilados os valores de CI_{50} e IS obtidos durante os ensaios de citotoxicidade com ESJ.

Tabela 3 Valores de CI₅₀ e índices de seletividade do extrato hidroalcolico de *Solanum jabrense* (ESJ) para as linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e HEK

Linhagem celular	CI ₅₀ (µg/ml)			índice de seletividade		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
MDA-MB-231	45,44 ± 0,09	35,64 ± 0,07	20,96 ± 0,15	2,68	2,18	2,71
MCF-7	87,03 ± 0,05	27,72 ± 0,02	23,91 ± 0,03	1,39	2,83	2,41
HEK-293	121,80 ± 0,05	78,56 ± 0,80	57,54 ± 0,06	-	-	-

Legenda: Valores de CI₅₀ (concentração inibitória de 50%) e índice de seletividade para cada linhagem celular (MCF-7, adenocarcinoma mamário; MDA-MB-231, adenocarcinoma mamário triplo negativo; e HEK, células de rim embrionário humano) após os períodos de incubação de 24h, 48h e 72h. Os índices de seletividade foram calculados com base nos valores de CI₅₀ da linhagem não tumoral (HEK) em relação às linhagens tumorais.

Fonte: elaborado pela autora

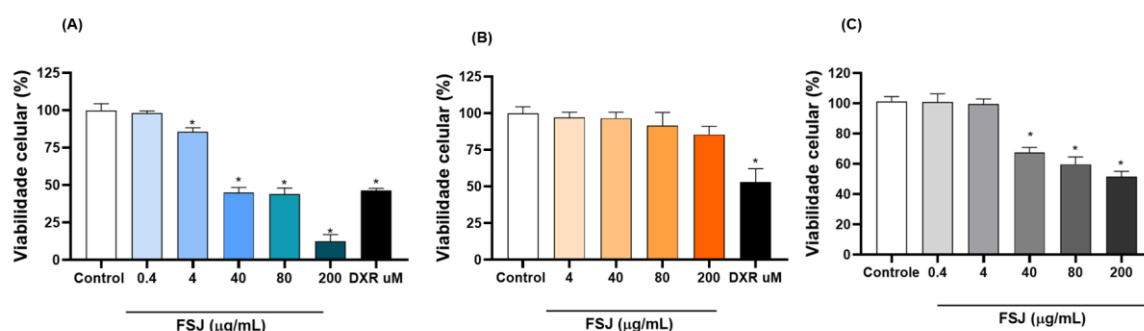
O tratamento com o extrato hidroalcolico de *Solanum jabrense* (ESJ) induziu maior seletividade para as células tumorais da linhagem MCF-7 no período de 48 horas, apresentando um índice de seletividade (IS) de 2,83 (Tabela 3). Assim, essa linhagem foi escolhida para dar continuidade às investigações, agora com a fração alcaloide do extrato (FSJ).

5.2.1 Citotoxicidade da FSJ em linhagem celular de adenocarcinoma mamário (MCF-7), rim embrionário humano (HEK) e tecido glandular mamário (MCF-10A) após 48h de tratamento.

Os resultados estão apresentados nos gráficos a), b) e c) da Figura 13, que evidenciaram uma redução dependente de concentração sobre a viabilidade celular de células MCF-7, enquanto as linhagens não tumorais MCF-10A e HEK apresentaram menor redução na viabilidade celular. O FSJ induziu redução significativa da viabilidade a partir de 4 µg/mL (85,62 ± 0,03, $p > 0,05$) enquanto que nenhuma redução significativa foi observada na linhagem HEK-293 em todas as concentrações testadas ($p > 0,05$). Após incubação das células MCF-10A, foi necessária uma concentração 10x maior de FSJ (40 µg/mL) para que a viabilidade celular fosse reduzida significativamente (67,62 ± 3,37), entretanto, sem atingir citotoxicidade máxima na maior concentração testada 200 µg/mL (51,43 ± 3,71). Doxorrubicina foi utilizada

como controle positivo, e reduziu a viabilidade para $46,35 \pm 1,50$ ($p > 0,05$) conforme esperado (Figura 13).

Figura 13 Citotoxicidade da fração alcaloide do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (FSJ) em célula tumoral MCF-7 e não tumorais HEK e MCF-10A



a) Gráfico de viabilidade celular para células MCF-7 em função das diferentes concentrações de tratamento com o FSJ (0,4; 4; 40; 80; 200 µg/mL) após 48 horas de incubação. b) Gráfico de viabilidade celular para células HEK em função das diferentes concentrações de tratamento com o FSJ (0,4; 4; 40; 80; 200 µg/mL) após 48 horas de incubação. c) Gráfico de viabilidade celular para células MCF-10A em função das diferentes concentrações de tratamento com o FSJ (0,4; 4; 40; 80; 200 µg/mL) após 48 horas de incubação. A doxorrubicina (DXR) a 20 µM foi utilizada como controle positivo em todos os experimentos. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Dunnett.

Fonte: elaborado pela autora

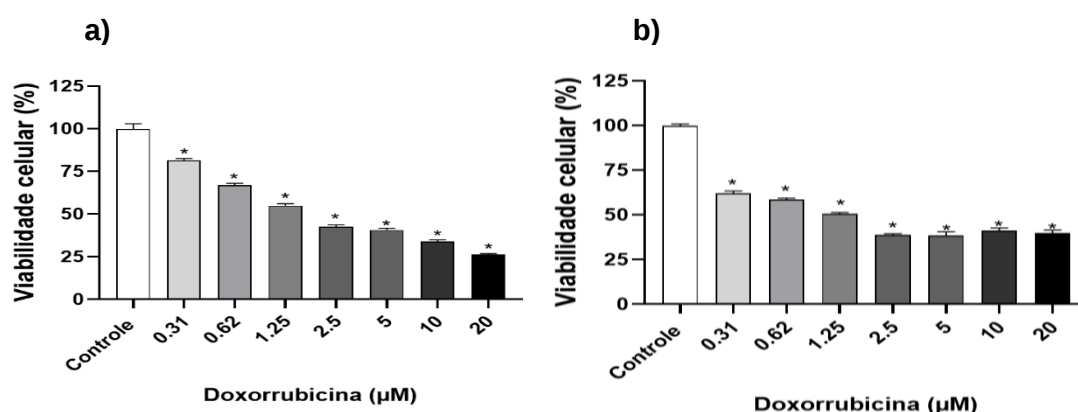
Os valores de CI_{50} obtidos foram: $35,50 \pm 0,10$ µg/mL para MCF-7, $168,9 \pm 0,11$ µg/mL para MCF-10A e $527,54 \pm 0,30$ µg/mL para HEK-293. Esses dados indicam que a fração alcaloide do extrato possui uma atividade citotóxica significativa nas células tumorais MCF-7 e uma menor atividade nas linhagens não tumorais MCF-10A e HEK-293. A comparação entre as linhagens tumorais e não tumorais permite avaliar a seletividade do FSJ, destacando seu potencial para terapias direcionadas. Os valores de CI_{50} foram utilizados para calcular o índice de seletividade do FSJ para a célula tumoral MCF-7, em relação às células não tumorais HEK-293 e MCF-10A e estão expressos na Tabela 4.

5.3 Curvas de concentração da doxorrubicina (DXR) em células tumorais de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e não tumorais de tecido glandular mamário (MCF-10A) após um período de tratamento de 48 h

Foi realizada uma curva de concentração da doxorrubicina (DXR) utilizando o ensaio de MTT para avaliar sua seletividade em células MCF-7 (adenocarcinoma mamário) em comparação com células não tumorais MCF-10A (tecido glandular mamário), no período de incubação de 48 horas, que foi o mais eficaz para o extrato FSJ.

As concentrações testadas da doxorrubicina foram: 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μM . Os resultados apresentados nos gráficos a) e b) da Figura 14, evidenciaram uma redução dependente de concentração sobre a viabilidade celular de células MCF-7, e da linhagem não tumoral (MCF-10A). Nas células MCF-7, a doxorrubicina induziu redução significativa da viabilidade celular a partir da menor concentração testada, 0,31 μM ($81,45 \pm 1,05$, $p > 0,05$), e essa redução foi mais acentuada para a linhagem não tumoral (MCF-10A), também na menor concentração utilizada ($61,94 \pm 1,40$, $p > 0,05$), conforme mostra a Figura 14.

Figura 14 Citotoxicidade da doxorrubicina em células MCF-7 e MCF-10A após um período de 48 horas de tratamento



Legenda: a) Gráfico de porcentagem de viabilidade celular de células MCF-7 em função das diferentes concentrações de doxorrubicina (DXR) após 48 horas de tratamento. b) Gráfico de porcentagem de viabilidade celular de células MCF-10A em função das diferentes concentrações de doxorrubicina (DXR) após 48 horas de tratamento. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Dunnett.

Fonte: elaborado pela autora

A viabilidade celular foi avaliada para determinar a CI_{50} em cada linhagem. Os resultados mostraram que a CI_{50} da doxorrubicina foi de $4,1 \pm 0,92 \mu\text{M/mL}$ para MCF-7 e $1,5 \pm 0,48 \mu\text{M/mL}$ para MCF-10A. Com base nesses valores, calculou-se o índice de seletividade da doxorrubicina. Os dados indicam que a doxorrubicina apresentou maior seletividade para a

linhagem MCF-10A, com uma CI_{50} menor em células não tumorais comparado às células tumorais MCF-7 (Tabela 4).

Tabela 4 Valores de CI_{50} e índices de seletividade do FSJ e doxorrubicina (DXR) para as linhagens celulares MCF-7, MCF-10A e HEK

Linhagem celular	CI_{50}		Índice de seletividade	
	FSJ	DXR	FSJ	DXR
MCF-10A	168,9 ± 0,11	1,5 ± 0,48	4,8	0,36
MCF-7	35,50 ± 0,10	4,1 ± 0,92	-	-
HEK-293	527,54 ± 0,30	-	15	-

Legenda: Valores de CI_{50} (concentração inibitória 50%) e índices de seletividade para o FSJ e doxorrubicina (DXR) nas linhagens celulares MCF-7, MCF-10A e HEK-293. O índice de seletividade foi calculado para avaliar a seletividade do FSJ ou DXR para a linhagem tumoral MCF-7 em comparação com as não tumorais MCF-10A e HEK-293.

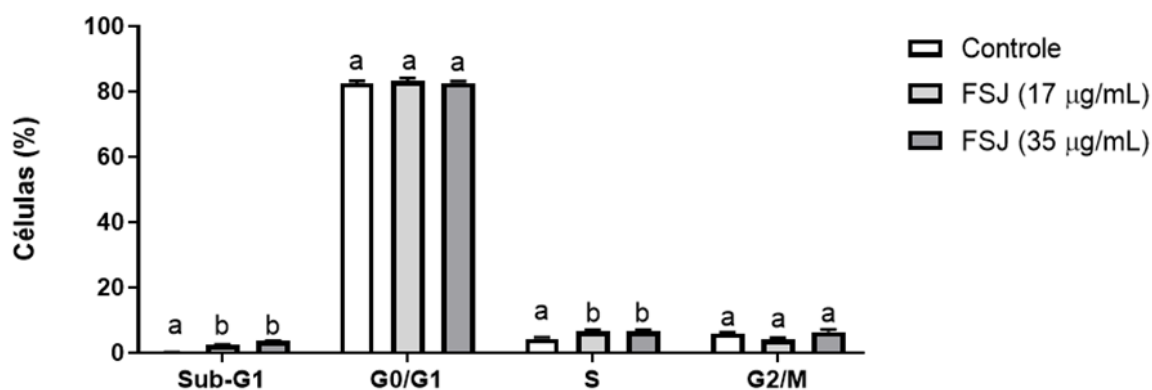
Fonte: Elaborado pela autora

O tratamento com FSJ foi mais seletivo para a linhagem tumoral MCF-7, sendo essa seletividade de 15x, quando calculada em relação a linhagem não tumoral HEK-293, e aproximadamente 5x quando calculada em relação a não tumoral de tecido glandular mamário, MCF-10A. Em contrapartida, a doxorrubicina, droga padrão utilizada, apresentou um índice de seletividade inferior a 1 (IS:0,36), sendo menos seletiva para a linhagem tumoral em relação a não tumoral MCF-10, apresentando seletividade inferior ao FSJ.

5.4 Efeito do FSJ sobre a progressão do ciclo celular

O tratamento de 48 h com o FSJ aumentou significativamente a população de células em sub-G1 (17 $\mu\text{g/mL}$: 0,54 ± 0,08%; 35 $\mu\text{g/mL}$: 0,61 ± 0,07%, $p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle (0,10 ± 0,02 %), induziu aumento significativo da população de células na fase S do ciclo nos grupos tratados como 17 $\mu\text{g/mL}$ e 35 $\mu\text{g/mL}$ (6,64 ± 0,39%; 35 $\mu\text{g/mL}$: 6,65 ± 0,42%, respectivamente, com $p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (4,3 ± 0,4%) (Figura 15).

Figura 15 Efeito do FSJ na distribuição de células de adenocarcinoma mamário nas diferentes fases do ciclo celular após 48h de tratamento



Legenda: Percentual de células em cada fase do ciclo celular e no pico sub-G1 após 48 h de tratamento com FSJ (17 ou 35 µg/mL). Os dados estão expressos como média ± EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por análise de variância (ANOVA) one-way, seguido do teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para cada condição. < 0,05.

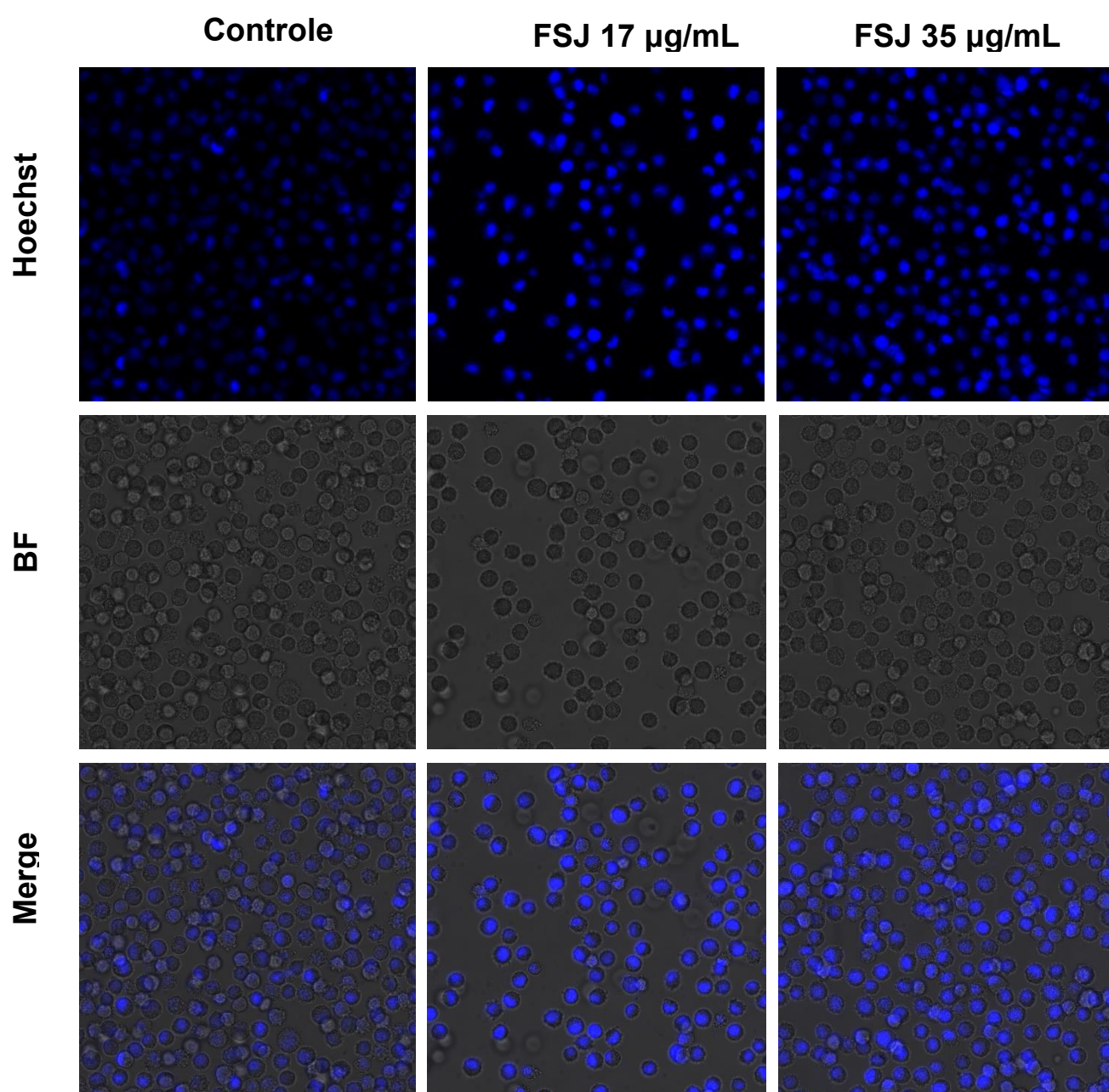
Fonte: Elaborado pela autora

5.5 Morte celular induzida pelo FSJ

5.5.1 Efeito do FSJ sobre a morfologia de células MCF-7 após coloração com Hoechst 34580 por microscopia confocal

A indução de apoptose pela fração alcaloide do extrato de *Solanum jabrense* (FSJ) foi analisada por coloração com Hoechst 34580 em células de adenocarcinoma mamário (MCF-7) após 48 horas de tratamento. As células foram tratadas com FSJ nas concentrações de 17 µg/mL e 35 µg/mL (que correspondem a metade e a CI₅₀, respectivamente) e a análise foi realizada por microscopia confocal. Na figura 16 estão representadas as imagens dos diferentes grupos experimentais marcados com Hoechst 34580. A condensação da cromatina indica a indução de apoptose pelo FSJ.

Figura 16 Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração com Hoechst em células de adenocarcinoma mamário incubadas com FSJ por 48 h



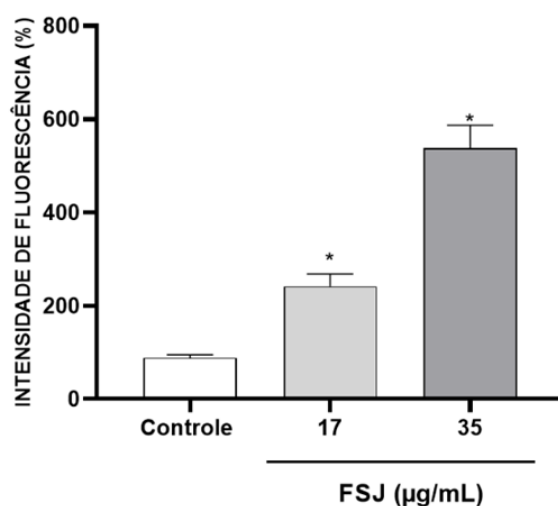
Legenda: Fotomicrografias de células MCF-7 coradas com Hoechst 34580 após 48 h de tratamento com FSJ (17 e 35 $\mu\text{g/mL}$). A coloração intensa indica condensação de cromatina e fragmentação nuclear, características de apoptose.

Fonte: Elaborado pela autora.

A intensidade de fluorescência, que reflete o grau de condensação da cromatina e fragmentação nuclear característica da apoptose. Os dados obtidos foram expressos em

comparação com o grupo controle não tratado, demonstrando um aumento significativo na intensidade de fluorescência nas células tratadas com o FSJ 17 µg/mL ($241,4 \pm 26\%$, $p < 0,05$) e 35 µg/mL, ($538,5 \pm 48,3\%$, $p < 0,05$) (Figura 17).

Figura 17 Indução de apoptose pelo FSJ analisada por coloração com Hoechst em células de adenocarcinoma mamário após 48h de tratamento



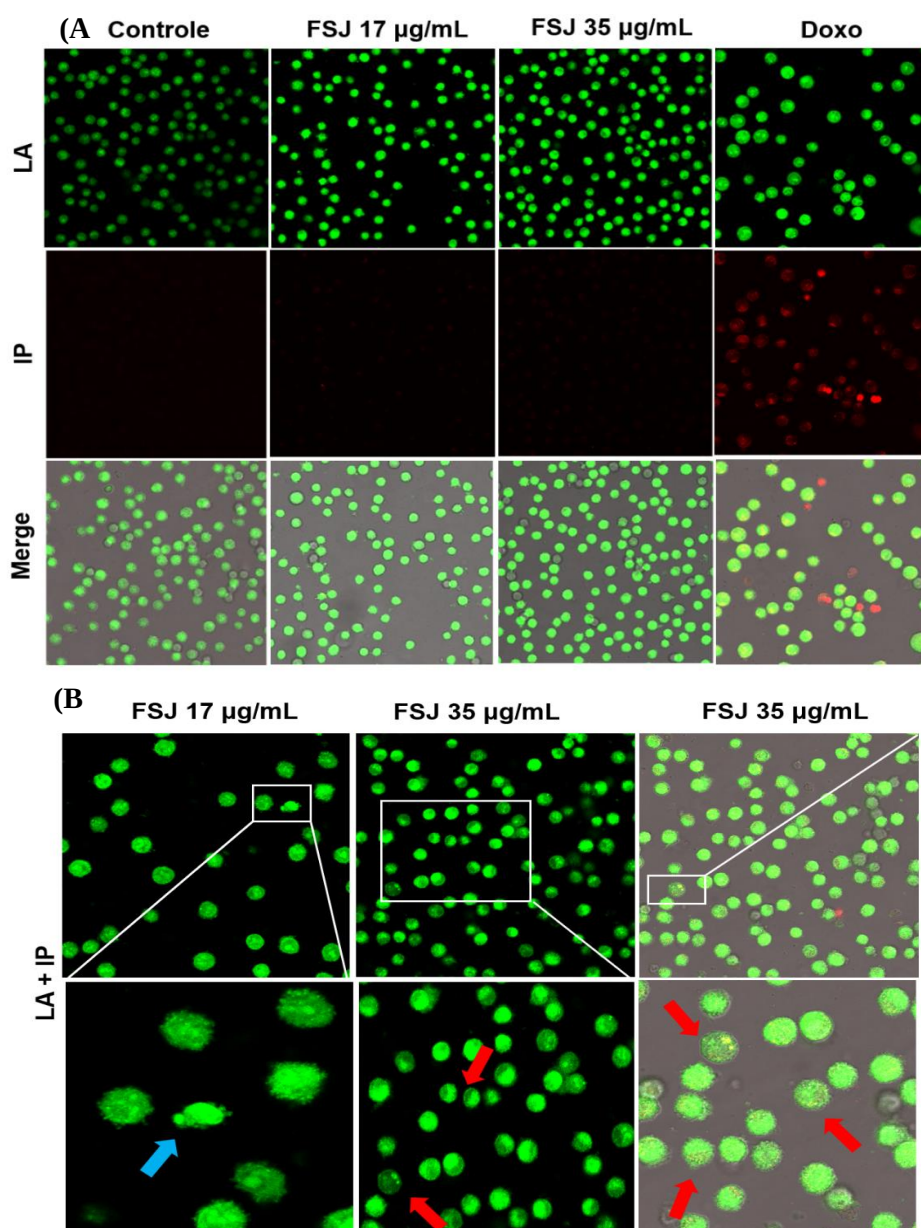
Legenda: Percentual de células marcadas com Hoechst 34580. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Dunnett, e as diferenças significativas em relação ao grupo controle são indicadas por $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora

5.5.2 Tipo de morte celular envolvida no efeito de FSJ em células MCF-7 por coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP)

A Figura 18 apresenta imagens representativas dos diferentes grupos experimentais de células MCF-7 marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) após 48 horas de tratamento com a fração alcaloide do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (FSJ) nas concentrações de 17 µg/mL e 35 µg/mL, além do tratamento com doxorubicina (DXR) a 4 µM.

Figura 18 Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) de células adenocarcinoma



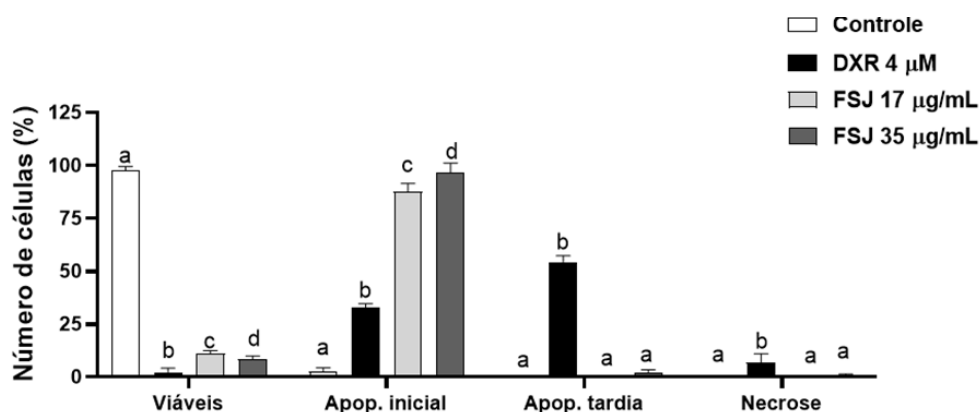
Legenda: Células MCF-7 após 48 h de tratamento com FSJ (17 ou 35 µg/mL) ou DXR (4 µM), marcadas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (PI) e observadas por microscopia confocal a laser. Em (A), as células viáveis apresentam núcleo verde claro e uma estrutura intacta. As células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde brilhante mostrando condensação da cromatina. As células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana enquanto as células necróticas apresentam núcleo vermelho. Em (B), a seta laranja indica condensação da cromatina; seta azul indica *blebs* de membrana e seta vermelha indica fragmentação do DNA. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Fonte: Elaborado pela autora

Na Figura 19, são apresentados os percentuais de células MCF-7 marcadas com IP e/ou LA, refletindo os efeitos dos tratamentos em diferentes estágios de morte celular. O tratamento com FSJ a 35 $\mu\text{g/mL}$ resultou em aumento significativo do percentual de células em apoptose inicial ($96,37 \pm 6,6\%$, $p < 0,05$) e em apoptose tardia ($1,91 \pm 5,85\%$, $p < 0,05$), sem induzir necrose significativa ($1,06 \pm 0,37\%$, $p < 0,05$). Da mesma forma, o FSJ a 17 $\mu\text{g/mL}$ elevou significativamente o percentual de células em apoptose inicial ($87,54 \pm 3,8\%$, $p < 0,05$) e em apoptose tardia ($0,39 \pm 0,30\%$, $p < 0,05$) em comparação ao controle para apoptose inicial ($2,38 \pm 1,86\%$, $p < 0,05$), e apoptose tardia ($0,34 \pm 0,2\%$, $p < 0,05$), também sem indução significativa de necrose ($0,49 \pm 0,19\%$, $p < 0,05$).

Por outro lado, a doxorrubicina (DXR) aumentou significativamente o percentual de células em apoptose inicial ($32,73 \pm 1,82\%$, $p < 0,05$), apoptose tardia ($54,33 \pm 5,59\%$, $p < 0,05$) e necrose ($6,82 \pm 4,17\%$, $p < 0,05$) em relação ao controle. Em contraste, o tratamento com ambas as concentrações de FSJ não induziu necrose.

Figura 19 Indução da apoptose pelo FSJ ou doxorrubicina (DXR) analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) em células de adenocarcinoma mamário após 48h de tratamento



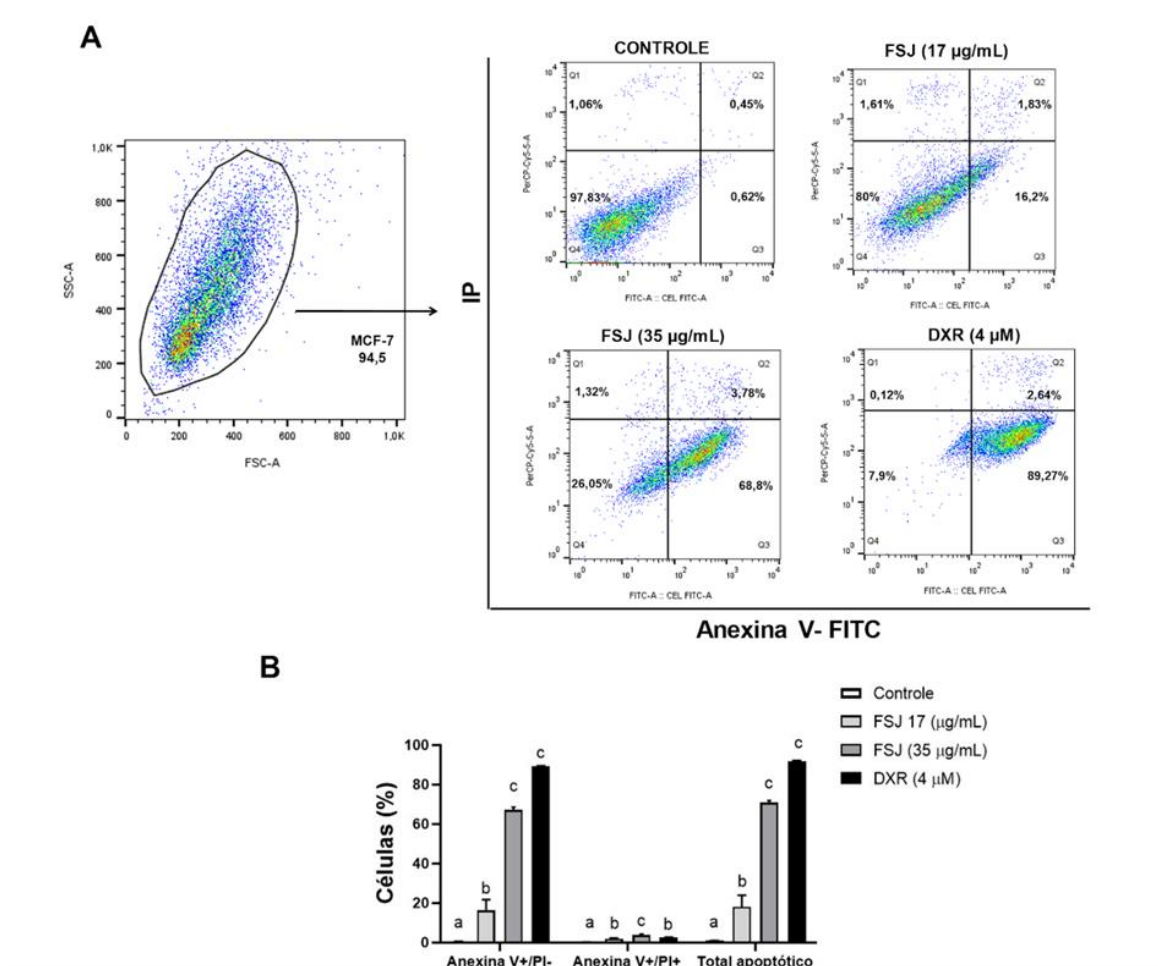
Legenda: Percentual de células coradas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídio (IP). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos experimentais de cada condição. $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora

5.5.3 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo

Como resultado da marcação com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP) e análise por citometria de fluxo foi possível observar que, após tratamento de 48 h, o FSJ induziu aumento significativo do percentual de células em apoptose inicial (anexina V-FITC+/IP-) ($17 \mu\text{g/mL}$: $16,2 \pm 5,4\%$; $35 \mu\text{g/mL}$: $68,8\% \pm 2,9\%$, $p < 0,05$ para ambos) e apoptose tardia/necrose, ou seja, células duplamente marcadas (anexina V-FITC+/IP+), na concentração de $17 \mu\text{g/mL}$ ($1,83 \pm 0,47\%$, $p < 0,05$) e $35 \mu\text{g/mL}$ ($3,78 \pm 0,53\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (apoptose inicial: $0,62 \pm 0,21\%$, apoptose tardia/necrose: $0,45 \pm 0,11\%$, com $p < 0,05$). O tratamento com o FSJ aumentou significativamente o percentual de células apoptóticas (apoptose total) nas concentrações utilizadas $17 \mu\text{g/mL}$ ($18,13 \pm 5,85\%$, $p < 0,05$) e $35 \mu\text{g/mL}$ ($72,65 \pm 10,16\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($1,73 \pm 0,32\%$, $p < 0,05$). Além disso, é possível observar que o controle positivo utilizado, doxorrubicina (DXR), induziu aumento significativo do número de células em apoptose inicial ($89,27 \pm 0,26\%$, $p < 0,05$), apoptose tardia/necrose ($2,64 \pm 0,15\%$, $p < 0,05$) e total ($91,91 \pm 0,38\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle sem tratamento (Figura 20).

Figura 20 Efeito do FSJ ou doxorrubicina (DXR) em células de adenocarcinoma mamário MCF-7 marcadas com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP) após 48 h de tratamento



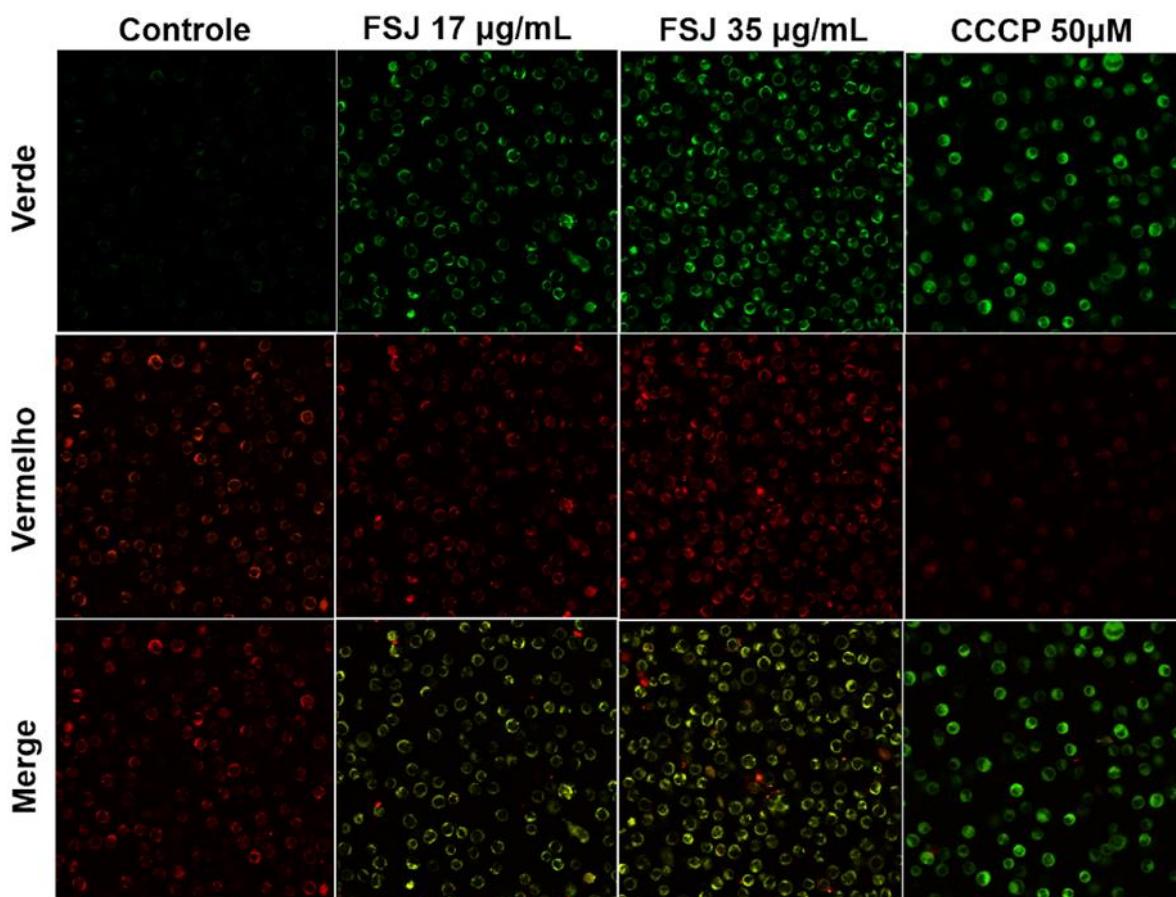
Legenda: Efeito do FSJ ou da doxorrubicina (DXR) nas células de adenocarcinoma mamário (MCF-7) marcadas com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP) após 48h de tratamento. (A) Dotplots representativos obtidos por meio da análise de citometria de fluxo. Os dotplots foram divididos em quatro quadrantes que representam diferentes populações celulares: células viáveis (anexina V-FITC-/IP-, quadrante inferior esquerdo), células em apoptose precoce (anexina V FITC+/IP-, quadrante inferior direito), células em apoptose tardia/necrose (anexina V-FITC+/IP+, quadrante superior direito) e células mortas (anexina V-FITC-/IP+, quadrante superior esquerdo). Um total de 10.000 eventos/amostra foram adquiridos usando detectores de fluorescência vermelha (IP, 325-488 nm) e detectores de fluorescência verde (FITC, 493-525 nm). (B) Porcentagem de células marcadas com anexina V-FITC e/ou IP. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de dois experimentos realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para cada condição. $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora

5.5.4 Efeito do FSJ sobre a despolarização mitocondrial após marcação com JC-1

Na Figura 21, é possível observar as imagens representativas dos grupos experimentais de células MCF-7 coradas com JC-1, evidenciando a integridade da membrana mitocondrial após tratamento com a fração alcaloide do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (FSJ) por 48 horas nas concentrações de 17 e 35 µg/mL, com o CCCP (50 µg/mL) como controle positivo.

Figura 21 Imagens representativas da avaliação da despolarização mitocondrial por coloração de JC-1, em células adenocarcinoma mamário (MCF-7) incubadas com o FSJ ou CCCP por 48h

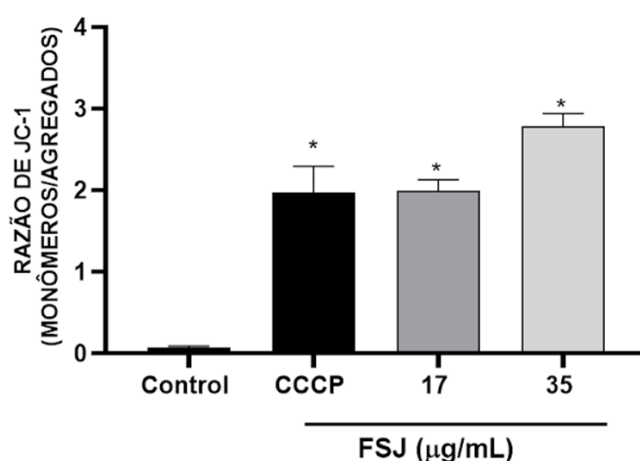


Legenda: Fotomicrografias representativas de células MCF-7 coradas com o JC-1 após tratamento com FSJ (17 e 35 µg/mL) por 48h. O controle positivo foi o CCCP (50 µg/mL). A coloração verde indica mitocôndrias com perda de potencial de membrana, sugerindo despolarização mitocondrial, enquanto a coloração vermelha representa mitocôndrias com potencial de membrana preservado. As imagens foram obtidas por microscopia confocal.

Fonte: Elaborado pela autora

A análise da integridade mitocondrial (Figura 22) mostra que o tratamento com FSJ induz uma despolarização significativa da membrana mitocondrial, evidenciada pelo aumento da razão verde/vermelho (monômeros/agregados) em comparação ao grupo controle. Esse efeito foi mais pronunciado na concentração de 35 $\mu\text{g/mL}$ de FSJ ($2,78 \pm 0,15$, $p < 0,05$), sendo mais elevado do que os valores observados no controle positivo tratado com CCCP 50 $\mu\text{g/mL}$ ($1,9 \pm 0,31$, $p < 0,05$). A proporção de fluorescência verde/vermelho é uma medida do potencial da membrana mitocondrial, e as imagens obtidas por microscopia confocal mostraram um aumento na intensidade de fluorescência verde/vermelha nas células tratadas com FSJ, indicando a indução de despolarização mitocondrial pelo FSJ.

Figura 22 Efeito do FSJ na despolarização mitocondrial de células MCF-7



Legenda: Gráfico da razão de JC-1 (monômeros/agregados) após tratamento com FSJ (17 e 35 $\mu\text{g/mL}$) ou CCCP (50 $\mu\text{g/mL}$) por 48h. A despolarização mitocondrial foi medida utilizando a coloração JC-1, onde um aumento da razão entre fluorescência verde/vermelha indica a despolarização. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM, e as diferenças significativas em relação ao grupo controle são indicadas por $p < 0,05$. Foram realizados três experimentos em triplicata.

Fonte: Elaborado pela autora

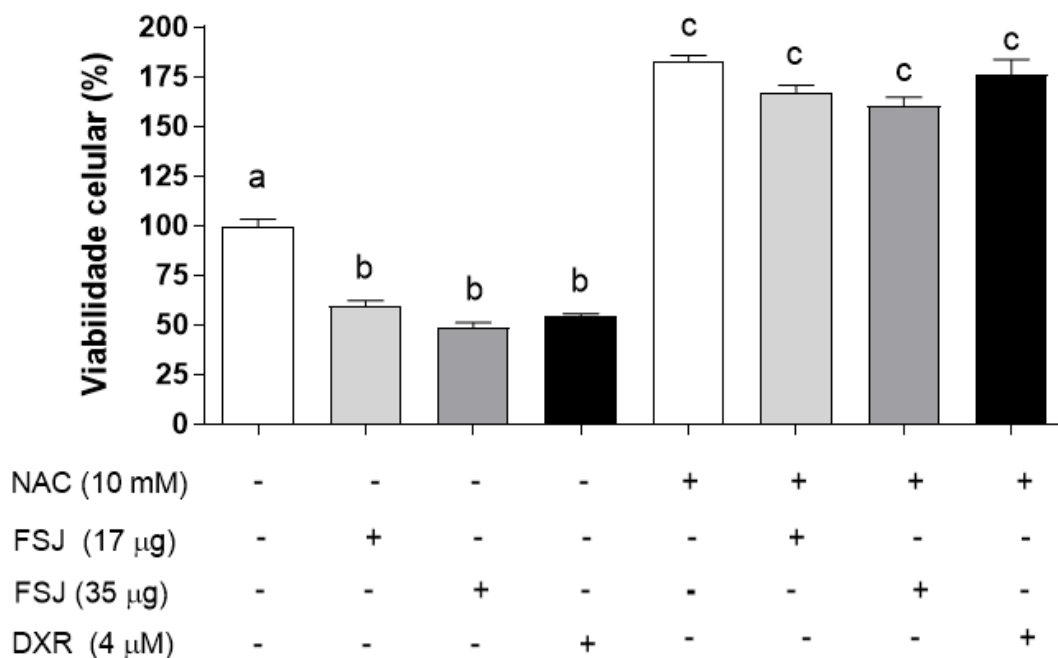
5.3 Efeito do FSJ sobre o estado redox celular

5.6 Citotoxicidade do FSJ ou doxorrubicina (DXR) na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Após 48 horas de tratamento com o FSJ na ausência de N-acetilcisteína (NAC), observou-se redução significativa na viabilidade celular. As concentrações de 17 e 35 µg/mL de FSJ reduziram a viabilidade de 100% (controle) para $59,70 \pm 4,2\%$ e $48,89 \pm 2,6\%$, respectivamente ($p < 0,05$).

No entanto, o pré-tratamento com NAC (10 mM) por três horas preveniu o efeito citotóxico do FSJ, resultando em aumento da viabilidade celular nas concentrações de 17 µg/mL ($168,69 \pm 0,05\%$) e 35 µg/mL ($161,7 \pm 0,06\%$). Como esperado, o NAC elevou a sobrevivência celular de forma semelhante à observada para a doxorrubicina ($177,42 \pm 0,10\%$). Os dados estão expressos na Figura 23.

Figura 23 Citotoxicidade do FSJ ou doxorrubicina (DXR) na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) após 48 h de tratamento



Legenda: Viabilidade celular (%) após 48 h de tratamento com FSJ ou DXR na presença ou ausência de NAC. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições. $p < 0,05$.

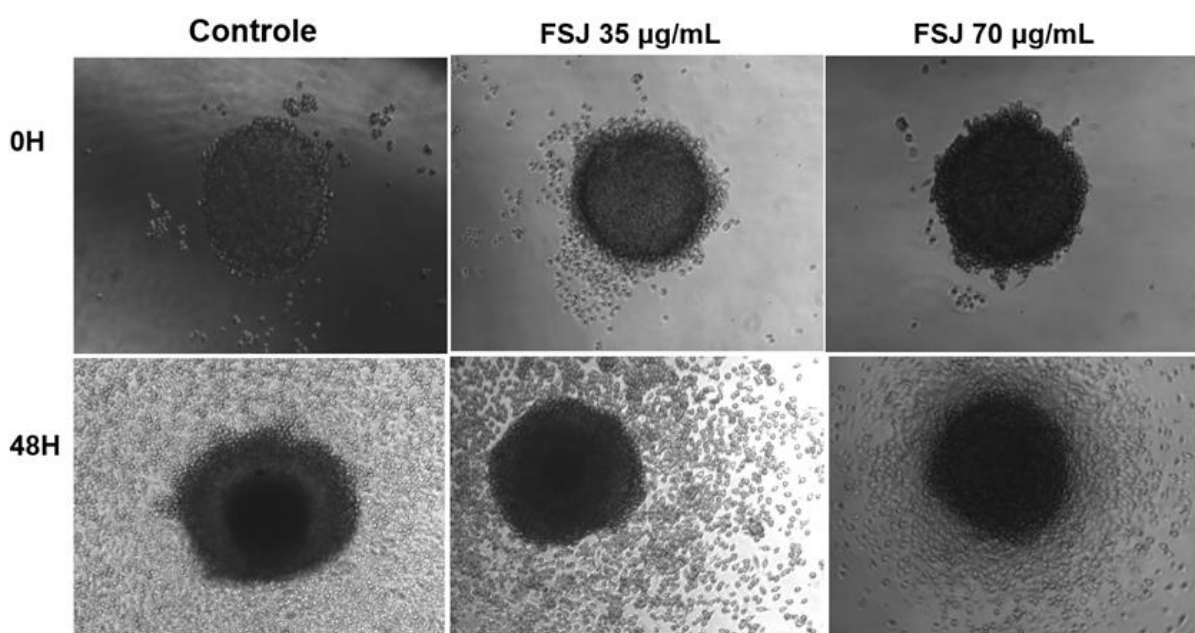
Fonte: Elaborado pela autora

5.7 Avaliação do efeito citotóxico do FSJ em modelo de cultura 3D em células de adenocarcinoma mamário (MCF-7)

5.7.1 Efeito do FSJ na migração celular e no tamanho dos esferoides de células MCF-7, após 48 h de tratamento

Na Figura 24, é possível observar as imagens representativas dos esferoides de células MCF-7 nos períodos de 0h e 48h, após tratamento com o FSJ nas concentrações correspondentes à CI_{50} (35 $\mu\text{g/mL}$) e duas vezes a CI_{50} (70 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 24 Imagens representativas dos esferoides de células MCF-7 tratados com FSJ em diferentes concentrações após 0 e 48 horas de tratamento



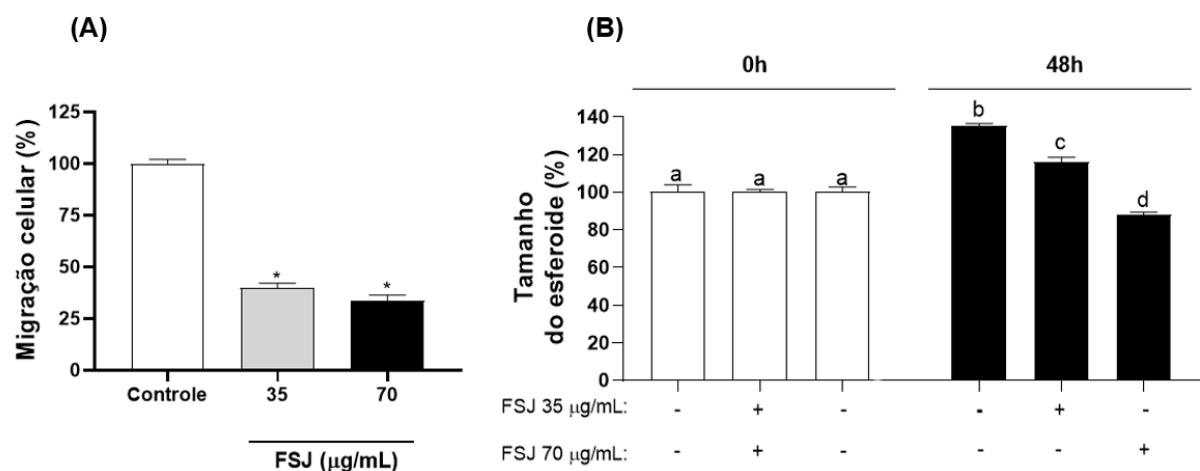
Legenda: Fotografias de esferoides de células MCF-7 no período de 0 horas (início do tratamento) e 48 horas após tratamento com FSJ (35 $\mu\text{g/mL}$ e 70 $\mu\text{g/mL}$). As imagens ilustram a redução significativa na migração celular, enquanto a redução no tamanho dos esferoides foi observada apenas na maior concentração (70 $\mu\text{g/mL}$).

Fonte: Elaborado pela autora

A análise da migração celular ao redor dos esferoides, após 48 horas de exposição ao FSJ nas concentrações de 35 e 70 $\mu\text{g/mL}$, demonstrou uma redução significativa na migração celular em ambos os grupos tratados, em comparação com o controle ($100 \pm 2,24\%$). Especificamente, o tratamento com 35 $\mu\text{g/mL}$ resultou em migração de $82,54 \pm 4,5\%$, enquanto

70 µg/mL reduziu a migração para $67,36 \pm 3,13\%$ ($p < 0,05$ para ambos) (Figura 25A). Também foi avaliado o efeito do FSJ sob a área dos esferoides tumorais. O resultado obtido mostrou redução significativa no tamanho médio dos esferoides após 48 horas de tratamento com FSJ, nas concentrações de 35 e 70 µg/mL, quando comparado ao grupo controle ($135 \pm 3,03\%$; $p < 0,05$). Especificamente, o tratamento com 35 µg/mL reduziu o tamanho dos esferoides para $115 \pm 6,3\%$ ($p < 0,05$), enquanto a concentração de 70 µg/mL reduziu para $87,75 \pm 4,08\%$ ($p < 0,05$). A concentração de 70 µg/mL reduziu significativamente o tamanho dos esferoides ao longo do período de incubação, passando de $100 \pm 6,9\%$ no tempo inicial (0h) para $87,75 \pm 4,08\%$ após 48 horas de tratamento ($p < 0,05$), destacando o efeito antitumoral do FSJ. Em contraste, o grupo controle apresentou aumento no tamanho dos esferoides ao longo das 48 horas, de $99,99 \pm 3,6\%$ para $135 \pm 3,03\%$, conforme representado na figura 25B.

Figura 25 Efeito do FSJ sobre a migração celular e o tamanho dos esferoides de células MCF-7 após 48 horas de tratamento



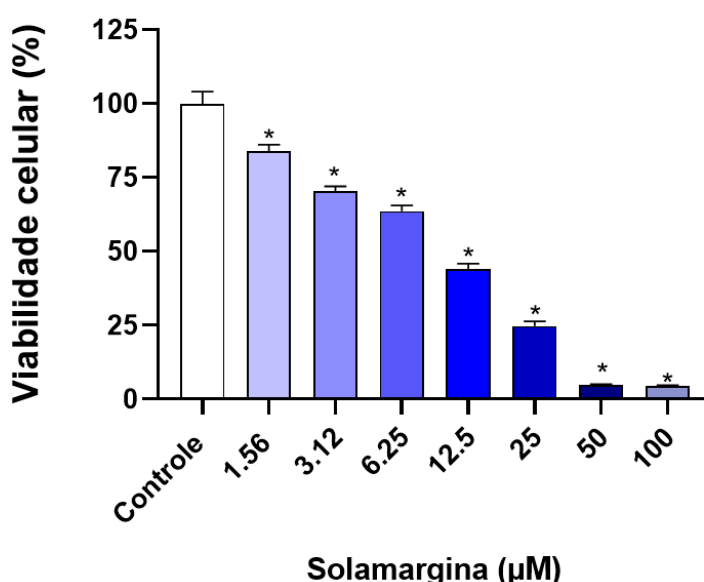
Legenda: Gráfico (A) mostrando a redução significativa da migração celular de esferoides de células MCF-7 tratados com FSJ nas concentrações de 35 µg/mL (CI_{50}) e 70 µg/mL ($2XCI_{50}$). Gráfico (B) indicando a redução significativa no tamanho dos esferoides tratados com FSJ na concentração de 35 e 70 µg/mL. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) two-way seguido do teste de Dunnett (25A) e de Tukey (25B).

Fonte: Elaborado pela autora

5.8 Citotoxicidade da Solamargina em células MCF-7 após 48 h de incubação

As concentrações testadas foram: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 e 1.56 μM . A viabilidade celular foi avaliada, resultando em uma IC_{50} de $8,65 \pm 0,04 \mu\text{M}$. Os dados obtidos mostraram que a solamargina induziu uma diminuição da viabilidade celular em MCF-7 de maneira dependente da concentração. Essa redução foi observada a partir da menor concentração testada, 1,56 μM ($83,78 \pm 0,03$, $p > 0,05$), sendo mais acentuada na concentração mais alta, 100 μM ($4,5 \pm 0,00$, $p > 0,05$) (Figura 26).

Figura 26 Citotoxicidade da solamargina em células MCF-7 após 48 h de tratamento



Legenda: Viabilidade celular (%) após 48 h de tratamento com Solamargina. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

5.9 Estudos *in silico* por docagem molecular

A tabela 6 apresenta a previsão de docking molecular, mostrando as médias das energias (MolDock score e Rerank score) referentes às interações intermoleculares entre a Solamargina, ou ligantes disponíveis no Protein Data Bank (PDB) e as proteínas Capases 3,7 e 8, a proteína ERK1 (Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1), JNK1 (Proteína Cinase

N-terminal c-Jun 1), p38 α MAPK (Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α), e o Inibidor da subunidade beta da cinase do fator nuclear *kappa* B (IKK β), juntamente com seus respectivos valores de afinidade (p).

Tabela 5 Valores de energia de ligação (kJ/mol) entre Solamargina ou outros ligantes e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 2 (ERK2), a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1), a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK), e o IKK β

Alvo	PDB ID	Ligante	Moldock Score [kJ.mol ⁻¹]
ERK2	6SLG	Solamargina	-193.81
		LHZ	-162.40
P38 α	7BDO	Solamargina	-197.96
		TBK	-178.19
JNK1	2G01	Solamargina	-210.83
		73Q	-60.59
IKK β	4KIK	Solamargina	-204.851
		KSA_700	-209.09

Legenda: Resultados de ancoramento molecular (Moldock Score) dos complexos formados entre diferentes alvos proteicos (Caspase 3, Caspase 7, Caspase 8, JNK1, P38 α e ERK2, IKK β) e ligantes (Solamargina, PRD_000231, PRD_000422, Ac-IETD-aldehyde, 73Q, TBK, LHZ e KSA_700). A análise revelou interações de afinidade com os alvos listados, sendo os valores de Moldock Score representados em kJ.mol⁻¹, indicando a estabilidade do complexo formado.

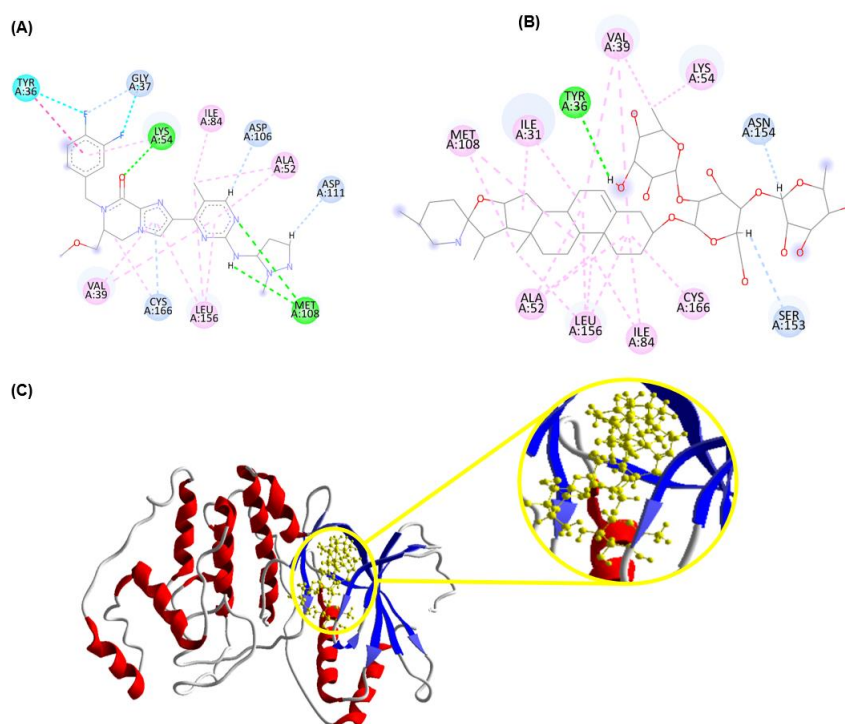
Fonte: Elaborado pela autora

As melhores orientações de encaixe para os ligantes com os alvos investigados podem ser observadas nas figuras 27 a 30, nas quais as interações das moléculas com os resíduos de aminoácidos das proteínas alvo estão representadas por diferentes cores, sendo: interações do tipo ligações de hidrogênio (linha tracejada em verde), interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa: π alquil; roxo: π - σ ; azul: halogênios – Br, Cl e I) e interações estéricas (linhas tracejadas vermelhas: doador-doador; linhas tracejadas laranjas: π -ânion).

Para o alvo ERK2, a energia do complexo formado pela proteína e o ligante cristalográfico presente no PDB (LHZ) foi maior do que a do complexo formado com a solamargina. Os escores obtidos foram $-162,40 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $-193,81 \text{ kJ.mol}^{-1}$, respectivamente. O menor escore da solamargina em relação ao LHZ pode ser explicado por seu maior número de interações pi-alquil.

No caso dos complexos formados com a ERK2 (PDB: 6SLG), as interações observadas foram: interações de hidrogênio e interações hidrofóbicas do tipo pi-alquil. Na solamargina, as interações de hidrogênio foram estabelecidas com os resíduos Arg 413 (5 interações), Ser 411 (3 interações), Ser 316 (2 interações), Cys 360, Tyr 36 e Arg 258. As interações pi-alquil foram detectadas nos resíduos Trp 420 (2 interações), Tyr 412 (2 interações), Arg 413 (2 interações), Lys 457 e Arg 258 (Figura 27B).

Figura 27 Interações moleculares entre a Solamargina ou o ligante do Protein Data Bank (PDB) e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 2 (ERK2)



Legenda: Interações moleculares em 2D entre (A) o ligante LHZ (PDB), (B) solamargina, e os resíduos de aminoácidos da proteína ERK2 (ID do PDB: 6SLG), e em 3D (D) entre a solamargina e o sítio ativo da Proteína ERK2. Resíduos: Asp (ácido aspártico), Glu (ácido glutâmico), Lys (lisina), Ile (isoleucina), Thr (treonina), Met (metionina), Cys (cisteína), Ala (alanina), Leu (leucina), Gln (glutamina) Val (valina), Asn (asparagina), Ser (serina), Tyr (tirosina), Trp (triptofano), His (histidina), Pro (prolina) e Phe (fenilalanina).

Fonte: Elaborado pela autora

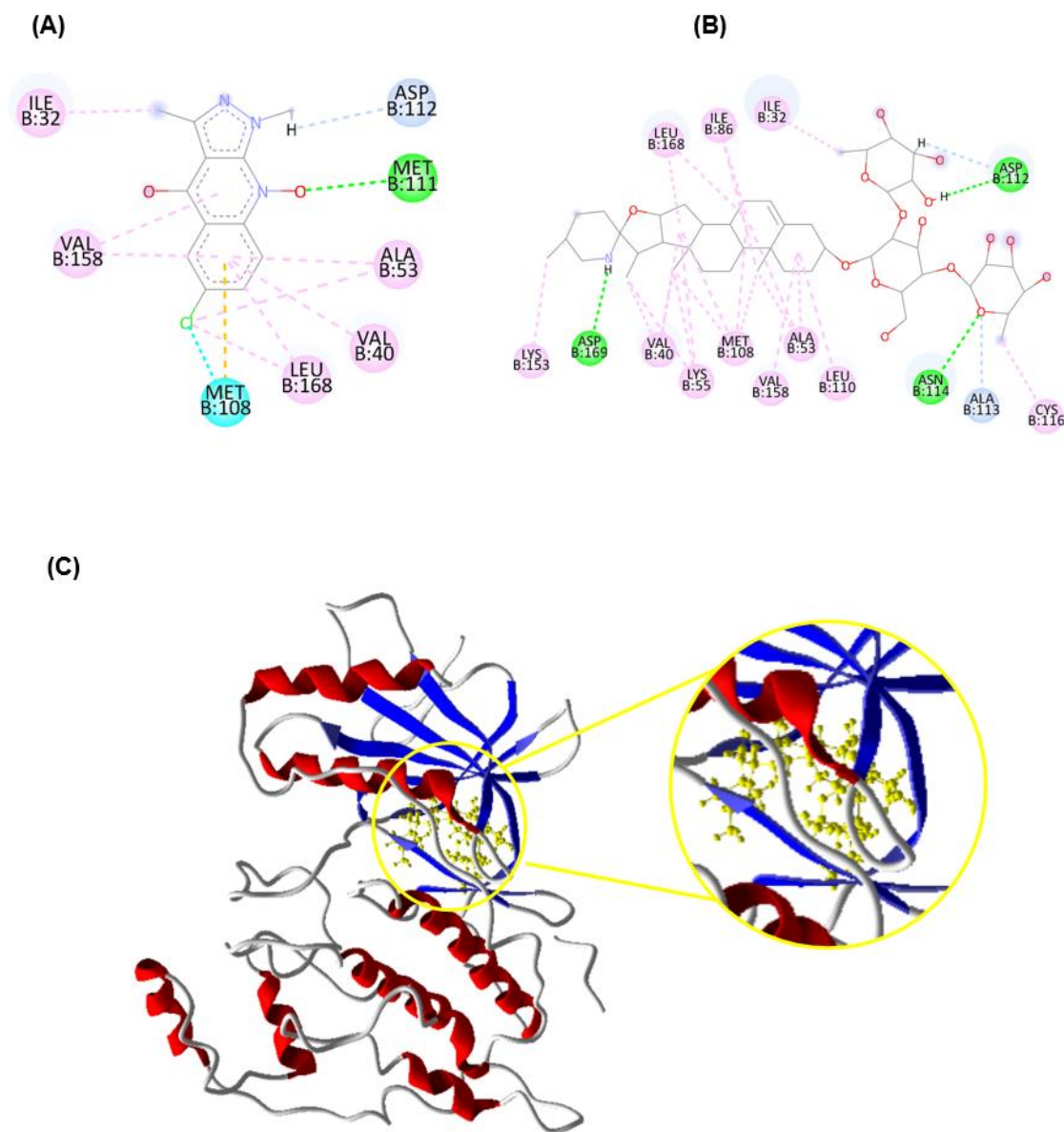
Ao comparar os complexos formados pelos ligantes co-cristalizados obtidos do PDB e a solamargina com as enzimas JNK1 e P38 α , padrões semelhantes emergiram. O complexo JNK1-solamargina apresentou um MolDock score de -210,83 kJ.mol⁻¹, significativamente mais alto do que o valor do complexo JNK1-73Q (-60,59 kJ.mol⁻¹). De forma similar, o complexo P38 α -solamargina exibiu um MolDock score de -197,96 kJ/mol, que foi menor (ou seja, mais favorável) do que o valor para o complexo P38 α -TBK (-178,19 kJ.mol⁻¹).

Esses achados indicam de forma consistente que a solamargina forma complexos mais estáveis tanto com JNK1 quanto com P38 α em comparação com os ligantes co-cristalizados. Ao analisar as interações entre os aminoácidos, observa-se que a solamargina forma

significativamente mais interações do que o 73Q, especialmente interações pi-alquil. Além disso, a solamargina interage com os mesmos resíduos de aminoácidos que o 73Q, sugerindo uma possível atividade em relação a essa proteína. Em relação ao ligante TBK, embora a solamargina apresente uma menor diversidade de interações em comparação ao ligante cristalográfico, a maior quantidade de interações por ligações de hidrogênio pode explicar o score mais baixo obtido pela solamargina.

No caso da JNK1 (PDB: 2G01), as interações moleculares dos complexos envolvem ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas do tipo pi-alquil. Adicionalmente, foram observadas uma interação de haleto e uma interação pi-sulfur com o resíduo Met 108 no complexo formado com o ligante 73Q (Figura 28A). Para a solamargina, foram detectadas interações de hidrogênio nos seguintes resíduos: Asp 112 (2 interações), Asn 114, Ala 113 e Asp 169. Também ocorreram interações pi-alquil com os resíduos: Met 108 (4 interações), Ala 53 (3 interações), Lys 55 (3 interações), Val 40 (2 interações), Leu 168 (2 interações), Ile 86 (2 interações), Ile 32 e Lys 153. A interação pi-alquil com o resíduo Val 40 é especialmente relevante, pois esse resíduo desempenha um papel importante na inibição da JNK1 (Figura 28B).

Figura 28 Interações moleculares entre a solamargina, ou ligante do Protein Data Bank (PDB) e a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1)

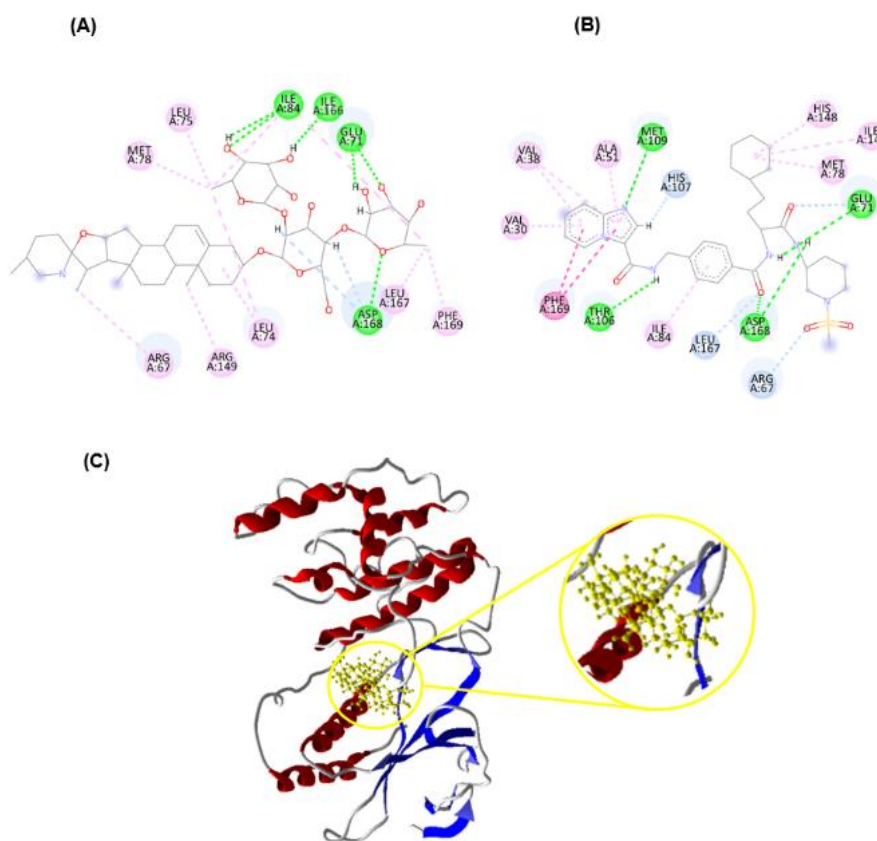


Legenda: Interações moleculares em 2D entre (A) ligante 73Q (PDB) (B) solamargina e os resíduos de aminoácidos da proteína JNK1 (ID do PDB: 2G01), e em 3D (D) entre a solamargina e o sítio ativo da Proteína JNK1. Resíduos: Asp (ácido aspártico), Glu (ácido glutâmico), Lys (lisina), Ile (isoleucina), Thr (treonina), Met (metionina), Cys (cisteína), Ala (alanina), Leu (leucina), Gln (glutamina) Val (valina), Asn (asparagina), Ser (serina), Tyr (tirosina), Trp (triptofano), His (histidina), Pro (prolina) e Phe (fenilalanina).

Fonte: Elaborado pela autora

Em relação à P38 α (PDB: 7BDO), as interações observadas foram semelhantes às da ERK2, com a adição de uma interação do tipo pi-pi stacked (linhas tracejadas em rosa escuro). No complexo com a solamargina, foram observadas interações de hidrogênio com os resíduos: Asp 168 (3 interações), Ile 84 (2 interações), Glu 71 (2 interações) e Ile 166. As interações hidrofóbicas do tipo pi-alquil ocorreram nos resíduos: Leu 74 (2 interações), Ile 84 (2 interações), Phe 169, Leu 167, Arg 149, Arg 67, Met 78 e Leu 75. A interação pi-alquil com o resíduo Arg 67 é de particular importância, pois esse resíduo está localizado na cavidade do sítio ativo, desempenhando um papel crucial no mecanismo de inibição dessa enzima (Figura 29B).

Figura 29 Interações moleculares entre a Solamargina ou o ligante do Protein Data Bank (PDB) e a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK)

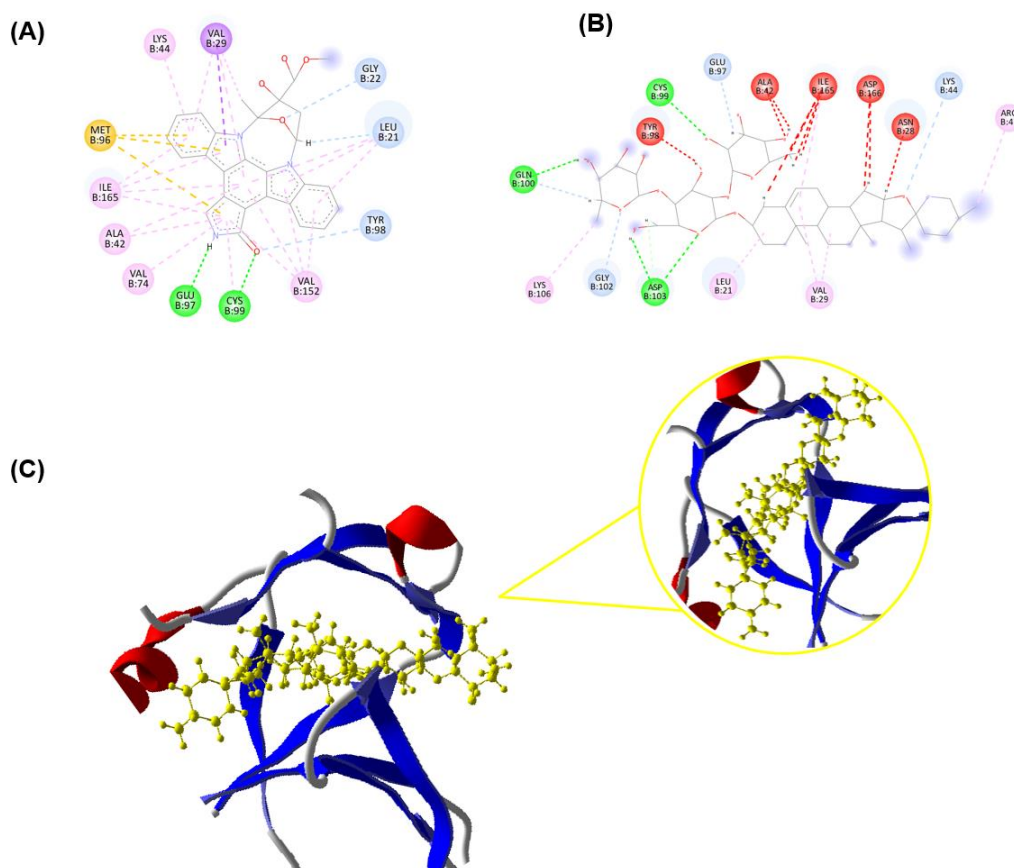


Legenda: Interações moleculares em 2D entre (A) ligante TBK (PDB) (B) a solamargina e os resíduos de aminoácidos da proteína p38 α MAPK (ID do PDB: 7BDO), e em 3D (D) entre a solamargina e o sítio ativo da Proteína p38 α MAPK. Resíduos: Asp (ácido aspártico), Glu (ácido glutâmico), Lys (lisina), Ile (isoleucina), Thr (treonina), Met (metionina), Cys (cisteína), Ala (alanina), Leu (leucina), Gln (glutamina) Val (valina), Asn (asparagina), Ser (serina), Tyr (tirosina), Trp (triptofano), His (histidina), Pro (prolina) e Phe (fenilalanina).

Fonte: Elaborado pela autora

No complexo da IKK β (PDB: 4KIK), Observou-se a presença de interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa), ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde), interações de hidrogênio (linhas tracejadas em azul) e interações estéricas (linhas tracejadas em vermelho). Adicionalmente uma interação pi-enxofre presente no complexo com o composto KSA_700, que envolve o resíduo Met 96 (Figura 30A). No caso da solamargina, as interações estéricas ocorreram com os seguintes resíduos: Ile 165 (3 interações), Asp 166 (2 interações), Ala 42 (2 interações), Tyr 98 e Asn 28. As interações de hidrogênio foram estabelecidas com os resíduos Asp 103 (3 interações), Gln 100 (2 interações), Cys 99, Glu 97, Lys 44 e Gly 102. As interações do tipo pi-alquil envolveram os resíduos Val 29 (2 interações), Leu 21, Arg 47 e Lys 106 (Figura 30B). A interação com o resíduo Lys 44 é particularmente importante, pois está relacionada ao processo de inibição da IKK β e, conseqüentemente, da via NF- κ B.

Figura 30 Interações moleculares entre a Solamargina ou o ligante do Protein Data Bank (PDB) e o Inibidor da subunidade beta da cinase do fator nuclear kappa B (IKK β)



Legenda: Interações moleculares em 2D entre (A) ligante KSA_700 (PDB) (B) solamargina e os resíduos de aminoácidos da proteína IKK β (ID do PDB: 4KIK), e em 3D (D) entre a solamargina e o sítio ativo da Proteína p38 α MAPK. Em vermelho estão indicadas as interações estéricas, em azul e rosa as interações hidrofóbicas e em verde as interações de hidrogênio; Resíduos: Asp (ácido aspártico), Glu (ácido glutâmico), Lys (lisina), Ile (isoleucina), Thr (treonina), Met (metionina), Cys (cisteína), Ala (alanina), Leu (leucina), Gln (glutamina) Val (valina), Asn (asparagina), Ser (serina), Tyr (tirosina), Trp (triptofano), His (histidina), Pro (prolina) e Phe (fenilalanina).

Fonte: Elaborado pela autora

Discussão

6 DISCUSSÃO

A natureza constitui uma fonte rica de compostos bioativos, o que tem impulsionado investigações globais voltadas à descoberta e análise dos efeitos biológicos de produtos naturais no tratamento de diversas patologias, incluindo o câncer (Sairazi; Sirajudeen, 2020). Neste trabalho, foi avaliada atividade antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico da *Solanum jabrense*.

Nesse contexto, a investigação do potencial antitumoral da *Solanum jabrense* começou com a avaliação *in vitro* do extrato hidroalcoólico dessa espécie (ESJ) em várias linhagens celulares malignas humanas. Para isso, foi utilizado o ensaio de MTT, um método colorimétrico amplamente empregado para quantificar a citotoxicidade (Gonçalves *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2023). Foi observado como resultado do ensaio do MTT, que ESJ induziu redução da viabilidade celular em todas as linhagens celulares testadas, sendo essa redução mais acentuada nas linhagens celulares de adenocarcinoma mamário MCF-7 e MDA-MB-231, apresentando uma média de inibição de: $10,90\% \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$; e $13,40\% \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

O câncer de mama é o tipo mais comum entre as mulheres, com 2,3 milhões de novos casos e mais de 685.000 mortes registradas em 2020 (Sung *et al.*, 2021). Esses dados ressaltam a necessidade de desenvolver novas terapias para essa doença, e, nesse cenário, a *Solanum jabrense* se destaca. Assim, tendo em vista o potencial de inibição tumoral do ESJ sobre o câncer de mama, investigou-se então o efeito deste extrato sobre linhagens celulares nos tempos de 24 h, 48h e 72h, a fim de determinar a CI_{50} nestes tempos de tratamento para a MCF-7 (24h: $87,03 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$; 48h $27,72 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$; 72h $23,91 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$) e MDA-MB-231 (24h: $45,44 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$; 48h: $36,64 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$; 72h: $20,90 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$).

Esses resultados são consistentes com os achados de Ling e colaboradores (2019) que investigaram o potencial antitumoral do extrato aquoso de *Solanum nigrum* L. (AESN), uma solanácea pertencente à mesma família da *Solanum jabrense*, em células da linhagem de câncer de mama humano MCF-7. Os resultados mostraram que o AESN inibiu o crescimento dessas células. Além disso, Churiyah, Ningsih e Firdayani (2020) ao avaliarem o efeito do extrato etanólico do fruto de *S. nigrum* L., observaram que ele inibiu a proliferação das células MCF-7, com valores de CI_{50} de $40,77 \pm 4,86 \mu\text{g/m}$, evidenciando o potencial antitumoral desta família.

A quimioterapia é frequentemente a terapia de escolha para o tratamento do câncer. No entanto, por não ser seletiva, está associada a efeitos tóxicos significativos, o que ressalta a

necessidade de estratégias terapêuticas que minimizem esses efeitos (Muhamad *et al.*, 2018). O índice de seletividade é uma medida fundamental nesse contexto, pois permite avaliar se um fármaco é preferencialmente direcionado a células tumorais às células normais. Esse parâmetro é essencial, considerando que os quimioterápicos convencionais podem causar danos de forma indiscriminada a tecidos malignos e saudáveis, resultando em efeitos adversos como náuseas, alopecia e imunossupressão (Blagosklonny, 2023; Muhamad; Plengsuriyakarn; Na Bangchang, 2018). Para reduzir essa toxicidade, busca-se desenvolver medicamentos seletivos que explorem características específicas das células cancerosas, como alterações metabólicas e alvos moleculares únicos, permitindo tratamentos mais eficazes e menos tóxicos (Saleh *et al.*, 2023).

Diante disso, realizamos a análise da citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (ESJ) em células saudáveis de rim embrionário humano (HEK-293), o que possibilitou o cálculo do índice de seletividade. Os resultados mostraram que o tratamento com o ESJ apresentou maior seletividade para células tumorais da linhagem MCF-7 no período de 48 horas. Dessa forma, essa linhagem foi selecionada para a continuidade das investigações.

Nesse sentido, dada a relevância dos alcaloides presentes nas solanáceas, decidiu-se testar a fração alcaloide do extrato de *Solanum jabrense* (FSJ) para avaliar se ela apresentaria uma maior seletividade para células tumorais, e para isso, calculamos a seletividade da FSJ em função das linhagens não tumorais MCF-10A (glandular mamária humana) e HEK-293 (rim embrionário humano). Assim, observamos que a fração alcaloide do extrato foi quinze vezes mais seletiva para as células tumorais quando comparada com a linhagem HEK-293, e aproximadamente cinco vezes mais seletiva para MCF-7 em relação a MCF-10A.

Em contraste, a doxorrubicina, droga padrão utilizada amplamente no tratamento do carcinoma de mama, apresentou um índice de seletividade inferior a 1 (IS: 0,36), em relação a MCF-10A, o que justifica os efeitos adversos frequentemente associados ao tratamento com este fármaco (Moustafa *et al.*, 2023).

Embora o objetivo das pesquisas seja encontrar drogas antitumorais com um equilíbrio adequado entre eficácia e toxicidade, o efeito tóxico em células não tumorais continua sendo um desafio significativo, contribuindo para os efeitos adversos observados em pacientes em tratamento contra o câncer, no entanto, a citotoxicidade observada em células saudáveis não impede a investigação contínua dos efeitos antitumorais de novos compostos, mas ressalta a necessidade de busca por aqueles mais seletivos (Sousa *et al.*, 2023).

O efeito antitumoral de produtos naturais e seus derivados pode ser investigado por diferentes mecanismos, como a alteração da distribuição celular nas diversas fases do ciclo celular, a indução da apoptose e a regulação do estresse oxidativo (Di Martili *et al.*, 2020). Assim, para identificar o modo pelo qual a fração exerce seu efeito, foram analisados os possíveis mecanismos de ação antitumoral deste extrato na linhagem celular mais sensível à sua citotoxicidade. Para isso, foi levada em consideração a CI_{50} após 48 h de tratamento ($35,50 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$), período em que o extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (ESJ) apresentou o melhor índice de seletividade. Para isso, foram utilizadas concentrações de $35 \mu\text{g/mL}$ e $17 \mu\text{g/mL}$ do FSJ, correspondentes à concentração total e metade da CI_{50} , respectivamente, para o tratamento das células.

Com base no potencial dos inibidores ciclo-específicos na terapia do câncer de mama (Piezzo *et al.*, 2020; Panda *et al.*, 2019; Ray *et al.*, 2019), investigou-se o efeito do FSJ na progressão do ciclo celular em células MCF-7. O ciclo celular, composto por interfase (fases G1, S e G2) e mitose, é um processo rigorosamente controlado, no qual a célula cresce, replica seu DNA e se prepara para a divisão, culminando na formação de duas células-filhas. Eventuais falhas nesse processo podem levar ao crescimento celular descontrolado, característico do câncer (Brandmaier; Hou; Shen, 2017).

Para avaliar o impacto do FSJ em cada fase do ciclo celular, as células MCF-7 foram marcadas com iodeto de propídio (IP) e analisadas por citometria de fluxo, o que possibilitou a quantificação precisa do DNA em diferentes fases: G0/G1 (DNA $2n$), S (DNA entre $2n$ e $4n$), G2/M (DNA $4n$) e sub-G1 (DNA $< 2n$) (Di Martili *et al.*, 2020; Jayat; Ratinaud, 1993; Hodroj *et al.*, 2018). Essa análise é essencial para identificar o potencial do FSJ em promover efeitos antitumorais por meio da interrupção seletiva do ciclo celular em células cancerosas.

Os resultados mostraram que o tratamento com FSJ por 48 horas levou a um aumento significativo no percentual de células na fase S do ciclo celular, além de uma elevação na população sub-G1. Em concordância com estes resultados estão os achados de Paul e Kundu (2017), que também observaram que a fração de clorofórmio do extrato metanólico de *Solanum nigrum* induziu um aumento na população de células sub-G1 na linhagem SiHa. De modo semelhante, Ferrag (2015), observou um aumento na população de células em sub-G1 e na fase S do ciclo celular na linhagem HepG2, após o tratamento com a solamargina isolada da *Solanum seaforthianum*. Tendo em vista que a solamargina, foi identificada como composto majoritário do FSJ, é possível estabelecer uma correlação entre os efeitos observados neste estudo e a composição química dos extratos analisados.

A fase S é responsável pela síntese e replicação do DNA (Rasli *et al.*, 2023), e o aumento de células nessa fase pode ser atribuído a uma parada do ciclo no ponto de verificação intra-fase S, impedindo a replicação e o alongamento do DNA (Seiler *et al.*, 2007). Já a elevação na população sub-G1, que apresenta menor conteúdo de DNA devido à fragmentação genética (Chainumnim *et al.*, 2022), é característica de células em processo de apoptose (Zhang *et al.*, 2023). Esses achados sugerem que o FSJ possivelmente induz apoptose nas células tratadas. Assim, considerando que o aumento da fração sub-G1 no ciclo celular está associado a apoptose, investigou-se mais a fundo a capacidade do FSJ de promover esse mecanismo de morte celular.

A apoptose é um processo de morte celular rigorosamente regulado, caracterizado por eventos como encolhimento celular, picnose, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, compactação do citoplasma, formação de *blebs* na membrana plasmática e fragmentação em corpos apoptóticos (Obeng, 2020; Kalinin *et al.*, 2020). A desregulação desse processo é essencial para o desenvolvimento do câncer. Portanto, a indução da apoptose tem sido um dos principais alvos de terapias antitumorais (Jan; Chaudhry, 2019). Diante disso, para investigar a indução desse processo, diversas técnicas podem ser empregadas, como a microscopia e a citometria de fluxo utilizando marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídio (D'arcy, 2019).

Nesse contexto, para avaliar as características típicas de apoptose, foi utilizada a coloração com o marcador nuclear Hoechst 34580 e empregou-se a microscopia confocal a laser. Este método permite a criação de uma fonte de luz pontual por meio de lasers, rejeitando a luz fora de foco e empregando um comprimento de onda específico para iluminar um ponto pequeno. Além disso, pontos focais estratégicos garantem a captura da fluorescência desejada, resultando em imagens de alta resolução (Elliott, 2019; Jayamohan, 2023). Com essa técnica, foi possível observar que o tratamento com FSJ induziu aumento significativo da fluorescência nas células MCF-7 em comparação com o grupo controle (não tratado), indicando que houve condensação da cromatina, uma característica típica da apoptose.

Para uma análise mais detalhada dos efeitos do tratamento com FSJ, realizou-se a coloração dupla com laranja de acridina e iodeto de propídio (IP) também utilizando microscopia confocal, que permitiu a visualização das características morfológicas das células tratadas, como a formação de *blebs* de membrana e fragmentação do DNA, e confirmou a indução de apoptose pelo FSJ, bem como revelou aumento significativo da população de células em apoptose, especialmente nos estágios iniciais.

Semelhantemente, Zhao e colaboradores (2018) avaliaram o efeito apoptótico da degalactotigonina, um composto da *Solanum nigrum* L., e investigou as características morfológicas das células por coloração com Hoechst, observando que o extrato induziu apoptose de células de osteossarcoma, além de suas características típicas, como a condensação da cromatina, após 48 horas de tratamento. Da mesma forma, Ding e colaboradores (2012) mostraram que a solamargina, purificada de *Solanum nigrum* L., induziu condensação da cromatina em células de hepatoma humano, SMMC-7721, observada também por coloração com Hoechst.

Adicionalmente, Ibrahim Abdel Aziz e colaboradores (2022) investigaram a indução de apoptose em células A549, câncer de pulmão, após tratamento com nanopartículas derivadas de *Solanum procumbens*. A análise incluiu uma dupla marcação com brometo de etídio (um intercalante de DNA, assim como o iodeto de propídio) e laranja de acridina, que revelou um aumento na proporção de células com características apoptóticas, semelhante ao observado no presente estudo com o FSJ.

Assim, as células foram expostas ao FSJ e analisadas por citometria de fluxo pela dupla marcação com anexina-FITC e iodeto de propídio. Este método é direcionado para a avaliação da apoptose pois visa a dosagem da fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que, em células viáveis, está orientado para o lado interno da membrana celular, durante a apoptose, a fosfatidilserina é externalizada, o que é uma característica distintiva desse processo (Shlomovitz, Speir, & Gerlic, 2019, Shin & Takatsu, 2020). A anexina V se liga especificamente à fosfatidilserina, enquanto o iodeto de propídio (IP) se liga ao DNA em células com integridade de membrana comprometida, permitindo a distinção entre apoptose e necrose (Hussain *et al.*, 2019, Kira *et al.*, 2023). Desse modo, as células viáveis não são marcadas por anexina V-FITC e IP. Células em apoptose inicial são marcadas apenas com anexina V-FITC, enquanto células em apoptose tardia mostram dupla marcação (anexina V-FITC/IP), já as células necróticas são marcadas apenas com IP (Twair *et al.*, 2021).

O tratamento com FSJ levou a um aumento no percentual de células em apoptose, abrangendo tanto apoptose inicial quanto tardia, o que já havia sido revelado através da microscopia confocal. Esse tipo de morte celular vem sendo documentado por diversos estudos envolvendo extratos e compostos isolados derivados das Solanáceas. A apoptose induzida pela degalactotigonina isolada da *Solanum nigrum*, foi observada em células de osteossarcoma tratadas por 48 horas (Zhao *et al.*, 2018). Em adição, linhagens celulares de câncer de ovário humano, A2780 e SKOV3, também apresentaram esse processo após o tratamento com o

extrato etanólico de *S. lyratum Thunb* (Zhang *et al.*, 2021). De modo semelhante, foi demonstrado que células SW620, provenientes de câncer colorretal humano, sofreram apoptose após o tratamento com a solasonina isolada da *Solanum nigrum* (Lan *et al.*, 2023).

Assim, para melhorar a compreensão sobre o efeito apoptótico da fração alcaloídica do extrato de *Solanum jabrense*, investigamos também o potencial mitocondrial das células tratadas através da microscopia confocal por coloração com o JC-1, um corante lipofílico que, em condições mitocondriais normais, acumula-se no interior da mitocôndria formando agregados vermelhos, enquanto, em situações de perda de potencial mitocondrial, resultante da permeabilização da membrana mitocondrial, se dissocia em monômeros verdes dispersos no citosol. Este ensaio permite a análise da ativação da via intrínseca da apoptose, que é modulada por alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial (Kumar *et al.*, 2022).

Os dados obtidos revelaram um aumento significativo na razão entre a fluorescência verde e vermelha nas células tratadas com o FSJ, evidenciando a ocorrência de despolarização mitocondrial, o que sugere a ativação da apoptose por meio dessa via. A via intrínseca é regulada por um delicado equilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, onde as primeiras promovem a formação de poros na membrana mitocondrial, facilitando a liberação de citocromo c e SMAC no citosol e desencadeando a cascata apoptótica (Carneiro; El-Deiry, 2020, Obeng, 2020; Voss; Strasser, 2020). Portanto, os resultados indicam que o FSJ atua como um indutor da apoptose via intrínseca, reforçando seu potencial na indução de morte celular programada em células tumorais.

Estudos anteriores, como o realizado por Khan e colaboradores (2023), também mostraram que o extrato aquoso de *Solanum nigrum* (SNWE) induziu uma despolarização mitocondrial significativa em células MCF-7 e MDA-MB-231 de maneira dependente da concentração. Esses achados são semelhantes aos deste estudo com o FSJ, evidenciando que esse mecanismo de disfunção mitocondrial, um indicativo de apoptose pela via intrínseca, pode ser uma característica comum entre espécies do gênero *Solanum*, destacando seu potencial terapêutico como indutores de apoptose seletiva em células tumorais.

Prosseguindo com a elucidação do mecanismo antitumoral da fração alcaloídica do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (FSJ), investigou-se o estado redox das células MCF-7 após tratamento com esse extrato. Para isso, foi realizado o ensaio de MTT na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC), uma molécula antioxidante (Sahasrabudhe; Terluk; Kartha, 2023), considerando um tempo de tratamento de 48 horas.

Os resultados mostraram que o pré-tratamento com NAC foi capaz de prevenir significativamente a citotoxicidade do FSJ nas células MCF-7, corroborando o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito antitumoral induzido por este extrato. As ROS desempenham um papel fundamental como moléculas sinalizadoras nas vias de transdução de sinais intracelulares (Checa; Aran, 2022). Em células tumorais, os níveis elevados de ROS estão associados à proliferação celular, metástase, inibição da apoptose e estimulação da angiogênese (Yang; Chen; Shi, 2019; Sajadimajd; Khazaei, 2018; Huang; Nan, 2019). Entretanto, concentrações excessivas de ROS podem causar danos irreversíveis e levar à morte celular (Kirtonia; Sethi; Garg, 2020).

Agentes antineoplásicos, como doxorrubicina e cisplatina, induzem a apoptose em células cancerígenas por meio do estresse oxidativo (Davalli *et al.*, 2018; Albasher *et al.*, 2018; Sinha; Tokar; Bushel, 2020). De modo semelhante ao que observamos, Zhang e colaboradores (2021) relataram que o pré-tratamento com NAC inibiu a citotoxicidade em células tratadas com o extrato etanólico de *Solanum lyratum* Thunb. Em adição, Yan e colaboradores (2020) demonstraram que o pré-tratamento com NAC reverteu o efeito citotóxico da α -solanina, isolada de *Solanum nigrum*, em células de câncer colorretal humano (HCT-116). Nessa perspectiva, sugere-se que a indução da apoptose causada pelo FSJ em células MCF-7 está associada ao aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio.

Os efeitos do FSJ também foram avaliados através do ensaio de cultura tridimensional, com o objetivo de analisar seu efeito sobre a migração e o tamanho dos esferoides de células MCF-7, uma vez que esse modelo oferece uma perspectiva mais ampla da complexidade tumoral *in vivo*. O uso da cultura tridimensional surgiu para superar as limitações dos modelos de cultivo monocamada (2D), que frequentemente apresentam compostos promissores que falham quando testados em condições *in vivo* (Coelho, 2020).

Nesse sentido, o modelo tridimensional mimetiza de maneira mais precisa o microambiente tumoral, reproduzindo aspectos fundamentais, como a estrutura do tumor e a interação celular. Essa abordagem permite observar a capacidade do microambiente tumoral de conferir resistência aos fármacos quimioterápicos e proporciona uma melhor compreensão dos mecanismos de metástase, além de avaliar a eficácia de novas estratégias terapêuticas (Barbosa *et al.*, 2021).

Considerando que o FSJ demonstrou uma seletividade para células tumorais, foi relevante avaliar a extensão desse efeito sobre a migração celular e o tamanho do tumor por meio de um modelo de cultura 3D. Esse estudo visa determinar se o FSJ impacta a capacidade

das células tumorais de se espalhar, um fator crítico na progressão do câncer, além de analisar seu efeito sobre o tamanho do tumor. Como resultado, foi demonstrado que o tratamento com FSJ reduziu a migração celular nas concentrações de tratamento testadas e, em adição, promoveu diminuição do tamanho dos esferoides após 48h.

A inibição da migração celular observada em nosso estudo está alinhada com os resultados de Zhao e colaboradores (2018), que demonstraram, através do ensaio de cultura tridimensional, a supressão da migração e metástase de osteossarcoma por *S. nigrum* L. Em adição, Wang e colaboradores (2010) relataram um efeito inibitório do extrato aquoso de *S. nigrum* Linn. na metástase do melanoma. Ling e colaboradores (2019) ao investigarem o efeito do extrato aquoso de *Solanum nigrum* L. observaram uma inibição da migração celular em células MCF-7. Esses achados, em conjunto com os deste trabalho, evidenciam o potencial citotóxico das plantas do gênero *Solanum* e sua capacidade de modular propriedades de proliferação e invasividade dos tumores.

Através da cromatografia líquida de ultra desempenho (UPLC) conduzida pela Me. Anauara Lima e Silva, após estudo fitoquímico realizado no LMCA (dados não publicados até o presente), foi possível identificar 47 compostos no extrato bruto hidroalcoólico da *Solanum jabrense* Agra e M. Nee, com predominância de alcaloides, especialmente glicoalcaloides. Além desses, também foram detectadas saponinas, compostos fenólicos e flavonoides (Anexo 3). Esses resultados estão em conformidade com o perfil químico característico de espécies do gênero *Solanum* L. (Kaunda *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2021).

As plantas da família Solanaceae são notoriamente ricas em alcaloides, compostos que têm um papel essencial nas propriedades terapêuticas dessas espécies. Entre as espécies medicinais de *Solanum*, já foram identificados aproximadamente 670 constituintes químicos, dos quais 63 são alcaloides esteroidais e 31 pertencem a outros tipos de alcaloides, incluindo os glicoalcaloides. Estes últimos, exibem propriedades tóxicas significativas contra células cancerígenas (Kaunda; Zhang, 2019).

No caso específico de *S. jabrense*, o composto majoritário identificado foi a solamargina (Anexo 3), isolada a partir do extrato bruto, e sua identidade foi confirmada por meio de técnicas de RMN unidimensionais e bidimensionais, e a comparação entre os perfis químicos da fração alcaloídica e do extrato bruto revelou uma alta semelhança entre ambos.

Nesse contexto, já foi demonstrado que a solamargina (SM) de outras espécies do gênero *Solanum*, possui atividade tóxica contra células cancerígenas (Li *et al.*, 2016). Em células MCF-7 e MDA-MB-231, a SM apresentou maior citotoxicidade comparada à

cicloheximida (Akter *et al.*, 2015). Em modelos de melanoma murino B16F10, SM inibiu a proliferação tumoral e promoveu a permeabilização da membrana lisossomal, ativando a via de morte mitocondrial extrínseca (Furtado *et al.*, 2022).

Embora a solamargina já tenha sido destacada como composto majoritário em várias plantas do gênero *Solanum L.* e investigada em estudos sobre sua atividade antitumoral, a relevância deste trabalho está no fato de que *Solanum jabrense* ainda não foi cientificamente avaliada quanto ao seu potencial antitumoral. Além disso, a solamargina utilizada neste estudo foi isolada especificamente de *S. jabrense*, uma espécie nunca antes explorada para esse fim. Isso representa uma oportunidade inédita para investigar tanto o potencial farmacológico da planta quanto os efeitos do glicoalcaloide isolado.

Posteriormente, para confirmar que o efeito citotóxico do FSJ era proveniente da solamargina, foi realizado um ensaio de MTT em células MCF-7, o qual demonstrou que esse glicoalcaloide possui elevada citotoxicidade nessa linhagem. Li e colaboradores (2016) demonstraram que a solamargina exibiu efeitos antitumorais, caracterizados pela despolarização mitocondrial e pela modulação da expressão de moléculas relacionadas à apoptose. Em adição, foi demonstrado que a solamargina derivada de *Solanum nigrum* apresenta citotoxicidade em células de câncer de mama (Akter *et al.*, 2015). No presente estudo, avaliou-se a citotoxicidade da solamargina isolada de *Solanum jabrense*.

Estudos têm demonstrado que efeitos antitumorais podem estar relacionados a elevação das espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez que essas moléculas podem induzir citotoxicidade através da ativação ou inativação de vias de sinalização intracelular, como a via das MAPKs (Zhao *et al.*, 2023) e a via do NF- κ B (Ahmadian *et al.*, 2017). Com o intuito de explorar o papel dessas vias de sinalização na ação antitumoral do FSJ, foi realizado um estudo de *docking* molecular utilizando estruturas cristalográficas dessas proteínas para formar complexos proteína-ligante com a solamargina, o composto majoritário do FSJ.

O *docking* molecular é uma técnica computacional capaz de prever a interação e a energia de ligação de determinadas moléculas a um alvo proteico específico. Esse método possibilita identificar, entre várias moléculas, aquela que possui a maior afinidade de ligação ao alvo. Em relação aos produtos naturais, essa é uma ferramenta valiosa para a triagem virtual de possíveis interações entre compostos naturais e alvos relacionados a doenças (Zubair *et al.*, 2020), incluindo o câncer (Cava; Castiglioni, 2020).

Nesse contexto, essa ferramenta foi empregada para avaliar a afinidade de ligação e os mecanismos de interação entre a solamargina, que é o composto predominante do FSJ, ou os

ligantes disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB), com as MAPKs: ERK2, JNK1, p38 α e do IKK β , alvos relacionados com as vias de indução de morte por apoptose

Nesse contexto, as vias de sinalização das MAPKs estão envolvidas em diversos processos celulares, como a proliferação e a sobrevivência celular (Ullah *et al.*, 2023). No câncer, essas proteínas exercem uma função dual, e a ativação dessas cinases pode promover tanto efeitos pró-tumorais quanto antitumorais (Stefani *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2020).

As proteínas ERK1 e ERK2, por serem ubiquitivamente expressas, não apresentam diferenças significativas em sua regulação e localização celular (Buscà, Pouysségur, Lenormand, 2016). Assim, a análise de *docking* molecular focou na interação entre a solamargina e a ERK2. Os resultados indicaram interação relevante com o resíduo Met 108 da ERK2, que desempenha um papel crítico no sítio de inibição dessa MAPK (Ward *et al.*, 2019), além de interações com o resíduo Lys 54. Essa evidência sugere que a solamargina modula diretamente a atividade da ERK2, inibindo seu papel nas vias de sinalização celular, dado seu envolvimento na regulação da proliferação e sobrevivência celular (Guo *et al.*, 2020).

Nesse sentido, apesar de não terem sido encontrados estudos de *docking* molecular específicos para compostos estruturalmente relacionados à solamargina, observa-se uma lacuna na literatura quanto a investigações deste tipo, alguns trabalhos que analisaram substâncias com efeito anticâncer por meio de *docking* molecular demonstraram que essas substâncias interagiram com os mesmos aminoácidos que a solamargina em nosso estudo. Essas interações sugerem uma relevância potencial desses resíduos na atividade anticancerígena.

Al e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antitumoral do parthenolide (PTL), uma molécula derivada da *Magnolia grandiflora*, que apresentou resultados significativos contra linhagens de células de câncer de pulmão. No estudo de *docking molecular*, foi observado que o PTL interagiu com a proteína ERK2 por meio de resíduos de aminoácidos, incluindo o Lys 54, semelhante ao que foi encontrado para a solamargina neste estudo.

A JNK exerce um papel antitumoral significativo no contexto do câncer de mama, especialmente em estudos que exploram sua ativação como um mecanismo de indução da morte celular. Investigações sobre produtos naturais revelaram que compostos como o WZ35, um análogo da curcumina, induzem a morte de células de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231) através da ativação da JNK mediada por estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2019). Evidências mostram que a ativação da JNK pode promover a morte celular dependente de autofagia em carcinoma ovariano, sugerindo que esse caminho pode ser uma estratégia terapêutica viável (Dou *et al.*, 2019). Esses achados indicam que a modulação da via JNK pode

não apenas contribuir para a redução da viabilidade celular tumoral, mas também representar uma abordagem promissora para o desenvolvimento de terapias direcionadas ao câncer de mama, ressaltando a necessidade de explorar mais a fundo seu papel antitumoral.

Dessa forma, foram examinadas as interações moleculares potenciais entre a solamargina e a proteína JNK1. Os achados da análise *in silico* indicaram que a solamargina interagiu com a proteína JNK1 em resíduos de aminoácidos: Asp 112, Asn 114, Ala 113 e Asp 169, Met 108, Ala 53, Lys 55, Val 40, Leu 168, Ile 86, Ile 32 e Lys 153. Não foram encontrados na literatura dados de interação molecular *in silico* entre JNK1 e a solamargina, entretanto, a literatura oferece evidências de interações similares para outras substâncias.

De maneira comparável aos achados deste estudo, Sugara e colaboradores (2021) demonstraram que novas haloxantonas, identificadas como 3CX, 10CX, 5BX e 4BX, projetadas para atividade antitumoral, interagiram com a proteína JNK1, envolvendo resíduos de aminoácidos também observados na interação entre a solamargina e esse alvo (Ala53 e Ile32). Além disso, Ferreira e colaboradores (2023) investigaram o efeito antitumoral do EZ, isolado do óleo essencial de *Coniza bonariensis*, que mostrou efeito antimelanoma frente a células SK-MEL-28. O estudo de *docking molecular* revelou que o EZ interagia com a JNK1 através de resíduos de aminoácidos (Ala53 e Ile32), similar ao que foi encontrado para a solamargina. Dessa forma, os resultados deste trabalho reforçam a proteína JNK1 como um alvo promissor para explorar os mecanismos antitumorais do FSJ.

A p38 MAPK, uma cinase de serina/treonina da família das MAPKs, possui quatro isoformas principais, sendo a p38 α (MAPK14) amplamente expressa em quase todos os tipos celulares, enquanto as demais têm distribuição mais restrita (Corre; Paris, 2017; Cánovas; Nebreda, 2021). Essa isoforma é fundamental na promoção tumoral no câncer de mama, e sua ativação está associada à sobrevivência celular e à resistência a tratamentos quimioterápicos, como a cisplatina. A proteína, influencia a angiogênese por meio da regulação do VEGF, favorecendo o crescimento tumoral e dificultando o sucesso de terapias antitumorais (Lee; Rauch; Kolch, 2020). Dada sua relevância no estabelecimento de mecanismos de resistência e na manutenção do ambiente tumoral, investigar a p38 α pode fornecer novas estratégias para superar a resistência e aumentar a eficácia dos tratamentos (Igea; Nebreda, 2015). Assim, investigou-se as possíveis interações moleculares entre a solamargina e esta isoforma da p38 MAPK, e foram observadas interações favoráveis, através dos resíduos de aminoácidos Asp 168, Ile 84, Glu 71, Ile 166, Leu 74, Ile 84, Phe 169, Leu 167, Arg 149, Arg 67, Met 78 e Leu 75 e Arg 67.

De maneira comparável aos achados deste estudo, Khan e colaboradores (2019) demonstraram que inibidores à base de dibenzepinonas, dibenzoxepinas e benzosuberonas, projetados para atividade antitumoral, interagiram com a proteína p38 α MAPK, envolvendo resíduos de aminoácidos também observados na interação entre a solamargina e esse alvo, como Asp 168, Glu 71 e Ile 84. Além disso, o estudo de docking molecular desses inibidores revelou interações hidrofóbicas com resíduos como Leu 74, Phe 169 e Leu 75, de maneira semelhante ao observado para a solamargina. Notavelmente, a solamargina apresentou uma interação pi-alquil com o resíduo Arg 67, que desempenha um papel importante na cavidade do sítio ativo desse alvo. Esses achados reforçam que o mecanismo antitumoral do FSJ pode estar relacionado com a inibição dessa via de sinalização.

O NF- κ B é um fator de transcrição envolvido em processos essenciais das células, como proliferação, diferenciação e apoptose (Wang *et al.*, 2023). Suas subunidades podem se organizar em homo ou heterodímeros, sendo o heterodímero p50/p65 o mais frequente (Catheline *et al.*, 2021). Atualmente, há várias evidências que indicam o papel dual do NF- κ B no desenvolvimento do câncer (Wu; Sun; Xu, 2023).

A ativação dessa via ocorre por meio do complexo IKK, composto pelas subunidades IKK α , IKK β e o modulador essencial NEMO/IKK γ . A subunidade IKK β é responsável pela fosforilação da proteína I κ B, que, em seu estado basal, mantém o NF- κ B inativo no citoplasma. A fosforilação da I κ B leva à sua ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteassoma, permitindo a liberação do NF- κ B, que então se transloca para o núcleo, onde regula a transcrição de genes relacionados à inflamação, sobrevivência celular e resposta imune (Xu; Lei, 2021; Mussbacher *et al.*, 2023). Dessa forma, a subunidade IKK β emerge, portanto, como um alvo relevante, pois sua inibição pode interromper a ativação do NF- κ B, impactando diretamente na sinalização pró-tumoral através dessa via.

Diante disso, investigou-se as possíveis interações moleculares entre a solamargina e o IKK β . Neste trabalho, observou-se uma interação favorável entre esse ligante e o alvo investigado, através dos resíduos de aminoácidos Ile 165, Asp 166, Ala 42, Tyr 98, Asn 28, Asp 103, Gln 100, Cys 99, Glu 97, Lys 44, Gly 102, Val 29, Leu 21, Arg 47 e Lys 106. Além disso, de maneira similar, Guo e colaboradores (2020) investigaram a atividade antitumoral do ácido ursólico (UA) em células MCF-7, demonstrando, por meio de *docking* molecular, que o efeito antitumoral do UA estava associado à inibição de IKK β . Os resultados indicaram que o UA interagiu com os resíduos Asp 103, Ile 165, Cys 99, Val 29 e Leu 21, os quais também foram identificados na interação entre a solamargina e esse alvo proteico.

Diante do exposto, neste trabalho também podemos inferir que a *Solanum jabrense* apresenta potencial antitumoral. Este estudo demonstrou que o extrato hidroalcoólico da planta, rico em alcaloides como a solamargina, exibe citotoxicidade seletiva contra células tumorais de câncer de mama, especialmente as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Verificou-se que o extrato não apenas reduz a viabilidade das células cancerígenas, mas também inibe a migração celular e diminui o tamanho dos esferoides tumorais. Os resultados de *docking* molecular revelaram interações relevantes entre a solamargina e proteínas fundamentais para a apoptose e a sinalização celular, incluindo as proteínas da via das MAPKs e o IKK β . Esses achados indicam que a solamargina pode modular diretamente essas vias, reforçando o potencial terapêutico da *Solanum jabrense* como uma fonte natural de agentes antitumorais.

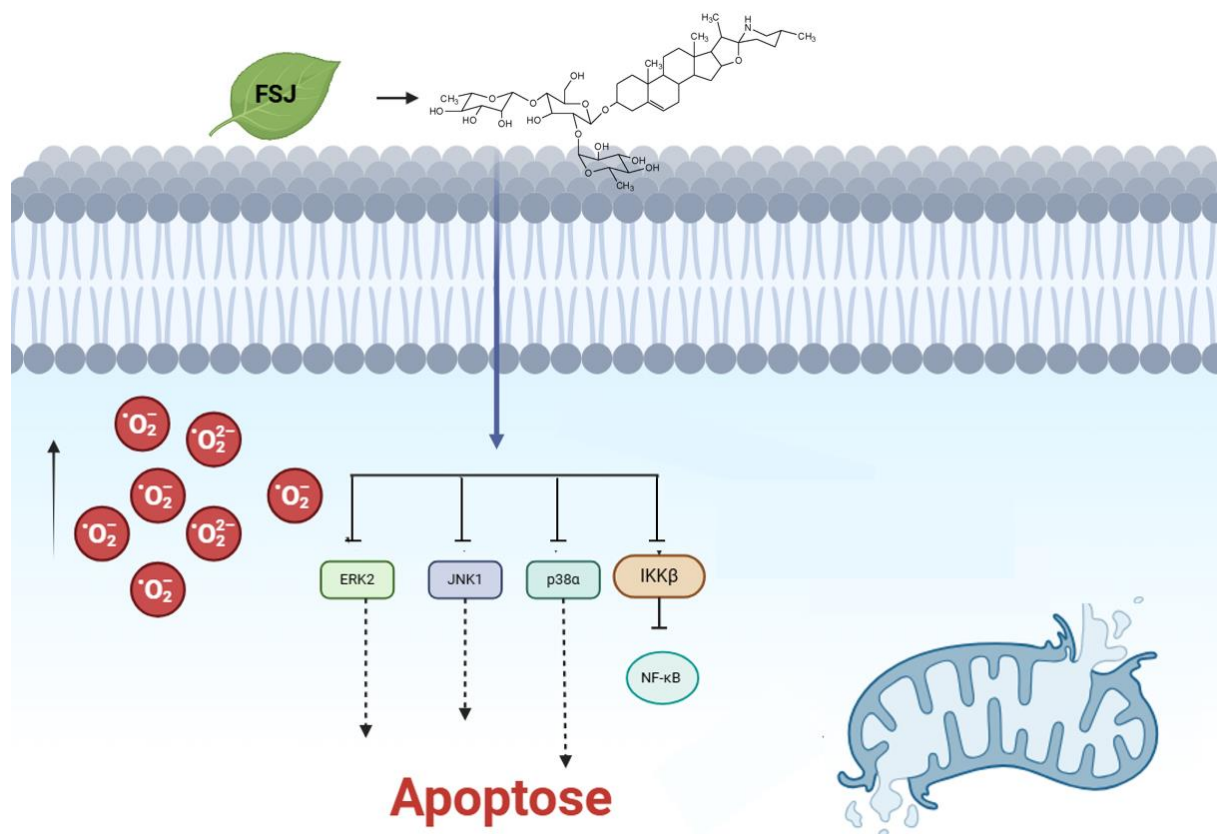
Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base neste resultado, conclui-se que o extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (ESJ) tem efeito antitumoral *in vitro*, especialmente na linhagem celular MCF-7 (carcinoma mamário humano), mostrando citotoxicidade mais seletiva para as células MCF-7 em comparação com a linhagem não tumoral HEK-293. Adicionalmente, a fração alcaloídica do extrato de *Solanum jabrense* (FSJ) apresentou citotoxicidade dependente de concentração em células MCF-7, sendo mais seletiva para as células tumorais em comparação com as células não tumorais HEK-293 e MCF-10A. Também foi observado que o FSJ mostrou maior seletividade para as células tumorais em comparação com a doxorrubicina, droga padrão utilizada.

O FSJ demonstrou efeito antitumoral em células MCF-7 *in vitro*, induzindo apoptose mediada pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em estresse oxidativo. O FSJ também exibiu efeitos citotóxicos em um modelo tridimensional de esferoides de MCF-7, com atividade antimigratória. A solamargina, componente majoritário do FSJ, apresenta efeito citotóxico em células MCF-7. Nos estudos de *docking* molecular, a solamargina demonstrou interações favoráveis com proteínas importantes na via de apoptose, incluindo as proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) ERK 2, JNK1 e p38 α MAPK, , além do inibidor da subunidade beta da cinase do fator nuclear kappa B (IKK β).

Figura 31 Mecanismos de ação da fração alcaloídica do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense* (FSJ) em células MCF-7



Legenda: O FSJ induz apoptose em células MCF-7 (adenocarcinoma mamário) de maneira dependente da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). O efeito antitumoral *in vitro* do FSJ é dependente da inibição da atividade da Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK), da Proteína Cinase N-terminal c-Jun (JNK), p38 MAPK e da inibição do Fator Nuclear kappa B (NF-κB). Sugere-se que a inibição das proteínas ERK, JNK, p38 MAPK e NF-κB seja mediada pelas ROS geradas após o tratamento com o FSJ, o que leva a apoptose.

Fonte: Elaborado pela autora

Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

Diante da comprovação experimental das atividades farmacológicas e citotóxicas do extrato hidroalcoólico de *Solanum jabrense*, o presente trabalho dará continuidade à investigação da solamargina, identificada como o metabólito predominante nesta espécie, buscando elucidar seu potencial terapêutico.

Para tanto, será realizada a avaliação da citotoxicidade da solamargina nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, e serão caracterizados os efeitos sobre a viabilidade celular da linhagem mais sensível em diferentes tempos de tratamento. Adicionalmente, será investigado o mecanismo de ação antitumoral *in vitro*, que incluirá a análise da interferência na regulação do ciclo celular e nos processos de morte celular, como apoptose e necrose. Por fim, investigaremos o efeito de FSJ e SM em modelos *in vivo* de câncer de mama, e docagem de SM sobre alvos envolvidos na migração e metástase.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, Kamal S. et al. Desenvolvimento e avaliação de híbridos de 1, 5–diarilpirazol/oxima visando EGFR e JNK–2 como agentes antiproliferativos: um estudo abrangente por meio de síntese, encaixe molecular e avaliação. **Molecules**, v. 28, n. 18, p. 6521, 2023.
- AGRA, M.F.; NURIT-SILVA, K.; BERGER, L.R. Flora da Paraíba, Brasil: Solanum L. (Solanaceae). *Acta Botanica Brasilica*, v. 23, n. 3, p. 826-842, 2009.
- AHMAD, A.; AHSAN, H. Ras-mediated activation of NF- κ B and DNA damage response in carcinogenesis. *Cancer Invest.*, v. 38, n. 4, p. 185-208, 2020.
- AHMADIAN, E.; EFTEKHARI, A.; BABAEI, H.; NAYEBI, A. M.; EGHBAL, M. A. Anti cancer effects of citalopram on hepatocellular carcinoma cells occur via cytochrome C release and the activation of NF- κ B. *Anticancer Agents Med. Chem.*, v. 17, n. 11, p. 1570-1577, 2017.
- AI, Xiao-Yu et al. Sesquiterpene binding Gly-Leu-Ser/Lys-“co-adaptation pocket” to inhibit lung cancer cell epithelial–mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 70192, 2017.
- AKTER, Raushanara et al. A new cytotoxic steroidal glycoalkaloid from the methanol extract of *Blumea lacera* leaves. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 616-633, 2015.
- ALBASHER, Gadah et al. Methotrexate-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma SKOV-3 cells via ROS-mediated bax/bcl-2-cyt-c release cascading. **OncoTargets and therapy**, p. 21-30, 2018.
- ALLEMANI, Claudia et al. Vigilância global de tendências na sobrevivência ao câncer 2000–14 (CONCORD-3): análise de registros individuais de 37 513 025 pacientes diagnosticados com um dos 18 tipos de câncer de 322 registros de base populacional em 71 países. **The Lancet**, v. 391, n. 10125, p. 1023-1075, 2018.
- ANG, L.; WANG, C.; TAO, Z.; ZHAO, L.; ZHU, Z.; WU, W.; CHEN, T. Curcumin derivative WZ35 inhibits tumor cell growth via ROS-YAP-JNK signaling pathway in breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, v. 38, n. 1, p. 1-17, 2019.
- ARAÚJO, Sônia Bernadete André de. Validação das características definidoras do diagnóstico de enfermagem nutrição desequilibrada: menos do que as necessidades corporais em pacientes com câncer de estômago no contexto amazônico. 2013.
Aspectos gerais do câncer
- BAE, E. S.; BYUN, W. S.; OCK, C. W.; KIM, W. K.; PARK, H. J.; LEE, S. K. Periplocin exerts antitumor activity by regulating Nrf2-mediated signaling pathway in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*, v. 157, p. 114039, 2023.
- BAHAR, Md Entaz; KIM, Hyun Joon; KIM, Deok Ryong. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 8, n. 1, p. 455, 2023.
- .

BAILLY, C.; THURU, X.; QUESNEL, B. Combined cytotoxic chemotherapy and immunotherapy of cancer: modern times. *NAR Cancer*, v. 2, n. 1, p. zcaa002, 2020.

BALTANÁS, F. C.; ZARICH, N.; ROJAS-CABAÑEROS, J. M.; SANTOS, E. SOS GEFs in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, v. 1874, n. 2, p. 188445, 2020.

BARBOSA, Mélanie AG et al. 3D cell culture models as recapitulators of the tumor microenvironment for the screening of anti-cancer drugs. *Cancers*, v. 14, n. 1, p. 190, 2021.

BARKER, Holly E. et al. O microambiente tumoral após radioterapia: mecanismos de resistência e recorrência. *Nature Reviews Cancer*, v. 15, n. 7, p. 409-425, 2015.

BENT, Eric H.; GILBERT, Luke A.; HEMANN, Michael T. A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes & development*, v. 30, n. 16, p. 1811-1821, 2016.

BLAGOSKLONNY, M. V. Selective protection of normal cells from chemotherapy, while killing drug-resistant cancer cells. *Oncotarget*, v. 14, p. 193, 2023.

BODEGA, G.; ALIQUE, M.; PUEBLA, L.; CARRACEDO, J.; RAMÍREZ, R. M. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *J. Extracell. Vesicles*, v. 8, n. 1, p. 1626654, 2019.

BOHS, Lynn. *Solanum jabrense* Agra & M. Nee. Solanaceae Source. Disponível em: <https://solanaceaesource.myspecies.info>. Acesso em: 05 nov. 2024.

BOICE, A.; BOUCHIER-HAYES, L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, p. 118688, 2020.

BONELLI, M. et al. Multiple effects of CDK4/6 inhibition in cancer: From cell cycle arrest to immunomodulation. *Biochemical Pharmacology*, v. 170, n. September, p. 113676, dez. 2019.

BRANDMAIER, A.; HOU, S-Q; SHEN, W. H. Cell cycle control by PTEN. *J. Mol. Biol.*, v. 429, n. 15, p. 2265-2277, 2017.

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. Estatísticas globais de câncer 2022: estimativas do GLOBOCAN de incidência e mortalidade em todo o mundo para 36 tipos de câncer em 185 países. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.

BRUTON, L.L.; HILAL-DANDAN, R. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 13ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2018. *E-book*. pág.1476. ISBN 9788580556155. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788580556155/>. Acesso em: 04 nov. 2024.

BUBICI, Concetta; PAPA, Salvatore. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *British journal of pharmacology*, v. 171, n. 1, p. 24-37, 2014.

BUSCÀ, R.; POUYSSÉGUR, J.; LENORMAND, P. ERK1 and ERK2 map kinases: specific roles or functional redundancy?. *Front. Cell Dev. Biol.*, v. 4, p. 53, 2016.

CANOVAS, Begoña; NEBREDÀ, Angel R. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 22, n. 5, p. 346-366, 2021

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, v. 17, n. 7, p. 395-417, 2020.

CASCETTA, Krystal. Câncer de mama invasivo primário. *BMJ Best Practice*, Nova York, p. 1-174. abr. 2021. Acesso em: 26 agosto 2024

CATHELINE, S. E.; BELL, R. D.; OLUOCH, L. S.; JAMES, M. N.; ESCALERA RIVERA, K.; MAYNARD, R. D.; JONASON, J. H. IKK β –NF- κ B signaling in adult chondrocytes promotes the onset of age-related osteoarthritis in mice. *Sci. Signal.*, v. 14, n. 701, p. eabf3535, 2021.

CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. Integration of molecular docking and in vitro studies: A powerful approach for drug discovery in breast cancer. *Appl. Sci.*, v. 10, n. 19, p. 6981, 2020.

CHAINUMNIM, S.; SAENKHAM, A.; DOLSOPHON, K.; CHAINOK, K.; SUKSAMRARN, S.; TANECHPONGTAMB, W. Stem extract from *Momordica cochinchinensis* induces apoptosis in chemoresistant human prostate cancer cells (PC-3). *Molecules*, v. 27, n. 4, p. 1313, 2022.

CHALABI-DCHAR, Mounira et al. A novel view on an old drug, 5-fluorouracil: an unexpected RNA modifier with intriguing impact on cancer cell fate. **NAR cancer**, v. 3, n. 3, p. zcab032, 2021.

CHAMORRO, Hugo Meneghel¹; COLTURATO, Pedro Luís; FATTORI, Nielse Cristina de Melo. Câncer de mama: fatores de risco e a importância da detecção precoce. **Revista Científica Eletrônica de Ciências Aplicadas**. http://www.fait.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ObsnYePSzKioRja_2021-7-2-16-36-0.pdf, 2021.

CHATTERJEE, R.; CHATTERJEE, J. ROS and oncogenesis with special reference to EMT and stemness. *Eur. J. Cell Biol.*, p. 151073, 2020.

CHECA, J.; ARAN, J. M. Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes. *J. Inflamm. Res.*, p. 1057-1073, 2020.

CHENG, W.; CUI, C.; LIU, G.; YE, C.; SHAO, F.; BAGCHI, A. K.; MEHTA, J. L.; WANG, X. NF- κ B, A potential therapeutic target in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, v. 37, n. 3, p. 571-584, 2023.

CHU C. S.; RUBIN S. C. Princípios básicos da quimioterapia. In: Di Saia PJ, Creasman WT, Mannel RS, McMeekin DS, Mutch DG, editores. *Oncologia ginecológica clínica*. 9a ed. Filadélfia, PA: Elsevier; pp. 449-469. 2018.

CHUNG, Stacey et al. Identification of EGF-NF- κ B-FOXC1 signaling axis in basal-like breast cancer. *Cell Communication and Signaling*, v. 15, p. 1-9, 2017.

CHURIYAH, Churiyah; NINGSIH, Sri; FIRDAYANI, Firdayani. As atividades citotóxicas, de indução apoptótica e de parada do ciclo celular do extrato etanólico de *Solanum nigrum* L. em células de câncer de mama humano MCF-7. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 21, n. 12, p. 3735, 2020.

CNCFlora. *Solanum jabrense* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro de Conservação da Flora. Disponível em . Acesso em 25 agosto 2024.

COELHO, Aline Silva et al. Predisposição hereditária ao câncer de mama e sua relação com os genes BRCA1 e BRCA2: revisão da literatura. *Rbac*, v. 1, pág. 17-21, 2018.

COELHO, L. L. Utilização de esferoides tumorais mamários para o estudo in vitro do potencial metastático e de resposta terapêutica. Tese de doutorado (doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

CORDOVER, E.; MINDEN, A.; LEHMAN, S.; ZHAO, O. Signaling pathways downstream to receptor tyrosine kinases: Targets for cancer treatment. *J. Cancer Metastasis Treat.*, v. 2020, p. 1-19, 2020.

CORRALES, T. R.; LOSADA-PÉREZ, M.; CASAS-TINTÓ, S. JNK pathway in CNS pathologies. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 22, n. 8, p. 3883, 2021.

CORRE, Isabelle; PARIS, François; HUOT, Jacques. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget*, v. 8, n. 33, p. 55684, 2017.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.*, v. 43, n. 6, p. 582-592, 2019.

DAVALLI, P.; MARVERTI, G.; LAURIOLA, A.; D'ARCA, D. Targeting oxidatively induced DNA damage response in cancer: opportunities for novel cancer therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, v. 2018, p. 1-21, 2018.

DE FÁTIMA AGRA, Maria; NEE, Michael. Uma nova espécie de *Solanum* subgênero *Leptostemonum* (Solanaceae) do nordeste do Brasil. *Bretanha*, v. 49, pág. 350–353, 1997.

DE NICOLA, Gian Felice et al. Mecanismo e consequência da autoativação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 α promovida por TAB1. *Nature structural & molecular biology*, v. 20, n. 10, p. 1182-1190, 2013.

DE TALHOUET, Solene et al. Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 7073, 2020.

DEKA, K.; LI, Y. Transcriptional regulation during aberrant activation of NF- κ B signalling in cancer. *Cells*, v. 12, n. 5, p. 788, 2023.

DENG, D.; SHAH, K. Trail of hope meeting resistance in cancer. *Trends Cancer*, 2020.

DI MARCO, F.; FOTI, G.; CORSICO, A. Where are we with the use of N acetylcysteine as a preventive and adjuvant treatment for COVID-19?. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, v. 26, n. 2, p. 715-721, 2022.

DI MARTILI, M.; GARZOLI, S.; RAGNO, R.; DEL BUFALO, D. Essential oils and their main chemical components: The past 20 years of preclinical studies in melanoma. *Cancers*, v. 12, n. 9, p. 2650, 2020.

DING, Xia et al. Induction of apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by solamargine from *Solanum nigrum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 599-604, 2012.

DONG, Naiwei et al. Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 195-203, 2018.

DOU, Y.; JIANG, X.; XIE, H.; HE, J.; XIAO, S. The Jun N-terminal kinases signaling pathway plays a “seesaw” role in ovarian carcinoma: A molecular aspect. *J. Ovarian Res.*, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019.

DUARTE, Sâmia Sousa et al. Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06. *Pharmacological Reports*, v. 74, n. 3, p. 545-554, 2022.

ELLIOTT, A. D. Confocal microscopy: principles and modern practices. *Curr. Protoc.* v. 92, n. 1, p. e68, 2020.

FARRAG, Noha Nagdy. Promising antitumor therapeutics of herbal origin: exploring cytotoxic activity of glycoalkaloids and unraveling underlying mechanisms. 2015.

FERREIRA, Rafael Carlos et al. The Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) Exerts an In Vitro Antimelanoma Effect by Inducing Apoptosis and Modulating the MAPKs, NF- κ B, and PKB/AKT Signaling Pathways. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 11, p. 1553, 2023.

FINLAY-SCHULTZ, Jessica et al. Novas linhas de células de câncer de mama de geração desenvolvidas a partir de xenoinxertos derivados de pacientes. *Breast Cancer Research*, v. 22, p. 1-12, 2020.

FURTADO, Ricardo Andrade et al. Antitumor activity of solamargine in mouse melanoma model: Relevance to clinical safety. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 85, n. 4, p. 131-142, 2022.

GALADARI, S.; RAHMAN, A.; PALLICHANKANDY, S.; THAYYULLATHIL, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress?. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 104, p. 144-164, 2017.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, L.; GARCÍA-ORTEGA, M. B.; RUIZ-ALCALÁ, G.; CARRILLO, E.; MARCHAL, J. A.; GARCÍA, M. Á. The p38 MAPK components and modulators as biomarkers and molecular targets in cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 23, n. 1, p. 370, 2022.

GARG, Manoj et al. Selinexor (KPT-330) has antitumor activity against anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo and enhances sensitivity to doxorubicin. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 9749, 2017.

GKOUVERIS, Ioannis; NIKITAKIS, Nikolaos G. Role of JNK signaling in oral cancer: a mini review. *Tumor Biology*, v. 39, n. 6, p. 1010428317711659, 2017.

GOETHALS, Andrea; ROSA Jessica. Mastectomy.2022. In: StatPearls; 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538212/>. Acesso em 21 fev. 2023.

GONÇALVES, Juan Carlos Ramos et al. Antitumoral activity of novel 1, 4-naphthoquinone derivative involves L-type calcium channel activation in human colorectal cancer cell line. *journal of applied biomedicine*, v. 14, n. 3, p. 229-234, 2016.

GRONDONA, P.; BUCHER, P.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; HAILFINGER, S.; SCHMITT, A. NF-κB activation in lymphoid malignancies: genetics, signaling, and targeted therapy. *Biomedicines*, v. 6, n. 2, p. 38, 2018.

guo

GUO, Weiqiang et al. The analysis of the anti-tumor mechanism of ursolic acid using connectively map approach in breast cancer cells line MCF-7. *Cancer Management and Research*, p. 3469-3476, 2020.

GUO, Y. J.; PAN, W. W.; LIU, S. B.; SHEN, Z. F.; XU, Y.; HU, L. L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp. Ther. Med.*, v. 19, n. 3, p. 1997-2007, 2020.

HA, J.; KANG, E.; SEO, J.; CHO, S. Phosphorylation dynamics of JNK signaling: Effects of dual-specificity phosphatases (DUSPs) on the JNK pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 20, n. 24, p. 6157, 2019.

HAMEED, Abdul et al. Aglycone solanidine and solasodine derivatives: A natural approach towards cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 94, p. 446-457, 2017.

HAMILTON, Gerhard; RATH, Barbara. Applicability of tumor spheroids for in vitro chemosensitivity assays. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 15, n. 1, p. 15-23, 2019.

HAMMOUDA, M.; FORD, A.; LIU, Y.; ZHANG, J. The JNK signaling pathway in inflammatory skin disorders and cancer. *Cells*, v. 9, n. 4, p. 857, 2020.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HAN, P.; MO, S.; WANG, Z.; XU, J.; FU, X.; TIAN, Y. UXT at the crossroads of cell death, immunity and neurodegenerative diseases. *Front. Oncol.*, v. 13, p. 1179947, 2023.

HANAHAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HODROJ, M. H.; JARDALY, A.; ABI RAAD, S.; ZOUEIN, A.; RIZK, S. Andrographolide potentiates the antitumor effect of topotecan in acute myeloid leukemia cells through an intrinsic apoptotic pathway. *Cancer Manag. Res.*, p. 1079 1088, 2018.

HUANG, Chiang-Chi et al. Updates on the pivotal roles of mitochondria in urothelial carcinoma. *Biomedicines*, v. 10, n. 10, p. 2453, 2022.

HUANG, Y-J.; NAN, G-X. Oxidative stress-induced angiogenesis. *J. Clin. Neurosci.*, v. 63, p. 13-16, 2019.

HUSSAIN, H.; RAJ, S.; AHMAD, S.; RAZAK, M. F. A.; MOHAMUD, W. M. W.; BAKAR, J.; MOHD, H. Ghazali Determination of cell viability using acridine orange/propidium iodide dual-spectrofluorometry assay. *Cogent. Food Agric.*, v. 5, n. 1, p. 1582398, 2019.

IBRAHIM ABDEL AZIZ, Ibrahim et al. Solanum Procumbens-Derived Zinc Oxide Nanoparticles Suppress Lung Cancer In Vitro through Elevation of ROS. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2022, n. 1, p. 2724302, 2022.

IGEA, Ana; NEBREDA, Angel R. A cinase de estresse p38 α como alvo para terapia do câncer. *Cancer research* , v. 75, n. 19, p. 3997-4002, 2015.

ILANGO, S.; PAITAL, B.; JAYACHANDRAN, P.; PADMA, P. R.; NIRMALADEVI, R. Epigenetic alterations in cancer. *Front. Biosci.*, v. 25, n. 6, p. 1058-1109, 2020.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Incidência de câncer no Brasil – estimativa 2023. Disponível em: Acesso em agosto de 2023.

INCA-Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023. Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, fev. 2022. Disponível https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa_2023.pdf. Acesso em: 21 fev. 2023.

JAIN, Ramya et al. Solanum nigrum: current perspectives on therapeutic properties. *Altern Med Rev*, v. 16, n. 1, p. 78-85, 2011.

JAN, R.; CHAUDHRY, G-S. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Adv. Pharm. Bull.*, v. 9, n. 2, p. 205, 2019.

JAYAMOHANAN, R. Confocal microscopy–Working principle and applications in dermatology. *J. Skin Sex. Transmitted Dis.*, v. 5, n. 2, p. 81-89, 2023.

JAYAT, C.; RATINAUD, M. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. *Biol. Cell*, v. 78, n. 1-2, p. 15-25, 1993.

JIN, Yanli et al. FOXC1 is a critical mediator of EGFR function in human basal-like breast cancer. *Annals of surgical oncology*, v. 21, p. 758-766, 2014.

JÚNIOR, R. R. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol. Res.*, v. 142, p. 151-168, 2019.

KABAKOV, Alexander E.; GABAI, Vladimir L. Cell death and survival assays. **Chaperones: methods and protocols**, p. 107-127, 2018.

KALININ, R. E.; IGOR'A, S.; KLIMENTOVA, E. A.; EGOROV, A. A.; POVAROV, V. O. Apoptosis in vascular pathology: present and future. I.P. Pavlov Russ. Med. Biol. Her., v. 28, n. 1, p. 79-87, 2020.

KALININ, R. E.; IGOR'A, S.; KLIMENTOVA, E. A.; EGOROV, A. A.; POVAROV, V. O. Apoptosis in vascular pathology: present and future. I.P. Pavlov Russ. Med. Biol. Her., v. 28, n. 1, p. 79-87, 2020.

KAUNDA, Joseph Sakah; ZHANG, Ying-Jun. The genus solanum: an ethnopharmacological, phytochemical and biological properties review. *Natural products and bioprospecting*, v. 9, p. 77-137, 2019.

KAUR, Rasanpreet; BHARDWAJ, Alok; GUPTA, Saurabh. Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. **Molecular biology reports**, v. 50, n. 11, p. 9663-9676, 2023.

KCIUK, M.; GIELECÍŃSKA, A.; BUDZINSKA, A.; MOJZYCH, M.; KONTEK, R. Metastasis and MAPK pathways. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 23, n. 7, p. 3847, 2022.

KELOTRA, Seema et al. An in silico appraisal to identify high affinity anti-apoptotic synthetic tetrapeptide inhibitors targeting the mammalian caspase 3 enzyme. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 23, p. 10137-10142, 2015.

KERR, Amanda J et al. Adjuvant and neoadjuvant breast cancer treatments: A systematic review of their effects on mortality. **Cancer Treatment Reviews**, fev. 2022.

KHAN, Homa Jilani et al. Identification of Anticancer and Antioxidant phytoconstituents from chloroform fraction of Solanum nigrum L. berries using GC-MS/MS analysis. 2016.

KHAN, Mohemmed Faraz et al. Dibenzepinones, dibenzoxepines and benzosuberones based p38 α MAP kinase inhibitors: Their pharmacophore modelling, 3D-QSAR and docking studies. *Computers in Biology and Medicine*, v. 110, p. 175-185, 2019.

KHAN, Haseeb A. et al. The role of mitochondrial dysfunction in cytotoxic effects of Solanum nigrum water extract on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 28, n. 8, p. 180, 2023.

KHOURY, T. Metaplastic breast carcinoma revisited; subtypes determine outcomes: comprehensive pathologic, clinical, and molecular review. *Clin. Lab. Med.*, v. 43, n. 2, p. 221-243, 2023.

KIM, Jae-Sung et al. Berberina induz apoptose relacionada a FasL por meio da ativação de p38 em células de câncer oral humano KB. *Oncology Reports*, v. 33, n. 4, p. 1775-1782, 2015.

KIM, K. W.; LEE, Y. S.; YOON, D.; KIM, G. S.; LEE, D. Y. The ethanolic extract of Curcuma longa grown in Korea exhibits anti-neuroinflammatory effects by activating of nuclear

transcription factor erythroid-2-related factor 2/heme oxygenase-1 signaling pathway. *BMC Complement. Med. Ther.*, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2022.

KIRA, Akihito et al. Apoptotic extracellular vesicle formation via local phosphatidylserine exposure drives efficient cell extrusion. *Developmental Cell*, v. 58, n. 14, p. 1282-1298. e7, 2023.

KIRTONIA, A.; SETHI, G.; GARG, M. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 77, p. 4459-4483, 2020.

KOGURE, K. et al. Neck and Occipital Pain Caused by Deep Cervical Intramuscular Lipoma: A Surgical Case. *Journal of Nippon Medical School*, v. 84, n. 2, p. 96–99, 2017.

KRUK, J.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; KŁADNA, A.; BOWSER, J. E. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. *Free Radic. Res.*, v. 53, n. 5, p. 497 521, 2019.

KUMAR, A.; SAINI, K.; KUMARI, R. A brief literature review on Piper longum with special references to different Ayurvedic samhitas. *World J. Pharm. Res.*, v. 11, p. 683-696, 2022.

KUMAR, Sonu et al. In vitro anticancer activity of methanolic extract of Justicia adhatoda leaves with special emphasis on human breast cancer cell line. *Molecules*, v. 27, n. 23, p. 8222, 2022.

KUMARI, Seema; BADANA, Anil Kumar; MALLA, RamaRao. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomarker insights*, v. 13, p. 1177271918755391, 2018.

KÚSZ, Norbert. Podophyllum peltatum-podofillotoxin. *Gyógyszerészet*, v. 60, n. 11, p. 661-663, 2016.

LAN, Xintian et al. Anti-Colorectal Cancer Activity of Solasonin from Solanum nigrum L. via Histone Deacetylases-Mediated p53 Acetylation Pathway. *Molecules*, v. 28, n. 18, p. 6649, 2023.

LATHAM, S.; O'DONNELL, Y.; CROUCHER, D. Non-kinase targeting of oncogenic c Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: the future of clinically viable cancer treatments. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 50, n. 6, p. 1823-1836, 2022.

LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 21, n. 10, p. 607-632, 2020.

LEE, Shannon; RAUCH, Jens; KOLCH, Walter. Targeting MAPK signaling in cancer: mechanisms of drug resistance and sensitivity. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 3, p. 1102, 2020.

LI, Na et al. Induction of solasonine on apoptosis of human breast cancer Bcap-37 cells through mitochondria-mediated pathway. *Chinese Herbal Medicines*, v. 8, n. 2, p. 164-172, 2016.

LI, X.; HOU, Y.; ZHAO, J.; LI, J.; WANG, S.; FANG, J. Combination of chemotherapy and oxidative stress to enhance cancer cell apoptosis. *Chem. Sci.*, v. 11, n. 12, p. 3215-3222, 2020.

LING, Binbing et al. Sondando o mecanismo antitumoral do extrato aquoso de *Solanum nigrum* L. contra células MCF7 de câncer de mama humano. **Bioengineering**, v. 6, n. 4, p. 112, 2019.

LIU, Ting et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2017.

LU, Y.; LIU, B.; LIU, Y.; YU, X.; CHENG, G. Dual effects of active ERK in cancer: A potential target for enhancing radiosensitivity. *Oncol. Lett.*, v. 20, n. 2, p. 993-1000, 2020.

LOPEZ, L. R.; BLEICH, R. M.; ARTHUR, J. C. Microbiota effects on carcinogenesis: initiation, promotion and progression. *Annu. Rev. Med.*, v. 72, 2020.

MA, Y.; NICOLET, J. Specificity models in MAPK cascade signalling. *FEBS Open Bio*, v. 13, n. 7, p. 1177-1192, 2023.

MAIK-RACHLINE, G.; WORTZEL, I.; SEGER, R. Alternative splicing of MAPKs in the regulation of signaling specificity. *Cells*, v. 10, n. 12, p. 3466, 2021.

MAJUMDER, D.; NATH, P.; DEBNATH, R.; MAITI, D. Understanding the complicated relationship between antioxidants and carcinogenesis. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, p. e22643, 2020.

MATTHEWS, Helen K.; BERTOLI, Cosetta; DE BRUIN, Robertus AM. Cell cycle control in cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 1, p. 74-88, 2022.

MEDEIROS, Gisele Alves. Benzotiadiazola em sistemas fluorescentes moleculares e nanométricos aplicados em bioimageamento. 2021.

MENDONÇA, Angelo Braga et al, Standardization of the infusion sequence of antineoplastic drugs used in the treatment of breast and colorectal cancers. **Einstein**, v. 16, n. 3, p. 1-6, 2018

MIKUŁA-PIETRASIŁ, Justyna et al. Comprehensive review on how platinum-and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, p. 681-697, 2019.

MILKOVIC, L.; GASPAROVIC, A. C.; CINDRIC, M.; MOUTHUY, P-A.; ZARKOVIC, N. Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells*, v. 8, n. 8, p. 793, 2019.

MILNER, Sinead Eileen et al. Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3454-3484, 2011.

MORENO-LAYSECA, P.; STREULI, C. H. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biol.*, v. 34, p. 144-153, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-53, 1983.

MOUSTAFA et al. Avaliação crítica de diretrizes clínicas para prevenção e tratamento de cardiotoxicidade induzida por doxorubicina. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, v. 29, n. 3, p. 695-708, 2023.

MUHAMAD, N.; PLENGSURIYAKARN, T.; NA-BANGCHANG, K. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *Int. J. Nanomedicine*, v. 13, p. 3921-3935, 2018.

MUSSBACHER, M.; DERLER, M.; BASÍLIO, J.; SCHMID, J. A. NF- κ B in monocytes and macrophages-an inflammatory master regulator in multitasked immune cells. *Front. Immunol.*, v. 14, p. 1134661, 2023.

NAKANO, R.; NAKAYAMA, T.; SUGIYA, H. Biological properties of JNK3 and its function in neurons, astrocytes, pancreatic β -cells and cardiovascular cells. *Cells*, v. 9, n. 8, p. 1802, 2020.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Produtos naturais como fontes de novos medicamentos ao longo de quase quatro décadas de 01/1981 a 09/2019. **Journal of natural products** , v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NICULESCU, A-G.; GRUMEZESCU, A. M. Novel tumor-targeting nanoparticles for cancer treatment—A review. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 23, n. 9, p. 5253, 2022.

NOLAN, Emma; LINDEMAN, Geoffrey J.; VISVADER, Jane E. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell*, v. 186, n. 8, p. 1708-1728, 2023.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*, v. 81, n. 4, p. 1133-1143, 2020.

OLIVEIRA, Pollyanna Francielli de et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 183-188, 2015.

OPDENBOSCH, N. V.; LAMKANFI, M. Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity*, v. 50, n. 6, p. 1352-1364, 2019.

OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93-115, 2017.

ÖZERKAN, D. The Determination of Cisplatin and Luteolin Synergistic Effect on Colorectal Cancer Cell Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction by Fluorescence Labelling. *J. Fluoresc.*, p. 1-9, 2023.

PANDA, S. K.; RAY, S.; NAYAK, S.; BEHERA, S.; BHANJA, S.; ACHARYA, V. A review on cell cycle checkpoints in relation to cancer. *J. Med. Sci*, v. 5, p. 88-95, 2019.

PANDA, Swarup K. et al. A review on cell cycle checkpoints in relation to cancer. **J. Med. Sci**, v. 5, p. 88-95, 2019.

PARK, H-B.; BAEK, K-H. E3 ligases and deubiquitinating enzymes regulating the MAPK signaling pathway in cancers. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, v. 1877, n. 3, p. 188736, 2022.

PATEL, Kanika; SINGH, Ravi B.; PATEL, Dinesh K. Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of solasodine: A concise report of current scientific literature. *Journal of Acute Disease*, v. 2, n. 2, p. 92-98, 2013.

PATERGNANI, Simone et al. Vários aspectos da sinalização de cálcio na regulação da apoptose, autofagia, proliferação celular e câncer. **International journal of molecular sciences** , v. 21, n. 21, p. 8323, 2020.

PAUL, SUBHABRATA; KUNDU, R. I. T. A. Induction of apoptosis by fatty acid rich fraction of *Solanum nigrum* on cervical cancer cell lines. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 9, p. 199-206, 2017.

PAVITRA, Eluri et al. The role of NF- κ B in breast cancer initiation, growth, metastasis, and resistance to chemotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 163, p. 114822, 2023.

PENG, Xuerun et al. Emetina, um produto natural de molécula pequena, exibe potente atividade anticâncer gástrico por meio da regulação de múltiplas vias de sinalização. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** , v. 91, n. 4, p. 303-315, 2023.

PERILLO, Bruno et al. ROS na terapia do câncer: o lado brilhante da lua. **Medicina experimental e molecular** , v. 52, n. 2, p. 192-203, 2020.

PICK, Anne et al. Structure–activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 19, n. 6, p. 2090-2102, 2011.

PIEZZO, Michela et al. Targeting cell cycle in breast cancer: CDK4/6 inhibitors. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 18, p. 6479, 2020.

PILON, Adhan et al. A new family of iron (II)-cyclopentadienyl compounds shows strong activity against colorectal and triple negative breast cancer cells. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1592, 2020.

PÔRTO, Kátia C.; CABRAL, Jaime JP; TABARELLI, Marcelo. Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2004.

POTOČNJAK, I. ŠIMIĆ, L.; GOBIN, I.; VUKELIĆ, I.; DOMITROVIĆ, R. Antitumor activity of luteolin in human colon cancer SW620 cells is mediated by the ERK/FOXO3a signaling pathway. *Toxicol. In Vitro*, v. 66, p. 104852, 2020.

PRASAD, S.; SRIVASTAVA, S. K. Oxidative stress and cancer: chemopreventive and therapeutic role of triphala. *Antioxidants*, v. 9, n. 1, p. 72, 2020.

PRAT, Aleix et al. Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 106, n. 8, p. dju152, 2014.

PUA, Lesley Jia Wei et al. Papéis funcionais da sinalização de JNK e p38 MAPK no carcinoma nasofaríngeo. **Revista internacional de ciências moleculares** , v. 23, n. 3, p. 1108, 2022.

RAMDHANI, Danni; KUSUMA, Sri Agung Fitri. MOLECULAR DOCKING METHOD OF WORTMANNIN NATURAL COMPOUND AS A POTENTIAL ANTI-CANCER AGENT. **growth**, v. 16, p. 18, 2023.

RASLI, Nur Rasyiqin et al. Series of organotin (IV) compounds with different dithiocarbamate ligands induced cytotoxicity, apoptosis and cell cycle arrest on Jurkat E6. 1, T acute lymphoblastic leukemia cells. **Molecules**, v. 28, n. 8, p. 3376, 2023.

RENVOIZÉ, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biol. Toxicol.*, v. 14, n. 2, p. 111-120, 1998.

RIGANTI, Chiara et al. A ativação da via do fator nuclear- κ B pela sinvastatina e silenciamento de RhoA aumenta a citotoxicidade da doxorubicina em células HT29 de câncer de cólon humano. **Farmacologia molecular**, v. 74, n. 2, p. 476-484, 2008.

ROBBINS, E.; MARCUS, P. Dynamics of acridine orange-cell interaction: I. Interrelationships of acridine orange particles and cytoplasmic reddening. *J. Cell Biol.*, v. 21, n. 2, p. 237-250, 1963.

ROCHE, Olga et al. p38 β and cancer: the beginning of the road. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 20, p. 7524, 2020.

ROMÃO, Vânia Alexandra Ribeiro. **Inibidores das ciclinas no tratamento do cancro da mama metastático em doentes com recetores hormonais positivos e HER negativo**. 2022. Tese de Doutorado.

SABBAH, D. A.; HAJJO, R.; SWEIDAN, K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2020.

SAHASRABUDHE, S. A.; TERLUK, Marcia R.; KARTHA, Reena V. N-acetylcysteine pharmacology and applications in rare diseases—repurposing an old antioxidant. *Antioxidants*, v. 12, n. 7, p. 1316, 2023.

SAIRAZI, N.S.M.; SIRAJUDEEN, K.N.S. Natural products and their bioactive compounds: neuroprotective potentials against neurodegenerative diseases. *Evid. Based Complementary Altern. Med.*, v. 2020, p. 1-30, 2020.

SAJADIMAJD, S.; KHAZAEI, M. Oxidative stress and cancer: the role of Nrf2. *Curr. Cancer Drug Targets*, v. 2018, n. 18, p. 538-557, 2018.

SALEH, E. A. M.; AL-DOLAIMY, F.; BAYMAKOV, S.; ULLAH, M. I.; KHLEWEE, I. H.; BISHT, Y. S.; ALSAALAMY, A. H. Oxidative stress affects the beginning of the growth of cancer cells through a variety of routes. *Pathol. Res. Pract.*, p. 154664, 2023.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; GELBERT, L. M.; LALLENA, M. J.; DIOS, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, v. 25, n. 17, p. 3420-3435, 2015.

SCHNEIDER, Bryan J. et al. Phase II Trial of Dose-dense Pemetrexed, Gemcitabine, and Bevacizumab in Patients With Advanced, Non-Small-cell Lung Cancer. **Clinical lung cancer**, v. 18, n. 3, p. 299-302, 2017.

SCHULTZ, Nikolaus. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 2012.

SCHWEITZER, Barry I.; DICKER, Adam P.; BERTINO, Joseph R. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. **The FASEB journal**, v. 4, n. 8, p. 2441-2452, 1990.

secretory responses. *Genes & development*, v. 30, n. 16, p. 1811-1821, 2016.

SEILER, Caroline et al. A variante de splicing Grb2, Grb3-3, é um regulador negativo da ativação do RAS. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1029, 2022.

SHANKAR, Amar et al. Diversidade estrutural e papel de fitoquímicos contra o domínio p38- α Mitogen-Activated Protein Kinase e Epidermal Growth Factor Receptor Kinase: Uma abordagem computacional privilegiada. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 2263-2269, 2021.

SHIH, R-H.; WANG, C-Y.; YANG, C-M. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review. *Front. Mol. Neurosci.*, v. 8, p. 77, 2015.

SHIELDS, M. Chemotherapeutics. In: MCCREATH, S.B.; DELGODA, R. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. Amsterdam: Elsevier, p. 295 – 313, 2017.

SHIN, H-W.; TAKATSU, H. Phosphatidylserine exposure in living cells. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v. 55, n. 2, p. 166-178, 2020.

SHLOMOVITZ, I.; SPEIR, M.; GERLIC, M. Flipping the dogma–phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. *Cell Commun. Signal.*, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2019.

SILVA, Tania Maria Sarmiento da; CARVALHO, Mario Geraldo de; BRAZ-FILHO, Raimundo. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. *Química Nova*, v. 32, p. 1119-1128, 2009.

SIMOES, Leticia Oliveira et al. Evidências do potencial anti-hipertensivo do extrato de *Solanum capsicoides* All. em ratos espontaneamente hipertensos. *Phytomedicine*, v. 23, n. 5, p. 498-508, 2016.

SINHA, B.K.; TOKAR, E.J.; BUSHEL, P.R. Elucidation of mechanisms of topotecan induced cell death in human breast MCF-7 cancer cells by gene expression analysis. *Front. Genet.*, v. 11, p. 775, 2020.

SIVANDZADE, Farzane; BHALERAO, Aditya; CUCULLO, Luca. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. **Bio-protocol**, v. 9, n. 1, p. e3128-e3128, 2019.

SMITH, Martyn T. et al. The key characteristics of carcinogens: relationship to the hallmarks of cancer, relevant biomarkers, and assays to measure them. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 29, n. 10, p. 1887-1903, 2020.

SNEZHKINA, Anastasiya V. et al. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2019, n. 1, p. 6175804, 2019.

SOTO, Karen M. et al. Antioxidantes na medicina tradicional mexicana e suas aplicações como tratamentos antitumorais. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 4, p. 482, 2023.

DE SOUSA, Damião P. et al. Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023.

SOUSA, Joana Carvalho de. Linfoma primário do mediastino de grandes células B: tratamento. 2016.

SOUSA, S. M. M. T. et al. Access to treatment of women with breast cancer. *Saúde debate*, v. 43, n. 122, p. 727-741, 2019.

SOUSA, D. P.; DAMASCENO, R. O. S.; AMORATI, R.; ELSHABRAWY, H. A.; CASTRO, R. D.; BEZERRA, D. P.; LIMA, T. C. Essential oils: chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules*, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023.

SOUSA, Benedito Tales Santos et al. Mecanismos de atuação dos derivados da vitamina E no combate ao câncer de mama: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 24, n. 1, p. e14862-e14862, 2024.

SRAMEK, Martin et al. Non-DHFR-mediated effects of methotrexate in osteosarcoma cell lines: epigenetic alterations and enhanced cell differentiation. **Cancer cell international**, v. 16, p. 1-12, 2016.

STEFANI, Constantin et al. Fatores de crescimento, vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK na patogênese do câncer colorretal: onde estamos agora?. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 19, p. 10260, 2021.

SUGARA, T. H.; SOLIKHAH, E. N.; PRANOWO, H. D. QSAR and molecular docking approaches for development of haloxanthones as the anticancer agent against MCF 7 and HepG2. *Rasayan J. Chem.*, v. 14, n. 3, 2021.

SUGIURA, R.; SATOH, R.; TAKASAKI, T. ERK: a double-edged sword in cancer. ERK-dependent apoptosis as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cells*, v. 10, n. 10, p. 2509, 2021.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAI, Bui Huu et al. Two new steroidal alkaloid saponins from the whole plants of *Solanum nigrum*. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 11, p. 1934578X1801301111, 2018.

TAN, B.; NORHAIZAN, M. Manilkara zapota (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human colorectal cancer cell line. *Biomed. Pharmacother.*, v. 110, p. 748-757, 2018.

TARANTINO, Paolo et al. HER2-low breast cancer: pathological and clinical landscape. *Journal of Clinical Oncology*, v. 38, n. 17, p. 1951-1962, 2020.

THENNAVAN, Aatish et al. Análise molecular de tipos histológicos de câncer de mama TCGA. *Cell genomics*, v. 1, n. 3, 2021.

THURSTON, David E.; PYSZ, Ilona. **Chemistry and pharmacology of anticancer drugs**. CRC press, 2021.

TODORIC, J.; KARIN, M. The Fire within: Cell-Autonomous Mechanisms in Inflammation-Driven Cancer. *Cancer Cell*, v. 35, n. 5, p. 714–720, maio 2019.

TOMAZELLI, J. G.; SILVA, G. A. Breast cancer screening in Brazil: an assessment of supply and use of Brazilian National Health System health care network for the period 2010-2012*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 26, n. 4, p. 713-724, 2017.

TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances In Anatomic Pathology*, v. 27, n. 1, p. 1, abr. 2019.

TWAIR, A. KASSEM, I. MURAD, H. ABBADY, A. Q. Secretion of recombinant human annexin V in fusion with the super folder GFP for labelling phosphatidylserine exposing membranes. *J. Membr. Biol.*, v. 254, p. 175-187, 2021.

ULLAH, F.; DIMA, D.; OMAR, N.; OGBUE, O.; AHMED, S. Advances in the treatment of Hodgkin lymphoma: current and future approaches. *Front. Oncol.*, v. 13, p. 1067289, 2023.

URREGO, I. C.; URREGO, C. C. A.; ARANGO, S. M. R.; ROJAS, E. C. H.; DEVIA, J. L. G. The current outlook of human papillomavirus and its association with digestive tract cancer. *Rev. Logos Cienc. Tecnol.*, v. 13, n. 1, p. 129-143, 2021.

URREGO, D.; TOMCZAK, A. P.; ZAHED, F.; STÜHMER, W.; PARDO, L. A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, v. 369, n. 1638, p. 20130094, 2014.

VERMA, K.; SINGH, A. P. Apoptosis: Modulators for Anticancer Therapy. *Int. J. Res. Eng. Sci. Manag.*, v. 3, n. 1, 278-281, 2020.

VIEIRA, Vanessa et al. Quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, v. 17, n. 34, 2020.

VOSS, Anne K.; STRASSER, Andreas. The essentials of developmental apoptosis. **F1000Research**, v. 9, 2020.

WANG, Hsueh-Chun et al. Solanum nigrum Linn. water extract inhibits metastasis in mouse melanoma cells in vitro and in vivo. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11913-11923, 2010.

WANG, L.; LI, P.; FENG, K. EGCG adjuvant chemotherapy: Current status and future perspectives. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 250, p. 115197, 2023.

WANG, Lihua et al. Derivado de curcumina WZ35 inibe o crescimento de células tumorais via via de sinalização ROS-YAP-JNK no câncer de mama. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research** , v. 38, p. 1-17, 2019.

WANG, Q.; FANG, X.; SUN, B.; ZHU, K.; YAO, M.; WEI, S.; ZHANG, A. Rosa roxburghii Tratt juice inhibits NF- κ B and increases IL-2 to alleviates the Foxp3 mediated Tregs imbalance in the peripheral blood of arseniasis patients. *Food Sci. Biotechnol.*, p. 1-10, 2023

WANG, Ya-Tao; JIANG, Shi-Qi; ZHANG, Shao-Lin. Synthetic Approaches and Clinical Application of Representative Small-Molecule Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase for Cancer Therapy. *Molecules*, v. 29, n. 13, p. 3029, 2024.

WILSON, B. A.; THORNBURG, C. C.; HENRICH, C. J.; GRKOVIC, T.; O'KEEFE, B. R. Creating and screening natural product libraries. *Nat. Prod. Rep.*, v. 37, n. 7, p. 893-918, 2020.

WINKIEL, Magdalena Joanna; CHOWAŃSKI, Szymon; SŁOCIŃSKA, Małgorzata. Anticancer activity of glycoalkaloids from Solanum plants: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 979451, 2022.

WARD, Richard A. et al. Discovery of a potent and selective oral inhibitor of ERK1/2 (AZD0364) that is efficacious in both monotherapy and combination therapy in models of nonsmall cell lung cancer (NSCLC). 2019.

WU, P.; BECKER, A.; PARK, J. Growth inhibitory signaling of the Raf/MEK/ERK pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 21, n. 15, p. 5436, 2020.

WU, X.; SUN, L.; XU, F. NF- κ B in Cell Deaths, Therapeutic resistance and nanotherapy of tumors: recent advances. *Pharmaceutics*, v. 16, n. 6, p. 783, 2023.

XIE, Y-H.; CHEN, Y-X.; FANG, J-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct. Target Ther.*, v. 5, n. 1, p. 22, 2020.

XU, Y-R.; LEI, C-Q. TAK1-TABs complex: a central signalosome in inflammatory responses. *Front. Immunol.*, v. 11, p. 608976, 2021.

YAN, GE; ELBADAWI, Mohamed; EFFERTH, Thomas. Modalidades múltiplas de morte celular e suas principais características. *World Academy of Sciences Journal* , v. 2, n. 2, p. 39-48, 2020.

YANG, B.; CHEN, Y.; SHI, J. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *Chem. Rev.*, v. 119, p. 4881-4985, 2019.

YANG, Haotian et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of experimental & clinical cancer research*, v. 37, p. 1-10, 2018.

YANG, X.; LI, P.; KANG, Z.; LI, W. Targeted therapy, immunotherapy, and chemotherapy for chordoma. *Curr. Med.*, v. 2, n. 1, p. 3, 2023.

YARYCHKIVSKA, O.; SHAHAM, S. Development or disease: caspases balance growth and immunity in *C. elegans*. *Dev. Cell*, v. 53, n. 3, p. 259-260, 2020.

YASMIN, R. et al. Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokines and Associated Genes in Human Malignancies. *Mediators of Inflammation*, v. 2015, p. 1–8, 2015.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov.*, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

YUAN, Jimin et al. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. **Journal of hematology & oncology**, v. 13, n. 1, p. 113, 2020.

ZERDAN, Bou et al. Câncer de Mama Triplo Negativo: Atualizações na Classificação e Tratamento em 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/5/1253>. Acesso em 11 abr. 2023.

ZHANG, Chen et al. Ethanol Extracts of *Solanum lyratum* Thunb Regulate Ovarian Cancer Cell Proliferation, Apoptosis, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) via the ROS-Mediated p53 Pathway. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, n. 1, p. 5569354, 2021.

ZHANG, L.; XIAO, X.; ARNOLD, P. R.; LI, X. C. Transcriptional and epigenetic regulation of immune tolerance: roles of the NF- κ B family members. *Cell. Mol. Immunol.*, v. 16, n. 4, p. 315-323, 2019

ZHANG, Ming et al. Naringenin induces hepg2 cell apoptosis via ROS-mediated JAK-2/STAT-3 signaling pathways. **Molecules**, v. 28, n. 11, p. 4506, 2023.

ZHANG, Minjie et al. Timosaponina AIII induz parada G2/M e apoptose em câncer de mama ativando as vias de sinalização ATM/Chk2 e p38 MAPK. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 601468, 2021.

ZHANG, Tao et al. Sinalização de NF- κ B na inflamação e no câncer. **MedComm**, v. 4, pág. 618-653, 2021.

ZHANG, Y.; LU, Q.; LI, N.; XU, M.; MIYAMOTO, T. LIU, J. Sulforaphane suppresses metastasis of triple-negative breast cancer cells by targeting the RAF/MEK/ERK pathway. *NPJ Breast Cancer*, v. 8, n. 1, p. 40, 2022.

ZHAO, et al. Montagem do novo genoma de *Camptotheca acuminata*, uma fonte natural do composto anticâncer camptotecina. *GigaScience*, 6 (9), 2017.

ZHAO, Y.; JIANG, J. Phytochemical profile and biological activities of the essential oils in the aerial part and root of *Saposhnikovia divaricata*. *Sci. Rep.*, v. 13, n. 1, p. 8672, 2023.

ZHAO, S.; TANG, Y.; WANG, R.; NAJAFI, M. Mechanisms of cancer cell death induction by paclitaxel: an updated review. *Apoptosis*, v. 27, n. 9-10, p. 647-667, 2022.

ZHAO, Zhiqiang et al. Degalactotigonina, um composto natural de *Solanum nigrum* L., inibe o crescimento e a metástase do osteossarcoma por meio da repressão mediada pela inativação de GSK3 β da via Hedgehog/Gli1. **Clinical Cancer Research** , v. 24, n. 1, p. 130-144, 2018.

ZOU, Junrong et al. Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence. *Molecular medicine reports*, v. 19, n. 2, p. 759-770, 2019.

Anexos

ANEXO 1

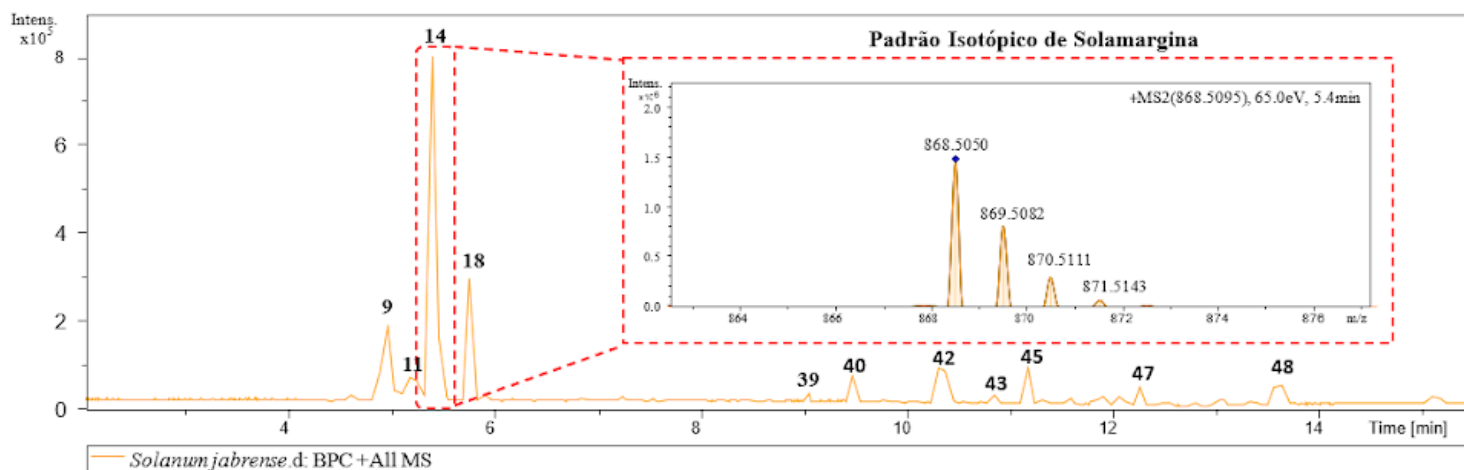
Cadastro Sisgen

1 registro encontrado

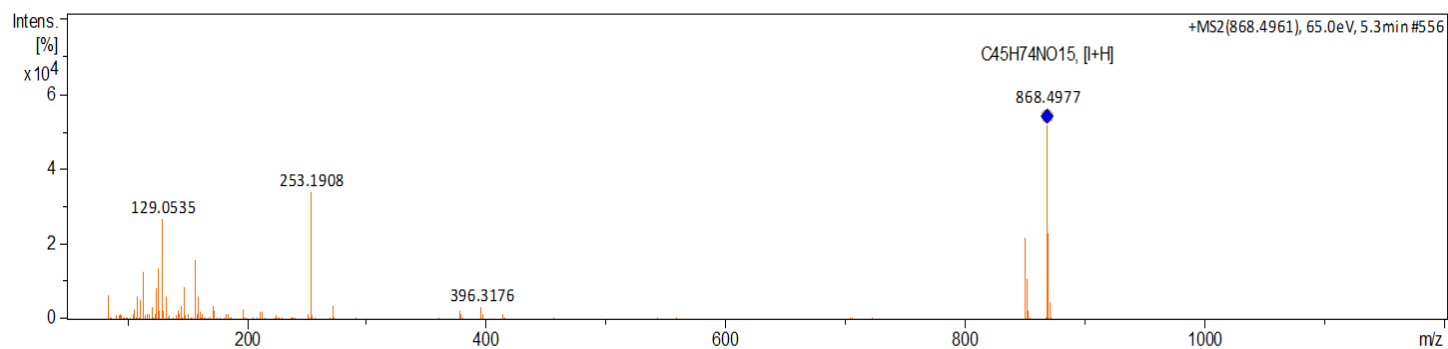
Número do Cadastro	Usuário	Sigiloso	Regularização	Finalidade do Acesso	Objeto do Acesso	Tipo de Componente do Patrimônio Genético	Procedência da Amostra	UF	Município	Bioma	Título do Projeto	Resultados Obtidos	Data do Cadastro
AD609FD	Universidade Federal da Paraíba	NÃO	NÃO	Pesquisa	Patrimônio Genético	Flora (exceto algas)	In situ	PB	Maturéia	Caatinga	Estudo químico e Biológico da espécie Solanum jabrense		09/09/2024 10:29

ANEXO 2

Cromatograma do pico base (BPC) do extrato hidroalcolólico de *Solanum jabrense* Agra e M. Nee



Espectro de fragmentação obtido do composto majoritário do extrato hidroalcolólico de *Solanum jabrense*, Solamargine.



ANEXO 3

Compostos identificados e anotados no extrato hidroalcolico de *Solanum jabrense* Agra e M. Nee.

Compostos	r.t. (min)	[M+H] ⁺	Fórmula Molecular	Íons fragmentos principais	Tentativa de anotação	Referência
1.	4.2	884.4810	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₆	866.4705, 394.3004, 376.2895, 251.1729, 133.0985	Solasonina ou isômero	Yang et al. 2021
2.	4.3	900.4757	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₇	882.4685, 412.3072, 251.1732, 112.0728	Robeneoside B ou isômero	Wu et al. 2013
3.	4.4	608.3666	Não identificado	590.3619, 465.2320, 353.1316, 285.1791, 267.1668. 114.0835	-	-
4.	4.5	902.4917	Não identificado	430.3220, 269.1820, 251.1713, 129.0521	-	-
5.	4.6	610.3804		592.3647, 431.2348, 269.1808, 251.1705, 114.0908	3-amino-hydroxy-dehydro-furostane-22-ol	Camara et al. 2021
6.	4.7	916.4691	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₈	752.3883, 624.3798, 462.3086, 276.2230, 114.0867	(3β,12β,22α,25R, -3,12-dihidroxi-espirosol-5-em-27-oic alcool-12-O-beta-D-lucopiranoside- (1-2) -O-alfa-L-ramnopiranosil	Yang et al. 2021
7.	4.8	738.4260	C ₃₉ H ₆₃ NO ₁₂	720.4148, 412.3145, 251.1726	Solanigroside P ou isômero	Yang et al. 2021
8.	4.9	898.4467	Não identificado	880.4426, 590.3519, 428.2970, 428.2970, 267.1675, 114.0905	-	-

9.	5.0	900.4935	$C_{45}H_{73}NO_{17}$	754.4344, 608.3775, 446.3247, 285.1822, 175.1100	Robeneoside B ou isômero	Yang et al. 2021 Yuan et al. 2019 Lelario et al. 2019 Wu et al. 2013
10.	5.1	738.4247	$C_{39}H_{63}NO_{12}$	394.3004, 251.1748, 133.0978	Solanigroside P ou isômero	Yang et al. 2021
11.	5.2	884.4816	$C_{45}H_{73}NO_{16}$	394.3018, 251.1728, 129.0524	Solanandaine, Solasonina ou isômero	Yang et al. 2021 Wu et al. 2013
12.	5.3	916.4772	$C_{45}H_{73}NO_{18}$	428.3048, 412.3100, 384.3160, 251.1730, 152.1172	(3 β ,12 β ,22 α ,25R, -3,12- dihidroxi-espirosol-5-em-27-oic alcool-12-O-beta-D- lucopiranoside- (1-2) -O-alfa-L- ramnopiranosil	Yang et al. 2021
13.	5.3	1000.5319	$C_{50}H_{81}NO_{19}$	868.5029, 722.4486, 558.3764, 396.3237, 253.1851, 157.0953	Arudonine	Fukuhara et al. 2004
14.	5.4	868.5095	$C_{45}H_{73}NO_{15}$	850.4941, 704.4376, 576.3892, 396.3257, 378.3153, 253.1944, 129.0547	Solamargine	Yang et al. 2021 Lelario et al. 2019 Wu et al. 2013
15.	5.5	414.3270	$C_{27}H_{43}NO_2$	396.3167, 271.1981, 157.0979	Solasodina ou isomêro	Cahill et al. 2010
16.	5.5	754.4328	$C_{39}H_{63}NO_{13}$	722.4332, 546.3634, 428.3060, 412.3120, 384.3162, 251.1730, 125.1158	Solasodine-2OH-hex-rha	Yang et al. 2021
17.	5.6	910.4995	$C_{47}H_{75}NO_{16}$	892.4899, 666.1974, 396.3194, 253.1934, 189.0734, 129.0582	Leptine I ou isômero	Shakya e Navarre, 2008
18.	5.8	722.4408	$C_{39}H_{63}NO_{11}$	704.4315, 253.1913, 129.0531	β_1 -solasonina ou β_2 - solamargina	Yuan et al. 2019 Yang et al. 2021

19.	5.9	446.3150	$C_{27}H_{43}NO_4$	428.3059, 414.2887, 400.3162	(3 β ,12 β ,25R) - 3,12-dihydroxy-siprosol-5-en- 27-oic-alcohol or isômero	Yang et al. 2021
20.	6.0	443.2701	$C_{21}H_{32}O_{10}$	407.2430,269.1844, 251.1724, 236.1445, 209.1255, 183.1085	Dihydrophaseicacid 4'-O- β -D-glucopyranoside	Rodríguez-Pérez et al. 2018
21.	6.0	751.3780	Não identificado	407.2456, 269.1781, 251.1720,157.0965		
22.	6.1	430.3219	$C_{27}H_{43}NO$	412.3082, 269.1774, 251.1693	Hydroxy solasodine	Abdel-Hamid et al. 2019
23.	6.4	428.3045	$C_{27}H_{41}NO_3$	410.2945, 267.1670, 239.1709, 175.1079, 114.0867	22 α ,23 α -Epoxy solasodina ou isômero	Yang et al. 2021
24.	6.5	277.1681	Não identificado	158.9684, 149.0182		
25.	6.6	355.2348	$C_{16}H_{19}O_9$	261.1700, 107.0817	5-O-(E)-Caffeoylquinic acid ou 4-O-(E)-Caffeoylquinic acid ou 3-O-(E)-Caffeoylquinic acid ou isômêro	Wu et al. 2013
26.	6.8	410.2951	$C_{27}H_{39}NO_2$	392.2847, 267.1663	22 α , 23 α - Epoxy-solanida-4-en-3-one or isômero	Torres et al. 2011 Yang et al 2021
27.	6.9	414.3257	$C_{27}H_{43}NO_2$	396.3161, 271.1998, 253.1888, 157.0966	Solasodina ou isomêro	Cahill et al. 2010
28.	7.0	412.3079	Não identificado	394.3023, 269.1807, 145.0930	-	-
29.	7.4	334.2846	Não identificado	286.2655, 242.2396	-	-
30.	7.5	406.3498	Não identificado	256.2566, 105.0297	-	-
31.	8.1	500.2586	Não identificado	396.1940, 105.0671	-	-
32.	8.4	467.1823	Não identificado	407.1626, 224.0989, 105.0329	-	-
33.	8.4	371.3177	$C_{16}H_{20}O_{10}$	268.255, 211.1945	Deacetylasperuloside	Rodríguez-Pérez et al. 2018
34.	8.5	445.2003	$C_{21}H_{34}O_{10}$	224.1017, 105.0299	Sacranoside A	Rodríguez-Pérez et al. 2018
35.	8.6	415.1846	$C_{19}H_{28}O_{10}$	253.1821,119.0809	Phenethyl- β -primeveroside	Rodríguez-Pérez et al. 2018
36.	8.6	432.2285	$C_{27}H_{45}NO_3$	405.2033, 285.1821, 119.0821	Isojuripidine	Camara et al.2021
37.	8.7	304.2932	Não identificado	212.2313, 91.050	-	-

38.	9.0	330.3330	Não identificado	312.3208, 106.0856	-	-
39.	9.1	346.3205	Não identificado	298.3031, 122.0780	-	-
40.	9.4	529.2005	C ₂₈ H ₄₁ N ₄ O ₆	292.0885, 238.0885, 109.0244	N ¹ -Caffeoyl, N ¹⁴ - dihydrocaffeoylspermine	Wu et al. 2013
41.	9.7	279.2211	C ₁₃ H ₁₂ O ₇	149.0182, 95.0826	p-Coumarylmalicacid	Rodríguez- Pérez et al. 2018
42.	10.3	579.2763		301.1311, 245.0702	Luteolin 6-C-β-D- glucopyranoside-8-C-α-L- arabinopyranoside or Luteolin 7-O-[2-(β-D- apiofuranosyl)-β-d- glucopyranoside] (Isomer II)	Morales-Soto et al. 2013
43.	10.8	417.3233		329.2072, 147.1108	Veremivirine	Gupta et al. 2014
44.	10.9	315.1479	C ₁₃ H ₁₆ O	243.1217, 147.1083	Gentisoyleglucoside isomer1 ou isômero	Rodríguez- Pérez et al. 2018
45.	11.2	827.4174		425.2040, 365.1841, 281.1288, 207.0540	Luteolin 7-O-(2-apiofuranosyl- 4-glucopyranosyl-6-malonyl) glucopyranoside	Morales-Soto et al. 2013
46.	11.8	813.4512		711.3730, 597.3461, 483.2786, 353.1438, 257.0888, 97.0250	-	-
47.	12.3	593.2620	C ₂₇ H ₂₀ O ₁₅	533.2422, 460.2157	Quercetin 3,7-di-O-α-L- rhamnopyranoside	Morales-Soto et al. 2013
48.	13.6	413.2956	Não identificado	301.1355, 189.0091	-	-