

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

CAMYLA CAROLINY NEVES DE ANDRADE

Potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Croton
grewioides* Baill. (Euphorbiaceae): um estudo *in vitro*

JOÃO PESSOA

2021

CAMYLA CAROLINY NEVES DE ANDRADE

**Potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides*
Baill. (Euphorbiaceae): um estudo *in vitro***

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

Orientadora: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa, PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A553p Andrade, Camyla Caroliny Neves de.
Potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de
Croton grewioides Baill. (Euphorbiaceae): um estudo in
vitro / Camyla Caroliny Neves de Andrade. - João
Pessoa, 2021.
107 f. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Óleo essencial. 3. Croton
grewioides Baill. 4. Atividade antitumoral in vitro. 5.
Melanoma. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9:616-006.8(043)

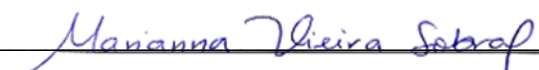
CAMYLA CAROLINY NEVES DE ANDRADE

**Potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* Baill.
(Euphorbiaceae): um estudo *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração Farmacologia.

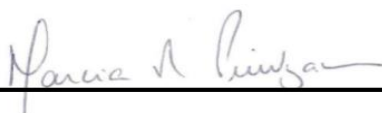
Data e local da defesa: aprovada em 18 de agosto de 2021, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

Orientadora – Universidade Federal da Paraíba



Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

Membro interno – Universidade Federal da Paraíba



Profa. Dra. Glaucia Veríssimo Faheina Martins

Membro externo – Universidade Federal de Campina Grande

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me dado forças, por ter me ajudado nos momentos difíceis, ter me renovado a cada dia, por ser sempre fiel, mesmo quando eu não sou. Tenho plena certeza de que sem Ele eu não teria conseguido;

À minha família, **meu pai, minha mãe e meu irmão**, que me apoiaram, me deram força e incentivo para continuar, por entenderem meus momentos de estresse, meus momentos de apertado quando os experimentos davam errado, mas que sempre estiveram ao meu lado para dizer que tudo ia dar certo;

Aos amigos que fiz ao longo desse mestrado, os quais caminharam junto ao meu lado, passando pelos apertos, pelas alegrias e por todas as situações que a pós-graduação nos propicia. Em especial, **Ana Luiza, Sâmia, Valgrícia, Rafael, Rawny, Thaís e Daiana**, meu muito obrigada pelos momentos divertidos, de descontração e por toda ajuda;

À minha duplinha e amiga que o mestrado me deu, **Ana Luiza**, aquela que dividiu comigo os incansáveis experimentos, os apertos quando dava tudo errado, mas também, aquela que me alegrava com seu jeitinho de ser, tão diferente de mim, mas ao mesmo tempo parecidas em muitas coisas. Amo você e sua amizade;

À minha amiga **Sâmia**, que foi indispensável para que eu conseguisse terminar esse mestrado, aquela que me ajudou em todos os experimentos, sempre disposta a ajudar e a tirar minhas dúvidas, aquela me ajudava com palavras de incentivo e tantas outras coisas, meu muito obrigada por tudo. Amo você e sua amizade;

A todos que fazem parte do Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), **Ana Luiza, Ana Paula, Clarissa, Prof. Juan, Júnior, Karinne, Moisés, Paulo, Rafael, Ramon, Rawny e Valgrícia**, que estiveram presentes no meu dia a dia, ajudando nos momentos em que precisei, muito obrigada pelo companheirismo e por toda dedicação;

À minha orientadora, **Marianna Vieira Sobral**, que aceitou essa responsabilidade, que confiou e acreditou em mim, agradeço por toda ajuda, por ter se dedicado à minha orientação e por ter contribuído tanto para minha formação, muito obrigada por tudo;

Aos membros da Banca Examinadora, **Glaucia Veríssimo** e **Marcia Piuvezam**, por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho;

Aos professores **Juan Gonçalves** e **Tatjana Keesen**, pelas colaborações que prestaram, auxiliando na obtenção dos resultados obtidos neste estudo;

À **Ana Paula**, técnica do OncoFar, que se dispõe a nos ajudar e nos alegra com suas risadas inconfundíveis, com seu carinho e seu compromisso com Deus. Muito obrigada por tudo.;

À **Fátima**, por sempre estar disposta a nos auxiliar nos experimentos no citômetro de fluxo sem se importar com hora e nem em quantas vezes precisasse repetir o experimento, por sempre dizer que daria tudo certo no final. Sem você não teria conseguido chegar até aqui. Muito obrigada pela companhia, pelas conversas, por todo carinho;

Ao **S. Josué** pelo carinho e amor com que trabalha, sempre preocupado em não deixar faltar nada no nosso dia a dia, fazendo tudo com muita disposição e alegria, meu muito obrigado;

Aos **professores do PPgPNSB** por toda dedicação nas disciplinas e todo o conhecimento repassado, como também, à minha **turma do mestrado** pelos momentos alegres, pelo companheirismo nas horas de prova e seminários;

Aos **funcionários do IpeFarm**, em especial às secretárias da pós-graduação **Caroline Manguiera** e **Nilmar de Medeiros**, pela paciência e por toda a ajuda prestada;

À **CAPES** pela bolsa concedida durante o mestrado;

À **Universidade Federal da Paraíba** pelo suporte e contribuição na minha formação acadêmica;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Camylá Carolíny Neves de Andrade

“Mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam” (Isaías 40.31)

"Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?" (Salmos 116.12)

“Não to mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo por onde quer que andares” (Josué 1.9)

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu” (Eclesiastes 3.1)

ANDRADE, C. C. N. **Potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* Baill. (Euphorbiaceae): um estudo *in vitro***. 2021. 109f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O termo câncer constitui um conjunto de doenças que apresenta crescimento e diferenciação celular descontrolados, assim como capacidade invasiva e metastática. Apesar dos avanços na terapia contra o câncer, características como alta citotoxicidade e desenvolvimento de resistência ao tratamento ainda limitam sua efetividade. A espécie vegetal *Croton grewoides* Baill. (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como “canelinha”, “caatinga de cheiro” ou “canelinha de cheiro”, é uma espécie do semiárido brasileiro com atividade antidiarreica, antioxidante e antitumoral em modelo de sarcoma 180 em camundongos. Nessa perspectiva, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antitumoral do óleo essencial extraído das folhas de *C. grewoides* (OEC), por meio de ensaios *in vitro*. A citotoxicidade foi avaliada em linhagens de células tumorais (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28) e não tumoral (HaCaT) humanas, por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio). O OEC induziu maior citotoxicidade em linhagem de melanoma, SK-MEL-28, obtendo-se um valor de concentração inibitória 50% (CI₅₀) de 70,0 µg/mL, em 72 horas. A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada em linhagem não tumoral, HaCaT, obtendo-se um valor de CI₅₀ de 214,0 µg/mL, após 72 horas. A droga padrão, doxorrubicina (DOX), apresentou alta toxicidade em SK-MEL-28 e em HaCaT, com valores de CI₅₀ de 4,0 e 0,28 µM, respectivamente. A partir desses resultados, foi possível determinar o índice de seletividade (IS), que estabelece o quanto a amostra é mais seletiva para a célula tumoral, em relação a célula não tumoral, sendo calculado um IS de 3,06 e 0,07 para o OEC e DOX, respectivamente. Para elucidar os mecanismos de ação *in vitro* envolvidos na atividade antitumoral do OEC, foram avaliados seus efeitos no ciclo celular, na indução de apoptose e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), usando concentrações correspondentes a CI₅₀ e ao dobro (70,0 e 140,0 µg/mL) em células SK-MEL-28. Após 48 horas de tratamento, OEC alterou a progressão do ciclo celular, induzindo aumento no percentual de células na fase G2/M (p<0,01) e o aparecimento da fração sub-G1 (p<0,0001), o que é indicativo de apoptose. Por meio da análise por microscopia confocal, foram observadas características morfológicas indicativas de morte celular por apoptose, como formação de *blebs* na membrana, corpos apoptóticos e condensação da cromatina, as quais foram confirmadas pela externalização da fosfatidilserina por meio da marcação com anexina V-FITC (p<0,0001), após 48 horas de tratamento com OEC. Em relação à produção de EROs, o OEC reduziu significativamente o nível de EROs (p<0,0001), em ambas as concentrações testadas após 24 horas de tratamento, sugerindo que o efeito antitumoral de OEC está associado a uma ação antioxidante. Em conclusão, os resultados apresentados indicam que o OEC possui atividade antitumoral *in vitro* em células da linhagem de melanoma, SK-MEL-28, por promover alterações no ciclo celular, indução de apoptose e efeito antioxidante, além de apresentar baixa toxicidade em linhagem de células não tumorais (HaCaT).

Palavras-chave: Óleo essencial. *Croton grewoides* Baill. Atividade antitumoral *in vitro*. Melanoma.

ANDRADE, C. C. N. **Antitumor potential of the essential oil from the leaves of *Croton grewoides* Baill. (Euphorbiaceae): an *in vitro* study.** 2021. 109f. **Dissertation** (Masters in Bioactive Natural and Synthetic Products) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

The term cancer is a set of diseases that present uncontrolled cell growth and differentiation, as well as invasive and metastatic capacity. Despite advances in cancer therapy, characteristics such as high cytotoxicity and development of resistance to treatment still limit its effectiveness. The plant species *Croton grewoides* Baill. (Euphorbiaceae), popularly known as “canelinha”, “smell caatinga” or “smell canelinha”, is a species from the Brazilian semiarid region with antidiarrheal, antioxidant and antitumor activity in a mouse sarcoma 180 model. In this perspective, the aim of the present work was to evaluate the antitumor potential of the essential oil extracted from the leaves of *C. grewoides* (OEC), through *in vitro* assays. Cytotoxicity was evaluated in human tumor (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28) and non-tumor (HaCaT) cell lines through the reduction assay of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). OEC induced greater cytotoxicity in melanoma strain, SK-MEL-28, obtaining an inhibitory concentration 50% (IC₅₀) of 70.0 µg/mL, in 72 hours. *In vitro* cytotoxicity was evaluated in a non-tumor strain, HaCaT, obtaining an IC₅₀ value of 214.0 µg/mL, after 72 hours. The standard drug, doxorubicin (DOX), showed high toxicity in SK-MEL-28 and in HaCaT, with IC₅₀ values of 4.0 and 0.28 µM, respectively. To elucidate the *in vitro* mechanisms of action involved in the antitumor activity of OEC, its effects on the cell cycle, induction of apoptosis and production of reactive oxygen species (ROS) were evaluated using concentrations corresponding to IC₅₀ and double (70, 0 and 140.0 µg/ml) in SK-MEL-28 cells. After 48 hours of treatment, OEC altered the progression of the cell cycle, inducing an increase in the percentage of cells in the G₂/M phase ($p < 0.01$) and the appearance of the sub-G₁ fraction ($p < 0.0001$), which is indicative of apoptosis. Through confocal microscopy analysis, morphological characteristics indicative of cell death by apoptosis were observed, such as formation of blebs in the membrane, apoptotic bodies and chromatin condensation, which were confirmed by the externalization of phosphatidylserine through annexin V-FITC labeling ($p < 0.0001$) after 48 hours of treatment with OEC. Regarding the production of ROS, OEC significantly reduced the level of ROS ($p < 0.0001$), at both concentrations tested after 24 hours of treatment, suggesting that the antitumor effect of OEC is associated with an antioxidant action. In conclusion, the results presented indicate that OEC has *in vitro* antitumor activity in cells of the melanoma lineage, SK-MEL-28, by promoting changes in the cell cycle, induction of apoptosis and antioxidant effect, in addition to presenting low toxicity in the melanoma lineage. non-tumor cells (HaCaT).

Keywords: Essential oil. *Croton grewoides* Baill. *In vitro* antitumor activity. Melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características biológicas das células cancerígenas	27
Figura 2 – Progressão do ciclo celular e principais proteínas reguladoras	32
Figura 3 – Vias de ativação da apoptose	37
Figura 4 – Papel dual das EROs no crescimento tumoral	42
Figura 5 – Efeito do tratamento de 48 horas com o OEC ^a (70 µg/mL) ou DXR ^b (4,0 µM) em células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo	69
Figura 6 – <i>Dotplots</i> representativos de células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com Anexina V- FITC e iodeto de propídeo, após tratamento (48 horas) com OEC ^a (70 e 140 µg/mL) ou DXR ^b (4,0 µM)	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito do OEC ^a ou DXR ^b sobre a viabilidade de células da linhagem SK-MEL-28 após 24, 48 e 72 horas de tratamento	65
Gráfico 2 – Efeito do OEC ^a ou DXR ^b sobre a viabilidade de células da linhagem não tumoral HaCaT, após 72 horas de tratamento	66
Gráfico 3 – Efeito do OEC ^a ou DXR ^b sobre a progressão do ciclo celular em células da linhagem SK-MEL-28, após 48 horas de tratamento	67
Gráfico 4 – Efeito do OEC ^a (70 µg/mL) ou DXR ^b (4,0 µM) em células SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo, após 48 horas de tratamento	71
Gráfico 5 – Efeito do OEC ^a (70 e 140 µg/mL) ou DXR ^b (4,0 µM) em células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com Anexina V- FITC e iodeto de propídeo, após 48 horas de tratamento	73
Gráfico 6 – Efeito do OEC ^a (70 e 140 µg/mL) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células da linhagem SK-MEL-28, após 24 horas de tratamento	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas utilizadas neste trabalho	57
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de *Croton grewoides***52**

Tabela 2 – Citotoxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* (OEC), utilizando o ensaio de redução do MTT após 72 horas de tratamento**64**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluorouracil
A-549	Carcinoma de pulmão humano
ACT	terapia celular adotiva
AIF	Fator indutor de apoptose
AMTAC-17	(E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APAF-1	Fator de ativação da protease apoptótica 1
APC/C	Complexo cromossomo promotor de anáfase
ATM	Cinase de Ataxia-telangiectasia mutada
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Ataxia telangiectasia e relacionada com Rad3
AV	Anexina V
BAD	Antagonista Bcl-2 de morte celular
BAK	Antagonista assassino Bcl-2 1
BAX	Proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	Linfoma 2 de células B
B-MYB	Proteína B relacionada a Myb
BEL-7402	Hepatoma
BRAF	Proto-oncogene B-Raf, serina/treonina quinase
BRCA	Breast cancer gene
CAD	DNase ativada por caspase
CAT	Catalase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDK	Cinase Ciclina-Dependentes
CDKI	Inibidores de Cinase Ciclina-Dependentes
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CH₅₀	Concentração que produz 50 % de hemólise
Chk	Cinase do ponto de checagem

Cl₅₀	Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular
c-SRC	Proto-oncogene tirosinocinase Src
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Fluoróforo 2',7'-diacetato diclorofluoresceína
DIABLO	Proteína de ligação direta de IAP com baixo ponto isoelétrico
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DLD-1	Adenocarcinoma de cólon humano
DMEM	Meio águia modificada de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
e.p.m.	Erro padrão da média
E2F	Família do fator E2
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
endoG	endonuclease G
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F-12K	Modificação de Kaighn do meio F-12 de Ham
FADD	Proteína do domínio da morte associada ao Fas
Fas-L	Ligante Fas
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Formazan	[(E, Z) -5- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -1,3-difenilformazan]
FoxM1	Proteína M1 da caixa forkhead
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
HaCaT	Queratinócito humano
HCT-116	Carcinoma colorretal
HeLa	Adenocarcinoma de colo do útero
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

HL-60	Leucemia humana
HPV	Vírus do papiloma humano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INK	Família de CKIs
IP	Iodeto de propídio
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IS	Índice de seletividade
JAK/STAT	Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição
KRAS	Gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
LA	Laranja de acridina
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises
LNCaP	Câncer de próstata
mAb	Anticorpos monoclonais
MAPK	Proteína cinase associada a microtúbulos
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama
MMP	Modulação de metaloproteinases
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NF-κB	Fator nuclear kappa - intensificador da cadeia leve de células B ativadas
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homólogo
OEC	Óleo essencial de <i>Croton grewioides</i>
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Solução tampão fosfato
PC-3	Carcinoma de próstata
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PMEM	Permeabilização da membrana externa mitocondrial
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
RB	Proteína retinoblastoma

RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Instituto Memorial Roswell Park
SBF	Soro bovino fetal
SC	Células-tronco normais
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SK-MEL-28	Melanoma maligno
SMAC/DIABLO	Segundo ativador da caspase derivado da mitocôndria
SOD	Superóxido dismutase
TKIs	Inibidores das proteínas tirosina cinases
TNF-β	Fator de crescimento tumoral β
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TP53	Gene da proteína tumoral p53
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRADD	Proteína de domínio de morte associada ao receptor de fator de necrose tumoral tipo 1
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Radiação ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
X-17	Adenocarcinoma de cólon humano (variante genética de LoVo deficiente de proteína P53)
XIAP	Inibidor de apoptose ligado ao X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1 Aspectos gerais do câncer	23
2.2 Ciclo celular e apoptose	28
2.3 Estresse oxidativo no câncer	39
2.4 Farmacoterapia do câncer	43
2.5 Modelos experimentais	47
2.6 Aspectos gerais sobre <i>Croton grewoides</i> Baill.....	50
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo gerais	54
3.2 Objetivos específicos	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Local da pesquisa	56
4.2 Material	56
4.2.1 Amostra	56
4.2.2 Cultivo celular	57
4.3 Métodos	58
4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais	58
4.3.2 Avaliação da regulação do ciclo celular	59
4.3.3 Análise morfológica da apoptose por laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP)	60
4.3.4 Avaliação dos efeitos do óleo essencial de <i>Croton grewoides</i> sobre a externalização da fosfatidilserina	60
4.3.5 Avaliação do OEC sobre o estado redox celular	61
4.4 Análise estatística	62
5 RESULTADOS	64
5.1 Citotoxicidade em células tumorais e não tumoral	64
5.2 Investigação da ação antitumoral <i>in vitro</i> do OEC	66

5.2.1 Avaliação do ciclo celular	67
5.2.2 Análise morfológica por microscopia confocal	68
5.2.3 Dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídio	71
5.2.4 Quantificação de espécies reativas de oxigênio	73
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	86

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer inicia-se a partir do acúmulo de inúmeras mutações em um tipo celular, que faz com que essas células adquiram uma variedade de características que lhe propiciam sobrevivência e proliferação celular descontrolada (JAN, 2019; ABOTALEB *et al.*, 2019). Essas células possuem propriedades instáveis o que lhes confere malignidade, influenciando em sua capacidade de invasão e disseminação, permitindo atravessar limites adjacentes, o sistema linfático e a corrente sanguínea para promover o surgimento de metástases (ABOTALEB *et al.*, 2019; NGUYEN; PANDEY, 2019).

Do ponto de vista epidemiológico, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo (ABOTALEB *et al.*, 2019) sendo, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), a causa de mais de 10 milhões de mortes todos os anos (FERLAY *et al.*, 2020). Para o triênio 2020-2022, a estimativa no Brasil é que ocorram cerca de 625 mil casos novos de câncer, para cada ano (INCA, 2020). Estima-se que até 2035, surjam mais de 1,5 milhões de novos casos de câncer na América do Sul (IARC, 2018), e que em 2030 a quantidade de novos casos de câncer no mundo seja de 21,4 milhões, tendo 13,2 milhões de mortes relacionadas, devido ao envelhecimento da população (MANSO *et al.*, 2017).

O tratamento do câncer apresenta-se como um grande desafio devido às inúmeras características adquiridas pelas células cancerígenas e às vias de sinalização constitutivamente ativas, que lhes conferem resistência à terapia comumente utilizada (NGUYEN; PANDEY, 2019; SENGU; GROSE, 2021). Atualmente, as terapias utilizadas para o tratamento do câncer consistem em quimioterapia, imunoterapia, radioterapia, cirurgia, transplante de medula óssea, terapia fotodinâmica, terapia alvo, entre outros (TAN; NORHAIZAN, 2019; YANG *et al.*, 2020).

A quimioterapia é a modalidade terapêutica mais utilizada e consiste em produzir citotoxicidade nas células tumorais (SCHIRRMACHER; 2019; TAN; NORHAIZAN, 2019). No entanto, observa-se uma elevada toxicidade sistêmica e o desenvolvimento de resistência por parte das células cancerígenas, o que estimula a realização de pesquisas que buscam novas terapias mais seletivas que apresentem

maior eficácia e menor toxicidade (DICKENS; AHMED, 2018; SCHIRRMACHER, 2019; ALI *et al.*, 2020).

Nesse contexto, destacam-se os produtos naturais, visto que o Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Apesar disso, estima-se que apenas 10% dessa biodiversidade foi estudada, existindo ainda muitas espécies que não foram investigadas e que podem apresentar potencial farmacológico (PINHO, 2016; STEHMANN; SOBRAL, 2017). Aliado a isso, desde o final de 1930, quando foi introduzida a quimioterapia, dos cerca de 206 compostos aprovados para uso em todo o mundo, aproximadamente 75% são produtos naturais ou derivados destes, o que caracteriza os produtos naturais como uma importante fonte para a descoberta de novas terapias anticâncer (CRAGG; NEWMAN, 2013; AMARAL *et al.*, 2019).

O gênero *Croton* é um dos mais estudados da família Euphorbiaceae, pertence à subfamília Crotonoideae composta por cerca de 1300 espécies, sendo considerado um gênero de grande importância na flora brasileira, com cerca de 300 espécies (PRADO *et al.*, 2021). Diversas espécies do gênero *Croton* são caracterizadas pela produção de óleo essencial, a maioria rica em mono e sesquiterpenos, enquanto os óleos essenciais de *C. zehntneri* e *C. grewioides* são compostos principalmente por fenilpropanoides (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A espécie *Croton grewioides* Baill. é encontrada em todos os estados da região Nordeste do Brasil, mais precisamente nas regiões semiáridas. É conhecida popularmente como “canelinha”, “caatinga de cheiro” ou “canelinha-de-cheiro” por causa do aroma exalado de suas folhas (PRADO *et al.*, 2021). Estudos anteriores evidenciaram atividade antidiarreica do extrato etanólico bruto de partes aéreas de *C. grewioides* (SILVA *et al.*, 2016), atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e caule de *C. grewioides* (NASCIMENTO, 2011) e atividade antitumoral *in vivo* em modelo de sarcoma 180 em camundongos (SOUSA, 2013; CAVALCANTI; DA SILVEIRA; DA SILVA, 2020). Todavia, sua atividade em linhagens de células humanas e seus mecanismos de ação antitumoral não foram avaliados.

Diante disso, este trabalho apresenta o estudo do óleo essencial obtido das folhas de *Croton grewioides* em células tumorais humanas, e demonstra seu efeito no ciclo celular, no estresse oxidativo e na indução de apoptose.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

O crescimento celular é um processo biológico, dinâmico e contínuo de multiplicação e aumento do tamanho celular, que tem como objetivo manter a homeostase tecidual e a substituição celular ao longo da vida (DE AQUINO, 2011; RUIJTENBERG; VAN DEN HEUVEL, 2016). O crescimento e a proliferação celular são coordenados pelo ciclo celular, um processo altamente regulado que envolve múltiplos ciclos de realimentação que permitem ou impedem a divisão celular (HYDBRING *et al.*, 2016, MOHAMED *et al.*, 2018).

No entanto, problemas no controle do ciclo celular ou na perda da diferenciação celular tornam as células normais autossuficientes em relação à sinais mitogênicos e insensíveis a sinais inibitórios de proliferação, resultando em um crescimento celular descontrolado, caracterizado pelas neoplasias ou tumores (SACOMAN, 2007; STRICKER; KUMAR, 2008; RUIJTENBERG; VAN DEN HEUVEL, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2019).

As neoplasias são classificadas, a depender de suas características morfológicas e funcionais, em benignas ou malignas. As neoplasias benignas apresentam um crescimento organizado, geralmente lento, com células bem diferenciadas, semelhantes às células do tecido de origem, são encapsuladas, e, principalmente, não são invasivas (OUYANG *et al.*, 2013; ALMEIDA, 2018). Já nas neoplasias malignas, as células apresentam um crescimento descontrolado, com um maior grau de autonomia, não possuem cápsula, são infiltrativas e são indiferenciadas, ou seja, não se assemelham as células do tecido de origem (OUYANG *et al.*, 2013; ISRAEL *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2019).

O câncer, ou neoplasia maligna, é uma das principais causas de morbimortalidade no mundo, sendo considerado um problema grave de saúde pública (GONZÁLEZ-CHAVARRÍA *et al.*, 2020). Caracteriza-se pelo crescimento celular desordenado e pela capacidade de invadir tecidos e órgãos através da corrente sanguínea e de vasos linfáticos dando origem às metástases (NAOZUKA; MENEZES; ALMEIDA, 2020).

Os cânceres são comumente diferenciados de acordo com o tecido ou com as células que estão se proliferando, e são classificados em: carcinomas, quando surgem a partir de células epiteliais que revestem os órgãos (quando esse epitélio é de origem glandular passam a ser chamados de adenocarcinomas); sarcomas, quando surgem a partir de células mesenquimais de tecidos moles e ossos; leucemias, quando surgem a partir de células hematopoiéticas da linhagem eritrocitária ou leucocitária; e os linfomas, tumores que se originam no sistema linfático (linfonodos e gânglios) (FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2009; MACHADO, 2011; GROISBERG *et al.*, 2017; INCA, 2020).

O câncer inicia-se em uma única célula a partir do acúmulo de mutações somáticas causadas por alterações genéticas, como mutações pontuais nas sequências de DNA; epigenéticas, como a metilação aberrante do DNA ou a acetilação das histonas; ou cromossômicas, como translocações, deleções e amplificações cromossômicas (LIN *et al.*, 2015; NUNNEY, 2016; LIN *et al.*, 2020). Todas essas alterações à nível celular, genético e epigenético quebram o equilíbrio entre a apoptose e a proliferação celular e, conseqüentemente, favorecem o desenvolvimento do câncer. O processo de formação do câncer a partir da transformação de células normais em células cancerígenas é conhecido como carcinogênese (ARAÚJO *et al.*, 2019; SHI; BISHAYEE; BHATIA, 2019; RODRIGO *et al.*, 2020).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, mas, basicamente, é dividida em três estágios principais: a iniciação, a promoção e a progressão (BASU; NOHMI, 2018; CONG *et al.*, 2018; MÄKITIE *et al.*, 2019). O estágio de iniciação é caracterizado por danos ao DNA que promovem alterações em determinados genes envolvidos com a proliferação, sobrevivência, diferenciação celular e apoptose, é um processo que pode ocorrer de forma espontânea ou induzida por um agente mutagênico endógeno ou exógeno, como exemplo, espécies reativas de oxigênio e fumaça de cigarro, respectivamente (RUNDHAUG; FISCHER, 2010; SIDDIQUI *et al.*, 2015; HYNDMAN, 2016).

A promoção constitui uma etapa lenta e reversível, caracterizada por atividade clastogênica, instabilidade genética e proliferação contínua das células tumorais. Nesse estágio, células inflamatórias são recrutadas por meio da ativação de vias intrínsecas impulsionadas pela ativação de proto-oncogenes, além disso, essa fase

também é estimulada pela ação do fator de necrose tumoral α (TNF- α), que irá acelerar a fase de promoção e estimular a fase de progressão (SMITH *et al.*, 2016; BASU, 2018).

O estágio de progressão está relacionado a processos celulares e moleculares complexos que causam a transformação irreversível de células pré-malignas em células cancerígenas, e ocorre como resultado de alterações genéticas e epigenéticas adicionais que promovem o potencial invasivo e metastático dessas células (AYOB; RAMASAMY, 2018; MÜLLER-COAN *et al.*, 2018). A metástase é caracterizada pela migração das células cancerígenas do local primário do tumor para outros locais do corpo através da corrente sanguínea ou dos vasos linfáticos. É um processo que inclui várias etapas, tais como: proliferação, angiogênese, descolamento/invasão local, intravasamento e extravasamento para a corrente sanguínea e crescimento no tecido/órgão distante (SIDDIQUI *et al.*, 2015; HYNDMAN, 2016; MÜLLER-COAN *et al.*, 2018).

As mutações que causam o câncer são resultado de danos ao DNA que não foram reparados adequadamente, de erros na replicação ou da inserção ou exclusão de segmentos do DNA, com consequente produção de proteínas aberrantes (BASU; NOHMI, 2018). Essas mutações podem estar associadas a um aumento na estimulação da divisão celular devido à ativação de proto-oncogenes, bem como, pela perda de função de genes supressores de tumor (ZHAO *et al.*, 2018; SANTOS, 2019). Os proto-oncogenes são genes normais envolvidos no estímulo da divisão celular que, quando alterados por mutações, tornam-se oncogenes (genes causadores de câncer), como exemplos, o KRAS, o NRAS, o BRAF, entre outros. Esses oncogenes podem promover a hiperativação de vias de sinalização que induzem à proliferação descontrolada das células (SANTOS, 2019; REAGAN, 2019).

Em contrapartida, os genes supressores de tumor são genes que estão normalmente ativos e, por mais que estejam relacionados ao desenvolvimento das células, possuem atividade contrária à dos proto-oncogenes, pois atuam inibindo a divisão celular. Quando inativos, por ação de agentes mutagênicos, estes deixam de inibir pontos chave nas vias de sinalização ligadas à proliferação celular, como exemplos, o TP53, o PTEN, o RB1, entre outros. Em conjunto, essas mutações proporcionam às células tumorais uma capacidade de autorrenovação elevada que as

auxilia a superar as células vizinhas, cooperando assim para a transformação neoplásica (ZHAO *et al.*, 2018; SANTOS, 2019; REAGAN, 2019).

As células cancerígenas apresentam diversas características que as diferenciam das células normais e que lhes conferem certas habilidades que promovem seu crescimento e sua manutenção, são elas: i) sinalização proliferativa sustentada – associada à secreção excessiva de fatores de crescimento, hiperresponsividade celular, ativação contínua de vias de sinalização proliferativas e bloqueio de vias de *feedback* negativo (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; KHABAR, 2017); ii) fuga de supressores de tumor – por meio da atenuação ou inativação de supressores de tumor como TP53, proteína retinoblastoma (Rb), homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) e fator de crescimento tumoral β (TNF- β) (KHABAR, 2017; AHN *et al.*, 2019); iii) resistência à apoptose – por meio da regulação positiva de proteínas antiapoptóticas, como as proteínas da família Bcl-2, inativação de genes supressores de tumor, como TP53, e diminuição da produção de fatores pró-apoptóticos (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; GIAMPAZOLIAS; TAIT, 2016; AHN *et al.*, 2019); iv) indução de angiogênese – por meio da desregulação de fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos resultando na formação de novos vasos sanguíneos para captação de nutrientes e oxigênio (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; FOUAD; AANEI, 2017; DE LA VEGA; CHAPMAN; ZHANG, 2018); v) inflamação promotora do tumor – caracterizada pela presença de células imunes residentes, como células dendríticas, macrófagos associados a tumores e outras células que, em vez de impedir o crescimento tumoral, promovem sua progressão e criam um microambiente inflamatório que remodela o tecido e induz angiogênese e metástase (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; DE LA VEGA; CHAPMAN; ZHANG, 2018); vi) evasão da destruição da resposta imune específica – as células tumorais adquirem a capacidade de evitar a detecção e a eliminação pelas células imunes devido a alterações genéticas e epigenéticas (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; FOUAD; AANEI, 2017; CAON *et al.*, 2020); vii) reprogramação do metabolismo energético – geração rápida de adenosina trifosfato (ATP) para sustentar o *status* energético, aumento da biossíntese de macromoléculas e regulação rigorosa do estado redox celular (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; SANCHO; BARNEDA; HEESCHEN, 2016; CAON *et al.*, 2020); viii) imortalidade replicativa – quando as células tumorais superam o processo de encurtamento dos telômeros tornando-se imortais (HANAHAHAN;

WEINBERG, 2011; HORNSVELD; DANSEN, 2016; MOSES *et al.*, 2018); ix) ativação de invasão e metástase – por meio da desestruturação de moléculas de adesão celular, como a E-caderina, promovendo a perda da adesão célula-célula, e aumento na regulação de moléculas de adesão associadas à migração celular, como a N-caderina, promovendo a invasão local, migração de células pela corrente sanguínea e propagação em outro local (HANAHAN; WEINBERG, 2011; NUDELMAN *et al.*, 2019); e, por fim, x) instabilidade do genoma e mutação – decorrente de mutações ou silenciamento epigenético de genes que previnem, detectam e reparam danos ao DNA, resultando em acúmulo de mutações adicionais, incluindo amplificações, deleções e rearranjos cromossômicos (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MOSES *et al.*, 2018).

Figura 1 – Características biológicas das células cancerígenas



Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011

O câncer é considerado uma doença multifatorial (KUMAR *et al.*, 2017) e pode ocorrer devido a fatores ambientais, como poluição, raios UV/solares, radiações ionizantes e agentes biológicos (alguns vírus, como HPV, HIV1, etc.; bactérias, como *H. pylori*; e parasitas, como *Schistosoma mansoni*), e também devido a hábitos do indivíduo, como tabagismo, consumo de álcool, má alimentação, obesidade etc., o

que, em conjunto, contribui para o surgimento de cerca de 90 – 95% dos cânceres (MARU *et al.*, 2016; RAASCHOU-NIELSEN *et al.*, 2016; TAYLOR *et al.*, 2017; MASSARWEH; EL-SERAG, 2017; LEWANDOWSKA *et al.*, 2019; DUTTA *et al.*, 2019). Em adição, fatores hereditários também estão associados ao desenvolvimento do câncer, porém, correspondem a apenas a 5% dos casos. Como exemplo pode ser citado a predisposição hereditária para desenvolvimento do câncer de mama, devido às mutações patogênicas nos genes BRCA1 ou BRCA2. Além disso, o próprio envelhecimento humano constitui um fator de risco para o surgimento do câncer, assim como, mutações aleatórias que acontecem durante a replicação do DNA em células-tronco normais (SCs) (PODOLSKIY; GLADYSHEV, 2016; SANTOS, 2019; REAGAN, 2019).

Em relação aos dados epidemiológicos, o câncer é considerado a segunda causa de morte na população, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (XIAO *et al.*, 2018; RUSSO; RUSSO, 2018). Apenas no ano de 2018, foram registrados aproximadamente 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer no mundo, segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) da OMS (DUTTA *et al.*, 2019). Para o triênio 2020-2022, a estimativa no Brasil é que ocorram cerca de 625 mil casos novos de câncer, para cada ano. Os tipos de câncer mais frequentes no Brasil em homens são próstata (29,2%) e traqueia, brônquio e pulmão (9,1%), e, em mulheres, são mama (29,7%) e cólon e reto (9,2%) (KUMAR; JAITAK, 2019; INCA, 2020). Estima-se que até 2050, surjam mais de 27 milhões de novos casos de câncer e 17,1 milhões de mortes por ano (KUMAR; JAITAK, 2019).

2.2 Ciclo celular e apoptose

O ciclo celular é um mecanismo ordenado que progride através de uma sequência bem definida de estágios, por meio da qual uma célula duplica seu DNA e depois se divide para formar duas células filhas idênticas (KAMENZ; FERRELL JÚNIOR, 2017; HUSTEDT; DUROCHER, 2020). A progressão no ciclo celular depende de sinais reguladores de crescimento, e esse processo é dividido em dois eventos principais: a duplicação do DNA, que ocorre na fase S (síntese de DNA), e a mitose, fase M (divisão do material genético e citocinese). Entre esses dois eventos estão as fases G1 (na qual as células verificam se devem crescer, dividir-se ou entrar

em quiescência, G0) e G2 (preparação para a mitose) (INGHAM; SCHWARTZ, 2017; OTTO; SICINSKI, 2017; HUSTEDT; DUROCHER, 2020).

Para que o ciclo celular possa prosseguir corretamente, existem pontos de verificação, também chamados de *checkpoints*, que garantem que cada estágio seja concluído antes que se inicie o outro (SHERR; BARTEK, 2017). Esses pontos de verificação garantem, por exemplo, que as células na fase G1 que sofreram danos ao DNA não passem para a fase S, e que o dano ocorrido na replicação do DNA durante a fase S seja corrigido antes que as células passem para a mitose, ou que os cromossomos duplicados sejam alinhados adequadamente no fuso mitótico antes da citocinese (VISCONTI; MONICA; GRIECO, 2016; SHERR; BARTEK, 2017).

Na fase G1, as células respondem a sinais extracelulares que determinam se estas irão se dividir novamente ou se entrarão em estado G0 (CRUZ, 2010). A maioria das células do organismo humano permanece na fase G0, na qual a célula não avança para as demais fases do ciclo celular, permanecendo em um estágio de “dormência”, e estas só retornam ao ciclo celular se receberem estímulo de fatores mitogênicos (SWAFFER *et al.*, 2016; OTTO; SICINSKI, 2017).

Durante a fase G1, a célula prepara-se para a próxima fase aumentando seu tamanho e duplicando suas organelas. Além disso, também são sintetizadas enzimas necessárias para o funcionamento da fase S, como enzimas que irão favorecer a síntese de trifosfatos de desoxirribonucleosídeos, enzimas da síntese de DNA polimerase, dentre outras (ALBERTS *et al.*, 2017; SOUZA, 2018). Ao final da fase G1, a célula passa pelo primeiro ponto de verificação, conhecido como ponto de checagem G1, que irá verificar a integridade do DNA e analisar se o ambiente está adequado para entrar na fase S (ALBERTS *et al.*, 2017; NEPOMUCENO *et al.*, 2017).

A fase S compreende a fase de síntese, em que ocorre a duplicação do material genético de modo semiconservativo, na qual cada um dos cromossomos é replicado uma única vez (MALUMBRES, 2020). Em seguida, a célula passa para a fase G2, a qual evidencia-se pelo início da condensação dos cromossomos e pela migração dos centríolos e centrossomos para polos opostos. Na fase G2, a célula passa pelo segundo ponto de verificação, o ponto de checagem G2, que tem como função analisar se o DNA foi replicado completamente (CHAUDHARY *et al.*, 2013; NEPOMUCENO *et al.*, 2017).

A fase M (mitose), uma fase rápida, divide-se em quatro etapas: prófase, metáfase, anáfase e telófase, na qual o conteúdo celular já duplicado durante as fases antecessoras é dividido dando origem a duas células filhas (SOUZA, 2018; MALUMBRES, 2020). Nessa fase, ocorre basicamente dois processos: a cariocinese, que compreende a divisão do núcleo celular, e a citocinese, que compreende a divisão citoplasmática (NEPOMUCENO *et al.*, 2017; SOUZA, 2018).

Para garantir que a duplicação do DNA e das organelas, assim como a divisão celular, ocorram de forma correta e ordenada, as células possuem um sistema de controle que orchestra a progressão da fase G1 para a fase S e da fase G2 para a mitose, esse sistema de controle é composto pelos complexos ciclina-CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*) (SWAFFER *et al.*, 2016; FONSECA, 2018). Os principais constituintes dos complexos ciclina-CDKs são proteínas denominadas de ciclinas, as quais se ligam, ativam e apresentam especificidade de substrato com as CDKs. Diferentes CDKs são expressas constantemente ao longo do ciclo, e são acionadas de maneira sequencial e em momentos específicos, quando a oscilação entre a expressão e a degradação das ciclinas é propícia (FONSECA, 2018; LIU *et al.*, 2019).

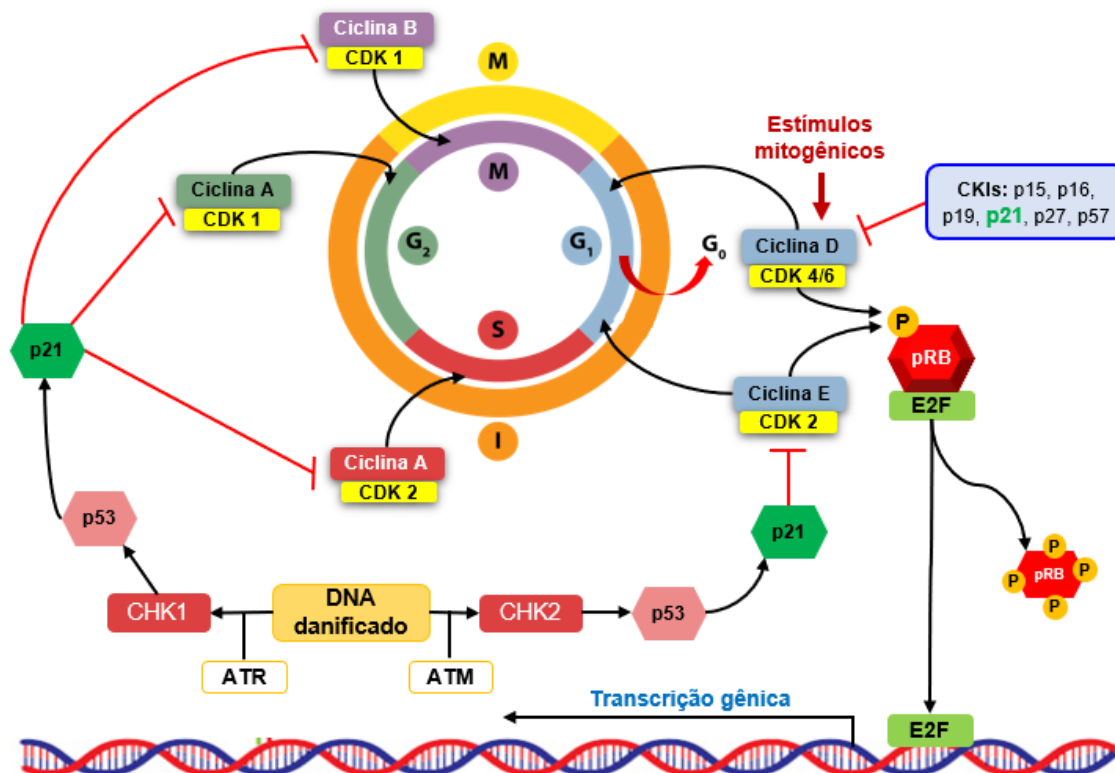
As CDKs constituem uma grande subfamília de cinases de serina/treonina que possuem uma subunidade catalítica e uma subunidade reguladora (ciclinas), e são responsáveis pela fosforilação de proteínas intracelulares que conduzem os eventos moleculares da progressão sistemática do ciclo celular (INGHAM; SCHWARTZ, 2017; MALUMBRES, 2020). As principais CDKs do ciclo celular são as CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6, que atuam em conjunto com ciclinas específicas, tais como A, B, D e E, para formar cinases enzimaticamente ativas (MALUMBRES, 2020; HUSTEDT; DUROCHER, 2020). A CDK1 interage com ciclinas do tipo A e B, a CDK2 com ciclinas A e E, e as CDK4 e CDK6 interagem com ciclinas do tipo D (D1, D2, D3). A atividade da CDK é comumente baixa na fase G1 e vai aumentando sucessivamente até alcançar a atividade máxima após entrar na fase M (INGHAM; SCHWARTZ, 2017; HUSTEDT; DUROCHER, 2020).

Cada transição entre as fases do ciclo é regulada por complexos distintos de ciclina-CDKs (FEDEDA; GERLICH, 2012; MOHAMED *et al.*, 2018). Alguns desses complexos estão empenhados principalmente na regulação da fase G1, as ciclinas D (D1, D2 e D3) são as primeiras ciclinas que percebem os sinais mitogênicos, dessa forma, atuam como sensores do fator de crescimento, ativando CDK4 e CDK6 na fase

G1 (CROSS *et al.*, 2011; KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016; KAMENZ; FERRELL JÚNIOR, 2017). O aumento da atividade da ciclina D-CDK4/6 promove a fosforilação da proteína supressora de tumor retinoblastoma (RB) e inibição de p53, levando a liberação de E2F do complexo pRB-E2F. RB é uma supressora de tumor que se liga ao fator de transcrição E2F para impedir a progressão do ciclo celular (Figura 2) (ZHENG *et al.*, 2019; ICARD *et al.*, 2019).

Em seguida, a ativação da CDK2 pela ciclina E1 e E2 induz a transição da fase G1 para a fase S (INGHAM; SCHWARTZ, 2017). Posteriormente, durante a fase S, a degradação e substituição da ciclina E pela ciclina A, ativa-a, e esta, acopla-se a CDK2 e a CDK1 promovendo a progressão da fase S para a mitose. Ao final da fase G2, a ciclina B ativa a CDK1 e conduz a separação do material genético para as células filhas (KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016; LIU *et al.*, 2019). A degradação das ciclinas A e B, mediada pelo complexo cromossomo promotor de anáfase (APC/C), resulta no fim da mitose, e a célula retorna para a fase G1 (Figura 2) (HUSTEDT; DUROCHER, 2020).

Além dos reguladores positivos do ciclo celular, a atividade das CDKs também é regulada por reguladores negativos, chamados de CKIs (*CDK inhibitor proteins*). Os CKIs são comumente expressos na fase G1, em resposta a fatores extracelulares antiproliferativos ou em resposta a danos no DNA. Os CKIs são classificados em duas famílias distintas, a família INK4 e a CIP/KIP, cada qual possuindo especificidades para as diferentes CDKs (FONSECA, 2018; LIU *et al.*, 2019). As proteínas INK (p16, p15, p18 e p19) interagem com CDK4 ou CDK6 e inibem sua ligação com as ciclinas D. As proteínas CIP/KIP (p21, p27 e p57) criam complexos ternários com ciclina-CDK2 e ciclina-CDK1 e inibem suas atividades catalíticas (LIU *et al.*, 2019).

Figura 2 – Progressão do ciclo celular e principais proteínas reguladoras

Fonte: Adaptado de SHERR; BARKET, 2017; OTTO; SICINSKI, 2017.

Legenda: Fatores mitogênicos ativam complexos ciclinas-CDKs que iniciam a progressão da fase G₁ para a fase S por meio da fosforilação (P) de diversos alvos moleculares, dentre eles a proteína retinoblastoma (RB). A hiperfosforilação de RB restringe sua atividade supressora de crescimento e promove a ativação da transcrição pela família de fatores de transcrição E2F. A transição da fase S e da fase G₂ para a fase M, também é regulada pelos complexos ciclina-CDK. Frequentemente, as células saem do ciclo celular e entram em um estágio no qual ela não avança para as demais fases do ciclo, podendo ser de forma reversível ou permanente (fase G₀). Além disso, o dano ao DNA é detectado por proteínas sensoras (ATM e ATR) que reconhecem o DNA danificado e desencadeiam a parada do ciclo celular através da ativação da Chk2 e p53 na fase G₁, ou por ativar Chk1 na fase S ou G₂.

O controle transcricional dos genes do ciclo celular é mediado principalmente pelos fatores de transcrição E2F, B-MYB e FoxM1 (MUSA *et al.*, 2017; BONACCI; EMANUELE, 2020). Em células humanas, a transição para as fases G₁ e S depende da família de fatores de transcrição E2F, bem como, de suas proteínas auxiliares de dimerização. Defeitos na regulação da função E2F são comumente encontrados no câncer, o que demonstra o importante papel do controle transcricional do ciclo celular na oncogênese (BERTOLI; SKOTHEIM; DE BRUIN, 2013; BONACCI; EMANUELE, 2020). A alta atividade transcricional de E2F observada em praticamente todos os cânceres está intimamente relacionada a mutações bialélicas recorrentes da perda de

função no gene do retinoblastoma (RB), um inibidor vital do E2F (KENT; LEONE, 2019).

Quando o DNA sofre algum dano, os pontos de verificação do ciclo celular podem ser acionados na fase G1, na fase S e na transição da fase G2 para a M. Proteínas sensoras reconhecem esses danos e sinalizam para proteínas efetoras, e estas interrompem a progressão do ciclo celular e promovem o reparo. A cinase de Ataxia-telangiectasia mutada (ATM), uma proteína sensora, quando ativada pela quebra da fita dupla do DNA, estimula o ponto de verificação G1 fosforilando e ativando a Chk2 (*Checkpoint kinase 2*) (VISCONTI; MONICA; GRIECO, 2016).

Já quando o dano ao DNA ocorre na fase S ou na transição da fase G2 para a M, esse dano é detectado pela Ataxia Telangiectasia e cinases relacionadas ao Rad3 (ATR). A ATR ativa a Chk1 (*Checkpoint kinase 1*), levando a Cdc25A à degradação proteossomal, impedindo a progressão pela fase S. Em outro momento, a ATR e a Chk1 também ativam o ponto de verificação G2/M, ao fosforilar a p53 e impedir que as células com DNA danificado prossigam para a mitose, bloqueando a ativação da ciclina B-CDK1 (FONSECA; BETTENCOURT-DIAS, 2019).

A parada do ciclo celular na transição das fases G1 e S é um processo que depende criticamente da proteína p53 (KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016). A proteína p53 atua como um fator de transcrição do ciclo celular, que inibe a progressão das células na fase G1, por meio da ativação da p21 ou do desencadeamento da apoptose através da alteração de genes que codificam cofatores, como por exemplo BAX e GADD45 (OLIVEIRA, 2018). Mutações no gene da proteína p53 inibem sua atividade promovendo o crescimento celular desordenado, particularidade de células malignas (SWAMINATHAN *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2018).

A ATM leva a fosforilação da p53, diminuindo sua afinidade por seu regulador negativo, o gene Mdm2 (ubiquitina ligase), estabilizando a proteína p53, que, uma vez estabilizada, p53 irá ativar p21, um membro das proteínas CKI (VISCONTI; MONICA; GRIECO, 2016). Ao ser ativada, p21 pode interromper a transição entre as fases G1/S e G2/M, inibindo ciclina D-CDK4/6 e ciclina E-CDK2, respectivamente, impedindo a fosforilação da proteína pRB, consequentemente, bloqueando a progressão do ciclo celular (VISCONTI; MONICA; GRIECO, 2016; KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016).

No contexto do câncer, o surgimento de células malignas pode ocorrer por meio da perda do controle do ciclo celular, observado como consequência de mutações em

proto-oncogenes, genes que em circunstâncias normais ativam o ciclo celular, tornando esse proto-oncogene em um oncogene, ou seja, um gene mutante que ativa continuamente o ciclo celular. Ou ainda, podem ocorrer mutações em genes supressores de tumor, os quais tem a função de regular o crescimento das células, bloqueando o ciclo celular, porém, quando mutados, deixam de bloquear a progressão do ciclo (FONSECA; BETTENCOURT-DIAS, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2019).

Todas essas mutações levam a transcrições desordenadas que promovem a regulação positiva das ciclinas-CDKs, resultando na progressão descontrolada do ciclo celular e mitose (ICARD *et al.*, 2019). Provavelmente, as células cancerígenas surgem a partir de células senescentes por meio de um mecanismo de reativação, retirando a célula de um estágio G0 permanente (senescência) induzindo a um quadro de hiperproliferação (SOTGIA; FIORILLO; LISANTI, 2019).

A desregulação da atividade da CDK, por meio das mutações ou inativações dos inibidores da CDK ou descontrole nos níveis de ciclina, são também comumente notadas no câncer. Essa desregulação pode induzir as células a passarem para a fase S prematuramente, como também para a fase mitótica, causando instabilidade no genoma (FONSECA; BETTENCOURT-DIAS, 2019). Dessa forma, além dos antineoplásicos utilizados na clínica que atuam no ciclo celular, como por exemplo os produtos naturais antimitóticos (vincristina e vimblastina) e os antimetabólitos; os compostos que influenciam a sinalização das CDKs, bem como de seus inibidores, estão sendo considerados como uma terapia promissora para o tratamento do câncer (HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016; SANTOS, 2019).

Como exemplos desses compostos, podem ser citados os inibidores da CDK4 e CDK6 (ASGHAR *et al.* 2015, SHERR *et al.* 2016). Os inibidores de CDK4 e CDK6 mantêm as células cancerígenas na fase G1, impedindo a progressão do ciclo, a exemplo do palbociclib, ribociclib e do abemaciclib (SHERR; BARKET, 2017), os quais foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento do câncer de mama HER2 (ERBB2) positivo (FINN *et al.* 2015, VANARSDALE *et al.* 2015; SHERR; BARKET, 2017).

Em resposta a diferentes tipos de estresses, tais como agentes danosos ao DNA (radiação etc.), espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS), choque térmico, infecções virais e hipóxia, a célula desencadeia um mecanismo de morte celular

programada, conhecido como apoptose (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). A apoptose é um mecanismo essencial envolvido na homeostase tecidual, no sistema imunológico, no desenvolvimento embrionário e na eliminação de células infectadas por vírus e, sobretudo, de células com mutações genômicas com a capacidade de desenvolver neoplasias (PENA-BLANCO; GARCIA-SAEZ, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2019; ABBAS; LARISCH, 2020).

A apoptose é caracterizada como sendo um processo não inflamatório de morte, e inicia-se a partir de uma cascata de sinalização desencadeada por intermédio de proteínas de várias famílias que induzem diversas mudanças morfológicas e bioquímicas na célula, tais como: redução do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, formação de *blebbing* de membrana e formação de corpos apoptóticos (MEDINA; RAVICHANDRAN, 2016; ALMEIDA, 2019).

A morte celular apoptótica é mediada pela ativação de uma família de proteases cisteína-aspárticas, as caspases, as quais possuem em seu sítio ativo uma série de resíduos de histidinas e cisteínas que desfazem ligações peptídicas após um resíduo de aspartato. As caspases degradam componentes celulares com o objetivo de preparar as células em apoptose para serem fagocitadas por macrófagos de forma individualizada, sem influenciar as células adjacentes, evitando uma resposta inflamatória (NAGATA, 2018; ADAMS; CORY, 2018; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

A apoptose é coordenada por conjuntos específicos de caspases que atuam em cascatas. Inicialmente, as caspases são sintetizadas na célula como zimogênios, as pró-caspases, necessitando que sejam clivadas para se tornarem proteoliticamente ativas. As caspases apoptóticas podem ser classificadas em iniciadoras, como caspases-8, -10, -2 e -9, que iniciam a cascata proteolítica clivando mais pró-caspases, e efetoras, como caspases-3, -6 e -7, ativadas pelas caspases iniciadoras, as quais desempenham um papel importante na conclusão da apoptose, pois estas permitem a ativação de endonucleases que realizam a fragmentação do material genético da célula (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; NAGATA, 2018).

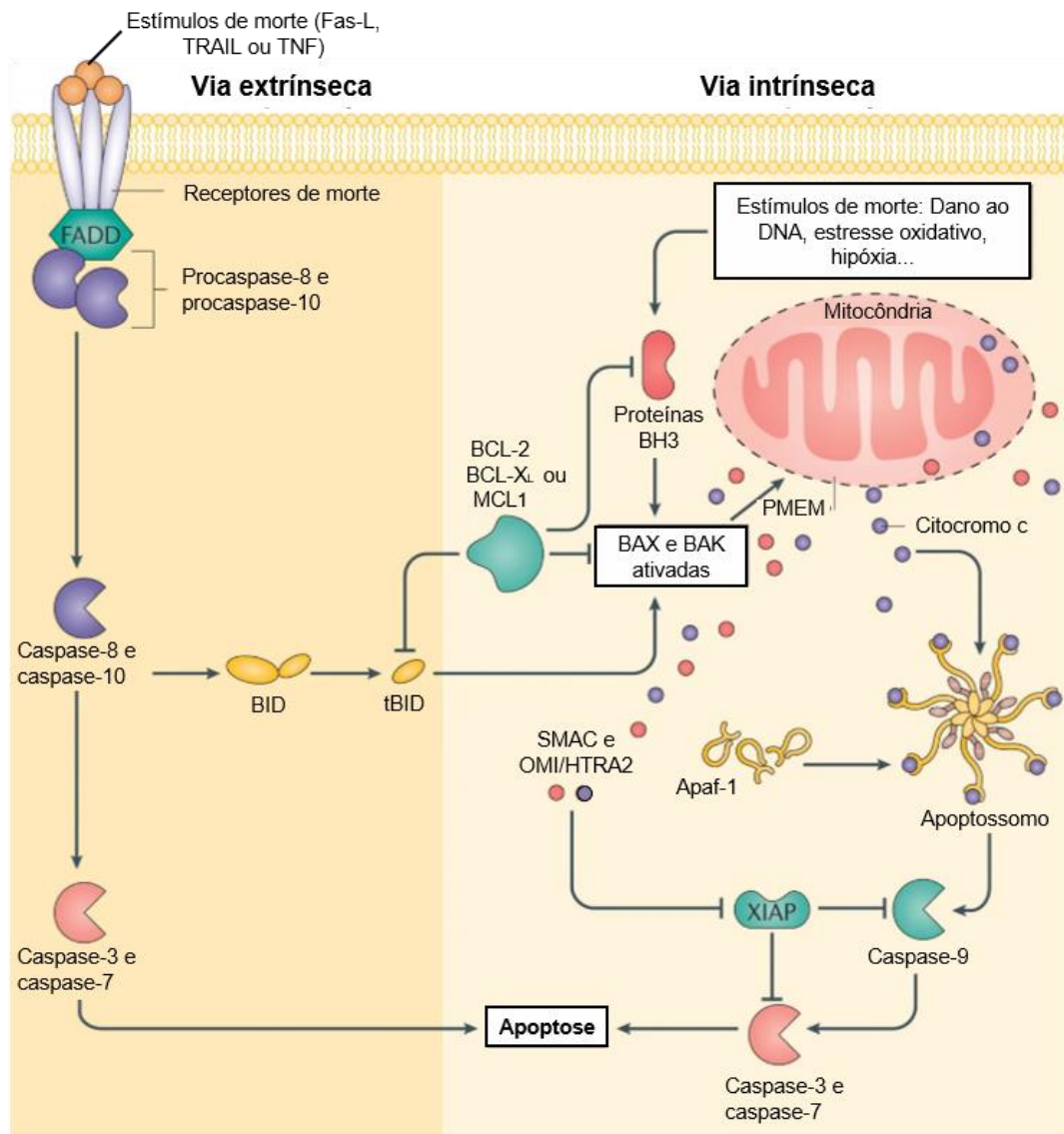
A caspase-3 possui um papel fundamental, pois atua inativando proteínas essenciais para a manutenção da integridade do citoesqueleto celular, bem como, do reparo do DNA e do controle do ciclo celular (KHALILZADEH *et al.*, 2018). Além disso, a caspase-3 também atua clivando e ativando as escramblases, enzimas

transportadoras de lipídios, que se encontram inativas normalmente. Com isso, a célula passa a expor na parte externa de sua membrana, a fosfatidilserina, um fosfolipídio de membrana que em condições normais está voltado para o interior da célula, servindo como um marcador para que os macrófagos reconheçam rapidamente a célula em apoptose (NAGATA, 2018; ALMEIDA, 2019).

O mecanismo de apoptose é ativado tanto por estímulos intracelulares, como também, estímulos extracelulares. Existem duas vias principais que promovem à apoptose, a via extrínseca, também chamada de via dos receptores de morte, e a via intrínseca, também chamada de via mitocondrial, e são ativadas de acordo com o tipo de estímulo recebido pela célula (SANTOS, 2018; LEE *et al.*, 2018; PAONE *et al.*, 2019).

A via extrínseca é ativada por estímulos extracelulares para induzir apoptose e está associada aos receptores de morte. Os estímulos de morte celular ou ligantes de morte, por exemplo, o ligante Fas (Fas-L), ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) e o fator de necrose tumoral (TNF), ligam-se aos receptores de morte da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), a exemplo do receptor de TNF-1, receptor de morte Fas-3, receptor TRAIL-1, receptor de morte-2 e o receptor de morte-6 (PFEFFER; SINGH, 2018; SHIRJANG *et al.*, 2019).

A ligação do ligante de morte ao seu receptor, ativa o domínio citoplasmático, conhecido como domínio de morte (DD), levando ao recrutamento de proteínas adaptadoras que apresentam o DD, como a proteína do domínio da morte associada ao Fas (FADD) e a proteína do domínio da morte associado ao receptor do TNF (TRADD) (LEE *et al.*, 2018; SHIRJANG *et al.*, 2019). As pró-caspases iniciadoras -8 e -10 se ligam à FADD ou à TRADD, e formam um complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Em seguida, a pró-caspase-8 é ativada (caspase-8), dando início à clivagem das pró-caspases efetoras, caspases-3, -6 e -7, sendo então ativadas, iniciando a clivagem de inúmeras proteínas e do citoesqueleto levando a célula à apoptose (Figura 3) (PFEFFER; SINGH, 2018; SANTOS, 2018; ABBAS; LARISCH, 2020).

Figura 3 – Vias de ativação da apoptose

Fonte: Adaptado de ICHIM; TAIT, 2016

Legenda: A apoptose é desencadeada por duas vias distintas, a via extrínseca e a via intrínseca. Na via extrínseca, após a ligação do ligante de morte (Fas-L, TRAIL e TNF), os receptores de morte (TRAF, TRADD, TRAILR e o FAS) ativam as caspases iniciadoras (caspase-8 e caspase-10) por meio da dimerização mediada por proteínas adaptadoras, como a proteína do domínio da morte associada à FAS (FADD). A caspase-8 e a caspase-10 ativas clivam e ativam as caspases efetoras, caspase-3 e a caspase-7, levando à apoptose. A via intrínseca, ou mitocondrial, estimulada a partir do estresse celular, envolve a ativação de proteínas com domínio 3 (BH3) da homologia Bcl-2, resultando na ativação de BAX e BAK promovendo a permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM). As proteínas da família BCL-2 antiapoptóticas (BCL-2, BCL-X_L, MCL1) neutralizam esse processo. Após a PMEM, proteínas do espaço intermembranar mitocondrial, como o SMAC e o citocromo c são liberados no citosol. O citocromo c interage com o APAF1, desencadeando a formação do apoptossomo, em seguida, ativando a caspase-9. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 e a

caspase-7, levando à apoptose. A liberação mitocondrial de SMAC facilita a apoptose, bloqueando o XIAP. A clivagem por caspase-8 do agonista do domínio da morte que interage com a proteína BH3 (BID) permite a interação entre as vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas.

Já a via intrínseca, também chamada de via mitocondrial, é ativada por diversos estímulos intracelulares, como dano ao DNA, privação de fatores de crescimento, hipóxia, estresse oxidativo, dentre outros, os quais causam alterações no equilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl-2, resultando na permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM), promovendo a liberação do citocromo c e de outros fatores apoptóticos (ASHKENAZI *et al.*, 2017; PAONE *et al.*, 2019).

Quando o citocromo c é liberado para o citoplasma ele se ligará ao fator de ativação da protease apoptótica 1 (Apaf-1) e a pró-caspase 9, formando um apoptossomo que irá sofrer oligomerização e ativar a pró-caspase-9. Uma vez ativada, a caspase-9 irá clivar e ativar as caspases efetoras, caspase-3 e -7, promovendo a morte celular (Figura 3) (ASHKENAZI *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2018).

A despolarização mitocondrial também libera fatores apoptóticos adicionais que garantem a morte celular, o segundo ativador da caspase derivado da mitocôndria (SMAC/DIABLO), e a serina-protease mitocondrial OMI/HTRA2, os quais bloqueiam os inibidores de proteínas da apoptose ligadas ao cromossomo X (XIAP), inibidores endógenos da caspase-3 (ASHKENAZI *et al.*, 2017; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019; ABBAS; LARISCH, 2020). Além dessas, também são liberados o fator indutor de apoptose (AIF), a DNase ativada por caspase (CAD) e a endonuclease G (endoG), os quais estão envolvidos com a fragmentação do DNA e com a condensação da cromatina (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018).

A família do gene do linfoma de células B 2 (Bcl-2) codifica mais de 20 proteínas que controlam a via apoptótica intrínseca ou mitocondrial e são essenciais para o equilíbrio entre a sobrevivência e a morte das células, de forma que a célula só entre no processo de apoptose quando necessário (ASHKENAZI *et al.*, 2017; PENA-BLANCO; GARCIA-SAEZ, 2018). A PMEM é controlada em grande parte pelas proteínas da família Bcl-2, que incluem proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas (PATWARDHAN; BEVERLY; SISKIND, 2016; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

Dentre as proteínas pró-apoptóticas podem ser citadas a Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Noxa e PUMA, que atuam promovendo a despolarização mitocondrial e, conseqüentemente, liberação do citocromo c e outros fatores pró-apoptóticos; e dentre as proteínas antiapoptóticas podem ser citadas a Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bfl1, Bcl-b e Bcl-w, que impedem a apoptose por bloquear essa despolarização mitocondrial (CHIPUK *et al.*, 2010; PATWARDHAN; BEVERLY; SISKIND, 2016). A desregulação do gene Bcl-2 tem como consequência a superexpressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, alterando o equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas. Considerando que é o equilíbrio entre as proteínas da família Bcl-2 que determina o destino da célula, desregulação do gene Bcl-2 favorece a sobrevivência das células cancerígenas (ASHKENAZI *et al.*, 2017; SANTOS, 2018).

A desregulação da apoptose tem um papel fundamental no desenvolvimento de tumores, distúrbios neurodegenerativos, doenças autoimunes, entre outros (PENA-BLANCO; GARCIA-SAEZ, 2018). Para que o câncer se desenvolva, as células tumorais adquirem características que lhe permitem inibir as vias apoptóticas para sobreviver, especialmente a perda do gene supressor de tumor p53 e a superexpressão de membros antiapoptóticos da família Bcl-2. Dessa forma, a intervenção terapêutica do câncer tem muitas vezes como alvo as vias de morte celular por apoptose (SHIRJANG *et al.*, 2019).

2.3 Estresse oxidativo no câncer

O estresse oxidativo é definido como sendo um estado fisiológico gerado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e outros radicais livres (SAHA *et al.*, 2017; TEHRANI *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2019). O estresse oxidativo surge devido ao desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos antioxidantes celulares, e está associado a diversas doenças, como doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, doenças neurodegenerativas, e diversos tipos de cânceres, entre outras (HUSSONG; SCHWEIGER, 2016; PECORINI *et al.*, 2020).

EROs são pequenas moléculas contendo oxigênio, e incluem o radical aniônico superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila (OH[•]), o íon hidroxila (OH⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO[•]), peroxil (RO₂[•]), entre outros SAED; DIAMOND;

FLETCHER, 2017; MORRYA; NGAMCHERDTRAKULA; YANTASEE, 2017; XU *et al.*, 2019). São moléculas quimicamente reativas que em níveis baixos a moderado são essenciais para os organismos vivos, pois desempenham um papel fundamental nas vias de sinalização celulares, atuando como segundos mensageiros (SAHA *et al.*, 2017), sendo geradas nas células, principalmente, como subprodutos de elétrons advindos da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (LIN *et al.*, 2019).

Em relação ao câncer, uma de suas características é a desregulação da energia celular. Essa característica possibilita que as células malignas proliferem e sobrevivam em microambientes que normalmente induziriam uma célula normal à morte (POSTOVIT *et al.*, 2018). Diversos estudos demonstram que as células cancerígenas produzem EROs mitocondriais de forma elevada em decorrência de estímulos oncogênicos e do seu metabolismo ativo, o que representa um papel importante no desenvolvimento de tumores (KLAUNIG; WANG, 2018; LIN *et al.*, 2019).

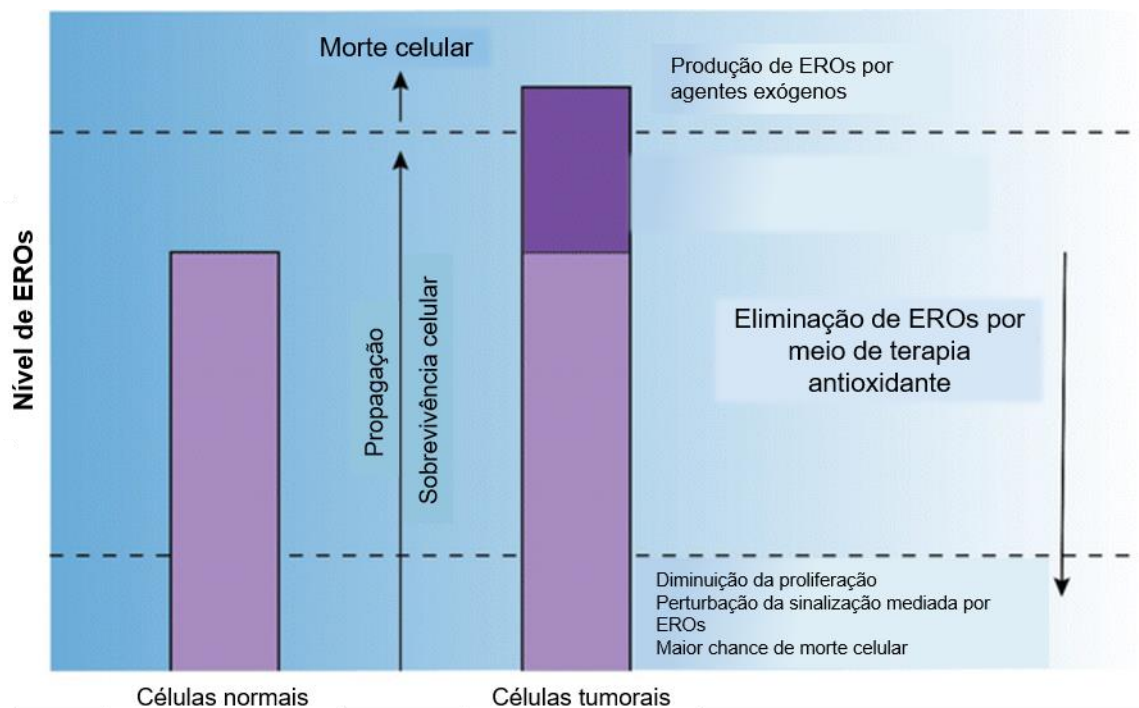
Níveis elevados de EROs em uma célula normal podem ocasionar mutações genéticas e/ou alterações no crescimento celular, estabelecendo, assim, uma correlação entre o aumento de EROs e a formação de tumores na etapa de iniciação da carcinogênese (KLAUNIG; WANG, 2018). Ainda, os níveis elevados de EROs nas células cancerígenas, quando comparado aos níveis de EROs nas células normais, beneficiam a sinalização celular mediada pelas EROs, pois favorecem a progressão e agressividade do tumor por meio da regulação da proliferação, apoptose e invasão das células cancerígenas, ou seja, induzindo promoção e progressão tumorais durante o processo de carcinogênese (MARTINEZ-USEROS *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2019).

Nesse sentido, dados da literatura mostram que EROs podem atuar em diferentes vias de sinalização para permitir a progressão do tumor, tais como a via da MAPK, promovendo proliferação celular, principalmente, por meio de ERK 1/2 e NF- κ B; a regulação do c-SRC (proto-oncogene tirosinocinase Src) e NF- κ B, envolvidos na evasão da apoptose; a via da PIK3/AKT e JAK/STAT (Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição); a modulação de metaloproteinases (MMP) na matriz extracelular para invasão e metástase; a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo angiogênese; entre outras (MARTINEZ-USEROS *et al.*, 2017; SAED; DIAMOND; FLETCHER, 2017).

Por depender da sinalização mediada por EROs para migração, proliferação e sobrevivência celular, as células cancerígenas aumentam a produção de EROs por meio de mutações oncogênicas adquiridas, perda de supressores de tumor e aceleração do seu metabolismo (RECZEK; CHANDEL, 2018). Entretanto, as EROs em níveis superelevados podem causar dano ao DNA, proteínas, lipídios e, por fim, ocasionar a morte da célula tumoral. Para proteger-se desses danos, as células cancerígenas necessitam aumentar potencialmente sua capacidade antioxidante para reestabelecer o equilíbrio redox favorável ao crescimento do tumor. No entanto, seus níveis relativamente mais altos estão mais próximos do limiar de toxicidade do que nas células normais, sendo estas então mais susceptíveis a morte celular desencadeada por agentes exógenos (REN *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2019).

Para equilibrar os níveis de EROs, as células possuem sistemas de defesa antioxidante que protegem a célula do desequilíbrio redox, prevenindo os danos causados pelo estresse oxidativo. Esses sistemas de defesa antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018; D'SOUZA *et al.*, 2020). Dentre os antioxidantes enzimáticos podem ser citados a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPX), entre outros. E os antioxidantes não enzimáticos incluem a glutathione reduzida (GSH), vitamina A, C e E, ácido lipoico, carotenoides, quelantes de ferro, entre outros (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; HUSSONG; SCHWEIGER, 2016; LIN, 2019; D'SOUZA *et al.*, 2020).

Considerando que as células cancerígenas são mais susceptíveis a um aumento agudo dos níveis intracelulares de EROs e que estas requerem a homeostase das EROs para migração, proliferação e sobrevivência celular (Figura 4), as estratégias terapêuticas recentes buscam manipular os níveis de EROs, a partir de agentes geradores de EROs que aumentem efetivamente esses níveis intracelulares acima do limiar de toxicidade, ou de agentes que diminuam a atividade dos sistemas antioxidantes, a partir da inibição de enzimas antioxidantes chave, elevando os níveis de EROs, causando morte celular via estresse oxidativo (RECZEK; CHANDEL, 2018; XU *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2019; REN *et al.*, 2019), como exemplo de drogas quimioterápicas que aumentam a produção de ROS, levando à citotoxicidade em células cancerosas, podem ser citadas a cisplatina, a doxorrubicina e a procarbazina (RAZA *et al.*, 2017).

Figura 4 – Papel dual das EROs no crescimento tumoral

Fonte: Adaptado de RAZA *et al.*, 2017

Legenda: As EROs possuem um papel dual na terapia do câncer, pois sua manutenção até um certo nível é necessária para a proliferação e sobrevivência celular. No entanto, o aumento brusco na produção de EROs e seu acúmulo podem levar a célula tumoral à apoptose. Da mesma forma, os níveis de EROs abaixo de um limite específico pode levar à parada das cascatas de sinalização mediadas por EROs, diminuindo assim a proliferação das células tumorais.

Por outro lado, existem também moléculas que diminuem os níveis de EROs abaixo de um limite específico, e assim, levam à interrupção das cascatas de sinalização de migração, proliferação e sobrevivência celular mediadas por EROs, e, consequentemente, reduzem o crescimento tumoral, como exemplos temos o derivado acridínico da série 9-(2-(1-ariletilideno)hidrazinil)acridina, e outro derivado acridínico, o (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-17), os quais demonstraram capacidade antioxidante por diminuir significativamente os níveis de EROs (RAZA *et al.*, 2017; HAIDER *et al.*, 2019; SILVA, 2020). Estudos sugerem que a utilização de antioxidantes pode diminuir os níveis de EROs intracelular e reduzir o risco de desenvolver o câncer. Dessa forma, diferentes moléculas têm mostrado efeitos pró-oxidantes, como também, efeitos antioxidantes em modelos experimentais (GALADARI *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2017).

2.4 Farmacoterapia do câncer

Considerando os diversos tipos de câncer existentes e suas particularidades, diferentes abordagens terapêuticas podem ser utilizadas para o seu tratamento. No entanto, mesmo com os avanços recentes, a busca pela cura ou por tratamentos mais eficazes continua, devido aos problemas frequentemente encontrados, como o desenvolvimento de resistência ao tratamento e o aparecimento de graves efeitos colaterais (COSTA; SILVA, 2017; JIN *et al.*, 2018). Os tratamentos atualmente disponíveis incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo, imunoterapia, hormonioterapia, entre outros (SEYED *et al.*, 2016; MILLER *et al.*, 2019). Por ser uma doença heterogênea, a escolha do tratamento mais adequado irá depender do estágio e progressão do câncer em cada indivíduo, podendo ser realizado de forma isolada ou em combinação, por exemplo, radioterapia e quimioterapia (PATEL; MINN, 2018; JANSSENS; SCHUSTER; VOSS, 2018; GONÇALVES, 2019).

A cirurgia caracteriza-se pela remoção do tumor, e é considerada a estratégia de tratamento com maior potencial de cura quando diagnosticado nos estágios iniciais, sendo a mais eficaz para os tumores ressecáveis (GUERRA, 2017; JIANG *et al.*, 2017; OLIVEIRA, 2019; O'DONNELL *et al.*, 2019). A radioterapia é uma técnica que utiliza a radiação para reduzir o tamanho do tumor quando aplicada antes da cirurgia ou eliminar as células cancerígenas remanescentes após uma cirurgia, e possui ação local (SILVEIRA, REGINO, *et al.*, 2013; SANTOS, 2019). A cirurgia e a radioterapia são basicamente tratamentos locais direcionados ao tumor primário. Entretanto, em aproximadamente 60% dos casos ocorre o desenvolvimento de metástase, além da reincidência do tumor, fazendo com que essas abordagens não sejam mais suficientes (GUERRA, 2017).

A quimioterapia é a terapia mais convencional e, conseqüentemente, a mais utilizada para o tratamento do câncer, e caracteriza-se pelo uso de moléculas citotóxicas com o objetivo de eliminar as células cancerígenas presentes no organismo do indivíduo (LI *et al.*, 2017; SOUHO *et al.*, 2018; GONÇALVES, 2019). Os fármacos antineoplásicos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação ou com a sua origem, em basicamente quatro classes: os agentes alquilantes, os agentes antimetabólitos, os antibióticos antitumorais e os produtos naturais (MERCK, 2015; CORTÉS, 2017; INCA, 2018).

Os agentes alquilantes atuam danificando o DNA, em qualquer fase do ciclo celular, por acoplar grupos alquila de modo covalente às bases nitrogenadas do DNA, impedindo sua replicação, além de danificar também outras macromoléculas celulares, como exemplos destes fármacos, pode-se citar a cisplatina e a ciclofosfamida (GOLAN, 2014; GARCÍA-GIL, 2018; OLIVEIRA, 2019).

Os agentes antimetabólitos atuam na fase S do ciclo celular intervindo nos processos de crescimento celular mediante inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese dos componentes essenciais do DNA e RNA. Exemplos de fármacos dessa classe incluem o 5-fluorouracil (5-FU), o metotrexato e a gencitabina (WORDING, PERISSINOTTI E MARINI, 2016; MEHRMOHAMADI; JEONG; LOCASALE, 2017).

Os antibióticos antitumorais, geralmente derivados de microrganismos, atuam intercalando-se ao DNA em diferentes fases do ciclo celular, além disso, por possuírem anéis insaturados em sua estrutura, promovem a incorporação de excesso de elétrons, logo, a produção de EROs, levando a morte celular. Além disso, fármacos dessa classe, como a doxorrubicina, podem inibir a topoisomerase II (HOFFMAN *et al.*, 2014; CORTÉS, 2017; OLIVEIRA, 2019).

Os produtos naturais, especialmente os derivados de plantas, têm sido amplamente utilizados nas pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos. Muitos dos medicamentos utilizados atualmente na clínica, inclusive dentre os antineoplásicos, tiveram sua origem de produtos naturais, direta ou indiretamente, por meio dos avanços na síntese de análogos e de alterações na estrutura química que promoveram melhorias nas propriedades farmacológicas e na redução da toxicidade (GUERRA, 2017; EFFERTH *et al.*, 2020). A descoberta de suas atividades biológicas deu origem a diversos medicamentos para o tratamento de uma variedade de doenças, como câncer, infecções bacterianas e fúngicas, inflamações e diabetes (SPRADLIN *et al.*, 2019).

Os compostos naturais apresentam inúmeros efeitos, podendo atuar em vários alvos oncogênicos, como em fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, receptores de fatores de crescimento, enzimas inflamatórias, entre outros (LIU *et al.*, 2019). Diversos medicamentos de origem natural encontram-se em uso na terapia contra o câncer, como por exemplo, os alcaloides da vinca (vinblastina, vincristina), que atuam inibindo a polimerização dos microtúbulos na mitose; os

taxanos (paclitaxel, docetaxel), que atuam inibindo a despolimerização dos microtúbulos na mitose; os agentes que inibem as topoisomerases como as podofilotoxinas (etoposida, teniposida), dentre outros (DUTTA *et al.*, 2019; GONZÁLEZ-CHAVARRÍA, *et al.*, 2020).

No entanto, os quimioterápicos não afetam apenas as células cancerígenas, mas também as células sadias de rápida proliferação, causando uma variedade de efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida dos pacientes (ROCHA, 2018; PEREIRA, 2019). Os tecidos e órgãos que mais sofrem com a quimioterapia são a medula óssea, o trato gastrointestinal e os folículos capilares, resultando em mielossupressão, astenia, mucosite e alopecia (CORTÉS, 2017; SENAPATI *et al.*, 2018). Além disso, uma alta porcentagem de indivíduos desenvolve resistência aos antineoplásicos, reduzindo as opções terapêuticas de tratamento (GONZÁLEZ-CHAVARRÍA, *et al.*, 2020).

O avanço no conhecimento da biologia molecular e tumoral transformou significativamente os padrões de tratamento do câncer pois demonstrou a necessidade de se desenvolver terapias direcionadas molecularmente ao câncer, assim como, selecionar tratamentos baseado em alterações moleculares específicas (ZUGAZAGOITIA *et al.*, 2016). As terapias direcionadas ao câncer, conhecidas como terapias alvo, utilizam agentes que se ligam e bloqueiam moléculas específicas implicadas no crescimento, progressão e metástase. Dessa forma, atuam em alvos moleculares específicos de determinado câncer, diferente da maior parte dos quimioterápicos que não distinguem as células normais das cancerígenas que se proliferam rapidamente (PRABHU; DEVARAJ, 2017).

A terapia alvo é amplamente dividida em duas classes: os anticorpos monoclonais (mAb) e os inibidores de tirosina quinase (TKIs) (JIANG *et al.*, 2019). O mais conhecido dos mAb é o bevacizumabe, um mAb humanizado que atua se ligando ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) impedindo que este se ligue ao seu receptor (VEGFR), bloqueando, consequentemente, a formação de novos vasos sanguíneos (RICCIUTI *et al.*, 2019). Outros exemplos utilizados na clínica são os mAb cetuximabe e anitumumabe, os quais se ligam ao domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), um receptor altamente expresso na superfície de muitas células cancerígenas, e bloqueiam a ligação do fator de crescimento ao EGFR (PRABHU; DEVARAJ, 2017; JIANG *et al.*, 2019).

Em relação aos inibidores das proteínas tirosina cinases (TKIs), os exemplos incluem as pequenas moléculas sintéticas lapatinibe, erlotinibe e gefitinibe, as quais atuam por meio da inibição competitiva do sítio de ligação do ATP nos receptores de tirosina cinase, impedindo a fosforilação e ativação do receptor, bloqueando diversas vias enzimáticas que se encontram exacerbadas nas células cancerígenas (AZEVEDO *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2019). Todavia, a terapia alvo, apesar de ser uma terapia dirigida a alvos específicos, apresenta vários efeitos adversos e casos de resistência especialmente devido a alterações genômicas nas células cancerígenas que levam a modificações no alvo terapêutico (LIN; LYU, 2019).

A hormonioterapia baseia-se no uso de substâncias análogas a hormônios endógenos ou no uso de substâncias supressoras destes, com o objetivo de inibir o crescimento das células tumorais de câncer hormônio sensíveis. Essa terapia atua por bloquear o eixo estimulador da produção de androgênios e estrogênios, inibindo a produção desses hormônios, ou por impedir a ligação desses hormônios a seus receptores (HAUSHEER, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2017). O tamoxifeno é um exemplo de agente utilizado nessa terapia, o qual apresenta efeito antagônico ao hormônio estrogênio, sendo utilizado para o tratamento do câncer de mama (GABRIEL *et al.*, 2017; SILVA, 2018).

A imunoterapia, por sua vez, consiste na estimulação do sistema imunológico, com o objetivo de aumentar a resposta imune contra as células tumorais, e vem sendo amplamente estudada no tratamento de diferentes tipos câncer (MCCUNE, 2018; OLIVEIRA, 2019; GONÇALVES, 2019). Dois tipos de imunoterapia são utilizados atualmente, a terapia com mAb dirigida a células imunes e a terapia celular adotiva (ACT). Os mAbs imunomoduladores têm como alvo componentes presentes em células do sistema imune, e não as células cancerígenas como na terapia alvo, sendo assim, não são essencialmente específicos para um determinado tipo de câncer (KHALIL *et al.*, 2016). Os mAbs imunomoduladores incluem os inibidores da proteína de morte celular programada 1 (PD-1), o pembrolizumab e o nivolumab, e do ligante de morte celular programada 1 (PD-L1), o atezolizumab, avelumab e o durvalumab (UGUREL *et al.*, 2020; TOPALIAN; TAUBE; PARDOLL, 2020).

A terapia celular adotiva consiste na administração de citocinas estimuladoras de imunidade, por exemplo, interferons e IL-2; de células T citotóxicas específicas para aquela célula tumoral, ativada e expandida *in vitro*; entre outros. No entanto,

essas técnicas apresentam limitações devido à resposta imune não específica, o que causa efeitos colaterais graves (BARRETA, 2018; RILEY *et al.*, 2019).

Diante do exposto, é possível inferir que existe uma diversidade de modalidades terapêuticas usadas na luta contra o câncer. Porém, apesar disso, a toxicidade elevada e o desenvolvimento de resistência continuam sendo problemas que afetam a efetividade dos tratamentos e a qualidade de vida dos indivíduos submetidos a eles. Diante disso, faz-se necessário o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos que atuem mais seletivamente nas células cancerígenas, reduzindo os efeitos colaterais graves (SENAPATI *et al.*, 2018; COLLERY *et al.*, 2019), e que superem a resistência adquirida pelas células cancerígenas a medicamentos, o que aumentaria as chances de sucesso terapêutico e a expectativa de vida dos indivíduos acometidos com a doença (SEYED *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-CHAVARRÍA, *et al.*, 2020).

2.5 Modelos experimentais para avaliação de novas drogas com potencial antitumoral

Estudos *in vitro* e *in vivo* são amplamente utilizados para identificar novos candidatos a fármacos, bem como, avaliá-los em relação à sua toxicidade fora de seu alvo molecular (YANG *et al.*, 2019; JUDSON *et al.*, 2019). Uma variedade de culturas celulares, incluindo linhagens de células tumorais, vem sendo largamente utilizadas como modelos *in vitro* (BAHADAR *et al.*, 2016). Em comparação com os estudos *in vivo*, a pesquisa *in vitro* de células cancerígenas possibilita a manipulação flexível dos parâmetros experimentais e a observação em tempo real do crescimento e proliferação dessas células, facilitando o desenvolvimento de novas terapias de forma mais rápida (WANG *et al.*, 2016), como consequência, os estudos *in vitro* mais recentes têm permitido a predição da eficácia clínica de candidatos a fármacos antineoplásicos (FUJINO *et al.*, 2018).

Nesse sentido, o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais está fortemente associado ao cultivo de células *in vitro*. Nas pesquisas, para encontrar compostos químicos eficazes, faz-se necessário diferenciar células viáveis de células mortas. Vários ensaios podem ser utilizados para determinar o número e a viabilidade celular (PRÄBST *et al.*, 2017). Entre os ensaios *in vitro* mais utilizados, pode-se

destacar o ensaio de redução do MTT, um ensaio amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de uma variedade de substâncias químicas (DE SIMONE *et al.*, 2020; MELLO *et al.*, 2020).

O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um corante amarelo que quando incubado em células viáveis, é reduzido por enzimas mitocondriais (succinato desidrogenase), que convertem o MTT a um composto de cor púrpura insolúvel em água, o formazan [(E, Z) -5- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -1,3-difenilformazan], que é solubilizado com a adição do dodecil sulfato de sódio (SDS). A formação do formazan é quantificada por meio densidade óptica em um espectrofotômetro, e corresponde diretamente ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; OLIVEIRA; SILVA JÚNIOR; ANDRADE FILHO, 2019; AMINIPOUR *et al.*, 2020).

Outra técnica amplamente utilizada para avaliar a viabilidade celular é a avaliação da integridade da membrana celular por meio da marcação com o iodeto de propídio (IP). O IP é uma molécula fluorescente que só atravessa membranas celulares comprometidas, marcando o DNA e RNA dentro de células mortas ou que estejam com suas membranas plasmáticas danificadas e emite um sinal fluorescente vermelho (ROSENBERG; AZEVEDO; IVASK, 2019). Além disso, o IP é utilizado para investigar o mecanismo de ação de compostos que atuam causando morte celular em decorrência de parada no ciclo celular. A quantificação de DNA permite determinar a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular e a porcentagem de células mortas (DNA fragmentado) em uma amostra (CROWLEY; CHOJNOWSKI; WATERHOUSE, 2016).

A distribuição das células nas principais etapas do ciclo celular é feita baseando-se na diferença de ploidia do DNA entre as células nas fases G0/G1 (2n), na fase S e na fase G2 (4n) e mitose. Em ensaios utilizando marcação exclusiva com o IP na citometria de fluxo, as células apoptóticas são comumente identificadas devido a hipodiploidia (por causa da fragmentação do DNA), levando a uma diminuição mensurável da marcação do DNA pelo IP, sendo essa população observada na forma de um pico sub-G0/G1, servindo como um indicativo de apoptose. Dessa forma, a quantificação da fluorescência do IP em uma célula é diretamente proporcional a quantidade de DNA dessa célula (CROWLEY; CHOJNOWSKI; WATERHOUSE, 2016; BABES *et al.*, 2018).

Em relação ao processo de morte celular induzido por agentes citotóxicos, este pode ocorrer como resultado, principalmente, da ativação de apoptose ou de necrose. Para diferenciá-las diversos métodos podem ser realizados, dentre estes, o ensaio de marcação com a anexina V. A anexina V (AV), uma proteína conjugada com uma molécula fluorescente (isotiocianato de fluoresceína - FITC), se liga com alta afinidade a fosfatidilserina, quando esta é exposta na superfície da célula apoptótica (HUANG *et al.*, 2014; PRASANNA *et al.*, 2020; KOVURU *et al.*, 2020). A fosfatidilserina é um fosfolípido presente na camada interna da membrana plasmática das células viáveis. Durante o início da apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a camada externa da membrana plasmática e serve como um sinal para os fagócitos de que a célula está em apoptose (KUPCHO *et al.*, 2019).

A exposição da fosfatidilserina pode ser facilmente detectada e medida por meio de sua conjugação com a AV associada a uma molécula fluorescente (KUPCHO *et al.*, 2019). Este ensaio utiliza também o corante IP para diferenciar, inicialmente, o processo de apoptose e necrose, além de indicar se a célula se encontra nas fases iniciais ou tardias da apoptose, de acordo com a integridade da membrana celular. Sendo assim, a marcação positiva apenas da AV significa que a célula está em apoptose inicial, porém, se a célula estiver duplamente marcada, ou seja, AV e IP positivos, é indicativo de que a célula está em apoptose tardia ou necrose. Essas marcações podem ser detectadas por meio das análises por citometria de fluxo ou por microscopia de fluorescência (GIRALDO, 2020; PRASANNA *et al.*, 2020).

2.6 Aspectos gerais sobre *Croton* spp.

Dentre as inúmeras famílias de plantas utilizadas para fins medicinais destaca-se a família Euphorbiaceae. A família Euphorbiaceae abrange um grupo muito diversificado, e é encontrada principalmente nos trópicos e em regiões temperadas. São representadas por aproximadamente 8000 espécies, distribuídas em 317 gêneros, 49 tribos e cinco subfamílias (WEBSTER, 1994; SOARES; SILVA; FARIA, 2015). Na flora brasileira, é uma das mais ricas e mais diversificadas, com 63 gêneros e 921 espécies em todos os tipos vegetacionais (CORDEIRO *et al.*, 2010; SOARES; SILVA; FARIA, 2015).

Estudos fitoquímicos da família Euphorbiaceae revelaram a presença de compostos químicos biologicamente ativos variados, tais como flavonoides, saponinas, terpenos (di e triterpenoides), ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas (ESTEVES, 2014). Alguns dos gêneros mais importantes são *Euphorbia* (*Euphorbia* ou boa noite), *Phyllanthus* (600), *Hevea* (12) (Pará ou seringueira no Brasil); *Aleurites* (2); *Croton* (700); *Manihot* (150) (mandioca, tapioca); *Acalifa* (450); *Ricinus* (1) *Higuerilla*; *Hiponamano* (5) (Manzanillo); *Pedilanto* (14); *Trazer* (100); *Sapium* (120) e *Jatropha* (175) (BARRERA; GÓMEZ; CASTIBLANCO, 2016).

O gênero *Croton* constitui cerca de 1300 espécies de árvores, arbustos e ervas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios, muitas das quais com propriedades medicinais e tóxicas. A diversidade de usos medicinais das espécies de *Croton* está associada a uma ampla diversidade de metabólitos secundários (FURLAN *et al.*, 2015; XU; LIU; LIANG, 2018).

O gênero é rico em constituintes com atividades biológicas, principalmente diterpenos do tipo labdano, ciclitolos, clerodano, tiglane, kaurane, labdane; triterpenos, esteroides, óleos voláteis, substâncias fenólicas e flavonoides, que possuem uma gama de atividades biológicas, como citotóxica, anti-inflamatória e antimicrobiana (XU; LIU; LIANG, 2018).

Muitas espécies de *Croton* são usados para fins medicinais, tais como: *C. zehntneri* e *C. cajucara*, que são comumente utilizados no Brasil para tratar distúrbios gastrointestinais. *C. lechleri* é amplamente utilizado nos países da América do Sul contra inflamações, úlceras gástricas, cicatrização de feridas e câncer; e *C. nepetaefolius* é usado na medicina popular do Brasil como antiespasmódico estomacal, carminativo e intestinal (MEDEIROS *et al.*, 2017). Os principais componentes presentes na composição dos óleos essenciais relatados do gênero *Croton* são os fenilpropanoides, os monoterpenos e os sesquiterpenos (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A espécie *Croton grewioides* Baill. é conhecida popularmente como “canelinha” ou “canelinha de cheiro” em referência ao aroma exalado por suas flores. Trata-se de uma espécie do semiárido brasileiro, apesar de ocorrer também nas faixas de floresta atlântica nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (SILVA; SALES; TORRES, 2009; DA SILVA *et*

al., 2016; MEDEIROS, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Em relação às suas atividades biológicas, estudos anteriores relataram uma potente atividade inseticida (SILVA *et al.*, 2008), antidiarreica (DA SILVA *et al.*, 2016), antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2021) e antitumoral *in vivo* em modelo de sarcoma 180 em camundongos (SOUSA, 2013; CAVALCANTI; DA SILVEIRA; DA SILVA, 2020).

A caracterização do óleo essencial das partes aéreas de *C. grewioides* foi realizada pela equipe de Fitoquímica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/CCS/UFPB) e foi descrita por Medeiros *et al.* (2017). A análise mostrou que monoterpreno (55,56%) e sesquiterpenos (44,44%) foram os principais grupos de constituintes químicos isolados, sendo os compostos majoritários: α -pineno (47,43%), sabineno (12,09%), limoneno (7,98%), biciclogermacreno (5,96%), *trans*-cariofileno (5,51%), germacreno D (4,96%). Esta composição química é consistente com os dados da literatura para constituintes voláteis da espécie *Croton* (MORAIS *et al.*, 2006).

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de *Croton grewioides*

SUBSTÂNCIAS	(% RELATIVA)	IK EXP.	IK LIT.*
α -pineno	47,43	931	939
Sabineno	12,09	968	976
β -pineno	1,91	972	980
Mirceno	0,70	986	991
α -felandreno	0,61	1001	1005
limoneno	7,98	1023	1031
1,8 cineol	2,21	1025	1033
γ -terpineno	0,61	1052	1062
4-tujanol	0,55	1093	1097
4-terpeneol	0,75	1169	1177
α -copaeno	1,29	1368	1376
<i>trans</i> -cariofileno	5,51	1411	1418
α -humuleno	0,61	1444	1454
germacreno D	4,96	1471	1481
Biciclogermacreno	5,96	1487	1494
β -bisaboleno	2,99	1499	1509
Δ -cadineno	0,46	1513	1524
espatulenol	0,78	1564	1576
Total identificado	97,40		

Componentes identificados baseados no IR e GC-MS listados de acordo com a ordem de eluição na coluna DB-5 (30 m).

Fonte: MEDEIROS, 2017.

Diante do exposto, e, devido às dificuldades presentes no tratamento do câncer, este trabalho se propôs a avaliar a citotoxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar o potencial antitumoral do óleo essencial extraído das folhas de *Croton grewoides* (OEC), por meio de ensaios *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do OEC em linhagens de células tumorais humanas (HCT-116, HeLa, SK-MEL-28, MCF-7, MDA-MB-231, PC-3);
- Avaliar a citotoxicidade do OEC em linhagem de célula não tumoral humana (HaCaT);
- Selecionar a linhagem celular mais sensível ao OEC e determinar o índice de seletividade do óleo essencial para esta linhagem;
- Investigar a interferência do OEC no ciclo celular;
- Estudar o tipo de morte celular induzido pelo OEC (apoptose ou necrose);
- Avaliar a ação do OEC no estado redox celular.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB), que se localiza nas dependências do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM).

4.2 Material

4.2.1 Amostra teste

O óleo essencial isolado das folhas de *Croton grewoides* (Euphorbiaceae) foi gentilmente fornecido pelo colaborador Prof. Dr. Josean Fachine Tavares do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) da UFPB.

As partes aéreas de *Croton grewoides* foram coletadas no município de Serra Branca, estado da Paraíba, em março de 2007. O material botânico foi identificado pela Profa. Maria de Fátima Agra, da Universidade Federal da Paraíba; uma exsiccata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da Universidade Federal da Paraíba sob identificação AGRA *et al.* 6987. O óleo essencial das partes aéreas de *C. grewoides* foi obtido conforme descrito por Medeiros e colaboradores (2017).

O estudo está registrado no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A22E9B0.

4.2.2 Cultivo celular

Para avaliação da atividade antitumoral *in vitro* foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas e, para avaliação da citotoxicidade, foi utilizada linhagem não tumoral humana (Quadro 2). As células HCT-116, HeLa, SK-MEL-28, MDA-MB-231, PC-3 e HaCat foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro (Rio de

Janeiro, Brasil). As células MCF-7 foram adquiridas no Instituto Nacional do Câncer, Frederick, MA, EUA.

Quadro 1 – Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas utilizadas neste trabalho

Linhagens	Tipo histológico	Origem	Meio de cultura
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	RPMI
HeLa	Adenocarcinoma de colo do útero	Humana	DMEM
SK-MEL-28	Melanoma	Humana	DMEM
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Humana	DMEM
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama	Humana	DMEM
PC-3	Carcinoma de próstata	Humana	F-12K
HaCaT	Queratinócito (<i>não tumoral</i>)	Humana	DMEM

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

As linhagens celulares foram cultivadas (5×10^4 células/mL) em frascos de cultivo utilizando o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou F-12K (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), e 1% de solução de antibióticos (penicilina 10.000 U/ml e estreptomicina 10 mg/mL) (Sigma Aldrich). As células foram manipuladas em fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações, e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas, e, ao atingirem 80% de confluência, normalmente após 48 horas de cultivo, foi feita a adição 2 mL de solução de tripsina (Sigma Aldrich), por 5-10 minutos, para o deslocamento da monocamada das células aderentes da parede do frasco. Após esse período, adicionou-se meio suplementado com SBF, na mesma proporção de tripsina, para interromper a ação desta. As células foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos e ressuspensas em meio suplementado para a contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada por meio da utilização do corante azul de Tripán (Sigma Aldrich).

4.3 Métodos

4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio), o qual é um método colorimétrico que mede a viabilidade celular. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, que é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais presentes em células metabolicamente ativas. Uma vez solubilizado, o produto formado (formazan) pode ser quantificado por espectrofotômetro e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células foram semeadas (100 μ L) em placas de 96 poços na concentração de 3×10^5 células/mL (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28, e HaCaT). Após 24 horas, o óleo essencial de *C. grewoides* foi previamente dissolvido em DMSO, em uma concentração de 20.000 μ g/mL, e incubado (100 μ L) em diferentes concentrações (9,375 – 300 μ g/mL) com a suspensão celular, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO, por 24, 48 e/ou 72 horas, conforme o caso, em estufa a 5% de CO₂, a 37 °C. A doxorrubicina foi utilizada como droga padrão, e testada em concentrações variando entre 0,31 e 20 μ M. Prosseguido o período de incubação, as placas foram centrifugadas (500 g, 5 minutos, 25 °C), foi removido 110 μ L do sobrenadante e 10 μ L da solução de MTT foi adicionada (5 mg/mL em PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por 3 horas, em seguida foi adicionado 100 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos *overnight*. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro (leitor de microplacas *BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA*), no comprimento de onda de 570 nm, para cálculo da concentração do óleo que produz 50% de inibição no crescimento celular (CI₅₀) (MELO *et al.*, 2003). O experimento foi realizado em quadruplicata e repetido três vezes. Em seguida, a linhagem tumoral mais sensível (SK-MEL-28), foi selecionada para os ensaios posteriores.

O índice de seletividade foi estimado e obtido a partir da razão entre a CI_{50} da célula não tumoral pela CI_{50} da célula tumoral (DE LIMA SERAFIM *et al.*, 2018; PILON *et al.*, 2020).

4.3.2 Investigação da ação antitumoral *in vitro* do OEC

4.3.2.1 Avaliação da regulação do ciclo celular

As células da linhagem SK-MEL-28 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o óleo essencial de *C. grewioides* na concentração de 70,0 µg/mL (correspondente à CI_{50}) e na de 140,0 µg/mL (correspondente à $2 \times CI_{50}$), por 48 horas. Como droga padrão foi utilizada a doxorrubicina (4,0 µM, correspondente à CI_{50}). Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 x g, 5 minutos, 20°C) e ressuspensas em 1 mL de PBS. As amostras foram fixadas cuidadosamente em 4 mL de etanol 70% gelado, em vórtex, e congeladas (-20 °C) até a análise. No momento da análise, as células fixadas foram recuperadas por centrifugação (400 x g, 10 minutos, 4°C), realizando-se sucessivas lavagens com PBS em temperatura ambiente. Posteriormente, 300 µL de células foram então incubadas com RNase (3 µL; 0,1 mg/mL) e iodeto de propídio (15 µL; 0,05 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), no escuro (37 °C, 30 minutos). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (*FacsCanto II*, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes em duplicata e analisados com o programa *Flowing Software 2.5.1*. Foi determinado o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2, M), bem como células sub-diploides (sub-G1), considerando que o marcador iodeto de propídio se liga especificamente ao DNA e, portanto, a intensidade de fluorescência detectada pode ser relacionada com a quantidade de DNA nas células em cada fase do ciclo (JAYAT; RATINAUD, 1993).

4.3.2.2 Análise morfológica da apoptose por laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP)

As células da linhagem SK-MEL-28 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o óleo essencial de *C. grewioides* na concentração de 70,0 µg/mL (correspondente à CI_{50}), por 48 horas. Como droga padrão foi utilizada a doxorrubicina (4,0 Mm, correspondente à CI_{50}). Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 x g, 5 minutos, 20°C), ressuspensas em PBS, e marcadas com 10 µL de laranja de acridina (10 µg/mL) e de iodeto de propídio (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células recém coradas foram observadas sob microscópio confocal de varredura a laser (*Leica*, Alemanha). Laranja de Acridina é um corante capaz de atravessar membranas intactas e se intercalar no DNA, emitindo a fluorescência verde, podendo assim diferenciar células viáveis/apoptose inicial de células em apoptose tardia/necrose, pois estas também são marcadas com o IP. As células foram observadas de acordo com os seguintes critérios: (a) as células viáveis apresentam coloração verde clara e estrutura intacta; (b) as células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde claro mostrando condensação da cromatina; (c) as células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; (d) as células necróticas possuem núcleo vermelho (RENVOIZÉ *et al.*, 1998; TAN; NORHAIZAN, 2019).

4.3.2.3 Avaliação dos efeitos do óleo essencial de *Croton grewioides* sobre a externalização da fosfatidilserina

Para avaliar os efeitos do óleo essencial de *C. grewioides* sobre a externalização da fosfatidilserina foi realizado o ensaio com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (IP). As células da linhagem SK-MEL-28 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o óleo essencial de *C. grewioides* na concentração de 70,0 µg/mL (correspondente à CI_{50}) e na de 140,0 µg/mL (correspondente à $2 \times CI_{50}$), por 48 horas. Como droga padrão foi utilizada a doxorrubicina (4,0 Mm, correspondente à CI_{50}). Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por

centrifugação (500 x *g*, 5 minutos, 20 °C), lavadas em PBS, ressuspensas em um tampão de ligação (195 µL) e 5 µL da Anexina V conjugada com fluoresceína (FITC) foi então adicionada, de acordo com as instruções do fabricante (*eBioscience, Thermo Fisher, Rochester, NY*). As células foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, lavadas e ressuspensas em 190 µL de tampão de ligação. Em seguida, 10 µL do iodeto de propídio (IP) (20 µg/mL) foi adicionado. A Anexina V possui alta afinidade com o fosfolípido fosfatidilserina presente na membrana externa de células em apoptose. Já o IP interage diretamente com o DNA de células que perderam a integridade de membrana, distinguindo assim células em apoptose ou necrose (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (*FacsCanto II, BD, EUA*), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes em duplicata e analisados com o programa *Flowing Software 2.5.1*.

4.3.2.4 Avaliação do OEC sobre o estado redox celular

Uma sonda amplamente utilizada para identificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é o fluoróforo 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA). Esta é uma molécula não fluorescente, permeável e muito sensível às mudanças no ambiente redox intracelular. Quando entra na célula é clivada por esterases citoplasmáticas em 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCF), em seguida, é oxidada por peroxidases, resultando em uma molécula altamente fluorescente, DCF (diclorofluoresceína) (COSSARIZZA *et al.*, 2009). Dessa forma, o número de células que emitirão fluorescência, detectadas por citometria de fluxo, será diretamente proporcional aos níveis de estresse oxidativo.

Neste ensaio, as células da linhagem SK-MEL-28 foram incubadas (2x10⁵ células/mL) em placas de 24 poços com o óleo essencial de *C. grewoides* na concentração de 70,0 µg/mL (correspondente à CI₅₀) e na de 140,0 µg/mL (correspondente à 2xCI₅₀), por 24 horas. Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 *g*, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em 1 mL de PBS, e posteriormente 300 µL de células foram marcadas com 6 µL de DCFH-DA (10 µM) e incubadas no escuro, durante 30 minutos, a 37 °C. Uma alíquota dessas amostras foi

incubada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na concentração final de 500 μM , utilizado como o controle positivo deste ensaio. Após o período de incubação, os tubos foram colocados em gelo triturado para suspender a reação de marcação do DCF. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo *FacsCanto II* (BD, EUA) em 530 nm de fluorescência e 485 nm de comprimento de excitação. A quantificação das EROs foi estimada pela intensidade média de fluorescência. Os dados foram obtidos a partir de um experimento em triplicata e analisados com o programa *Flowing Software 2.5.1*.

4.4 Análise estatística

Para a determinação da CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (95%), foi realizada a regressão não-linear. Nos demais ensaios, os dados foram analisados a partir da média $\pm$ e.p.m (erro padrão da média). Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguido de Tukey ou Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade em células tumorais e não tumoral

Os resultados estão expressos como concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular (CI_{50}) do OEC para cada linhagem celular, e estão demonstrados na Tabela 2, assim como os valores de índice de seletividade calculados.

Tabela 2 – Citotoxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* (OEC), utilizando o ensaio de redução do MTT após 72 horas de tratamento

Linhagem celular	CI_{50}		IS	
	OEC ^a ($\mu\text{g/mL}$)	DXR ^b (μM)	OEC	DXR
HCT-116	165,5 $\pm$ 1,15	2,57 $\pm$ 0,0	1,29	0,11
HeLa	92,6 $\pm$ 1,09	3,8 $\pm$ 1,1	2,31	0,07
SK-MEL-28	70,0 $\pm$ 1,16	4,0 $\pm$ 1,92	3,06	0,07
MCF-7	97,2 $\pm$ 1,45	NT	2,20	-
MDA-MB-231	312,4 $\pm$ 1,19	NT	0,68	-
PC-3	138,1 $\pm$ 1,26	NT	1,55	-
HaCaT	214,0 $\pm$ 1,06	0,28 $\pm$ 0,0	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Legenda: Dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. Os valores de CI_{50} foram expressos em $\mu\text{g/mL} \pm \text{SEM}$. **Nota:** CI_{50} : concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular. **NT:** Não testado; **IS:** Índice de seletividade (CI_{50} linhagem não tumoral (HaCaT)/ linhagem tumoral)

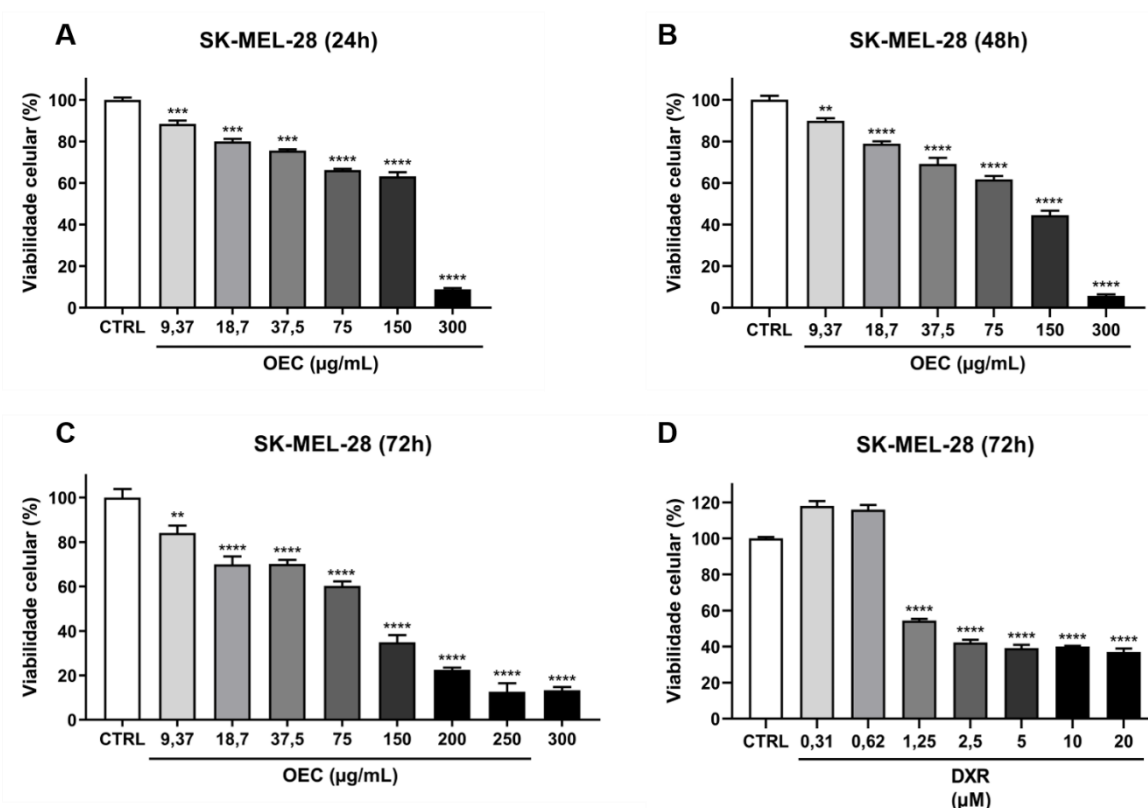
^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*; ^bDXR: doxorrubicina

O OEC induziu citotoxicidade nas linhagens tumorais após 72 horas de tratamento, com menor atividade na linhagem de adenocarcinoma de mama, MDA-MB-231, para a qual o valor de CI_{50} foi de 312,4 $\pm$ 1,19 $\mu\text{g/mL}$. As células de melanoma (SK-MEL-28) foram as mais sensíveis ao tratamento, sendo o valor de CI_{50} obtido para o óleo de 70,0 $\pm$ 1,16 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, a partir dos resultados de CI_{50} obtidos foi determinado o índice de seletividade (IS) do OEC e da doxorrubicina para linhagens tumorais testadas, em relação com a linhagem não tumoral (HaCaT). O OEC

apresentou maior IS para células SK-MEL-28, com valor de 3,06. Já a droga padrão doxorrubicina, apresentou valor de IS de 0,07, conforme exposto na Tabela 2.

Sendo assim, a linhagem SKMEL-28 foi escolhida para dar continuidade aos experimentos, com o objetivo de calcular a CI_{50} após diferentes tempos de tratamento. O gráfico 1 mostra que o OEC apresentou atividade citotóxica na linhagem SK-MEL-28 após 24, 48 e 72 horas de incubação (CI_{50} : $123,0 \pm 1,36 \mu\text{g/mL}$, $98,0 \pm 1,31 \mu\text{g/mL}$ e $70,0 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Gráfico 1A-C). Ainda, a droga padrão doxorrubicina apresentou valor de CI_{50} de $4,0 \pm 0,76 \mu\text{M}$, após 72 horas de tratamento (Gráfico 1D).

Gráfico 1 – Efeito do OEC^a ou DXR^b sobre a viabilidade de células da linhagem SK-MEL-28 após 24, 48 e 72 horas de tratamento



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

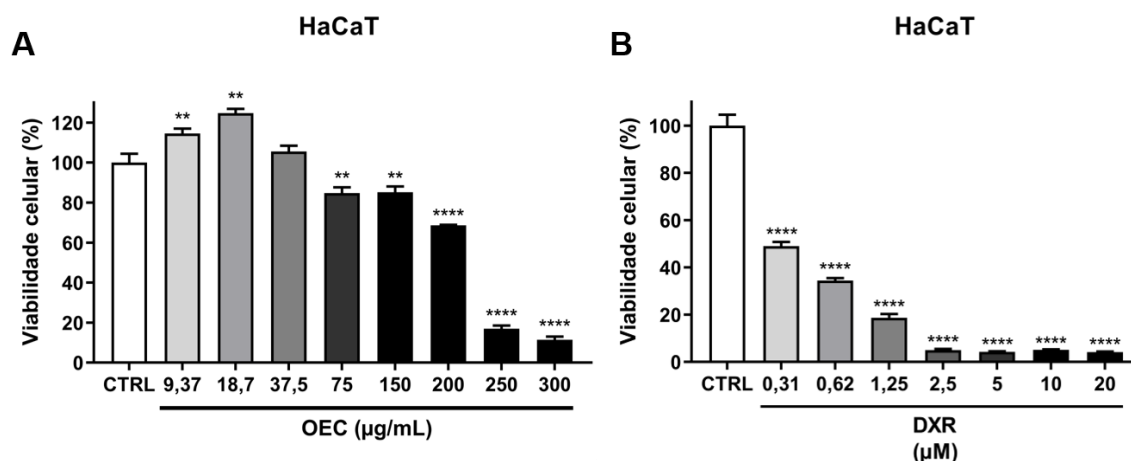
Legenda: Dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle.

^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*

^bDXR: Doxorrubicina

Em relação à linhagem não tumoral (HaCaT), o OEC apresentou CI_{50} de $214 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$ (Gráfico 2A). Já a droga padrão, doxorrubicina, apresentou CI_{50} de $0,28 \pm 0,0 \mu\text{M}$ para HaCaT (Gráfico 2B).

Gráfico 2 – Efeito do OEC^a ou DXR^b sobre a viabilidade de células da linhagem não tumoral HaCaT, após 72 horas de tratamento



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Legenda: Dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle.

^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*

^bDXR: Doxorrubicina

5.2 Investigação da ação antitumoral *in vitro* do OEC

Os ensaios de investigação do potencial antitumoral *in vitro* do OEC foram realizados após 24 horas de tratamento para o ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio e após 48 horas para os demais ensaios de investigação dos mecanismos de ação *in vitro*; utilizando as concentrações correspondentes à CI_{50} (70 $\mu\text{g/mL}$) e ao dobro da CI_{50} (140 $\mu\text{g/mL}$), as quais foram definidas a partir do ensaio de redução do MTT.

5.2.1 Avaliação do ciclo celular

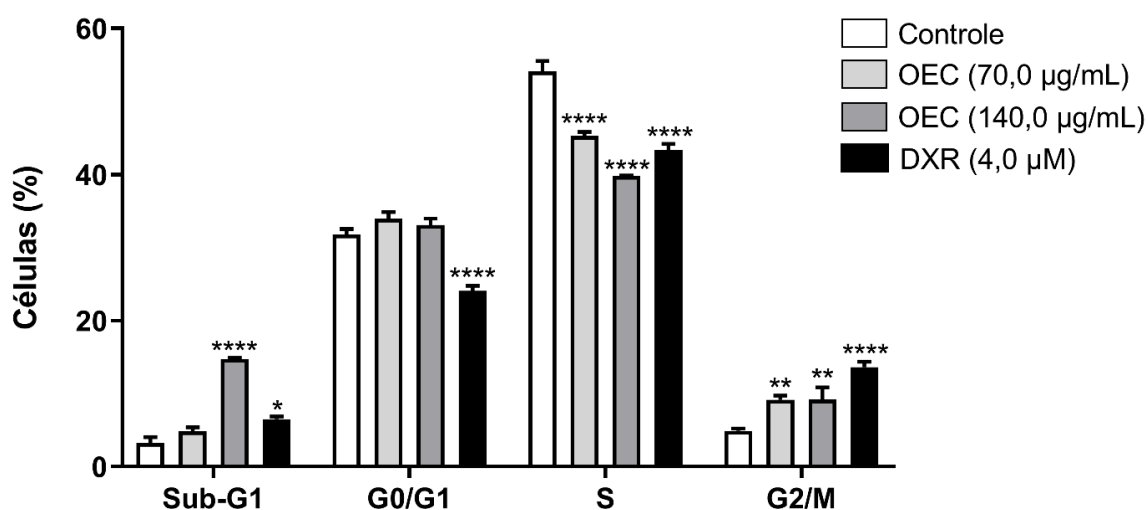
Após 48 horas de tratamento, o OEC causou alterações significativas na distribuição das células tumorais (SK-MEL-28) nas diferentes fases do ciclo celular

(Gráfico 3). Foi possível observar um aumento no percentual de células na fase G2/M (70 µg/mL: $9,16 \pm 0,56\%$; 140 µg/mL: $9,20 \pm 1,64\%$; $p < 0,01$ para ambas), quando comparado ao grupo controle (G2/M: $4,93 \pm 0,29\%$), acompanhado de uma redução no percentual de células na fase S (70 µg/mL: $45,30 \pm 0,53\%$; 140 µg/mL: $39,84 \pm 0,03\%$; $p < 0,0001$ para ambas), em comparação ao controle (S: $54,14 \pm 1,4\%$). Contudo, não houve alterações significativas na fase G0/G1.

Ainda, observou-se que o tratamento com o OEC aumentou significativamente o percentual de células no pico sub-G1, na concentração de 140 µg/mL ($14,8 \pm 0,12\%$; $p < 0,0001$), quando comparado ao grupo controle ($3,28 \pm 0,79\%$) (Gráfico 3).

A droga padrão doxorrubicina (4,0 µM) também induziu aumento de células em sub-G1 ($6,53 \pm 0,34\%$; $p < 0,05$) e na fase G2/M ($13,65 \pm 0,74\%$; $p < 0,0001$), com consequente diminuição na distribuição de células em G0/G1 ($24,09 \pm 0,70\%$; $p < 0,0001$) e na fase S ($43,33 \pm 0,85\%$; $p < 0,0001$), em comparação com seus respectivos controles (Sub-G1: $3,28 \pm 0,79\%$; G0/G1: $31,82 \pm 0,69\%$; S: $54,14 \pm 1,4\%$; G2/M: $4,93 \pm 0,29\%$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Efeito do OEC^a ou DXR^b sobre a progressão do ciclo celular em células da linhagem SK-MEL-28, após 48 horas de tratamento



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Legenda: Proporção de células (%) em cada fase do ciclo celular. Dados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. de três experimentos independente em duplicata, analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle.

^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*

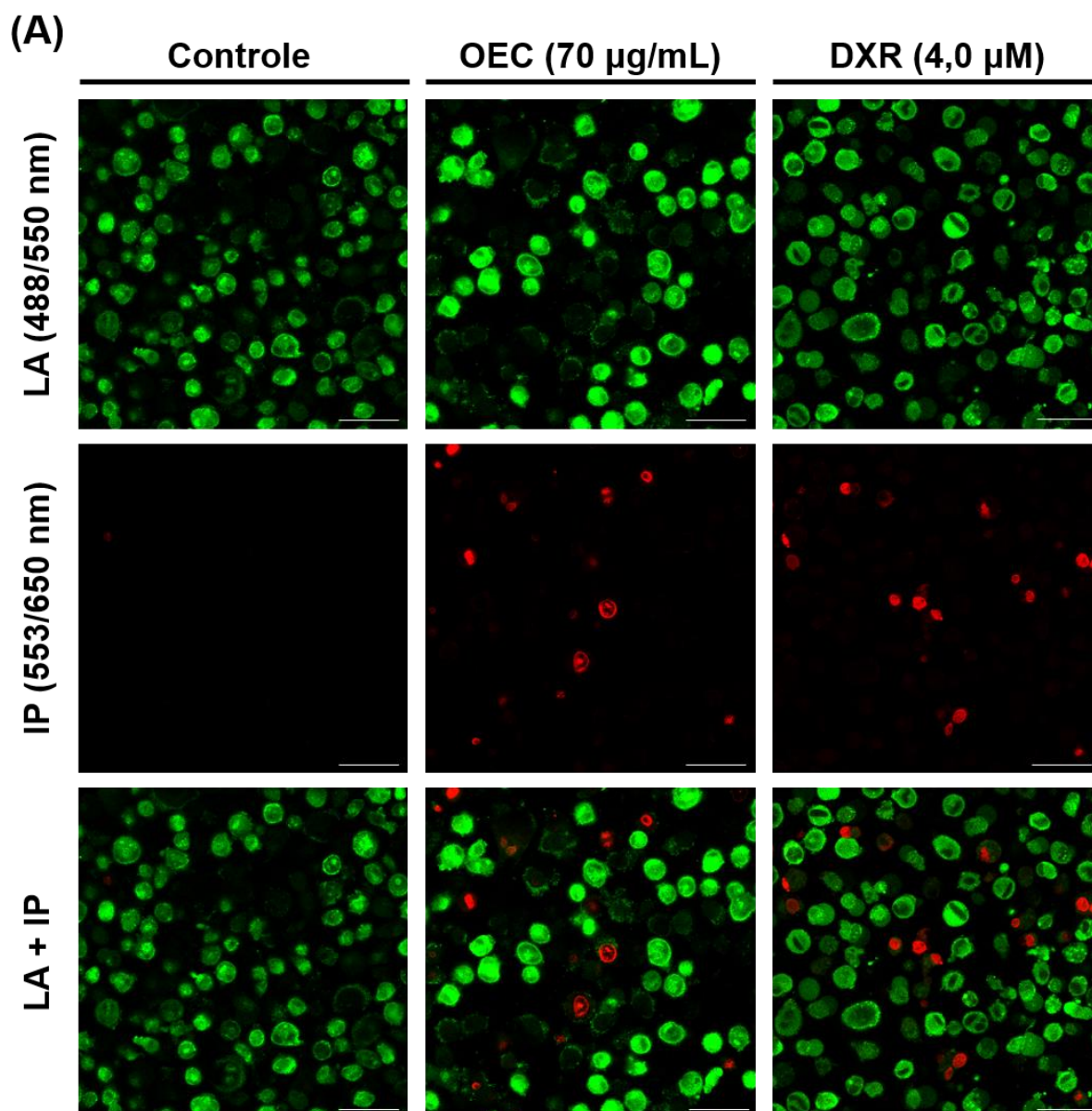
^bDXR: Doxorrubicina

5.2.2 Análise morfológica por microscopia confocal

A figura 5 mostra as células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo, analisadas por microscopia confocal. Após o tratamento com o OEC (70 µg/mL) ou com a droga padrão doxorrubicina (4,0 µM), por 48 horas, foi possível observar que as células SK-MEL-28 apresentavam características típicas de apoptose, indicadas pelas setas na figura 5B, como a formação de blebs na membrana, corpos apoptóticos e condensação da cromatina (Figura 5B).

As células em apoptose foram diferenciadas também pela coloração verde-brilhante do seu núcleo. Células em necrose ou mortas (núcleo vermelho) também foram visualizadas após os tratamentos. Diferentemente, células do grupo controle (não tratadas) apresentaram uma estrutura intacta, tamanho morfológicamente homogêneo e núcleo com coloração verde-claro (Figura 5A).

Figura 5 – Efeito do tratamento de 48 horas com o OEC^a (70 µg/mL) ou DXR^b (4,0 µM) em células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

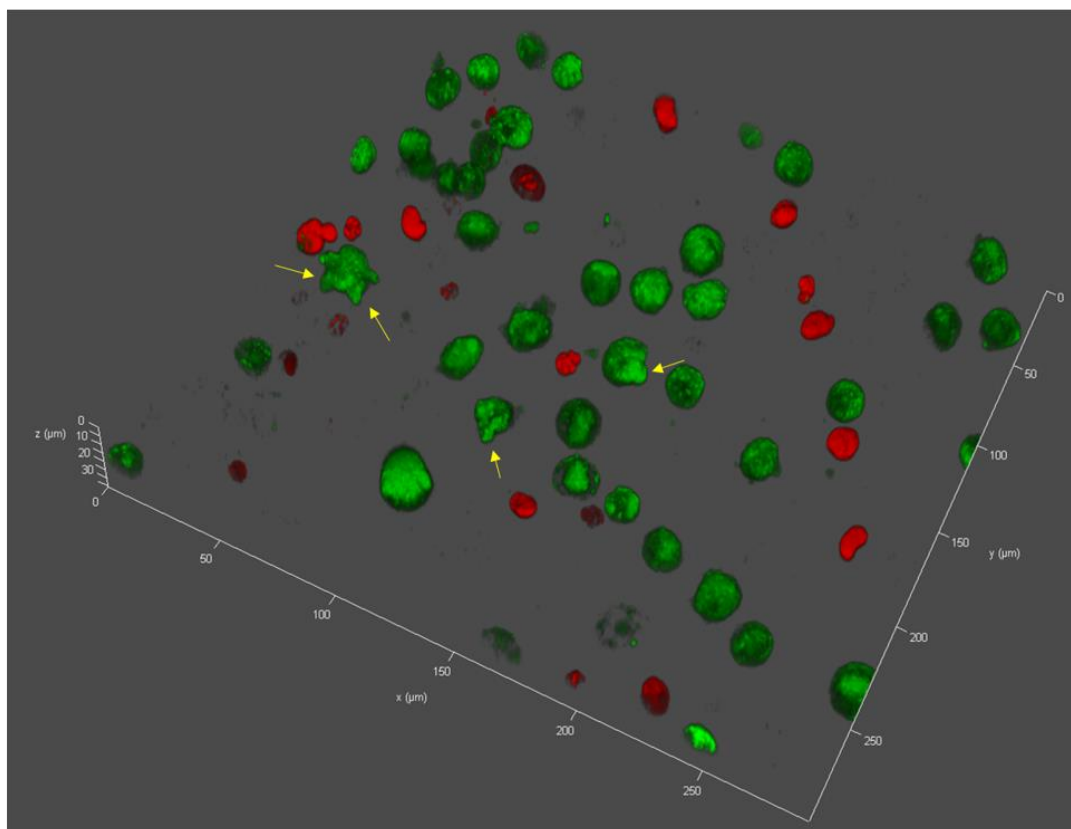
Legenda: (A) Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser, com ampliação de 400-630x (barra de escala = 50 µm). As células foram diferenciadas com base nos seguintes critérios: células viáveis apresentam estrutura intacta e núcleo verde claro; células em apoptose inicial exibem um núcleo verde brilhante e condensação da cromatina; células em apoptose tardia mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; células necróticas/mortas apresentam um núcleo vermelho. *Nota:* LA (laranja de acridina); IP (iodeto de propídeo).

^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*

^bDXR: Doxorubicina

Figura 5 – Efeito do tratamento de 48 horas com o OEC^a (70 µg/mL) ou DXR^b (4,0 µM) em células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo (continuação)

(B)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Legenda: Imagem em 3D representativa de células SK-MEL-28 tratadas com o OEC* (70 µg/mL) marcadas com a dupla coloração. **(B)** Visualização de características morfológicas próprias de apoptose. As setas em amarelo indicam a formação de *blebs* de membrana e corpos apoptóticos. *Nota:* LA (laranja de acridina); IP (iodeto de propídeo).

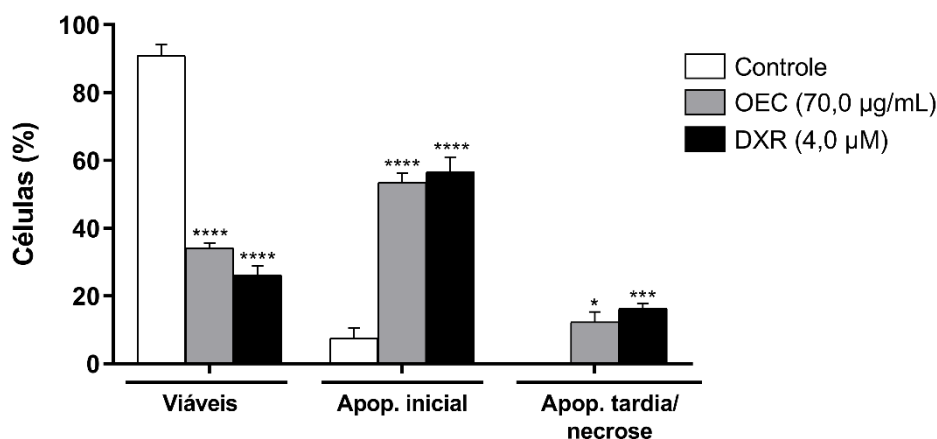
^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*

^bDXR: Doxorrubicina

Os dados quantitativos referentes à análise morfológica por microscopia confocal estão expressos no gráfico 4, onde é possível observar que o número de células em apoptose inicial aumentou significativamente de $7,5 \pm 1,8\%$ (grupo controle) para $53,5 \pm 2,2\%$ ($p < 0,0001$) após o tratamento com o OEC (70 µg/mL). Além disso, o OEC também aumentou significativamente o número de células em apoptose tardia/necrose de $0,0\%$ (grupo controle) para $12,3 \pm 2,4\%$ ($p < 0,05$). A doxorrubicina (droga padrão) aumentou significativamente tanto a apoptose inicial, de $7,5 \pm 1,8\%$

(grupo controle) para $56,6 \pm 3,2\%$ ($p < 0,0001$), como também a apoptose tardia/necrose, de $0,0\%$ (grupo controle) para $16,2 \pm 1,2\%$ ($p < 0,001$).

Gráfico 4 – Efeito do OEC^a (70 µg/mL) ou DXR^b (4,0 µM) em células SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo, após 48 horas de tratamento



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Legenda: Avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP). Os dados são expressos como média $\pm$ e.p.m. de células contadas em 3 campos em duplicatas e analisados por ANOVA seguido de Bonferroni's. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle. LA (laranja de acridina); IP (iodeto de propídeo).

^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*

^bDXR: Doxorubicina

5.2.3 Dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo

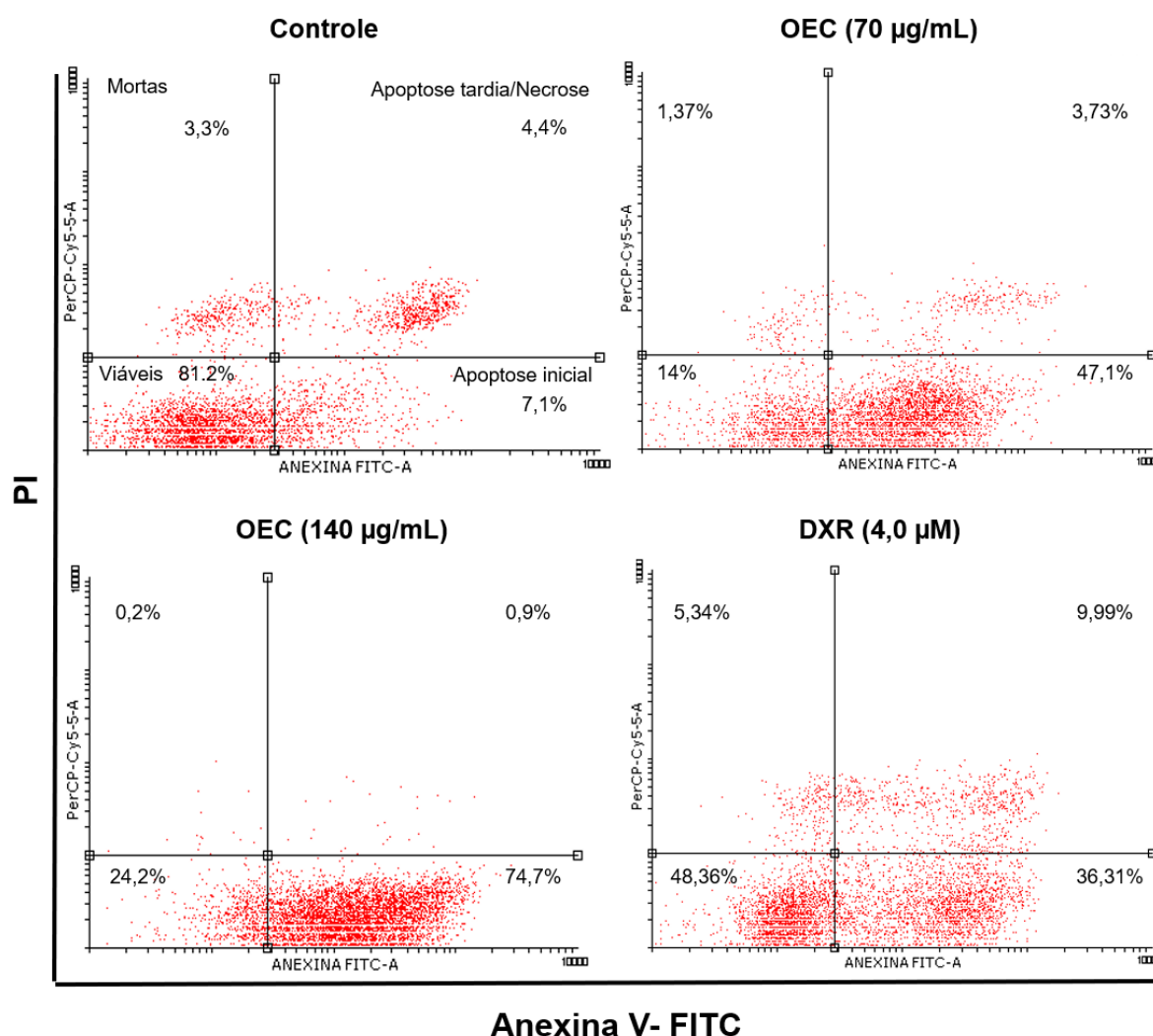
Após 48 horas de tratamento, as células SK-MEL-28 foram duplamente marcadas com anexina V/ IP e analisadas por citometria de fluxo. Observa-se que a proporção de células em apoptose inicial (anexina + / IP -, quadrante inferior direito do dotplot) aumentou significativamente de $7,1 \pm 0,34\%$ (controle) para $47,1 \pm 1,2\%$ e $74,7 \pm 1,3\%$ após o tratamento com 70 µg/mL e 140 µg/mL de OEC ($p < 0,0001$, para ambas), respectivamente, confirmando o indicativo de apoptose observado no ensaio anterior.

O OEC não alterou significativamente o percentual de células em apoptose tardia/necrose (anexina + / IP +, quadrante superior direito do dotplot) nas duas concentrações (70 µg/mL: $3,73 \pm 0,20\%$; 140 µg/mL: $0,958 \pm 0,36\%$) ($p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($4,4 \pm 0,29\%$) (Figura 6 e Gráfico 5).

Estes resultados, em conjunto, mostram que o OEC induziu um aumento significativo de células apoptóticas (apoptose total) nas concentrações avaliadas (70 $\mu\text{g/mL}$: $50,81 \pm 1,15\%$; 140 $\mu\text{g/mL}$: $75,65 \pm 1,36\%$) ($p < 0,0001$, para ambas), em relação ao controle ($11,46 \pm 0,52\%$) (Gráfico 5).

A droga padrão doxorrubicina também aumentou significativamente o número de células em apoptose inicial ($36,31 \pm 1,52\%$; $p < 0,0001$) e tardia ($9,99 \pm 1,52\%$; $p < 0,01$), em comparação ao controle ($7,1 \pm 0,34\%$ e $4,4 \pm 0,29\%$, respectivamente) (Figura 6 e Gráfico 5).

Figura 6 – Dotplots representativos de células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com Anexina V- FITC e iodeto de propídeo, após tratamento (48 horas) com OEC^a (70 e 140 $\mu\text{g/mL}$) ou DXR^b (4,0 μM)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

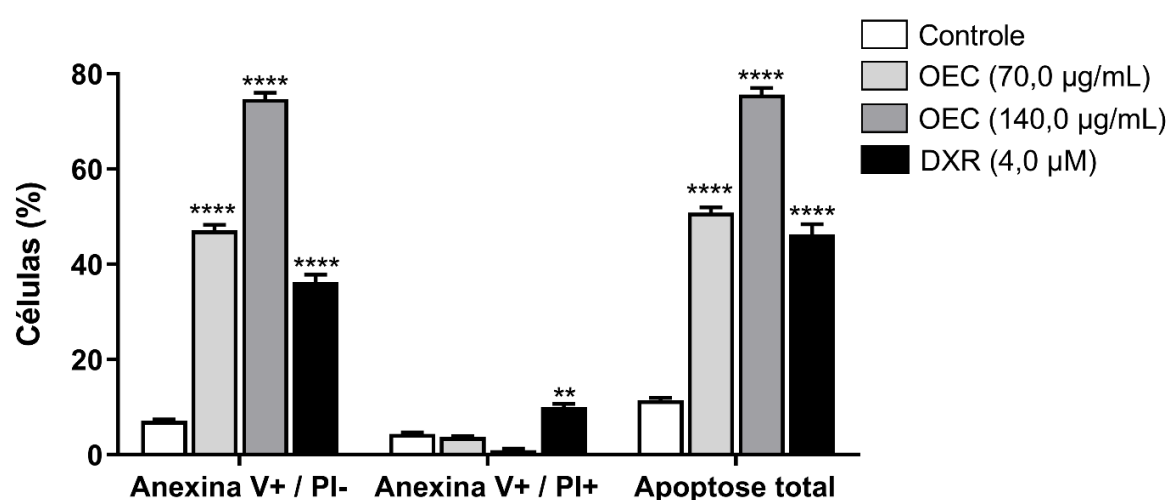
Legenda: Dotplots representativos obtidos por análise de citometria de fluxo. Os dotplots foram divididos em quatro quadrantes que representam diferentes populações celulares: células viáveis

(anexina - / IP -, quadrante inferior esquerdo), células em apoptose inicial (anexina + / IP -, quadrante inferior direito), células em apoptose tardia/ necrose (anexina + / IP +, quadrante superior direito), células mortas (anexina - / IP +, quadrante superior esquerdo). Foram adquiridos 10.000 eventos/amostra por meio dos detectores de fluorescência vermelho (IP, 325-488 nm) e verde (FITC, 493-525 nm).

^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*

^bDXR: Doxorrubicina

Gráfico 5 – Efeito do OEC^a (70 e 140 µg/mL) ou DXR^b (4,0 µM) em células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com Anexina V- FITC e iodeto de propídeo, após 48 horas de tratamento



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos a partir dos *dotplots*. A porcentagem de células em apoptose inicial (anexina + / IP -) e tardia (anexina + / IP +), bem como os valores de apoptose total (inicial + tardia) foi evidenciada. Os dados são expressos como média ± e.p.m. de um experimento independente em triplicata, analisado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle. *Nota:* FITC (isotiocianato de fluoresceína); IP (iodeto de propídeo).

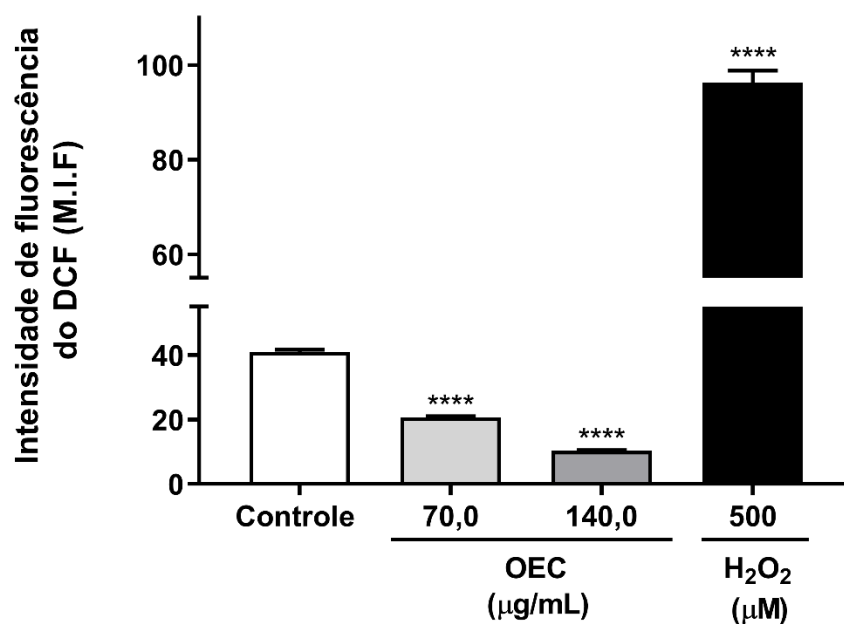
^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*

^bDXR: Doxorrubicina

5.2.4 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

O efeito do tratamento de 24 horas com o OEC sobre a produção de EROs encontra-se expresso na Gráfico 6. É possível observar que o OEC reduziu significativamente a produção de EROs em células da linhagem SK-MEL-28 nas duas concentrações avaliadas (70 µg/mL OEC: $20,7 \pm 0,36$; 140 µg/mL OEC: $10,34 \pm 0,22$; $p < 0,0001$ para ambas), em relação ao controle ($40,9 \pm 0,68$). Por outro lado, no grupo H_2O_2 é possível observar um aumento significativo da intensidade de fluorescência do DCF ($96,3 \pm 2,5\%$) ($p < 0,0001$), conforme observado no gráfico 6.

Gráfico 6 – Efeito do OEC^a (70 e 140 µg/mL) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células da linhagem SK-MEL-28, após 24 horas de tratamento



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Os dados são expressos como média $\pm$ e.p.m. de três experimentos independentes em duplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey. **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle. M.I.F.: Média da intensidade de fluorescência. *Nota:* H₂O₂: Peróxido de hidrogênio. DCF: 2',7'-diacetato diclorofluoresceína.

^aOEC: Óleo essencial de *Croton grewoides*

Discussão

6 DISCUSSÃO

Estudos realizados com a espécie vegetal *Croton grewoides* têm demonstrado seu potencial farmacológico no tratamento diversas doenças. Os óleos essenciais extraídos das folhas e do caule dessa espécie apresentaram potente atividade inseticida, antidiarreica, antioxidante, bem como, atividade antitumoral *in vivo* em modelo de sarcoma 180 em camundongos (SILVA *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2016; SOUSA, 2013; CAVALCANTI; DA SILVEIRA; DA SILVA, 2020). Em adição, de acordo com a análise qualitativa e quantitativa dos compostos presentes no OEC, seu componente majoritário trata-se do composto α -pineno.

O α -pineno é um terpenoide encontrado em óleos essenciais de várias espécies, os quais estão entre os representantes mais conhecidos de uma ampla família de monoterpenos. Diversos estudos têm apresentado seu potencial farmacológico, que inclui atividades moduladora da resistência a antibióticos, anticoagulante, antimicrobiana, antimalárica, antioxidante, anti-inflamatória, anti-*Leishmania*, bem como, analgésica. O α -pineno também apresentou efeitos antitumorais contra linhagens de células de carcinoma hepatocelular (BEL-7402) (CHEN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015), e de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) (YANG *et al.*, 2016), em que demonstrou estimular a apoptose, evidenciada pela interrupção inicial da função mitocondrial, além de fragmentação do DNA e exposição da fosfatidilserina na superfície celular (MATSUO *et al.*, 2011; SALEHI *et al.*, 2019). Nesse contexto, considerando o potencial farmacológico do óleo essencial de *C. grewoides* (OEC), mais precisamente seu potencial antitumoral, este trabalho estudou a ação antitumoral *in vitro* do referido óleo essencial em linhagens de células tumorais humanas.

O presente trabalho se iniciou com a avaliação da citotoxicidade e determinação da CI_{50} do OEC, por meio do ensaio de redução do MTT, em seis linhagens de células tumorais (HeLa, PC-3, MDA-MB-231, HCT-116, SK-MEL-28 e MCF-7) e em uma linhagem de célula não tumoral (HaCaT) humanas. Nesse ensaio, o OEC apresentou atividade antitumoral contra as linhagens testadas, com menor atividade na linhagem de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) e maior atividade em células de melanoma (SK-MEL-28). Ensaio realizados por Prado (2019) mostraram atividade antitumoral de partições do extrato metanólico de *C. grewoides*

em linhagens de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e de leucemia humana (HL-60), por meio do ensaio *Alamar blue* após 72 horas de exposição.

Outras espécies do gênero *Croton* também possuem relatos na literatura de atividade antitumoral *in vitro*, a exemplo da espécie *Croton tiglium* L., cujo óleo da semente e seu principal constituinte ativo, 12- O -tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), demonstraram atividade antitumoral em células de câncer de próstata (LNCaP) (ZHENG *et al.*, 2004). Ainda, o óleo essencial de *Croton flavens* L. apresentou atividade antitumoral contra linhagens de carcinoma de pulmão humano (A-549) e de adenocarcinoma de cólon humano (DLD-1) (SYLVESTRE *et al.*, 2006); os óleos essenciais obtidos das espécies de *C. matourensis* e *C. micans* apresentaram atividade antitumoral contra linhagens de adenocarcinoma de cólon humano (LoVo), de adenocarcinoma de colo do útero (HeLa) e de adenocarcinoma de cólon humano (variante genética de LoVo deficiente de proteína P53) (X-17) (COMPAGNONE *et al.*, 2010).

Dentre as linhagens tumorais avaliadas neste estudo, a linhagem de melanoma (SK-MEL-28) foi a mais sensível ao tratamento com o OEC, sendo, então, a linhagem escolhida para a continuidade dos estudos de atividade antitumoral *in vitro*. O melanoma é um tipo de câncer de pele maligno potencialmente fatal, que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina). Pode surgir em diferentes partes do corpo, na pele ou mucosas, na forma de manchas, pintas ou sinais (INCA, 2020). Embora o melanoma seja o menos comum em comparação com os outros tipos de cânceres de pele, ele é o mais letal, sendo responsável por quase 73% dos óbitos relacionados ao câncer de pele, devido ao seu alto potencial metastático (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

No Brasil, foram registradas cerca de 1.978 mortes por melanoma no ano de 2019. E as estimativas de novos casos para o ano de 2021 são de 8.450, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres (INCA, 2020). O melanoma é tratável com cirurgia nos estágios iniciais, onde se encontra localizado, tendo uma alta taxa de sobrevida relativa em 5 anos de 98%. Entretanto, essa porcentagem cai substancialmente quando os pacientes são diagnosticados com melanoma avançado ou metastático, quando as opções de tratamento se tornam limitadas. Sendo assim, é essencial a descoberta e o desenvolvimento de métodos mais eficientes de diagnóstico, bem

como, de terapias mais específicas e efetivas para o seu tratamento (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020).

Infelizmente, os fármacos utilizados na quimioterapia citotóxica padrão são inespecíficos e afetam tanto o câncer quanto as células normais, provocando muitos efeitos colaterais, como neutropenia, anemia, queda de cabelo e náusea (KLUSKA *et al.*, 2021). Nessa perspectiva, buscou-se investigar uma possível seletividade do OEC para as células tumorais, a partir dos valores de CI_{50} obtidos. Para isso foi calculado o índice de seletividade (IS), o qual consiste em um índice que permite inferir se a amostra teste é mais seletiva para as células tumorais em comparação às células não tumorais, sendo considerada como seletiva quando o valor de IS for igual ou superior a 2 (DE LIMA SERAFIM *et al.*, 2018; PILON *et al.*, 2020).

Os resultados mostraram que o OEC exibiu baixa toxicidade na linhagem HaCaT, com índice de seletividade (IS) de 3,06, demonstrando assim, que o OEC apresentou seletividade para as células SK-MEL-28 em comparação com as células não tumorais, HaCaT. Dados anteriores mostraram que o OEC apresentou moderada toxicidade (CH_{50} = 370,3 μ g/mL), por meio do ensaio de hemólise em eritrócitos de camundongos *Swiss*, os quais são extensamente afetados pela quimioterapia antineoplásica. Adicionalmente, dados *in vivo* também reforçam a observação de moderada toxicidade do OEC, uma vez que sua DL_{50} em camundongos foi de 366,1 mg/kg, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo (SOUSA, 2013).

Já a droga padrão utilizada, DXR, apresentou alta toxicidade para as células não tumorais HaCaT, e não foi seletiva para as células SK-MEL-28, visto que apresentou valor de IS de 0,07. A DXR é um agente quimioterápico eficaz comumente utilizado no tratamento de inúmeros tipos de câncer (GEISBERG; SAWYER, 2010; KHASRAW *et al.*, 2012). No entanto, apesar de apresentar potente atividade antitumoral, a DXR também apresenta alta toxicidade para células normais de vários órgãos, incluindo o coração, o cérebro, os rins, trato gastrointestinal, entre outros, devido a sua toxicidade não seletiva para as células tumorais (CHEN; AI, 2016; PRATHUMSAP *et al.*, 2020).

Posteriormente, com o objetivo de investigar o efeito citotóxico do OEC sobre as células tumorais SK-MEL-28, seus efeitos foram avaliados após diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72 horas), os quais, de acordo com os valores de CI_{50} calculados, mostraram que os tratamentos de 24 e 48 horas foram menos efetivos

comparado ao tratamento de 72 horas. Em seguida, para caracterização da ação antitumoral, foram utilizadas duas concentrações do OEC, o valor correspondente à CI_{50} (70 $\mu\text{g/mL}$) e ao dobro da CI_{50} (140 $\mu\text{g/mL}$). O período de tratamento escolhido para análise foi de 48 horas para os ensaios de análise do ciclo celular e de apoptose, e 24 horas para o ensaio de quantificação de EROs, já que se buscava identificar os mecanismos que ocorrem durante os processos de morte celular induzida pelo OEC.

Inicialmente foi investigado se o tratamento com o OEC influenciaria na distribuição de células SK-MEL-28 nas diferentes fases do ciclo celular, visto que, vários agentes quimioterápicos interferem nesse processo, a exemplo da doxorrubicina, 5-fluorouracil (5-FU), paclitaxel, etoposido, cisplatina, dentre outros (DI SOTTO *et al.*, 2020; DA SOM; MIN; LEE, 2020; JIANG *et al.*, 2020; KLUSKA *et al.*, 2021; MOHIUDDIN *et al.*, 2021). E, uma vez impedido a conclusão desse processo, em qualquer fase do ciclo celular, a divisão celular e o crescimento tumoral são inibidos (NIU *et al.*, 2020).

As fases do ciclo celular podem ser diferenciadas entre si com base na quantidade de DNA marcada com o iodeto de propídio (IP) na citometria de fluxo. Isso porque, células presentes na fase G0/G1 apresentam ploidia típica ($2n$) correspondentes a células que ainda não estão se dividindo, ao passo que células que estão iniciando a duplicação do seu material genético na fase S apresentam ploidia $>2n$, além das células presentes na fase G2/M, as quais já apresentam o material genético totalmente duplicado ($4n$) (SHEN; VIGNALI; WNAG, 2017; RAMADOSS; SIVALINGAM, 2021). Além disso, pode surgir um pico com quantidade de DNA inferior à da fase G0/G1 ($<2n$), denominado de pico sub-G1, o qual, segundo a literatura, é caracterizado por um aumento na quantidade de DNA fragmentado, indicativo do processo de apoptose (ITHARAT *et al.*, 2021).

Nesse sentido, foi possível observar que o OEC induziu aumento de células em sub-G1, permitindo sugerir que seu efeito citotóxico envolve a indução de apoptose. Observou-se também que o OEC aumentou o percentual de células na fase G2/M, e, simultaneamente, diminuiu a população de células na fase S. Esses resultados sugerem que o OEC apresenta efeitos antimitóticos, promovendo a morte das células tumorais (LIU *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020).

Dados da literatura com óleos essenciais de outras espécies do gênero *Croton* corroboram os resultados do presente trabalho, a exemplo do estudo realizado por

Niu e colaboradores (2020), em que o óleo essencial de *C. tiglius* inibiu a progressão do ciclo celular em células de câncer de pulmão A549 (IC₅₀: 48,38 µg/mL). Ademais, o estudo realizado por Salehi e colaboradores (2019), mostrou que o α-pineno, componente majoritário do óleo essencial investigado no presente trabalho, inibiu as linhagens de células de hepatoma BEL-7402 e HepG2, mediante parada do ciclo celular na fase G2/M, corroborando o efeito antimitótico apresentado pelo OEC no presente estudo.

Considerando o resultado sugestivo de indução de apoptose, após observação de células em sub-G1, e o fato de que muitos agentes quimioterápicos promovem a morte de células tumorais por meio da ativação da apoptose (YAO *et al.*, 2020), o presente estudo buscou investigar se o OEC também atua dessa forma. As células SK-MEL-28 tratadas com o OEC, duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo e analisadas por microscopia confocal, apresentaram aumento na quantidade de células com núcleo verde brilhante, sugestivo de apoptose inicial, além de morfologia típica de apoptose, como formação de *blebs* na membrana plasmática, corpos apoptóticos e condensação da cromatina. Esse efeito apoptótico foi confirmado na citometria de fluxo, com a marcação com Anexina V-FITC, a qual se liga seletivamente à fosfatidilserina, um fosfolípido externalizado na membrana de células apoptóticas, constituindo um importante indicador de apoptose inicial. Em conjunto, esses resultados inferem que a apoptose é um mecanismo de morte celular produzido pelo OEC.

A marcação com o iodeto de propídeo (IP) é amplamente utilizada para avaliar a integridade da membrana celular, pois o IP é uma molécula fluorescente que só atravessa membranas celulares que perderam sua integridade, marcando o DNA dentro dessas células (ROSENBERG; AZEVEDO; IVASK, 2019). Com base nisso, a dupla marcação com anexina V-FITC/IP (anexina V+/IP+), é utilizada para indicar os estágios mais avançados do processo apoptótico ou necrótico, quando além da externalização da fosfatidilserina, o DNA também se encontra exposto para ser marcado pelo IP. No entanto, no presente estudo, não houve aumento no percentual de células SK-MEL-28 duplamente marcadas, após o tratamento com o OEC, indicando que as células observadas estavam na fase inicial do processo apoptótico.

Um estudo realizado por De Lima e colaboradores (2018) com o óleo essencial (OE) das folhas de *Croton matourensis* mostra que o referido óleo promoveu

apoptose, identificada pela marcação com anexina V-FITC/IP em citometria de fluxo, a qual foi observada por meio do aumento no percentual de células Hep-G2 em apoptose inicial (anexina V+/IP-) e em apoptose tardia/necrose (anexina V+/IP+). Outro estudo realizado por Poofery, Sripanidkulchai e Banjerdpongchai (2020) com o extrato acetato de etila da espécie *Croton oblongifolius* mostrou a indução de apoptose em células câncer de mama MDA-MB-231, no qual observaram aumento nas porcentagens de células MDA-MB-231 em apoptose inicial (anexina V+/IP-) e em apoptose tardia/necrose (anexina V+/IP+). Além desses, a pesquisa desenvolvida por Niu e colaboradores (2020) também corrobora os resultados do presente estudo, o qual avaliou a atividade antitumoral do óleo essencial de *C. tiglius* em células de câncer de pulmão A549, nas concentrações de 0, 20, 40 e 60 µg/mL, os resultados da marcação com Anexina-V-FITC/IP exibiram aumento significativo de apoptose de maneira depende de concentração.

Uma das características do câncer é a produção aumentada de EROs, em comparação com as células normais. Esse nível aumentado favorece a progressão e agressividade tumoral por meio da estimulação da proliferação, inibição de vias pró-apoptóticas, além de invasão e metástase (MARTINEZ-USEROS *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2019). Entretanto, níveis superelevados de EROs podem causar dano ao DNA, proteínas, lipídios e, por fim, ocasionar a morte da célula tumoral (REN *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2019).

Nesse sentido, estratégias terapêuticas recentes buscaram alterar os níveis de EROs, a partir de agentes que aumentem efetivamente os níveis intracelulares de EROs acima do limiar de toxicidade, ou de agentes que diminuam a atividade dos sistemas antioxidantes, a partir da inibição de enzimas antioxidantes chave, elevando os níveis de EROs, causando morte celular via estresse oxidativo (RECZEK; CHANDEL, 2018; XU *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2019; REN *et al.*, 2019). Por outro lado, há também moléculas que diminuem os níveis de EROs abaixo de um limite específico, e assim, levam à interrupção das cascatas de sinalização de migração, proliferação e sobrevivência celular mediadas por EROs. Estudos mostram que a utilização de antioxidantes pode diminuir os níveis de EROs intracelular e reduzir a progressão do câncer (GALADARI *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2017).

Para avaliação dos níveis EROs foi realizado o ensaio utilizando o fluoróforo DCFH-DA, no qual foi possível diminuição nos níveis de EROs após exposição ao

OEC, permitindo inferir que o OEC possui atividade antioxidante nas células SK-MEL-28. O resultado obtido com o OEC é promissor, visto que o tratamento com agentes antioxidantes tem se tornado uma abordagem terapêutica em desenvolvimento no tratamento do câncer (FERDOUS; YUSOF, 2021).

Comparando os resultados obtidos no presente estudo com os dados da literatura, pode-se observar que a maioria das espécies do gênero *Croton* possuem compostos com ação antioxidante associado a um efeito antitumoral, como *C. grewoides*, *C. matourensis*, *C. argyrophyllus* (DE MOURA SILVA *et al.*, 2017; AMARAL *et al.*, 2018; BEZERRA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2021). O estudo realizado por Salehi e colaboradores (2019), com o componente majoritário do óleo essencial investigado no presente estudo, o α -pineno, corrobora com os resultados observados neste estudo, o qual demonstrou que, quando pré-administrado em células Hep-G2, o α -pineno foi capaz de inibir significativamente a formação de EROs após exposição à radiação ultravioleta (UV). As células Hep-G2 expostas à radiação UV exibiram níveis aumentados de peroxidação, em comparação com as células do controle, que foram reduzidos pelo α -pineno (SALEHI *et al.*, 2019).

Os resultados apresentados neste trabalho contribuem para a elucidação da ação antimelanoma do óleo essencial de *C. grewoides* e estimulam estudos adicionais para a caracterização dos seus efeitos antimitótico, apoptótico e antioxidante.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base nos estudos realizados foi possível concluir que o óleo essencial extraído das folhas de *Croton grewoides* (OEC):

- Apresenta atividade citotóxica em células tumorais humanas (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231 e SK-MEL-28), com maior atividade na linhagem de melanoma (SK-MEL-28);
- Possui seletividade para células tumorais SK-MEL-28, superior à droga padrão doxorrubicina, associada à baixa toxicidade em células não tumorais humanas (HaCaT);
- Exerce seu efeito antitumoral *in vitro* em células SK-MEL-28 por induzir efeito antimitótico e morte celular por apoptose;
- Apresenta atividade antitumoral *in vitro* em células SK-MEL-28 associada a efeitos antioxidantes.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS; R.; LARISCH, S. Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death - The Story of ARTS and SMAC. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 663, 2020.

ADAMS, J. M.; CORY, S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. **Cell Death & Differentiation**. v. 25, n. 1, pp.27-36, 2018.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by cromatography/mass spectroscopy. **Allured Publ. Corp. Carol Stream**, 1995.

AHN, S. B.; MOHAMEDALI, A.; PASCOVICI, D.; ADHIKARI, S.; SHARMA, S.; NICE, E. C.; BAKER, M. S. Proteomics Reveals Cell-Surface Urokinase Plasminogen Activator Receptor Expression Impacts Most Hallmarks of Cancer. **Proteomics**, v. 19, n. 21-22, p.1900026, 2019.

ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALI, E. S.; SHARKER, S. M.; ISLAM, M. T.; KHAN, I. N.; SHAW, S.; RAHMAN, M. A.; UDDIN, S. J.; SHILL, M. C.; REHMAN, S.; DAS, N.; AHMAD, S. Targeting cancer cells with nanotherapeutics and nanodiagnostics: Current status and future perspectives. In **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2020.

ALMEIDA, Adriano José. **Análise imunoistoquímica de fatores angiogênicos em lesões benignas e malignas tireoidianas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, SP, 2018.

ALMEIDA, Matheus Augusto Patricio. **Ativação da apoptose mediada por lactoferrina bovina em células Vero**. Rio de Janeiro, p. 68, 2019.

AMARAL, R. G.; ANDRADE, L. N.; SEVERINO, P.; DE ARAUJO, S. S.; SANTOS, M. I. S.; DIAS, A. S.; MORAES FILHO, M. O.; PESSOA, C. Ó.; CARVALHO, A. A.; THOMAZZI, S. M.; ESTEVAM, C. S. Investigation of the Possible Antioxidant and Anticancer Effects of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae). **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 253-258, 2018.

AMARAL, R. G.; DOS SANTOS, S. A.; ANDRADE, L. N.; SEVERINO, P.; CARVALHO, A. A. Natural products as treatment against cancer: a historical and current vision. **Clin. Oncol**, v. 4, n. 5, p.1562, 2019.

AMINIPOUR, Z.; KHORSHID, M.; KESHVARI, H.; BONAKDAR, S.; WAGNER, P.; VAN DER BRUGGEN, B. Passive permeability assay of doxorubicin through model cell membranes under cancerous and normal membrane potential conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 146, pp.133-142, 2020.

ASGHAR, U.; WITKIEWICZ, A. K.; TURNER, N. C.; KNUDSEN, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 14, n. 2, pp.130-146, 2015.

ASHKENAZI, A.; FAIRBROTHER, W. J.; LEVERSON, J. D.; SOUERS, A. J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 4, p.273, 2017.

AYOB, A. Z.; RAMASAMY, T. S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. **Journal of biomedical science**, v. 25, n. 1, p.20, 2018.

AZEVEDO, L. D. D.; BASTOS, M. M.; OLIVEIRA, A. P. D.; BOECHAT, N. Sínteses e propriedades de fármacos inibidores da tirosina quinase BCR-ABL, utilizados no tratamento da leucemia mieloide crônica. **Química Nova**, v. 40, n. 7, pp.791-809, 2017.

BABES, R. M.; TOFOLEAN, I. T.; SANDU, R. G.; BARAN, O. E.; COSOREANU, V.; ILIE, M. T.; DUTA, A. I.; CEAUSESCU, M. C.; CIUCUR, P. M.; COSTACHE, S.; GANEA, C. Simple discrimination of sub-cycling cells by propidium iodide flow cytometric assay in Jurkat cell samples with extensive DNA fragmentation. **Cell Cycle**, v. 17, n. 6, pp.766-779, 2018.

BAHADAR, H.; MAQBOOL, F.; NIAZ, K.; ABDOLLAHI, M. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. **Iranian biomedical journal**, v. 20, n. 1, p.1, 2016.

BARRERA, C. A. C.; GÓMEZ, D. C.; CASTIBLANCO, F. A. Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 2, pp.234-247, 2016.

BARRETA, Amílcar. **Carcinomas de ovário associados à endometriose: expressão de marcadores proteicos de terapia alvo e prognóstico**. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, SP, 2018.

BASU, A. K.; NOHMI, T. Chemically-induced DNA damage, mutagenesis, and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1767, 2018.

BASU, A. K. DNA damage, mutagenesis and cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 970, 2018.

BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; DE BRUIN, R. A. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, pp.518-528, 2013.

BEZERRA, F. W. F.; SALAZAR, M. D. L. A. R.; FREITAS, L. C.; DE OLIVEIRA, M. S.; DOS SANTOS, I. R. C.; DIAS, M. N. C.; GOMES-LEAL, W.; DE AGUIAR ANDRADE, E. H.; FERREIRA, G. C.; DE CARVALHO JR, R. N. Chemical composition, antioxidant activity, anti-inflammatory and neuroprotective effect of

Croton matourensis Aubl. Leaves extracts obtained by supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, p.104992, 2020.

BONACCI, T.; EMANUELE, M. J. Dissenting degradation: Deubiquitinases in cell cycle and cancer. In *Seminars in Cancer Biology*. **Academic Press**. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)**. Rio de Janeiro, RJ. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)**. Rio de Janeiro, RJ. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)**. Rio de Janeiro, RJ. 2020.

CAON, I.; BARTOLINI, B.; PARNIGONI, A.; CARAVÀ, E.; MORETTO, P.; VIOLA, M.; KAROUSOU, E.; VIGETTI, D.; PASSI, A., May. Revisiting the hallmarks of cancer: the role of hyaluronan. In *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. v. 62, pp. 9-19. 2020.

CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and risk factors of melanoma. **Surgical Clinics**, v. 100, n. 1, pp.1-12, 2020.

CAVALCANTI, D. F. G.; DA SILVEIRA, D. M.; DA SILVA, G. C. Aspectos e potencialidades biológicas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, pp.45931-45946, 2020.

CHAUDHARY, P.; SHARMA, R.; SAHU, M.; VISHWANATHA, J. K.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y. C. 4-Hydroxynonenal induces G2/M phase cell cycle arrest by activation of the ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR)/checkpoint kinase 1 (Chk1) signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 28, p. 20532-20546, 2013.

CHEN, W.; LIU, Y.; LI, M.; MAO, J.; ZHANG, L.; HUANG, R.; JIN, X.; YE, L. Efeito antitumoral de α -pineno em linhas de células de hepatoma humano por meio da indução da parada do ciclo celular G2/M. **J. Pharmacol. Sci.** v. 127, p. 332-338, 2015.

CHEN, W. Q.; XU, B.; MAO, J. W.; WEI, F. X.; LI, M.; LIU, T.; JIN, X. B.; ZHANG, L. R. Inhibitory effects of alpha-pinene on hepatoma carcinoma cell proliferation. **Asian Pac. J. Cancer Prev.** v. 15, p. 3293-3297, 2014.

CHEN, Z. I.; AI, D. I. Cardiotoxicity associated with targeted cancer therapies. **Molecular and clinical oncology**, v. 4, n. 5, pp.675-681, 2016.

CHIPUK, J. E.; MOLDOVEANU, T.; LLAMBI, F.; PARSONS, M. J.; GREEN, D. R. The BCL-2 family reunion. **Molecular cell**, v. 37, n. 3, pp.299-310, 2010.

COLLERY, P.; VEENA, V.; HARIKRISHNAN, A.; DESMAELE, D. The rhenium (I)-diselenoether anticancer drug targets ROS, TGF- β 1, VEGF-A, and IGF-1 in an in vitro experimental model of triple-negative breast cancers. **Investigational new drugs**, v. 37, n. 5, pp.973-983, 2019.

COMPAGNONE, R. S.; CHAVEZ, K.; MATEU, E.; ORSINI, G.; ARVELO, F.; SUÁREZ, A. I. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Records of Natural Products**, v. 4, n. 2, 2010.

CONG, J.; WANG, X.; ZHENG, X.; WANG, D.; FU, B.; SUN, R.; TIAN, Z.; WEI, H. Dysfunction of natural killer cells by FBP1-induced inhibition of glycolysis during lung cancer progression. **Cell metabolism**, v. 28, n. 2, pp.243-255, 2018.

CORTÉS, C. Innovación farmacológica en terapias antineoplásicas. **Contacto Científico**, v. 7, n. 1, 2017.

COSSARIZZA, A.; FERRARESI, R.; TROIANO, L.; ROAT, E.; GIBELLINI, L.; BERTONCELLI, L.; NASI, M.; PINTI, M. Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 4, n. 12, p. 1790–1797, 2009.

COSTA, A. M.; SILVA, V. V. Estratégias nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do câncer. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2, pp.1-13, 2017.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads, **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n.6, p. 3670-95, 2013.

CROSS, F. R.; BUCHLER, N. E.; SKOTHEIM, J. M. Philos. Trans. R. Soc. Lond. **B Biol. Sci.** v. 366, p. 3532–3544, 2011.

CROWLEY, L. C.; CHOJNOWSKI, G.; WATERHOUSE, N. J. Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 10, pp.pdb-prot087247, 2016.

CRUZ, Adriana Taveira da. **Componentes do ciclo celular ao longo da gênese do melanoma e seus possíveis reguladores**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. 125f, São Paulo, 2010.

DA SILVA, A. D. S.; E SILVA, K. D. M.; NETO, J. C.; DE OLIVEIRA COSTA, V. C.; PESSOA, H. D. L. F.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; DE ANDRADE CAVALCANTE, F. *Croton grewioides* Baill (Euphorbiaceae) shows antidiarrheal activity in mice. **Pharmacognosy research**, v. 8, n. 3, p.202, 2016.

DA SOM, K. I. M.; Min, K.; Lee, S. K. Cell Cycle Dysregulation Is Associated With 5-Fluorouracil Resistance in Gastric Cancer Cells. **Anticancer Research**, v. 40, n. 6, pp.3247-3254, 2020.

DE AQUINO, L.A. Acompanhamento do crescimento normal. **Revista de pediatria SOPERJ**, v. 12, n. 1, pp.15-20, 2011.

DE LA VEGA, M. R.; CHAPMAN, E.; ZHANG, D. D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. **Cancer cell**, v. 34, n. 1, pp.21-43, 2018.

DE LIMA, E. J.; ALVES, R. G.; ANUNCIAÇÃO, T. A. D.; SILVA, V. R.; SANTOS, L. D. S.; SOARES, M. B.; CARDOZO, N.; COSTA, E. V.; SILVA, F.; KOOLEN, H. H.; BEZERRA, D. P. Antitumor effect of the essential oil from the leaves of *Croton matourensis* Aubl. (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2974, 2018.

DE MEDEIROS, V. M.; DO NASCIMENTO, Y. M.; SOUTO, A. L.; MADEIRO, S. A. L.; DE OLIVEIRA COSTA, V. C.; SILVA, S. M. P.; SILVA, V. D. S. F.; DE FÁTIMA AGRA, M.; DE SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; TAVARES, J. F. Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewoides*. **Microbial pathogenesis**, v. 111, pp.468-471, 2017.

DE MOURA SILVA, M. H.; DOS SANTOS, N. B. C.; DE LIMA, L. L.; OLIVEIRA, A. F. M. Óleo essencial de *Croton grewoides* Baill. (Euphorbiaceae): Composição química e atividades antibacteriana e antioxidante. 2017.

DE SIMONE, U.; SPINILLO, A.; CALONI, F.; AVANZINI, M. A.; COCCINI, T. In vitro evaluation of magnetite nanoparticles in human mesenchymal stem cells: comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 30, n. 1, pp.48-59, 2020.

DI SOTTO, A.; DI GIACOMO, S.; RUBINI, E.; MACONE, A.; GULLI, M.; MAMMOLA, C.L.; EUFEMI, M.; MANCINELLI, R. AND MAZZANTI, G. Modulation of STAT3 Signaling, cell redox defenses and cell cycle checkpoints by β -caryophyllene in cholangiocarcinoma cells: Possible mechanisms accounting for doxorubicin chemosensitization and chemoprevention. **Cells**, v. 9, n. 4, p.858, 2020.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**, v. 36, n. 3, pp.134-138, 2018.

D'SOUZA, L.C.; MISHRA, S.; CHAKRABORTY, A.; SHEKHER, A.; SHARMA, A.; GUPTA, S.C. Oxidative Stress and Cancer Development: Are Noncoding RNAs the Missing Links?. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2020.

DUTTA, S.; MAHALANOBISH, S.; SAHA, S.; GHOSH, S.; SIL, P. C. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food and Chemical Toxicology**, 2019.

EFFERTH, T.; SAEED, M. E.; KADIOGLU, O.; SEO, E. J.; SHIROOIE, S.; MBAVENG, A. T.; NABAVI, S. M.; KUETE, V. Collateral sensitivity of natural products in drug-resistant cancer cells. **Biotechnology advances**, v. 38, 2020.

FEDEDA, J. P.; GERLICH, D. W. Molecular control of animal cell cytokinesis. **Nat. Cell Biol.** v. 14, p.440-447, 2012.

FERDOUS, U.T.; YUSOF, Z. N. B. Algal terpenoids: a potential source of antioxidants for cancer therapy. In **Terpenes and Terpenoids**. IntechOpen, 2021.

FERLAY, J.; ERVIK, M.; LAM, F.; COLOMBET, M.; MERY, L.; PIÑEROS, M. *et al.* **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Lyon: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer; 2020.

FILHO, G. B.; PEREIRA, F.E.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celulares. In.: **Bogliolo Patologia Geral**. 4 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 8, p.226-281, 2009.

FINN, R. S.; CROWN, J. P.; LANG, I.; BOER, K.; BONDARENKO, I. M.; KULYK, S. O.; ETTL, J.; PATEL, R.; PINTER, T.; SCHMIDT, M.; SHPARYK, Y. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. **The lancet oncology**, v. 16, n. 1, pp.25-35, 2015.

FONSECA, Cecilia Sella. **Mecanismos moleculares do efeito citotóxico de FGF2 em células transformadas por Ras**. Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. 165f. São Paulo, 2018.

FONSECA, I. S.; BETTENCOURT-DIAS, M. The Cell Cycle, Cytoskeleton and Cancer. In **Molecular and Cell Biology of Cancer** (pp. 51-74). Springer, Cham, 2019.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p.1016, 2017.

FUJINO, S.; MIYOSHI, N.; OHUE, M.; SASO, K.; MIZUSHIMA, T.; DOKI, Y.; MORI, M. Anti-cancer drug sensitivity assay using in vitro primary culture cells. 2018.

FURLAN, C. M.; SANTOS, K. P.; SEDANO-PARTIDA, M. D.; DA MOTTA, L. B.; SANTOS, D. Y. A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G.; BERRY, P. E.; VAN EE, B.W.; SALATINO, A. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, 38(4), pp.693-702, 2015.

ARAÚJO, G. L. S.; PARRELA, A. F. B.; BORGES, J. M. S.; TRINDADE, J. V. F.; SOUZA, L. T. S.; JÚNIOR, M. F. Apoptose como perspectiva de cura do câncer. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**. v. 28, n.2, pp.32-35, 2019.

GABRIEL, G.H.; NEPOMUCENO, L. L.; DE SOUSA CRUZ, V.; PIMENTA, E. G. D. A. Quimioterapia, Hormonioterapia e novas alternativas de tratamento do adenocarcinoma mamário. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 14, n.26, p.583, 2017.

GALADARI, S. *et al.* Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, n. 8, p. 144–164, 2017.

GARCÍA-GIL, C. M. B. **Reparación por Escisión de Bases en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*: papel en el procesamiento de lesiones inducidas por agentes alquilantes** (Doctoral dissertation, Universidad de Córdoba), 2018.

GEISBERG, C. A.; SAWYER, D. B. Mechanisms of anthracycline cardiotoxicity and strategies to decrease cardiac damage. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 6, pp.404-410, 2010.

GIAMPAZOLIAS, E.; TAIT, S. W. Mitochondria and the hallmarks of cancer. **The FEBS journal**, v. 283, n. 5, pp.803-814, 2016.

GILL, J. G.; PISKOUNOVA, E.; MORRISON, S. J. Cancer, oxidative stress, and metastasis. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. v. 81, pp. 163-175, 2016.

GIRALDO, C. I. Q. **Avaliação da viabilidade de espermatozoides humanos após liofilizações utilizando a técnica de citometria de fluxo**, 2020.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GONÇALVES, M. V. P. **Desenvolvimento de lipossomas híbridos contendo fragmentos de membranas de células tumorais para imunoestimulação na terapia antitumoral**, 2019.

GONZÁLEZ-CHAVARRÍA, I.; DUPRAT, F.; ROA, F. J.; JARA, N.; TOLEDO, J. R.; MIRANDA, F.; BECERRA, J.; INOSTROZA, A.; KELLING, A.; SCHILDE, U.; HEYDENREICH, M. Maytenus disticha Extract and an Isolated β -Dihydroagarofuran Induce Mitochondrial Depolarization and Apoptosis in Human Cancer Cells by Increasing Mitochondrial Reactive Oxygen Species. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p.377, 2020.

GORANOV, A. I.; GULATI, A.; DEPHOURE, N.; TAKAHARA, T.; MAEDA, T.; GYGI, S. P.; MANALIS, S.; AMON, A. Changes in cell morphology are coordinated with cell growth through the TORC1 pathway. **Current Biology**, v. 23, n. 14, pp.1269-1279, 2013.

GROISBERG, R.; HONG, D. S.; BEHRANG, A.; HESS, K.; JANKU, F.; PIHA-PAUL, S.; NAING, A.; FU, S.; BENJAMIN, R.; PATEL, S.; SOMAIAH, N. Characteristics and

outcomes of patients with advanced sarcoma enrolled in early phase immunotherapy trials. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 5, n. 1, p.100, 2017.

GUERRA, Andreza Conceição Vêras de Aguiar. **Avaliação das atividades antitumoral e antioxidante in vitro de extratos de Libidibia ferrea em células de câncer colorretal**, 2017. 60f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2017.

HAIDER, M. R.; AHMAD, K.; SIDDIQUI, N.; ALI, Z.; AKHTAR, M. J.; FULORIA, N.; FULORIA, S.; RAVICHANDRAN, M.; YAR, M. S. Novel 9-(2-(1-arylethylidene)hydrazinyl) acridine derivatives: Target Topoisomerase 1 and growth inhibition of HeLa cancer cells. **Bioorganic chemistry**, v. 88, p.102962, 2019.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAUSHEER, Frederick H. **Compositions and methods of use of compounds to increase cancer patient survival time**. U.S. Patent n. 9,320,760, 26 abr. 2016.
HE, L. *et al.* Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532-553, 2017.

HOFFMAN, B. L.; SCHORGE, J. O.; HALVORSON, L. M.; BRADSHAW, K. D.; CUNNINGHAM, F. G. **Ginecologia de Williams**. Artmed Editora, 2014.
HORNSVELD, M.; DANSEN, T.B. The hallmarks of cancer from a redox perspective. **Antioxidants & redox signaling**, v. 25, n. 6, pp.300-325, 2016.

HUANG, R.; ZHAO, L.; CHEN, H.; YIN, R. H.; LI, C. Y.; ZHAN, Y. Q.; ZHANG, J. H.; GE, C. H.; YU, M.; YANG, X. M. Megakaryocytic differentiation of K562 cells induced by PMA reduced the activity of respiratory chain complex IV. **PloS one**, v. 9, n. 5, 2014.

HUSSONG, M.; SCHWEIGER, M. R. Oxidative Stress and Cancer Epigenomics. In *Epigenetics-A Different Way of Looking at Genetics*. Springer, Cham, pp. 223-243 2016.

HUSTEDT, N.; DUROCHER, D. The control of DNA repair by the cell cycle. **Nature cell biology**, v. 19, n.1, pp.1-9, 2017.

HYDBRING, P.; MALUMBRES, M.; SICINSKI, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 17, n. 5, p. 280, 2016.

HYNDMAN, I. J. The contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, v. 9, n. 1, pp.63-69, 2016.

ICARD, P.; FOURNEL, L.; WU, Z.; ALIFANO, M.; LINCET, H. Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer. **Trends in biochemical sciences**, v. 44, n. 6, pp.490-501, 2019.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de pele melanoma**. 2020.

INGHAM, M.; SCHWARTZ, G. K. Cell-cycle therapeutics come of age. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 25, p. 2949, 2017.

ISRAEL, Y.; RACHMIEL, A.; ZIV, G.; NAGLER, R. Benign and Malignant Salivary Gland Tumors—Clinical and Demographic Characteristics. **Anticancer Research**, v. 36, n. 8, p. 4151-4154, 2016.

ITHARAT, A., RATTAROM, R., HANSAKUL, P., SAKPAKDEEJAROEN, I., OORAIKUL, B.; DAVIES, N. M. The effects of Benjakul extract and its isolated compounds on cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell line NCI-H226. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 2, p.129, 2021.

JAN, R. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 9, n. 2, p.205, 2019.

JANSSENS, J. P.; SCHUTER, K.; VOSS, A. Preventive, predictive, and personalized medicine for effective and affordable cancer care. **EPMA Journal**. v. 9, issue 2, p. 113-123, 2018.

JAYAT, C.; RATINAUD, M. H. Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications. **Biology of the Cell**, v. 78, n. 1-2, p. 15–25, 1993.

JIANG, B.; NI, H.; ZHOU, Z.; LI, Y. Parkin enhances sensitivity of paclitaxel to NPC by arresting cell cycle. **Pathology-Research and Practice**, v. 216, n. 3, p.152755, 2020.

JIANG, X.; YE, J.; DONG, Z.; HU, S.; XIAO, M. Novel genetic alterations and their impact on target therapy response in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer management and research**, v. 11, p.1321, 2019.

JIN, J.; GUO, M.; LIU, J.; LIU, J.; ZHOU, H.; LI, J.; WANG, L.; LIU, H.; LI, Y.; ZHAO, Y.; CHEN, C. Graphdiyne nanosheet-based drug delivery platform for photothermal/chemotherapy combination treatment of cancer. **ACS applied materials & interfaces**, v. 10, n. 10, pp.8436-8442, 2018.

JONES, P. A.; Baylin, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, pp.683-692, 2007.

JUDSON, R. S.; THOMAS, R. S.; BAKER, N.; SIMHA, A.; HOWEY, X. M.; MARABLE, C.; KLEINSTREUER, N.C.; HOUCK, K. A. Workflow for defining reference chemicals for assessing performance of in vitro assays. **ALTEX**, v. 36, n. 2, p. 261, 2019.

KAMENZ, J.; FERRELL JR, J. E. The temporal ordering of cell-cycle phosphorylation. **Molecular cell**, v. 65, n. 3, pp.371-373, 2017.

KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA repair**, v. 42, pp.63-71, 2016.

KENT, L. N.; LEONE, G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.19, p. 326-338, 2019.

KHABAR, K. S. Hallmarks of cancer and AU-rich elements. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, n. 1, p.e1368, 2017.

KHALIL, D. N.; SMITH, E. L.; BRENTJENS, R. J.; WOLCHOK, J. D. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 13, n. 5, p.273, 2016.

KHALILZADEH, B.; SHADJOU, N.; KANBEROGLU, G. S.; AFSHARAN, H.; DE LA GUARDIA, M.; CHAROUDEH, H. N.; OSTADRAHIMI, A.; RASHIDI, M. R. Advances in nanomaterial based optical biosensing and bioimaging of apoptosis via caspase-3 activity: a review. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 9, p.434, 2018.

KHASRAW, M.; BELL, R.; DANG, C. Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. **The Breast**, v. 21, n. 2, pp.142-149, 2012.

KLAUNIG, J. E.; WANG, Z. Oxidative stress in carcinogenesis. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, pp.116-121, 2018.

KLUSKA, M.; JUSZCZAK, M.; ŻUCHOWSKI, J.; STOCHMAL, A.; WOŹNIAK, K. Kaempferol and Its Glycoside Derivatives as Modulators of Etoposide Activity in HL-60 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 227, p. 3520, 2021.

KOVURU, N.; RAGHUWANSHI, S.; SHARMA, D. S.; DAHARIYA, S.; PALLEPATI, A.; GUTTI, R. K. Endoplasmic reticulum stress induced apoptosis and caspase activation is mediated through mitochondria during megakaryocyte differentiation. **Mitochondrion**, v. 50, pp.115-120, 2020.

KUMAR, A.; JAITAK, V. Natural products as multidrug resistance modulators in cancer. **European journal of medicinal chemistry**, 2019.

KUMAR, B.; SINGH, S.; SKVORTSOVA, I.; KUMAR, V. Promising targets in anti-cancer drug development: Recent updates. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 42, pp.4729-4752, 2017.

KUPCHO, K.; SHULTZ, J.; HURST, R.; HARTNETT, J.; ZHOU, W.; MACHLEIDT, T.; GRAILER, J.; WORZELLA, T.; RISS, T.; LAZAR, D.; CALI, J. J. A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. **Apoptosis**, v. 24, n. 1-2, pp.184-197, 2019.

LEE, H.; SHIN, E. A.; LEE, J. H.; AHN, D.; KIM, C. G.; KIM, J. H.; KIM, S. H. Caspase inhibitors: a review of recently patented compounds (2013-2015). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 28, n. 1, pp.47-59, 2018.

LEE, H. A.; CHU, K. B.; MOON, E. K.; KIM, S. S.; QUAN, F. S. Sensitization to oxidative stress and G2/M cell cycle arrest by histone deacetylase inhibition in hepatocellular carcinoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 147, pp.129-138, 2020.

LEWANDOWSKA, A. M.; RUDZKI, M.; RUDZKI, S.; LEWANDOWSKI, T.; LASKOWSKA, B. Environmental risk factors for cancer-review paper. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**, v. 26, n. 1, pp.1-7, 2019.

LI, Z.; TAN, S.; SHEN, Q.; WANG, K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). **Oncology Reports**. p. 611-624, 2017.

LIN, L. S.; WANG, J. F.; SONG, J.; LIU, Y.; ZHU, G.; DAI, Y.; SHEN, Z.; TIAN, R.; SONG, J.; WANG, Z.; TANG, W. Cooperation of endogenous and exogenous reactive oxygen species induced by zinc peroxide nanoparticles to enhance oxidative stress-based cancer therapy. **Theranostics**, v. 9, n. 24, p.7200, 2019.

LIN, T.; LYU, P. The Application of Next Generation Sequencing in Cancer Precision Diagnosis and Target Therapy Selection. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 20, n. 1, pp.14809-14812, 2019.

LIN, T. C.; YANG, C. H.; CHENG, L. H.; CHANG, W. T.; LIN, Y. R.; CHENG, H. C. Fibronectin in Cancer: Friend or Foe. **Cells**, v. 9, n. 1, p.27, 2020.

LIN, X.; PENG, ZHANGXIAO.; CHANGQING. Review Potential Anti-Cancer Activities and Mechanisms of Costunolide and Dehydrocostuslacton. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, p.10888-10906, 2015.

LIN, Y.H. MicroRNA networks modulate oxidative stress in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p.4497, 2019.

LIU, J. S.; HUO, C. Y.; CAO, H. H.; FAN, C. L.; HU, J. Y.; DENG, L. J.; LU, Z. B.; YANG, H. Y.; YU, L. Z.; MO, Z. X.; YU, Z. L. Alopentine induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt signaling pathway. **Phytomedicine**, v. 61, p.152843, 2019.

LIU, L.; AHN, K. S.; SHANMUGAM, M. K.; WANG, H.; SHEN, H.; ARFUSO, F.; CHINNATHAMBI, A.; ALHARBI, S. A.; CHANG, Y.; SETHI, G.; TANG, F. R. Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF- κ B activation cascade in estrogen receptor-negative breast cancer cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 3, pp.4504-4513, 2019.

LIU, L.; MICHOWSKI, W.; KOŁODZIEJCZYK, A.; SICINSKI, P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. **Nature cell biology**, v. 21, n. 9, pp.1060-1067, 2019.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 5, pp.1469-1478, 2018.

MÄKITIE, A. A.; ALMANGUSH, A.; RODRIGO, J. P.; FERLITO, A.; LEIVO, I. Hallmarks of cancer: Tumor budding as a sign of invasion and metastasis in head and neck cancer. **Head & neck**, v. 41, n. 10, pp.3712-3718, 2019.

MALUMBRES, M. Control of the Cell Cycle. In Abeloff's Clinical Oncology (). **Content Repository Only!**. pp. 56-73, 2020.

MANSO, M. E. G.; DA COSTA LOPES, R. G.; FONSECA, A.; REI, A.; DOS SANTOS, M.M. O que são Cuidados Paliativos e sua importância para o portador de câncer. **Revista Longeviver**, 2017.

MARTINEZ-USEROS, J.; LI, W.; CABEZA-MORALES, M.; GARCIA-FONCILLAS, J. Oxidative stress: a new target for pancreatic cancer prognosis and treatment. **Journal of clinical medicine**, v. 6, n. 3, p.29, 2017.

MARU, G. B.; HUDLIKAR, R. R.; KUMAR, G.; GANDHI, K.; MAHIMKAR, M. B. Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. **World journal of biological chemistry**, v. 7, n. 1, p.88, 2016.

MASSARWEH, N. N.; EL-SERAG, H. B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. **Cancer Control**, v. 24, n. 3, p.1073274817729245, 2017.

MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C.; PEREIRA, F. V.; SCUTTI, J. A. B.; MASSAOKA, M. H.; TRAVASSOS, L. R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. α -Pineno isolado de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induz apoptose e confere proteção antimetastática em um modelo de melanoma. **Biochem. Biophys. Res. Comum.** v. 411, p. 449–454, 2011.

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current cancer epidemiology. **Journal of epidemiology and global health**, v. 9, n. 4, pp.217-222, 2019.

MCCUNE, JEANNINE S. Rapid Advances in Immunotherapy to Treat Cancer. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 103, n. 4, p. 540–544, 2018.

MEDINA, C. B.; RAVICHANDRAN, K. S. Do not let death do us part: 'find-me' signals in communication between dying cells and the phagocytes. **Cell Death and Differentiation**, p. 979-989, 2016.

MEHRMOHAMADI, M.; JEONG, S. H.; LOCASALE, J. W. Molecular features that predict the response to antimetabolite chemotherapies. **Cancer & metabolism**, v. 5, n. 1, p. 8, 2017.

MELLO, D.F.; TREVISAN, R.; RIVERA, N.; GEITNER, N. K.; DI GIULIO, R. T.; WIESNER, M. R.; HSU-KIM, H.; MEYER, J. N. Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. **Chemico-biological interactions**, v. 315, p.108868, 2020.

MERCK VETERINARY MANUAL, 2015. Disponível em:
<https://www.merckvetmanual.com/pharmacology/antineoplastic-agents/overview-ofantineoplastic-agents>.

MILLER, K. D.; NOGUEIRA, L.; MARIOTTO, A. B.; ROWLAND, J. H.; YABROFF, K. R.; ALFANO, C. M.; JEMAL, A.; KRAMER, J. L.; SIEGEL, R. L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 5, pp.363-385, 2019.

MOHAMED, T. M.; ANG, Y. S.; RADZINSKY, E.; ZHOU, P.; HUANG, Y.; ELFENBEIN, A.; FOLEY, A.; MAGNITSKY, S.; SRIVASTAVA, D. Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. **Cell**, v. 173, n. 1, pp.104-116, 2018.

MOHIUDDIN, M.; KIMURA, H.; SONE, T.; MATSUOKA, H.; SAEKI, K.; TERADA, N.; KASAHARA, K. P28-10 Cisplatin induces DNA damage associated with cell cycle arrest and apoptosis in PC9 cells. **Annals of Oncology**, v. 32, p.S346, 2021.

MORAIS, S. M. D.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A. D.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, pp.907-910, 2006.

MORRY, J.; NGAMCHERDTRAKUL, W.; YANTASEE, W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. **Redox biology**, v. 11, pp.240-253, 2017.

MOSES, C.; GARCIA-BLOJ, B.; HARVEY, A. R.; BLANCAFORT, P. Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. **European Journal of Cancer**, v. 93, pp.10-18, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜLLER-COAN, B. G.; CAETANO, B. F. R.; PAGANO, J. S.; DE OLIVEIRA, D. E. Cancer progression goes viral: the role of oncoviruses in aggressiveness of malignancies. **Trends in cancer**, v. 4, n. 7, pp.485-498, 2018.

MUSA, J.; AYNAUD, M. M.; MIRABEAU, O.; DELATTRE, O.; GRÜNEWALD, T. G. MYBL2 (B-Myb): a central regulator of cell proliferation, cell survival and differentiation involved in tumorigenesis. **Cell Death Dis.** v. 8, e2895, 2017.

NAGATA, S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. **Annual review of immunology**, 36, pp.489-517, 2018.

NAOZUKA, G. T.; MENEZES, M. P. C.; ALMEIDA, R. C. **Análise de Sensibilidade e Calibração de Modelos para o Crescimento Tumoral**. Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics, v. 7, n. 1, 2020.

NASCIMENTO, J. C. **Estudo químico e avaliação biológica de *Piper klotzschianum* Kunth (Piperaceae) e *Croton grewoides* Baill (Euphorbiaceae)**. 2011.

NEPOMUCENO, L.; FERREIRA, J. L.; CRUZ, V.; GABRIEL, G.; ARAÚJO, E. Mecanismos de reparo aos danos no DNA nos pontos de checagem do ciclo celular. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, 2017.

NIU, Q. L.; SUN, H.; LIU, C.; LI, J.; LIANG, C. X.; ZHANG, R. R.; GE, F. R.; LIU, W. *Croton tiglium* essential oil compounds have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in A549 lung cancer cell lines. **PLoS one**, v. 15, n. 5, p.e0231437, 2020.

NUDELMAN, K. N.; MCDONALD, B. C.; LAHIRI, D. K.; SAYKIN, A. J. Biological hallmarks of cancer in Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 56, n. 10, pp.7173-7187, 2019.

NUNNEY, L. Commentary: The multistage model of carcinogenesis, Peto's paradox and evolution. **International journal of epidemiology**, v. 45, n. 3, pp.649-653, 2016.

O'DONNELL, J. S.; HOEFESMIT, E. P.; SMYTH, M. J.; BLANK, C. U.; TENG, M. W. The promise of neoadjuvant immunotherapy and surgery for cancer treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 19, pp.5743-5751, 2019.

OLIVEIRA, N. M. T. D. Efeito antitumoral dos oligossacarídeos extraídos de vinho tinto no modelo de carcinoma de Ehrlich, 2019.

OLIVEIRA, S. D. D. S.; DE OLIVEIRA E SILVA, A. M.; BLANK, A. F.; NOGUEIRA, P. C. D. L.; NIZIO, D. A. D. C.; ALMEIDA-PEREIRA, C. S.; PEREIRA, R. O.; MENEZES-SÁ, T. S. A.; SANTANA, M. H. D. S.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F. Radical scavenging activity of the essential oils from *Croton grewoides* Baill accessions and the major compounds eugenol, methyl eugenol and methyl chavicol. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 1, pp.94-103, 2021.

OLIVEIRA, T. K. B. D.; SILVA JÚNIOR, P. R. D.; ANDRADE FILHO, J. A. **Modelos experimentais: pesquisa com animais de laboratório**. 1. ed. Aracaju: IFS, 2019.

OLIVEIRA, Viviane Alves de. **Imunoexpressão das proteínas APE1, XRCC1, p53 e Ki67 em carcinoma de células escamosas de língua oral**. 113 f. Tese (Doutorado em Patologia Oral) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Patologia Oral, Natal, 2018.

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

OUYANG, D.Y.; ZENG, L.H.; PAN, H.; XU, L.H.; WANG, Y.; LIU, K.P.; HE, X.H. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. **Food and chemical toxicology**, v. 60, pp.424-430, 2013.

PAONE, S.; BAXTER, A. A.; HULETT, M. D.; POON, I. K. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. **Cellular and molecular life sciences**, v. 76, n. 6, pp.1093-1106, 2019.

PATEL, S. A.; MINN, A. J. Combination cancer therapy with immune checkpoint blockade: mechanisms and strategies. **Immunity**, v. 48, n. 3, pp.417-433, 2018.

PATWARDHAN, G. A.; BEVERLY, L. J.; SISKIND, L. J. Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 48, n. 2, pp.153-168, 2016.

PECORINI, S.; GIBELLINI, L.; DE BIASI, S.; BIANCHINI, E.; NASI, M.; COSSARIZZA, A.; PINTI, M. Mitochondria, Oxidative Stress, Cancer, and Aging. **Geriatric Oncology**, pp.183-204, 2020.

PEÑA-BLANCO, A.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis. **The FEBS journal**, v. 285, n. 3, pp.416-431, 2018.

PEREIRA, I. G. **Qualidade de vida em mulheres com cancro da mama a receber quimioterapia** (Doctoral dissertation). 2019.

PFEFFER, C. M.; SINGH, A.T. Apoptosis: a target for anticancer therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p.448, 2018

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

PINHO, Cláudia Marta Libreiro de. **Pharmacological evaluation of plant extracts from Chapada Diamantina (Bahia, Brazil): Focus on antioxidant and cytotoxic properties**. 2016.

PODOLSKIY, D. I.; GLADYSHEV, V. N. Intrinsic versus extrinsic cancer risk factors and aging. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 10, pp.833-834, 2016.

POOFERY, J.; SRIPANIDKULCHAI, B.; BANJERDPONGCHAI, R. Extracts of *Bridelia ovata* and *Croton oblongifolius* induce apoptosis in human MDA-MB-231 breast cancer cells via oxidative stress and mitochondrial pathways. **International journal of oncology**, v. 56, n. 4, pp.969-985, 2020.

POSTOVIT, L.; WIDMANN, C.; HUANG, P.; GIBSON, S. B. Harnessing oxidative stress as an innovative target for cancer therapy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2018.

PRABHU, V. V.; DEVARAJ, N. Tirocina Quinase do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico: um Alvo Potencial no Tratamento do Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 36, p. 151-158, 2017.

PRÄBST, K.; ENGELHARDT, H.; RINGGELER, S.; HÜBNER, H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In **Cell Viability Assays** (pp. 1-17). Humana Press, New York, NY, 2017.

PRADO, V. M.; JESUS, R. A. D.; OLIVEIRA, J.; PEREIRA, C. S.; BLANK, A. F.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B.; LIMA, J. M. D.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, P. C.; MORAES, V. R. Evaluation of the Seasonality and Extraction Method on the Polar Extracts of *Croton grewoides* Baill. by Chromatogram Fingerprinting and Isolation of a New Triglycosylated Flavonoid. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 2, pp.385-394, 2021.

PRADO, V. M. D. J. Isolamento de constituintes químicos, estudo biológico e caracterização de extratos de *Croton grewoides* Baill. através de fingerprint cromatográfico e PCA. 2019.

PRASANNA, R.; ELBESSOUMY, A. A.; CHANDRAMOORTHY, H. C.; DERA, A.; AL FAYI, M. FCX, an arylidene derivative, induces apoptosis in androgen receptor-selective prostate cancer cells, 2020.

PRATHUMSAP, N.; SHINLAPAWITTAYATORN, K.; CHATTIPAKORN, S. C.; CHATTIPAKORN, N. Effects of doxorubicin on the heart: From molecular mechanisms to intervention strategies. **European journal of pharmacology**, v. 866, p.172818, 2020.

RAASCHOU-NIELSEN, O.; BEELEN, R.; WANG, M.; HOEK, G.; ANDERSEN, Z. J.; HOFFMANN, B.; STAFOGGIA, M.; SAMOLI, E.; WEINMAYR, G.; DIMAKOPOULOU, K.; NIEUWENHUIJSEN, M. Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. **Environment international**, v. 87, pp.66-73, 2016.

RAMADOSS, D. P.; SIVALINGAM, N. Vanillin extracted from proso and barnyard millets induces cell cycle inhibition and apoptotic cell death in MCF-7 cell line. 2021.
RAZA, M. H.; SIRAJ, S.; ARSHAD, A.; WAHEED, U.; ALDAKHEEL, F.; ALDURAYWISH, S.; ARSHAD, M. ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 143, n. 9, pp.1789-1809, 2017.

REAGAN, M. CAUSES OF CANCER: GENETIC, EPIGENETIC, VIRAL, MICROENVIRONMENTAL, AND ENVIRONMENTAL CONTRIBUTIONS TO CANCER. **Cancer: Prevention, Early Detection, Treatment and Recovery**, pp.53-74, 2019.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. ROS promotes cancer cell survival through calcium signaling. **Cancer cell**, v. 33, n. 6, pp.949-951, 2018.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, pp.2977-2992, 2016.

REN, X.; SANTHOSH, S. M.; COPPO, L.; OGATA, F. T.; LU, J.; HOLMGREN, A. The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 134, pp.350-358, 2019.

RENVOIZÉ, C. *et al.* Apoptosis: Identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 111–120, 1998.

RIBEIRO, M. D. S. F.; DE FARIAS, M. T.; BRANDÃO, I. A.; DE CARVALHO VIANA, P. A. D. Hormonioterapia oral no câncer de mama: fatores que podem influenciar a adesão. **JMPHC| Journal of Management & Primary Health Care**, v. 8, n. 1, pp.16-26, 2017.

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

RICCIUTI, B.; FOGLIETTA, J.; BIANCONI, V.; SAHEBKAR, A.; PIRRO, M. Enzymes involved in tumor-driven angiogenesis: A valuable target for anticancer therapy. In **Seminars in cancer biology**, v. 56, pp. 87-99, 2019.

RILEY, R. S.; JUNE, C. H.; LANGER, R.; MITCHELL, M.J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 18, n. 3, pp.175-196, 2019.

ROCHA, Ilanna Marques Gomes da. **Toxicidade em pacientes com câncer no trato gastrointestinal durante a quimioterapia: associações com Sarcopenia e Caquexia**. 2018. 62f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Natal, 2018.

RODRIGO, M. A. M.; JIMEMEZ, A. M. J.; HADDAD, Y.; BODOOR, K.; ADAM, P.; KRIZKOVA, S.; HEGER, Z.; ADAM, V. Metallothionein Isoforms as Double Agents- Their Roles in Carcinogenesis, Cancer Progression and Chemoresistance. **Drug Resistance Updates**, p.100691, 2020.

ROSENBERG, M.; AZEVEDO, N. F.; IVASK, A. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, pp.1-12, 2019.

RUIJTENBERG, S.; VAN DEN HEUVEL, S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. **Cell cycle**, v. 15, n. 2, pp.196-212, 2016.

RUNDHAUG, J. E.; FISCHER, S. M. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. **Cancers**, v. 2, n. 2, pp.436-482, 2010.

RUSSO, M.; RUSSO, G.L. Autophagy inducers in cancer. **Biochemical pharmacology**, v. 153, pp.51-61, 2018.

SACOMAN, J. L.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G. M.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p. 411-415, 2008.

SAED, G. M.; DIAMOND, M. P.; FLETCHER, N. M. Updates of the role of oxidative stress in the pathogenesis of ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 145, n. 3, pp.595-602, 2017.

SAHA, S. K.; LEE, S. B.; WON, J.; CHOI, H. Y.; KIM, K.; YANG, G. M.; DAYEM, A. A.; CHO, S. G. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p.1544, 2017.

SAJADIMAJD, S.; KHAZAEI, M. Oxidative stress and cancer: the role of Nrf2. **Current cancer drug targets**, v. 18, n. 6, pp.538-557, 2018.

SALEHI, B.; UPADHYAY, S.; ERDOGAN ORHAN, I.; KUMAR JUGRAN, A.; LD JAYAWEERA, S.; A DIAS, D.; SHAROPOV, F.; TAHERI, Y.; MARTINS, N.; BAGHALPOUR, N.; CHO, W. C. Therapeutic potential of α - and β -pinene: a miracle gift of nature. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p.738, 2019.

SAMAVARCHI TEHRANI, S.; MAHMOODZADEH HOSSEINI, H.; YOUSEFI, T.; ABOLGHASEMI, M.; QUJEQ, D.; MANIATI, M.; AMANI, J. The crosstalk between trace elements with DNA damage response, repair, and oxidative stress in cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 2, pp.1080-1105, 2019.

SANCHO, P.; BARNEDA, D.; HEESCHEN, C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. **British journal of cancer**, v. 114, n. 12, pp.1305-1312, 2016.

SANTOS, D. D. S. **Câncer de mama: associação entre terapias convencionais e não convencionais**. 2019.

SANTOS, L. A. C. D. **Apoptose induzida por diferentes tipos de vírus influenza**. 2018.

SANTOS, Patrícia dos. Síntese e estudos da atividade antitumoral de complexos de rutênio-salen (Doctoral dissertation, Universidade de Coimbra). 2019.

SANTOS, Patrick Wellington da Silva dos. **Influência do sulforafano, um inibidor de histonas desacetilases, sobre a instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos em linhagens celulares humanas**. 2019. 124f. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. **International journal of oncology**, v. 54, n. 2, pp.407-419, 2019.

SENAPATI, S.; MAHANTA, A. K.; KUMAR, S.; MAITI, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 3, n. 1, pp.1-19, 2018.

SENGA, S. S.; GROSE, R. P. Hallmarks of cancer – the new testament. **Open Biology**, v. 11, n. 1, p.200358, 2021.

SEYED, M. A.; JANTAN, I.; BUKHARI, S. N. A.; VIJAYARAGHAVAN, K. A comprehensive review on the chemotherapeutic potential of piceatannol for cancer treatment, with mechanistic insights. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 4, pp.725-737, 2016.

SHEN, Y.; VIGNALI, P.; WANG, R. Rapid profiling cell cycle by flow cytometry using concurrent staining of DNA and mitotic markers. **Bio Protoc**, v. 7, p.e2517, 2017.

SHERR, C. J.; BARTEK, J. Cell cycle–targeted cancer therapies. **Annual Review of Cancer Biology**, 2017.

SHI, Q.; BISHAYEE, A.; BHATIA, D. Genetic and Epigenetic Targets of Natural Dietary Compounds as Anticancer Agents. In **Epigenetics of Cancer Prevention**. pp. 3-21, Academic Press, 2019.

SHIRJANG, S.; MANSOORI, B.; ASGHARI, S.; DUIJF, P. H.; MOHAMMADI, A.; GJERSTORFF, M.; BARADARAN, B. MicroRNAs in cancer cell death pathways: apoptosis and necroptosis. **Free Radical Biology and Medicine**. 2019.

SIDDIQUI, I. A., SANNA, V., AHMAD, N., SECHI, M., MUKHTAR, H. REsveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**. P. 1-12, 2015.

SILVA, A. D. S. *et al.* Croton growioides Baill. (Euphorbiaceae) mostra atividade antidiarreica em ratos. **Pharmacognosy Research**, Paraíba, v. 8, n. 3, p. 202-205, 2016.

SILVA, C. G.; MARINHO, M. G. V.; LUCENA, M. F. A.; COSTA, J. G. M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 1, pp.133-142, 2015.

SILVA, C. G.; ZAGO, H. B.; JÚNIOR, H. J.; DA CAMARA, C. A.; DE OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M. O.; LUCENA, M. F. Composition and insecticidal activity of the essential oil of *Croton grewoides* Baill. against Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 2, pp.179-182, 2008.

SILVA, Daiana Karla Frade. **Efeito antitumoral e toxicidade de um novo derivado acridínico (AMTAC-17) em modelos *in vitro* e *in vivo***. 2020. 183 f. Tese (Doutorado) – UFPB/CCS. João Pessoa, 2020.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; TORRES, D. S. C. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 879-901. 2009.

SILVA, K. F. D. L. **Fatores associados ao ganho de peso em pacientes com câncer de mama em hormonioterapia**, 2018.

SILVEIRA, C. F.; REGINO, P. A.; SOARES, M. B. O.; MENDES, L. C.; ELIAS, T. C.; SILVA, S. R. D. Qualidade de vida e toxicidade por radiação em pacientes com câncer ginecológico e mama. **Escola Anna Nery**, v. 20, n. 4, 2016.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 3, pp.175-193, 2019.

SMITH, M. T., GUYTON, K. Z., GIBBONS, C. F., FRITZ, J. M., PORTIER, C. J., RUSYN, I., DEMARINI, D. M., CALDWELL, J. C., KAVLOCK, R. J., HECHT, S. S., BUCHER, J. R., STEWART, B. W., BANN, R. A. COGLIANO, V. J., STRAIF, K. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. **Environmental Health Perspectiver**, v. 124, p. 713-722, 2016.

SOARES, M. V. A., SILVA, M. J.; FARIA, M. T. LEVANTAMENTO TAXONÔMICO DA FAMÍLIA EUPHORBIACEAE JUSS NA FLORESTA NACIONAL DE SILVÂNIA, GOIÁS, BRASIL. **RENEFARA**, v. 8, n. 8, pp.241-272, 2015.

SOTGIA, F.; FIORILLO, M.; LISANTI, M. P. Hallmarks of the cancer cell of origin: comparisons with “energetic” cancer stem cells (e-CSCs). *Aging* (Albany NY), v. 11, n. 3, p.1065, 2019.

SOUHO, T.; LAMBONI, L.; XIAO, L.; YANG, G. Cancer hallmarks and malignancy features: Gateway for improved targeted drug delivery. **Biotechnology advances**. 2018.

SOUSA, T. K. G. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* (Euphorbiaceae). 2014.

SOUZA, L. L. S. D. Ciclo celular detalhado pela análise de componentes principais, 2018.

SPRADLIN, J. N.; HU, X.; WARD, C. C.; BRITAIN, S. M.; JONES, M. D.; OU, L.; TO, M.; PROUDFOOT, A.; ORNELAS, E.; WOLDEGIORGIS, M.; OLZMANN, J. A. Harnessing the anti-cancer natural product nimbolide for targeted protein degradation. **Nature chemical biology**, v. 15, n. 7, pp.747-755, 2019.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, Artmed. 2017.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V. Neoplasia. In.: **Robbins Patologia Básica**. 8 edição. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 6, p. 187-243. 2008.

SWAFFER, M. P.; JONES, A. W.; FLYNN, H. R.; SNIJDERS, A. P.; NURSE, P. CDK substrate phosphorylation and ordering the cell cycle. **Cell**, v. 167, n. 7, pp.1750-1761, 2016.

SWAMINATHAN, U. *et al.* Expression of p53 and cyclin D1 in oral squamous cell caecinoma and normal mucosa: an immunohistochemical study. **J. Oral maxillofac. Pathol.**, v. 16, n. 2, p. 172-177, 2012.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, pp.99-102, 2006.

TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E. Manilkara zapota (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human colorectal cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. June 2018, p. 748–757, 2019.

TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E. Curcumin combination chemotherapy: the implication and efficacy in cancer. **Molecules**, v. 24, n. 14, p.2527, 2019.

TAYLOR, C.; CORREA, C.; DUANE, F. K.; AZNAR, M. C.; ANDERSON, S. J.; BERGH, J.; DODWELL, D.; EWERTZ, M.; GRAY, R.; JAGSI, R.; PIERCE, L. Estimating the risks of breast cancer radiotherapy: evidence from modern radiation doses to the lungs and heart and from previous randomized trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 15, p.1641, 2017.

TOPALIAN, S. L.; TAUBE, J. M.; PARDOLL, D. M. Neoadjuvant checkpoint blockade for cancer immunotherapy. **Science**, v. 367, n. 6477, 2020.

UGUREL, S.; SCHADENDORF, D.; HORNY, K.; SUCKER, A.; SCHRAMM, S.; UTIKAL, J.; PFÖHLER, C.; HERBST, R.; SCHILLING, B.; BLANK, C.; BECKER, J. C. Elevated baseline serum PD-1 or PD-L1 predicts poor outcome of PD-1 inhibition therapy in metastatic melanoma. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 1, pp.144-152, 2020.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. **Journal of Chromatography**, v. 11, 463-471, 1963.

VANARSDALE, T.; BOSHOF, C.; ARNDT, K. T.; ABRAHAM, R. T. Molecular pathways: targeting the cyclin D–CDK4/6 axis for cancer treatment. **Clinical cancer research**, v. 21, n. 13, pp.2905-2910, 2015.

VISCONTI, R.; DELLA MONICA, R.; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p.153, 2016.

WANG, G.; WANG, X.C.; LIU, T.; LIU, R. C.; LIU, L. Y. *In vitro* experimental models and their molding technology of tumor cell. **Acta Physica Sinica**, v. 65, n. 18, p.188705, 2016.

WEBSTER, G. L. Systematics of the Euphorbiaceae. In: **Annals of the Missouri Botanic Garden. California**, EUA. N.81, v.1, p44., 1994.

WORDING, F. P.; PERISSINOTTI, A. J.; MARINI, B. L. **Cancer Pharmacology and Pharmacotherapy Review**. New York: Demos Medical, 2016.

WORDING, F. P.; PERISSINOTTI, A. J.; MARINI, B. L. Cancer Pharmacology and Pharmacotherapy Review. New York: Demos Medical, 2016.

XIAO, M.; FENG, Y.; LIU, C.; ZHANG, Z. Prognostic values of long noncoding RNA PVT1 in various carcinomas: An updated systematic review and meta-analysis. **Cell Proliferation**, e12519. 2018.

XU, H.; LI, C.; MOZZICONACCI, O.; ZHU, R.; XU, Y.; TANG, Y.; CHEN, R.; HUANG, Y.; HOLZBEIERLEIN, J. M.; SCHÖNEICH, C.; HUANG, J. Xanthine oxidase-mediated oxidative stress promotes cancer cell-specific apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 139, pp.70-79, 2019.

XU, W. H.; LIU, W. Y.; LIANG, Q. Chemical constituents from *Croton* species and their biological activities. **Molecules**, v. 23, n. 9, p.2333, 2018.
Yang, J. B.; Li, M.; Xie, J. J.; Yang, M. D.; Lu, X. S.; Wang, F.; Chen, W. Q. Effects of alpha-pinene extraído from pine agulha on expression of miR-221 and its potencial target genes in human hepatocellular carcinoma cells. *China J. Chin. Mater. Med.* v. 41, p. 3996-3999. 2016.

YANG, L.; SHI, P.; ZHAO, G.; XU, J.; PENG, W.; ZHANG, J.; ZHANG, G.; WANG, X.; DONG, Z.; CHEN, F.; CUI, H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, pp.1-35, 2020.

YANG, S.; WU, S.; FIFITA, J.; MCCANN, E.; FAT, S. C. M.; GALPER, J.; FRECKLETON, S.; ZHANG, K. Y.; BLAIR, I. P. Theme 3 *In vitro* experimental models. Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration, v. 20(sup1), pp.135-159, 2019.

YAO, X.; ZHAO, C. R.; YIN, H.; WANG, K.; GAO, J. J. Synergistic antitumor activity of sorafenib and artesunate in hepatocellular carcinoma cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 12, pp.1609-1620, 2020.

ZHAO, Y.; DONG, Q.; LI, J.; ZHANG, K.; QIN, J.; ZHAO, J.; SUN, Q.; WANG, Z.; WARTMANN, T.; JAUCH, K.W.; NELSON, P.J. Targeting cancer stem cells and their niche: perspectives for future therapeutic targets and strategies. In **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press. August, 2018.

ZHENG, K.; HE, Z.; KITAZATO, K.; WANG, Y. Selective autophagy regulates cell cycle in cancer therapy. **Theranostics**, v. 9, n. 1, p.104, 2019.

ZHENG, X.; CHANG, R. L.; CUI, X. X.; AVILA, G. E.; LEE, S.; LU, Y. P.; LOU, Y. R.; SHIH, W. J.; LIN, Y.; REUHL, K.; NEWMARK, H. Inhibitory effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate alone or in combination with all-trans-retinoic acid on the growth of LNCaP prostate tumors in immunodeficient mice. **Cancer Research**, v. 64, n. 5, pp.1811-1820, 2004.

ZHONG, Z.; YU, J.; VIRSHUP, D. M.; MADAN, B. Wnts and the hallmarks of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, pp.1-21, 2020.

ZUGAZAGOITIA, J.; GUEDES, C.; PONCE, S.; FERRER, I.; MOLINA-PINELO, S.; PAZ-ARES, L. Current challenges in cancer treatment. **Clinical therapeutics**, v. 38, n. 7, pp.1551-1566, 2016.