

# Atividade antiproliferativa do composto bioativo de *Silybum marianum* em linhagem celular de melanoma humano com mutação BRAF: potencial para reposicionamento terapêutico

Antiproliferative activity of the bioactive compound from *Silybum marianum* in a human melanoma cell line with BRAF mutation: potential for therapeutic repurposing

<https://doi.org/10.32712/2446-4775.2025.1812>

Cardoso, Clever Gomes<sup>1</sup>

 <https://orcid.org/0000-0002-9175-7695>

Guillo, Lidia Andreu<sup>2\*</sup>

 <https://orcid.org/0000-0003-3220-6890>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Morfologia, *Campus* Samambaia, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Laboratório de Bioquímica Celular, *Campus* Samambaia, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

\*Correspondência: [guillo@ufg.br](mailto:guillo@ufg.br).

## Resumo

O presente estudo investigou o potencial antiproliferativo *in vitro* de Silibinina sobre células de melanoma humano com mutação no gene BRAF. A viabilidade celular *in vitro* foi avaliada por meio da incubação com diferentes concentrações: 41, 104, 207 e 518  $\mu\text{M}$  por 48 horas, por meio do ensaio que envolve a redução do sal de tetrazólio MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium]) (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). O valor encontrado para a concentração inibitória ( $\text{IC}_{50}$ ) foi de 240  $\mu\text{M}$ . A observação por microscopia de campo claro indicou a perda de aderência das células ao substrato, aspecto característico de morte celular por apoptose, nas diferentes doses tratadas. Os resultados reforçam a necessidade da continuidade desses estudos visando à elucidação do mecanismo de ação e comprovação de sua eficácia clínica.

**Palavras-chave:** Viabilidade celular. MTT. Silibinina. Linhagens celulares. Melanoma humano.

## Abstract

This study investigated the *in vitro* antiproliferative potential of Silibinin on human melanoma cells with a BRAF gene mutation. Cell viability was assessed through incubation with different concentrations (41, 104,

207, and 518  $\mu\text{M}$ ) for 48 hours, using the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), which involves the reduction of the tetrazolium salt. The inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) was determined to be 240  $\mu\text{M}$ . Bright-field microscopy revealed loss of cell adhesion to the substrate, a characteristic feature of cell death by apoptosis, across the tested doses. These results highlight the need for further studies to elucidate the mechanism of action and confirm its clinical efficacy.

**Keywords:** Cell viability. MTT. Silibinin. Cell lines. Human melanoma.

---

## Introdução

Atualmente o reposicionamento de drogas aprovadas é um tema que vem ganhando destaque na literatura, principalmente porque seria uma forma mais barata e rápida de estar disponível aos pacientes<sup>[1]</sup>, uma vez que essas moléculas já passaram por todos os testes regulamentares de biossegurança, eficácia, biodistribuição, toxicidade, dentre outros, quando da liberação para o uso clínico original.

Entretanto, o caminho não é tão simples assim, pois no que se refere ao tratamento do câncer, apenas o trióxido de arsênio e o ácido all-trans-retinóico, usados desde 1962 para tratar afecções cutâneas, foram reposicionados especificamente para tratamento de leucemia promielocítica aguda desde 2000<sup>[1]</sup>.

Por outro lado, verifica-se que fitoterápicos vem ocupando espaço como medicamentos coadjuvantes no tratamento do câncer, embora estudos que se destinam ao seu reposicionamento para comprovar uma possível atividade antitumoral ainda sejam esparsos. Um deles que têm atraído nosso interesse, a erva floral medicinal *Cardo mariano* (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), cujo extrato seco do fruto é indicado como fitoterápico regulamentado pela ANVISA, nas preparações sob forma farmacêutica sólida ou líquida para uso oral<sup>[2,3]</sup> em medicamentos como Legalon<sup>®</sup>, Steaton<sup>®</sup>, Silimalon<sup>®</sup> e Forfig<sup>®</sup>.

Os estudos mais recentes sobre essa planta, vem apontando outras atividades biológicas para além da sua conhecida e aprovada atividade hepatoprotetora. Dentre essas, destaca-se a atividade antiproliferativa, verificada em diversos estudos *in vitro* e pré-clínicos de cânceres de pele, hepático, mama, ovário, próstata, pulmão e outros<sup>[4-7]</sup>.

O princípio ativo encontrado nas folhas, sementes e frutos é a Silimarina, nome genérico dado ao extrato seco que contém uma mistura de flavolignanós, flavonoides e compostos polifenólicos, onde a Silibina é principal componente bioativo<sup>[8]</sup>.

Especificamente, em relação ao melanoma, verificou-se que há poucos estudos até a presente data, sendo que não se encontrou nenhum estudo clínico registrado na plataforma ClinicalTrials.gov, da *National Library of Medicine* (NLM) nos Estados Unidos. Estudos empregando linhagens celulares de melanoma murino ou humano (SK-MEL-5, SK-MEL-28, A375), *in vitro* ou em camundongos imunocompetentes, demonstraram efeitos inibitórios da Silibina no crescimento celular<sup>[9-11]</sup>. Uma formulação em hidrogel termossensível, apresenta potencial para aplicação tópica<sup>[12]</sup>, o que seria importante para melanoma cutâneo.

Sabe-se que, cerca de 60% dos casos de melanoma maligno diagnosticados, apresentam mutações no protooncogene BRAF<sup>[13,14]</sup>. As linhagens celulares comerciais de melanoma humano, foram estabelecidas

de amostras de pacientes e expressam o gene *wild-type* ou mutante BRAF, conforme se pode verificar no catálogo disponibilizado pelo *Memorial Sloan Kettering Cancer Institute*<sup>[45]</sup>. Tais estudos têm indicado que a presença ou não do gene mutante pode influenciar na resposta ao tratamento com a Silibinina<sup>[11]</sup>.

Visando ampliar a compreensão do efeito de Silibinina no melanoma, utilizou-se a linhagem SK-MEL-37, uma vez que não há estudos sobre a atividade antiproliferativa de Silibinina empregando tal linhagem celular. Tal linhagem, além de apresentar o gene mutante BRAF, é amelanótica, o que a diferencia das linhagens já avaliadas na literatura.

## Material e Métodos

### Cultura de células e manutenção da linhagem celular

As células de melanoma humano metastático amelanótico da linhagem SK-MEL-37 empregadas neste estudo foram obtidas por doação de Dr. Loyd J. Old do Instituto de Câncer Memorial Sloan-Kettering, New York, USA. As células foram semeadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em meio de cultura MEM (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco BRL, Argentina) e 0,25 µg/mL de Fungizona (Gibco BRL, Argentina) e mantidas em incubadora úmida com condições de 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C. Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 24 poços, e as concentrações celulares foram calculadas assumindo-se um tempo de duplicação de 30 horas, de forma a garantir o crescimento exponencial durante todo o tempo de tratamento com a Silibinina.

### Preparação da solução de silibinina

O extrato de Silibinina [2,3-Dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-6-(3,5,7-trihydroxy-4-oxobenzopyran-2-yl)benzodioxin, Silybin] com ≥ 98% de pureza (HPLC) foi obtida da Sigma Aldrich. O composto foi armazenado em temperatura de -20°C. As soluções de Silibinina usadas nos experimentos foram preparadas por dissolução de massa adequada em DMSO.

### Medida da atividade antiproliferativa de Silibinina

Inicialmente realizou-se um acompanhamento visual, verificando-se em microscópio invertido, o grau de desprendimento das células do fundo da placa de cultivo, fato indicativo da citotoxicidade do tratamento. Neste procedimento, as células de melanoma (SK MEL-37) foram semeadas em placas de com 24 poços (Nunc Brand Products, USA) e tratadas após 24 horas (tempo suficiente para adesão das células ao fundo da placa) com diferentes concentrações de Silibinina. Após 48 horas de incubação, as placas foram diretamente observadas em microscópio óptico (Eclipse TE 2000S, NIKON) e fotografadas. A seguir, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT, com algumas variações em relação ao protocolo original. Este ensaio se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a qual é capaz de metabolizar o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (conhecido como MTT) em um composto colorido denominado formazan (cor roxa), que pode ser solubilizado e quantificado por espectrofotometria (570 nm). Dessa forma, os eventos metabólicos de apoptose ou necrose que levam a uma diminuição na viabilidade da cultura celular, podem ser quantificados. O formazan produzido pelas células está diretamente correlacionado com o número de

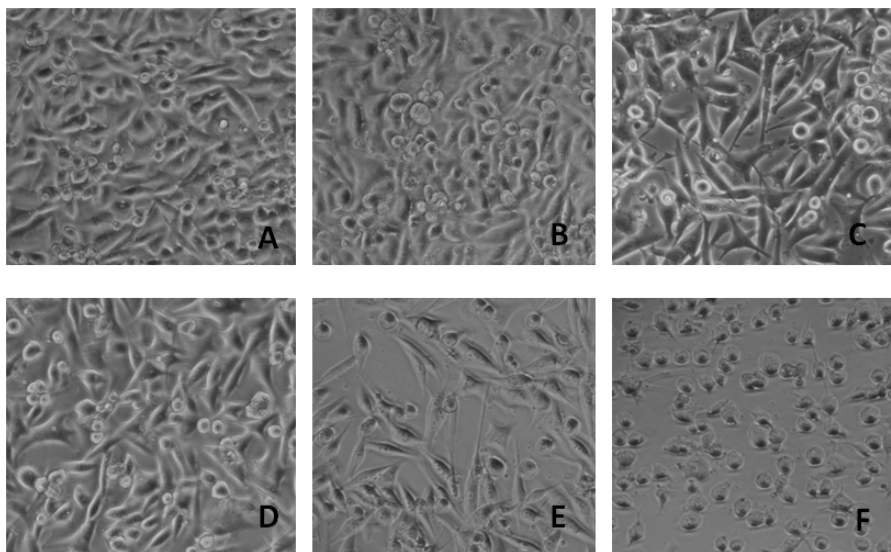
células viáveis<sup>(15)</sup>. Em nossas mãos, o melhor solvente para a solubilização do formazan e estabilidade dessa solução foi o metanol.

O número de células semeadas foi calculado de tal forma que as células atingissem a confluência ao término de 72 horas. Após 24 horas da semeadura, as células foram tratadas com diferentes concentrações da solução de Silibinina em quadruplicata e incubadas por um período de 48 horas. Ao término do período de incubação, acrescentou-se 50  $\mu$ L de solução de MTT (5 mg/mL, Calbiochem, USA), incubando-se novamente por duas horas para metabolização do MTT. A seguir, o meio foi totalmente descartado, acrescentando-se 300  $\mu$ L de metanol gelado (Vetec) para a solubilização do formazan formado. Alíquotas de 100  $\mu$ L foram transferidas para uma placa de 96 poços para leitura da absorbância a 570 nm em leitor de microplacas (ELX-800, Bio-Teck Instrument, INC). Para a construção do gráfico de Porcentagem de viabilidade celular x concentração e o cálculo do IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória para 50% das células), utilizou-se o Programa GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows, da GraphPad Software, San Diego, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Os valores de absorvância obtidos no tratamento com as diferentes concentrações de Silibinina, foram normalizados para os valores obtidos com o solvente DMSO (B) para obtenção da porcentagem de viabilidade celular (C) através da equação:  $C = A/B \times 100$  para todas as concentrações estudadas. Os resultados foram obtidos de três experimentos independentes.

## Resultados e Discussão

As células semeadas foram fotografadas em microscópio óptico (NIKON) para a observação da ação da solução de Silibinina, após 72 horas de incubação. Foi possível observar mudanças morfológicas nítidas entre as células tratadas (**FIGURA 1 C-F**) e o controle (**FIGURA 1 A-B**). As células não tratadas ou tratadas apenas com o solvente, apresentam-se aderidas à placa de cultura, bem distribuídas e com prolongamentos irregulares em várias direções, aspectos característicos do melanoma (SK MEL-37) em cultura. Já as células tratadas se caracterizaram pelo arredondamento celular, presença de vacúolos e fragmentação nuclear e desprendimento (perda de aderência ao substrato), sendo que, essas características se tornaram mais evidentes à medida que se aumentava a concentração de Silibinina.

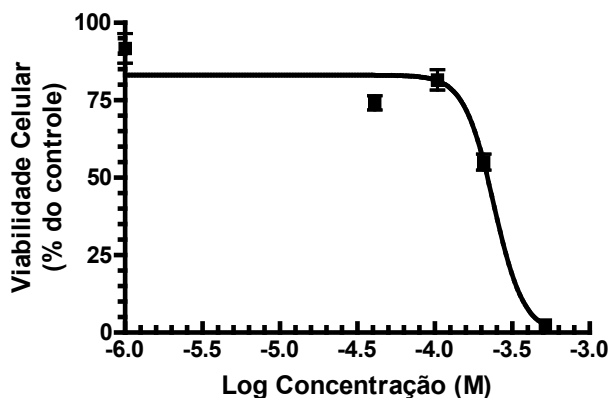
**FIGURA 1:** Micrografia óptica das células SK MEL-37 tratadas com Silibinina.



Legenda: Aspecto morfológico de células de melanoma SK-MEL-37 em cultura após 48 horas de incubação na ausência de silibinina (A); na presença de DMSO (B); e nas concentrações de 41, 104, 207 e 518 $\mu$ M de Silibinina (C, D, E, F), respectivamente.

Para análise da viabilidade celular, as células foram tratadas por 48 horas com as seguintes concentrações de Silibinina: 41, 104, 207 e 518  $\mu\text{M}$ . O valor do  $\text{IC}_{50}$  encontrado foi de 240  $\mu\text{M}$ , obtido por meio curva dose-resposta demonstrada na **FIGURA 2**. As células não tratadas apresentaram 100% de viabilidade.

**FIGURA 2:** Gráfico dose-resposta da viabilidade celular.



Legenda: As células de melanoma humano SK MEL 37 foram tratadas com diferentes concentrações da solução de Silibinina e a viabilidade celular foi avaliada por meio do método MTT, conforme descrito em Material e Métodos.

Os resultados indicaram que a Silibinina apresentou efeito antiproliferativo em células da linhagem SK-MEL-37, com um  $\text{IC}_{50}$  de 240  $\mu\text{M}$ . Esse valor é maior do que os relatados em estudos anteriores, que avaliaram o efeito da Silibinina em células SK-MEL-5 e SK-MEL-28, ambas com mutação no gene BRAF, sugerindo  $\text{IC}_{50}$  entre 40 e 80  $\mu\text{M}$ , conforme observado nos histogramas de viabilidade celular apresentados. Em contraste, na linhagem SK-MEL-2, que não apresenta mutação no gene BRAF, a Silibinina não demonstrou efeito antiproliferativo significativo. Esses achados sugerem uma possível influência da mutação no gene BRAF na resposta à Silibinina. No entanto, como a linhagem SK-MEL-37 utilizada neste estudo também expressa BRAF mutante, a diferença de  $\text{IC}_{50}$  não pode ser completamente explicada apenas por essa mutação.

Adicionalmente, estudos prévios demonstraram que a presença ou ausência da enzima tirosinase pode alterar a resposta a drogas em melanomas melanóticos e amelanóticos. Em células SK-MEL-28, a ausência do gene da tirosinase em células transfectadas (amelanóticas) modificou significativamente o efeito da Rutina<sup>[16]</sup>, indicando que a tirosinase pode atuar como moduladora da eficácia de determinadas substâncias em linhagens melanóticas. Embora esse mecanismo não tenha sido diretamente avaliado para a Silibinina, ele sugere que fatores relacionados à melanogênese e ao metabolismo de drogas podem desempenhar um papel importante na variabilidade da resposta observada.

## Conclusão

A Silibinina demonstrou potencial antiproliferativo em células de melanoma humano com mutação no gene BRAF, utilizando uma linhagem amelanótica. A observação morfológica indicou alterações compatíveis com morte celular, reforçando seu papel como candidato promissor para futuras investigações no contexto do tratamento de melanomas.

## Fontes de financiamento

Não houve.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesses.

## Agradecimentos

Ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFG, por meio da Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação para compra de materiais e insumos necessários ao desenvolvimento do estudo.

## Colaboradores

Concepção do estudo: CGC; LAG

Curadoria dos dados: CGC; LAG

Coleta de dados: LAG

Análise dos dados: CGC; LAG

Redação do manuscrito original: LAG

Redação da revisão e edição: CGC; LAG

## Referências

1. Gonzalez-Fierro A, Dueñas-González A. Drug repurposing for cancer therapy, easier said than done. **Semin Cancer Biol.** 2021 Jan; 68: 123-131. Disponível em: [<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.012>] [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31877340/>].
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Produtos tradicionais fitoterápicos passíveis de notificação de acordo com as formulações publicadas na 2ª edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira.** [acesso em: 26 nov. 2024]. Disponível em: [<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/fitoterapicos-dinamizados-e-especificos/informes/fitoterapicos/texto-tecnico-estatico-para-publicar-na-pagina-da-area.pdf>].
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). ***Silybum marianum* (L.) Gaertn., fructus.** [acesso em: 26 nov. 2024]. Disponível em: [[https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/fitoterapicos-dinamizados-e-especificos/monografias-traduzidas/silybum\\_marianum\\_frutop.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/fitoterapicos-dinamizados-e-especificos/monografias-traduzidas/silybum_marianum_frutop.pdf)].
4. Cheung CW, Gibbons N, Johnson DW, Nicol DL. Silibinin--a promising new treatment for cancer. **Anticancer Agents Med Chem.** 2010 Mar; 10(3): 186-95. Disponível em: [<https://doi.org/10.2174/1871520611009030186>]. PMID: 20015009.
5. Wang X, Zhang Z, Wu SC. Health Benefits of *Silybum marianum*: Phytochemistry, Pharmacology, and Applications. **J Agric Food Chem.** 2020 Oct 21; 68(42): 11644-11664. Disponível em: [<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04791>]. PMID: 33045827.

6. Marmouzi I, Bouyahya A, Ezzat SM, El Jemli M, Kharbach M. The food plant *Silybum marianum* (L.) Gaertn.: Phytochemistry, Ethnopharmacology and clinical evidence. **J Ethnopharmacol**. 2021 Jan 30; 265: 113303. Disponível em: [<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113303>]. PMID: 32877720.
7. Nawaz A, Zaib S, Khan I, Ahmed A, Shahzadi K, Riaz H. *Silybum marianum*: An Overview of its Phytochemistry and Pharmacological Activities with Emphasis on Potential Anticancer Properties. **Anticancer Agents Med Chem**. 2023; 23(13): 1519-1534. Disponível em: [<https://doi.org/10.2174/1871520623666230412111152>]. PMID: 37055902.
8. Abenavoli L, Izzo AA, Milić N, Cicala C, Santini A, Capasso R. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. **Phytother Res**. 2018 Nov; 32(11): 2202-2213. Disponível em: [<https://doi.org/10.1002/ptr.6171>]. PMID: 30080294.
9. Amiri M, Jafari S, Lavasanifar A, Molavi O, Montazersaheb S. Nano-delivery of *Silibinin* Potentiate the Induction of Immunogenic Cell Death (ICD) in Melanoma Cells. **Curr Pharm Biotechnol**. 2024 Mar 12; 26(3): 392-401. [<https://doi.org/10.2174/0113892010280336240227062954>]. PMID: 38482616.
10. Coutinho TE, Souto EB, Silva AM. Selected Flavonoids to Target Melanoma: A Perspective in Nanoengineering Delivery Systems. **Bioengineering** (Basel). 2022 Jun 29; 9(7): 290. [<https://doi.org/10.3390/bioengineering9070290>]. PMID: PMC9311564.
11. Lee MH, Huang Z, Kim DJ, Kim SH, Kim MO, Lee SY, *et al*. Direct targeting of MEK1/2 and RSK2 by silybin induces cell-cycle arrest and inhibits melanoma cell growth. **Cancer Prev Res** (Phila). 2013 May; 6(5): 455-65. [<https://doi.org/10.1158/1940-6207>]. PMID: PMC3644346.
12. Makhmalzadeh BS, Molavi O, Vakili MR, Zhang HF, Solimani A, Abyaneh HS, *et al*. Functionalized Caprolactone-Polyethylene Glycol Based Thermo-Responsive Hydrogels of Silibinin for the Treatment of Malignant Melanoma. **J Pharm Pharm Sci**. 2018; 21(1): 143-159. [<https://doi.org/10.18433/jpps29726>]. PMID: 29789104.
13. Patel H, Yacoub N, Mishra R, White A, Long Y, Alanazi S, Garrett JT. Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. **Cancers** (Basel). 2020 Feb 19; 12(2): 482. [<https://doi.org/10.3390/cancers12020482>]. PMID: PMC7072236.
14. Boutros A, Croce E, Ferrari M, Gili R, Massaro G, Marconcini R, Arecco L, Tanda ET, Spagnolo F. The treatment of advanced melanoma: Current approaches and new challenges. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2024 Apr; 196: 104276. [<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104276>]. PMID: 38295889.
15. Memorial Sloan Kettering Cancer Institutr. **Tangible Materials Licencing Catalogue**. [acesso em: 27 nov. 2024]. Disponível em: [[https://www.mskcc.org/sites/default/files/node/25311/documents/msk-trm-catalogue-edition-4\\_final\\_may-2023.pdf](https://www.mskcc.org/sites/default/files/node/25311/documents/msk-trm-catalogue-edition-4_final_may-2023.pdf)].
16. Vad N, Naik B, Moridani M. Abstract #678: Biochemical mechanism of Rutin toxicity in SK-MEL-28 melanomas cells: A tyrosinase bioactivation prodrug approach. **Cancer Res**. 1 May 2009; 69 (9\_Supplement): 678. [[https://aacrjournals.org/cancerres/article/69/9\\_Supplement/678/558831/Abstract-678-Biochemical-mechanism-of-Rutin](https://aacrjournals.org/cancerres/article/69/9_Supplement/678/558831/Abstract-678-Biochemical-mechanism-of-Rutin)].

---

Histórico do artigo | Submissão: 04/12/2024 | Aceite: 03/06/2025

Como citar este artigo: Cardoso CG, Guillo LA. Atividade antiproliferativa do composto bioativo de *Silybum marianum* em linhagem celular de melanoma humano com mutação BRAF: potencial para reposicionamento terapêutico. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2025; 19(1): e1812. e-ISSN 2446-4775. Disponível em: <<https://doi.org/10.32712/2446-4775.2025.1812>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

