

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade**

**Tadeu Ferreira Braga Junior**

**Efeito do extrato aquoso e de inibidores de Proteases da *Sterculia striata* na modulação da resposta antitumoral *in vitro* e *in vivo* em modelo murino de câncer de mama**

**Teófilo Otoni**

**2023**

**Tadeu Ferreira Braga Junior**

**Efeito do extrato aquoso e de inibidores de Proteases da *Sterculia striata* na modulação da resposta antitumoral *in vitro* e *in vivo* em modelo murino de câncer de mama**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Mucuri, como requisito para obtenção de título de Mestre em Recursos Naturais e ambiente (Imunologia e Bioquímica de compostos bioativos).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra de Paula Carli.

Coorientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves.

Colaboradora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra B. R. de Castro.

**Teófilo Otoni-MG**

**2023**

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

B813Mestre Ferreira Braga Junior, Tadeu

2023 Efeito do extrato aquoso e de inibidores de Proteases da *Sterculia striata* na modulação da resposta antitumoral in vitro e in vivo em modelo murino de câncer de mama [manuscrito] / Tadeu Ferreira Braga Junior. -- Teófilo Otoni, 2023. 97 p. : il.

Orientador: Prof. Alessandra de Paula Carli.

Coorientador: Prof. Caio César de Souza Alves.

Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia, Ambiente e Sociedade) -Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de PósGraduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, Teófilo Otoni, 2023.

1. Câncer de Mama. 2. *Sterculia striata*. 3. in vitro. 4. in vivo. 5. redução.

I. de Paula Carli, Alessandra . II. César de Souza Alves, Caio. III. Universidade

Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.


TADEU FERREIRA BRAGA JUNIOR

Efeito do extrato aquoso e de inibidores de Proteases da Sterculia striata na modulação da resposta antitumoral in vitro e in vivo em modelo murino de câncer de mama


Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM  
TECNOLOGIA, AMBIENTE E  
SOCIEDADE, nível de  
MESTRADO como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM TECNOLOGIA,  
AMBIENTE E SOCIEDADE

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>  
Alessandra De Paula Carli


Data da aprovação : 26/04/2023

Documento assinado digitalmente  
 ALESSANDRA DE PAULA CARLI  
Data: 03/05/2023 10:08:16-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.Dr.<sup>a</sup> ALESSANDRA DE PAULA CARLI - UFVJM

Documento assinado digitalmente  
 CAIO CESAR DE SOUZA ALVES  
Data: 03/05/2023 10:20:20-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.Dr. CAIO CESAR DE SOUZA ALVES - UFVJM

Documento assinado digitalmente  
 FERNANDO LEITAO ROCHA JUNIOR  
Data: 05/05/2023 11:01:09-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Dr. FERNANDO LEITÃO ROCHA JUNIOR - UFVJM

Documento assinado digitalmente  
 ALEXANDRE SYLVIO VIEIRA DA COSTA  
Data: 22/05/2023 08:04:23-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Dr. ALEXANDRE SYLVIO VIEIRA DA COSTA - UFVJM

Documento assinado digitalmente  
 NERILSON MARQUES LIMA  
Data: 23/05/2023 10:53:13-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Dr. NERILSON MARQUES LIMA - UFG

TEÓFILO OTONI  
2023

## ATA DE DEFESA DE MESTRADO

A comissão examinadora da dissertação apresentada pelo pós-graduando TADEU FERREIRA BRAGA JUNIOR do Programa de pós-graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, nível MESTRADO, área de concentração: PPGTAS-M - MESTRADO EM TECNOLOGIA, AMBIENTE E SOCIEDADE, Mestrado sub linha de pesquisa, Recursos Naturais e ambiente (Imunologia e Bioquímica de compostos bioativos). , da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, instalou-se no dia 26 de abril do ano de 2023, às 14 horas, nas dependências da UFVJM. A comissão examinadora foi composta por: Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Alessandra de Paula Carli - Orientadora (UFVJM), Prof. Dr. Caio Cesar de Souza Alves - Co-orientador (UFVJM), Prof. Dr. Alexandre Sylvio Vieira da Costa (UFVJM), Prof. Dr. Fernando Leitão Rocha Junior (UFVJM), Prof. Dr. Nerilson Marques Lima (UFG), presentes no local. A defesa atendeu ao disposto no regulamento geral dos cursos de pós-graduação stricto sensu/UFVJM. Iniciou-se a sessão com a apresentação dos componentes da comissão e passou-se a palavra ao discente para apresentação de sua dissertação intitulada "Efeito do extrato aquoso e de inibidores de Proteases da Sterculia striata na modulação da resposta antitumoral in vitro e in vivo em modelo murino de câncer de mama". Após a apresentação oral, o discente foi arguido pela referida comissão, obtendo o seguinte resultado:

(x)Aprovado ( ) Reprovado

Após aprovação e entrega da versão final da dissertação devidamente corrigida, o concluinte fará jus ao título de MESTRE EM TECNOLOGIA, AMBIENTE E SOCIEDADE, pela UFVJM.

TEÓFILO OTONI, 26 de abril do ano de 2023, às 14 horas.


Prof.Dr. Fernando Leitão Rocha Junior - UFVJM

Prof.Dr. Alexandre Sylvio Vieira da Costa – UFVJM

Prof.Dr. Nerilson Marques Lima – UFG


Prof.Dr. Caio Cesar de Souza Alves – UFVJM Co-orientador

Documento assinado digitalmente

 FERNANDO LEITAO ROCHA JUNIOR  
Data: 05/05/2023 11:01:09-0300


Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente

 ALEXANDRE SYLVIO VIEIRA DA COSTA  
Data: 22/05/2023 08:02:13-0300


Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente

 NERILSON MARQUES LIMA  
Data: 23/05/2023 10:51:32-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente

 CAIO CESAR DE SOUZA ALVES  
Data: 03/05/2023 10:20:20-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## **COLABORADORES**

### **ESTUDANTES DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Gabriela de Paula Carli

Samuel Galvão Barbosa

Beatriz Joia Tabái

Roberta Maria Abrão

### **ESTUDANTES DE DOUTORADO E MESTRADO**

Gracimério José Guarneire

Jander Savedra Nunes

Paulo Gaio Leite

Mariana Stella Santiago Maia

### **PROFESSORES PESQUISADORES**

Prof. Dr. Ernani Aloysio Amaral - UFVJM

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sarah Alves Auharek - UFVJM

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fabiana Simão Machado - UFMG

### **ÓRGÃOS FINANCIADORES**

UFVJM

## **AGRADECIMENTOS**

Acredito que a ciência é uma dádiva divina, programada para amadurecer de acordo com os planos do Criador. Ele planejou a sabedoria para enriquecer nossas esperanças em um mundo melhor, cheio de conhecimento ainda desconhecido.

Agradeço a todos os colaboradores envolvidos e à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra de Paula Carli por sua preciosa e incrível paciência, amizade e conhecimento. Ao coorientador Prof. Dr. Caio César de Souza Alves homem inteligente, digo o meu obrigado, onde sempre apresentou sua experiência e sabedoria em vários momentos oportunos.

Agradeço de uma forma especial ao professor Ernani Aloysio Amaral que ofertou o material para as análises extraídas da planta.

Reconheço a gratidão por toda a equipe envolvida neste projeto que colaborou de uma forma muito significativa para as investigações em cada procedimento realizado.

“No meio da rua principal da cidade, de cada lado do rio estava à árvore da vida, que frutifica doze vezes por ano, uma por mês. As folhas da árvore servem para a cura das nações.”

Apocalipse 22:2

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RPMI – ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE - É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Age como uma solução nutritiva em cultivo celular.

4T1 Linhagem de carcinoma mamário murino

µL - Microlitro

UFVJM – Universidade federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri

CTN: Grupo controle negativo; sem inoculação, tratados com PBS.

CTP: Controle Positivo Inoculação ou inoculado de 4T1

EASs 300 mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 300 mg/kg de extrato aquoso de semente *Sterculia striata* (EASs).

IPcSs 300 mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 300 mg/kg de extrato rico em inibidores de proteases da casca de *Sterculia striata* (IPC).

IPsSs 300 mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 300 mg/kg de extrato rico em inibidores de proteases da semente de *Sterculia striata* (IPS).

IPcSc 500mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 500 mg/kg de extrato rico em inibidores de proteases da casca de *Sterculia striata* (IPSc).

IPsSs 500 mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 500 mg/kg de extrato rico em inibidores de proteases da semente de *Sterculia striata* (IPSc).

HE - Hematoxilina e Eosina

µg: Micrograma

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IFN-γ: Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12



INCA: Instituto Nacional do Câncer

IP: Inibidores de protease

SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alfa

MTT - Técnica padrão para avaliar a viabilidade celular 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazolium.

## LISTA DE FIGURAS

Título	Pág
Figura 1: Carcinoma mamário.....	15
Figura2: Foto representativa da <i>Sterculia striata</i> .....	22
Figura 3: Mapa com locais identificados de ocorrência natural de Amendoim de macaco ( <i>Sterculia striata</i> ), no Brasil.....	23
Figura 4: Processo de extração aquosa.....	24
Figura 5: Esquema da Preparação do extrato enriquecido com inibidores de proteases de <i>Sterculia striata</i> .....	28
Figura 6 – Linhagens celulares do experimento <i>in vitro</i> .....	29
Figura7– Crescimento das células 4T1.....	31
Figura 8 – Etapas do modelo <i>in vivo</i> .....	34
Figura 9 : Comparação do volume tumoral .....	42
Figura 10. Volume e comparação de tamanhos da massa tumoral.....	44
Figura 11. Volume e comparação de tamanhos da massa tumoral para o grupo IPcSs-300 e 500 mg/kg.....	45
Figura 12. Comparação com grupo de menor redução tumoral após 18 dias de tratamento.....	47
Figura13.Tamanho do baço após 25 dias de indução de células 4T1.....	49
Figura 14. Peso do Pulmão em comparação com diferentes grupos .....	51

<b>Figura 15: Peso corporal avaliado a cada dois dias.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 16. Extrato Aquoso em comparação com o grupo inoculado com 4T1.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 17. Comparação de linfonodos a diferentes grupos experimentais.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 18. Níveis de citocinas no sobrenadante do macerado dos linfonodos..</b>	<b>57</b>
<b>Figura 19: As citocinas IL-10, TNF e IL-12 (p-70) encontrados no tumor.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura20. Cortes histológicos (H/E) do Tumor.....</b>	<b>61</b>

#### Lista de Gráficos

<b>Gráfico 1: Viabilidade das linhagens celulares após 48hs com inibidores de Proteases.....</b>	<b>38</b>
<b>Gráfico 2: Viabilidade das linhagens celulares após 48hs com EA.....</b>	<b>39</b>

#### Lista de Tabelas

<b>Tabela 1. Principais observações encontradas nas lâminas de tumor.....</b>	<b>63</b>
---	-----------

## RESUMO

O adenocarcinoma de mama se destaca pelas altas taxas de incidência, mortalidade e associação a metástases tumorais na população feminina. De acordo com dados de 2020, 24,5% das neoplasias femininas foram de mama, abrangendo 20% das mortes por câncer em mulheres. Assim, o presente estudo propõe avaliar a ação do extrato aquoso *Sterculia striata* (EASs) e do extrato rico em inibidores de proteases da *Sterculia striata* (IPsS) em modelo *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama. Linhagens celulares MCF-7, 4T1 e MDA-MB-231 foram cultivadas por 48hs para análise da viabilidade celular. Camundongos BALB/c fêmeas (n=30) com 8 semanas de idade foram utilizadas para a indução do modelo. Após anestesia, foram injetadas células 4T1 ( $1 \times 10^4$  células/50 $\mu$ L) na mama caudal esquerda de cada camundongo induzido. As células de adenocarcinoma mamário 4T1 foram solubilizadas em 50  $\mu$ L de RPMI. No 8º dia após a inoculação ao sentir os nódulos nas glândulas de cada camundongo iniciaram-se o tratamento, medição do tumor com o auxílio de paquímetro e a pesagem do animal a cada dois dias. O tratamento foi realizado diariamente, por gavagem, os animais foram divididos em grupos: I. Controle negativo; II. Controle Positivo; III. EASs 300 mg/kg, IV. IPC 300 mg/kg V. IPS 300 mg/kg: VI. IPC 500 mg/kg VII IPS 500 mg/kg, durante 18 dias. O volume tumoral dos grupos foi calculado a cada dois dias. Os resultados *in vitro* mostraram reduções significativas nas maiores concentrações dos compostos retirados da semente da *S. striata* para todas as linhagens celulares. Para a linhagem MDA-MB-231 dosagens com 333  $\mu$ g/mL de IPsSs, houve reduções na viabilidade celular de 50%, em MCF-7 o tratamento com EASs reduziu em até 35% e o tratamento com IPsS em até 30%. A linhagem 4T1, reduções de 25% foram observadas. Na investigação *in vivo* nos grupos de IPsSs observou-se reduções significativas no peso e volume tumoral. A capacidade dos princípios ativos encontradas nos extratos e inibidores de proteases desperta o interesse em produzir ciência pelos resultados promissores encontrados na sementes. Assim precisa de maiores estudos a fim de averiguar o mecanismo de ação da planta.

**Palavras chave:** Câncer de Mama. *Sterculia striata*. Extrato Aquoso. Inibidores de Proteases.

## ABSTRACT

Breast adenocarcinoma stands out for its high rates of incidence, mortality and association with tumor metastases in the female population. According to 2020 data, 24.5% of female neoplasms were breast cancer, comprising 20% of cancer deaths in women. extract and protease inhibitors of *Sterculia striata*, mainly in the treatment of breast cancer. Thus, the present study proposes to evaluate the action of the aqueous extract *Sterculia striata* (EASs) and the extract rich in protease inhibitors of *Sterculia striata* (IPsSs) in an in vitro and in vivo model of breast cancer. MCF-7, 4T1 and MDA-MB-231 cell lines were cultured for 48 hours for cell viability analysis. 8-week-old female BALB/c mice (n=30) were used for model induction. After anesthesia, 4T1 cells (1x10<sup>4</sup> cells/50µL) were injected into the left caudal breast of each induced mouse. 4T1 breast adenocarcinoma cells were solubilized in 50 µL of RPMI. On the 8th day after inoculation, when feeling the nodules in the glands of each mouse, the treatment began, measuring the tumor with the aid of a caliper and weighing the animal every two days. The treatment was performed daily, by gavage, the animals were divided into groups: I. Negative control; II. Positive Control; III. EASs 300 mg/kg, IV. IPC 300 mg/kg V. IPS 300 mg/kg: VI. IPC 500 mg/kg VII IPS 500 mg/kg, for 18 days. The tumor volume of the groups was calculated every two days. The in vitro results showed significant reductions in the highest concentrations of compounds removed from the *S. striata* seed for all cell lines. For the MDA-MB-231 strain, dosages with 333 µg/mL of IPsSs, there were reductions in cell viability of 50%, in MCF-7 treatment with EASs reduced by up to 35% and treatment with IPsS by up to 30%. In the 4Q1 lineage, reductions of 25% were observed. In vivo research in the IPsSs groups showed significant reductions in tumor weight and volume. The ability of the active principles found in extracts and protease inhibitors arouses interest in producing science due to the promising results and trends in its potential to reduce found in the seed. Thus, further studies are needed in order to ascertain dosages of the plant's mechanism of action.

**Keywords:** Breast Cancer. *sterculia striata*. Aqueous Extract. Protease Inhibitors.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>Referencial Teórico .....</b>	<b>14</b>
2.1	Câncer de Mama.....	14
2.2	Plantas Medicinais – <i>Sterculia striata</i> .....	16
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>21</b>
3.1	Objetivo Geral .....	21
3.2	Objetivos Específicos .....	21
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>22</b>
4.1	Coleta do Material .....	22
4.2	Preparações do extrato aquoso de <i>Sterculia striata</i> .....	23
4.3	Preparação do extrato enriquecido com inibidores de protease da <i>Sterculia striata</i> .....	24
4.4	Modelo <i>in vitro</i> .....	29
4.5	Preparação de células 4T1 .....	30
4.6	Ensaio <i>invivo</i> .....	31
4.7	Dosagem de citocinas por ELISA.....	34
4.8	Análise histopatológica em hematoxilina e eosina .....	35
4.9	Análises Estatísticas.....	36

<b>5.0</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
5.1	<i>S. striata</i> reduz a viabilidade celular de diferentes linhagens.....	37
5.2	Resultados dos grupos experimentais.....	41
5.3	Diferença no tratamento com IPs.....	44
5.4	Volume e comparação de tamanhos da massa tumoral.....	46
5.5	Diferença da massa tumoral após 18 dias de tratamento.....	47
5.6	Tamanho do Baço induzido por células 4T1 após 18 dias de tratamento.....	49
5.7	Pesos dos pulmões entre os grupos analisados.....	50
5.8	Avaliação do peso corporal.....	51
5.9	Tratamento com Extrato Aquoso Inoculado com 4T1.....	53
5.10	Comparação dos linfonodos nos grupos de tratamento.....	55
5.11.	As citocinas IL-10, TNF e IL-12 (p-70) nos linfonodos.....	56
5.12	As citocinas IL-10, TNF e IL-12 (p-70) encontrados no tumor .....	58
5.13	Histopatologia do tumor.....	59
<b>6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>

**Anexos..... 77**



## 1. Introdução

O câncer de mama se destaca pelas altas taxas de incidência, mortalidade e associação a metástases tumorais na população feminina (ANDERSON, 2021). O câncer de mama está entre as 4 principais causas de morte no mundo, reconhecido como a segunda mais incidente.

Essa patologia em nosso país, indica diferentes tipos e formas (BRAY *et al.*, 2018). Em 2018, ocorreram 2,1 milhões de casos novos de mulheres diagnosticadas no mundo, o equivalente a 11,6% de todos os cânceres estimados. Sua manifestação está relacionada ao crescimento desordenado de células nas glândulas mamárias (INCA 2019).

Apesar dos avanços na prevenção e tratamento, o mesmo ainda apresenta alta taxa de crescimento, podendo dobrar esses números até 2040 (WHO 2020). O tratamento para o câncer de mama depende do estágio do tumor e do tipo de células envolvidas, mas, independentemente do tipo, todo o tratamento traz efeitos adversos que podem ser de curta ou longa duração, aumentando inclusive a morbidade e mortalidade das pacientes (BERGIN e LOI 2019; CASTANEDA e STRASSER 2017; ODLE 2014).

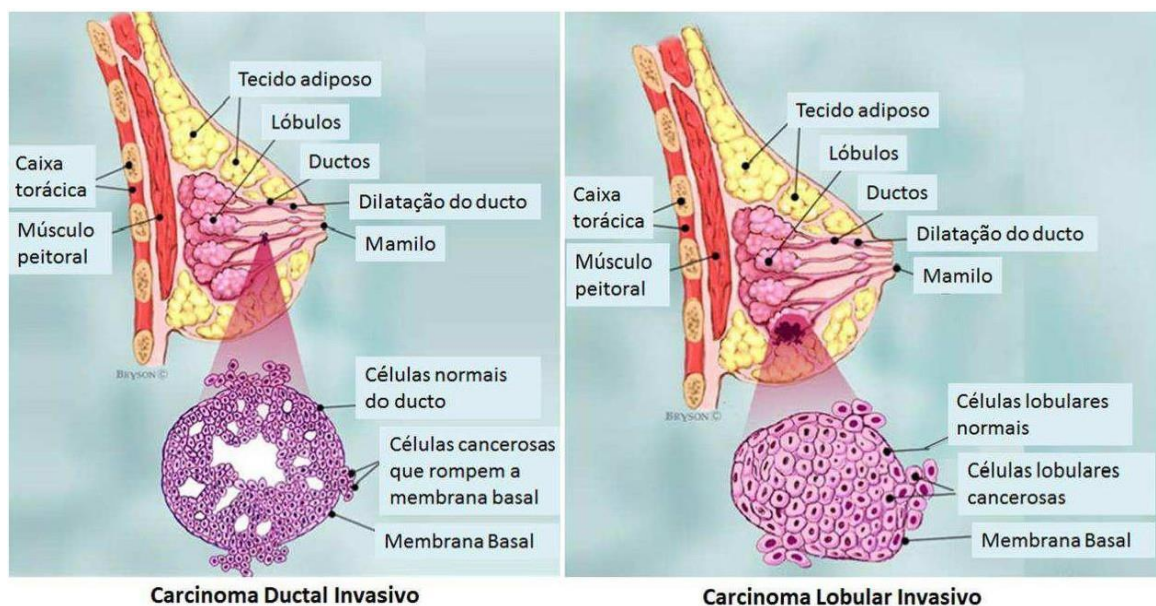
Recentes estudos têm demonstrado o potencial do uso de plantas medicinais, e produtos derivados, para a terapêutica do câncer de mama (BUJA *et al* 2020; SINHA *et al* 2016), nesse contexto, as pesquisas na área oncológica tornam-se essenciais para melhor compreender aspectos patofisiológicos desse conjunto de doença, no intuito de prevenir novos casos, bem como o tratamento desses pacientes. Com o aumento do perfil epidemiológico deste tipo de câncer que requer um tratamento deprecioso, necessita-se de tratamentos cada vez menos hostis, acarretando interesses ligados à fitoterapia, por ser natural. A espécie Amendoim de Macaco (*Sterculia striata*), objeto desse estudo pode possuir efeitos citotóxicos seletivos que podem ser investigadas em modelos de câncer de mama (GONÇALVES, 2019 e SALVADOR, 2014). Assim, o presente estudo propõe avaliar a ação do extrato aquoso *Sterculia striata* (EASs) e do extrato rico em inibidores de proteases da *Sterculia striata* (IPSSs) em modelo *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama.

## 2. Referencial Teórico

### 2.1 Câncer de mama

O câncer de mama por sua vez é reconhecido pelo INCA como crescimento desordenado de células nas glândulas mamárias (INCA 2020). Em casos raros homens também apresentam essa patologia. Outro fator que fica mais difícil de tratar pode ser o diagnóstico tardio (INCA 2019). A figura 1 mostra dois locais frequentes para região do carcinoma mamário. Segundo Zevallos (2020) o câncer de mama apresenta estágios agressivos que podem estar relacionado com a desordem dos hormônios, receptores de progesterona, estrógenos e a proteína HER2 nas regiões das glândulas.

**Figura 1: Carcinoma mamário**



Fonte: [breastcancer.org/about-you/concerned-about-risk](http://breastcancer.org/about-you/concerned-about-risk) Desenho esquemático demonstrando o desenvolvimento dos carcinomas mamários ductal e lobular invasivos. (Adaptado de [www.breastcancer.org](http://www.breastcancer.org)).

Alguns hormônios ou proteínas alvos podem agir como agente promotor que altera a expressão da informação genética da célula, potencializando assim a transformação celular (FREITAS *et al.*, 2006). A etapa da progressão geralmente oferta alterações celulares que são formadas durante a iniciação e promoção e exibem um maior comportamento maligno

(ARAÚJO; CORDEIRO; ATHANAZIO, 2007). As mutações ocorrentes nestas células desordenadas demonstram propensão para invadir os tecidos adjacentes e gerar metástase (DUARTE; ANDRADE, 2006).

Alguns sinais podem ser percebidos pelo corpo através de nódulos próximos às glândulas mamárias. Esse caroço pode ser fixo ou indolor, o que geralmente pode aparecer nas axilas ou próximo ao pescoço. Outros sintomas são manchas vermelhas na pele e alterações como grãos ou líquidos espontâneos saindo dos mamilos. Ficar atento às mudanças do corpo, textura da pele, secreções com sangue e observar pequenas alterações, são maneiras importantes para se notar modificações peculiares no corpo (INCA, 2020).

A OMS sugere a mamografia, entre outros exames, que auxilia mulheres a reconhecer as alterações em seu corpo com antecedência. O diagnóstico precoce contribui para um tratamento menos agressivo que pode levar a uma diminuição significativa do câncer (INCA, 2020).

Com a evolução da ciência, muitas terapêuticas surgiram na última década. De acordo com o diagnóstico prescrito pelo especialista responsável e com estágio da doença será elaborado um quadro de propostas, usando tratamentos sistêmicos e locais. Ao passar dos anos surgem novos tratamentos ligados à cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica (terapia alvo) (INCA, 2020).

Um dos recursos utilizados na imunoterapia é induzir as citocinas para alcançar respostas imunes que consigam inibir o crescimento de células desordenadas, estimular ou provocar diferentes papéis biológicos no processo de imunização contra fatores patogênicos. O procedimento com citocinas busca regular ou estimular uma resposta do sistema imunológico ao câncer (OLIVEIRA 2019).

Entre suas funções uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As citocinas são proteínas de sinalização produzidas pelas células do sangue entre outras, elas atuam na comunicação entre as células durante a resposta imune do corpo. No tratamento elas são utilizadas para a ativação de células específicas ou para aumentar a resposta do corpo contra o câncer. Entre os grupos de citocinas existentes, para este estudo os principais tipos de citocinas escolhidas no tratamento do câncer são os

TNF $\alpha$ , interferons e as interleucinas (OLIVEIRA 2019, ABBAS, et al., 2012; PAUL, 2013; THERESA, 2013).

Para estudar a capacidade de alguns grupos de citocinas, investigar as plantas medicinais através da utilização dos seus diferentes sítios de ação, é um poderoso utensílio no uso da fitoterapia, que podem estimular precursores fármacos que acenda respostas imunes, com resultados promissores para o tratamento do câncer (VIEIRA, 2015).

Alguns conceitos de grandes representantes da ciência como a Organização Mundial da Saúde (OMS) definem como planta medicinal "todo e qualquer vegetal que possui um ou mais órgãos vegetais, (flores, caules, frutos, raíze, sementess ou folhas), substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semisintéticos" (OMS, 1998). Os componentes presentes em uma planta medicinal podem atuar no organismo indicando respostas que favoreçam as ações imunológicas. (Garlet 2019).

A área da ciência que estuda esses componentes medicinais nas plantas é chamada de fitoterapia. Este campo está à procura de descobertas para sempre evoluir e atingir os princípios de uma investigação farmacológica, que ainda não foi desvendada por meio de uma pesquisa científica, o que geralmente seria utilizado para uma ação contra fatores patológicos (GARLET, 2019).

## **2.2 Plantas Medicinais - *Sterculia striata***

Plantas são continuamente alvos para fármacos. Seus compostos podem ser extraídos e usados para uma boa avaliação ao auxílio medicinal (ITOKAIAS 2008). Muitas substâncias bioativas são retiradas de plantas para diversas atividades fitoterápicas como anti-inflamatórios, antitumorais, analgésicos entre outros diferentes efeitos sobre mediadores de preparações para cada parte das plantas. (DEVIENNE et al., 2004).

Algumas formas no uso das plantas medicinais podem ser pela ingestão por meio de chás ou xaropes, ou por meio tópico onde é usado na pele ou nas mucosas das cavidades. Grandes exemplos como a maceração, cataplasma, tintura entre outros são formas de aplicar ao corpo de forma natural. Avalia-se outros métodos que separam apenas o componente específico encontrado na planta como os princípios ativos. (GARLET 2019).

Os princípios ativos são substâncias químicas presentes em ervas medicinais que provocam reações nos organismos. Essa composição química é um resultado da transformação da luz, gases e nutrientes retirados e produzidos pela vegetação que extrai nutrientes do solo e elabora o fitoterápico (GARLET 2019).

Assim com o levantamento e aumento na enorme variedade de plantas com valores terapêuticos, que são utilizadas tanto pela população na cura de alguma enfermidade quanto em fabricação de medicamentos fitoterápicos que são a base de plantas medicinais (MOTA et al. 2014), foi proposto nesta pesquisa dentre a grande biodiversidade de nossa região, apresentar um estudo farmacognóstico das cascas e sementes de uma árvore, típica do Cerrado brasileiro, a *Sterculia striata*, que pertence a família Sterculiaceae, classificada atualmente como Malvaceae.

A *Sterculia striata* é uma planta arbórea, cuja a indicação de Silva (2001), sugere popularmente ser conhecida como, xixá, chichá do cerrado, amendoim-de-macaco, castanha-de-macaco, mendubi-guaçu, castanheiro-do-mato, arachachá, pau-rei e pertence à família Malvaceae (Silva 2001). Essa árvore pode ser encontrada em diferentes regiões brasileiras como Região Centro-Oeste e nos Estados do Maranhão, Bahia, Piauí, Minas Gerais, São Paulo, Pará e Tocantins (Brasil 2015).

Sua origem é por meio da amazônia, caatinga, cerrado e mata atlântica. Conhecida por ser uma espécie com potencial para o mercado de nozes, devido ao seu baixo teor de gorduras em comparação a outras nozes, pode ser indicada como um meio “light” para o consumo (EMBRAPA 2018). Essas sementes são consumidas por populações locais de formas torradas, cruas e cozidas. Indígenas conhecidos como “etnia norte-americana Kofán” utilizam seu extrato para erupções cutâneas (BRASIL 2015).

A noz (semente), apresenta casca dura e resistente, de coloração verde-acinzentada, tornando-se enegrecida quando mais velha. A polpa branca é aproveitada na alimentação humana tanto *in natura* como cozida ou torrada, e ainda na forma de pé-de-moleque, de paçoca doce ou salgada (SILVA et al., 2001). As amêndoas dessa espécie são consumidas principalmente pela população do interior de Goiás, do Ceará e do Piauí (COSTA et al., 2004). De acordo com Chaves et al. (2004) e Carvalho, (2019) foi avaliado o potencial

nutricional da noz de chichá-do-cerrado, observando os teores de alguns macronutrientes como : Lipídios (28,6%), Proteína (22,5%), Carboidratos (45,8%).

Um dos seus principais constituintes químicos são os licopenos e o princípio ativo flavonoide (ROCHA 2013). O teor de antocianina, óleos, vitamina C podem contribuir para os dados farmacológicos presentes na espécie em estudo (ROCHA 2013). Outros componentes foram determinados como os ácidos graxos, os esteróis e os álcoois triterpênicos(CHAVES 2004).

Substâncias conhecidas como compostos químicos secundários, sintetizados pelas plantas, por meio da água, luz, nutrientes entre outros processos, podem oferecer efeitos químicos ou biológicos sobre as reações para o organismo (GARLET 2019).

Os carotenóides complementam os pigmentos na fotossíntese e na fotoproteção devido a sua estrutura conjugada de polieno que absorve a luz através desta molécula. Alguns grupos são reconhecidos com hidrocarboneto (caroteno) e outros chamados de xantofilas, que são grupos funcionais oxigenados (WILLIS e WIANS, 2003).

O Licopeno é um carotenóide cíclico que contém 11 ligações duplas conjugadas, 2 ligações não conjugadas, arrançadas linearmente em sua composição química. Pertence a família do betacaroteno. Encontra-se no grupo dos carotenóides constituídos de carbono e hidrogênio (Moritz 2006). Possui a habilidade de capturar radicais livres e contém a capacidade sequestrante do oxigênio (Shami 2004). O licopeno é um componente presente na planta em estudo (KANDASWAMI 2007) . Sua estrutura química consiste em 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos (GARLET 2019).

Alguns mecanismos de ação dos flavonoides, incluindo inativação de carcinógenos, antiproliferação, parada do ciclo celular, indução de apoptose e diferenciação, inibição da angiogênese, antioxidação e reversão da multirresistência ou uma combinação desses mecanismos são indicados em alguns estudos (REW 2003).

O resultado do estudo dos ácidos graxos da *Sterculia striata* reforça o relatado na literatura sobre a presença de compostos com grupos ciclopropênicos em óleos de sementes de plantas da família Sterculiaceae. Assim, não se recomenda a ingestão das amêndoas de

chichá, e o óleo para fins comestíveis, somente após os ácidos serem eliminados.

Inibidores de protease estão relacionados a proteínas encontradas em plantas, microrganismos e animais capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, promovendo a inibição da atividade dessas proteases, podendo variar de tamanho (CÁMPANO et al. 2013). Os inibidores de proteases podem ser classificados em dois grandes grupos: os inibidores de baixo peso molecular e os inibidores peptídicos com uma ou mais cadeias polipeptídicas, sendo que os de ocorrência natural são majoritariamente polipeptídeos. Esses grupos também podem ser classificados de acordo com o tipo de protease que inibem, por exemplo: inibidores de serino, cisteíno, aspártico, treonino e metaloproteases (COLARES, 2016).

Os inibidores de proteases apresentam importantes funções na regulação de diversos organismos e em plantas de modo especial, contendo importantes estratégias de defesa contra patógenos e predadores, visto que as plantas não dispõem de sistema imune (CORREA, 2018 e NGUYEN, T.T., et al 2019).

As proteases desempenham funções vitais nas plantas e seus inibidores participam da regulação de suas atividades, protegendo-as de ataques de agentes externos e inibindo preferencialmente suas enzimas digestivas. Esses inibidores podem ser facilmente administrados oralmente, devido à alta especificidade, estabilidade aos extremos de pH e temperatura, características que facilitam sua utilização na produção de novos fármacos (STENICO et al. 2012).

Existem diversos métodos de extração de seus inibidores (CARLI, 2011). O método utilizado através das plantas medicinais como coadjuvante no tratamento de patologias, apresenta um passo para investigar a extração de inibidores de plantas medicinais (GUARNEIRE 2018).

As pesquisas acerca de inibidores de proteases provenientes de plantas ainda são recentes e necessitam de estudos que aprofundem o conhecimento de suas estruturas, pois o entendimento do funcionamento dessas moléculas contribuiria para o desenvolvimento de novos medicamentos (KONG et al. 2011).

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Analisar o efeito dos extratos aquosos e dos extratos de inibidores de proteases da *Sterculia striata* na modulação da resposta antitumoral em modelo de câncer de mama *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato aquoso e inibidores de proteases da casca e semente de *Sterculia striata* nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e 4T1.
- Induzir modelo de câncer de mama com células 4T1 em camundongos BALB/c;
- Determinar os níveis de IL-10, IL-12, TNF e IFN- $\gamma$  nos tumores e linfonodos.



## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Coleta do Material

A *Sterculia striata* foi coletada no mês de maio de 2021, na zona rural da cidade de Berilo – MG no vale de Jequitinhonha. Os instrumentos de coleta foram tesoura de poda, facão e podão. As sementes e casca coletadas foram lavadas e submetidas à secagem em estufa a uma temperatura média de 40°C por 02 horas conforme Fonseca (1984) e Monteiro e Siani (2009).

Foram realizadas análises morfológicas da planta, com auxílio de materiais como lupas, pinças, agulhas histológicas e comparadas com exsicatas de coleções virtuais botânicas brasileiras e mundiais (Herbário Virtual Re flora (2018), New York Botanical Garden (2018) e o Royal Botanical Gardens Kew (2018), (Figura 2)

**Figura 2: Foto representativa da *Sterculia striata***

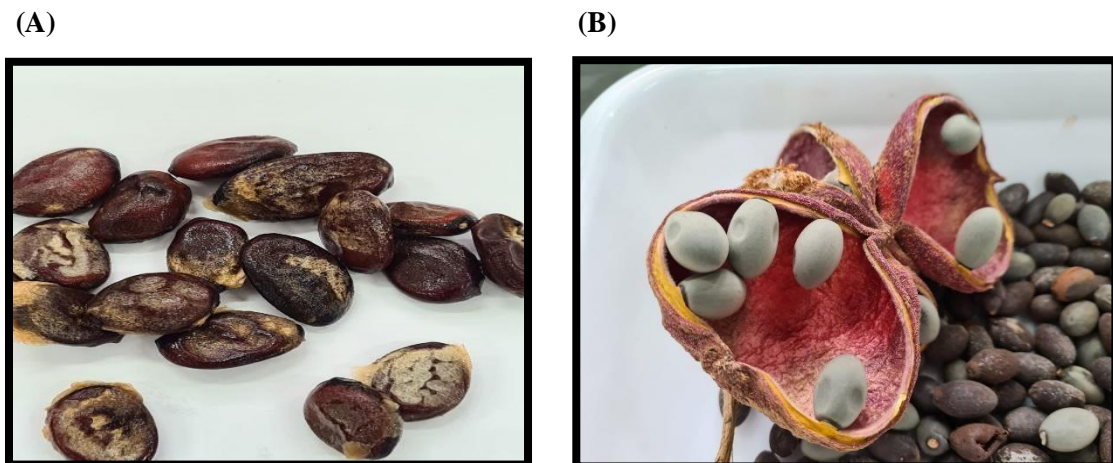
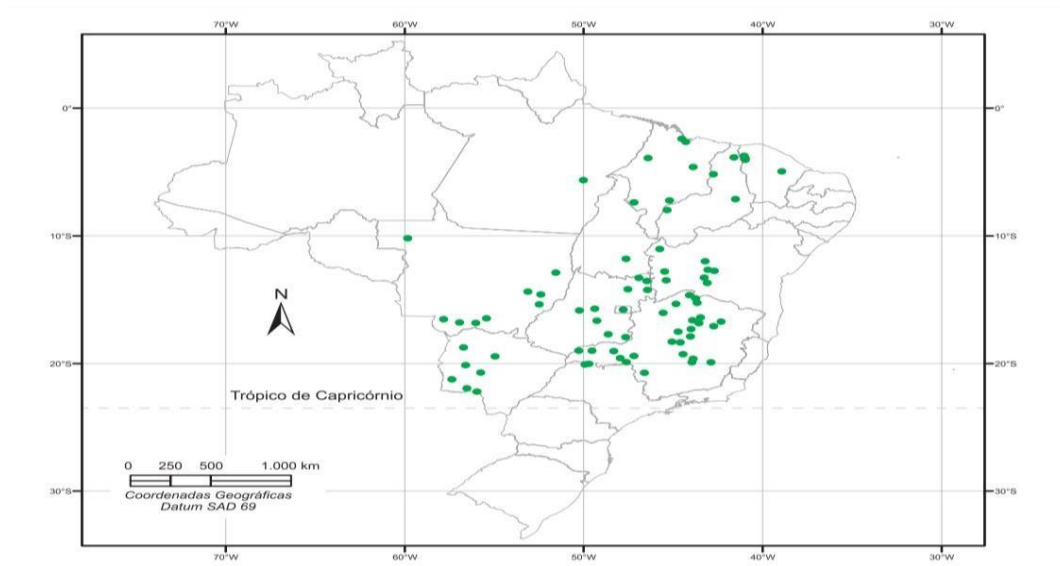


Imagem com as principais estruturas usadas para extração aquosa e inibidores de proteases, (A) semente e (B) casca.

De acordo com a EMBRAPA (2014), observou-se essa planta em diferentes locais do nosso país, inclusive em diferentes regiões do estado de Minas Gerais (Figura 3). Em seguida, a identificação foi realizada pelo Herbário Dendrológico da UFVJM, Jeanine Felfili e a espécie foi depositada sob o registro HDJF 9102 e o projeto cadastrado no SisGen sob número de registro AA97EDF conforme os cadastros em anexo.

**Figura 3: Mapa com locais identificados de ocorrência natural de Amendoim de macaco (*Sterculia striata*), no Brasil.**



Fonte: CARVALHO, EMBRAPA, 2014.

#### **4.2 Preparações do extrato aquoso de *Sterculia striata***

As cascas e as sementes da *Sterculia striata* foram trituradas e moídas em liquidificador industrial separadamente. Pesou-se 200 g do material e diluiu em 400ml de água destilada, homogeneizando-os e mantendo em recipiente fechado por 48h. k. O material foi filtrado e posteriormente centrifugado a 3640 x g por 30 minutos e o precipitado acondicionados em freezer em temperatura de -80°C por 24 horas. Em seguida, foram liofilizados por 48 horas e recondicionados em freezer a -20°C. A obtenção do extrato foi obtida conforme orientações de Gomes e colaboradores (2016). As etapas deste processo podem ser observadas na figura 4.

**Figura 4: Processo de extração aquosa**

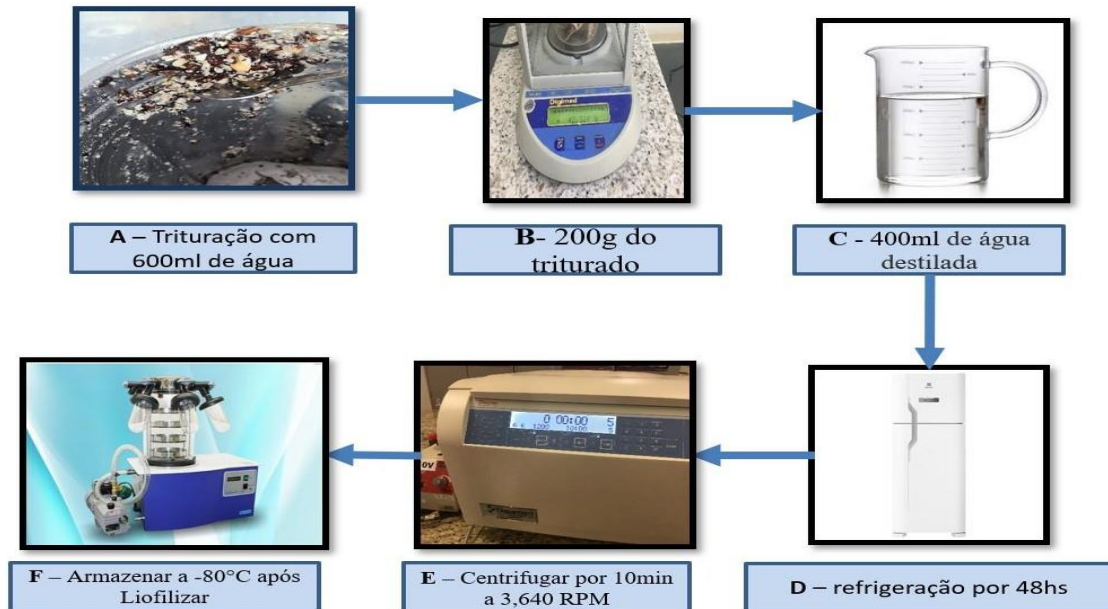
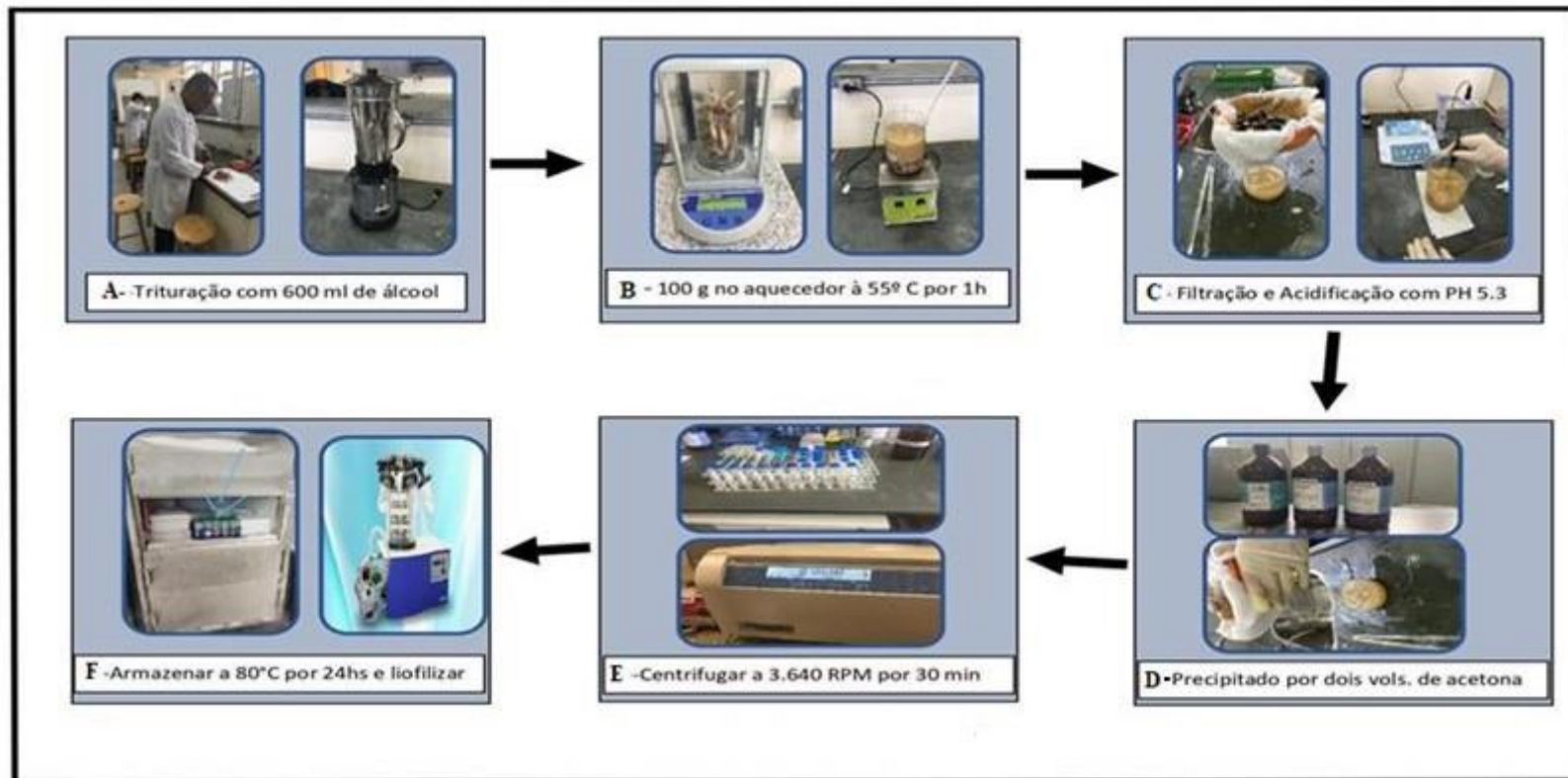


Imagem representando o processo de preparação do extrato aquoso, sendo (A) trituração, (B) Balança analítica, (C) Água destilada, (D) Refrigeração, (E) Centrifugação e (F) Liofilização.

#### 4.3 Preparação do extrato enriquecido de inibidores de protease da *Sterculia striata*

Para realizar a detecção e extração de inibidores de proteases, baseou-se no trabalho de (CARLI, A.P; 2012). As cascas e sementes da planta foram selecionadas e trituradas em liquidificador. As proteínas foram extraídas, acrescentando-se 10% p/v de etanol a 60%, aquecidos à 55°C com agitação constante por 1 hora. Após este período, o material foi filtrado em gaze, e acidificado em pH 5,3. O filtrado foi precipitado com dois volumes de acetona, em seguida centrifugou-se a 4600 x g por 30 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o precipitado resultante foi ressuspensionado em 10 ml de água destilada e armazenado à - 80°C. Posteriormente, o material foi liofilizado e armazenado em freezer-20°C figura 5.

**Figura 5: Esquema da Preparação do extrato enriquecido com inibidores de proteases de *Sterculia striata***

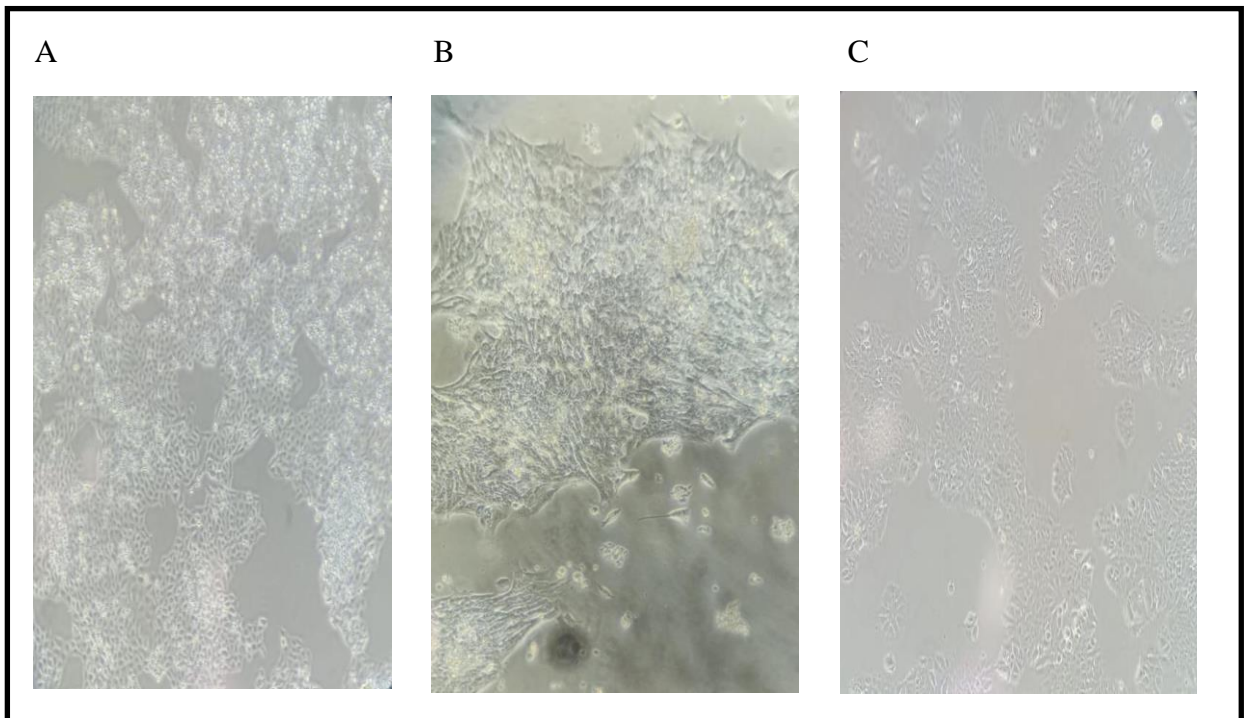


Processo utilizado para extração dos inibidores de proteases das sementes e cascas de *Sterculia striata* (Amendoim de macaco). Processo onde (A) trituração, (B) aquecimento, (C) filtração e PH (D) Precipitado com acetona, (E) Centrifugação e (F) Liofilizar e armazenar a -80°C.

#### 4.4 Modelo *in vitro*

Células 4T1, MDA-MB-231 e MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células/mL) conforme observação na figura 6, foram adicionadas em placas de 96 poços em RPMI-1640 suplementado com 2mM L-glutamina, 100  $\mu\text{g/mL}$  de antibiótico (estreptomicina e penicilina), 5% de soro fetal bovino. As células foram tratadas com EASs, IPsSs e IPcSs, nas concentrações de 333, 100, 33,3 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , e mantidas a 37 °C em 5% de  $\text{CO}_2$  por 48 horas. Para a análise de citotoxicidade foi realizado o teste de viabilidade celular com o composto 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazolium – MTT. Após o tempo de cultivo, foi retirado o sobrenadante e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de RPMI-suplementado e 10 $\mu\text{L}$  (5 mg/mL) de solução de MTT em cada poço. As células foram então incubadas por 4 horas. Ao término da incubação o sobrenadante foi retirado e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. As placas foram agitadas e a densidade óptica (OD) da absorbância foi determinada no leitor de microplacas EZ Read 2000 (Biochrom San Diego, USA) em comprimento de onda de 560 nm. A citotoxicidade (%) foi obtida pela fórmula  $(X1/X2) \cdot 100$ , considerando X1 e X2 a média da OD nos poços de células tratadas e células não tratadas, respectivamente.

**Figura 6 – Linhagens celulares do experimento *in vitro***



Imagens das linhagens celulares, no aumento de 100X, tiradas durante o experimento para comparação e observação de suas alterações morfológicas onde (A) são linhagens MCF-7 humanas de câncer de mama, (B) células 4T1 do modelo murino e (C) linhagem celular MDA humana.

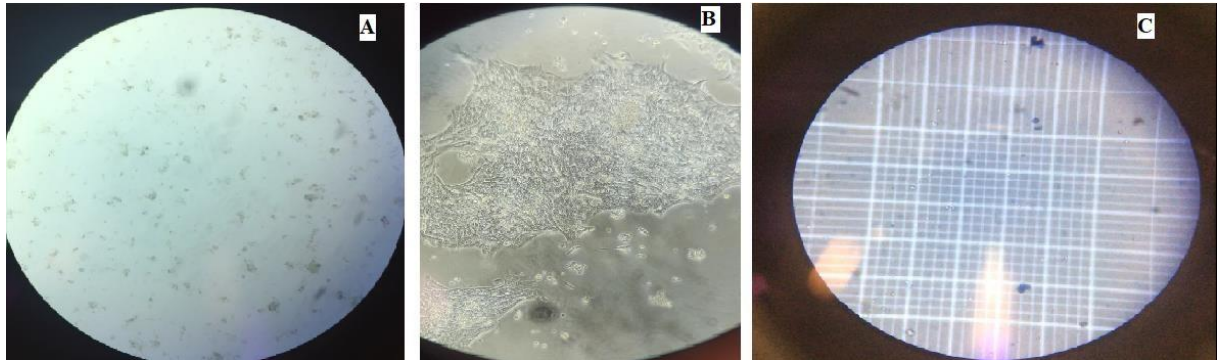
#### **4.5 Preparações de células 4T1 para o modelo experimental *in vivo***

A linhagem de células 4T1 é um modelo murino comum de ser usado para estudar mecanismos que desenvolvem carcinoma de mama celular tumoral transplantável. Reconhecido por ser um método de cultivo que se assemelha ao estágio avançado próximo ao que ocorre em humanos e por também apresentar metástases (Gonçalves 2019).

As células de adenocarcinoma mamário 4T1 foram doadas pela Dra. Fabiana Simão Machado - Laboratório de Imunologia- UFMG. A alíquota da linha celular de câncer de mama murino 4T1, armazenada -80°C, foi descongelada em banho maria a 37°C por 1min. O conteúdo do tubo é adicionado a uma garrafa de cultura, com RPMI (1X) suplementado de soro bovino fetal, em concentração de 10%, 1% de penicilina-estreptomicina Figura 7. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado. A manutenção das células ocorreu a cada dois dias em um fluxo laminar. Para a troca do meio de cultura das foram feitas duas lavagens com RPMI utilizando uma pipeta de 10ml. As células foram guardadas e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C.

O descongelamento das células 4T1 contidas no criotubo, foram retiradas da câmara de nitrogênio a - 96 °C e levadas para o fluxo laminar esterilizado. Sequencialmente foi enriquecida com 1 ml de RPMI. O meio foi suplementado e realocado para um tubo falcon com 20 ml de RPMI e levado para centrifugação por 10 min a 5°C por 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet diluído em 1ml RPMI suplementado e transferido para uma garrafa com 50 ml de RPMI suplementado. Posteriormente, armazenado em câmara 37° C CO<sub>2</sub> 5% até atingir a confluência.

**Figura 7 – Crescimento das células 4T1**



Imagens capturadas durante os procedimentos de repique e contagens de células 4T1 vistas no microscópio onde (A) corresponde a aumento de 40x, (B) apresenta células prontas para o repique com aumento de 100x e (C) células para serem quantificadas na câmara de Neubauer com aumento de 100x.

Para manutenção das células 4T1, foi realizado o repique a fim de não atingir a confluência. Neste procedimento o meio de cultura foi removido do frasco com o auxílio de uma pipeta de pasteur sendo aspirado e descartado. Sequencialmente após oito dias de observação das colônias de 4T1, foi colocado 1 mL de tripsina (3 a 6 min). Acrescentou-se 10 ml de RPMI completo, aspirou todo o meio da garrafa e guardou em um tubo de falcon 50 ml. Centrifugou-se por 10 min a uma velocidade de 1200 rpm a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu com RPMI completo em volume de 1ml. A contagem das células foi realizada na câmara de Neubauer.

Ajustou a concentração de células 4T1 para  $1 \times 10^6$  / 50µl de RPMI para cada camundongo (Zhang Et. Al 2018). Com o animal anestesiado foi injetada diretamente sobre a mama caudal esquerda dos camundongos, a solução contendo a célula utilizando uma agulha de 13x4,5 e seringa de 1mL. Para o ensaio de contagem inicial com a câmara de Neubauer foi adicionado o corante trypan blue as células.

#### **4.6 Ensaio *in vivo***

Todos os ensaios realizados nesta pesquisa em animais foram realizados de acordo com protocolos experimentais aprovados pelo comitê de ética animal nº 08-2021 R, sob o protocolo nº 158/2018 (ANEXO I) e está em conformidade com o guia recomendado pelo

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para o cuidado e uso de animais de laboratório CEUA da UFVJM.

Os camundongos BALB/c fêmeas de 8 semanas de idade; 25 g foram adquiridos no biotério da UFMG e mantidos a 25 °C num ciclo claro / escuro de 12h, alimentados com ração para roedores e água *ad libitum*.

Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram diluídas em meio de cultura completa de modo a ser obtido  $1 \times 10^4$  células/50 $\mu$ L. Os animais com 8 semanas de idade do grupo experimental foram inoculados de forma subcutânea (s.c.) na almofada de gordura mamária do lado esquerdo de adenocarcinoma mamário 4T1 ressuspensas em 50 $\mu$ L de RPMI e solução tampão fosfato-salino (PBS 1X) estéril. Os animais do grupo controle foram inoculados no mesmo local com 50  $\mu$ L de solução tampão fosfato-salino (PBS 1X) estéril.

Os animais do grupo controle foram inoculados no mesmo local. Antes da inoculação, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- I. Grupo CTN: Grupo controle negativo; sem inoculação, tratados com PBS (100 $\mu$ L).
- II. Grupo CTP: Controle Positivo Inoculação de 4T1 e tratamento com PBS.
- III. Grupo EASs 300 mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 300 mg/kg de extrato aquoso de *Sterculia striata* (EASs).
- IV. Grupo IPC 300 mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 300 mg/kg de extrato rico em inibidores de proteases da casca de *Sterculia striata* (IPC).
- V. Grupo IPS 300 mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 300 mg/kg de extrato rico em inibidores de proteases da semente de *Sterculia striata* (IPS).
- VI. Grupo IPC 500 mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 500 mg/kg de extrato rico em inibidores de proteases da casca de *Sterculia striata* (IPC).



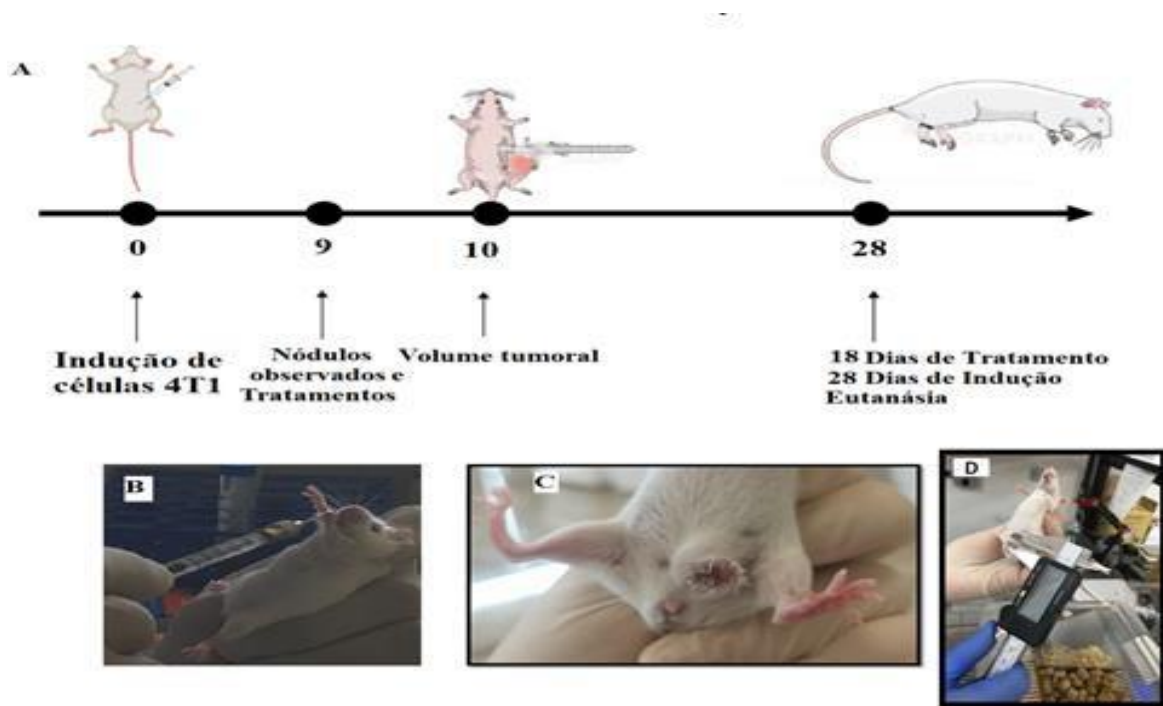
**VII.** Grupo IPS 500mg/kg: Inoculação de 4T1 e tratamento com 500 mg/kg de extrato rico em inibidores de proteases da semente de *Sterculia striata* (IPSs).

Cada grupo contendo 5 animais recebeu 100 µl por animal diário, para auxiliar na diluição do composto, com o tratamento diluído de acordo com seu peso e cálculo de transformação para miligramas (mg) e microlitros (µl). Conforme a dosagem para o tratamento e controle.

Após 10 dias da inoculação, quando o tumor se encontrava palpável, iniciou-se a medição com o auxílio de paquímetro. A medição ocorreu em intervalos de 48hs. O tratamento foi iniciado no 10º dia após a indução das células 4T1. Os animais de todos os grupos foram eutanasiados no 28º dias após a inoculação, tendo como referência o tamanho máximo dos nódulos, alcançando volume de 800 mm<sup>3</sup>. Após a remoção cirúrgica do baço e linfonodo inguinal ipsilateral, os mesmos foram fotografados ao lado de uma régua.

A padronização da concentração de células para o desenvolvimento foi de  $1 \times 10^4$ . Com objetivo de confirmar se a inoculação de células 4T1 na almofada de gordura mamária dos animais acarretaria em crescimento do tumor conforme descrito na literatura (ZHANG, 2018), assim como verificar se diferentes concentrações de células afetariam no crescimento tumoral obtidos após processamento tumoral (Figura 8) e o detalhamento das dosagens.

**Figura 8 – Etapas do modelo *in vivo***



Imagens com os modelos trabalhados, (A) dias contendo as etapas do modelo *in vivo*, (B) gavagem e (C) câncer de mama induzido (D) Volume tumoral

A eutanásia foi realizada por exsanguinação após aprofundamento de anestesia, para a coleta dos tumores e linfonodos inguinais. Após a remoção cirúrgica do tumor, o mesmo foi colocado em tubo cônico de centrifugação de 15 mL (Falcon®), pesado e fracionado. Parte foi armazenada em formalina 10%. Parte do tumor e os linfonodos inguinais foram mantidos a  $-86^{\circ}\text{C}$  até as análises.

#### 4.7 Dosagem de citocinas

Posteriormente ao descongelamento, os órgãos foram macerados em tampão de extração de citocinas (100 mg/mL) composto de: 0,4 M de NaCl, 0,05% de tween 20, 0,5% desoroalbumina bovina-BSA, 0,1 M de fluoreto de fenil-metil-sulfonil-PMSF, 0,1 M de cloreto

de benzetônico-BC, 10 mM de ácido etileno diamino tetracético-EDTA e 20 pM de aprotinina-AP. Em seguida, o material foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80 °C. As concentrações de citocinas nos sobrenadantes foram determinadas por ELISA.

Os sobrenadantes dos órgãos coletados foram submetidos à dosagem de IL-10, IL-12, TNF e IFN- $\gamma$ ). Placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico conforme instruções do fabricante (BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, USA). Estas foram incubadas *overnight* e, em seguida, lavadas com PBS-Tween por 04 vezes, bloqueadas com PBS-soro fetal por 01 hora. Após o bloqueio de 01 hora, as placas foram novamente lavadas e adicionados nos poços às amostras e os padrões de citocinas. Foram incubadas por 2 horas a 4 °C. Após o período de incubação, elas foram lavadas e o segundo anticorpo foi adicionado. Foram incubadas por 01 hora a temperatura ambiente e lavadas por mais 04 vezes. Foi acrescentado o conjugado enzimático e as placas foram incubadas por mais 01 hora. Transcorrido a incubação, a reação foi revelada pela adição do substrato e por fim bloqueada com ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas Ezread em comprimento de onda de 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes para IL-10, IL-12, TNF e IFN- $\gamma$  (BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, USA).

#### **4.8 Análise histopatológica**

Os tumores foram fixados com 10% formalina tamponada durante 48 horas. Em seguida, os mesmos foram submetidos a processamento histológico, passando pelas etapas de desidratação: I álcool 70% ,II álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, três etapas de álcool absoluto; clarificação: 1 hora em cada um dos seguintes banhos: xilol I, xilol II e xilol III ou *overnight*; e impregnação: 1 hora para cada banho de parafina I, parafina II e parafina III. Cortes longitudinais de 5  $\mu$ m, obtidos dos blocos de parafina, foram corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram digitalizadas no microscópio panoramatic desk e as imagens foram analisadas com o software Leica.

#### **4.9 Análises Estatísticas**

As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Posteriormente, foram utilizados o teste Mann-Whitney, ou o Two-way ANOVA. O nível de significância admitido para os testes foi de  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados no software Prism 5.0 (GraphPad) e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. *S. striata* reduz a viabilidade de células de diferentes linhagens

As maiores reduções na viabilidade das células foram observadas nas maiores concentrações dos compostos retirados da semente da *S. striata*. A linhagem MDA-MB-231 quando tratada com 333 µg/mL de IPs<sub>Ss</sub>, apresentou 50% de redução na viabilidade. Nas linhagens MCF-7 e 4T1 a redução após o tratamento com IPs<sub>Ss</sub> foi de 30% e 25%, respectivamente. O tratamento com IPs<sub>Cs</sub>, na concentração de 333 µg/mL reduziu a viabilidade em 45%, 30% e 10% nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e 4T1, respectivamente. As demais concentrações apresentaram redução variada, não sendo efetivas somente na linhagem 4T1 tratadas com IPs<sub>Cs</sub> (gráfico 1).

Em relação ao tratamento com o extrato aquoso da semente de *S. striata* (EASs) foi observado uma maior efetividade sobre a linhagem MCF-7, com redução da viabilidade em todas as dosagens, atingindo 35% de redução na maior concentração. Sobre a linhagem MDA-MB-231, o EASs foi capaz de induzir uma redução de 25% na viabilidade na maior concentração, porém não foi significativamente efetivo sobre a linhagem 4T1 (gráfico 2).

Assim, a linhagem MDA-MB-231 apresentou os melhores resultados em comparação às outras linhagens neste estudo. Esses dados sugerem um promissor efeito anticâncer dos extratos e inibidores de proteases, especialmente sobre as células MDA e MCF-7.

**Gráfico 1: Viabilidade das linhagens celulares após 48hs com inibidores de Proteases**

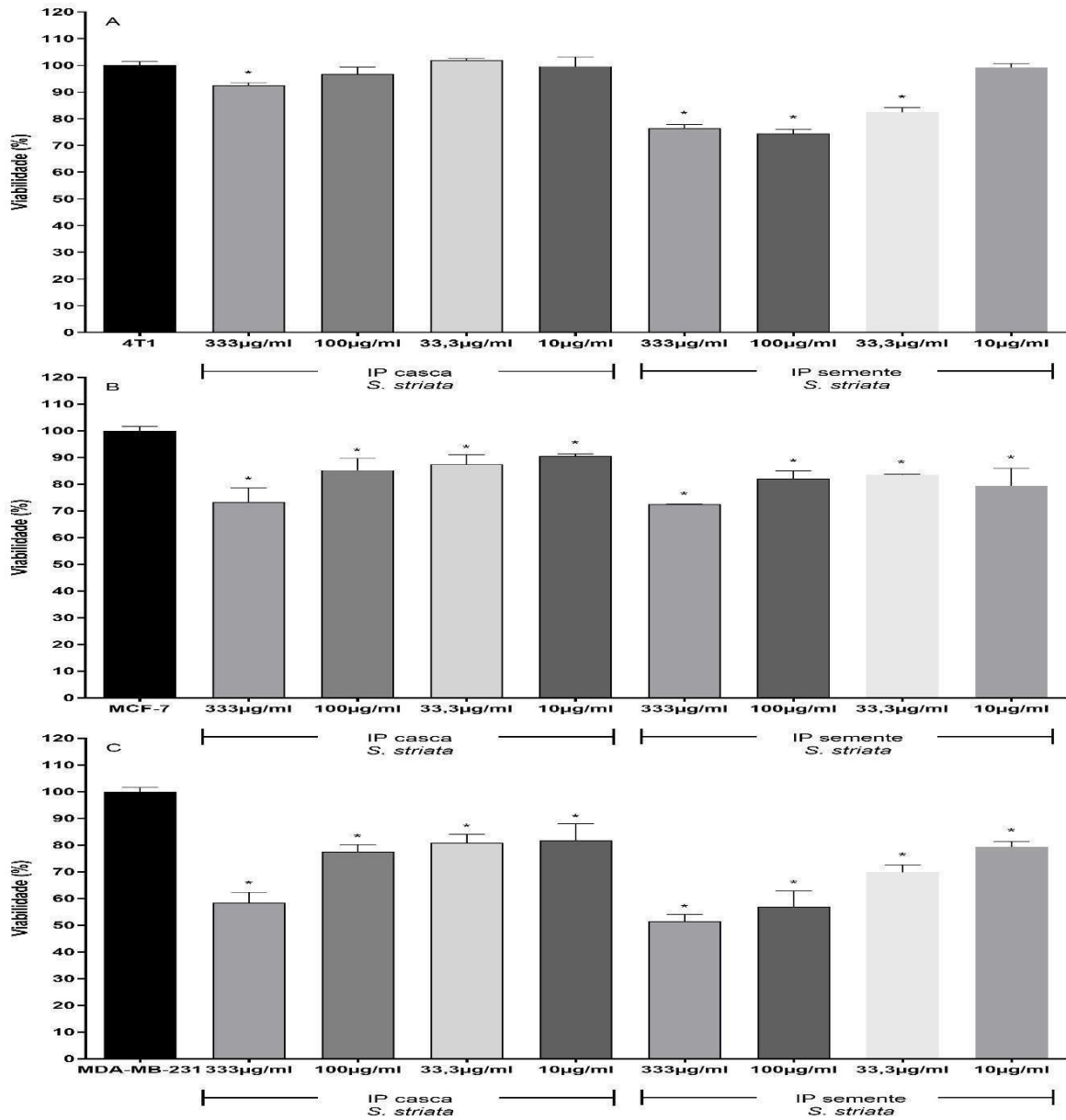


Gráfico de barras observando a redução da viabilidade celular nas concentrações de 333, 100, 33,3 e 10 µg/mL de inibidores de proteases da semente e casca por 48h, das linhagens, (A) 4T1, (B) MCF-7 e (C) MDA-MB-231. \* = p<0,05 quando comparado às células não tratadas.

**Gráfico 2: Viabilidade das linhagens celulares após 48hs com EA**

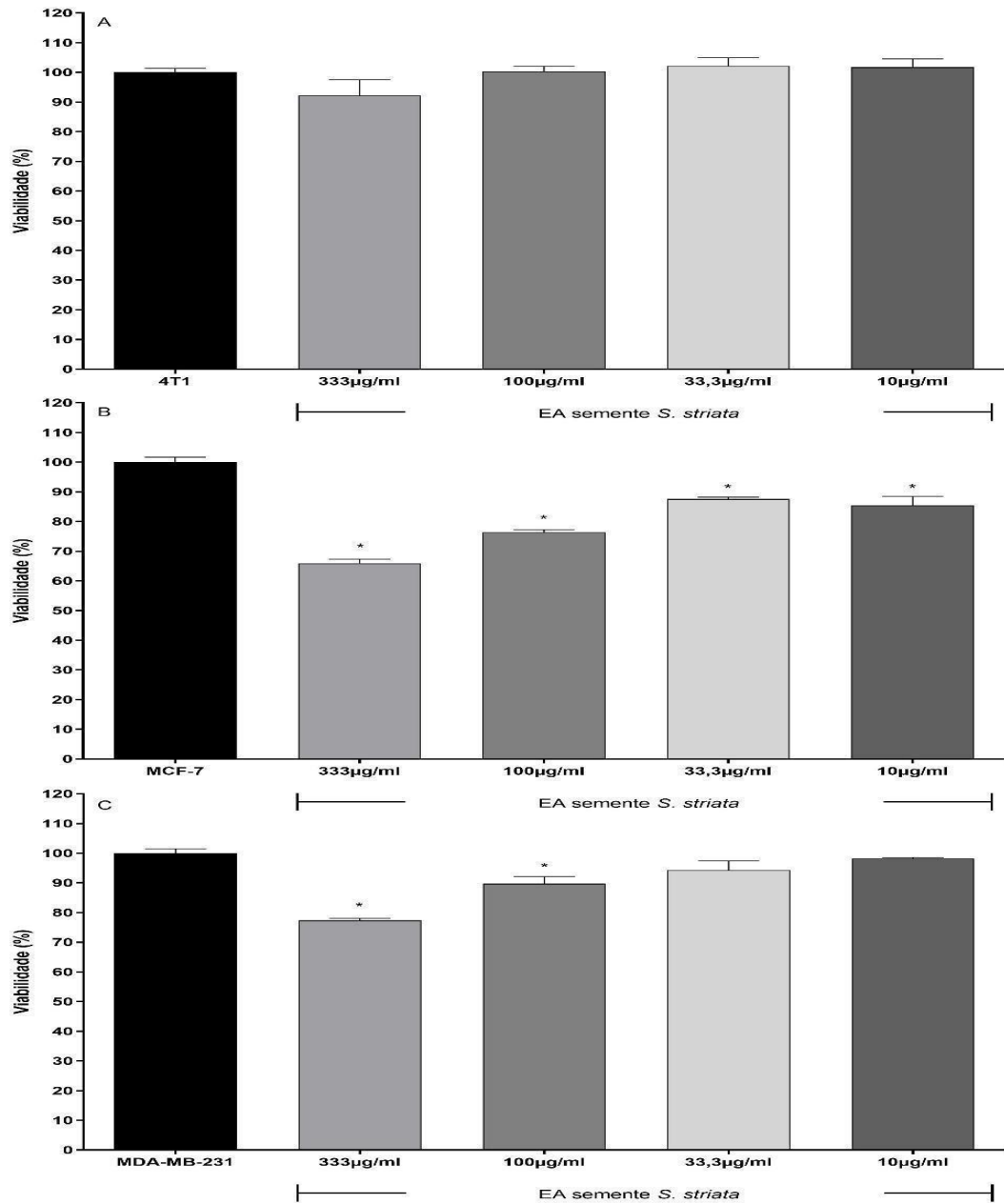


Gráfico de barras observando a redução da viabilidade celular nas concentrações de 333, 100, 33,3 e 10 µg/mL de extrato aquoso da semente por 48h, das linhagens, (A) 4T1, (B) MCF-7 e (C) MDA-MB-231. \* =  $p < 0,05$  quando comparado às células não tratadas.

Esses modelos humanos são preditivos de câncer mais prevalentes e metastáticos, considerados altamente invasivos *in vitro* (MARTIN, 2015; BARROSO, 2021; SANTOS 2017, KATADE et al., 2006; MOGBOJURI et al., 2016). Entre os compostos, os inibidores de proteases foram os mais efetivos, sendo os inibidores de semente os que se destacaram.

A semente é onde as proteínas capazes de inibir a tripsina concentram-se mais no Reino Plantae, especificamente nas sementes não germinadas, onde desempenham uma função de defesa contra pragas (XAVIER-FILHO & VENTURA, 1988). Rocha (2021) aponta citotoxicidade frente diferentes linhagens tumorais, em vários sítios de ação que as plantas podem apresentar em dosagens diferentes e da falta de conhecimento científico robusto a respeito do composto vegetal, apoiamos a continuação da investigação da perspectiva antitumoral de plantas que em dosagens e sítios de ação diferentes podem reduzir ou estimular combinações de fármacos.

Moura (2019) indica resultados do ensaio de toxicidade com o gênero *Sterculia* que corroboram com nossos resultados através de reduções significativas em inflamações. Outros estudos de toxicidade realizados com extratos em altas concentrações de outras plantas do gênero *Sterculia* como a sementes da *Sterculia guttata*, em que o extrato etanólico exibiram 100% de letalidade em um período de 24 horas de exposição a uma concentração de 500 ppm. Conseqüentemente, seu uso tem sido utilizado para possíveis tratamentos farmacológicos como para o uso como larvicidas e controle ambiental de mosquitos e outras pragas (KATADE et al., 2006; MOGBOJURI et al., 2016).



## Resultados *in vivo*

### 5.2 Resultados dos grupos experimentais

Outro conceito fundamental do uso dos linfonodos, e da massa tumoral e baços está associado a proliferação de células de defesa. Assim, considerando que o câncer de mama é uma das neoplasias mais agressivas com altas taxas de mortalidade, um dos intuitos deste trabalho foi avaliar o aumento ou diminuição de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), inflamatórias (IL-12) e o aumento de IFN- $\gamma$  e TNF (responde contra o tumor) através do ensaio ELISA feitos dos macerados do linfonodo e na massa tumoral em modelo de adenocarcinoma mamário (GONÇALVES, 2019 e SALVADOR, 2014).

Todos os animais inoculados com células 4T1 desenvolveram tumor na glândula mamária. Após 28 dias do transplante das células, os tumores foram retirados, pesados, comparados e fotografados. A cada dois dias o volume tumoral dos grupos foram pesados com um paquímetro e registrado de acordo com a figura 7. O aumento expressivo da massa tumoral no 28º dia torna-se cada vez maior de acordo com o crescimento de células 4T1 nos camundongos transplantados. Este estudo demonstrou similaridade quanto aos achados descritos na literatura considerando a concentração de células inoculadas, demonstrando consistência com o modelo tumoral proposto (ZHANG, L. *et al.*, 2016; ZHANG, Y. *et al.*, 2012; LOU, Y. *et al.*, 2011; HU, G. *et al.*, 2015; Ito, K. *et al.*, 2011).

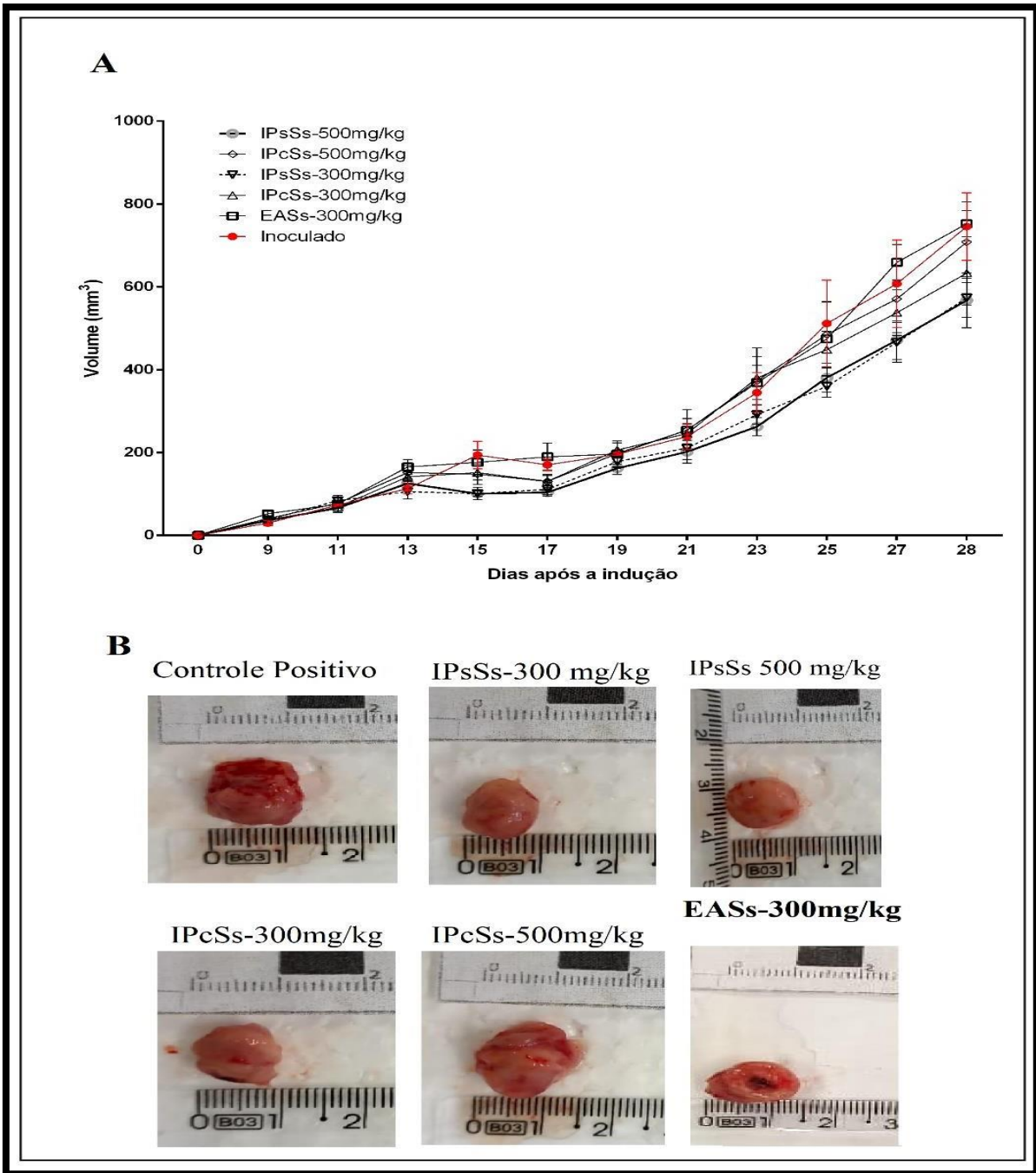
Os tumores cresceram com um padrão similar entre os grupos analisados até o 11º dia, quando os comparados aos estudos de Cabral (2022) e Gonçalves (2019) apresentaram tumores com, aproximadamente, 260 mm<sup>3</sup>. Já neste estudo atingiram 260 mm<sup>3</sup> no 21º dia, ofertando mais tempo de tratamento com o tumor com menor tamanho. No 15º dia, dos estudos de Cabral (2022) e Gonçalves (2019) os tumores de mama do grupo atingiram, aproximadamente, 520 mm<sup>3</sup> (Figura 9), praticamente o dobro do volume tumoral sequencialmente crescendo a partir dos dias. Ao confrontar com este estudo, após 22 dias de inoculação houve este crescimento repentino.

A análise do gráfico indica um padrão similar entre os grupos, variando de 580 mm<sup>3</sup> a 790 mm<sup>3</sup>. Sendo um resultado que aponta que existe a tendência em reduzir para alguns

grupos. Foi observada leve diminuição no volume dos tumores (Figura 9) dos animais tratados com 500 mg/kg e 300mg/kg de semente de *Sterculia striata* em relação a todos os grupos estudados. Além disso, foi observado no volume tumoral dos animais tratados somente com 300 mg/kg do extrato aquoso, nas duas concentrações testadas de IPsSs que houve um aumento em comparação com o grupo de EASs.

No contexto do carcinoma, a forma natural tem sido estudada para garantir diferentes métodos de tratamento, seja pré ou pós a intervenção do descobrimento do tumor em mulheres. Essa área de estudo tem sido desenvolvida com base no papel chave para respostas imunes específicas e na coordenação dos mecanismos imunes antitumorais. A esperança de usar inibidores de proteases e extratos demonstra ser uma forma promissora de acordo com Silva (2018).

**Figura 9: Comparação do volume tumoral**



(A) Gráfico em barra representando o volume tumoral dos grupos de camundongos BALB/c com 8 semanas de idade com 25 dias de indução de células de adenocarcinoma. (B) Fotos representativas do tumor retirado de camundongos da linhagem BALB/c pertencentes aos grupos controle positivo, IPsSs-300mg/kg, IpsSs 500 mg/kg, IPcSs-300mg/kg, IPcSs-500mg/kg e EASs-300mg/kg.

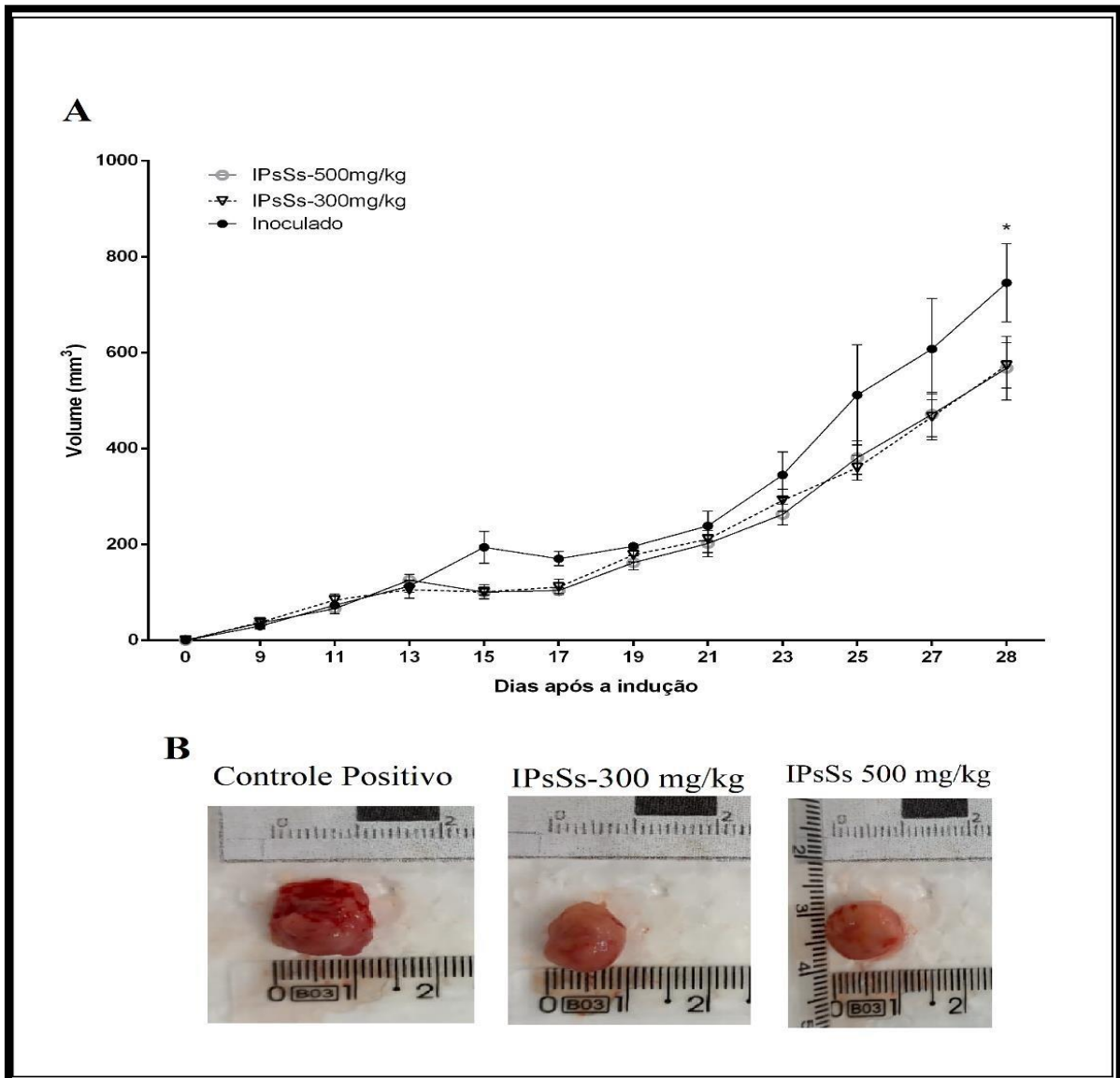
### 5.3 Diferenças no tratamento com IPs

Nas análises realizadas de adenocarcinoma mamário, houve Diferença significativa no tratamento com IPs, tanto para 300mg/kg quanto para 500mg/kg, no último dia, quando observados a figura 10 que indica as comparações e diferenças entre os grupos. Os resultados estatísticos mostraram em comparação com o grupo controle, grupo tratado com casca e extrato aquoso, uma redução significativa quando comparados após 18 dias de tratamento.

Sendo essa redução, um dos aspectos significativos encontrados neste estudo, o que fortalece as propostas fitoterápicas existentes nesta planta. Sequencialmente entra em cordo com a investigação de Costa (2010) que relaciona o interesse pela determinação do conteúdo de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante da *S. striata*, que foi reforçado pela presença de substâncias flavonoídicas e alcaloídicas relatadas em outras espécies do gênero *Sterculia* e pela inexistência na literatura de estudo semelhante sobre a espécie ligadas a atividades antitumorais e antioxidantes (SILVA 2001 e SILVA 2018).

De acordo com Carvalho (2014), o resultado do estudo dos ácidos graxos da *Sterculia striata* reforça o relatado na literatura sobre a presença de compostos com grupos ciclopropênicos em óleos de sementes de plantas da família Sterculiaceae. Assim, não se recomenda a ingestão das amêndoas de *Sterculia striata*, e o óleo só será próprio para fins comestíveis, se tais ácidos forem eliminados. Tais substâncias presentes na semente merecem ser investigadas e comparadas para compreender melhor seu papel biológico na planta.

**Figura 10. Volume e comparação de tamanhos da massa tumoral.**

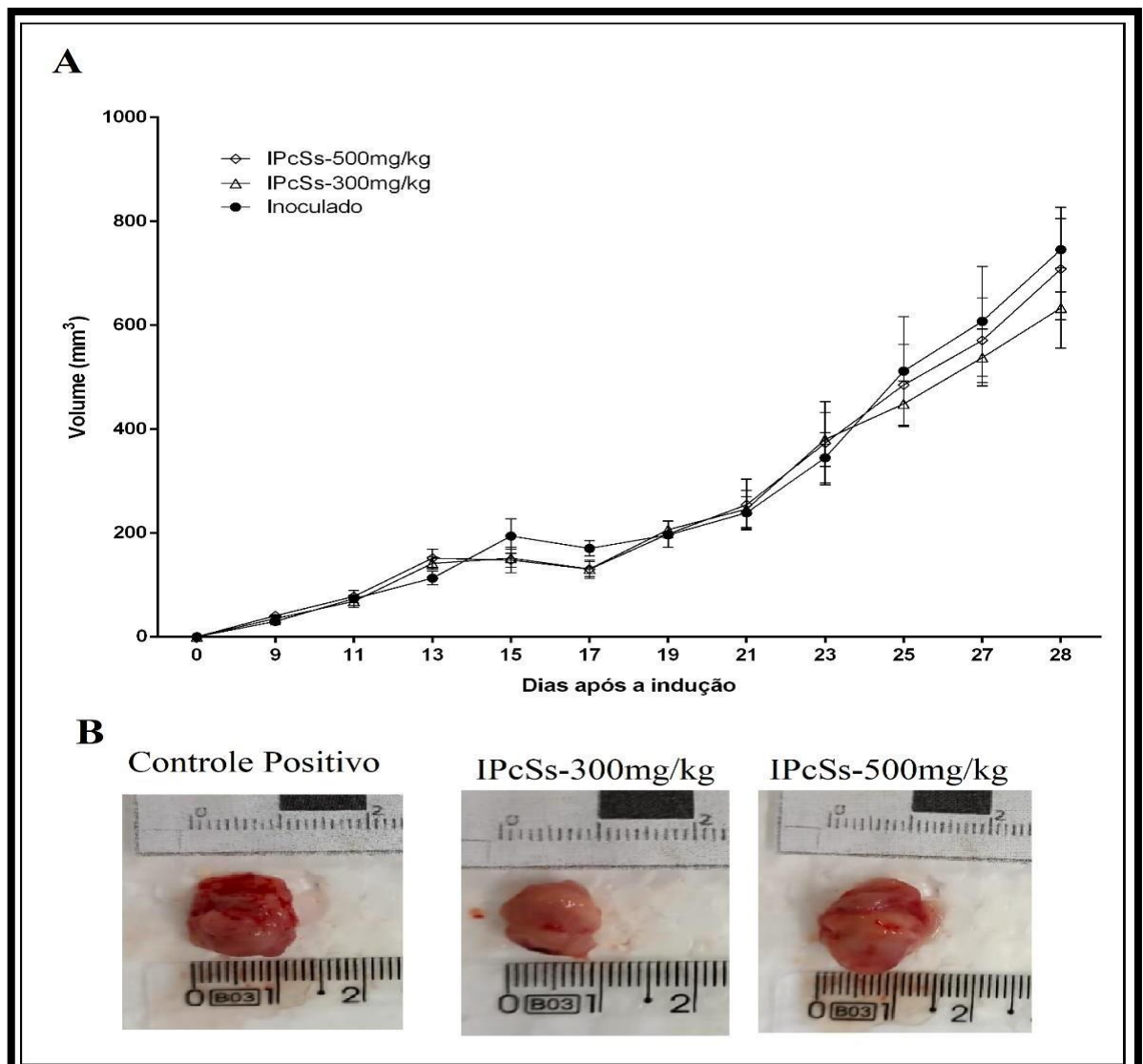


(A) Gráfico representando o volume tumoral dos grupos com IP 300mg/kg e 500mg/kg da semente da *Sterculia striata*, comparados ao controle positivo. (B) Fotos representativas do tamanho (cm) da massa tumoral dos grupos controle positivo comparados ao grupo IPsSs 500 mg/kg e IPsSs 300mg/kg.

#### 5.4 Volume e comparação de tamanhos da massa tumoral

Em comparação ao grupo inoculado (controle positivo) o tratamento com IPcSs 300mg/kg não obteve redução significativa de acordo a figura 11 em relação ao grupo IPcSs-500mg/kg observa-se uma tendência em reduzir.

**Figura 11. Volume e comparação de tamanhos da massa tumoral para o grupo IPcSs-300 e 500 mg/kg**



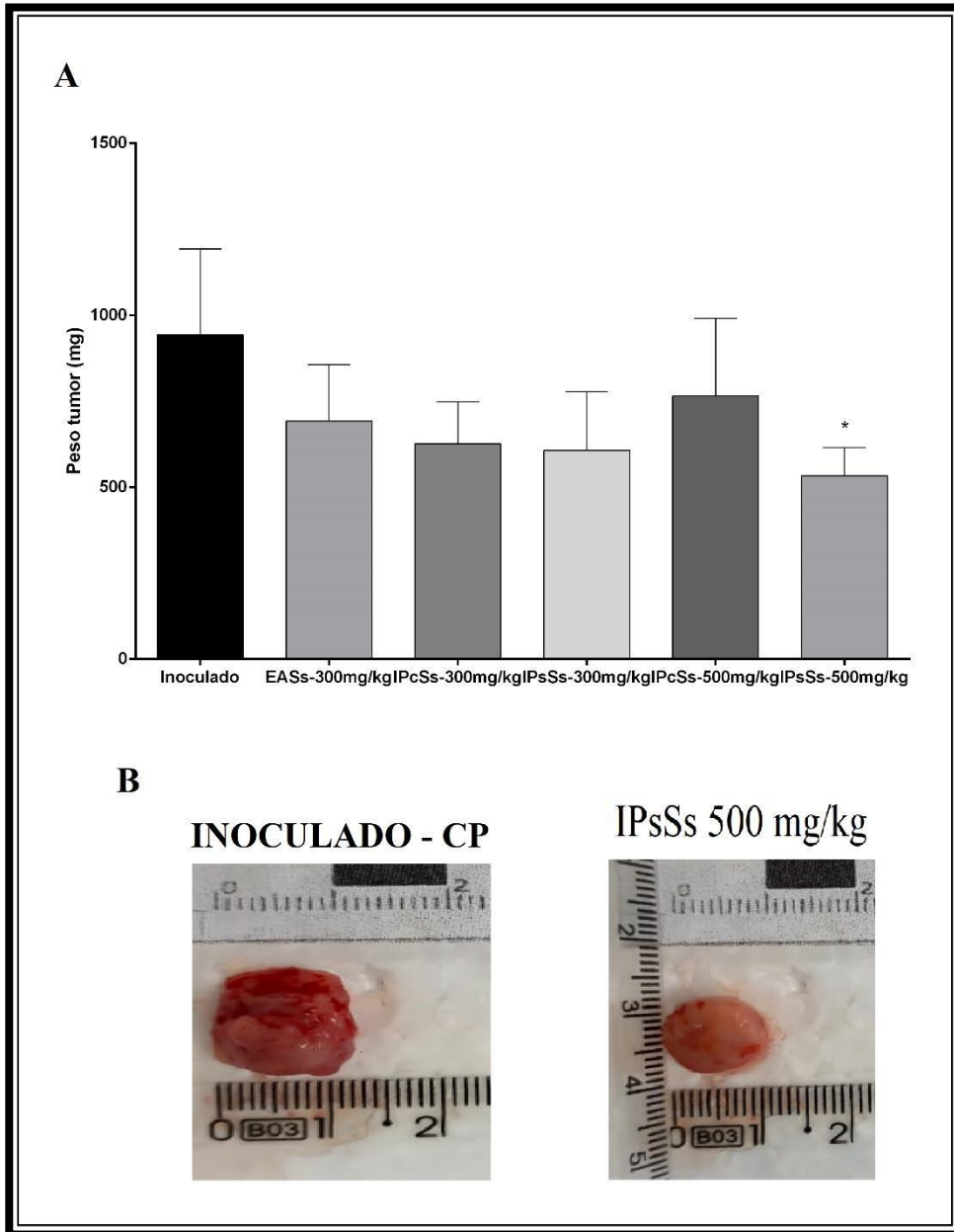
Fonte: Tadeu Braga, 2020. (A) Gráfico representando o volume tumoral dos grupos com IPcSs-300mg/kg e 500mg/kg da casca da *Sterculia striata*, comparados ao controle positivo. (B) Fotos representativas do tamanho (cm) da massa tumoral dos grupos controle positivo comparados ao grupo IPcSs 500 mg/kg e IPcSs 300mg/kg.

### **5.5 Massa tumoral após 18 dias de tratamento.**

Na análise estatística dos dados, observou-se que não tinham distribuição normal entre o valor calculado a partir do comprimento e largura do tumor. Conforme verificado pela figura 12, foi observado que houve diferenças significativas entre o grupo controle e IPcSs- 500mg/kg.

Sendo assim, foi verificada a diferença estatística expressiva da massa tumoral após 18 dias de tratamentos. Alteração estatisticamente significativa entre os pesos de cada grupo. A partir da análise dos dados, observamos a maior diferença estatística (\*) presente no grupo IPcSs-500mg/kg de aproximadamente 50% de redução do peso do tumor em comparação com o grupo de controle positivo (inoculado).

**Figura 12. Comparação com grupo de menor redução tumoral após 18 dias de tratamento.**



Fonte: Tadeu Braga, 2020. (A) Gráfico em barra representando o peso dos tumores de camundongos BALB/c com 8 semanas de idade com 25 dias de indução (B) Comparação do tamanho do tumor formado pelo crescimento de células de adenocarcinoma 4T1 em camundongos da linhagem BALB/c pertencentes aos grupos controle positivo e tratamentos retirados no dia da eutanásia.



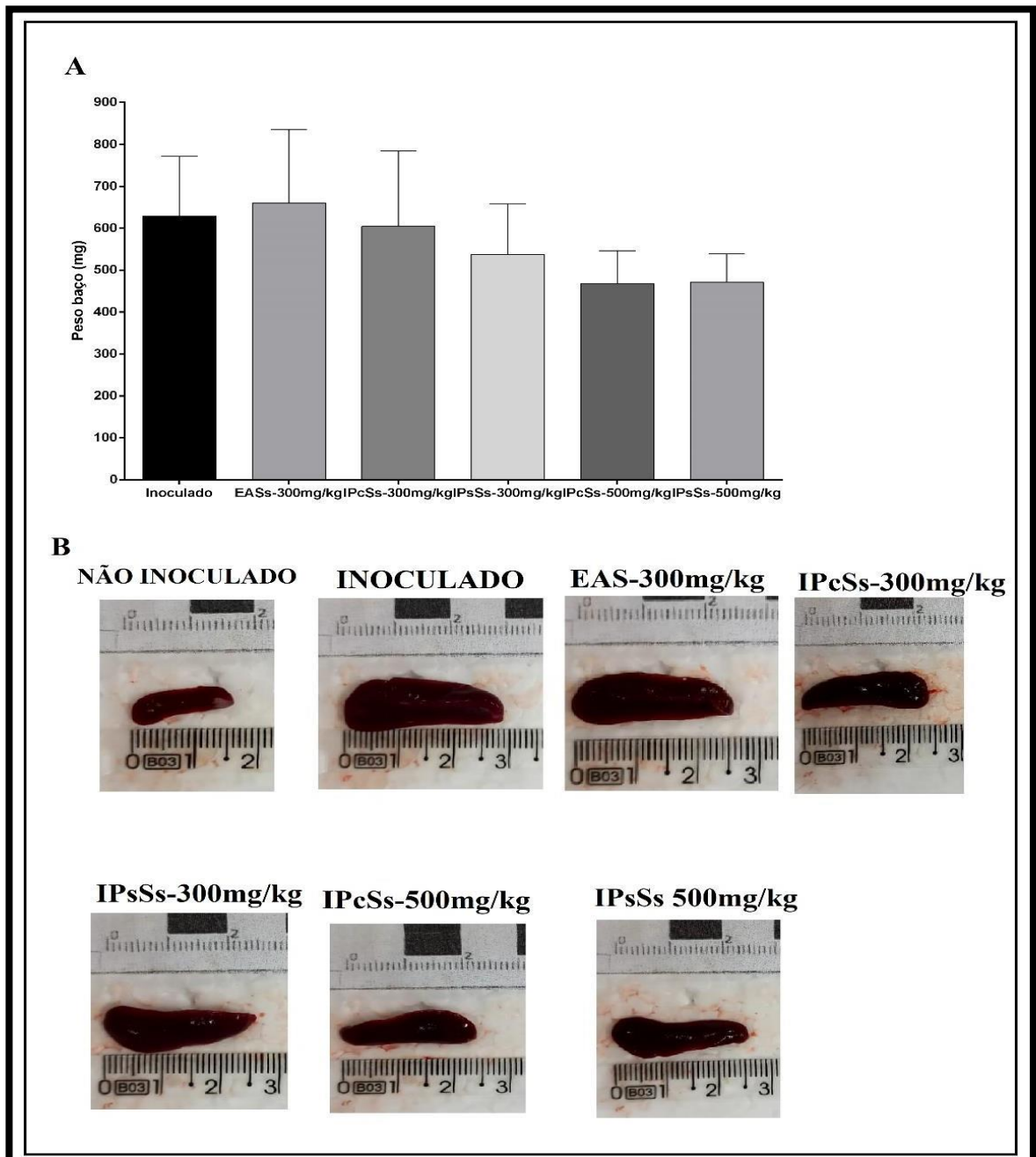
## 5.6 Tamanho do Baço induzido por células 4T1 após 18 dias de tratamento

O baço foi extraído, a presença de alterações visuais foi verificada e o seu tamanho foi medido por régua.

Ao comparar o peso do baço foi observou-se diferença estatística após 18 dias de tratamentos. Alteração ocorre em uma leve redução entre os pesos de cada grupo. A partir da análise dos dados, observamos a maior diferença estatística presentes entre os grupos IPss-500mg/kg e IPcSs 500mg/kg do peso do baço em comparação com o grupo de controle positivo (inoculado). Tornou-se evidente que o aumento da área do baço está intimamente associado a expansão da massa tumoral Figura 13.

Em média, o peso esplênico dobra de tamanho em camundongos com tumores implantados e este aumento reflete a carga tumoral total no animal (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019). Examinando este estudo observa-se pela figura 11 que o baço apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo de controle negativo.

**Figura 13. Tamanho do baço após 25 dias de indução de células 4T1**



Fonte: Tadeu Braga, 2020. (A) Gráfico em barra representando o peso dos baços de grupos camundongos BALB/c com 8 semanas de idade com 25 dias de indução de células de adenocarcinoma. (B) Fotos representativas do baço de camundongos da linhagem BALB/c pertencentes aos grupos controle negativo, C. positivo IPsSs-300mg/kg, IpsSs 500 mg/kg, IPcSs-300mg/kg, IPcSs-500mg/kg e EASs-300mg/kg. (C) Gráfico em barra representando o tamanho dos baços, em centímetro medidos por régua dos grupos de camundongos controle negativo, Controle positivo IPsSs-300mg/kg, IpsSs 500 mg/kg, IPcSs-300mg/kg, IPcSs-500mg/kg e EASs-300mg/kg.

## 5.7 Pesos dos pulmões entre os grupos analisados

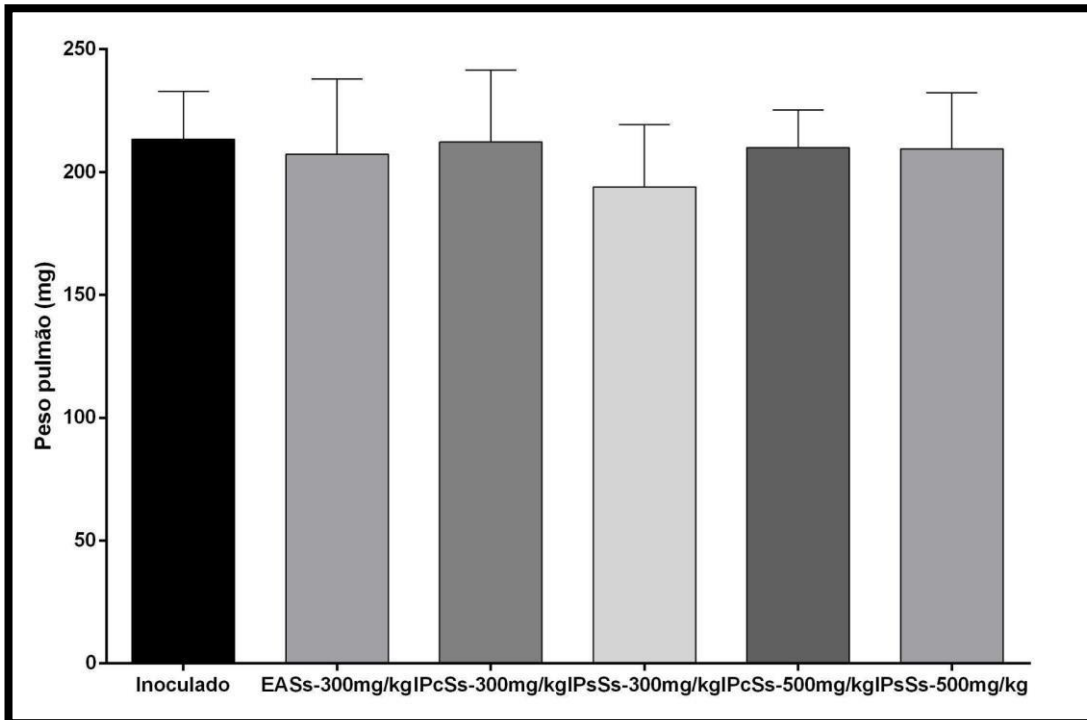
Os pesos dos pulmões permaneceram com um padrão similar entre os grupos analisados. Foi observando uma tendência em reduzir, mas não foi significativa no grupo IPsSs-300mg/kg quando comparado ao grupo controle positivo (inoculado) Figura 14. Na colonização metastática, acredita-se que exista um padrão órgão-específico. Devido à localização anatômica pulmonar, o órgão tende a ser local de colonização por células de carcinoma mamário, o que impacta diretamente na sobrevida global das pacientes, representando um mal prognóstico (VIEIRA, 2012 IN PUT SLEEMAN, 2012; TANG; AHMAD; SARKAR, 2012) .

Kim e colaboradores, em 2011, observaram aumento de nódulos tumorais no pulmão de animais que receberam células 4T1, além de maior volume e peso do tumor desses animais, e menor sobrevida, ratificando nossos resultados.

De acordo com Vieira (2021) as metástases pulmonares são uma das causas de mortalidade em pacientes com câncer de mama. A comparação dos pesos e observação histológica dos pulmões são focos de investigação por apresentarem vasos e sistemas próximos, ligados as glândulas mamarias. O peso dos pulmões em comparação demonstra quenão houve diminuição ou alteração significativa com os inibidores de proteases ou o extrato aquoso.

**Figura 14. Peso do Pulmão em comparação com diferentes grupos**

(A)



Fonte: Tadeu Braga, 2020. (A) Gráfico em barra, representando o peso dos pulmões de grupos camundongos BALB/c com 8 semanas de idade com 25 dias de indução de células de adenocarcinoma 4T1.

## 5.8 Avaliação do peso corporal

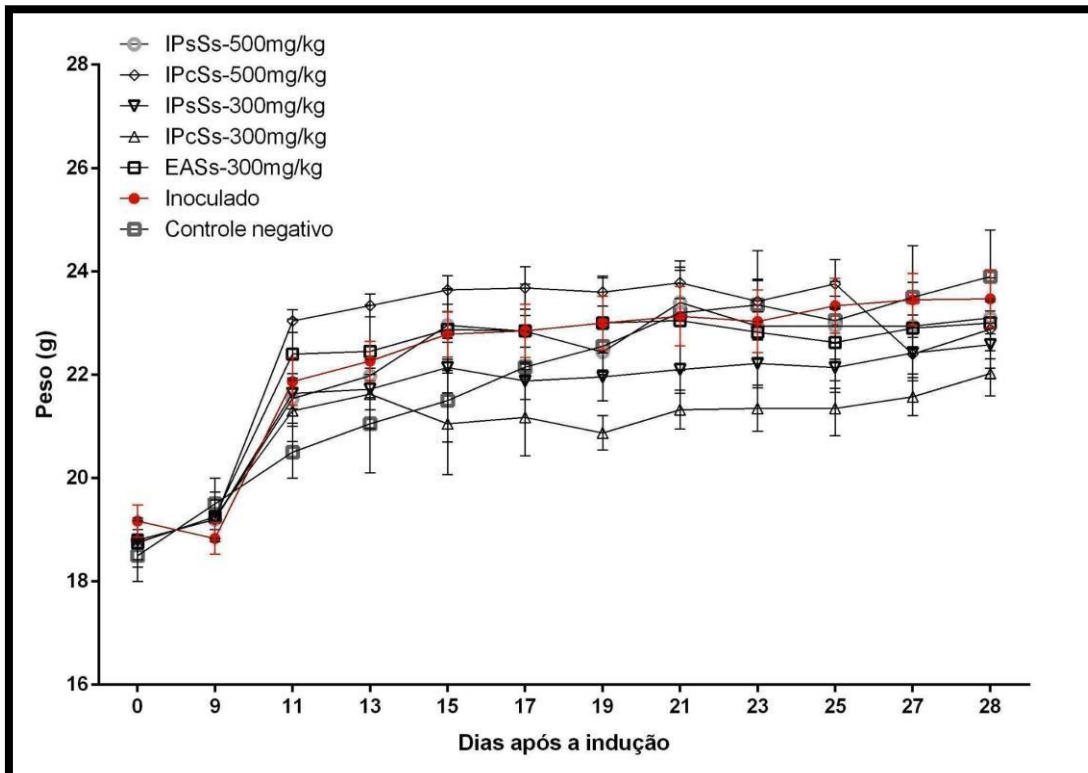
Na Figura 15 está representada a variação de peso corporal a cada dois dias dos camundongos tratados com casca e semente da planta *Sterculia striata*. Pode-se notar que nos grupos de tratamentos, ficaram abaixo do controle positivo. Entretanto, não houve diferença estatística expressiva entre os tratamentos. No entanto, a partir décima administração pode-se observar que ocorre perda do peso corporal, entre os dias 25 e 27 observa-se uma queda de 2 gramas para o grupo IPcSs-500mg/kg.

O ganho de peso nesses grupos pode ser resultante do natural crescimento dos animais acrescido do notável aumento do volume tumoral, visto que nesses grupos (Inoculado e EA Ss 300mg/kg), os tumores apresentavam diâmetros bem maiores em relação aos demais.

Para essa espécie de camundongo o peso corporal manteve um padrão esperado, quando comparado a estudos como de Salvador (2014), sequencialmente mantendo o crescimento natural da espécie, com uma leve influência ligada ao crescimento tumoral. De acordo com os grupos de controle negativo presentes nas pesquisas dos autores que compartilham essa ideia em 2010, Olson e colaboradores caracterizaram os camundongos BALB/c como animais resistentes a obesidade por apresentarem um pequeno ganho de peso corporal ao serem alimentados. Nossos resultados não demonstram ganho de peso corporal significativo nos animais, comparados aos controles. O aumento da massa por alimentação pode influenciar e acelerar o processo do desenvolvimento do tumor, (Kim et al 2011; Zhao et al 2013 e Salvador 2014). Porém neste estudo a gavagem foi feita com inibidores de proteases e extrato aquoso, o que não alterou de forma significativa de acordo com o gráfico da figura 15 o crescimento da massa corporal dos camundongos.

Portanto, o tempo escolhido entre a inoculação das células 4T1 e o início do tratamento com os inibidores de proteases e extrato aquoso associadas à fitoterapia foi de 28 dias de indução e 18 de tratamentos. Os pesos dos animais de uma forma geral apresentaram leves tendências com algumas alterações, indicando pouca influência nos pesos pelo tratamento.

**Figura 15: Peso corporal avaliados a cada dois dias.**

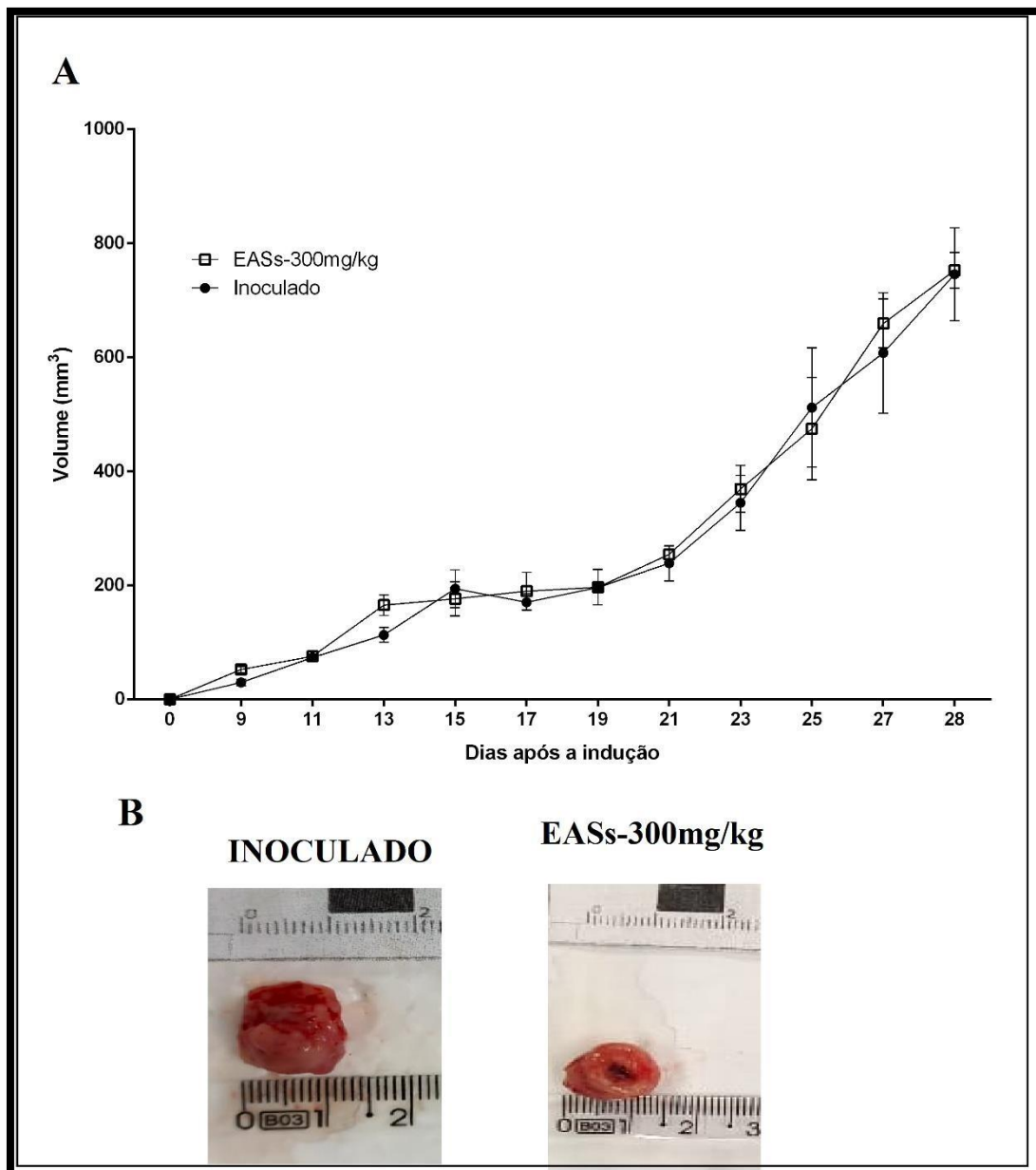


Fonte: Tadeu Braga, 2020. (A) Gráfico em barra, representando o peso corporal avaliados a cada dois dias de grupos camundongos BALB/c com 8 semanas de idade com 25 dias de indução de células de adenocarcinoma 4T1.

### 5. 9 Tratamento com Extrato Aquoso Inoculado com 4T1

Durante o período analisado não foi observada mudança estatisticamente significativa no grupo tratado com extrato aquoso comparado ao grupo controle positivo (inoculado). No extrato aquoso observa-se na figura 16 que ainda mantém um padrão similar entre os grupos. O uso deste extrato aquoso quando confrontado ao extrato etanólico avaliado pela EMBRAPA (2018) e Carvalho (2014) propõe que o extrato etanólico dessa espécie apresentou fraca atividade antioxidante, que foi compatível com o baixo teor de fenóis totais, sendo assim um grupo com poucos componentes antioxidantes.

Figura 16. Extrato aquoso em comparação com o grupo inoculado com 4T1



Fonte: Tadeu Braga, 2020. (A) Gráfico em linha representando o volume dos tumores dos camundongos tratados com EASs300mg/kg (B) Fotos representativas dos tumores de camundongos da linhagem BALB/c pertencentes aos grupos inoculados e EASs300mg/kg.

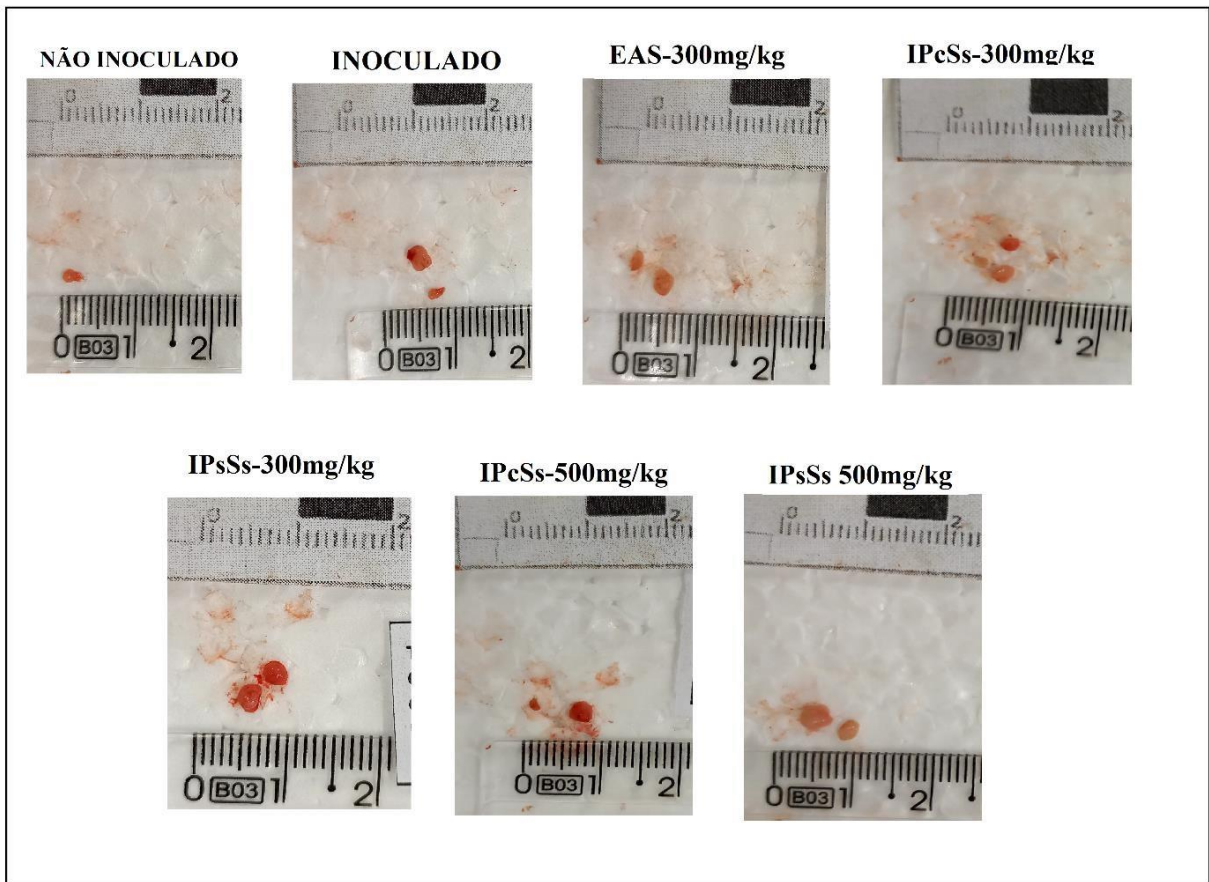
### **5.10 Comparação dos linfonodos nos grupos de tratamento**

O modelo experimental usado neste experimento apresentou um aumento de tamanho dos linfonodos observado na eutanásia e na comparação presente na figura 17. A análise visual dos linfonodos demonstrou que a formação e crescimento do tumor de mama nos animais transplantados possui plena capacidade de influenciar na morfologia aumentando de tamanho devido a sua capacidade de reter células ruins, essa capacidade pode ou não ter células retidas entre outras respostas (DO NASCIMENTO et al, 2014). Esse caso pode ser chamado de linfonodomegalia, ocorre quando os linfonodos crescem excessivamente, outra causa pode ser em decorrência do aumento da produção de linfócitos, uma proliferação das células de defesa (FALCÃO, 2005).

Conforme Gonçalves (2019) o linfonodo inguinal responde de maneira distinta em função da progressão do tumor 4T1 em animais BALB/c. Demonstrando que diferentes mecanismos possivelmente atuam nos locais avaliados, apresentando respostas que ajudam a interpretar a atuação das células tumorais no corpo. Os linfonodos do grupo controle negativo (não inoculado) apresenta um tamanho menor em comparação aos grupos inoculados com 4T1.



**Figura 17. Comparação de linfonodos a diferentes grupos experimentais**

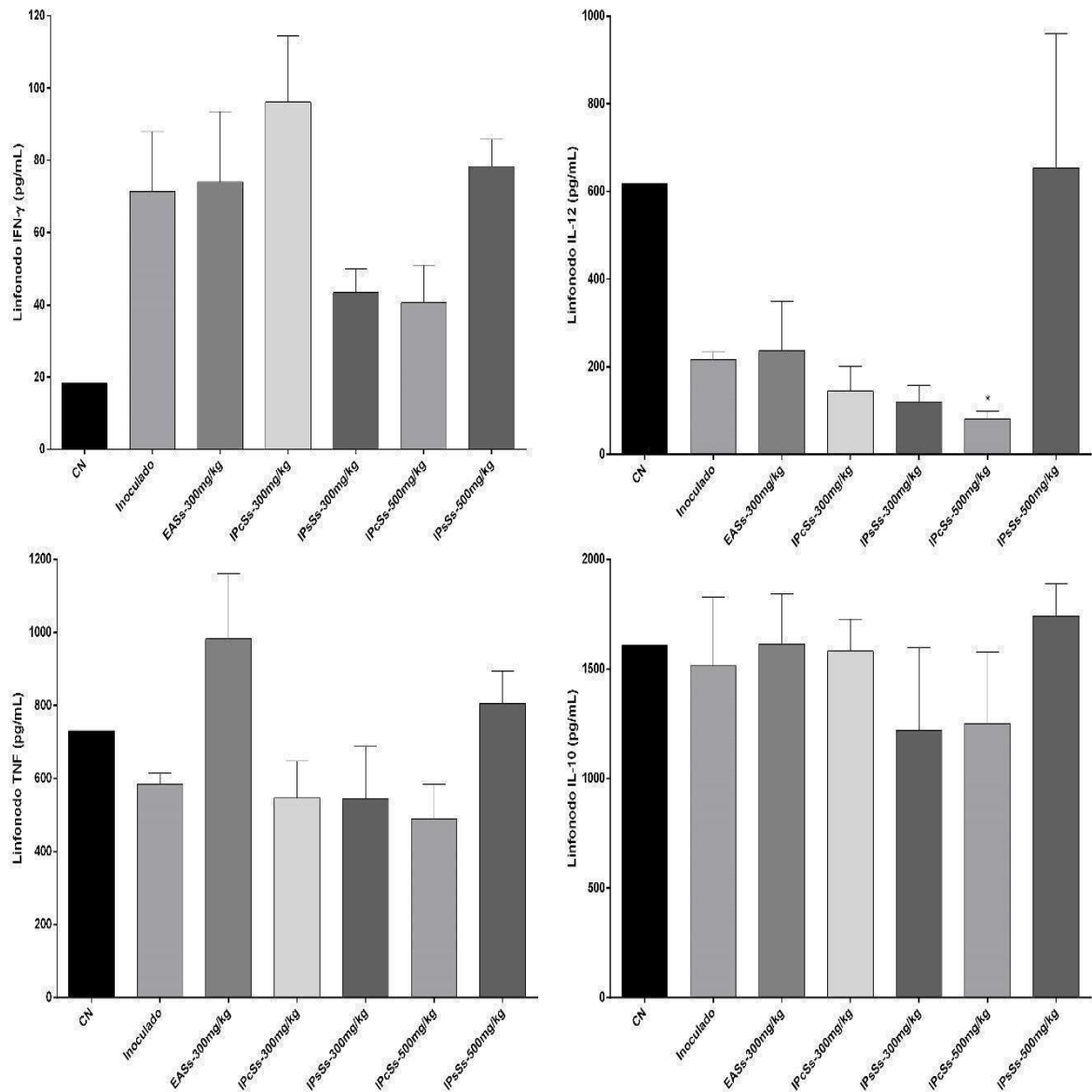


Fonte: Tadeu Braga, 2020. (A)Imagens fotográficas dos linfonodos coletados em centímetros medidos por régua dos grupos de camundongos BALB/c com 8 semanas de idade com 25 dias de indução de células de adenocarcinoma pertencentes aos grupos controle negativo, C. positivo (inoculado), IPcSs-300mg/kg, IpsSs 500 mg/kg, IPcSs-300mg/kg, IPcSs-500mg/kg e EASs-300mg/kg.

### **5.11 Nível de citocinas IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12 (p-70)**

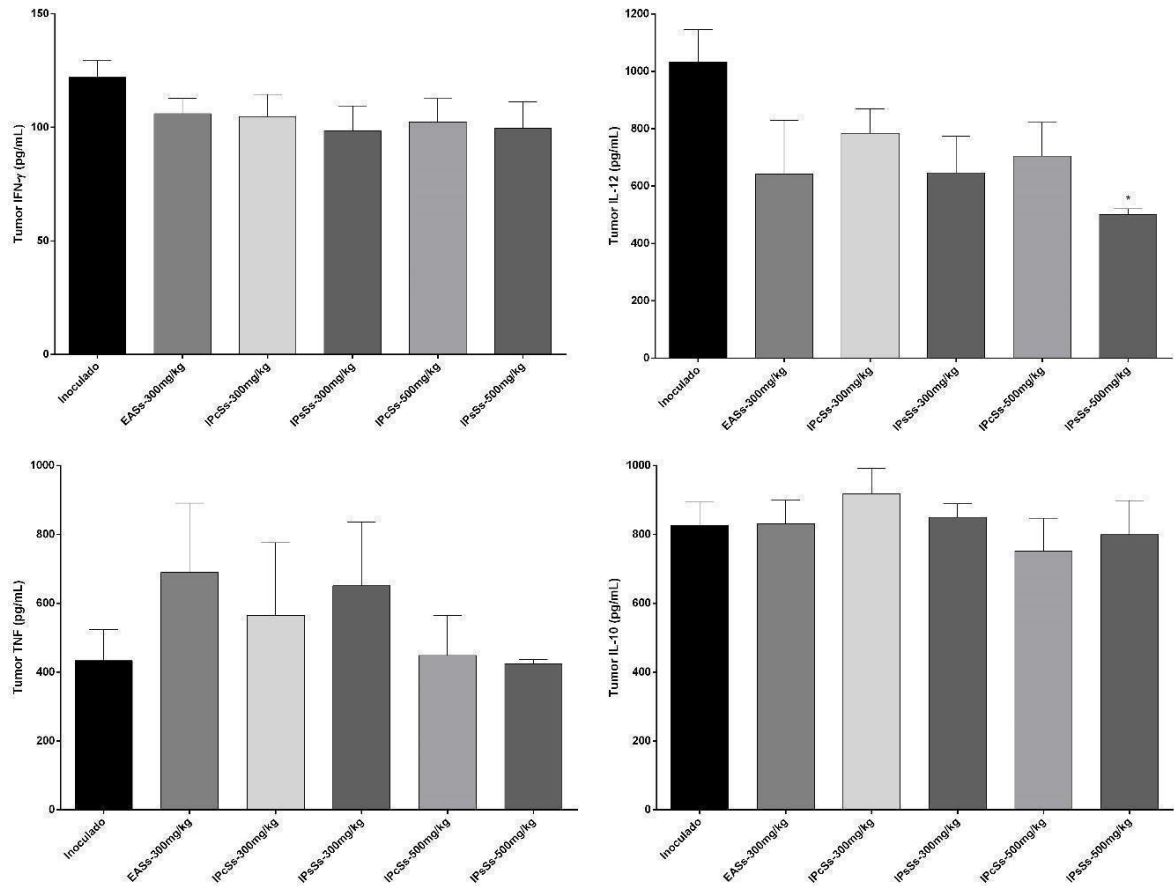
Ao analisar o gráfico de barras na figura 18, observa-se uma produção diversa nos níveis das citocinas dosadas no linfonodo, sendo que no tratamento com IPcSs foi possível observar a redução na produção de IL-12. Análise semelhante pode ser observada na figura 19, quando se verifica os níveis de citocinas no tecido tumoral. Apesar da produção diversa nos níveis de citocinas, o IPcSs foi capaz de reduzir a produção de IL-12.

**Figura 18. Níveis de citocinas no sobrenadante do macerado dos linfonodos**



Gráficos de barras de linfonodos de camundongos com diferentes dosagens e tratados ou não-tratados, com 300 mg/kg de e 500 mg/kg extrato aquoso e inibidores de proteases da *Sterculia striata* após 18<sup>o</sup> dias de tratamento. Comparação aos grupos de tratamento e controles medidos em pg/mL com média aritmética \* indica  $p < 0,05$  dos macerados de linfonodos dos grupos de camundongos BALB/c com 8 semanas de idade com 25 dias de indução de células de adenocarcinoma pertencentes aos grupos controle negativo, C. positivo (inoculado), IPcSs-300mg/kg, IpsSs 500 mg/kg, IPcSs-300mg/kg, IPcSs-500mg/kg e EASs-300mg/kg.

**Figura 19. Níveis de citocinas no sobrenadante do macerado dos tumores decamundongos**



Imagens de gráficos de barras em Diferentes dosagens e tratados ou não-tratados, com 300 mg/kg de e 500 mg/kg extrato aquoso e inibidores de proteases da *Sterculia striata* após 18<sup>o</sup> dias de tratamento. Comparação aos grupos de tratamento e controles medidos em pg/mL com média aritmética \* indica  $p < 0,05$  dos macerados de tumores dos grupos de camundongos BALB/c com 8 semanas de idade com 25 dias de indução de células de adenocarcinoma pertencentes aos grupos controle negativo, C. positivo (inoculado), IPcSs-300mg/kg, IpsSs 500 mg/kg, IPcSs-300mg/kg, IPcSs-500mg/kg e EASs-300mg/kg.

Confrontando os resultados deste estudo com Hagemann (2006), a produção de altas quantidades da citocina IL-12 e baixas quantidades de IL-10, pode contribuir para o controle do desenvolvimento tumoral. Segundo MARTINS (2013) no câncer de mama, algumas citocinas estimulam (IL-1, IL-6 e IL-11) enquanto outras inibem (IL-12, IL-18, IFNs) a proliferação e/ou invasão pelas células malignas.

O tratamento TNF- $\alpha$  tem sido demonstrado como um dos principais mediadores inflamatórios e é capaz de alterar a expressão de fatores de crescimento e outras citocinas através de diversas vias de transdução de sinais (SEMESIUK et al., 2013). Outros autores indicam que a principal atividade biológica do TNF é uma acentuada citólise e citoestase em diferentes linhagens neoplásicas, tendo ação antitumoral importantíssima. É o principal mediador na caquexia das neoplasias malignas (MACKAY et al e TARTAGLIA et al 1993).

Existem grupos de células que podem ser capazes de inibir ou serem programados para uma ação antitumoral. Um grupo de células com efeitos antitumorais são os macrófagos, na resposta antitumoral inata do tipo M1, são capazes de inibir a disseminação das células tumorais através da produção de enzimas lisossômicas, de espécies reativas de oxigênio, de óxido nítrico e da citocina fator de necrose tumoral (TNF), que em conjunto levam à morte da célula tumoral (OBEID, et al., 2013).

### **5.13 Histopatologia do tumor**

Características básicas para este tipo de experimento como necroses, células binucleadas, inflamações, divisões celulares foram observadas (figura 20), sendo resultados sem reduções ou sem alterações significativas na histologia.

De acordo com Carneiro (2013) células do tumor variam sua forma de acordo com o período do ciclo desordenado, pois apresentou diferentes formas com condições ambientais padrão para este modelo, sugerindo assim um pleomorfismo moderado com áreas de infiltração de células inflamatórias no tecido.

Relatórios anteriores mostraram que as células tumorais 4T1 exibem um padrão de desenvolvimento tumoral em vários estágios com hiperplasia atípica em algumas regiões, ou seja, produção de células em tecidos e órgãos, fazendo-os aumentar de volume, corroborando com nossos achados. O tumor de mama 4T1 é um modelo murino que compartilha semelhanças com o câncer de mama humano metastático, representando assim um bom modelo para avaliar a eficácia de drogas anticancerígenas. (CABRAL, 2022; CARNEIRO et al., 2013).

As características histopatológicas dos diferentes grupos de tratamento são apresentadas na Figura 20. Os tumores do grupo controle apresentaram pleomorfismo peculiar e foram caracterizados com pouca diferença entre eles. Além disso, em camundongos não tratados com IP da semente e casca, observamos edema inflamatório, bem como a presença de fragmentos nucleares observados na maioria dos grupos, que podem estar relacionados à morte de células tumorais, células binucleadas ou poli nucleadas observadas. Esses resultados corroboram com o crescimento tumoral observada em camundongos tratados em outro estudo (CARNEIRO et al., 2013).

A rede ductal na mama humana e na glândula mamária de camundongos é composta por duas camadas essenciais de células: células epiteliais luminais (LE) e células mioepiteliais (MECs) uma vez que os tumores se encontravam em estágio avançado, diferenciando essas regiões apresentando perda de adesão intercelular, ocasionada pela necrose tecidual, uma das características básicas deste procedimento. (CABRAL, 2022)

A análise do microambiente e das interações tumor-hospedeiro no comportamento das células tumorais é essencial durante a busca de um novo tratamento antitumoral e os modelos murinos singênicos, como o modelo 4T1 utilizado neste estudo, têm a vantagem importante de permitir o desempenho de análises em animais com função imune (TAO et al., 2008).

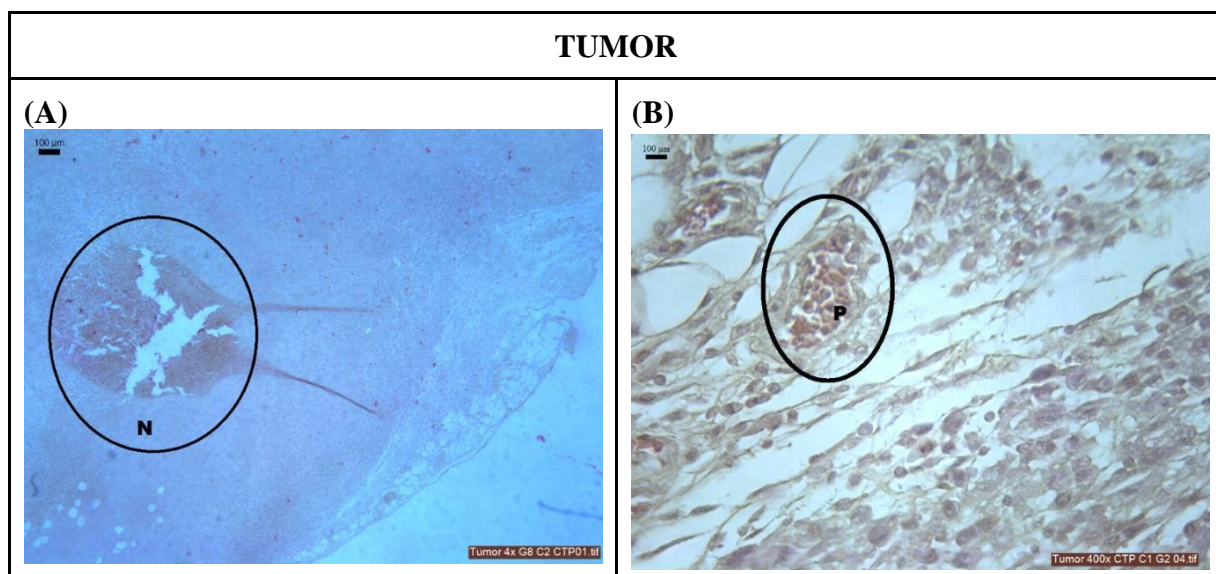
Em sua maioria, os tecidos observados, não mostraram áreas com massa tumoral bem definida. Porém, foi evidenciado que a exposição de células 4T1 começou a invadir diferentes áreas do corpo como a pele e seus anexos próximos as glândulas mamárias. Células

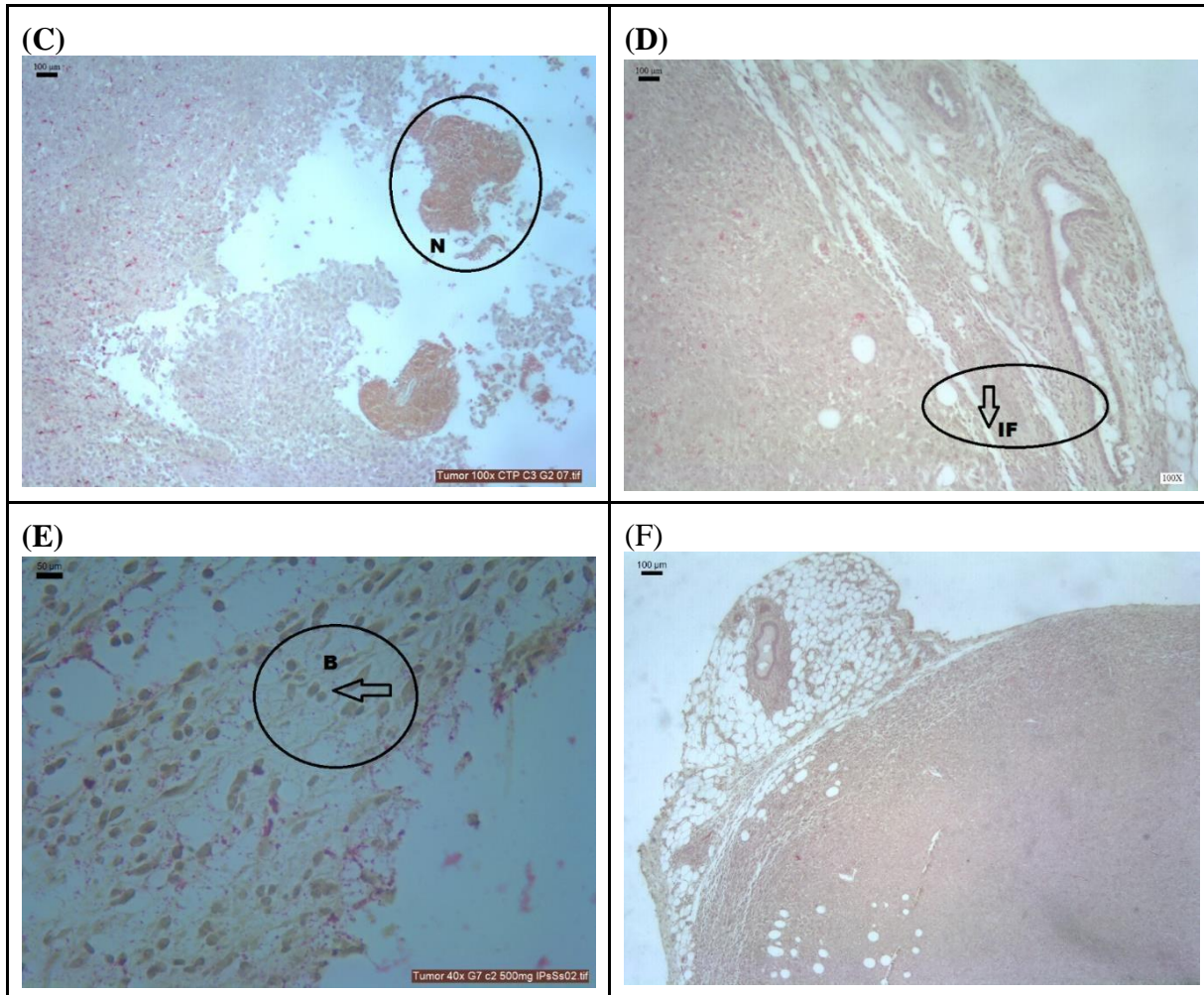
pleomórficas (P) no grupo CTP vistas a 40x, 100µm (Figura 20; B) foram observadas por se tratar de uma variação de forma e tamanho das células e seus núcleos (CAMBRUZZI, 2020).

Possíveis metástases podem ser vistas no pulmão das lâminas histológicas (Figura 20) observadas neste experimento de acordo com os estudos de PIRANLIOGLU e seus colaboradores (2019), o pulmão pode apresentar metástases consistente com a hipótese de “semente e solo” de Paget, o termo “nicho pré-metastático” foi recentemente introduzido para descrever o microambiente permissivo induzido por tumor, “solo” em órgãos distantes (BUBNOV et al 2017; URSINI-SIEGEL et al 2016; OUZOUNOVA et al 2017).

Consequentemente, algumas células tumorais, “semeiam” com sucesso, preparam os órgãos-alvo para criar um local metastático, “solo” antes da disseminação metastática (PEINADO et al 2017). De acordo com o conceito, a infiltração de um subconjunto granulocítico de células supressoras derivadas de mieloide que é um tecido que produz essas células (gMDSC) nos pulmões cria e esses nichos pré-metastáticos em camundongos portadores de tumor 4T1(Ouzounova et al 2017). Nesse modelo, as gMDSCs não apenas suprimem a imunidade antitumoral, mas também promovem o fenótipo epitelial das células-tronco cancerígenas (CSC), que de fato demonstraram ser proliferativas (LIU et al, 2014).

**Figura 20. Cortes histológicos (H/E) do Tumor**





Imagens correspondentes as análises feitas nos cortes de histopatologia em tumores e pulmões extraídos de camundongos inoculados com células 4T1 do grupo controle e tratados. Após a extração, os tumores e pulmões foram processados, incluídos em parafina histológica (H/E) e seccionados a 5 micrômetros para a produção de lâminas histológicas. Os tecidos foram então corados com Hematoxilina e Eosina alcoólica (H/E) e analisados à microscopia de luz (4X, 10x e 40x). Foram mensuradas as áreas contendo células diferenciadas. A: Onde (A) corresponde ao tumor do controle positivo, área 100µm vista 4X onde N (área de necrose); (B) Células pleomórficas **P** no tumor do grupo CTP, (C) Grupo CTP indicado por N (área de necrose) no corte histológico. (D) corte indicando inflamações (**IF**) na camada epitelial do tumor. (E) Células binucleadas (F) Tumor

Possíveis anomalias no núcleo celular como as células binucleadas, inflamações, necroses e atividade mitótica intensa foram encontrados de acordo com o a tabela 1 e figura 20. Assim indicam alterações comuns de serem encontradas neste tipo de experimento. Também foram observados por serem células neoplásicas volumosas, pleomórficas, contendo algumas vezes espaçadas umas das outras (BORATTO, 2016).

**Tabela 1. Principais observações encontradas nas lâminas de tumor**

Grupos	NECROSES	INFLAMAÇÕES	Células Binucleadas
I - Grupo CTN	Não	Não	Não
II - Grupo CTP	100%	100%	100%
III - Grupo EASs 300mg/kg	50%	-	-
IV - Grupo IPcSs 300 mg/kg	50%	-	100%
V - Grupo IPsSs 300mg/kg	-	-	-
VI. Grupo IPcSs 500 mg/kg	-	50%	-
VII. Grupo IPsSs 500mg/kg	-	-	50%

Tabela indicando lâminas investigadas do tumor, quantificando as principais observações encontradas nos cortes histopatológicos analisados no microscópio de luz em laboratório.

Outra característica marcante nestes cortes histológicos analisados foi a presença de padrão uniformes, com núcleo central e redondo e com relação núcleo- citoplasmático aumentada. nos tecidos, Cabral (2022) confirmam espaços bem definidos formados pelo rearranjo das células, característico de tumores de mama invasivos, ou seja, pontos que se assemelham à uma aparência fenestrada, lembrando um crivo ou peneira(Figuras 20).



Também notou a presença de pigmentos de hemossiderina, que corresponde a degradação de hemoglobina em regiões teciduais onde há pouco oxigênio (hipóxia), observado nas zonas mais internas dos tumores, onde a vascularização torna-se mais restrita (CABRAL,2022). Como esperado para este procedimento, algumas regiões podem ser observadas como as apoptosis e necroses. De acordo com MARTIN (2015) os experimentos que relacionam nossas observações, revelam que apoptosis não é o único mecanismo que regula a morte celular.

A necrose também pode ocorrer, e esta tem sido descrita tradicionalmente como uma morte passiva, atualmente sabe-se que parte dessa morte pode ocorrer através de um mecanismo conhecido como necroptose ou necrose programada. A necroptose pode ser ativada pelos mesmos ligantes do apoptose, como o TNF- $\alpha$ , onde neste experimento observou-se sua presença através do ensaio ELISA (Figura 19) Entretanto, a via ativada é através da RIP1 (*Receptor interacting protein 1*) que é considerada a molécula chave na necroptose. A RIP1 é então ativada e se associa com a RIP3 formando o complexo necroptótico IIB, induzindo a necroptose. Sabe-se da existência de um inibidor da formação do complexo IIB conhecido como Nec-1 (Necrostatina-1), entretanto, pouco se sabe sobre qual via será ativada através dos receptores da morte (CHRISTOFFERSON; YUAN, 2010; GALLUZZI; KROEMER; VILLEJUIF, 2008).

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados encontrados podem mostrar que os tratamentos com maiores concentrações dos inibidores de proteases, principalmente os retirados da semente, apresentaram melhor redução da viabilidade celular, peso e volume tumoral, sugerindo uma melhor atividade. No entanto, maiores estudos são necessários para confirmar a via de ação destes compostos e sua eficácia no tratamento do câncer.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Editora Ltda, 7<sup>o</sup> ed., Rio de Janeiro, 2012

ACCAMARGO.org.br/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/mama – **Informações sobre o câncer de mama – Hospital AC Camargo**, disponível em <https://www.accamargo.org.br/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/mama>, Acesso em 23 de Novembro de 2022

ALIMENTOS regionais brasileiros / Ministério da Saúde, **Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica**. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015. 484 p. : il. ISBN 978-85-334-2145-5

ANDERSON, B.O., **The Lancet Oncology**. et al. The Global Breast Cancer Initiative: a strategic collaboration to strengthen health care for non-communicable diseases [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00071-1), , n. 22, v.5, p. 578-581, 2021.

ARAÚJO, J.; CORDEIRO, N. L.; ATHANAZIO, D. A. **Terapia de reposição hormonal e o câncer do endométrio**. Cad. Saúde. Pública. São Paulo. v.23, n.11, p.167-177, 2007.

ASSESSORIA de imprensa, Guilherme Silva <https://atanews.com.br/noticia/49440/avanco-contra-o-cancer-de-mama>

BÁFICA, André B143m **Mecanismos inatos de regulação da il - 12** durante a infecção por mycobacterium tuberculosis [manuscrito] 90 f. : il. ; 30 cm, André Báfica. - 2006.

BAZZONI, Flávia; BEUTLER, Bruce. . **New England Journal of Medicine** As famílias de ligantes e receptores do fator de necrose tumoral, v. 334, n. 26, pág. 1717-1725, 1996.

BIER, O., SILVA, W.D.da & MOTA, I. **Imunologia Básica e Aplicada**. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 388p 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015.

BRAY F, FERLAY J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: **GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. **CA Cancer J Clin**. Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018. Erratum in: **CA Cancer J Clin**. 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593, Sep 12, 2018.

BINGHAM CO. **The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation**. **J Reum**;29 supl 65:3-9, 2002.

BREASTCANCER.org/about-you/concerned-about-risk. Desenho esquemático demonstrando o desenvolvimento dos carcinomas mamários ductal e lobular invasivos. (Adaptado de www.breastcancer.org).

BRUNO, A. *et al.* **Orchestration of angiogenesis by immune cells**. *Frontiers in oncology*, v. 4, p. 131, 2014.

BARARDI, Celia Regina Monte; CAROBREZ, Sonia Gonçalves; PINTO, Aguinaldo Roberto. **Imunologia**. UFSC, CCB, 2010.

BARROSO, Poliana Ribeiro. **Miconia ferruginata DC. (Melastomataceae): estudo biomonitorado para triagem biológica de extratos e frações com atividade anticâncer**. 2021. 167 p. Tese (Doutorado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2021.

BORATTO, Fernanda Alves. B726i **Investigação da atividade antitumoral de lipossomas pHsensíveis de circulação prolongada contendo doxorrubicina em modelo animal experimental** / Fernanda Alves Boratto. – UFMG -. 96 f. : il, 2016.

BUBNOV, R., Polivka, J. Jr., Zubor, P., Konieczka, K. & Golubnitschaja, O. **“Nichos pré-metastáticos” no câncer de mama: eles são criados por ou antes do início do tumor?** Relevância da “Síndrome de Flammer” para abordar a questão. *EPMA J.* **8**, 141–157 (2017).

CABRAL, Ágata Silva. **"Avaliação da ação de nanoemulsões vinculadas à terapia fotodinâmica em modelo de câncer de mama metastático murino 4T1."** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto (2022).

CAMBRUZZI, E., Cruz, R. P., Gava, V. G., & Pêgas, K. L.. (2020). Undifferentiated high-grade pleomorphic sarcoma of the larynx treated with partial laryngectomy. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, *86*(Braz. j. otorhinolaryngol., 86 suppl 1, 2020).

CÁMPANO, M.T.A *et al.* **Trypsin inhibitors in xoconostle seeds (*Opuntia joconostle* Weber.)** *Rev. Assoc. Med. Bras.* *Journal of Plant Bio chemistry and Biotechnology*, July 2013, Volume 22, Issue 3, pp 261–268 Câncer no Brasil: presente e futuro. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302004000100001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302004000100001&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 20 de maio de 2021, São Paulo, v. 50, n. 1, pág. 1, 2004.

CARNEIRO, M.L.B., Peixoto, R.C., Joanitti, G.A. *et al.* **Efeito antitumoral e toxicidade de nanopartículas de citrato de ródio livre (II) e de magremito carregado de ródio (II) em camundongos portadores de câncer de mama.** *J Nanobiotechnol* **11**, 4 <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-4>(2013).

CARLI, Alessandra de Paula. **Efeito do ácido jasmônico na síntese de lipoxigenase e de inibidores de proteases em sementes de explantes de soja.** 1999. 42f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1999.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. "Espécies arbóreas brasileiras." Vol. 4 EMBRAPA (2014).

CHAVES, Mariana H. et al. **Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. et Naud.** Química Nova [online]. [Acessado 7 Junho 2021] , pp. 404-408. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300008>>. Epub 13 Jul 2004. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300008>. v. 27, n. 3 2004.

COLARES.L.F. **Detecção de inibidores de proteases em cinco espécies vegetais nos vales do jequitinhonha e mucuri.** 2016.

COSTA, Danielly Albuquerque et al. **Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin.** Acta Amazonica [online].[Acessado 3 Janeiro 2023], pp. 207-212. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000100026>>. Epub 06 Maio 2010. ISSN 1809-4392. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000100026>, v. 40, n. 1, 2010.

CORREA,K.C.S. **Caracterização funcional de uma Cisteíno Catepsina recombinante da formiga cortadeira *Atta Sexdens***- repositório.ufscar.br- 2018.

COSTA, Dirceu Brazilian Association for Research and Graduate Studies in Physical Therapy (ABRAPG-Ft). **Fisioterapia e Pesquisa** [online], v. 21, n. 3 [Acessado 24 Março 2022] , pp. 199. Disponível em: <<https://doi.org/10.590/1809-2950/00021032014>>. ISSN 1809-2950. <https://doi.org/10.590/1809-2950/00021032014>,2014.

CHRISTOFFERSON, D. E.; YUAN, J. **Necroptosis as an alternative form of programmed cell death.** Current Opinion in Cell Biology, p. 263–268, 2010.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. **Das plantas medicinais aos fitofármacos.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DEVITA, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology Review. Reino Unido: Lippincott Williams & Wilkins.2009

DEXTER, D.L. et al. **Heterogeneity of Tumor Cells from a Single Mouse Mammary Tumor.** Cancer Research. v.38. p3174-3181..Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014). 1978.

DO NASCIMENTO, EDILAINE SUDRE MARCELINO. **Cinética de migração de células do sistema imune após desafio com células de adenocarcinoma mamário 4T1.** Diss. Universidade Paulista, 2014.

DUARTE, T.P; ANDRADE, A. N. **Enfrentando a mastectomia:** análise dos relatos de mulheres mastectomizadas sobre questões ligadas à sexualidade. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413294X2003000100017&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413294X2003000100017&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 01 de Jun. 2016.2006.

EMBRAPA Meio-Norte. 14/09/2018 , **Chichá (*Sterculia striata* St. Hil et Naud): uma nova opção para os mercados nacional e internacional de nozes.** Folder/Folheto/Cartilha, EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte (Teresina, PI). Teresina, Plantas e Produtos de Origem Vegetal, Embrapa Meio-Norte (CPAMN), 2018.

FADLI, M.E.L. et al. **Breast cancer metastasis to the spleen: a case report and literature review.** v.12. 2017.

FAURE H, Fayol V, Galabert C, Grolier P, Le Moël G, Steghens JP, Van Kappel A, Nabet F. **Les caroténoïdes: I. Métabolisme et physiologie** [Carotenoids: 1. Metabolism and physiology]. *Ann Biol Clin (Paris)*. Mar-Apr;57(2):169-83. French. PMID: 10210743.1999.

FALCÃO, Roberto P. **“O Paciente com Linfonodomegalia” e “Proliferação monoclonal B CD5+ subclínica.”** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 27, e livro Capítulo 10 : 267-271.(2005).

FONSECA,R.S. **Coleções botânicas com enfoque em herbário. UFV.** Viçosa, n. 29. Disponível em:<https://www2.cead.ufv.br/serieconhecimento/wp-content/uploads/2015/11/colecoes-botanicas-1.pdf>. Acesso em 16 junho de 2021, 1984.

FORMIGA, A. E. M. **Isolamento e caracterização estrutural de flavonoides de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (MALVACEAE) e avaliação do efeito antiinflamatório e antitumoral,** 2016. 91 f Dissertação (Programa Pós-graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2016.

FORTE, W.N. **Imunologia Básica e Aplicada.** Porto Alegre: Artmed,358p, 2004.

FREITAS, J.R. et al., **Conhecimento e prática do autoexame de mama.** *Rev Assoc Med Bras.* v.52, n. 5, p.337-341, 2006.

GALLUZZI, L.; KROEMER, G.; VILLEJUIF, F.-. **Previews Necroptosis : A Specialized Pathway of Programmed Necrosis.** *Cell*, p. 2007–2009, 2008

GARLET, Tanea Maria Bisognin.

GONÇALVES Angela **Fisioterapia no câncer de mama / coordenação Marx, Patrícia Vieira Guedes Figueira.** -- Barueri, SP : Manole, 2017.

GONCALVES, Igor Visconte. **"Avaliação espaço-temporal de subpopulações de linfócitos B em modelo de câncer de mama murino."**UFMG – MINAS GERAIS (2019).

GUARNEIRE, Gracimério José. **Diversidade e uso de plantas medicinais da APA Alto do Mucuri, MG. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.** Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiente e Sociedade. Teófilo Otoni - MG,91p, 2018.

GOULART, S.; MORITZ, M.I.G.; LANG, K.L.; LIZ, R.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE,T.S.. **Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy.** *Journal of Ethnopharmacology*, Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.*v. 113, p. 346-353, 2007.

HAGEMANN, T. et al. **Ovarian Cancer Polarize Macrophages toward a Tumor- Associated Phenotype.** *J. Immunol.*, Baltimore, v. 176, n. 8, p. 5023-5032, Apr. 2006.

INCA Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. **O câncer e seus fatores de risco: o que a educação pode evitar.** 2º edição; Rio de Janeiro, 2013.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2020.**

KANDASWAMI C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. **The antitumor activities of flavonoids.** In Vivo. Erratum in: In Vivo;21(3):553. Kanadaswami, Chithan [corrected to Kandaswami, Chithan]. Erratum in: In Vivo. 2007 Nov-Dec;21(6):1172. PMID: 16097445. May-Jun,2007.Sep-Oct;19(5):895-909. 2005.

KATADE, Sushama R. et al. **Sterculia guttata seeds extractives-an effective mosquito larvicide.** *Indian J Exp Biol*, V.44, n. 8, p. 662 – 5, 2006.

KIM, E. J.; Choi, M. R.; Park, H.; Kim, M.; Hong, J. E.; Lee, J.Y.; Chun, H.S.; Lee, K.W.; Yoon Park, J.H. **Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice.** *Breast Cancer Research*, 11; 13(4):R78.2011.

KHACHIK F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB. **Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health.** *Exp Biol Med*. 227(10):845-51.2002.

KONG, Y. et al. **Facil e purification and characterization of recombinant human anti thrombin III from transgenic goat Milk.** *Jornal of chemical technology and biotechnology* 16 kong, June 2011.

KYANI, S. et al. Inhibitory effect of Bowman-Birk protease inhibitor on autophagy in MDAMB231 breast cancer cell line, **Journal of cancer research and therapeutics**, doi:10.4103/jcrt.JCRT\_622\_18, n. 17, v.2, p. 504-509, 2021.

LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. **Structure and function of the immune system in the spleen.** *Sci Immunol*, 4, n. 33, Mar 1 2019.

LIRA, Fernando José Xavier De. "Uso do meio Roswell Park memorial Institute (RPMI) como conservante de córneas de camundongos Swiss." 30-30. (2012).

LIU, S. et al. **As células-tronco do câncer de mama transitam entre os estados epitelial e mesenquimal, refletindo suas contrapartes normais.** *Stem Cell Rep.* 2 , 78–91 (2014).

LYPE, S., AKBAR, M.A., KRISHNA, G. **Isolated splenic metastasis from carcinoma of the breast.** *Postgraduate Medical Journal*. v.78. ed.917. 2002.

MACHADO, LO. "Risco do Aparecimento do Câncer de Mama em Mulheres Menopausadas com Síndrome Metabólica e o Papel da Dieta na Prevenção da Doença." *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento* 1.02 : 67-100.(2017).

MACKAY F, Loester H, Stueber D, Gehr G, Les-slaur W. **Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )-induced cell adhesion to human endotelial cells is under dominant control of one TNF recep-tor type, TNF-R55.** *J Exp Med.*177:1277-1286.1993.

MARQUES, JOÃO PAULO; LOPES, GISELY CRISTINY. **ALCALOIDES COMO AGENTES ANTITUMORAIS: CONSIDERAÇÕES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS.** *REVISTA UNINGÁ REVIEW*, [S.l.], ISSN 2178-2571. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1674>>. Acesso em: 13 maio 2021. v. 24, n. 1, out. 2015.

MANDAL, Manab et al. **Physicochemical and elemental studies of *Hydrocotyle javanica* Thunb.** for standardization as herbal drug. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*,. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.001>. [S. l.], v. 7, n. 11, p. 979–986, 2017.

MARTINS FILHO, Agrinaldo et al. **Correlação de citocinas e óxido nítrico teciduais com fatores prognósticos em pacientes com neoplasias malignas de ovário.** 2013.

MARTIN, Ana Carolina Baptista Moreno. **Eficácia do [10]-gingerol contra metástases de câncer de mama : estudos in vitro e in vivo em camundongos.** Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/7699>. São Carlos : UFSCar, 108 p,2015.

MATSUDA M, Salazar F, Petersson M, et al. **Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression.** *J Exp Med*; 180(6): 2371-6.1994.

MENDONÇA DE ASSIS, Pollyana et al. **Plinia cauliflora (Mart.) Kausel: toxicological assays, biological activities, and elemental analysis of organic compounds.** *Natural Product Research*. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1633642>, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019.

MILLER, F.R., MILLER, B.E., HEPPNER, G.H. **Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability.** *Invasion Metastasis*. v.3. ed.1. p22-31. 1983.

MONTEIRO, S.S; SIANI, A.C. **Exsiccate Conservation in Herbaria: Contribution to the Management and Preservation** *Revista Fitos*. v.4, n.2, p. 24-37. Dez 2009.

MORITZ, Bettina e Tramonte, Vera Lúcia Cardoso. **Biodisponibilidade do licopeno.** *Revista de Nutrição [online]*. 2006, v. 19, n. 2 [Acessado 7 Junho 2021] , pp. 265-273. Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000200013>>. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000200013>.ISSN 1678-9865.Epub 24 Maio 2006.



MOTA, Tathiane Helena Soares, et al. "**Estudo farmacognóstico das folhas da Sterculia Striata St. Hil. Et. Naid., coletadas em Itapuranga-Go1.**" *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos* 7.1 (2014).

MOGBOJURI, Olufunke M.; ADEDAPO, Adeolu A.; ABATAN, Matthew O. **Phytochemical screening, safety evaluation, anti-inflammatory and analgesic studies of the leaf extracts of Sterculia tragacantha.** *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, v. 13, n. 3, p. 221-228, 2016.

MOURA, Brenda Carol de. **Avaliação da toxicidade do óleo da semente da Sterculia striata em embriões de zebrafish.** 2019. Monografia (Graduação em Farmácia) – Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2019.

MURPHY, Kenneth. **Livro de Imunologia** Imunobiologia de Janeway [recurso eletrônico]/ Kenneth Murphy; tradução: Denise C. Machado, Gaby Renard, Lucien Peroni Gualdi; revisão técnica: Denise C. Machado. - 8. ed. - Dados eletrônicos. - Porto Alegre : Artmed, 2014.

NOGUEIRA, R.C. et al. **Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (Byrsonima intermedia A. Juss.).** *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.10, n.1, p.44-48, 2008.

NGUYEN, T.T., **Natural Product Communications** et al. Triterpenoidal and Phenolic Compounds Isolated from the Aerial Parts of Helicteres hirsuta and their Cytotoxicity on Several Cancer Cell Lines, doi:10.1177/1934578X1901400103, n. 14, v. 1, 2019.

OLIVEIRA CB, Comunello LN, Maciel ES, et al. **The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from Baccharis trimera in Siha cells: differences in their activity and mechanism of action.**18(9):11022-11032. Published 2013 Sep 9. doi:10.3390/molecules180911022. *Molecules*. 2013.

OMS - World Health Organization. (2020). **WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all.** World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO 2020.

OLIVEIRA, Caio Marcio Barros et al. **Citocinas e dor.** *Brazilian Journal of Anesthesiology*, v. 61, n. 2, p. 260-265, 2019.

OLSON, L.K.; Tan, Y.; Zhao, Y.; Aupperlee, M.D. **International Journal of Obesity, 34;** Haslam. Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness.:1415-1426, S.Z. 2010

OBEID, E.*et al.* **The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review).** *International journal of oncology*, v. 43, n. 1, p. 5-12, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS **Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines.** A worldwide review. Geneva, 43p., 1998.

OUZOUNOVA, M. et al. **Células supressoras derivadas de mielóides monocíticas e granulocíticas regulam diferencialmente a plasticidade tumoral espaço-temporal durante a cascata metastática.** *Nat. Commun.* **8** , 14979 (2017).

PAUL, W. E. *Fundamental Immunology*. Editora LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 7ª ed, Philadelphia, 2013.

PEINADO, H. et al. **Nichos pré-metastáticos: locais específicos de órgãos para metástases.** *Nat. Rev. Cancer* **17** , 302–317 (2017).

PINHEIRO, Gleyse Karina Lopes de Oliveira et al . **Nature as a source of drugs for ophthalmology.** *Arq.Bras.Oftalmol.* Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27492018000500443&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492018000500443&lng=en&nrm=iso)>. access on 03 May 2021. <https://doi.org/10.5935/0004-2749.20180086>. São Paulo , v. 81, n. 5, p. 443-454, Oct. 2018 .

PIRANLIOGLU, R., Lee, E., Ouzounova, M. *et al.* **A imunidade induzida por tumor primário erradica células tumorais disseminadas em modelo de camundongo singênico.** <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09015-1>. *Nat Commun* **10** , 1430 (2019).

PLANTAS medicinais nativas de uso popular no Rio Grande do Publicado em WHO communications: **the world health organization’s fight against cancer: strategies that prevent, cure and care.** World Health Organization 2007.

PETERS, chreiber .media-stock.adobe, **Tratamento-controlado-do-câncer** acesso <https://cienciahoje.org.br/artigo/tratamento-controlado-do-cancer>, em 24 de outubro de 2022 .

PULASKI, B.A., OSTRAND-ROSENBERG, S. **Mouse 4T1 Breast Tumor Model.** *Current Protocols in Immunology*. v.39. ed.1. 2000.

REN W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. **Flavonoids: promising anticancer agents.** *Med Res Rev.* Jul;23(4):519-34. doi: 10.1002/med.10033. PMID: 12710022.2003.

REMCO van Horssen, Timo LM ten Hagen, Alexander MM Eggermont, **TNF- $\alpha$  in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility,** *The Oncologist* , Volume 11, Issue 4, Pages 397–408, <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-4-397>, April 2006.

ROBBINS **patologia básica.**/ Vinay Kumar... [ et al] Tradução de Cláudia Coana... et al- Rio de Janeiro: Elsevier,918 p. 2013.

ROBISON, J.E; PERREARD, L.; BERNARD, P.S. **State of the science: molecular classifications of breast cancer for clinical diagnostics.** *Clinical Biochemistry*, v. 37, n. 7, p. 572-578, 2004.

ROCHA, Marina Souza et al. **Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado Piauiense.** *Revista Brasileira de Fruticultura* [online]. 2013, v. 35, n. 4 [Acessado 7 Junho 2021] , pp. 933-941. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000400003> ISSN 1806-9967..Epub 30 Jan 2014

ROCHA, Nathália Araújo. **AVALIAÇÃO IN VITRO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO DE SEMENTES DE *Eschweilera ovata* (CAMBESS.) MIERS.** UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA FACULDADE DE FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE, 2021

SALVADOR P. A. **Papel da obesidade induzida por dieta hiperlipídica no desenvolvimento de carcinoma mamário experimental.**, Mestrado em Ciências Biológicas - Imunologia e Doenças Infecto - Parasitárias/Genética e Biotecnologia (Dissertações) UFJF, <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/5563>, 2014.

SANTOS K. M. D. **Estudos in vitro e in vivo da atividade de extratos de Bauhinia sobre o desenvolvimento tumoral.** Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São João Del Rei LINDU– CCO, CAMPUS CENTRO OESTE DONA. Divinópolis, 2017.

SCHARON, J. *Imunologia Básica.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 267p. 2000.

SCHRÖRS B, et al. **Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model.** *Front Oncol*;10:1195. doi:10.3389/fonc.2020.01195. 2020.

SEMESIUK, N.I.; Zhylchuk, A.; Bezdenezhnykh, N.; Lykhova, A.; Vorontsova, A.L.; Zhylchuk, V.E.; Kudryavets, Y.I. **Disseminated tumor cells and enhanced level of some cytokines in bone marrow and peripheral blood of breast cancer patients as predictive factors of tumor progression.** *Experimental Oncology*, 35(4): 295-302. 2013.

SENDÃO, Milena Cristina S474e **Efeito do licopeno na mutagenicidade induzida pela cisplatina em ratos.** /Milena Cristina Sendão. – Araraquara, 2004

SLEEMAN, J. P. **The metastatic niche and stromal progression.** *Cancer and Metastasis Reviews*, 2012.

SHAMI, Najua Juma Ismail Esh e Moreira, Emília Addison Machado. **Licopeno como agente antioxidante.** *Revista de Nutrição* [online], v. 17, n. 2 [Acessado 8 Junho 2021], pp. 227-236. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000200009>>. Epub 13 Ago 2004. ISSN 1678-9865. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000200009>. 2004

SILVA DB, Silva JA, Junqueira NTV, Andrade LRM. **Frutas do cerrado.** Brasília: Embrapa; 2001

SILVA, E. X., Silva, S., Lima, C. M., Medeiros, A., & Serquiz, A. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E MITOCONDRIAL DO EXTRATO DAS SEMENTES DE CHICHÁ (*STERCULIA STRIATA* A. ST. HIL. & NAUDIN) EM CELULAS 3T3 E HeLa.** *Revista UNI-RN*, 16(1/2), 37. Recuperado de <http://www.revistas.unirn.edu.br/index.php/revistaunirn/article/view/406>. (2018).

SORIA G, Ofri-Shahak M, Haas I, Yaal-Hahoshen N, Leider-Trejo L, Leibovich-Rivkin T, Weitzenfeld P, Meshel T, Shabtai E, Gutman M, Ben-Baruch A. **Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF $\alpha$  & IL-1 $\beta$  with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition.** *BMC Cancer*. doi: 10.1186/1471-2407-11-130. PMID: 21486440; PMCID: PMC3095565. Apr 12;11:130,2011.

SUL [recurso eletrônico] / [Tanea Maria Bisognin Garlet]. – Santa. 2018.

STENICO, M.E. et al. **Inibidores de proteases produzidos por cianobactérias: uma revisão.** Vol 16, No 2 (2012) .

VIEIRA J. F. **Imunoterapia profilática com células dendríticas reduz metástases pulmonares em modelo de câncer de mama experimental Prophylactic immunotherapy with dendritic cells reduces lung metastases in an experimental breast cancer model** DOI:10.34117/bjdv7n5-241 (UFTM) Instituto de Pesquisa em Oncologia – UFTM.2021 .

VIEIRA, H. S. **Estudo Comparativo de Citocinas Anti-Inflamatórias em Células Tronco Mesenquimais Cultivadas com Cordia ecalyculata e Biocurativo.** 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

VITALE, Rodrigo Faller e Ribeiro, Fernando de Andrade Quintanilha. **O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média.** Revista Brasileira de Otorrinolaringologia [online]. v. 73, n. 1 [Acessado 14 Novembro 2022], pp. 123-127. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000100020>>. Epub 16 Maio 2007. ISSN 0034-7299. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000100020>.2007.

TANG, J.; AHMAD, A.; SARKAR, F. H. **The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis**International Journal of Molecular SciencesMDPIAG, Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23202960/>>. Acesso em: 19 abr. 2021 , 2012.

TARTAGLIA LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. **A novel domain within the 55 kd TNF recep-tor signals cell death.** Cell. 1993;74:845-853.

TAO, K. et al. **Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer.** BMC Cancer, v. 8, p. 228, 2008.

URSINI-SIEGEL, J. & Siegel, PM **A influência do nicho pré-metastático na metástase do câncer de mama.** *Carta de Câncer.* **380** , 281–288 (2016).Peinado, H. et al. Nichos pré-metastáticos: locais específicos de órgãos para metástases. *Nat. Rev. Cancer* **17** , 302–317 (2017).

WHITESIDE, T. L. **Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis?** Frontiers in oncology, v. 3, p. 107, 2013.

WILLIS MS, Wians FH. **The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances.** Clin Chim Acta. 2003

WOODS KV, Storthz KA, Clayman GL, et al. **Interleukin-1 regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma in vitro: possible influence of p53 but not human papillomavirus E6/E71;** 58(14): 3142-9. Cancer Res. 1998.

WHO, World Health Organization. .WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. ISBN 978-92-4-000129-9,(2020) .

XAVIER-FILHO, J.; VENTURA, M.M. **Trypsin inhibitors in Cowpea: a review.** *Comments Agric. Food Chem*, pp. 239–314; 1988.

ZHANG Y, Zhang GL, Sun X, et al. **Estabelecimento de um modelo de tumor de mama murino por implantação subcutânea ou ortotópica.** *Oncol Lett*; 15 (5): 6233-6240. doi: 10.3892 / ol.2018.8113. 2018.

ZHANG, Y. et al. **B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion.** *Cancer Immunology and Immunotherapy*. v.62. p87-99. 2013.

ZEEVALLOS A, Bravo L, Bretel D, Paez K, Infante U, Cárdenas N, Alvarado H, Posada AM, Pinto JA. **The hispanic landscape of triple negative breast cancer.** *Crit Rev Oncol Hematol*. Nov;155:103094. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103094. Epub 2020 Sep 22. PMID: 33027724.2020.

ZHAO, Y.; Tan, Y. S.; Aupperlee, M. D.; Langohr, I. M.; Kirk, E. L.; Troester, M. A.; Schwartz, R. C.; Haslam, S. Z. **Pubertal high fat diet: effects on mammary cancer development.** *Breast Cancer Research*, 15(5):R100. 2013.

## **ANEXO 1**

### **MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA**

### **DIAMANTINA – MG**

## **CERTIFICADO**

Teófilo Otoni, 02 de fevereiro de 2022.

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do efeito do extrato aquoso de *Sterculia striata* e do extrato rico em inibidores de proteases da *Sterculia striata* na modulação da resposta antitumoral em modelo murino de câncer de mama", registrada com o nº 08-2021 R, sob a responsabilidade de Caio César de Souza Alves - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-Mucuri/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em 26ª Reunião Ordinária, no dia 02 de fevereiro de 2022. sob o protocolo nº 158/2018 (ANEXO I) e está em conformidade com o guia recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para o cuidado e uso de animais de laboratório

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	13/02/2022 a 13/02/2026
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	300
Peso/Idade	22g / 6 a 8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	CEBIO - Centro de Bioterismo - ICB-UFMG

***O prazo de validade desse Certificado é equivalente a vigência do Projeto prorrogável por mais 1 ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA-Mucuri/UFVJM durante a vigência do projeto.***

*Com o recebimento deste Certificado, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.*

*Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa I, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA-Mucuri/UFVJM.*

Ernani Aloysio Amaral

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA-Mucuri/UFVJM

Documento assinado eletronicamente por **Ernani Aloysio Amaral, servidor (a)**, em 03/02/2022, às 11:19, [conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0594966** e o código CRC **B0AB9F80**.

**Referência:** Caso responda este Ofício, indicar expressamente o Processo nº 23086.006746/2021-62 SEI nº 0594966

**Campus JK**

Comissão de Ética no Uso de Animais/ UFVJM

Prédio da Reitoria-PRPPG- Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba -  
Diamantina/MG – CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3532-1200



## ANEXO II



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
**SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO**  
**CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO**

**Comprovante de Cadastro de Acesso****Cadastro nº AA97EDF**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do **AA97EDF**  
 cadastro: **Tadeu Ferreira**  
 Usuário: **Braga Junior**  
 CPF/CNPJ: **408.028.698-82**  
 Objeto do **Patrimônio**  
 Acesso: **Genético/CTA**  
 Finalidade do **Pesquisa**  
 Acesso:

**Espécie****Sterculia striata****Fonte do CTA**

**CTA de origem** Efeito do extrato aquoso e de  
**não identificável** inibidores de Proteases da  
Título da *Sterculia striata* na modulação da  
Atividade: resposta antitumoral in vitro e in  
vivo em modelo murino de  
câncer de mama

#### Equipe

**Tadeu Ferreira**  
**Braga Junior** INDEPENDENTE

#### Parceiras

Nacionais

16.888.315/0002-38 / UFVJM

#### Resultados Obtidos

##### Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do 22/08/2022 17:17:27

meio onde foi

Revista da  
universidade

UFVJM divulgado:

Data do Cadastro:

Situação do **Concluído**

Cadastro:



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:18 de 22/08/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**

### Anexo- III registro no herbário da UFVJM

	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
HDJF 9102	
MALVACEAE	
<i>Sterculia striata</i> A.St.-Hil. & Naudin	
Det.: Machado, ELM, 01-XII-2022	
Brasil, Minas Gerais, Berilo. 16°57'7" S, 42°27'57" W. Elev.: 400-400 m.	
Hábito/Forma de vida: Árvore.	
Nome popular: chicha	
Moisa, TB, sn	
15-IX-2022	
	
HDJF00009102	

Anexo – IV



## Natural Product Research

**In vitro Antitumor Effects of Aqueous Extract and Protease Inhibitors from *Sterculia striata* St. Hil. etNaud and metabolite profiling**

<b>Submission ID</b>	239090981
<b>Article Type</b>	Short Communication
<b>Keywords</b>	<i>Sterculia striata</i> , Cytotoxicity, Breast cancer, Bioactive Metabolites
<b>Authors</b>	ALESSANDRA DE PAULA CARLI, CAIO CESAR ALVES, Tadeu F Braga Junior

For any queries please contact:

GNPL-peerreview@journals.tandf.co.uk

Note for Reviewers:

To submit your review please visit <https://mc.manuscriptcentral.com/prod1/GNPL>

# *In vitro* Antitumor Effects of Aqueous Extract and Protease Inhibitors from

## *Sterculia striata* St. Hil. et Naud and metabolite profiling

Tadeu F Braga Junior<sup>a</sup>, Roberta M Cachuba<sup>a</sup>, Nerilson M Lima<sup>b</sup>, Gracimério J Guarneire<sup>a</sup>,  
Beatriz J Tabai<sup>a</sup>, Roberta M Abrão<sup>a</sup>, Samuel G Barbosa<sup>a</sup>, Jander S Nunes<sup>a</sup>, Gabriela P Carli<sup>a</sup>,  
Fabiana Simão Machado<sup>c</sup>, Sandra BR Castro<sup>a</sup>, Boniek G. Vaz<sup>b</sup>, Caio Cesar S Alves<sup>a</sup>,  
Alessandra P Carli<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39803-371 Teófilo Otoni - MG, Brazil

<sup>b</sup>Universidade Federal de Goiás, 74690-900 Goiânia – GO, Brazil

<sup>c</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brazil

✉ Corresponding author: [alessandrapcarli@hotmail.com](mailto:alessandrapcarli@hotmail.com)

## ABSTRACT

The present study aims to assess the cytotoxic effect of the aqueous and protease inhibitors extracts of *Sterculia striata* on breast cancer cell lines *in vitro*. The MCF-7, 4T1, and MDA-MB-231 were cultured for analysis of cell viability. The chemical characterization of extracts was performed through ESI(-)-Orbitrap MS analysis. Treatment with the aqueous extract reduced viability in up to 35% in the MCF-7, 25% in the 4T1, and 35% in the MDA-MB-231 cell lines. Regarding the protease inhibitor extract, a 50% reduction in cell viability was observed in the MDA-MB-231 at concentration of 333 µg/mL. Chemical characterization analysis revealed several polyphenols such as flavonoids, tannins, phenolic acids, and other secondary metabolites including terpenes, steroids, fatty acids, and organic acids, which may be related to the promising bioactivity observed. The *S. striata* extracts showed important antitumor activity *in vitro*, emphasizing the pharmacological potential of this plant.

**Keywords:** *Sterculia striata*, Cytotoxicity; Breast cancer, Bioactive Metabolites

### 1. Introduction

Breast cancer stands out for its high incidence, mortality rates, and association with the development of tumor metastases in the female population. According to data from 2020, about 24.5% of female breast neoplasms were covered by approximately 15% of deaths from cancer in women (Anderson, 2021). Although therapeutic advances have resulted in the cure of patients and a reduction in mortality rates, the difficulty of managing patients with advanced-stage breast

30 cancer, the continuous growth of these neoplasms, and the high toxicity of chemotherapy drugs  
31 reinforce the need for research aimed at discovering new therapeutic targets (tIsNCA, 2020).

32 The treatment for breast cancer depends on the stage of the tumor and the type of tumor  
33 cells involved, however, the therapeutic approaches currently available have adverse effects that  
34 can be of short or long duration, even increasing the morbidity and mortality of patients (Zhao et  
35 al., 2023). Numerous studies have demonstrated the potential of using medicinal plants and their  
36 metabolites for breast cancer therapy (Buja et al. 2020; Newman and Cragg, 2020; Sinha et al.  
38 2016).

39 *Sterculia striata* (Malvaceae) is a tree plant popularly known as “amendoim-de-macaco”  
40 (Silva, 2001). One of its main chemical constituents includes flavonoids and lycopenes and  
41 flavonoids, which are considered efficient therapeutic agents in the fight against tumors (Rocha,  
42 2013; Moritz 2006). In addition, other biologically active metabolites such as anthocyanin, fatty  
43 acids, sterols and triterpene alcohols, oils, ascorbic acid are reported in the *S. striata* species (Rocha  
44 2013; Chaves 2004).

45 Thus, the present study proposes to evaluate the cytotoxic effect of aqueous extract and  
46 protease inhibitor enriched extract of *S. striata* at *in vitro* assays using the cancer cell lines MCF-  
47 7, 4T1 and MDA-MB-231, as well as to determine the metabolic profiling.

## 48 2. Results and Discussion

### 49 2.1 *S. striata* reduced the cell viability of different tumor cell lines

50 In the present study, the seed aqueous extract (EASs) and the protease inhibitor of seed  
51 (IPsSs) or bark (IPcSs) from *S. striata* was investigated for its *in vitro* cytotoxic activity (**Figure S1**  
52 and **Figure S2**) using the cancer cell lines MCF-7, 4T1, and MDA-MB-231. The greatest reductions  
53 in cell viability were observed at the highest concentrations of *S. striata* seed and bark extracts. The  
54 protease inhibitor extract at a concentration of 333 µg/mL showed the best significant reduction in  
55 cell viability for the MDA-MB-231 cell line. Significant reductions of 50% in the cell viability of  
56 the MDA-MB-231 cell lines were found for the PI extract (concentration of 333 µg/mL) from *S.*  
57 *striata* bark. At lower concentrations (100 and 33.3 µg/mL) of the PI extract, reductions of 45 to  
58 30% were observed in the viability of the MDA-MB-231 cell lines, and a 35% reduction in the same  
59 cancer cell lines using the aqueous extract. These data suggest a promising cytotoxic effect of the  
60 aqueous extracts and protease inhibitors of *S. striata* in highly prevalent and metastatic breast cancer  
61 cell lines (Martin, 2015; Barroso, 2021; Santos 2017; Mogbojuri et al., 2016). Moura (2019)  
62 indicates results of the toxicity test with the genus *Sterculia* that corroborate our findings.

63 Concerning the MCF-7 cancer cell lines treated with four concentrations of aqueous  
64 extract and protease inhibitor from the bark and seeds of *S. striata*, treatment with the aqueous  
65 extract reduced viability by up to 35% and treatment with the protease inhibitor extract protease  
66 reduced cell viability by up to 30%. All extract dosages were able to reduce cell viability from 10%  
67 to 30% approximately. However, a greater ability to reduce the strains was observed for the  
68 concentration of 333 $\mu$ g/ml of the protease inhibitor extract obtained from the seeds of *S. striata*.  
69 Whereas the protease inhibitor extract from the peels achieved the most significant difference at the  
70 concentration 333  $\mu$ g/mL.

71 Regarding the cancer cell lines 4T1, no significant reductions in cell viability were found  
72 for the extract of protease inhibitors from the *S. striata* bark, whose same profile was observed for  
73 the aqueous extract of the seeds. While the seed protease inhibitor extract showed very low reduction  
74 in cell viability. However, the greatest interest is in the seed, which is expected to have a higher  
75 concentration of proteins capable of inhibiting trypsin and which are recognized for their role in  
76 defense against pests (Xavier-Filho and Ventura, 1988).

#### 77 2.2 Metabolite profiling of the bioactive extract from *S. striata*

78 The metabolite profile was obtained by ultra-high resolution mass spectrometry analyzes using  
79 a Q-Exactive hybrid Quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometer (*Thermo Scientific*) in  
80 positive ion mode (ESI(+)). The structural annotation of the metabolites present in the extracts was  
81 based on the fragmentation profile (MS/MS) of the selected ions, Mass-to-Charge ratio ( $m/z$ ) and  
82 elemental composition obtained through Orbitrap mass analyzer, and applying online dereplication  
83 platforms (GNPS, MetFrag, and CFM -ID). The metabolite profiling showed several bioactive  
84 polyphenols such as flavonoids, tannins, and phenolic acids. Moreover, other secondary metabolites  
85 including terpenes, steroids, and organic acids were detected in the extracts, whose results are in  
86 agreement with the metabolome of *S. striata* (Dillak et al., 2019; Rabbi et al. 2021). Phytochemical  
87 screening suggested the presence of Protocatechuic acid ( $m/z$  155.03), Ferulic acid ( $m/z$  195.10),  
88 and Quercetin ( $m/z$  303.05), which were previously reported in *S. striata* (de Britto Policarpi et al.,  
89 2018). However, few studies describe the molecular composition of *S. striata*.

### 90 3. Conclusion

91 The extracts with the highest concentrations of protease inhibitors obtained from *S.*  
92 *striata* seeds showed the greatest significant reductions. Thus, possible significant trends with the  
93 potential to reduce are greater when compared with the protease inhibitors of the bark and aqueous  
94 extract. Finally, we conclude that seed protease inhibitors are related to these antitumor activities.

## 95 Acknowledgment

96 The authors would like to thank to Brazilian Research Agencies CNPq, CAPES and FAPEMIG for  
97 financial support. Author Roberta Mello Cachuba received research support from National Council  
98 for Scientific and Technological Development (CNPq)

99 **Disclosure statement:** No potential conflict of interest was reported by the authors.

## 100 References

- 101 Anderson BO, Ilbawi AM, Fidarova E, Weiderpass E, Stevens L, Abdel-Wahab M, Mikkelsen B.  
102 2021. The Global Breast Cancer Initiative: a strategic collaboration to strengthen health care for  
103 non-communicable diseases. *Lancet Oncol.* 22(5): 578-581.
- 104 Chaves MH, Barbosa AS, Moita Neto JM, Aued-Pimentel S, Lago JHG. 2004. Caracterização  
105 química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. et Naud. *Quim Nova* 27: 404-408.
- 106 Dillak HI, Kristiani EBE, Kasmiyati S. 2019. Secondary metabolites and antioxidant activity of  
107 ethanolic extract of Faloak (*Sterculia quadrifida*). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology*  
108 *Education*, 11(3): 296-303.
- 109 Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2020: incidência de câncer*  
110 *no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.* – Rio de Janeiro: INCA,  
111 2020.
- 112 Newman DJ, Cragg GM..2020. Natural products as sources of new drugs over the nearly  
four  
113 decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 83(3): 770 803.
- 114 Rabbi F, Zada A, Nisar A, Khan FU, Rahim A, Salman M, ... Sohail M. 2021. Evaluation of in-vivo  
115 biological activities of *Sterculia diversifolia* (G. Don) in relevance to the isolated secondary  
116 metabolites. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 31(1).
- 117 Rocha MS, Figueiredo RWD, Araújo MADM, Moreira-Araújo RSDR. 2013. Caracterização físico-  
118 química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. *Revista Brasileira de*  
119 *Fruticultura* 35: 933-941.
- 120 Zhao N, Wang W, Jiang H, Qiao Z, Sun S, Wei Y, ... & Yang Z. 2023. Natural Products and Gastric  
121 Cancer: Cellular Mechanisms and Effects to Change Cancer Progression. *Anticancer Agents Med*  
122 *Chem.*
- 123 de Britto Policarpi P, Turcatto L, Demoliner F, Ferrari RA, Bascuñan VLAF, Ramos JC,..... Block  
124 JM. 2018. Nutritional potential, chemical profile and antioxidant activity of Chichá (*Sterculia*  
125 *striata*) nuts and its by-products. *Food Research International*, 106: 736-744.



# In vitro Antitumor Effects of Aqueous Extract and Protease Inhibitors from

128 *Sterculia striata* St. Hil. et Naud and metabolite profiling

129 Tadeu F Braga Junior<sup>a</sup>, Roberta M Cachuba<sup>a</sup>, Nerilson M Lima<sup>b</sup>, Gracimério J Guarneire<sup>a</sup>,  
130 Beatriz J Tabai<sup>a</sup>, Roberta M Abrão<sup>a</sup>, Samuel G Barbosa<sup>a</sup>, Jander S Nunes<sup>a</sup>, Gabriela P Carli<sup>a</sup>,  
131 Fabiana Simão Machado<sup>c</sup>, Sandra BR Castro<sup>a</sup>, Boniek G. Vaz<sup>b</sup>, Caio Cesar S Alves<sup>a</sup>,  
132 Alessandra P Carli<sup>a\*</sup>

133 <sup>a</sup>Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39803-371 Teófilo Otoni - MG,  
134 Brazil

135 <sup>b</sup>Universidade Federal de Goiás, 74690-900 Goiânia – GO, Brazil

136 <sup>c</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brazil

137 ✉ Corresponding author: [alessandrapcarli@hotmail.com](mailto:alessandrapcarli@hotmail.com)

## 138 ABSTRACT

139 The present study aims to assess the cytotoxic effect of the aqueous and protease inhibitors  
140 extracts of *Sterculia striata* on breast cancer cell lines *in vitro*. The MCF-7, 4T1, and MDA- MB-  
141 231 were cultured for analysis of cell viability. The chemical characterization of extracts was  
142 performed through ESI(-)-Orbitrap MS analysis. Treatment with the aqueous extract reduced  
143 viability in up to 35% in the MCF-7, 25% in the 4T1, and 35% in the MDA-MB-231 cell lines.  
144 Regarding the protease inhibitor extract, a 50% reduction in cell viability was observed in the  
145 MDA-MB-231 at concentration of 333 µg/mL. Chemical characterization analysis revealed  
146 several polyphenols such as flavonoids, tannins, phenolic acids, and other secondary  
147 metabolites including terpenes, steroids, fatty acids, and organic acids, which maybe related  
148 to the promising bioactivity observed. The *S. striata* extracts showed important antitumor  
149 activity *in vitro*, emphasizing the pharmacological potential of this plant.

150

151 *2.1. Plant material and extracts preparation*

152 *Sterculia striata* was collected in May 2021, in the rural area of the city of Berilo -  
153 MG in the Jequitinhonha valley. An exsiccate was deposited in the Jeanine Felfili  
154 Dendrological Herbarium (HDJF) from the Federal University of the Jequitinhonha and  
155 Mucuri Valeys (UFVJM) and registered in the National System for the Management of  
156 Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under registration number  
157 AA97EDF. 100 g from plant powder was extracted in water by successive maceration (48 h).  
158 The solvent was removed, and the concentrated extract was frozen for further analysis. To  
159 carry out the detection and extraction of protease inhibitors, it was based on the work of  
160 Gomes et al. (2016). The bark and seeds of the plant were selected and crushed in a blender.  
161 Proteins were extracted by adding 10% w/v of 60% ethanol, heated to 55°C with constant  
162 stirring for 1 hour. After this period, the material was filtered through gauze and acidified to  
163 pH 5.3. The filtrate was precipitated with two volumes of acetone, then centrifuged at 4600 x  
164 g for 30 minutes, the supernatant was discarded and the resulting precipitate was resuspended  
165 in 10 ml of distilled water and stored at -80°C.

166 *2.2. Cellular viability assay*

167 4T1, MDA-MB-231 and MCF-7 cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were added to 96-well plates in  
168 RPMI-1640 supplemented with 2mM L-glutamine, 100 µg/ml antibiotic (streptomycin and  
169 penicillin), and 5% of fetal bovine serum. The cells were then treated with aqueous extract  
170 (EASs), seed protease inhibitor extract (IPsSs) and bark protease inhibitor extract (IPcSs), at  
171 concentrations of 333, 100, 33.3 and 10 µg/mL, and kept at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours.  
172 For cytotoxicity analysis, a cell viability test was performed with the compound 3-(4,5-  
173 dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyl tetrazolium – MTT. After the culture time, the supernatant  
174 was removed and 100 µL of RPMI-supplemented and 10µL (5 mg/mL) of MTT solution were

175 added to each well. The cells were then incubated for 4 hours. At the end of the incubation,  
176 the supernatant was removed and 100  $\mu$ L of DMSO was added. The plates were shaken and  
177 the optical density (OD) of the absorbance was determined in the EZ Read 2000 microplate  
178 reader (Biochrom San Diego, USA) at a wavelength of 560 nm. Cytotoxicity (%) was  
179 obtained by the formula  $(X1/X2)*100$ , considering X1 and X2 the mean OD in the wells of  
180 treated cells and untreated cells, respectively.

### 181 2.3. Metabolite profiling from *Sterculia striata* extracts

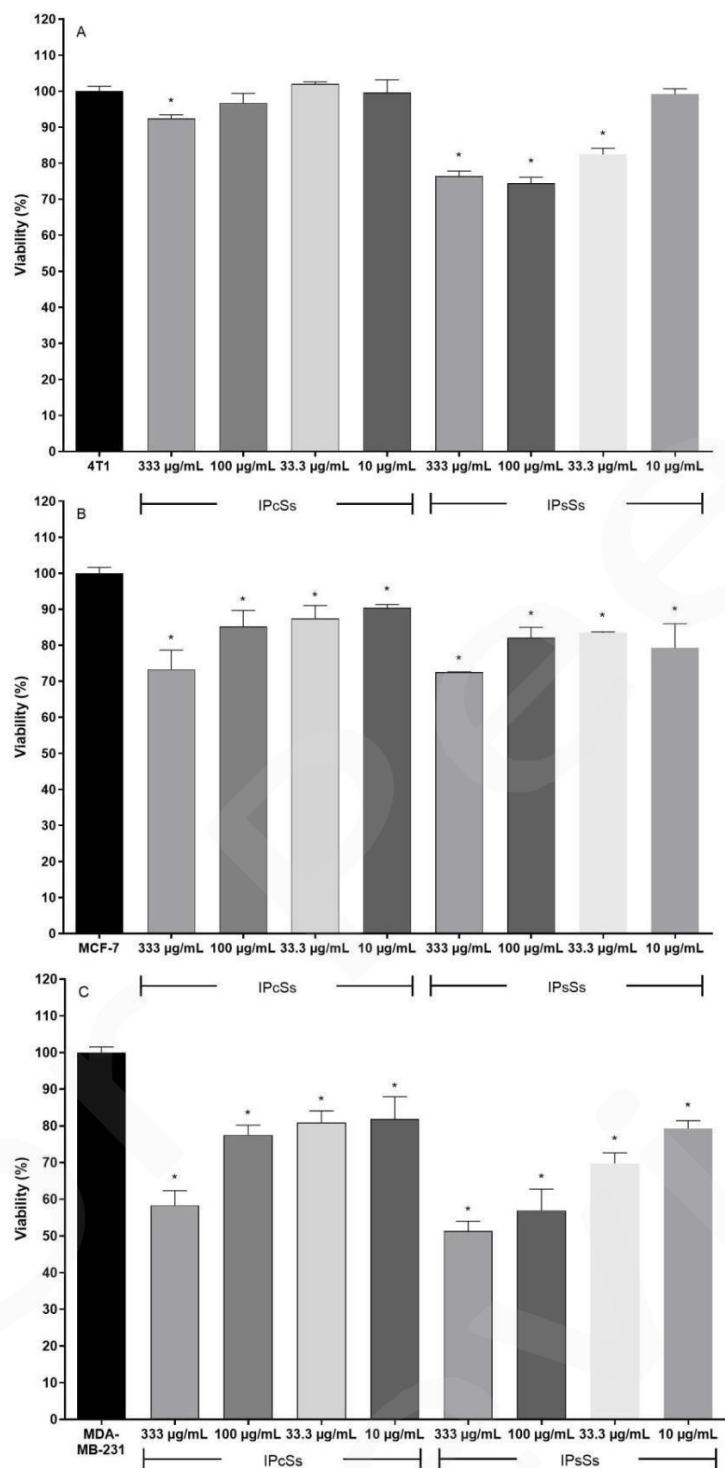
182 The mass spectrometry analysis was performed using a Q-Exactive hybrid  
183 Quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometer (Thermo Scientific).

### 184 2.4. Statistical analysis

185 The results are presented as the mean  $\pm$  standard error, and are representative of three  
186 independent experiments, aiming to maximize the reproducibility of the results. Significance  
187 between groups was analyzed using non-parametric Mann-Whitney test, One- way ANOVA or  
188 Two-way ANOVA (GraphPad Prism 5.00). The differences were considered significant for p  
189 < 0.05.

190 **Figures:**

For Peer Review

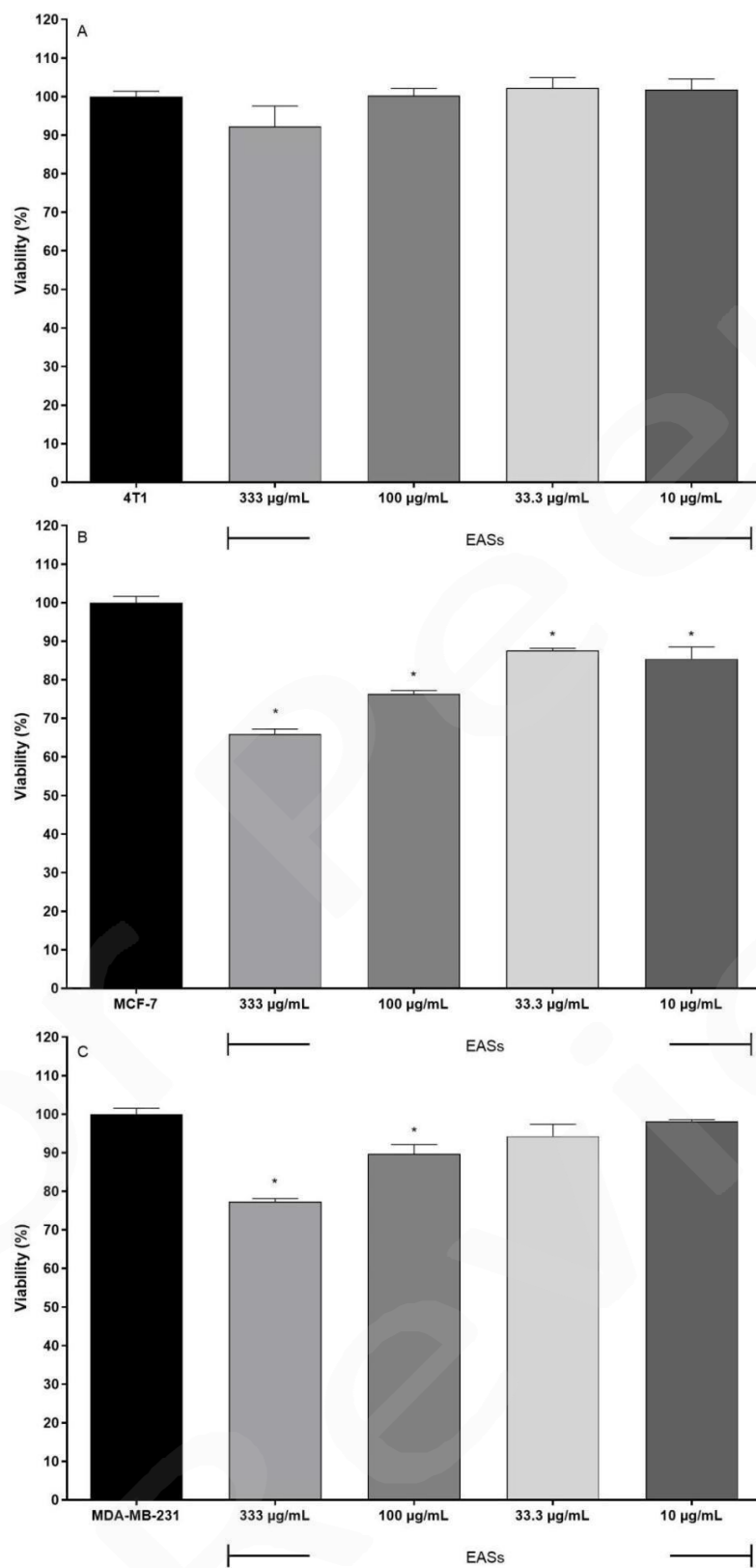


191 Figure S1. Cell viability (%) in concentrations of 333, 100, 33.3 and 10 µg/mL of protease

192 inhibitor extracts from the seed (IPsSs) and bark (IPcSs) of *Sterculia striata* using the cancer

193 cell lines (A) 4T1, (B) MCF-7, and (C) MDA-MB-231. \*  $p < 0.05$  when compared to untreated  
194 cells.

For Peer Review



197 Figure S2. Cell viability (%) in concentrations of 333, 100, 33.3 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of aqueous  
198 extract of *Sterculia striata* seed (EASs) using the cancer cell lines (A) 4T1, (B) MCF-7, and  
199 (C) MDA-MB -231, with  $p < 0.005$ . \*  $p < 0.05$  when compared to untreated cells.

200

