

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

RAFAEL CARLOS FERREIRA

**ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES AÉREAS DE *Conyza bonariensis* (L.)
CRONQUIST (ASTERACEAE): CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, EFEITO
ANTIMELANOMA *IN VITRO* E TOXICIDADE EM MODELO DE PEIXE-ZEBRA**

João Pessoa, PB

2023

RAFAEL CARLOS FERREIRA

**ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES AÉREAS DE *Conyza bonariensis* (L.)
CRONQUIST (ASTERACEAE): CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, EFEITO
ANTIMELANOMA *IN VITRO* E TOXICIDADE EM MODELO DE PEIXE-ZEBRA**

Tese 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 Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.
Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa, PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383ó Ferreira, Rafael Carlos.

Óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) : caracterização química, efeito antimelanoma in vitro e toxicidade em modelo de peixe-zebra / Rafael Carlos Ferreira. - João Pessoa, 2023.

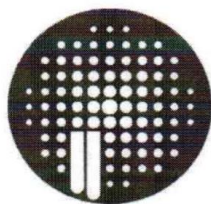
199 f. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Óleos essenciais naturais. 2. Citotoxicidade. 3. Estresse oxidativo. 4. Docking molecular. 5. Embriotoxicidade. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 665.52(043)

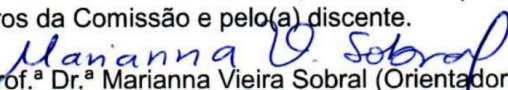


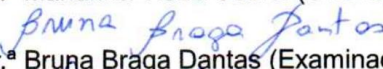
PgPNSB

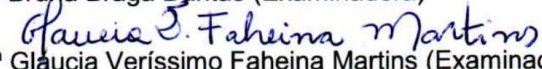
Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 371ª (trecentésima septuagésima primeira) Tese de Doutorado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Rafael Carlos Ferreira**, candidato(a) ao Título de "Doutor(a)" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às dez horas (10h00) do dia dez de novembro do ano dois mil e vinte e três (10/11/2023), no Auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Rafael Carlos Ferreira**, candidato(a) ao Título de "DOUTOR(A)" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores Bruna Braga Dantas, Ph.D em Farmacologia; Gláucia Veríssimo Faheina Martins, Ph.D em Farmacologia; Márcia Regina Piuvezam, Ph.D em Microbiologia; Leônia Maria Batista, Ph.D em Biologia Funcional e Molecular e Marianna Vieira Sobral, Ph.D em Farmacologia. Sendo a primeira, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Campina Grande; e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Banca, professor(a) Marianna Vieira Sobral, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Rafael Carlos Ferreira**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae): caracterização, efeito antimelanoma *in vitro* e toxicidade em modelo de peixe-zebra". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO(A)**. Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente, achar-se o(a) examinado(a) **Rafael Carlos Ferreira**, legalmente habilitado(a) a receber o Título de "DOUTOR(A)" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.


Prof.ª Dr.ª Marianna Vieira Sobral (Orientadora)


Prof.ª Dr.ª Bruna Braga Dantas (Examinadora)


Prof.ª Dr.ª Gláucia Veríssimo Faheina Martins (Examinadora)


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


Prof.ª Dr.ª Leônia Maria Batista (Examinadora)


Rafael Carlos Ferreira (Discente)





PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

ERRATA DA ATA DA 371ª (TRECENTÉSIMA SEPTUAGÉSIMA PRIMEIRA) SOLENIDADE PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO ALUNO RAFAEL CARLOS FERREIRA

No título:

ONDE SE LÊ:

“Óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae): caracterização, efeito antimelanoma *in vitro* e toxicidade em modelo de peixe-zebra”

LEIA-SE:

“Óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae): caracterização química, efeito antimelanoma *in vitro* e toxicidade em modelo de peixe-zebra”

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos (Mestrado e Doutorado), em João Pessoa/ PB.


Caroline Helena M. de M. Manguieiro
SIAPE 01775369
Assistente em Administração



À meu pai, Geraldo (in memoriam), dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e à Virgem Santíssima por cuidar sempre de mim.

À minha família pelo apoio durante toda a minha trajetória acadêmica, em especial à minha tia Eva, mulher forte e corajosa.

A Jéferson, por ser o amor da minha vida e o meu melhor amigo. Essa conquista também é sua!

Agradeço aos meus amigos pela torcida e generosidade em estarem sempre me apoiando durante tantas batalhas.

Ao “OncoTox” – Karinne, Geovana, Igor, Júnior, Moisés, Paulo e Ramon – pelas melhores risadas e pelas palavras de força nos momentos difíceis do doutorado e da vida.

Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) – Isione, Mariana, Júnior, Moisés, Marina, Érica, Gabriela, Heivila, Isabela e Pablo. A Ramon, Geovana, Val, Karinne e Paulo, agradeço por toda a ajuda nos pré-experimentos e experimentos. Agradeço também ao Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves, pela ajuda na construção e execução desse trabalho e pela torcida constante. À Dra. Ana Paula, uma das pessoas mais generosas do mundo, meu muito obrigado por todo o companheirismo, toda ajuda e por todas as palavras que me deram coragem e força para continuar. À Renata, agradeço especialmente pela ajuda com o *docking* molecular. À Dra. Sâmia, minha colega de trabalho e amiga. Tenho certeza de que sem sua ajuda eu não conseguiria. Obrigado pelo apoio durante todo o meu doutorado e por fazer parte da minha vida.

Agradeço aos professores Dr. Josean Fachine Tavares, Dr. Marcelo Sobral da Silva e Dr. Yuri Manguiera do Nascimento do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela parceria na obtenção e caracterização do óleo essencial. Agradeço também à Me. Natália Ferreira de Sousa e aos professores Dra. Luciana Scotti e Dr. Marcus Tullius Scotti do Laboratório de Quimioinformática (UFPB) pela parceria no *docking* molecular. Ao prof. Dr. Davi Felipe Farias do Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco/UFPB), agradeço a parceria desde o mestrado. Muito obrigado!

À minha orientadora Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral, que me acompanha desde a iniciação científica. Sou fruto de sua dedicação e amor com a educação e a ciência. Obrigado pela paciência, conselhos e abraços nos momentos felizes e difíceis, e por vibrar a cada vitória. Você é minha inspiração.

À UFPB por ser minha casa por tantos anos e ao povo brasileiro que sustentou a minha formação acadêmica, da graduação em Farmácia ao doutorado em farmacologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

"Primeiro, lembre-se de olhar para as estrelas e não para seus pés. Segundo, nunca desista do trabalho. O trabalho dá a você significado e propósito para a vida. Terceiro, se você tiver a sorte de encontrar o amor, lembre-se que está lá e não o jogue fora."

Stephen Hawking

FERREIRA, R.C **ÓLEO ESSENCIAL DAS PARTES AÉREAS DE *Conyza bonariensis* (L.) CRONQUIST (ASTERACEAE): CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, EFEITO ANTIMELANOMA *IN VITRO* E TOXICIDADE EM MODELO DE PEIXE-ZEBRA.** 2023. 200 f. **Tese** (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

Conyza bonariensis (L.) Cronquist (Asteraceae) é uma planta rica em óleos essenciais que apresentam efeito antitumoral e variações significativas na sua composição. O presente trabalho objetivou obter, caracterizar e investigar os efeitos antitumorais e toxicológicos do óleo essencial das partes aéreas de *C. bonariensis* (OECB) coletadas no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). O OECB foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e analisado por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM). A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em linhagens de células tumorais (SK-MEL-28, HeLa, HCT-116, HL-60 e K562) e não tumoral (HaCaT) humanas. Diferentes vias de sinalização associadas com a citotoxicidade do OECB foram avaliadas *in silico* e *in vitro*. Em adição, a toxicidade do OECB foi investigada em modelo de peixe-zebra. O componente majoritário foi o éster (Z)-2-lacnofilum (EZ) (57,24%). Após 72 h de tratamento, a linhagem de células de melanoma SK-MEL-28 foi a mais sensível a citotoxicidade do OECB (concentração inibitória média – $CI_{50} = 18,65 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$). Na linhagem de queratinócitos saudáveis humanos HaCaT foi obtida $CI_{50} = 56,49 \pm 1,03 \mu\text{g/mL}$, mostrando seletividade três vezes maior para a linhagem SK-MEL-28. Assim, os mecanismos de ação do OECB foram investigados nesta linhagem celular tumoral. A análise do ciclo celular mostrou que, após 48 h de tratamento com o OECB, houve aumento significativo do percentual da fração sub-G1, e a marcação com anexina V-FITC/IP mostrou aumento do percentual de células em apoptose. Em adição, foram observadas características morfológicas de apoptose por microscopia confocal a laser. O OECB estimulou a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) após 30 min, 1 h ou 3 h de tratamento, e o pré-tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC) preveniu significativamente a sua citotoxicidade. No *docking* molecular, observou-se que o EZ apresentou interações moleculares com os sítios ativos das proteínas ERK1, JNK1, p38 α MAPK, PKB/AKT e NF- κ B. Então, usando marcação com anticorpos específicos, observou-se que, após 48 h de tratamento com o OECB, houve aumento significativo do percentual de células marcadas com anticorpos anti-ERK1/2, anti-JNK1/2, anti-PKB/AKT e anti-NF- κ B, e redução significativa do número de células marcadas com anti-p38 MAPK. Ainda, o pré-tratamento com inibidores de ERK1/2 ou JNK preveniu a citotoxicidade do OECB, enquanto o inibidor de p38 MAPK potencializou esse efeito. No modelo de peixe-zebra, OECB (1,5 $\mu\text{g/mL}$) induziu a morte de todos os embriões e efeitos não letais foram observados nas concentrações de 0,50 a 1,25 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, foi observado aumento significativo na atividade de enzimas associadas ao estresse oxidativo (GPx, GST, CAT, LDH) e redução na AChE. Em resumo, o OECB apresenta efeito antimelanoma *in vitro* por indução de apoptose, estresse oxidativo, inibição da p38 MAPK, e ativação de ERK1/2, JNK1/2, PKB/AKT e NF- κ B, além de embriotoxicidade em modelo de peixe-zebra.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Estresse oxidativo; *Docking* molecular; Embriotoxicidade; Óleos essenciais

FERREIRA, R.C. **ESSENTIAL OIL FROM *Conyza bonariensis* (L.) AERIAL PARTS CRONQUIST (ASTERACEAE): CHEMICAL CHARACTERIZATION, *IN VITRO* ANTIMELANOMA EFFECT, AND TOXICITY IN A ZEBRAFISH MODEL.** 2023. 200 p. **Thesis** (Doctorate in Natural and Synthetic Bioactive Products) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Conyza bonariensis (L.) Cronquist (Asteraceae) is a plant rich in essential oils that exhibit antitumor effects and significant variations in their composition. This study aimed to obtain, characterize, and investigate the antitumor and toxicological effects of the essential oil from *C. bonariensis* aerial parts (OECB) collected at the Medicinal Plants Garden of the Institute of Pharmaceutical and Medicinal Research (IPeFarM/UFPB). The OECB was obtained by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Cytotoxicity was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay on human tumor cell lines (SK-MEL-28, HeLa, HCT-116, HL-60, and K562) and non-tumor (HaCaT) cells. Different signaling pathways associated with OECB cytotoxicity were evaluated *in silico* and *in vitro*. Additionally, OECB toxicity was investigated in a zebrafish model. The major component was the (Z)-2-lacnofilum ester (EZ) (57.24%). After 72 hours of treatment, the SK-MEL-28 melanoma cell line was the most sensitive to OECB cytotoxicity (half-maximal inhibitory concentration – $IC_{50} = 18.65 \pm 1.16 \mu\text{g/mL}$). In the healthy human keratinocyte cell line HaCaT, an IC_{50} of $56.49 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$ was obtained, showing three times greater selectivity for the SK-MEL-28 line. Thus, the mechanisms of action of OECB were investigated in this tumor cell line. Cell cycle analysis showed a significant increase in the sub-G1 fraction after 48 hours of OECB treatment, and annexin V-FITC/PI staining revealed an increase in the percentage of apoptotic cells. Additionally, confocal laser microscopy showed morphological features of apoptosis. OECB stimulated the production of Reactive Oxygen Species (ROS) after 30 min, 1 h, or 3 h of treatment, and pre-treatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC) significantly prevented its cytotoxicity. In molecular docking, EZ exhibited molecular interactions with the active sites of ERK1, JNK1, p38 α MAPK, PKB/AKT, and NF- κ B proteins. Using specific antibody labeling, a significant increase in the percentage of cells labeled with anti-ERK1/2, anti-JNK1/2, anti-PKB/AKT, and anti-NF- κ B antibodies was observed after 48 hours of OECB treatment, along with a significant reduction in the number of cells labeled with anti-p38 MAPK. Furthermore, pre-treatment with ERK1/2 or JNK inhibitors prevented OECB cytotoxicity, while the p38 MAPK inhibitor potentiated this effect. In the zebrafish model, OECB (1.5 $\mu\text{g/mL}$) induced the death of all embryos, and non-lethal effects were observed at concentrations from 0.50 to 1.25 $\mu\text{g/mL}$. Additionally, a significant increase in the activity of enzymes associated with oxidative stress (GPx, GST, CAT, LDH) and a reduction in AChE were observed. In summary, OECB exhibits *in vitro* antimelanoma effects through the induction of apoptosis, oxidative stress, inhibition of p38 MAPK, and activation of ERK1/2, JNK1/2, PKB/AKT, and NF- κ B, as well as embryotoxicity in the zebrafish model.

Keywords: Cytotoxicity; Oxidative Stress; Molecular Docking; Embryotoxicity; Essential oils

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características biológicas do câncer.	30
Figura 2. Progressão do ciclo celular direcionado por Cinases Dependentes de Ciclina (CDKs)	37
Figura 3. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose	39
Figura 4. Efeitos dos diferentes níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células saudáveis e tumorais.....	43
Figura 5. Cascatas de sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs).....	45
Figura 6. Cascata de sinalização das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK).....	47
Figura 7. Cascata de sinalização das Proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNKs)..	50
Figura 8. Cascata de sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK).....	53
Figura 9. Via de sinalização intracelular da Proteína Cinase B (PKB/AKT).....	56
Figura 10. Vias de sinalização intracelulares canônica (clássica) e não-canônica (alternativa) do Fator Nuclear <i>kappa</i> B (NF- κ B)	59
Figura 11. Partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronquist (Asteraceae).....	62
Figura 12. Citotoxicidade do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorrubicina (DXR) em linhagem de células de melanoma humano SK-MEL-28 após 24, 48 e 72 h de tratamento	87
Figura 13. Citotoxicidade do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorrubicina (DXR) em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas após 72 h de tratamento	88
Figura 14. Efeito do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorrubicina (DXR) na distribuição de células de melanoma humano SK-MEL-28 nas diferentes fases do ciclo celular após 48 h de tratamento	89
Figura 15. Efeito do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorrubicina (DXR) em células de melanoma humano SK-MEL-28 marcadas com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP) após 48 h de tratamento	90

Figura 16. Indução da apoptose pelo óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorrubicina (DXR) analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de melanoma humano SK-MEL-28 após 48 h de tratamento	91
Figura 17. Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo de propídeo (IP) de células de melanoma humano SK-MEL-28 incubadas com o óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorrubicina (DXR) por 48 h	92
Figura 18. Percentual de células fluorescentes após incubação com o 2'7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) e o óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorrubicina (DXR) em diferentes tempos de tratamento	94
Figura 19. Citotoxicidade do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorrubicina (DXR) na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) após 72 h de tratamento	95
Figura 20. Interações moleculares entre o éster (Z)-2-lacnofilum, a doxorrubicina ou o ligante do <i>Protein Data Bank</i> (PDB) e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK1).....	98
Figura 21. Interações moleculares entre o éster (Z)-2-lacnofilum, a doxorrubicina ou o ligante do <i>Protein Data Bank</i> (PDB) e a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1)	99
Figura 22. Interações moleculares entre o éster (Z)-2-lacnofilum, a doxorrubicina ou o ligante 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-imidazol e a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK).....	100
Figura 23. Interações moleculares entre o éster (Z)-2-lacnofilum, a doxorrubicina ou o ligante 8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil-2H-[1,2,4]triazolo[3,4-f][1,6]naftiridina-3-ona e a Proteína Cinase B (PKB/AKT).....	101
Figura 24. Interações moleculares entre o éster (Z)-2-lacnofilum, a doxorrubicina ou o ligante 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina e o Fator Nuclear <i>kappa</i> B (NF- κ B; p50/p65).....	102
Figura 25. Modulação das Proteínas Cinases Reguladas por Sinal Extracelular 1 e 2 (ERK1/2) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes	

aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB, 20 ou 40 µg/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 µM)	103
Figura 26. Modulação das Proteínas Cinases N-terminal c-Jun 1 e 2 (JNK1/2) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB, 20 ou 40 µg/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 µM)	104
Figura 27. Modulação da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 (p38 MAPK) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB, 20 ou 40 µg/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 µM)	105
Figura 28. Efeito do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorubicina (DXR), na presença ou ausência de inibidores de ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) ou p38 MAPK (PD 169316), sobre a viabilidade de células da linhagem de melanoma humano SK-MEL-28 após 72 h de tratamento	107
Figura 29. Modulação da Proteína Cinase B (PKB/AKT) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB, 20 ou 40 µg/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 µM).....	108
Figura 30. Modulação do Fator Nuclear κ B (NF- κ B; p65) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB, 20 ou 40 µg/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 µM).....	109
Figura 31. Efeitos cumulativos da exposição de embriões e/ou larvas de peixe-zebra ao óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) após 96 h ...	110
Figura 32. Efeitos letais e não letais observados em embriões de peixe-zebra após exposição a diferentes concentrações do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB)	111
Figura 33. Atividade de enzimas marcadoras de estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra após 96 h de exposição a diferentes concentrações do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB).....	113
Figura 34. Mecanismos de ação do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) em células SK-MEL-28.....	137

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Representação esquemática dos ensaios utilizados para caracterização química e estudo da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronquist (OECB)	72
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas	70
Tabela 2. Identificação e quantificação dos metabólitos secundários presentes no óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB)	85
Tabela 3. Citotoxicidade do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) ou doxorubicina (DXR) em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas após 72 h de tratamento	86
Tabela 4. Valores de energia de ligação (kJ/mol) entre o éster (Z)-2-lacnofilum (EZ), a doxorubicina (DXR) ou outros ligantes e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK1), a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1), a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK), a Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o Fator Nuclear <i>kappa</i> B (NF- κ B; p50/p65)	96
Tabela 5. Efeitos da exposição ao óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB) sobre os parâmetros de desenvolvimento dos estágios iniciais de peixe-zebra após 96 h	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AChE	Acetilcolinesterase
Ala	Alanina
ANOVA	Análise de variância
AO	Laranja de acridina
APAF1	Fator 1 ativador de protease apoptótica
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATF2	Fator de transcrição ativador-2
CAT	Catalase
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDK	Cinase dependentes de ciclina
Cl₅₀	Concentração inibitória média
CKI	Inibidor de CDK
Cys	Cisteína
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DBM	Departamento de Biologia Molecular
DCFH-DA	2'7-dicloro dihidrofluoresceína diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Proteína cinase regulada por sinal extracelular
DXR	Doxorrubicina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
GDP	Difosfato de guanosina
GEF	Fator de troca de nucleotídeo de guanina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPx	Glutathione peroxidase

GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione
GST	Glutathione transferase
GTP	Trifosfato de guanossina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
His	Histidina
IARC	<i>International Agency for Research of Cancer</i>
Ile	Isoleucina
IκB	Inibidor de <i>kappa</i> B
IKK	Complexo IκB cinase
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
JNK	Proteína cinase c-Jun N-terminal
LabRisco	Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias
LDH	Lactato desidrogenase
Leu	Leucina
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises
Lys	Lisina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
MAPKKK	MAPK cinase cinase
MAPKK	MAPK cinase
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
Met	Metionina
mTORC	Complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos
NAC	N-acetilcisteína
NIK	Proteína indutora de NF-κB
NF-κB	Fator Nuclear <i>kappa</i> B
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
OECB	Óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OncoFar	Laboratório de Oncofarmacologia
p38 MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno p38

PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Solução tampão fostato
PDK1	Proteína cinase dependente de fosfoinosítídeo-1
Phe	Fenilalanina
PI3K	Fosfoinosítídeo 3 cinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PI	Iodeto de propídeo
PKB/AKT	Proteína cinase B
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Prx	Peroxirredoxina
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSK	Proteína cinase ativada por ERK
RTK	Receptor tirosina cinase
SAPK	Proteína cinase ativada por estresse
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SIH	Sistema de Informações Hospitalares
SOD	Superóxido dismutase
SOS	Proteína <i>son of sevenless</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Thr	Treonina
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TrA2/OMI	Proteína A2 de alta temperatura
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

Trp	Triptofano
Trx	Tiorredoxina
Tyr	Tirosina
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
Val	Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 Aspectos gerais do câncer	28
2.2 Melanoma: características gerais e tratamento	31
2.3 Ciclo celular e o câncer	35
2.4 Apoptose	38
2.5 Estresse oxidativo e o câncer.....	41
2.6 Vias de sinalização intracelulares das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs).....	44
2.6.1 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK) e o câncer	46
2.6.2 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) e o câncer	48
2.6.3 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK) e o câncer	51
2.7 Via de sinalização intracelular da Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o câncer	54
2.8 Via de sinalização intracelular do Fator Nuclear <i>kappa</i> B (NF- κ B) e o câncer	57
2.9 <i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronquist e o seu potencial farmacológico	60
3 OBJETIVOS.....	65
3.1 Objetivo geral	66
3.2 Objetivos específicos	66
4 MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1 Local da pesquisa	68
4.2 Material.....	68
4.2.1 Substâncias e reagentes	68
4.2.2 Equipamentos	69
4.2.3 Material botânico	70
4.2.4 Linhagens celulares tumorais e não tumoral humanas	70

4.2.5 Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas	71
4.3 Métodos.....	72
4.3.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB)	72
4.3.2 Avaliação da citotoxicidade e dos mecanismos de ação antitumorais do OECB	73
4.3.2.1 Avaliação da citotoxicidade do OECB em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do Índice de Seletividade (IS)	74
4.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade do OECB em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas	75
4.3.2.3 Investigação dos mecanismos de ação antimelanoma <i>in vitro</i> do OECB.....	75
4.3.2.3.1 Avaliação do efeito do OECB sobre a progressão do ciclo celular	75
4.3.2.3.2 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo OECB	76
4.3.2.3.2.1 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo	76
4.3.2.3.2.2 Análise morfológica de células SK-MEL-28 por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo	76
4.3.2.3.3 Avaliação do efeito do OECB sobre o estado redox celular	77
4.3.2.3.3.1 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) utilizando o 2'7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA)	77
4.3.2.3.3.2 Avaliação da citotoxicidade do OECB na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	78
4.3.2.3.4 <i>Docking</i> molecular	78
4.3.2.3.5 Avaliação do efeito do OECB sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)	79
4.3.2.3.5.1 Marcação de células SK-MEL-28 com anticorpos anti-MAPKs e análise por citometria de fluxo	79
4.3.2.3.5.2 Avaliação da citotoxicidade do OECB na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)	80
4.3.2.3.6 Marcação de células SK-MEL-28 com anticorpos anti-PKB/AKT ou anti-NF- κ B/p65 e análise por citometria de fluxo.....	80
4.3.3 Embriotoxicidade do OECB em modelo de peixe-zebra	81
4.3.3.1 Investigação da toxicidade aguda do OECB em embriões de peixe-zebra...	81
4.3.3.2 Avaliação da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra após exposição ao OECB	82

4.3.4 Análise estatística	82
5 RESULTADOS.....	84
5.1 Caracterização química do óleo essencial das partes aéreas de <i>Conyza bonariensis</i> (OECB)	85
5.2 Ensaio farmacológicos e toxicológicos com o OECB	86
5.2.1 Citotoxicidade do OECB em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas.....	86
5.2.2 Citotoxicidade do OECB em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas	87
5.2.3 Mecanismos de ação antimelanoma <i>in vitro</i> do OECB.....	88
5.2.3.1 Efeito do OECB sobre a progressão do ciclo celular	88
5.2.3.2 Morte celular induzida pelo OECB	89
5.2.3.2.1 Marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo.....	89
5.2.3.2.2 Morfologia das células SK-MEL-28 por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo.....	91
5.2.3.3 Efeito do OECB sobre o estado redox celular	93
5.2.3.3.1 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) utilizando o 2'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA).....	93
5.2.3.3.2 Citotoxicidade do OECB na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)	95
5.2.3.4 <i>Docking</i> molecular	96
5.2.3.5 Efeito do OECB sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)	102
5.2.3.5.1 Marcação com anticorpos anti-MAPKs e análise por citometria de fluxo .	102
5.2.3.5.2 Citotoxicidade do OECB na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)	105
5.2.3.6 Marcação de células SK-MEL-28 com anticorpos anti-PKB/AKT e análise por citometria de fluxo	107
5.2.3.7 Marcação de células SK-MEL-28 com anticorpos anti-NF- κ B (p65) e análise por citometria de fluxo	108
5.2.4 Embriotoxicidade do OECB em modelo de peixe-zebra	109
5.2.4.1 Toxicidade aguda do OECB em embriões de peixe-zebra.....	109

5.2.4.2 Atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra expostas ao OECB	112
6 DISCUSSÃO	114
7 CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS.....	138
APÊNDICES	178
ANEXOS	181

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo utilizado para definir um conjunto de doenças caracterizadas por uma massa anormal de tecido conhecida como tumor maligno (Patel, 2020), cujas células apresentam uma série de características adquiridas no processo de malignidade, incluindo proliferação celular descontrolada, indução da angiogênese e capacidade de invasão e metástase (Hanahan, 2022).

Considerando os cânceres de pele, o melanoma, oriundo da proliferação de melanócitos modificados (Centeno; Pavet; Marais, 2023), apresenta-se como a forma mais letal (Guo; Wang; Li, 2021). Mundialmente, em 2020, foram registrados mais de 320 mil novos casos e aproximadamente 57 mil mortes causadas por esse tipo de câncer (Ferlay *et al.*, 2021). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), nesse mesmo ano ocorreram quase 2 mil óbitos por câncer de pele do tipo melanoma (INCA, 2022).

Atualmente, o tratamento do câncer consiste em terapias locais e/ou sistêmicas que incluem cirurgia, radioterapia, terapia imune, hormonioterapia, terapia alvo e quimioterapia (Yang *et al.*, 2023), sendo esta última a principal forma de tratamento (Wu *et al.*, 2023). No tratamento quimioterápico do melanoma, por exemplo, incluem-se os agentes alquilantes dacarbazina, temozolomida e fotemustina (Pham *et al.*, 2023). Contudo, a quimioterapia está associada a certas limitações, como toxicidade sistêmica, taxa de resposta insatisfatória e resistência aos agentes quimioterápicos (Xie; Chen; Fang, 2020).

Diante disso, diversos trabalhos têm sido conduzidos visando a obtenção de novas terapias para o tratamento do melanoma (Malyarenko *et al.*, 2023). Neste contexto, a natureza, em especial as espécies vegetais, é considerada uma fonte significativa de produtos utilizados para o tratamento do câncer (Soto *et al.*, 2023) ou com potencial antitumoral, como moléculas isoladas (Bae *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2023), extratos (Filho *et al.*, 2023; Samiry *et al.*, 2023) e óleos essenciais (An *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023).

Os óleos essenciais são líquidos oleosos (Baptista-Silva *et al.*, 2020) e voláteis, ligeiramente solúveis em água e solúveis em éter, álcool e na maioria dos solventes orgânicos, que possuem odor característico podendo ter em sua composição moléculas como terpenos, sesquiterpenos e politerpenos e seus derivados

oxigenados (Kulkarni; Kulkarni, 2023). Esses derivados vegetais são produzidos por diversas espécies e tem mostrado diferentes atividades biológicas, tais como, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante e antitumoral (Sousa *et al.*, 2023).

Nesta perspectiva, relatos da literatura têm mostrado a obtenção de óleos essenciais das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) e a investigação do seu potencial biológico, destacando efeitos como antifúngico (Lundgren *et al.*, 2021) e antitumoral *in vitro* frente a linhagem de células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 (Elgamal *et al.*, 2021). Em adição, as pesquisas têm mostrado diferentes composições químicas dos óleos essenciais desta espécie vegetal as quais variam de acordo com o seu local de coleta. De fato, a literatura reporta que a composição química e, conseqüentemente, os efeitos biológicos dos óleos essenciais podem ser modificados por diversos fatores, tais como localização geográfica e sazonalidade (Abd-Elgawad *et al.*, 2023).

Assim, considerando que o câncer é um importante problema de saúde pública mundial com significativa morbimortalidade e que a quimioterapia está associada à alta toxicidade e ao desenvolvimento de resistência, e considerando o potencial biológico dos óleos essenciais de *Conyza bonariensis*, o presente trabalho obteve, caracterizou quimicamente e avaliou a atividade antitumoral e a toxicidade em modelos de células humanas e em embriões e larvas de peixe-zebra, do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) cultivada no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM/UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brasil (S 7°08'30.0" – O 34°50'46.7") e coletada em setembro de 2019.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

Na homeostase, a taxa de proliferação celular é controlada graças a um balanço entre os sinais que estimulam e os que suprimem o crescimento celular (Al-Bedeary, Getta, Al-Sharaf, 2020). Contudo, células saudáveis que sofrem modificações genéticas e/ou epigenéticas (Lopez-Bigas; Gonzalez-Perez, 2020) podem passar a proliferar-se descontroladamente, originando uma neoplasia (Kasala *et al.*, 2015). A massa anormal de tecido resultante da hiperproliferação celular (tumor) pode ser classificada como benigna ou maligna (Ahmad; Ahsan, 2020).

Os tumores benignos são bem delimitados por uma cápsula fibrosa, crescem lentamente (Júnior *et al.*, 2014) e possuem células diferenciadas, ou seja, células fenotipicamente semelhantes àsquelas do tecido de origem (Boutry *et al.*, 2022). Por sua vez, os tumores malignos apresentam rápido crescimento (Patel, 2020), são constituídos por células indiferenciadas (Talmadge; Fidler, 2010) e possuem a capacidade de migrar e invadir outros tecidos, por meio da corrente sanguínea e/ou linfática, em um processo denominado de metástase (Ahmad; Ahsan, 2020), sendo este tipo de tumor caracterizado como câncer (Patel, 2020).

O câncer pode então ser definido como um grupo de doenças caracterizadas por possuírem células com mecanismos de proliferação e diferenciação celulares descontrolados, e com o potencial de disseminação pelo corpo (Eldehna *et al.*, 2021).

Essa doença é um dos principais problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por altas taxas de morbimortalidade (Prado *et al.*, 2020) com aproximadamente 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes registradas em 2020, por todo o mundo. Neste ano, o câncer de pulmão (14,3%) e próstata (14,1%) foram os mais comuns em homens, e o de mama (24,5%) em mulheres. Quanto à mortalidade, considerando ambos os sexos, o câncer de pulmão foi o principal causador de óbitos (18,0%) (Sung *et al.*, 2021). Ainda, de acordo com a *International Agency for Research of Cancer* (IARC), estima-se que, até 2040, sejam registrados aproximadamente 30,2 milhões de casos mundialmente (IARC, 2021).

No Brasil, segundo os dados obtidos do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS) da plataforma DATASUS-TABNET do Ministério da Saúde, foram registrados, no primeiro semestre de 2023, 488.772 internações por neoplasias, sendo destes casos aproximadamente 59,07% (288.737)

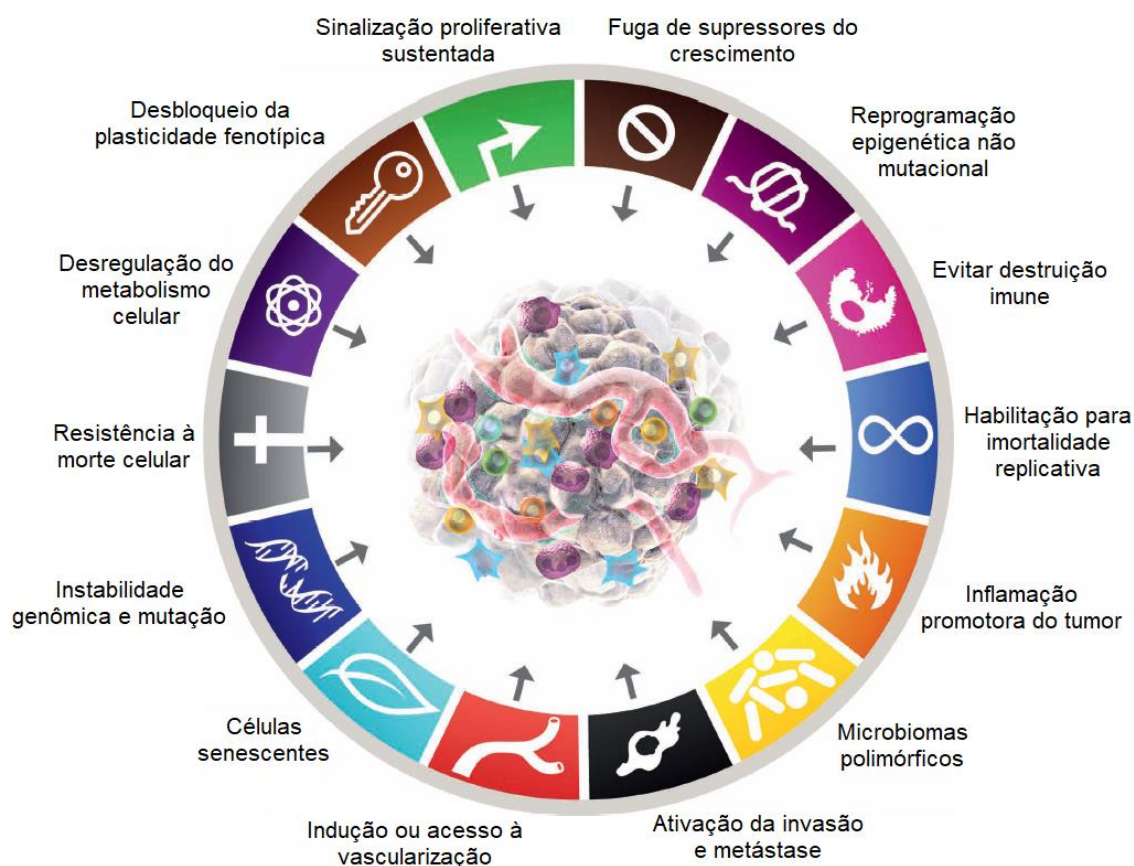
mulheres e 40,92% (200.035) homens (DATASUS, 2023). Em relação ao número de óbitos por neoplasias, foram registrados, durante o período de janeiro a junho de 2023, 38.084 mortes, sendo aproximadamente 49,52% (18.863) homens e 50,47% (19.221) mulheres. Destes registros, cerca de 20% (7.491) foram da região Nordeste e 608 casos no Estado da Paraíba (DATASUS, 2023).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), a estimativa para cada ano do triênio 2023-2025 aponta que ocorrerão 704 mil novos casos de câncer no Brasil, dos quais o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (220 mil), seguido pelos cânceres de mama (74 mil), próstata (72 mil), cólon e reto (46 mil), pulmão (32 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2022).

Atualmente, são descritos mais de cem tipos distintos de câncer que podem ser categorizados de acordo com o tecido de origem, sendo: (i) carcinomas, originados de células epiteliais, representando aproximadamente 90% dos cânceres humanos (Ahmad; Ahsan, 2020), a exemplo dos cânceres mamário (Khoury, 2023) e pancreático (Jiang; Sohal, 2023); (ii) sarcomas, originados de células do tecido conjuntivo (Ahmad; Ahsan, 2020), como o osteossarcoma, um tumor ósseo (Pilavaki *et al.*, 2023); e (iii) leucemias, linfomas e mielomas, que surgem das células brancas do sangue (Shields, 2017), a exemplo da leucemia mieloide crônica (Senapati *et al.*, 2023) e do linfoma de Hodking (Ullah *et al.*, 2023).

Apesar das diferenças significativas entre os cânceres, as células tumorais apresentam características comuns entre si, chamadas de *hallmarks* ou marcas do câncer, e que as distinguem das células saudáveis (Smith *et al.*, 2020), são estas: (i) sinalização proliferativa sustentada; (ii) fuga de supressores do crescimento; (iii) reprogramação epigenética não mutacional; (iv) evasão da destruição imune; (v) habilitação para imortalidade replicativa; (vi) inflamação promotora do tumor; (vii) microbiomas polimórficos; (viii) ativação da invasão e metástase; (ix) indução ou acesso à angiogênese; (x) células senescentes; (xi) instabilidade genômica e mutação; (xii) resistência à morte celular; (xiii) desregulação do metabolismo celular; e (xiv) desbloqueio da plasticidade fenotípica (Hanahan, 2022) (Figura 1).

Figura 1. Características biológicas do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

Diversos fatores internos e externos estão associados ao desenvolvimento do câncer. Tabagismo (Botteri *et al.*, 2020), consumo de álcool (Rehm; Shield; Weiderpass, 2020), infecções por vírus (Urrego *et al.*, 2021) e bactérias (Jessurun, 2021; Watanabe *et al.*, 2021) e exposição aos raios ultravioleta (UV) (Islami *et al.*, 2020; Miligi, 2020) são exemplos de fatores externos. Já dentre os fatores internos incluem-se as mutações genéticas herdadas (Rantapero *et al.*, 2020) que correspondem a aproximadamente 10% das causas de câncer no mundo (Alharthi *et al.*, 2020).

O processo de transformação de uma célula sadia à maligna é denominado de carcinogênese e compreende três etapas: iniciação, promoção e progressão (Majumder *et al.*, 2020). Na primeira etapa, iniciação tumoral, a célula sadia sofre modificações genéticas e/ou epigenéticas que podem ser espontâneas ou induzidas, como por exposição a um agente carcinogênico, passando a proliferar-se

descontroladamente, dando origem a uma população celular de clones modificados (Ahmad; Ahsan, 2020; Lopez; Bleich; Arthur, 2020). Na etapa de promoção, ocorrem danos genéticos adicionais e amplificação de mutações, com proliferação e acumulação das células mutadas (Lopez; Bleich; Arthur, 2020). A última etapa do processo carcinogênico, a progressão, é irreversível (Liu *et al.*, 2015). Nela, ocorre expansão neoplásica adicional, com aumento da taxa de crescimento do tumor, capacidade de invasão e metástase (Lopez; Bleich; Arthur, 2020).

Sabe-se que o desenvolvimento do câncer é mais frequentemente causado por mutações ou alterações nos padrões de expressão de protooncogenes, a exemplo de Ras (Prior; Hood; Hartley, 2020), MYC (Balupuri; Wolf; Eilers, 2020) e Raf (Ahmad; Ahsan, 2020; Sun; Carr; Khushalani, 2020), de genes supressores de tumor, como retinoblastoma (Rb) (Chen; Liu; Tao, 2020), p53 (Chen; Liu; Tao, 2020; Jung *et al.*, 2020) e BRCA1/2 (Caulfield; Davis; Byers, 2019) e àqueles envolvidos no reparo do DNA (Sztandera; Gorzkiewicz; Klajnert-Maculewicz, 2018).

2.2 Melanoma: características gerais e tratamento

O câncer de pele é o mais comum de todos os tipos de cânceres em humanos (Patel *et al.*, 2021) sendo classificado em dois tipos, os cânceres de pele não-melanoma, derivados de queratinócitos ou de seus precursores (Pizzimenti *et al.*, 2021), sendo eles o carcinoma de células escamosas e o carcinoma basocelular (Cives *et al.*, 2020), e os cânceres de pele melanoma, que representam a minoria dos casos (Hu *et al.*, 2022), mas que possuem alto potencial de metástase (Carr; Smith; Wernberg, 2020).

Dentre os cânceres de pele, o do tipo melanoma é o mais agressivo, sendo a mais letal das neoplasias cutâneas primárias (Switzer *et al.*, 2022). Seu desenvolvimento dá-se a partir da transformação maligna dos melanócitos, células localizadas na camada basal da epiderme e que produzem melanina, pigmento escuro que dá cor à pele (Saginala *et al.*, 2021).

A depender do local de apresentação, o melanoma pode ser classificado em cutâneo (Carr; Smith; Wernberg, 2020), a forma mais prevalente deste tipo de câncer (Rebecca; Somasundaram; Herlyn, 2020), ou não-cutâneo (Carr; Smith; Wernberg, 2020), que pode acometer diversos tecidos como oral, nasal (Marrone *et al.*, 2023), gastrointestinal e geniturinário (Carr; Smith; Wernberg, 2020).

De acordo com as suas características histopatológicas os melanomas cutâneos podem ser subclassificados em: (i) melanoma extensivo superficial, o mais comum dos casos correspondendo a aproximadamente 70%. Refere-se ao melanoma em uma fase de crescimento radial ou horizontal com células tumorais distribuídas como um ninho ou unidades solitárias exibindo um padrão pagetóide; (ii) melanoma nodular, que representa 15 a 30% dos melanomas cutâneos, apresentando-se como lesões elevadas ou polipóides; (iii) melanoma lentigo maligno, que ocorre mais comumente em pacientes idosos com pele cronicamente exposta ao sol, correspondendo a aproximadamente 4-10% do total de casos; e (iv) melanoma lentiginoso acral, que apresenta-se histologicamente como células tumorais em unidades únicas ao longo da junção derme-epidérmica e como focos confluentes, sendo o tipo menos incidente, com menos de 5% dos casos. Neste tipo de melanoma, as lesões surgem mais comumente nas palmas das mãos, plantas dos pés, subungueais e, ocasionalmente, superfícies mucosas (Carr; Smith; Wernberg, 2020; Guo; Wang; Li, 2021).

Quanto ao desenvolvimento do melanoma, diversas mutações genéticas podem estar envolvidas, tais como as que ocorrem nos genes *MC1R*, *EDNRB* e *TYRP1* que codificam o receptor de melanocortina-1, a tirosinase relacionada a proteína-1 e o receptor de endotelina tipo B, respectivamente (Bishop *et al.*, 2009; Ward; Lazovich; Hordinsky, 2012; Hawryluk; Tsao, 2014; Guo; Wang; Li, 2021). Outras mutações envolvem os genes *BRAF*, *NRAS*, *NF1* e *KIT*, relacionados a hiperativação da via das Proteínas Cinase Ativadas por Mitógenos (MAPK), e a mutação da proteína retinoblastoma (Rb), o que leva ao descontrole do ciclo celular (Guo; Wang; Li, 2021). Modificações epigenéticas também têm sido relacionadas à biologia do melanoma e incluem metilação do DNA e modificação de histonas (Moran *et al.*, 2018; Guo; Wang; Li, 2021).

A incidência de melanoma apresenta perspectivas de aumento nas próximas décadas (Saginala *et al.*, 2021) mais rapidamente do que qualquer outro tumor sólido (Wagstaff *et al.*, 2022). Em todo o mundo, em 2020, aproximadamente 325 mil pessoas foram diagnosticadas com melanoma e cerca de 57 mil indivíduos morreram desta doença (Arnold *et al.*, 2022). No Brasil, os óbitos por câncer de pele melanoma corresponderam a 1.923 registros no ano de 2020. Para cada ano do triênio 2023-

2025, estima-se a incidência de aproximadamente 8.980 novos casos, sendo 4.640 em homens e 4.340 em mulheres (INCA, 2022).

Dentre os fatores de risco incluem-se a exposição aos raios ultravioleta sem filtro solar de amplo espectro ou outra proteção, bronzamento artificial, imunossupressão (Arnold *et al.*, 2022), irritação química ou mecânica permanente e predisposição genética (Rutkowski *et al.*, 2020).

De forma geral, o tratamento do câncer consiste em abordagens farmacológicas e/ou não-farmacológicas, que são empregadas considerando diversos fatores, incluindo o tipo de câncer e suas características, localização da doença, histórico de tratamento prévio e estado geral de saúde do paciente (Niculescu; Grumezescu, 2022). Dentre as abordagens mais utilizadas, destacam-se como terapias locais, a cirurgia e a radioterapia, e como terapias sistêmicas, a terapia alvo, a imunoterapia e a quimioterapia (Wang *et al.*, 2023a).

Atualmente, o tratamento antimelanoma baseia-se no estágio da doença. Para o melanoma primário e metastático é realizada a ressecção cirúrgica do tumor e de gânglios linfáticos (Rosen *et al.*, 2023). A remoção cirúrgica da maioria dos melanomas é realizada por excisão cirúrgica padrão, com remoção do tumor e de uma margem de pele sadia (Ellison; Zitelli; Brodland, 2019).

A radioterapia, utilizada para o tratamento de melanoma metastático (Rutkowski *et al.*, 2020), é a técnica fundamentada na emissão de radiação de fótons de alta energia, como raios-X e raios gama (γ), às células tumorais, visando induzir danos irreparáveis ao DNA, tanto por mecanismos diretos nesta macromolécula quanto por mecanismos indiretos baseados na indução da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, ao causar danos irreversíveis ao DNA, induzem a morte da célula tumoral (Gong *et al.*, 2021).

A terapia alvo é compreendida pelo uso de pequenas moléculas ou anticorpos monoclonais que atuam bloqueando moléculas específicas envolvidas no crescimento do tumor (Tonooka; Ohashi, 2022), a exemplo do receptor BCR-Abl, na leucemia mieloide crônica (Yuda *et al.*, 2023), ou na ativação de células do sistema imune para o reconhecimento e destruição das células tumorais (Tonooka; Ohashi, 2022). No tratamento do melanoma metastático, inclui-se o uso dos inibidores da proteína B-fibrossarcoma rapidamente acelerado (B-Raf), vemurafenibe e dabrafenibe (Davis; Shalin; Tackett, 2019).

Os medicamentos utilizados na imunoterapia contra o câncer são projetados para ativar ou desativar pontos de controle (*checkpoints*) imunológicos específicos implicados na vigilância imunológica (Bailly; Thuru; Quesnel, 2020). No tratamento com imunoterapia em pacientes com melanoma metastático podem ser utilizados, por exemplo, o ipilimumabe, anticorpo anti-CTLA-4, e o nivolumabe e o pembrolizumabe, anticorpos anti-PD-1 (Nikoo *et al.*, 2023).

A quimioterapia continua sendo a principal modalidade farmacológica de tratamento para muitos tipos de câncer (El-Hussein *et al.*, 2021). Esta baseia-se no uso de substâncias químicas para destruição (citotóxicas) ou inibição do crescimento do tumor (citostáticas) (Kumar; Atangana, 2020). De acordo com o seu mecanismos de ação, esses agentes podem ser divididos em (Mafi *et al.*, 2023): (i) agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, cujos metabólitos ativos formam ligações cruzadas inter e/ou intracadeias com o DNA; (ii) agentes antimetabólitos, a exemplo do 5-fluorouracil (5-FU), que inibe a timidilato sintase levando a um defeito na síntese do DNA; e (iii) produtos naturais, como os alcaloides da vinca e os taxanos que interferem na dinâmica dos microtúbulos e interrompem a divisão celular induzindo a apoptose (Bailly; Thuru; Quesnel, 2020). Para pacientes com melanoma metastático, a quimioterapia pode ser indicada, por exemplo, com o uso dos agentes alquilantes dacarbazina, fotemustina ou temozolomida (Rosen *et al.*, 2023).

Contudo, considerando as principais terapias farmacológicas disponíveis para o tratamento do câncer, têm-se observado limitação quanto ao sucesso terapêutico, com pacientes sem resposta adequada à terapia ou com recidivas (Lopes *et al.*, 2022), surgimento de efeitos adversos significativos, tais como náuseas, problemas gástricos e fraqueza (Michalczyk *et al.*, 2021), e desenvolvimento de resistência (Bahar *et al.*, 2022; Marei *et al.*, 2023; Said; Ibrahim, 2023), o que tem estimulado a pesquisa por novas oportunidades terapêuticas para o tratamento dessa doença (Malyarenko *et al.*, 2023).

Neste contexto, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para a investigação do efeito antimelanoma de produtos naturais e sintéticos, visando a elucidação dos mecanismos de ação antitumorais relacionados à proliferação e sobrevivência celulares, tais como aqueles envolvidos no ciclo celular (Ren *et al.*, 2022; Wei *et al.*, 2022), na apoptose (Palma *et al.*, 2022; Thatikonda *et al.*, 2023), no estado redox celular (Raut *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022) e em vias de sinalização celulares, como

aquelas que envolvem as Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) (Satoh *et al.*, 2020), o Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Möller *et al.*, 2020) e a Proteína Cinase B (PKB/AKT) (Woo *et al.*, 2020).

2.3 Ciclo celular e o câncer

O ciclo celular é um processo constituído por uma série de fases distintas (G0/G1, S, G2 e M) que culminam na replicação do DNA e sua subsequente segregação entre as células-filhas (Matthews; Bertoli; Bruin, 2022).

Esse processo se inicia com a fase G1 (*gap* 1), um intervalo que separa a divisão celular anterior do período de síntese de DNA conhecido como fase S. Esta fase de síntese do material genético é seguida por um segundo intervalo onde as células se preparam para a mitose, a fase G2 (*gap* 2) e, posteriormente, pela fase M (mitose) (Urrego *et al.*, 2014), na qual ocorre a segregação cromossômica dos genomas recém-replicados (Álvarez-Fernández; Malumbres, 2014). Após a fase M, a célula pode avançar para uma nova fase G1 ou para um estado quiescente, denominado G0 (Urrego *et al.*, 2014; Sánchez-Martínez *et al.*, 2015). As células quiescentes podem entrar novamente no ciclo celular por meio de estimulação por fatores mitogênicos (Otto; Sicinski, 2017).

Toda divisão celular requer que a replicação fiel do DNA ocorra na fase S e que a maquinaria necessária para dividir os cromossomos esteja em vigor durante a mitose, levando à produção das células-filhas (Asghar *et al.*, 2015). Ambos os processos estão propensos a erros, durante os quais a síntese de DNA errônea ou a disjunção incompleta dos cromossomos normalmente ativa as proteínas dos pontos de controle (*checkpoints*) para interromper o ciclo celular e desencadear o reparo do DNA (Brandmaier; Hou; Shen, 2017).

Os *checkpoints* atrasam a progressão do ciclo celular quando ocorrem problemas na fase anterior, possuindo moléculas sensoras que detectam o problema e componentes efetores que desencadeiam a parada do ciclo celular em fases específicas (Salazar-Roa; Malumbres, 2017).

Dentre os componentes envolvidos na regulação do ciclo celular, encontram-se as Cinases Dependentes de Ciclinas (CDKs) (Moreno-Layseca; Streuli, 2014), que constituem uma família de serina/treonina cinases heterodiméricas (Pitts *et al.*, 2014) cuja atividade oscilante, em diferentes fases do ciclo celular, resulta em eventos de

fosforilação reversíveis e de sua associação transitória com cofatores específicos, como ciclinas e inibidores de CDK (CKIs) (Bendris; Lemmers; Blanchard, 2015).

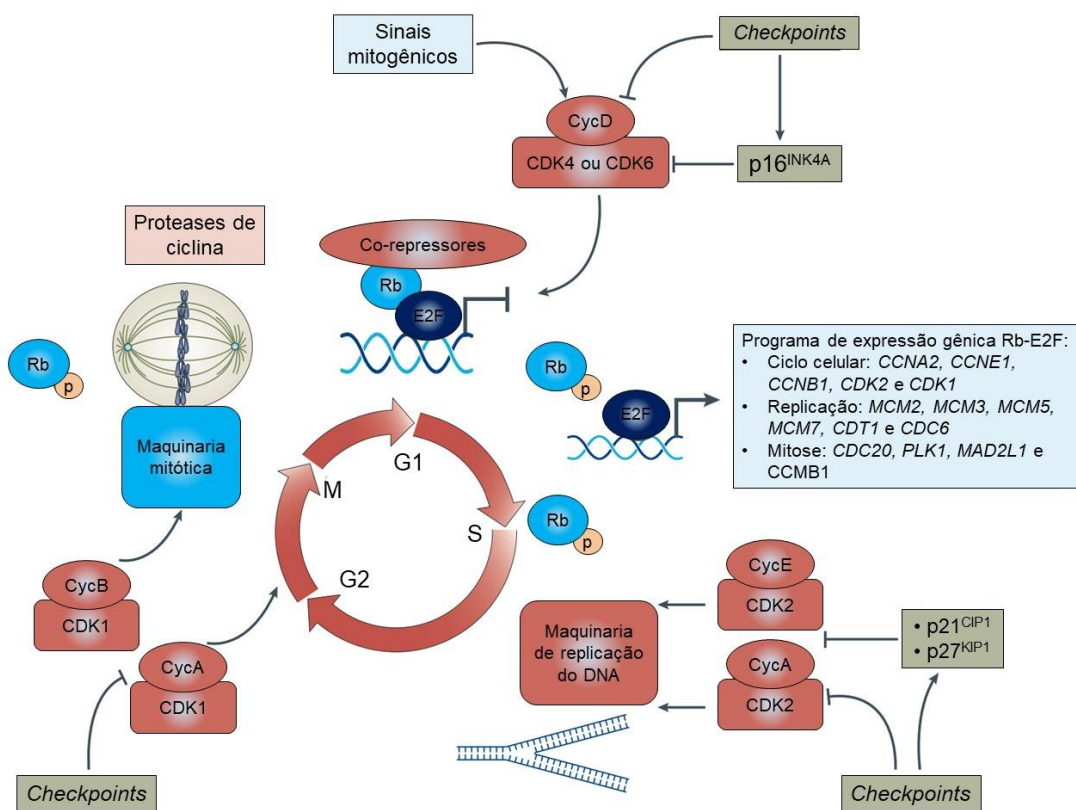
Diferentes famílias de ciclinas foram identificadas e sua expressão varia significativamente ao longo das fases do ciclo celular. Os complexos de ciclina D/CDK são funcionalmente ativos em G1 e fosforilam a proteína retinoblastoma (Rb) permitindo a progressão para a fase S. As ciclinas E e A acumulam-se no limite de fase G1/S, onde ativam CDK2 e CDK1 sucessivamente, promovendo a progressão até a fase G2. Neste ponto, as ciclinas do tipo B, especialmente a ciclina B1 e a CDK1, conduzem as células à mitose (Malumbres; Barbacid, 2005; Sánchez-Martínez *et al.*, 2015) (Figura 2).

Então, as etapas do ciclo celular são rigorosamente controladas para garantir a efetividade desse processo. Em contrapartida, o câncer é caracterizado por atividade aberrante do ciclo celular. Isso ocorre como resultado de mutações em vias de sinalização ou por lesões em genes que codificam proteínas do ciclo celular que são frequentemente hiperativas em células cancerosas, levando a uma proliferação descontrolada (Otto; Sicinski, 2017).

No melanoma, a mutação do gene supressor tumoral *CDKN2A* (inibidor de cinase dependente de ciclina 2A) está relacionado a alto risco para desenvolvimento deste câncer (Pissa *et al.*, 2023). Este gene codifica as proteínas p16^{INK4A} e p14^{ARF}, inibidoras do ciclo celular (Chan; Chiang; Ngeow, 2021). A proteína p16^{INK4A} regula a transição da fase G1 para a fase S, ao inibir especificamente as proteínas CDK4 e CDK6 e, conseqüentemente, bloquear a fosforilação e ativação da proteína Rb (Safwan-Zaiter; Wagner; Wagner, 2022). Já a proteína p14^{ARF} inibe a degradação da p53 (Rossi *et al.*, 2019), proteína envolvida na parada do ciclo celular, reparo do DNA e indução da apoptose (Cheng *et al.*, 2021). Logo, mutações no gene *CDKN2A* permitem o escape das células da parada do ciclo celular (Rossi *et al.*, 2019).

A ativação aberrante de CDKs, que é frequentemente vista em cânceres humanos, fornece um raciocínio para a concepção de inibidores sintéticos de CDKs como drogas antitumorais (Otto; Sicinski, 2017) como o abemaciclib, o palbociclib e o ribociclib, inibidores seletivos das CDK4 e CDK6 (Barroso-Sousa; Shapiro; Tolaney, 2016) que, em particular, são considerados importantes alvos visto que essas CDKs e a via retinoblastoma associada, encontram-se desreguladas na maioria dos tumores humanos (Sánchez-Martínez *et al.*, 2015).

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



Sinais mitogênicos estimulam a formação de complexos ciclina D-CDK4/6, permitindo a entrada da células no ciclo celular. Pontos de controle antiproliferativos podem inibir a atividade dessas enzimas por estimular a expressão de p16^{INK4A}. Os complexos ativos fosforilam a proteína retinoblastoma (Rb), iniciando um programa de expressão gênica coordenado pela família E2F de fatores de transcrição. Neste contexto, inicia-se a transcrição e a estabilidade de ciclinas do tipo E e A e a ativação subsequente da CDK2 que permite o início da replicação de DNA. A atividade de CDK2 pode ser inibida por pontos de verificação adicionais ou por p21^{CIP1} e p27^{KIP1}. Com a conclusão da replicação do DNA, os complexos ciclina A/B-CDK1 fosforilam alvos na fase G2. Na ausência de danos no DNA e após a preparação adequada para a segregação cromossômica, os complexos ciclina B-CDK1 são ativados para a progressão da mitose. A ciclina B é degradada para a progressão da anáfase e a produção de duas células-filhas na fase G1. Durante a transição da fase M para a fase G1, a RB é desfosforilada e o ciclo é mais uma vez responsivo à sinalização mitogênica e antiproliferativa.

Fonte: Adaptado de Asghar *et al.*, 2015.

Atualmente, duas moléculas inibidoras de CDK encontram-se em estágio de pesquisa clínica para o tratamento do melanoma: o riviciclib (P276-00), inibidor de CDK1, CDK4 e CDK9, investigado para tratamento de melanoma avançado positivo para expressão de ciclina D1; e o dinaciclib (SCH727965), inibidor da CDK1, CDK2, CDK5 e CDK9 (Wang; Bode; Zhang, 2023).

Assim, a busca por moléculas reguladoras do ciclo celular é útil na pesquisa de novos fármacos para o tratamento do câncer.

2.4 Apoptose

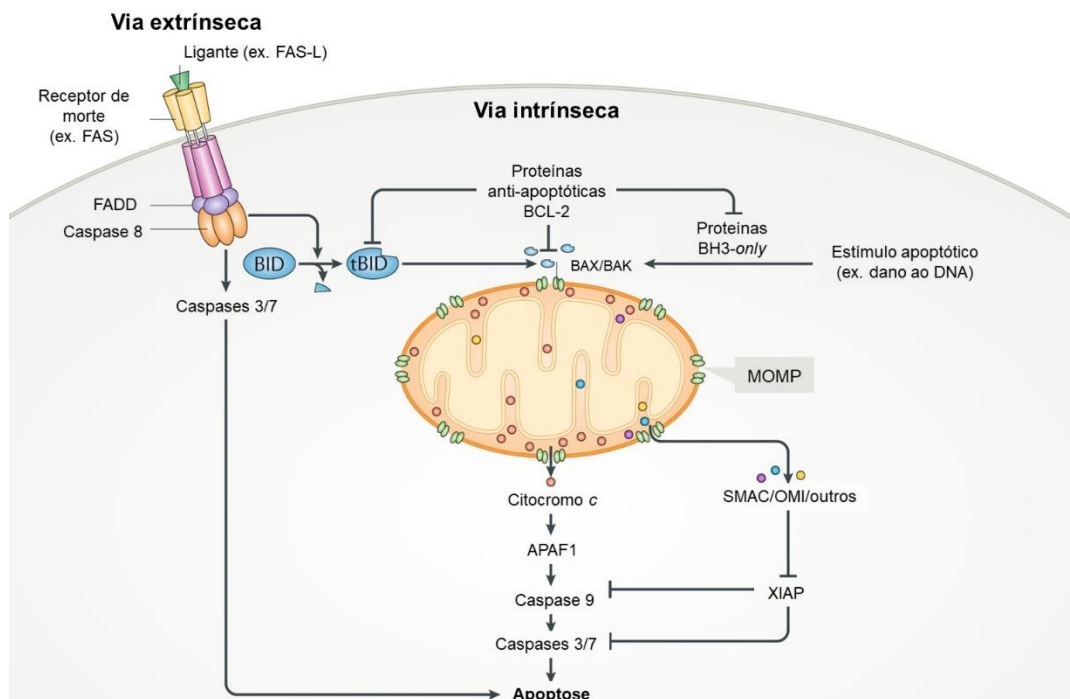
Em organismos multicelulares há um esforço constante para a manutenção de um equilíbrio homeostático entre a quantidade de células geradas e a de células danificadas ou desnecessárias (D'arcy, 2019), sendo estas últimas removidas do corpo graças à morte celular (Yan; Elbadawi; Efferth, 2020).

A apoptose, ou morte celular programada do tipo I, envolve uma série de eventos rigidamente controlados e apresenta características bioquímicas e morfológicas peculiares tais como encolhimento celular, condensação e fragmentação de DNA, *blebs* da membrana plasmática, ativação de caspases e exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (Yan; Elbadawi; Efferth, 2020). Em contraste com a necrose, a apoptose é um processo “silencioso” de morte celular tendo em vista que se mantém a integridade do tecido, pois não ocorre extravasamento do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, não é iniciado um processo inflamatório (Voss; Strasser, 2020).

A apoptose está envolvida com diversos processos no organismo, como o desenvolvimento embrionário e fetal (Voss; Strasser, 2020), a cicatrização de feridas (Prasad *et al.*, 2020) e a eliminação de células defeituosas e mutantes, como as células tumorais (Kalinin *et al.*, 2020).

Esse processo é executado predominantemente pelas caspases, proteases de cisteína que clivam suas proteínas-alvo após resíduos de ácido aspártico (Kesavardhana *et al.*, 2020). Essas enzimas são sintetizadas como precursoras inativas (zimogênios), chamadas de pró-caspases (Boice; Bouchier-Hayes, 2019; Deng; Shah, 2020), e são ativadas por autoclivagem ou proteólise por outras caspases (Yarychkivska; Shaham, 2020), podendo ser categorizadas como caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10) ou caspases efetoras ou executoras (3, 6 e 7) (Boice; Bouchier-Hayes, 2019; Opdenbosch; Lamkanf, 2019).

Duas principais vias de apoptose são bem descritas: a via intrínseca, ativada quando há estresse celular, como quando ocorre estresse do retículo endoplasmático; e a via extrínseca, ativada após interação dos receptores de morte com os seus respectivos ligantes (Boice; Bouchier-Hayes, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose

A via intrínseca é induzida por diversos estímulos, como dano irreparável ao DNA, ocorrendo a ativação das proteínas pró-apoptóticas BH3-only, como PUMA e NOXA (não representadas), cuja ação sobre as proteínas anti-apoptóticas permite a ativação e consequente oligomerização das proteínas efetoras BAK e BAX. Como efeito, ocorre permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), acarretando saída de fatores apoptogênicos do espaço intermembranas mitocondrial, como o citocromo c. Esta proteína, ao encontrar-se no citoplasma, liga-se ao fator 1 ativador de protease apoptótica (APAF1) que, junto à pró-caspase 9, formam o apoptossoma (não representado). Posteriormente, ocorre autoproteólise da pró-caspase 9 e conversão à sua forma ativa, a caspase 9, que irá ativar as caspases efetoras 3 e 7. Estas irão inativar ou ativar diversas proteínas, como nucleases e proteases. MOMP também causa a liberação da proteína de ligação-IAP direta com baixo pI (SMAC/DIABLO) e da proteína A2 de alta temperatura (HtrA2/OMI), que bloqueiam o inibidor da proteína de apoptose ligado ao X (XIAP), facilitando a apoptose. Já a ativação da via extrínseca ocorre quando há interação dos receptores de morte (membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral) com os seus respectivos ligantes, por exemplo FAS e o ligante FAS (FAS-L), respectivamente. A ativação desses receptores permite o recrutamento do Domínio de Morte Associado a FAD (FADD), uma molécula adaptadora. Essa ligação induz o recrutamento da pró-caspase 8, ocorrendo a sua conversão em caspase 8 que, por sua vez, irá ativar as pró-caspases 3 e 7 que atuarão em seus substratos. Além disso, também ocorre proteólise da proteína BID, uma BH3-only, mediado pela caspase 8. Um dos produtos dessa clivagem, o fragmento BID truncado (tBID) irá ativar BAX e BAK, culminando em permeabilização da membrana mitocondrial externa. A integração entre as duas vias funciona como um mecanismo amplificador do sinal de morte.

Fonte: Adaptado de Bock; Tait, 2020.

A resposta aos estímulos ativadores da via intrínseca, também chamada de via mitocondrial, é regulada por uma família de proteínas chamada BCL-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), constituída por membros com atividade anti ou pró-apoptótica. Quando o dano sofrido pela célula é letal, os membros pró-apoptóticos (BIM, PUMA, BID, BMF, NOXA, BIK, BAD e HRK, denominadas de proteínas BH3-only) irão inibir os membros anti-apoptóticos (BCL-2, MCL-1, BCL-XL, BCL-W e A1/BFL-1) que, na

ausência de estímulos apoptóticos, inibem as proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK (Carneiro; El-Deiry, 2020).

Ao serem ativadas, BAX e BAK oligomerizam-se e formam poros na membrana mitocondrial externa ocasionando permeabilização da membrana mitocondrial externa e liberação, para o citoplasma, de fatores apoptogênicos como o citocromo c que, ao associar-se ao fator 1 ativador de protease apoptótica (APAF1) e à pró-caspase 9 constituem o apoptossoma. Em seguida, a pró-caspase 9 sofre autoclivagem, o que dá origem a sua forma ativa, a caspase 9, que irá clivar as pró-caspases 3, 6 e 7, convertendo-as às caspases efetoras 3, 6 e 7. Estas proteínas podem ativar ou inibir outras proteínas como endonucleases, que impulsionam a fragmentação do DNA, e flipases, o que causa a exposição da fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática, respectivamente. Esses processos levam à condensação da cromatina e ao empacotamento do conteúdo celular em corpos apoptóticos e à remoção por fagocitose (Voss; Strasser, 2020).

Na via extrínseca, a apoptose é iniciada a partir da interação dos receptores de morte, pertencentes à família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), a exemplo do CD95/FAS, TNFR1 e os receptores do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) (TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5), com os seus ligantes, neste caso, os ligantes CD95/FAS (CD95L/FASL), TNF e TRAIL, respectivamente (Boice; Bouchier-Hayes, 2019). A ativação desses receptores permite o recrutamento do Domínio de Morte Associado a FAD (FADD), uma molécula adaptadora, o que culmina no recrutamento e na conversão da pró-caspase-8 em caspase 8, que ativa diretamente as caspases 3, 6 e 7 (Voss; Strasser, 2020).

Em adição, existe um *crosstalk* entre as duas vias de sinalização de morte que ocorre como uma forma de amplificação do sinal apoptótico (Voss; Strasser, 2020). A caspase 8 pode clivar a proteína BID, originando o fragmento BID truncado (tBID) que irá ativar BAX e BAK, ocasionando, assim, a permeabilização da membrana mitocondrial externa (Verma; Singh, 2020).

Durante a carcinogênese, as células adquirem a capacidade de contornar a apoptose, o que resulta em vantagens proliferativas e de sobrevivência. O acúmulo de alterações genéticas induz o aumento ou redução da expressão de genes pró e/ou antiapoptóticos (Patergnani *et al.*, 2020). Em adição, alterações epigenéticas como a metilação de *DAPK*, *ASC/TMS1* e *HIC1* estão relacionadas ao escape da apoptose

(Ilango *et al.*, 2020). No melanoma, observam-se mutações ou deleções em *p53*, um gene supressor tumoral, e no gene *TERT* que codifica a subunidade catalítica da telomerase (Strashilov; Yordanov, 2021). Quanto às alterações epigenéticas no melanoma, observa-se que a metilação do gene *RASSF1A* (família de domínio de associação Ras 1 isoforma A) está relacionada ao desenvolvimento de melanoma uveal (Baradaran *et al.*, 2020).

Atualmente, é reconhecido que agentes quimioterápicos citotóxicos produzem morte celular por apoptose, a exemplo da cisplatina (Özerkan, 2023), dacarbazina (Drzewiecka *et al.*, 2023), paclitaxel (Zhao *et al.*, 2022) e vimblastina (Dhyani *et al.*, 2022) utilizados para o tratamento do melanoma (Bomar; Senithilnathan; Ahn, 2019).

Diante disso, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visem a indução da apoptose é uma abordagem potencial para o tratamento do câncer.

2.5 Estresse oxidativo e o câncer

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a formação de moléculas oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), e a capacidade de depuração dos sistemas antioxidantes, levando a uma perturbação da sinalização redox e/ou danos às biomoléculas (Huang; Nan, 2019; Kruk *et al.*, 2019; Sies, 2020).

ROS são pequenas moléculas, derivadas do oxigênio molecular (Sies; Jones, 2020), que possuem elétrons desemparelhados em sua camada de valência, o que as tornam altamente reativas (Chatterjee; Chatterjee, 2020). Essas espécies incluem os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e moléculas não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Milkovic *et al.*, 2019).

Essas moléculas podem ser geradas endogenamente como subprodutos do metabolismo celular a partir dos peroxissomos, retículo endoplasmático e, principalmente, nas mitocôndrias (Perillo *et al.*, 2020) durante a fosforilação oxidativa (Snezhkina *et al.*, 2019), ou por exposição a fatores externos como a radiação ultravioleta (UV) e poluentes (Bodega *et al.*, 2019).

Em condições fisiológicas, a produção e a eliminação de ROS são equilibradas (Bodega *et al.*, 2019). Em células saudáveis, os baixos a moderados níveis de ROS estão envolvidos em muitos processos celulares fundamentais, tais como a defesa imune e ativação de vias de sinalização celulares (Milkovic *et al.*, 2019; Perillo *et al.*, 2020;

Prasad; Srivastava, 2020) como aquelas que envolvem proteínas cinases e fatores de transcrição envolvidos em processos como proliferação e diferenciação celular controlados (Chatterjee; Chatterjee, 2020). Contudo, níveis excessivos de ROS estão envolvidos no dano celular e, portanto, as células desenvolveram sistemas antioxidantes para sua eliminação (Snezhkina *et al.*, 2019).

Esses sistemas de defesas antioxidantes incluem componentes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), peroxirredoxina (Prx), tioredoxina (Trx) e catalases, bem como componentes não enzimáticos, como as vitaminas C, E e A (Bodega *et al.*, 2019; Perillo *et al.*, 2020). No entanto, os níveis elevados de ROS podem sobrepujar a barreira antioxidante, resultando em estresse oxidativo e no surgimento de diversas doenças como o câncer (Snezhkina *et al.*, 2019).

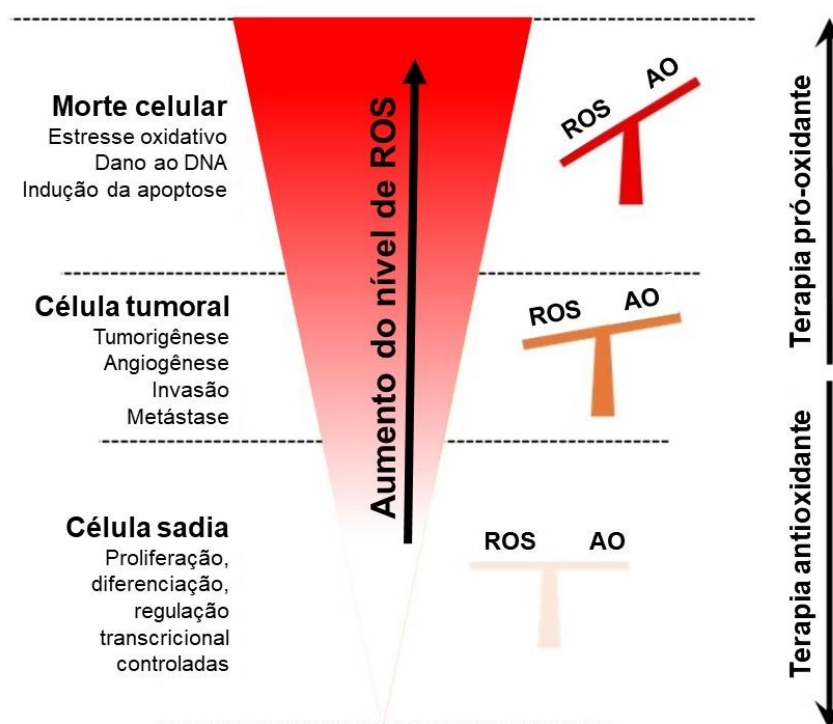
As células tumorais são caracterizadas por apresentarem alta concentração de ROS (Yang; Chen; Shi, 2019) que estão envolvidas na carcinogênese e na aquisição de resistência ao tratamento antitumoral (Kumari *et al.*, 2018; Snezhkina *et al.*, 2019). A sobrevivência das células tumorais aos níveis elevados de ROS dá-se graças a regulação positiva de moléculas antioxidantes, como observado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Galadari *et al.*, 2017), que permitem a manutenção da homeostase redox nessas células (Li *et al.*, 2020a). O aumento da produção de ROS nas células tumorais é capaz de inativar supressores de tumor como p53 e PTEN (homólogo de fosfatase e tensina) e ativar oncogenes incluindo a proteína cinase B (PKB/AKT), ERK e c-MYC induzindo o aumento da proliferação celular e metástase, bem como inibição da apoptose (Sajadimajd; Khazaei, 2017), além de promover a angiogênese tumoral (Huang; Nan, 2019).

Comparado a outros tumores sólidos, o melanoma apresenta concentrações elevadas de ROS. Isto ocorre porque células expostas à radiação UV são estimuladas a produzir ROS e RNS, por meio de moléculas fotossensibilizadoras e pela ativação de enzimas produtoras de ROS, como a NADPH oxidase (NOX) e a óxido nítrico sintase (NOS). Além disso, outra importante fonte de ROS é a via de síntese da melanina, que envolve reações de oxidação e produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Pizzimenti *et al.*, 2021).

Em contrapartida, a radioterapia (Gašparović, 2020) e alguns agentes utilizados na quimioterapia antineoplásica, inclusive para o tratamento do melanoma, têm

mostrado induzir o aumento excessivo dos níveis de ROS intracelulares, aumentando os danos irreparáveis que resultam em apoptose das células tumorais (Kirtonia; Sethi; Garg, 2020) (Figura 4), a exemplo da doxorrubicina (Davalli *et al.*, 2018), metotrexato (Albasher *et al.*, 2019), cisplatina (Yu *et al.*, 2020) e topotecana (Sinha; Tokar; Bushel, 2020), o que pode ocorrer pela modulação das cascatas de sinalização das proteínas cinases reguladas por mitógenos (MAPKs) ou da cinase 1 reguladora do sinal de apoptose (ASK1) (Chatterjee; Chatterjee, 2020).

Figura 4. Efeitos dos diferentes níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células saudáveis e tumorais



Em condições fisiológicas, as baixas concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) permitem a ocorrência controlada dos processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares. O aumento da concentração de ROS observado nas células tumorais, gerando um desbalanço entre a concentração de ROS e de antioxidantes (AO) enzimáticos e não-enzimáticos, estimula, por exemplo, a tumorigênese, angiogênese, invasão e metástase. Contudo, embora sejam observados maiores níveis de ROS em células tumorais, tais células mostram-se mais vulneráveis ao aumento intracelular de ROS, em comparação com células não tumorais. Logo, o aumento adicional de ROS, como causado pela radioterapia e por alguns agentes quimioterápicos, podem causar danos irreparáveis ao DNA da célula tumoral, induzindo a ativação da apoptose.

Fonte: Adaptado de Azmanova; Pitto-Barry, 2022.

Diante dessas premissas, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas que causem aumento na produção de ROS, induzindo estresse oxidativo nas células tumorais, mostram-se promissoras para o tratamento do câncer.

2.6 Vias de sinalização intracelulares das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)

Todos os organismos vivos possuem a capacidade de responder a estímulos externos. A célula, considerada a menor unidade de resposta a estes estímulos, traduz os sinais recebidos do meio extracelular (Ma; Nicolet, 2023), como fatores de crescimento, citocinas e hormônios (Park; Baek, 2022), em cascatas de sinalização intracelulares permitindo, desta forma, a obtenção de uma resposta celular (Ma; Nicolet, 2023).

As cascatas das MAPKs estão conectadas a praticamente todos os estímulos extracelulares, as quais, apesar de serem mecanisticamente semelhantes, modulam uma variedade de atividades *downstream* distintas (Maik-Rachline; Wortzel; Seger, 2021).

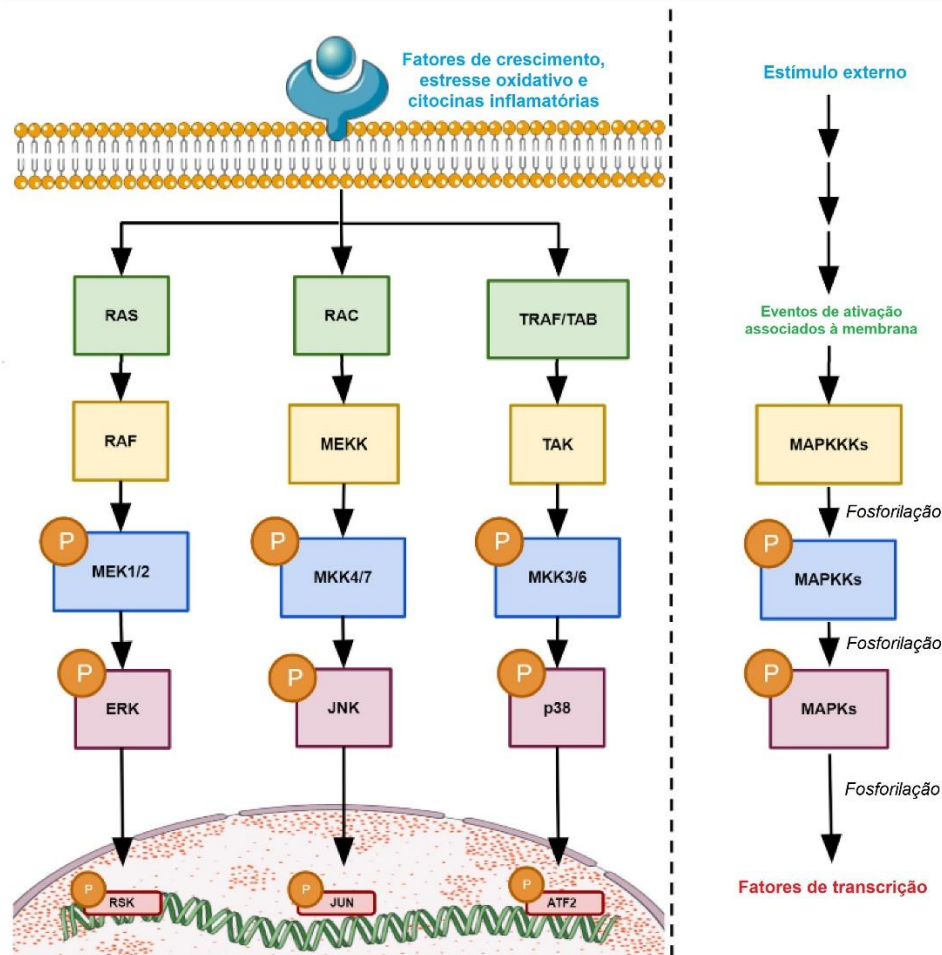
As MAPKs são famílias de serina/treonina cinases ativadas por diversos sinais extracelulares, como fatores de crescimento, citocinas e estresse oxidativo (Kciuk *et al.*, 2022), destacando-se as famílias das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares 1 e 2 (ERK1/2), das Cinases c-Jun N-terminal 1, 2 e 3 (JNK1, JNK2 e JNK3, respectivamente) e das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno p38 α , β , γ e δ (p38 α MAPK, p38 β MAPK, p38 γ MAPK e p38 δ MAPK, respectivamente) (Wu; Becker; Park, 2020).

De forma geral, a ativação das vias de sinalização das MAPKs pode ocorrer pela ativação de receptores tirosina cinase (RTKs) por sinais extracelulares, culminando na ativação de pequenas proteínas de ligação ao GTP, a exemplo das proteínas Ras e Rac. A partir de então uma série de proteínas cinases é ativada. As MAPK cinase cinases (MAPKKKs) fosforilam e ativam as MAPK cinases (MAPKKs) que, por sua vez, fosforilam e ativam as MAPKs. Por fim, as MAPKs ativadas podem fosforilar seus alvos, tais como a Proteína Cinase Ativada por ERK (RSK), o fator de transcrição c-JUN e o fator de transcrição ativador-2 (ATF2) (Figura 5) (García-Hernández *et al.*, 2022).

A sinalização das MAPKs regula diversos processos celulares, como proliferação, migração, diferenciação e apoptose (Yue; López, 2020). No câncer, as MAPKs exercem importantes papéis na carcinogênese, principalmente em cânceres como o de pulmão, o colorretal e o melanoma (Ostrowski; Fisher, 2021). Contudo, tem

sido observado que, a depender do contexto mutacional e celular, também pode ocorrer uma sinalização supressora tumoral (Braicu *et al.*, 2019).

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



Receptores transmembranares do tipo tirosina cinase (RTKs) são ativados por diferentes estímulos, como fatores de crescimento, estresse oxidativo e citocinas inflamatórias. A ativação destes receptores induz a ativação das proteínas RAS, RAC, TRAF/TAB, que são pequenas GTPases (*small G*). Estas proteínas ativam as MAPK cinase cinases (MAPKKKs), como a proteína RAF, que, por sua vez, fosforilam as MAPK cinase cinases (MAPKKs), como as proteínas cinases ativadas por mitógenos 1 e 2 (MEK1/2), ativando-as. As MAPKKs ativam, por fosforilação, as MAPKs (ERK, JNK e p38) que, por sua vez, fosforilam seus alvos citoplasmáticos e/ou nucleares, modulando diversas funções celulares.

Legenda: ©: grupo fosfato.

Fonte: Adaptado de García-Hernández *et al.*, 2022

2.6.1 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK) e o câncer

Ao interagir com ligantes extracelulares, a exemplo do fator de crescimento epidérmico (EGF) (Sabbah; Hajjo; Sweidan, 2020), RTKs ativam-se após dimerização e transfosforilação de seus resíduos de tirosina em seus domínios intracelulares (Cordover *et al.*, 2020). Esta ativação induz o recrutamento de proteínas adaptadoras, principalmente a Proteína Ligada ao Receptor do Fator de Crescimento 2 (Grb2). A interação da Grb2 com os RTKs recruta fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), em especial a proteína *son of sevenless* (SOS) (Seiler *et al.*, 2022). A SOS favorece a troca do difosfato de guanosina (GDP) pelo trifosfato de guanosina (GTP) em Ras (Baltanás *et al.*, 2020; Park; Baek, 2022), cujas isoformas incluem a K-Ras, a N-Ras e a H-Ras (Nussinov *et al.*, 2021). Ao ligar-se ao GTP, Ras torna-se ativa (Ras-GTP) e estimula a formação de homodímeros ou heterodímeros de proteínas Raf (A-Raf, B-Raf e C-Raf) (Júnior, 2019; Seiler *et al.*, 2022). As proteínas Raf fosforilam as Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos 1 e 2 (MEK1/2), ativando-as (Zhang *et al.*, 2022). As MEK1/2 ativas fosforilam a sequência de resíduos treonina-glutamato-tirosina no segmento de ativação das proteínas ERK1/2, ativando-as. Posteriormente, as proteínas ERK1/2 ativas fosforilam seus alvos citoplasmáticos, como a proteína cortactina e a Proteína Cinase da Cadeia Leve de Miosina (MLCK), e nucleares, a exemplo dos fatores de transcrição c-Myc, c-Fos e c-Jun (Ullah *et al.*, 2022) (Figura 6). A regulação desta via mantém a homeostase celular (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021) e envolve as proteínas fosfatases de dupla especificidade 5 e 6 (DUSP5 e DUSP6) que catalisam a desfosforilação e inativação das ERK1/2 (Júnior, 2019).

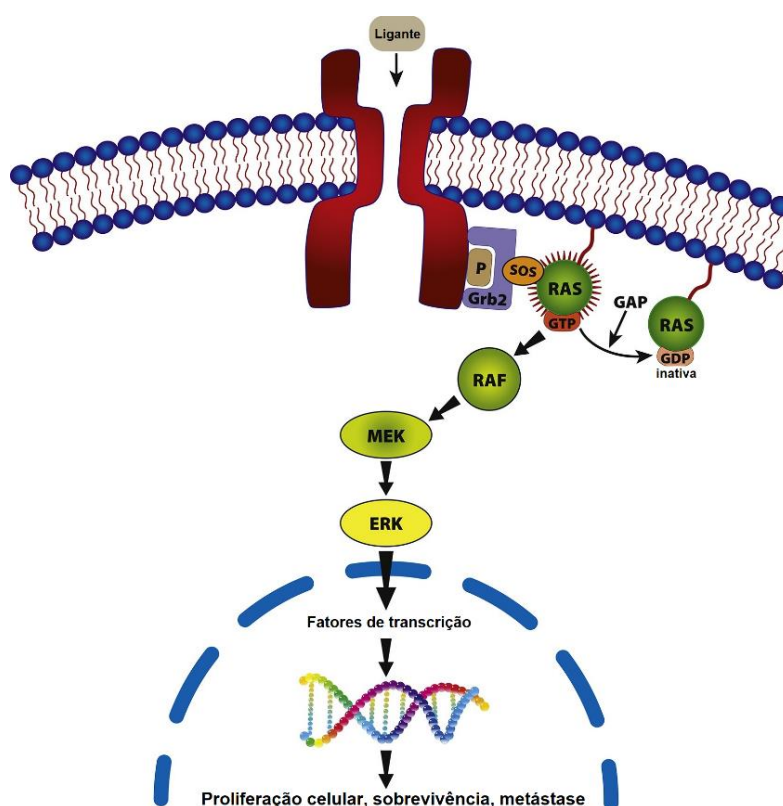
Fisiologicamente, a sinalização ERK1/2 está envolvida em diversos processos celulares controlados, incluindo proliferação, sobrevivência, crescimento, metabolismo, migração e diferenciação celulares (Lavoie; Gagnon; Therrien, 2020). Contudo, a desregulação desta cascata de sinalização está envolvida com diversas doenças, como esclerose lateral amiotrófica (Sahana; Zhang, 2021), Alzheimer (Khezri *et al.*, 2023), autismo (Erickson *et al.*, 2023) e câncer (Gong *et al.*, 2023).

Nas células tumorais, é bem relatado o papel dessa via na tumorigênese, proliferação, diferenciação, angiogênese e metástase (Guo *et al.*, 2020). No melanoma, por exemplo, a via de sinalização ERK1/2 mostra-se fundamental para o desenvolvimento e progressão deste tumor (Savoia *et al.*, 2019) com

aproximadamente 50% dos melanomas apresentando mutação do oncogene *BRAF*, o que leva a ativação constitutiva dessa via (Buchbinder; Giobbie-Hurder; Ott, 2023).

No contexto da sobrevivência das células tumorais, a sinalização ERK1/2 modula negativamente a apoptose, por regular as atividades e os níveis de proteínas da família Bcl-2, como a proteína pró-apoptótica BIM e a proteína anti-apoptótica MCL-1, além de inibir a apoptose induzida pelo receptor de morte Fas ou pelos receptores dos fatores de necrose tumoral (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021).

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



A ativação dos receptores do tipo tirosina cinase (RTKs), após ligação de ligantes extracelulares, induz o recrutamento das proteínas Grb2 (proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2) e SOS (*son of sevenless*) e consequente ativação da proteína Ras, após troca de difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina (GTP). Ras-GTP ativa Ras que, por sua vez, ativa as proteínas cinases ativadas por mitógenos 1 e 2 (MEK1/2) que, por fosforilação, ativam as proteínas ERK1/2. ERK1/2 fosforilam diversos alvos citoplasmáticos (não indicados na imagem) e nucleares, modulando, desta forma, diversos processos celulares, tais como proliferação celular, sobrevivência e metástase. As proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) aceleram a conversão (hidrólise) do GTP a GDP pelas proteínas Ras, tornando-as inativas.

Legenda: ©: grupo fosfato.

Fonte: Adaptado de Imperial *et al.*, 2019.

O conhecimento do envolvimento e importância da via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK no câncer tem permitido o desenvolvimento de terapias direcionadas aos

componentes desta via, como os anticorpos monoclonais vemurafenibe e dabrafenibe, que têm como alvo a proteína Raf, e encorafenibe, cobimetinibe, trametinibe e binimetinibe que são anticorpos anti-MEK1/2, utilizados para o tratamento do melanoma metastático (Florent *et al.*, 2023).

Apesar de serem observados efeitos pró-tumorais mediados pela sinalização ERK1/2, tem-se relatado o envolvimento destas MAPKs na indução da morte das células tumorais, o que é dependente do tipo celular e do estímulo. Este efeito antitumoral está associado à ativação apoptose pela via intrínseca, mediada pela liberação do citocromo c e ativação da caspase-9, ou extrínseca dependente da ativação da caspase-8. Atualmente, diversos estímulos têm sido relacionados a esse efeito indutor de morte das células tumorais mediado pela ativação de ERK1/2, e estes incluem as ROS e alguns agentes antineoplásicos, como cisplatina, doxorrubicina, etoposídeo, carboplatina e paclitaxel (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021).

Pesquisas têm demonstrado o potencial antitumoral de produtos naturais baseados na ativação da via ERK1/2. Em seu trabalho, Potočnjak e colaboradores (2020), ao tratar células da linhagem de câncer de cólon SW620 com o flavonoide luteolina, observaram que o efeito antitumoral desta molécula é dependente da expressão de ERK1/2. Ainda, a morte celular dependente da ativação destas proteínas, após o tratamento de células da linhagem RKO (câncer colorretal) com 8-metoxiflindersina (8-MF), um alcaloide da quinolina, foi um achado observado no trabalho de Zhang e colaboradores (2023a).

Desta forma, diante do papel dual da via de sinalização ERK1/2 no câncer, o desenvolvimento de terapias que modulem esta via mostra-se útil para o tratamento dessa doença.

2.6.2 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) e o câncer

A JNK, também conhecida como Proteína Cinase Ativada por Estresse (SAPK) (Lee *et al.*, 2022), é expressa sob três isoformas codificadas por genes altamente relacionados: JNK1 (*JNK1*) e JNK2 (*JNK2*) expressas de forma ubíqua, e JNK3 (*JNK3*) restrita ao cérebro, coração e testículo (Nakano; Nakayama; Sugiya, 2020; Latham; O'donnell; Croucher, 2022).

A via JNK é modulada principalmente por estresse ambiental ou genotóxico (Martínez-Limón et al., 2020), como pela ação de citocinas pró-inflamatórias e consequente ativação de RTKs, radiação ultravioleta ou estresse osmótico (Ha et al., 2019). Estes fatores externos induzem a ativação de MAPKKs, como as Cinases Ativadoras da MAP Cinase 1-4 (MEKK1-4) e as Cinases Reguladoras de Apoptose 1 e 2 (ASK1/2). As MAPKKs ativam as MAPKKs como as Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos 4 e 7 (MKK4 e MKK7) que, por sua vez, ativam as JNKs por fosforilação dos seus resíduos de treonina e tirosina na sequência treonina-prolina-tirosina (Park; Baek, 2022). As JNKs ativas regulam diversos fatores de transcrição como c-Jun e c-Fos (Ahn et al., 2023) (Figura 7) e vários membros da família BCL-2, pró e anti-apoptóticos, em nível transcricional e/ou pós-transcricional (Yue; López, 2020). A regulação negativa dessa via dá-se pela ação das fosfatases DUSP, como DUSP1, DUSP2 e DUSP3 (Ha et al., 2019).

A sinalização JNK está envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos, como progressão do ciclo celular, sobrevivência celular e apoptose (Ha et al., 2019), e patológicos, como o desenvolvimento de doenças como fibrose pulmonar idiopática (Popmihajlov et al., 2022), Huntington, Parkinson (Corrales; Losada-Pérez; Casas-Tintó, 2021), psoríase e câncer (Hammouda et al., 2020).

No câncer, a sinalização JNK está envolvida no desenvolvimento e progressão tumoral (Wu et al., 2020), modulando a proliferação celular, a metástase, a autofagia, o metabolismo celular e o escape ao sistema imune, além de resistência à quimioterapia (Lee et al., 2022).

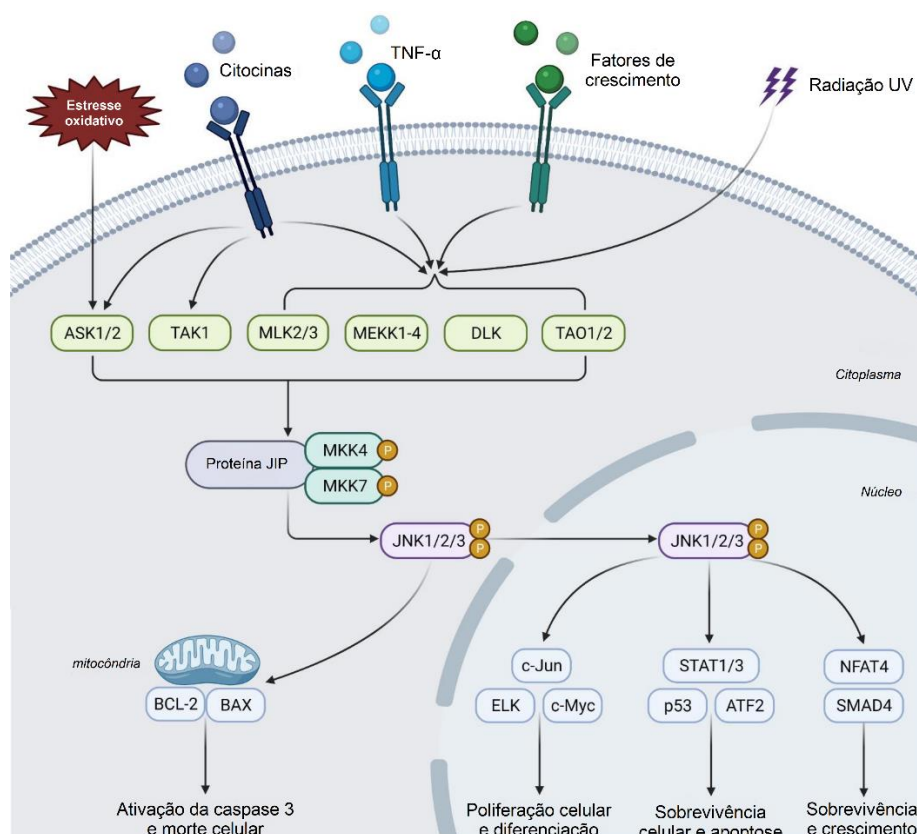
Foi relatado que a ativação de JNK encontra-se significativamente elevada em tecidos de câncer de bexiga humano e murino, e que está envolvida na fuga imune de células das linhagens de câncer de bexiga 5637 e J82 (Ni et al., 2022).

No câncer de próstata, evidencia-se, em estudo com células das linhagens de câncer prostático DU145 e LNCaP, que a ativação da JNK se encontra envolvida com progressão e metástase (Sung et al., 2018).

Outros estudos *in vitro* mostraram o envolvimento da ativação da JNK com a sobrevivência de células da linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549 (Jiang et al., 2022) e a viabilidade de células da linhagem de câncer de pulmão com mutação em K-Ras H2122 (Hoang et al., 2020). Ainda, foi relatado que o tratamento de células da linhagem de câncer de mama MCF-7 resistentes a paclitaxel (PTX-res MCF-7) com

o inibidor seletivo de JNK, JNK-IN-8, suprimiu o perfil mesenquimal destas células, reforçando o envolvimento da via JNK na metástase (Kilbas *et al.*, 2020).

Figura 7. Cascata de sinalização das proteínas cinases c-Jun N-terminal (JNKs)



Diversos fatores extracelulares ativam a via de sinalização das proteínas cinases c-Jun N-terminal (JNKs) como estresse oxidativo, radiação ultravioleta (UV), citocinas, fatores de crescimento e o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Nesta via, as proteínas MAPK cinase cinases (MAPKKKs) são a ASK_{1/2}, TAK₁, MLK_{2/3}, MEKK₁₋₄, DLK e TAO_{1/2}. As MAPKKKs ativam por fosforilação as proteínas MAPK cinases MKK4 e MKK7 que, associadas à proteína de interação à JNK 1 (J1P), fosforilam e ativam as proteínas JNK_{1/2/3}. As JNKs ativas induzem diversos efeitos celulares como proliferação celular, por fosforilação de fatores de transcrição como c-Jun, e apoptose, por modular a atividade das proteínas BCL-2 e BAX.

Legenda: ASK_{1/2}: cinases reguladoras de apoptose 1 e 2; TAK₁: cinase 1 ativada pelo fator de crescimento transformante- β ; MLK_{2/3}: cinases de linhagem 2 e 3; MEKK₁₋₄: cinases ativadoras da MAP cinase 1-4; DLK: cinase com duplo zíper de leucina; TAO_{1/2}: cinase TAO 1 e 2; BCL-2: proteína 2 de leucemia/linfoma de células B; BAX: proteína X associada à BCL-2; ®: grupo fosfato.

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

No melanoma, Zhou e colaboradores (2021) observaram que a expressão da utrofina, proteína codificada pelo gene supressor tumoral *UTRN*, encontra-se reduzida em células da linhagem de melanoma humano A375 e que sua atividade antiproliferativa nestas células envolve a inibição da via JNK/c-Jun.

Em contrapartida, evidências apontam para o papel antitumoral da JNK, tornando esta proteína um alvo atrativo para o tratamento do câncer (Abdelrahman *et*

al., 2021). Em células de carcinoma ovariano, a ativação da morte celular dependente de autofagia pode ser induzida por modulação positiva da JNK (Dou *et al.*, 2019).

Em adição, o tratamento de células tumorais com produtos naturais tem induzido morte celular por indução da atividade de JNK dependente de estresse oxidativo. Como observado no estudo realizado por Wang e colaboradores (2019), o composto nomeado de WZ35, um derivado da curcumina, uma substância polifenólica isolada da *Curcuma longa* (Zingiberaceae), exerceu significativo efeito antitumoral frente linhagem de células de câncer de mama (MDA-MB-231) por aumento da produção de ROS e ativação da JNK. Já o tratamento de células da linhagem de câncer colorretal Caco-2 com ginsenosídeo Rh4, uma saponina isolada da *Panax notoginseng* (Araliaceae), induziu estresse oxidativo e consequente morte celular apoptótica e autofágica dependente da ativação de JNK e p53, em trabalho publicado por Wu e colaboradores (2018).

A apoptose de células tumorais também tem sido induzida por ativação de JNK por produtos sintéticos. O tratamento de células das linhagens de osteosarcoma 143B e U2OS com metformina induziu o aumento da produção de ROS e ativação da JNK, causando a morte destas células (Li *et al.*, 2020b). Ainda, a exposição de células das linhagens SCC12 e SCC13 (carcinoma escamoso de pele) à pitavastatina induziu apoptose por ativação de JNK (KIM *et al.*, 2023). Por fim, Kang e colaboradores (2023) observaram indução de apoptose por ativação da via JNK/p53 em células da linhagem de câncer colorretal HCT-116 após exposição ao composto codificado como MHY2251, um análogo da 2,3-dihidroquinazolin-4-ona.

2.6.3 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK) e o câncer

A p38 MAPK é descrita sob quatro isoformas, p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ (Ma; Nicolet, 2023), expressas de forma ubíqua, mas com diferentes níveis de expressão em vários tecidos (Phan *et al.*, 2023). De forma semelhante ao observado na via de sinalização da JNK, a ativação dessas proteínas é dependente principalmente de estímulos extracelulares relacionados ao estresse (Martínez-Limón *et al.*, 2020).

Ainda, assim como na via da JNK, os estímulos extracelulares, como fatores de crescimento e estresse oxidativo, podem ativar, por exemplo, ASK1/2 e MEKK1-4. Estas cinases fosforilam e ativam as Proteínas Cinases da Proteína Cinase Ativada

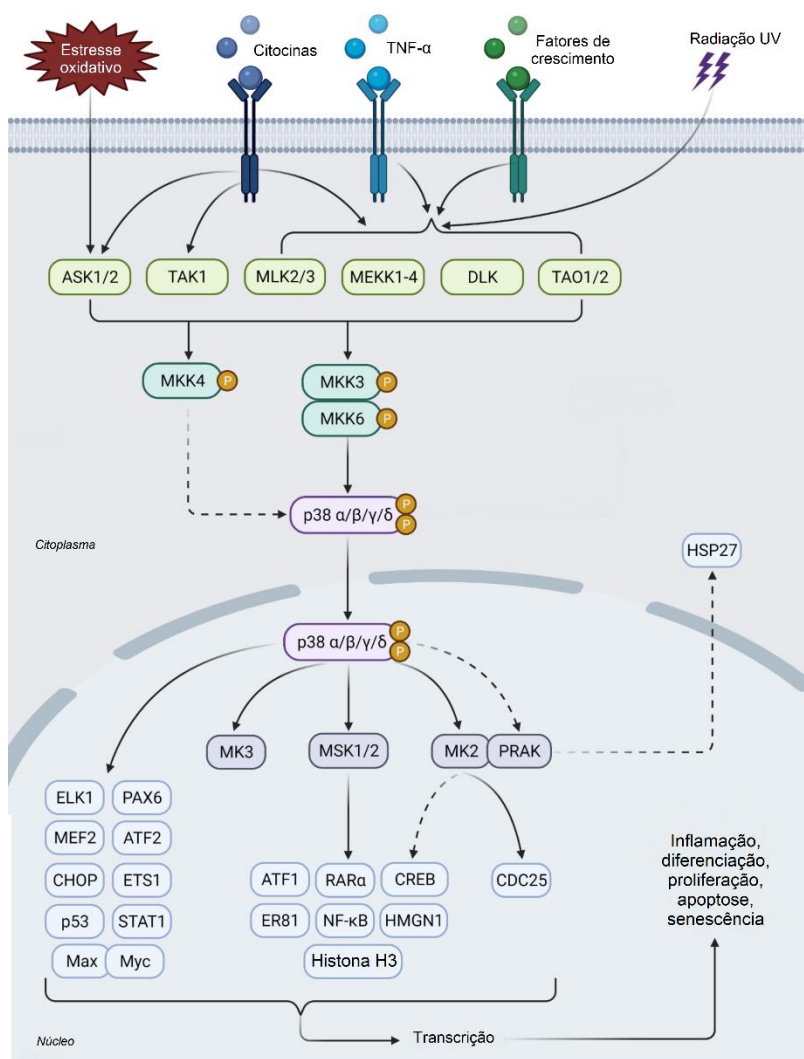
por Mitógenos 3, 4 e 6 (MKK3, MKK4, MKK6, respectivamente). As MKK3, MKK4 e MKK6 ativam a p38 MAPK que pode modular outras proteínas cinases, como a Proteína Cinase Ativada por Proteína Cinase Ativada por Mitógeno 3 (MK3) ou fatores de transcrição, como o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1) (Pua *et al.*, 2021) (Figura 8). A regulação desta via é realizada por fosfatases como DUSP1, DUSP10 e DUSP16 (Chen; Chuang; Tan, 2019), e sua desregulação encontra-se envolvida em diversas doenças (Canovas; Nebreda, 2021).

No câncer, tem sido observado que a via p38 MAPK está associada à tumorigênese de carcinoma nasofaríngeo por modulação da proliferação celular, inflamação, angiogênese e metástase (Pua *et al.*, 2022). Em células de melanoma *BRAF* mutantes (A375 e SK-MEL-28), a ativação da p38 MAPK encontra-se associada à regulação negativa de bombas de Ca^{2+} da membrana plasmática do subtipo 4b (PMCA4b), um supressor de metástase (Naffa *et al.*, 2020).

Em seu trabalho de revisão, Phan e colaboradores (2023) reuniram informações acerca do envolvimento da p38 MAPK com os tumores gastrointestinais. No câncer de esôfago, a maior expressão de p38 MAPK está associada a pior prognóstico, sendo observada correlação significativa entre os níveis de p38 γ MAPK e o surgimento de metástases. No câncer gástrico, o tratamento de células das linhagens de câncer gástrico humano AGS, HGC-27 e GES-1 com interferon- γ (IFN- γ) evidenciou regulação negativa da p38 γ MAPK e consequente inibição da proliferação celular. Tanto no adenocarcinoma pancreático quanto no carcinoma hepatocelular, a superexpressão de p38 γ MAPK está associada a menor sobrevida e, ainda, a análise de tecidos de carcinoma hepatocelular humano mostrou a superexpressão da isoforma p38 γ MAPK, em comparação aos tecidos hepáticos saudáveis.

Além disso, Wada e colaboradores (2017) ao utilizar um modelo de carcinoma mamário metastático murino, observaram que os animais desenvolveram metástase pulmonar e que camundongos geneticamente modificados para não expressarem a proteína p38 δ MAPK (*p38 δ ^{-/-}*) apresentaram atraso na formação do tumor primário e redução da metástase. Em adição, o *knockdown* de *p38 δ* em células da linhagem de carcinoma mamário humano MCF-7 e MDA-MB-231 induziu redução da proliferação celular, aumento da adesão celular à matriz extracelular e redução do desprendimento celular.

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



Diversos estímulos como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) ativam a via da proteína cinase ativada por mitógenos p38 (p38 MAPK) que é expressa sob quatro isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ . Nesta via de sinalização intracelular, as proteínas ASK1/2, TAK1, MLK2/3, MEKK1-4, DLK e TAO1/2 (MAPK cinase cinases - MAPKKKs) fosforilam e ativam as proteínas MAPK cinases MKK3, MKK4 e MKK6 que, por sua vez, fosforilam e ativam as proteínas p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$. Quando se encontram ativadas, as p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ fosforilam diversos fatores de transcrição como ATF2 ou outras proteínas cinases, a exemplo da MSK1/2 que, por sua vez, fosforilam alvos como a proteína STAT1. A ativação da via da p38 MAPK pode induzir inflamação, diferenciação celular, proliferação celular, senescência celular ou apoptose.

Legenda: ASK1/2: cinases reguladoras de apoptose 1 e 2; TAK1: cinase 1 ativada pelo fator de crescimento transformante- β ; MLK2/3: cinases de linhagem 2 e 3; MEKK1-4: cinases ativadoras da MAP cinase 1-4; DLK: cinase com duplo zíper de leucina; TAO1/2: cinase TAO 1 e 2; MK2: proteína cinase ativada por proteína cinase ativada por mitógeno 2; MK3: proteína cinase ativada por proteína cinase ativada por mitógeno 3; PRAK: proteína cinase regulada por p38; $\textcircled{P}$: grupo fosfato.

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

Contudo, tem sido observado que a via de sinalização da p38 MAPK exerce um papel pleiotrópico no câncer (Pranteda *et al.*, 2020). De fato, diversos fármacos

antineoplásicos utilizados na clínica como a oxaliplatina, a irinotecana, o 5-FU e a doxorrubicina induzem a ativação da p38 MAPK como um dos seus mecanismos de ação antitumorais (Martínez-Limón *et al.*, 2020; Pranteda *et al.*, 2020).

Atualmente, diversas pesquisas têm demonstrado que outros compostos naturais e sintéticos têm exercido efeito anticâncer por ativação dessa via de sinalização. Ao avaliar o efeito antitumoral da lobaplatina em células A549 (adenocarcinoma pulmonar), Zhang e colaboradores (2019b) observaram que a apoptose nestas células é mediada pela indução de estresse oxidativo e ativação da p38 MAPK. De forma semelhante, a dioscina, triterpenoide hexacíclico, induz morte apoptótica após ativação de p38 MAPK dependente de ROS em células de osteosarcoma das linhagens U2-OS e MG63 (Zheng *et al.*, 2023), o que também é observado em várias linhagens de células de carcinoma colorretal (HT116, HT29, HCT116-OxR e HT29-OxR) após o tratamento com echinatina, uma cumarina (Kwak *et al.*, 2023).

Em adição, a saponina esteroideal timosaponina AIII e polissacarídeos sulfatados derivados da microalga *Synechococcus* sp. exercem significativo efeito antitumoral por ativação da p38 MAPK frente as linhagens de células humanas de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e colorretal (Caco-2), respectivamente (Zhang *et al.*, 2021a; Srimongkol *et al.*, 2023).

Assim, a modulação da p38 MAPK mostra-se uma abordagem promissora para o tratamento do câncer.

2.7 Via de sinalização intracelular da Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o câncer

A proteína PKB, também chamada de AKT, é uma serina/treonina cinase que exerce importantes funções na fisiologia celular como no crescimento, sobrevivência, proliferação e metabolismo (Yuan *et al.*, 2023), sendo expressa sob três isoformas, AKT1/PKB α – expressa de forma ubíqua, AKT2/PKB β – expressa em órgãos responsivos à insulina, e AKT3/PKB γ – expressa principalmente no cérebro e testículos (Abdullah *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023a).

A ativação da PKB/AKT está associada a diversos estímulos incluindo fatores de crescimento, citocinas, hormônios e estresses (Hua *et al.*, 2021) que podem ativar receptores acoplados à proteína G (GPCRs) ou RTKs. A modulação desses

receptores culmina em ativação da fosfoinositídeo 3 cinase (PI3K) que fosforila o fosfolípídeo de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) produzindo o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) (Van Huizen; Mcinerney, 2020) (Figura 9).

O PIP3 associa-se a PKB/AKT, por meio do seu domínio de homologia à pleckstrina (domínio PH) localizado na extremidade N-terminal, induzindo mudança conformacional na estrutura proteica o que permite a interação da PKB/AKT com a proteína cinase dependente de fosfoinositídeo-1 (PDK1), também recrutada à membrana plasmática. A PDK1, por sua vez, fosforila o aminoácido Tre308 na PKB/AKT. Em adição, o complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2) fosforila AKT em Ser473. A partir de então, a PKB/AKT ativada transloca-se ao citoplasma e ao núcleo fosforilando diversos alvos (Powis *et al.*, 2023) como proteínas envolvidas na sobrevivência celular, no metabolismo e na progressão do ciclo celular (Revathidevi; Munirajan, 2019). A regulação da atividade da PKB/AKT é exercida pela ação da proteína PTEN (homólogo de fosfatase e tensina) que remove um fosfato de PIP3, convertendo-o ao PIP2 (Luo *et al.*, 2023) (Figura 9).

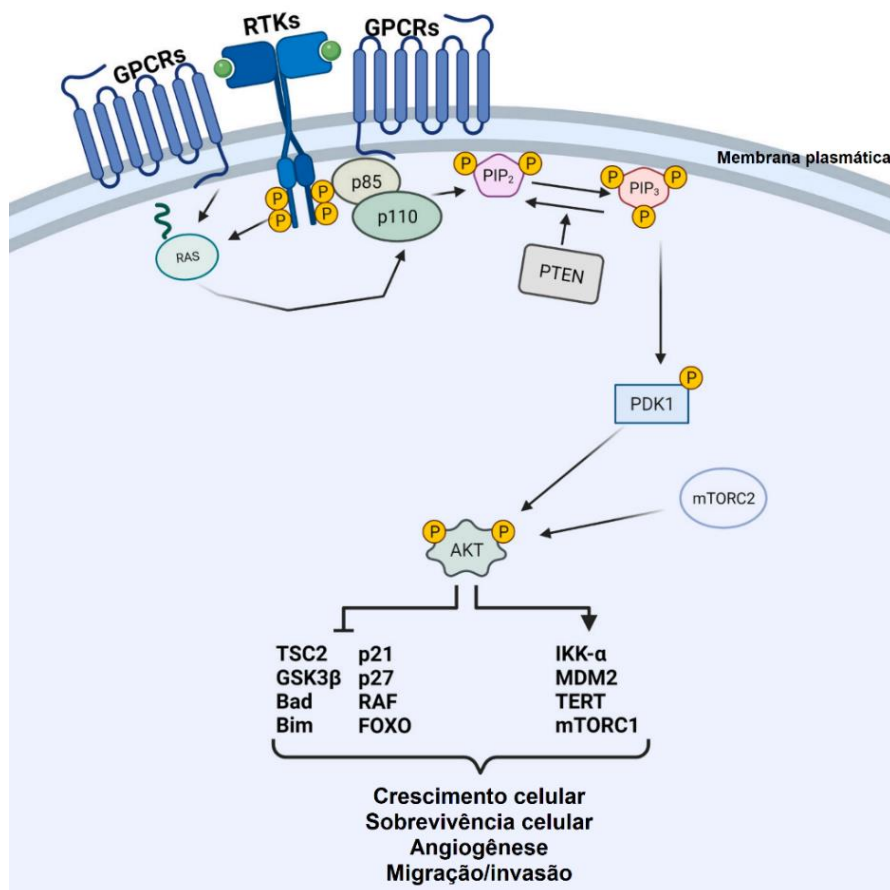
Várias doenças estão associadas à desregulação dessa via de sinalização, como diabetes e distúrbios cardiovasculares e neurológicos (Kumar *et al.*, 2023). No câncer, a superexpressão e/ou a ativação aberrante de proteínas desta via estão associados ao desenvolvimento de diversos tumores malignos como os carcinomas mamário – por hiperativação da PI3K (Miricescu *et al.*, 2020), prostático – por deleção/mutação do gene *PTEN* (Shorning *et al.*, 2020) e ovariano – por mutação de *AKT1* (Ediriweera *et al.*, 2019), e em melanomas cuja ativação constitutiva de *AKT* encontra-se presente em aproximadamente 70% destes tumores (Dong *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2020).

Em seu trabalho, Lee e colaboradores (2021) observaram que o silenciamento da proteína DJ-1, conhecida como uma reguladora negativa de *PTEN*, em células de melanoma humano G361, induziu apoptose e suprimiu a sobrevivência e migração celular, o que foi acompanhado de inibição da fosforilação da PKB/AKT.

Em seu trabalho, Li e colaboradores (2019) observaram que o silenciamento do gene *FGFR3*, que codifica o receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos (*FGFR3*), em células A357 (melanoma humano), diminuiu os níveis de fosforilação de PKB/AKT. Esse achado mostra-se importante pois também foi observada redução da capacidade de formação de colônias e do percentual de proliferação destas células,

além de aumento significativo da taxa de apoptose e redução significativa da capacidade de invasão e migração celular, com aumento da expressão da E-caderina e diminuição da expressão da N-caderina e da vimentina.

Figura 9. Via de sinalização intracelular da Proteína Cinase B (PKB/AKT)



A ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) ou tirosina cinase (RTKs) ativa a fosfoinosítídeo 3 cinase (PI3K), constituída pelas subunidades p85 e p110. Quando ativa, a PI3K fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) convertendo-o ao fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). O PIP₃ liga-se a serina/treonina cinase PKB/AKT favorecendo a sua fosforilação e ativação pela proteína cinase dependente de fosfoinosítídeo-1 (PDK1) e pelo complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2). A PKB/AKT, agora ativa, migra para o citoplasma e núcleo e fosforila diversos alvos envolvidos com processos celulares como crescimento e sobrevivência celulares, angiogênese, migração e metástase. Dentre estes alvos incluem-se as proteínas relacionadas à apoptose BAD e BIM. A regulação desta via de sinalização dá-se graças a ação da proteína PTEN (homólogo de fosfatase e tensina), uma fosfatase que atua sobre o PIP₃, gerando PIP₂.

Legenda: TSC2: complexo de esclerose tuberosa 2; GSK3β: glicogênio sintase cinase-3 beta; p21: proteína 1A inibidora da cinase dependente de ciclina; p27: proteína 1B inibidora da cinase dependente de ciclina; RAF, FOXO: proteína forkhead box O1; IKK-α: IκB cinase alfa; MDM2: homólogo duplo minuto 2 de camundongo; TERT: transcriptase reversa da telomerase; mTORC1: complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos; @: grupo fosfato.

Fonte: Modificado de Vidal *et al.*, 2022

Ao analisar os níveis de expressão da proteína 44 contendo motivos tripartidos (TRIM44) em amostras clínicas de melanoma, Wei e colaboradores (2019)

observaram superexpressão desta proteína nestes tecidos, em comparação as amostras teciduais paratumorais. Em experimentos *in vitro*, utilizando as linhagens de melanoma humano A2058 e A375, esses autores evidenciaram que os altos níveis de TRIM44 aumentaram os níveis da proteína PKB/AKT fosforilada e que a inibição específica de PKB/AKT inibiu a progressão tumoral induzida por TRIM44. Neste modelo experimental, a superexpressão de TRIM44 estimulou invasão e migração celulares, resistência à apoptose e proliferação celular. Em adição, em modelo de xenoenxerto em camundongos BALB/c, observou-se o envolvimento da TRIM44 com a capacidade tumoral de indução de metástase pulmonar.

Em contrapartida, dados do trabalho realizado por Sun e colaboradores (2019) evidenciaram o envolvimento da ativação da via PI3K/AKT ao efeito antitumoral em modelos de câncer de fígado. Nessa pesquisa, o tratamento de células de carcinoma hepatocelular (HepG2 e Bel-7402) e de camundongos BALB/c inoculados com células HepG2 com aloína ou metformina, bem como a combinação destas moléculas, induziu efeito antitumoral por inibir o crescimento e invasão celulares e indução de apoptose e autofagia por meio da ativação da via PI3K/AKT/mTOR.

Diante do exposto, a proteína PKB/AKT tem sido considerada um alvo atraente para a pesquisa e desenvolvimento de drogas antitumorais e muitos esforços estão sendo realizados para identificar moduladores dessa via de sinalização celular.

2.8 Via de sinalização intracelular do Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B) e o câncer

A família do NF- κ B constitui um grupo de cinco fatores de transcrição que formam homo ou heterodímeros: c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p105/p50) e NF- κ B2 (p100/p52) (Han *et al.*, 2023), todos com domínio de homologia Rel (RHD) de ligação ao DNA (Mussbacher *et al.*, 2023). Nas células em repouso, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado ao inibidor de *kappa* B (I κ B), expresso sob as isoformas I κ B α , I κ B β ou I κ B ϵ (Cheng *et al.*, 2023), que mascara a sua sequência de ligação ao DNA (Liu; Zhong; Karin, 2022).

Atualmente, são descritas duas vias de sinalização do NF- κ B, a canônica ou clássica e a não-canônica ou alternativa. A via canônica, associada a processos como resposta imune, inflamação, crescimento e sobrevivência celulares (Hoorzad *et al.*, 2023), é desencadeada por diversos estímulos como pela ativação dos receptores do fator de necrose tumoral α (TNFR), dos receptores de interleucina-1 (IL-1R) e dos

receptores Toll-like (TLR) (Shih; Wang; Yang, 2015; Kim *et al.*, 2022). Os receptores ativados induzem o recrutamento de proteínas acessórias o que acarreta a autofosforilação da cinase 1 ativada por fator de crescimento transformante β (TAK1) (Aashaq; Batool; Andrabi, 2019) que fosforila e ativa o complexo I κ B cinase (IKK) (Xu; Lei, 2021), formado pelas subunidades IKK α , IKK β e modulador essencial de NF- κ B (NEMO/IKK γ) (Cheng *et al.*, 2023). O complexo IKK ativo fosforila o I κ B que sofre ubiquitinação e degradação por proteassomas (Hoorzad *et al.*, 2023), liberando assim o NF- κ B que transloca-se ao núcleo para a transcrição de vários genes alvo (Xu; Lei, 2021) (Figura 10). O gene que codifica o I κ B é alvo para o NF- κ B. Ao ser sintetizado, o I κ B transloca-se ao núcleo e se liga ao NF- κ B deslocando-o do DNA e, consequentemente, redirecionando-o ao citosol (Mussbacher *et al.*, 2023).

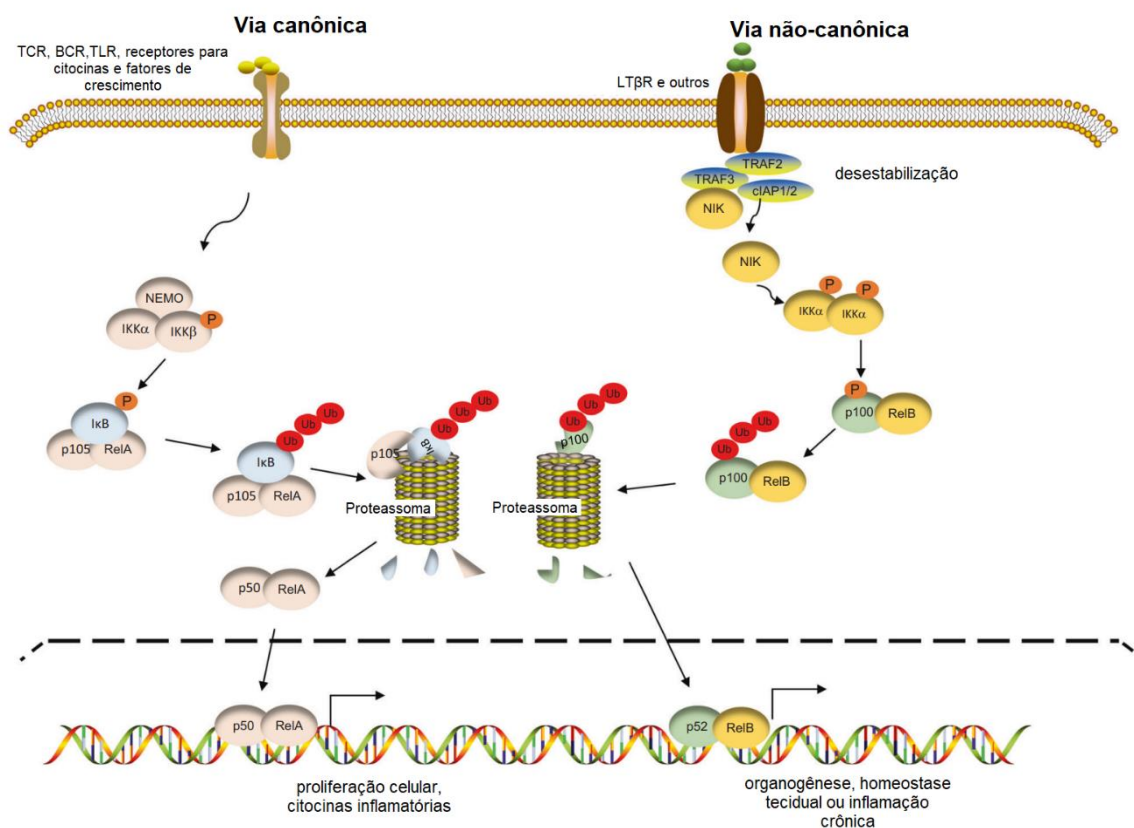
A via não-canônica está relacionada à resposta imune e as doenças inflamatórias (Zhao *et al.*, 2023b) e ocorre quando há a ativação de receptores incluindo o *cluster* de diferenciação 40 (CD40), o receptor da linfotóxina- β (LT β R) e o ativador do receptor do NF- κ B (RANK) que induzem a ativação da proteína indutora de NF- κ B (NIK) (Grondona *et al.*, 2018). Nas células em repouso, NIK é constantemente degradada por ubiquitinação, mediada pelo complexo formado por TRAF2, TRAF3, cIAP1 e cIAP2. Em células estimuladas, o complexo TRAF2/TRAF3/cIAP1/cIAP2 sofre desestabilização, o que inibe a degradação da NIK. Assim, a NIK fosforila e ativa a IKK α que, por sua vez, fosforila o heterodímero p100/RelB e induz a clivagem proteolítica do precursor p100 gerando a p52 que, na forma de dímero com a RelB, atuará na transcrição de genes alvo (Zhang *et al.*, 2019b) (Figura 10).

Quando desreguladas, as vias de sinalização do NF- κ B podem originar inflamação crônica, doença autoimune e câncer (Zhang *et al.*, 2021b). Atualmente, tem sido observado que há um elo entre inflamação e o câncer (Hanahan, 2022). No câncer, a via de sinalização NF- κ B contribui para a progressão tumoral ao ativar a transcrição de diversos genes envolvidos na proliferação celular, inibição da apoptose, invasão, metástase e angiogênese (Deka; Li, 2023).

No mieloma múltiplo diversas alterações genéticas, relacionadas a componentes de ambas as vias de sinalização do NF- κ B, têm sido observadas e entre estas incluem-se amplificações de NFKB1, mutações de ganho de função e amplificações de genes que codificam LT β R, CD40 e NIK, e inativação ou deleção

mutacional de genes que codificam reguladores negativos da via não-canônica, como TRAF2, TRAF3, cIAP1 e cIAP2 (Roy; Sarkar; Basak, 2018).

Figura 10. Vias de sinalização intracelulares canônica (clássica) e não-canônica (alternativa) do Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B)



São descritas duas vias de sinalização intracelulares do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B): a via canônica (clássica) e a não-canônica (alternativa). Na via canônica, a ativação de receptores de membrana celular, como o receptor de células T (TCR), induz a fosforilação e ativação do complexo I κ B cinase (IKK – NEMO, IKK α e IKK β). Este, por sua vez, fosforila o inibidor de *kappa* B (I κ B – I κ B, p105/p50 e RelA) que sofre ubiquitinação e degradação. O NF- κ B livre (p50/RelA, o heterodímero mais comum nesta via) transloca-se ao núcleo para a indução da expressão de genes envolvidos, por exemplo, com proliferação celular e expressão de citocinas inflamatórias. Na via não-canônica após a ativação de receptores de membrana celular, tais como o receptor da linfotóxina- β (LT β R), ocorre a ativação da proteína indutora de NF- κ B (NIK) que, por sua vez, ativa a I κ B cinase α (IKK α) e esta induz a clivagem da subunidade p100 a p52. O dímero p52-RelB transloca-se ao núcleo para transcrição de genes alvo envolvidos com organogênese, homeostase tecidual ou inflamação crônica.

Legenda: BCR: receptor de células B; TLR: receptores Toll-like; Ub: ubiquitina; ©: grupo fosfato.

Fonte: Modificado de Zhang *et al.*, 2019b

A análise de tecidos de tumores colorretais e de tecidos subjacentes saudáveis por PCR-*real time* de 27 pacientes mostrou uma expressão maior do NF- κ B/RelA nos tecidos doentes, evidenciando o envolvimento desta via de sinalização na tumorigênese do câncer colorretal (Negi *et al.*, 2018).

No melanoma, foi observado que a pentraxina 3 longa derivada de células cancerígenas (PTX3), uma glicoproteína inflamatória de fase aguda secretada por células de melanoma invasivo, promove a migração e invasão celulares através de via de sinalização NF- κ B dependente do receptor Toll-like 4 (TLR4) (Rathore *et al.*, 2019). Em adição, em estudo *in vivo*, Stansel, Wickline e Pan (2020) investigaram o efeito do tratamento com nanopartículas de siRNA p5RHH-p65, para silenciamento do NF- κ B, na metástase pulmonar de melanoma. Para isto, estes autores injetaram células de melanoma murinas da linhagem B16-F10 em camundongos e administraram as nanopartículas por três dias. Como resultado, estes autores observaram redução significativa na metástase pulmonar, em comparação ao grupo controle não tratado.

Apesar do efeito pró-tumoral da via NF- κ B ser bem relatada, tem sido reportado que a citotoxicidade de fármacos antitumorais é dependente da ativação desta via. A doxorrubicina e seus análogos estruturais, WP631 e WP744, induzem apoptose por ativação da via NF- κ B pela degradação do I κ B α em células tumorais das linhagens KBM-5 (leucemia mieloide crônica) e Jurkat (leucemia aguda de células T) (Ashikawa *et al.*, 2004). Riganti e colaboradores (2008) observaram que a ativação da via NF- κ B pela sinvastatina potencializou a citotoxicidade da doxorrubicina em células malignas humanas da linhagem HT-29 (câncer de cólon).

Ainda, o tratamento de células tumorais humanas da linhagem de câncer de próstata DU145 com o ácido 6-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]-2-naftaleno carboxílico induziu a ativação da via NF- κ B, por diminuição do I κ B α , e consequente apoptose induzida pelo aumento da expressão do receptor de morte 4 (DR4) (Jin *et al.*, 2005).

Assim, a via NF- κ B mostra-se um alvo favorável para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer.

2.9 *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist e o seu potencial farmacológico

A natureza é uma importante fonte de moléculas bioativas (Wilson *et al.*, 2020). Há muitos séculos, os produtos naturais têm sido utilizados pelas suas propriedades terapêuticas. Atualmente, os efeitos biológicos dos produtos de origem natural e/ou dos seus compostos bioativos têm sido intensamente investigados para potencial tratamento de diversas doenças como as cardiovasculares, o diabetes, as doenças neurodegenerativas e o câncer (Sairazi; Sirajudeen, 2020).

Na farmacoterapia do câncer, sabe-se que aproximadamente 60% dos fármacos disponíveis clinicamente são produtos naturais ou seus derivados (Rayan; Raiyn; Falah, 2017), a exemplo da doxorrubicina, isolada de *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* (Rawat *et al.*, 2021), e da vincristina encontrada em *Catharanthus roseus* (L.) (Das *et al.*, 2020). Assim, diversos estudos têm sido realizados para investigar o potencial antitumoral de produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, tais como extratos (Afshin *et al.*, 2022; Carrasco *et al.*, 2023) e óleos essenciais (An, 2023; Cappelli *et al.*, 2023; Ghavam *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2023).

Nesse contexto, destaca-se a família Asteraceae que compreende 1.600 gêneros e 2.500 espécies de plantas distribuídas pelo mundo. Membros desta família apresentam diversas propriedades farmacológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e hepatoprotetora (Rolnik; Olas, 2021). Nessa família encontra-se o gênero *Conyza* que engloba mais de 50 espécies que produzem significativa variedade de metabólitos secundários como alcaloides, terpenoides, esteroides, compostos fenólicos, flavonoides e taninos (Opiyo; Njoroge; Kuria, 2023). Entre as espécies deste gênero, encontra-se *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, uma planta invasora nativa da América do Sul (Adande *et al.*, 2023).

Conyza bonariensis, popularmente conhecida no Brasil como acatóia, buva, capetiçoba, capiçoba, catiçoba, enxota, erva-lanceta, margaridinha-do-campo, rabo-de-foguete, rabo-de-raposa, salpeixinho ou voadeira, é uma planta herbácea, que atinge até dois metros de altura. Suas folhas apresentam-se alternas, sésseis, oblanceoladas ou lanceoladas, com 6 a 12 cm de comprimento, 1,5 a 2,5 cm de largura e margens não dentadas, e as flores apresentam capítulos isolados, pedicelados (Lazaroto; Fleck; Vidal, 2008) (Figura 11).

Essa planta possui ciclo de vida anual (Terra; Ferreira, 2020) e ampla distribuição pelas regiões tropicais e temperadas quentes de todo o mundo (Bastida *et al.*, 2021), infestando tanto a zona rural, como em campos de cultivo de milho e soja (Terra; Ferreira, 2020) e em vinhedos (Cabrera-Perez; Royo-Esnaol; Recasens, 2022), quanto as áreas urbanas (Terra; Viera, 2019). O comportamento invasivo dessa espécie tem sido atribuído à sua alta fecundidade adquirida pela capacidade de dispersão das suas sementes à longas distâncias (Zambrano-Navea; Bastida; Gonzalez-Andujar, 2016).

Diversos compostos têm sido identificados nessa espécie incluindo limoneno, (*E*)-cariofileno, (*E*)- β -farneseno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, *trans*- α -bergamoteno, éster metílico de matricária, β -copaen-4 α -ol, carvacrol, α -curcumeno óxido de cariofileno, neofitadieno, acetato de 2-heptil 2,6,7,7a-tetrahidro-1,5-dimetil-1H-indeno-3-carboxaldeído (Hoi *et al.*, 2020), quercetina, ácido gálico, ácido *p*-cumarínico e ácido cinâmico (Saleem *et al.*, 2021).

Figura 11. Partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae)



Conyza bonariensis (L.) Cronquist cultivada no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brasil, julho de 2023.

Fonte: Acervo particular do autor

Além de ser considerada uma planta alimentícia não convencional (Terra; Viera, 2019), *Conyza bonariensis* é popularmente utilizada por suas diversas ações terapêuticas que incluem efeito anti-helmíntico, diurético, vermífugo, antidiarreico e antisséptico em feridas (Qasem, 2015).

Em adição, diversos estudos reportam os efeitos biológicos de *Conyza bonariensis* como atividade antibacteriana (Thabit *et al.*, 2015; Musembei; Jepkorir Joyce, 2017; Paula *et al.*, 2018), antifúngica (Mussin *et al.*, 2017; Girma; Jiru, 2021; Lundgren *et al.*, 2021), hepatoprotetora (Saleem *et al.*, 2014), antienvhecimento (Elgamal *et al.*, 2021), anti-inflamatória (Santana *et al.*, 2011; Espinoza *et al.*, 2021),

hipoglicêmica (Saleem *et al.*, 2021), antiamnéstica (Saikia *et al.*, 2022) e antitumoral (Araújo *et al.*, 2013; Elgamal *et al.*, 2021; Saleem *et al.*, 2022).

Diversos óleos essenciais e compostos isolados destes produtos naturais têm sido investigados quanto o seu potencial antitumoral (Sharifi-Rad *et al.*, 2022). Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos obtidos de muitas partes das plantas, como flores, sementes, folhas, galhos e raízes. Óleos essenciais são compostos por numerosos constituintes voláteis, como sesquiterpenos, monoterpenos, aldeídos, álcoois, ésteres e cetonas. A vantagem específica dos óleos essenciais parece estar nos efeitos sinérgicos de seus componentes, em comparação aos efeitos individuais dessas moléculas (Baptista-Silva *et al.*, 2020).

A espécie *Conyza bonariensis* é rica em óleos essenciais encontrados em toda a planta (Adande *et al.*, 2023) e que, de forma geral, apresentam em sua composição química principalmente limoneno e β -farneseno (Opiyo; Njoroge; Kuria, 2023).

Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas para investigar as propriedades farmacológicas dos óleos essenciais de *Conyza bonariensis*. Quanto ao efeito antitumoral, o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* coletada em Mérida, Venezuela, em 2006, cujo principal componente isolado foi o *trans*- β -farneseno (37,8%), revelou significativa citotoxicidade frente as linhagens tumorais humanas HeLa (carcinoma cervical), A-459 (carcinoma de pulmão) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário) com valores de concentração inibitória média (CI₅₀) entre 1,4 a 45,8 μ g/mL (Araújo *et al.*, 2013). Já o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* coletada em 2019 entre o Cairo e Alexandria, Egito, apresentou como componente majoritário o *trans*- α -farneseno (25,03%), mostrando efeito antitumoral contra a linhagem de células tumorais humanas HepG2 (carcinoma hepatocelular) (CI₅₀: 25,6 μ g/mL), mas sem efeitos citotóxicos significativos contra as linhagens A-459 e MCF-7 (Elgamal *et al.*, 2021).

Apesar de serem plantas da mesma espécie, dados da literatura mostram que diferenças significativas na composição química dos óleos essenciais podem ser observadas a depender de fatores como sazonalidade (Prado *et al.*, 2022), o local de cultivo, os métodos de extração, o ciclo de crescimento e o tempo e tecnologia de secagem do óleo essencial (Ni *et al.*, 2021), e que isto afeta as propriedades biológicas desses derivados vegetais (Chamali *et al.*, 2022).

Nessa perspectiva, para óleos essenciais das partes aéreas de *Conyza bonariensis*, estudos realizados em vários países mostraram diferentes componentes majoritários, como o limoneno (Amaral *et al.*, 2018), o 1*H*-indeno-3-carboxaldeído, 2,6,7,7*a*-tetrahydro-1,5-dimetil (Musembei; Kiplimo, 2017) e o *allo*-aromadendreno (Hoi *et al.*, 2020).

Assim, sabendo que mudanças no perfil químico dos óleos essenciais afetam diretamente as suas atividades biológicas (Hanif *et al.*, 2017) e considerando a necessidade de obtenção de novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer, o presente trabalho propôs a caracterização do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) cultivada no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em João Pessoa, Paraíba, Brasil, e coletada em setembro de 2019, bem como a avaliação da sua citotoxicidade em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas, e avaliação da sua toxicidade em modelos humano e de peixe-zebra.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Obter e caracterizar quimicamente o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (OECB), e investigar sua atividade antitumoral *in vitro* e sua toxicidade.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o OECB e identificar e quantificar os seus componentes químicos;
- Avaliar a citotoxicidade do OECB em diferentes linhagens de células tumorais humanas (SK-MEL-28, HeLa, HCT-116, HL-60 e K562);
- Avaliar a citotoxicidade do OECB em linhagem de células sadias de pele humana HaCaT (queratinócitos) e em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas;
- Determinar o índice de seletividade (IS) do OECB;
- Investigar o efeito do OECB sobre a progressão do ciclo celular em células SK-MEL-28;
- Avaliar o tipo de morte induzido pelo OECB (apoptose ou necrose) em células SK-MEL-28;
- Investigar o efeito do OECB sobre o estado redox celular em células SK-MEL-28;
- Determinar os valores de energia de ligação e os encaixes 2D e 3D entre o composto majoritário do OECB e as estruturas cristalográficas das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs), da Proteína Cinase B (PKB/AKT) e do Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B);
- Avaliar o efeito do OECB sobre a modulação das MAPKs, da PKB/AKT e do NF- κ B em células SK-MEL-28;
- Investigar a toxicidade aguda do OECB em embriões e larvas de peixe-zebra;
- Determinar o efeito do OECB sobre a atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A obtenção e caracterização do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (OECB) foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em colaboração com o prof. Dr. Josean Fachine Tavares e o Dr. Yuri Manguiera do Nascimento. O OECB foi armazenado em frasco de cor âmbar, mantido sob refrigeração e vedação do frasco para evitar perda da amostra por volatilização.

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do OECB foi realizada no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) pertencente ao Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, e no Laboratório de Biofotônica do Centro de Biotecnologia da UFPB (CBiotec/UFPB).

O *docking* molecular foi realizado no Laboratório de Quimioinformática localizado no IPeFarM/UFPB em colaboração com a profa. Dra. Luciana Scotti, prof. Dr. Marcus Tullius Scotti e a Me. Natália Ferreira de Sousa.

A avaliação da toxicidade do OECB em peixe-zebra, foi realizada no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco) localizado no Departamento de Biologia Molecular (DBM) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB, em colaboração com o prof. Dr. Davi Felipe Farias.

4.2 Material

4.2.1 Substâncias e reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: azul de tripan (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), solução fosfato tamponada (PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), L-glutamina (Nutricell®, Campinas, São Paulo, Brasil), soro fetal bovino (SBF) (GIBCO®,

Grand Island, New York, EUA), solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Êxodo Científica®, Sumaré, São Paulo, Brasil), Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), doxorubicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), N-acetilcisteína (NAC) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), iodeto de propídeo (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA), anexina V-FITC (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA), RNase (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), cloreto de sódio (NaCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), cloreto de potássio (KCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), cloreto de cálcio (CaCl₂) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), sulfato de magnésio (MgSO₄) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), sulfato de sódio (Na₂SO₄) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), azul de metileno (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), hexano (Biograde®, Anápolis, Goiás, Brasil), fitohemaglutinina (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA). A ração para o peixe-zebra foi adquirida da Tetra® (Niedersachsen, Melle, Alemanha).

As drogas e as soluções reagentes foram preparadas imediatamente antes do uso.

4.2.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: centrífuga Rotina 380R (Hettich®, North Rhine-Westphalia, Alemanha), microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Olympus®, Tóquio, Japão), balança analítica eletrônica SHI-AUW220D (Shimadzu®, São Paulo, Brasil), cabina de fluxo de ar laminar vertical Aeolus V (Telstar®, São Paulo, Brasil), incubadora de CO₂ MCO-18ACL-PA (Panasonic®, Osaka, Japão), leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek®, Vermont, EUA), autoclave vertical linha CS-A (Primatec®, São Paulo, Brasil), estufa de secagem (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil), citômetro de fluxo FACSanto II (Becton Dickinson®, New Jersey, EUA), estereomicroscópio Televal 31 (Zeiss®, Baden-Württemberg, Alemanha), câmera fotográfica OverShot A2500 (Canon®, São Paulo, Brasil), microscópio confocal de varredura a laser (Leica®, Hesse, Alemanha), banho-

maria AQUAlíne (LAUDA®, São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Eletrólux®, Paraná, Brasil), agitador MS 3 digital (IKA®, Baden-Württemberg, Alemanha), aparelho tipo Clevenger M480 (Marconi®, São Paulo, Brasil) e espectrômetro de massas QP-2010 Ultra Quadrupole (Shimadzu®, Quioto, Japão).

4.2.3 Material botânico

Ramos e folhas (1 kg) de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist foram coletados no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brasil (S 7°08 '30.0" – O 34°50'46.7") em setembro de 2019. Uma exsiccata de *Conyza bonariensis* foi identificada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra e depositada no Herbário Lauro Pires Xavier-JPB da UFPB, sob o número JPB 26391 (número de registro SISGEN ABB39C8).

4.2.4 Linhagens celulares tumorais e não tumoral humanas

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens celulares: SK-MEL-28 (melanoma humano), HeLa (câncer cervical humano), HCT-116 (carcinoma de cólon humano), HL-60 (leucemia promielocítica humana), K562 (leucemia mielóide crônica) e HaCat (queratinócitos humanos imortalizados) (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas

Linhagens ^a	Tipo histológico	Origem	Meios de cultura ^b
SK-MEL-28	Melanoma	Humana	DMEM
HeLa	Carcinoma cervical	Humana	DMEM
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	RPMI
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	RPMI
K562	Leucemia mielóide crônica	Humana	RPMI
HaCaT	Queratinócito (não tumoral)	Humana	DMEM

^aSK-MEL-28: linhagem celular de melanoma humano; HeLa: linhagem celular de câncer cervical humano; HCT-116: linhagem celular de carcinoma de cólon humano; HL-60: linhagem celular de leucemia promielocítica humana; K562: linhagem celular leucêmica mielóide crônica; HaCat: linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados; ^bDMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute 1640*.

Fonte: Elaborado pelo autor

As células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil, e cultivadas nos meios *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (SK-MEL-28, HeLa e HaCaT) ou *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI) (HCT-116, HL-60 e

K562) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina-estreptomicina a 37 °C, 5% de CO₂.

As células foram manipuladas em fluxo laminar e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de CO₂ a 5%. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 h e, ao atingirem 80% de confluência, foi realizado procedimento para repique celular. Para isso, foram adicionados 2 mL de solução de tripsina, por 5 minutos, para o deslocamento da monocamada das células aderentes da parede do frasco (procedimento realizado para todas as linhagens, exceto para HL-60 e K562, cujo cultivo é em suspensão). Após esse período, foi adicionado meio suplementado com SBF, na mesma proporção de tripsina, para interromper sua ação. 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 usando o corante azul de tripan e a concentração celular ajustada para 5 × 10⁴ células/mL.

4.2.5 Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas

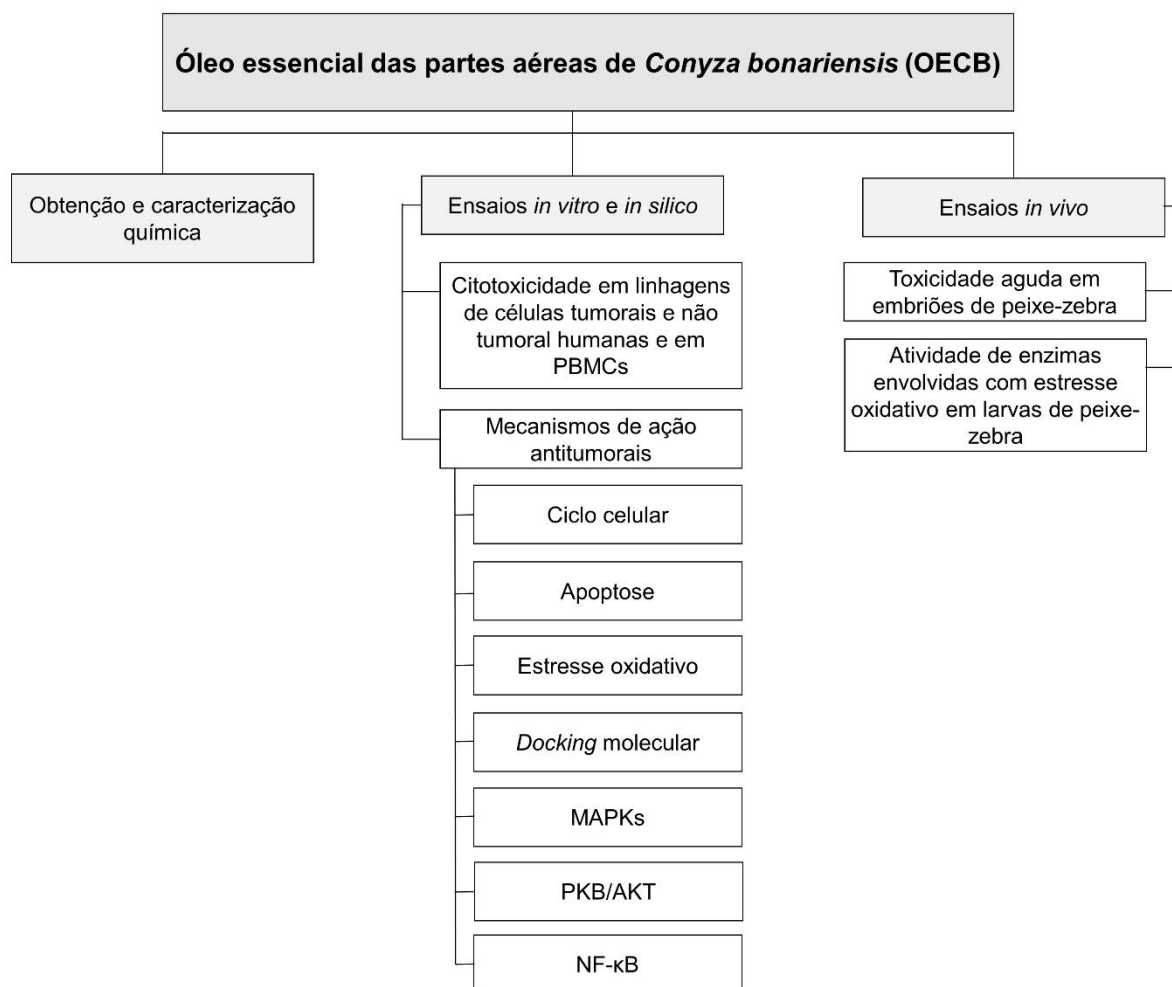
Para avaliar o efeito citotóxico de OEBC em células sanguíneas humanas, foi realizado o teste de MTT em células de sangue periférico (PBMCs) humanas. PBMCs, que incluem monócitos e linfócitos (Betsou *et al.*, 2019), podem ser obtidas por uma técnica de centrifugação de densidade de etapa única (Ahmad *et al.*, 2021) como descrito a seguir. As amostras de sangue foram coletadas de doadores saudáveis em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano foram isoladas após centrifugação (400 × *g*, 20 °C, por 30 min) das amostras de sangue em tubos contendo Histopaque®-1077. Posteriormente, a interface contendo as células mononucleares foi coletada e lavada com PBS (400 × *g*, 10 min, 20 °C). Antes do tratamento com OEBC ou DXR, as PBMC foram ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF, 1% penicilina-estreptomicina e 2% fitohemaglutinina, e cultivadas em placas de 96 poços (1×10⁶ células/mL) (100 µL por poço) a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h (Lisboa *et al.*, 2020).

O uso das células PBMC foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley da UFPB, com autorização documentada pelo protocolo número 3.715.689 (Anexo 1).

4.3 Métodos

Os ensaios realizados para obtenção, caracterização e investigação dos efeitos farmacológicos e toxicológicos do OECB estão esquematizados no fluxograma 1.

Fluxograma 1. Representação esquemática dos ensaios utilizados para caracterização química e estudo da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (OECB)



Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB)

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. As amostras foram trituradas e submetidas à destilação por 2 h (AGÊNCIA

NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019). Após a extração, o óleo essencial foi seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), obtendo-se (m/m) 1,3%.

A análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-EM) foi realizada utilizando um sistema Shimadzu QP-2010 Ultra Quadrupole MS, operando com energia de ionização de 70 eV. A coluna capilar RTX-5MS (30 m $\times$ 0,25 mm de diâmetro interno, espessura de filme de 0,25 μm) foi usada com hélio como gás de arraste a uma vazão de 3 mL/min com divisão de 1:100. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 220 °C e 280 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 40°C (isotérmica por 1 min) a 220°C, a uma taxa de 10°C/min (permanecendo isotérmica por 2 min a 220°C). Posteriormente, a temperatura foi aumentada de 220°C para 280°C a uma taxa de 20°C/min e mantida isotérmica por 5 min a 280°C. Os íons foram escaneados em modo *scan*, variando de m/z 50 a 500. A solução amostral foi preparada em hexano na diluição de 999:1 (v/v) e injetada 1 μL no cromatógrafo em vazão (*Split*) de 1:200.

Para calcular os índices de retenção dos compostos, nas mesmas condições de operação, foi injetada uma série de hidrocarbonetos (C_{10} a C_{40}) (Sigma-Aldrich®). O índice de retenção para cada composto foi determinado com base no índice de similaridade acima de 89% estimado pelas bibliotecas (Nist. 08 e Wiley 9) utilizadas para identificação dos compostos. O índice de retenção foi calculado utilizando o cromatograma obtido através da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

4.3.2 Avaliação da citotoxicidade e dos mecanismos de ação antitumorais do OECEB

Antes da realização de cada ensaio farmacológico ou toxicológico, o OECEB (5 mg) foi diluído em 250 μL de DMSO (100%) para obtenção de uma solução estoque a 20.000 $\mu\text{g/mL}$. A partir da solução estoque foram preparadas diluições para a obtenção das diferentes concentrações do OECEB e posterior tratamento das células ou exposição do óleo aos embriões do peixe-zebra. A quantidade de DMSO por poço não ultrapassou a concentração de 0,5%.

4.3.2.1 Avaliação da citotoxicidade do OECB em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do Índice de Seletividade (IS)

A citotoxicidade do OECB foi investigada em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas, empregando-se o ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O MTT é um sal amarelo permeável às membranas celulares. Em células viáveis, é convertido a cristais roxos insolúveis de formazan que podem ser medidos espectrofotometricamente, sendo o valor da densidade óptica proporcional ao número de células viáveis (Duarte *et al.*, 2022).

Neste ensaio, as linhagens de células humanas SK-MEL-28 (melanoma), HeLa (câncer cervical), HCT-116 (câncer colorretal), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), K562 (leucemia mielóide crônica) e HaCaT (queratinócitos) foram cultivadas em meio DMEM ou RPMI suplementado com 10% de SBF, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3×10^5 células/mL (SK-MEL-28, HeLa e HCT-116) ou 5×10^5 células/mL (HL-60 e K562) (100 µL por poço). Após 24 h, foram adicionados 100 µL da solução de OECB (2,34-200 µg/mL) ou doxorrubicina (DXR) (0,31-10 µM) dissolvidos em DMSO (0,5%) (para as linhagens em suspensão, HL-60 e K562, o tratamento foi realizado logo após o plaqueamento das células). Após incubação por 24, 48 ou 72 h, as placas foram centrifugadas ($500 \times g$, 24 °C, 5 min) e 110 µL do sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h (37 °C, 5% de CO₂). O formazan depositado foi dissolvido com SDS (100 µL) (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em $\lambda = 570$ nm e usado para calcular a CI₅₀ (concentração inibitória média). Para cada linhagem celular, foram realizados três experimentos em triplicata.

O Índice de Seletividade (IS) foi determinado de acordo com a fórmula abaixo:

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

4.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade do OECB em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas

Antes do tratamento com o OECB ou DXR, as PBMCs foram coletas e cultivadas por 24 h como descrito no item 4.2.5. Decorrido esse tempo de incubação, as células foram expostas a 100 μ L de OECB (0,15-20 μ g/mL) ou DXR (0,15-5 μ M), dissolvidos em DMSO (0,5%), e incubadas por 72 h (37 °C; 5% de CO₂). Após esse período, as placas foram centrifugadas (500 $\times$ g, 24 °C, 5 min), 110 μ L do sobrenadante foi descartado e 10 μ L da solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h (37 °C, 5% de CO₂). O formazan depositado foi dissolvido com SDS (100 μ L) *overnight* (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em λ = 570 nm. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.2.3 Investigação dos mecanismos de ação antimelanoma *in vitro* do OECB

Para melhor caracterizar o efeito antitumoral do OECB, foram realizados ensaios de investigação dos possíveis mecanismos de ação antitumorais deste óleo na linhagem de melanoma humano SK-MEL-28.

4.3.2.3.1 Avaliação do efeito do OECB sobre a progressão do ciclo celular

Para avaliar o efeito do OECB sobre a progressão do ciclo celular, células SK-MEL-28 tiveram o DNA marcado com iodeto de propídeo (IP) e foram analisadas por citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência emitida pelo IP ligado ao DNA permite a quantificação de DNA nas células em cada fase do ciclo celular (Jayat; Ratinaud, 1993).

Para isso, as células SK-MEL-28 foram plaqueadas (2 $\times$ 10⁵ células/mL) em placas de 24 poços e incubadas com o OECB nas concentrações de 20 ou 40 μ g/mL (correspondentes a CI₅₀ e o dobro, respectivamente) ou DXR (4 μ M, correspondente a CI₅₀), dissolvidos em DMSO a 0,2%, por 48 h. Após este tempo de incubação, as células foram coletadas e centrifugadas (500 $\times$ g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS, fixadas cuidadosamente com etanol 70% previamente gelado, em agitador, e congeladas (-20 °C) até a análise. No momento da análise, as células foram

recuperadas por centrifugação ($400 \times g$, 10 min, 4 °C), lavadas em PBS e incubadas com RNase (0,1 mg/mL) e IP (0,05 mg/mL), no escuro (25 °C, 30 minutos). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Foi determinado o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular, bem como células subdiploides (sub-G1). Os dados foram obtidos com o *software* DIVA 6.0. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata (Sousa *et al.*, 2023).

4.3.2.3.2 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo OECB

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

Para a avaliação do tipo de morte induzida pelo OECB em células SK-MEL-28, foi realizado o ensaio de marcação com anexina V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e IP. Neste ensaio, as células SK-MEL-28 foram plaqueadas (2×10^5 células/mL) em placas de 24 poços e incubadas com o OECB (20 ou 40 $\mu\text{g/mL}$, correspondentes a CI_{50} e o dobro, respectivamente) ou DXR (4 μM , correspondente a CI_{50}), dissolvidos em DMSO a 0,2%, por 48 h. Após este tempo, as células foram coletadas e centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em tampão de ligação. Em seguida, as células foram marcadas com anexina V-FITC e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, no escuro. Decorrido este tempo de incubação, as células foram lavadas com o tampão de ligação, centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em tampão de ligação e marcadas com IP (20 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos com o *software* DIVA 6.0. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata (Sousa *et al.*, 2023).

4.3.2.3.2.2 Análise morfológica de células SK-MEL-28 por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo

Neste ensaio, foi realizada a análise morfológica de células SK-MEL-28 após tratamento com o OECB. As células foram coradas com laranja de acridina (LA) e IP. LA é um corante metacromático, permeável às membranas celulares, que possui afinidade por ácidos nucleicos (Gao *et al.*, 2020). Células viáveis são coradas em

verde, por ligação do LA ao RNA citoplasmático e nuclear (Bankó *et al.*, 2021). Para isto, as células SK-MEL-28 foram plaqueadas (2×10^5 células/mL) em placas de 24 poços e incubadas com o OEGB (20 ou 40 $\mu\text{g/mL}$, correspondentes a CI_{50} e o dobro, respectivamente) ou DXR (4 μM , correspondente a CI_{50}), dissolvidos em DMSO a 0,2%, por 48 h. Após este período de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS e coradas com LA (1 mg/mL) e solução de IP (10 $\mu\text{g/mL}$). As células coradas foram observadas sob um microscópio confocal de varredura a laser (Sousa *et al.*, 2023). Os critérios estabelecidos foram: a) células viáveis eram aquelas que possuíam núcleo verde claro e estrutura intacta; b) células apoptóticas precoces (iniciais), possuíam núcleo verde brilhante, mostrando cromatina em condensação; c) células apoptóticas tardias, mostrando áreas alaranjadas densas (coradas em verde e vermelho) de condensação da cromatina e formação de bolsas apoptóticas (*blebs*) da membrana; d) e células necróticas ou mortas, coradas apenas em vermelho (Robbins, Marcus, 1963; Renviosé *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2019). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.3.2.3.3 Avaliação do efeito do OEGB sobre o estado redox celular

4.3.2.3.3.1 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) utilizando o 2'7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA)

Espécies reativas de oxigênio (ROS) foram quantificadas pelo método de oxidação do reagente diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Hasui; Hirabayashi; Kobayashi, 1989). O DCFH-DA é uma sonda apolar e não fluorescente, que atravessa livremente as membranas celulares. As esterases intracelulares clivam o DCFH-DA em DCFH, que é oxidado por ROS a DCF, uma molécula altamente fluorescente. Portanto, o número de células fluorescentes é proporcional à quantidade de ROS intracelular (Jávega *et al.*, 2023). Para isso, células SK-MEL-28 foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^5 células/mL). Após 24 h, as células foram expostas ao OEGB (20 ou 40 $\mu\text{g/mL}$, correspondentes a CI_{50} e o dobro, respectivamente), DXR (4 μM , correspondente a CI_{50}), dissolvidos em DMSO a 0,2%, ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (500 μM) na presença do DCFH-DA (10 μM), e incubadas por 30 min, 1 h ou 3 h. Após esses tempos, as células foram tripsinizadas, lavadas e ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem

de células fluorescentes foi obtida a partir de 10.000 eventos/amostra adquiridos em fluorescência de 530 nm e comprimento de excitação de 485 nm. Os dados foram obtidos com o *software* DIVA 6.0. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.3.2.3.3.2 Avaliação da citotoxicidade do OEGB na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Para avaliar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito citotóxico do OEGB, as células SK-MEL-28 foram pré-tratadas com N-acetilcisteína (NAC), uma molécula antioxidante que atua neutralizando ROS, bem como servindo de precursora para a síntese de glutatona (Marco; Foti; Corsico, 2022). Para isto, as células SK-MEL-28 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3×10^5 células/mL. Após 24 h, as células foram incubadas na presença ou ausência da NAC (5 μ M) por mais 3 h. Decorrido este período, as células foram tratadas com 20 ou 40 μ g/mL do OEGB (correspondentes a CI_{50} e o dobro, respectivamente) ou 4 μ M de DXR (correspondente a CI_{50}) dissolvidos em DMSO a 0,5%. Após incubação por 72 h, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h. O formazan depositado foi dissolvido com SDS *overnight* (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em $\lambda = 570$ nm e usadas para determinar a viabilidade celular (%). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.2.3.4 Docking molecular

Para os ensaios *in silico* foi utilizado o *software* Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) (molexus.io/molegro-virtual-docker). Os encaixes moleculares foram realizados com as enzimas, que já apresentaram em sua estrutura o ligante cocrystalizado, ERK1 (ID do *Protein Data Bank* (PDB): 5LCJ) e JNK1 (ID do PDB: 2G01). Também foram utilizadas estruturas da p38 α MAPK (ID do PDB: 1R39), da PKB/AKT (ID do PDB: 1GZN) e do NF- κ B (p50/p65) (ID do PDB: 1VKX) que, pela ausência dos seus ligantes no PDB, buscaram-se as coordenadas do sítio catalítico na literatura (Barančík *et al.*, 2001; Gorlick *et al.*, 2012; Homme *et al.*, 2019; Paw *et al.*, 2021).

As moléculas testadas (éster (Z)-2-lacnofilum – EZ, DXR, ligantes do PDB e os ligantes encontrados na literatura) foram desenhadas usando o *software* Marvin Sketch v. 19.18 (chemaxon.com/marvin). Em seguida, os compostos desenhados foram padronizados usando o *software* Standardizer v. 21.2.0 ChemAxon (chemaxon.com/standardizer) no qual foi realizada a adição de átomos de hidrogênio, padronização do anel aromático, remoção de sais e conversão da estrutura para 3D e, após esta etapa, os compostos foram submetidos ao *docking* molecular. Todas as moléculas de água foram retiradas da estrutura cristalina. Em seguida, foi criado um *template* entre a enzima e o ligante cocrystalizado, a fim de demarcar o sítio ativo da macromolécula. Posteriormente, as moléculas foram adicionadas e a previsão de acoplamento foi realizada.

Antes da simulação do *docking* foi realizado o *redocking*, que corresponde ao desvio médio quadrado (RMSD), calculado a partir das posturas, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for menor que 2,0 Å.

4.3.2.3.5 Avaliação do efeito do OEBC sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)

4.3.2.3.5.1 Marcação de células SK-MEL-28 com anticorpos anti-MAPKs e análise por citometria de fluxo

Para investigar o efeito do OEBC na modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs) em células SK-MEL-28, realizou-se o plaqueamento destas células (2×10^5 células/mL) em placas de 24 poços. Após 24 h, as células foram incubadas com o OEBC (20 ou 40 µg/mL, correspondentes a CI_{50} e o dobro, respectivamente) ou DXR (4 µM, correspondente a CI_{50}), por 48 h. Após este tempo, as células foram coletadas, centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos) e fixadas por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas e permeabilizadas. Após este procedimento, as células foram ressuspensas e marcadas com anticorpos anti-ERK1/2, anti-JNK1/2 e anti-p38 MAPK, seguindo as recomendações do fabricante. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos (25 °C, no escuro), as células foram lavadas e centrifugadas ($300 \times g$, 4°C, 5 minutos) e o sobrenadante removido. Em seguida, as células foram novamente ressuspensas e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos

com o *software* DIVA 6.0. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.3.2.3.5.2 Avaliação da citotoxicidade do OEGB na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)

Para avaliar o envolvimento das vias das MAPKs na citotoxicidade do OEGB, as células SK-MEL-28 foram pré-tratadas com inibidores de ERK1/2 (U0126), de JNK (SP600125) ou de p38 MAPK (PD 169316). Para isto, as células SK-MEL-28 foram semeadas em placas de 96 poços (3×10^5 células/mL). Após 24 h, as células foram incubadas por mais 3 h na presença ou ausência de 40 μ M de U0126, 20 μ M de SP600125 ou 20 μ M de PD 169316. Decorrido este período, as células foram expostas ao OEGB (20 ou 40 μ g/mL, correspondentes a CI_{50} e o dobro, respectivamente) ou a doxorubicina (DXR) (4 μ M, correspondente a CI_{50}), dissolvidos em DMSO a 0,5%. Após 72 h de incubação, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h. O formazan depositado foi dissolvido com SDS *overnight* (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em $\lambda = 570$ nm e usado para determinar a viabilidade celular (%). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.2.3.6 Marcação de células SK-MEL-28 com anticorpos anti-PKB/AKT ou anti-NF- κ B/p65 e análise por citometria de fluxo

Para investigar o efeito do OEGB na modulação destas vias de sinalização em células SK-MEL-28, realizou-se o plaqueamento destas células (2×10^5 células/mL) em placas de 24 poços. Após 24 h, as células foram incubadas com o OEGB (20 ou 40 μ g/mL, correspondentes a CI_{50} e o dobro, respectivamente) ou DXR (4 μ M, correspondente a CI_{50}), dissolvidos em DMSO a 0,2%, por 48 h. Após este tempo, as células foram coletadas, centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos) e fixadas por 30 min a 4° C. Em seguida, as células foram permeabilizadas (30 minutos, no gelo). Decorrido esse tempo, as células foram lavadas, ressuspensas e marcadas com anticorpos anti-NF- κ B/p65 ou anti-PKB/AKT, seguindo as recomendações do fabricante. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos (25 °C, no escuro), as células foram lavadas, centrifugadas ($300 \times g$, 4°C, 5 minutos) e o sobrenadante removido. Em seguida, as células foram ressuspensas e a leitura foi realizada em

citômetro de fluxo, adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos com o *software* DIVA 6.0. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.3.3 Embriotoxicidade do OEGB em modelo de peixe-zebra

A toxicidade do OEGB foi investigada em embriões e larvas de peixe-zebra a partir do ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET), para determinação da toxicidade aguda, e avaliação da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra.

4.3.3.1 Investigação da toxicidade aguda do OEGB em embriões de peixe-zebra

O teste FET foi conduzido de forma independente com OEGB de acordo com a diretriz número 236 da OECD (OECD, 2013), com pequenas modificações. Embriões de peixe-zebra com até 3 horas pós-fertilização (hpf) foram expostos a cinco concentrações crescentes (0,5, 0,75, 1,0, 1,25 e 1,5 µg/mL) de OEGB. Para cada concentração testada foi preparada uma placa de 96 poços contendo 20 ovos fertilizados (1 embrião por poço) expostos à amostra teste e 4 embriões expostos apenas ao meio E3 (controles internos). Duas placas adicionais contendo embriões expostos ao meio E3 (controle negativo) e DMSO a 0,1% (controle de solvente) também foram testadas. A exposição foi realizada por 96 h, e os embriões foram analisados diariamente quanto aos *endpoints* de letalidade: coagulação do ovo; falta de formação de somitos; falta de desprendimento do broto caudal do saco vitelino e falta de batimentos cardíacos. Na presença de qualquer um desses parâmetros, o embrião/larva foi considerado morto.

O número de mortes foi usado para calcular a taxa de sobrevivência (% de sobrevivência = número de organismos vivos/total × 100). Além disso, efeitos não letais (malformação do olho, malformação do otólito, malformação da boca, malformação da coluna, pigmentação do corpo, atraso na eclosão, edema do saco vitelino, deformação do saco vitelino, edema pericárdico, edema da cabeça, coagulação sanguínea e tamanho reduzido) também foram registrados a cada 24 h. As exposições foram em condições estáticas (sem renovação da amostra de teste ou controles negativos e solventes). As observações foram feitas em estereomicroscópio

(aumento de 50×) e fotografadas. Após 96 h, as larvas sobreviventes foram eutanasiadas com eugenol e devidamente descartadas.

O número de mortes e efeitos não letais prevalentes (presença em pelo menos três concentrações) foram usados para calcular a LC_{50} (concentração letal mediana) e EC_{50} (concentração efetiva mediana) por meio de análise *probit* (Finney, 1971). Esses números também foram usados para determinar o NOAEL (maior concentração na qual não se observam efeitos adversos) e o LOAEL (menor concentração na qual se observam efeitos adversos).

4.3.3.2 Avaliação da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra após exposição ao OEGB

O teste FET foi repetido para OEGB nas mesmas condições descritas no item 4.3.3.1, mas neste momento os embriões foram expostos independentemente a três concentrações subletais de OEGB (0,12, 0,25 e 0,50 $\mu\text{g/mL}$) (Martins *et al.*, 2021). Após 96 h de exposição, as larvas foram rapidamente congeladas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4.

Posteriormente, as larvas foram maceradas com solução gelada de NaCl 0,9% 1:9 (p/v). Os homogenatos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 10 min a 4 °C, e os sobrenadantes resultantes foram usados para medição do conteúdo de proteína solúvel e atividade enzimática. As atividades das enzimas lactato desidrogenase (LDH), glutathione transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) foram medidas de acordo com Domingues *et al.* (2010). Os testes foram realizados em quadruplicata para cada enzima.

Os experimentos realizados com peixe-zebra neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), com autorização documentada pelo protocolo número 5391250222 (Anexo 2).

4.3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, EUA).

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). A análise estatística dos dados foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

As concentrações inibitórias médias (CI_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos por análise de regressão não-linear. Para o ensaio de embriotoxicidade, os valores médios de concentração letal (LC_{50}) e os valores médios de concentração de efeito (CE_{50}) foram calculados por análise de regressão probit.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização química do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB)

A análise da composição química do OECB permitiu a identificação de 96,95% de seus componentes (Apêndices 1 e 2), sendo o composto majoritário o éster (Z)-2-lacnofilum (57,24%). As demais moléculas corresponderam a monoterpenos e sesquiterpenos (39,71%) (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação e quantificação dos metabólitos secundários presentes no óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB)

Composto	Área (%)	T _r ^a (min)	IR ^b Kovats (calculado)	IR ^b Kovats (literatura)
α-tujeno	0,03	6,320	928,792	925,0
(-)-α-pineno	0,66	6,458	937,300	937,0
Sabineno	0,74	7,131	978,792	972,0
β-pineno	1,70	7,209	983,600	976,0
Mirceno	0,51	7,376	993,896	993,0
p-cimeno	0,08	7,990	1032,198	1024,0
Limoneno	14,26	8,062	1036,699	1038,0
(E)-β-ocimeno	0,04	8,160	1042,826	1047,0
(Z)-β-ocimeno	1,32	8,333	1053,642	1036,0
Terpinen-4-ol	0,11	10,500	1189,122	1177,0
(E,E)-2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol	0,16	10,873	1214,039	1209,2
Timol	0,24	12,134	1302,998	1297,0
Carvacrol	0,61	12,282	1302,114	1300,0
(E)-cariofileno	4,19	14,046	1442,840	1433,0
(E)-α-bergamoteno	0,64	14,144	1450,658	1434,0
(E)-β-farneseno	0,75	14,316	1464,380	1446,0
(+)-β-funebreno	0,20	14,388	1470,124	1415,0
α-humuleno	0,41	14,495	1478,660	1459,0
1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil benzeno	0,38	14,730	1497,407	1484,0
Germacreno-D	0,78	14,835	1505,784	1519,0
Éster (Z)-2-lacnofilum	57,24	15,105	1527,323	1512,0
β-sesquifelandreno	7,04	15,265	1540,088	1525,0
(E)-nerolidol	0,68	15,678	1573,036	1565,0
Germacreno-B	0,34	15,827	1584,922	1566,0
Espatuleno	1,67	16,065	1604,363	1605,0
Óxido de cariofileno	1,22	16,158	1612,645	1613,0
Isopatuleno	0,41	16,758	1666,073	1666,0
Cadin-4-en-10-ol	0,33	16,937	1682,012	1673,0
Neofitadieno	0,21	18,698	1839,421	1849,0
Total identificado	96,95%			

^aT_r: Tempo de retenção; ^bIR: Índice de retenção;

Fonte: Elaborado pelo autor

5.2 Ensaios farmacológicos e toxicológicos com o OEGB

5.2.1 Citotoxicidade do OEGB em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas

No ensaio do MTT, o OEGB induziu menor citotoxicidade na linhagem celular de leucemia promielocítica aguda (HL-60), CI_{50} de $32,20 \pm 1,10 \mu\text{g/mL}$, enquanto a linhagem celular de melanoma humano (SK-MEL-28) mostrou-se a mais sensível ao tratamento (CI_{50} de $18,65 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$). Em relação à linhagem celular de queratinócitos humanos não tumorais (HaCaT), o OEGB apresentou CI_{50} de $56,49 \pm 1,03$, enquanto a doxorrubicina (DXR) apresentou CI_{50} de $0,28 \pm 0,001 \mu\text{M}$ para esta linhagem celular, após 72 h de tratamento (Tabela 3).

Então, a partir dos valores de CI_{50} obtidos, o Índice de Seletividade (IS) do OEGB e DXR foi determinado usando a linhagem de células de pele saudáveis HaCaT como modelo de célula não tumoral. O OEGB apresentou o maior IS para células SK-MEL-28 (3,03), conforme mostrado na Tabela 3. Diante desses resultados, a linhagem SK-MEL-28 foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

Tabela 3. Citotoxicidade do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OEGB) ou doxorrubicina (DXR) em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas após 72 h de tratamento

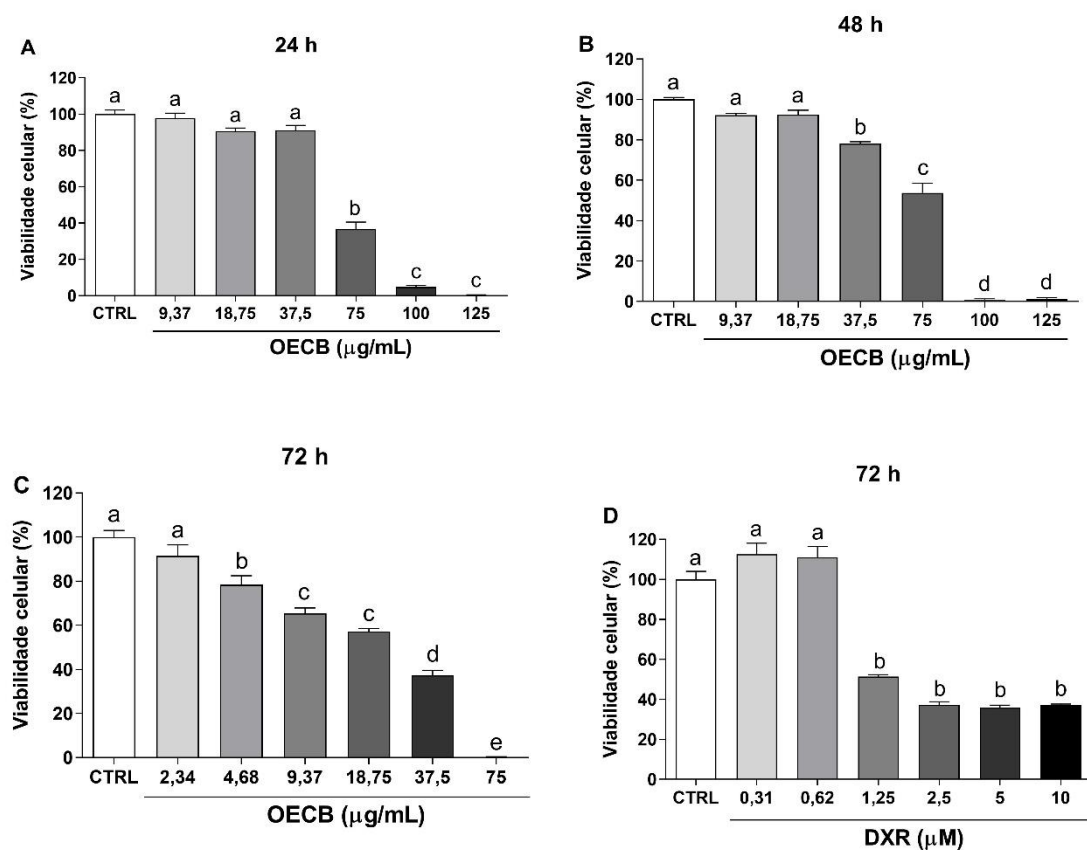
Linhagens celulares ^a	CI_{50} ^b		IS ^c	
	OEGB ($\mu\text{g/mL}$)	DXR (μM)	OEGB	DXR
SK-MEL-28	$18,65 \pm 1,16$	$3,55 \pm 1,67$	3,03	0,08
HeLa	$30,34 \pm 1,08$	$3,80 \pm 1,10$	1,86	0,07
HCT-116	$31,28 \pm 1,16$	$2,57 \pm 0,001$	1,81	0,11
HL-60	$32,20 \pm 1,10$	$0,22 \pm 0,001$	1,75	1,27
K562	$32,13 \pm 1,09$	$0,71 \pm 1,13$	1,76	0,39
HaCaT	$56,49 \pm 1,03$	$0,28 \pm 0,001$	-	-

^aSK-MEL-28: linhagem celular de melanoma humano; HeLa: linhagem celular de câncer cervical humano; HCT-116: linhagem celular de carcinoma de cólon humano; HL-60: linhagem celular de leucemia promielocítica humana; K562: linhagem celular leucêmica mielóide crônica; HaCaT: linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados; ^bConcentração inibitória média; ^cIS: Índice de seletividade (CI_{50} linhagem não tumoral/ CI_{50} linhagem tumoral); Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%

Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme observado na figura 12, o OEGB apresentou citotoxicidade significativa na linhagem SK-MEL-28 após 24, 48, e 72 h de tratamento (CI_{50} : $66,60 \pm 1,07 \mu\text{g/mL}$, $75,67 \pm 1,03 \mu\text{g/mL}$ e $18,65 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Em adição, a doxorrubicina, utilizada como droga padrão, mostrou valor de CI_{50} de $3,55 \pm 1,67 \mu\text{M}$, após 72 h de tratamento.

Figura 12. Citotoxicidade do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) ou doxorubicina (DXR) em linhagem de células de melanoma humano SK-MEL-28 após 24, 48 e 72 h de tratamento



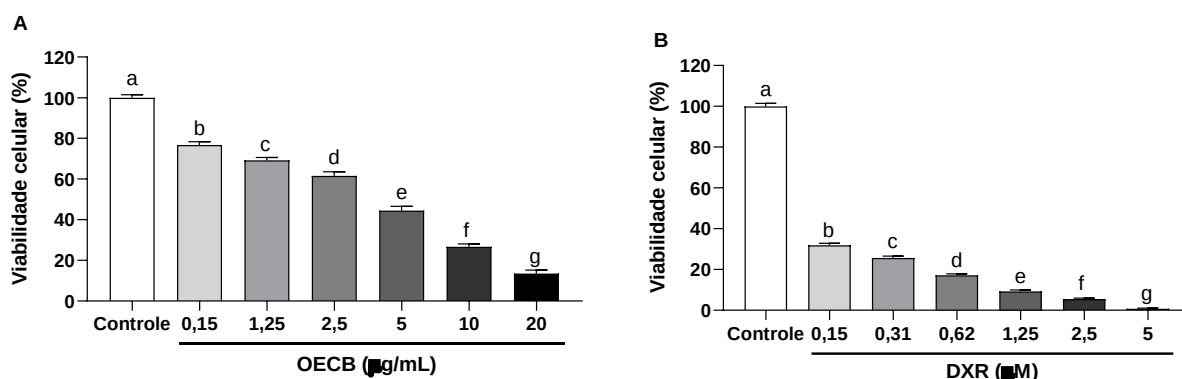
Viabilidade celular (%) após (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h de tratamento com OECB, ou após (D) 72 h de tratamento com DXR. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições. $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.2 Citotoxicidade do OECB em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas

A citotoxicidade do OECB também foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas. O OECB apresentou CI_{50} de $2,68 \pm 1,29$ (Figura 13A) e a DXR apresentou CI_{50} de $0,06 \pm 1,19$ μ M (Figura 13B), após 72 h de tratamento.

Figura 13. Citotoxicidade do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) ou doxorrubicina (DXR) em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas após 72 h de tratamento



Viabilidade celular (%) após 72 h de tratamento com **(A)** OECB ou **(B)** DXR. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições. $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor

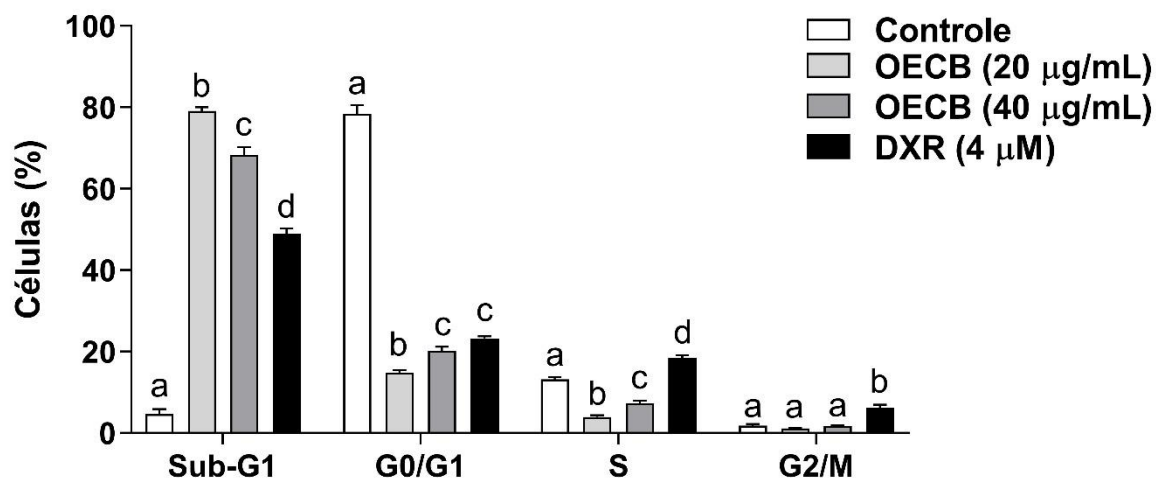
5.2.3 Mecanismos de ação antimelanoma *in vitro* do OECB

5.2.3.1 Efeito do OECB sobre a progressão do ciclo celular

O tratamento de 48 h com o OECB aumentou significativamente a população de células em sub-G1 (20 µg/mL: $79,09 \pm 0,98\%$; 40 µg/mL: $68,25 \pm 2,06\%$, $p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($4,51 \pm 1,31\%$). Essa alteração foi acompanhada de uma redução significativa do percentual de células nas fases G0/G1 (20 µg/mL: $14,85 \pm 0,61\%$; 40 µg/mL: $20,19 \pm 1,02\%$, $p < 0,05$ para ambos) e S (20 µg/mL: $3,97 \pm 0,44\%$; 40 µg/mL: $7,26 \pm 0,73\%$, $p < 0,05$ para ambos), comparado ao grupo controle (Fase G0/G1: $78,47 \pm 2,05\%$; Fase S: $13,18 \pm 0,54\%$) (Figura 14).

O tratamento com a DXR, induziu aumento significativo do percentual de células nas fases S ($18,57 \pm 0,59\%$, $p < 0,05$) e G2/M ($6,17 \pm 0,80\%$, $p < 0,05$), comparado ao grupo controle (G2/M: $1,80 \pm 0,42\%$). Em adição, foi observado aumento significativo da população de células em sub-G1 ($48,94 \pm 1,31\%$, $p < 0,05$), comparado ao grupo controle. Esses resultados foram acompanhados de redução significativa do percentual de células na fase G0/G1 ($23,26 \pm 0,50\%$, $p < 0,05$), comparado ao grupo controle (Figura 14).

Figura 14. Efeito do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) ou doxorrubicina (DXR) na distribuição de células de melanoma humano SK-MEL-28 nas diferentes fases do ciclo celular após 48 h de tratamento



Percentual de células em cada fase do ciclo celular e no pico sub-G1 após 48 h de tratamento com OECB (20 ou 40 µg/mL) ou DXR (µM). Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos experimentais de cada fase do ciclo celular ou do grupo sub-G1. $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor

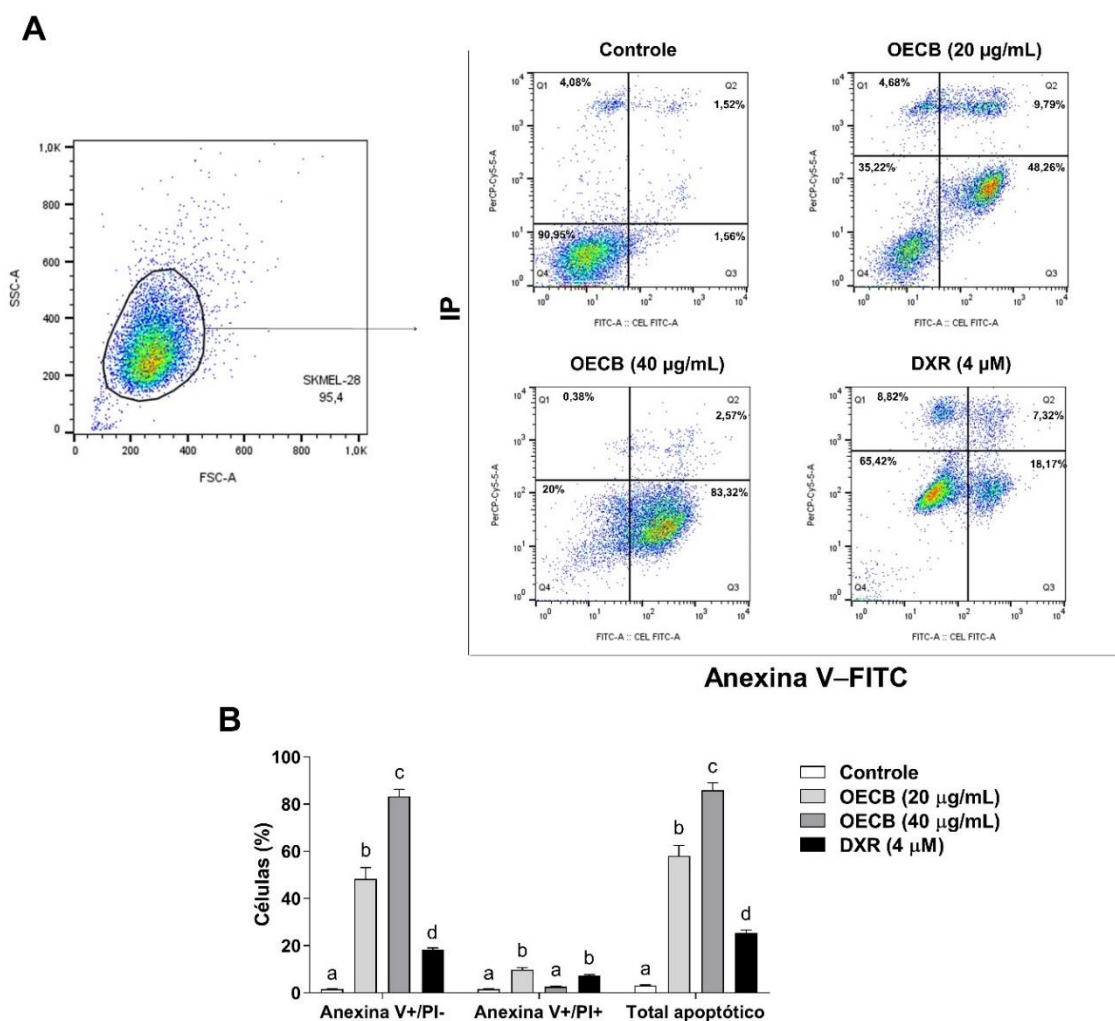
5.2.3.2 Morte celular induzida pelo OECB

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

A marcação com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP) e análise por citometria de fluxo permitiram observar que, após tratamento de 48 h, OECB induziu aumento significativo do percentual de células em apoptose inicial (anexina V-FITC+/IP-) (20 µg/mL: $48,26 \pm 4,83\%$; 40 µg/mL: $83,32 \pm 2,97\%$, $p < 0,05$ para ambos) e apoptose tardia/necrose, ou seja, células duplamente marcadas (anexina V-FITC+/IP+), na concentração de 20 µg/mL ($9,79 \pm 0,94\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($1,56 \pm 0,16\%$ e $1,53 \pm 0,15\%$, respectivamente). Estes resultados permitem observar que o tratamento com o OECB aumentou significativamente o percentual de células apoptóticas (apoptose total) nas concentrações utilizadas (20 µg/mL: $58,05 \pm 4,41\%$; 40 µg/mL: $85,89 \pm 3,17\%$, $p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($3,09 \pm 0,27\%$) (Figura 15).

A doxorubicina induziu aumento significativo do número de células em apoptose inicial ($18,17 \pm 0,84\%$, $p < 0,05$), apoptose tardia/necrose ($7,32 \pm 0,34\%$, $p < 0,05$) e total ($25,49 \pm 1,14\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

Figura 15. Efeito do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) ou doxorubicina (DXR) em células de melanoma humano SK-MEL-28 marcadas com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP) após 48 h de tratamento



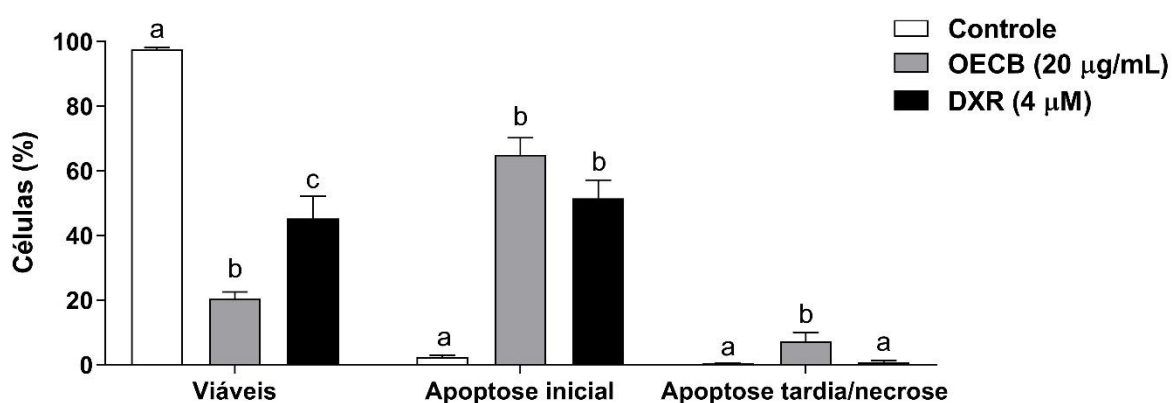
Efeito do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) (OECB) ou da doxorubicina (DXR) nas células de melanoma humano SK-MEL-28 marcadas com anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) e/ou iodeto de propídeo (IP) após 48 h de tratamento. **(A)** Dotplots representativos obtidos por meio da análise de citometria de fluxo. Os dotplots foram divididos em quatro quadrantes que representam diferentes populações celulares: células viáveis (anexina V-FITC-/IP-, quadrante inferior esquerdo), células em apoptose precoce (anexina V-FITC+/IP-, quadrante inferior direito), células em apoptose tardia/necrose (anexina V-FITC+/IP+, quadrante superior direito) e células mortas (anexina V-FITC-/IP+, quadrante superior esquerdo). Um total de 10.000 eventos/amostra foram adquiridos usando detectores de fluorescência vermelha (IP, 325-488 nm) e detectores de fluorescência verde (FITC, 493-525 nm). **(B)** Porcentagem de células marcadas com anexina V-FITC e/ou IP. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para cada condição. $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3.2.2 Morfologia das células SK-MEL-28 por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo

A figura 16 apresenta o percentual de células SK-MEL-28 marcadas com IP e/ou laranja de acridina (LA), após 48 h de tratamento com o OECB (20 µg/mL) ou DXR (4 µM). O tratamento com OECB induziu aumento significativo do percentual de células com características típicas de apoptose inicial ($64,96 \pm 5,28\%$, $p < 0,05$) e tardia/necrose ($12,65 \pm 5,85\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($2,40 \pm 0,55\%$; e $0,39 \pm 0,16\%$, respectivamente). Quanto ao tratamento com a DXR, observou-se aumento significativo do percentual de células em apoptose inicial ($51,56 \pm 5,59\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle.

Figura 16. Indução da apoptose pelo óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) ou doxorubicina (DXR) analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de melanoma humano SK-MEL-28 após 48 h de tratamento

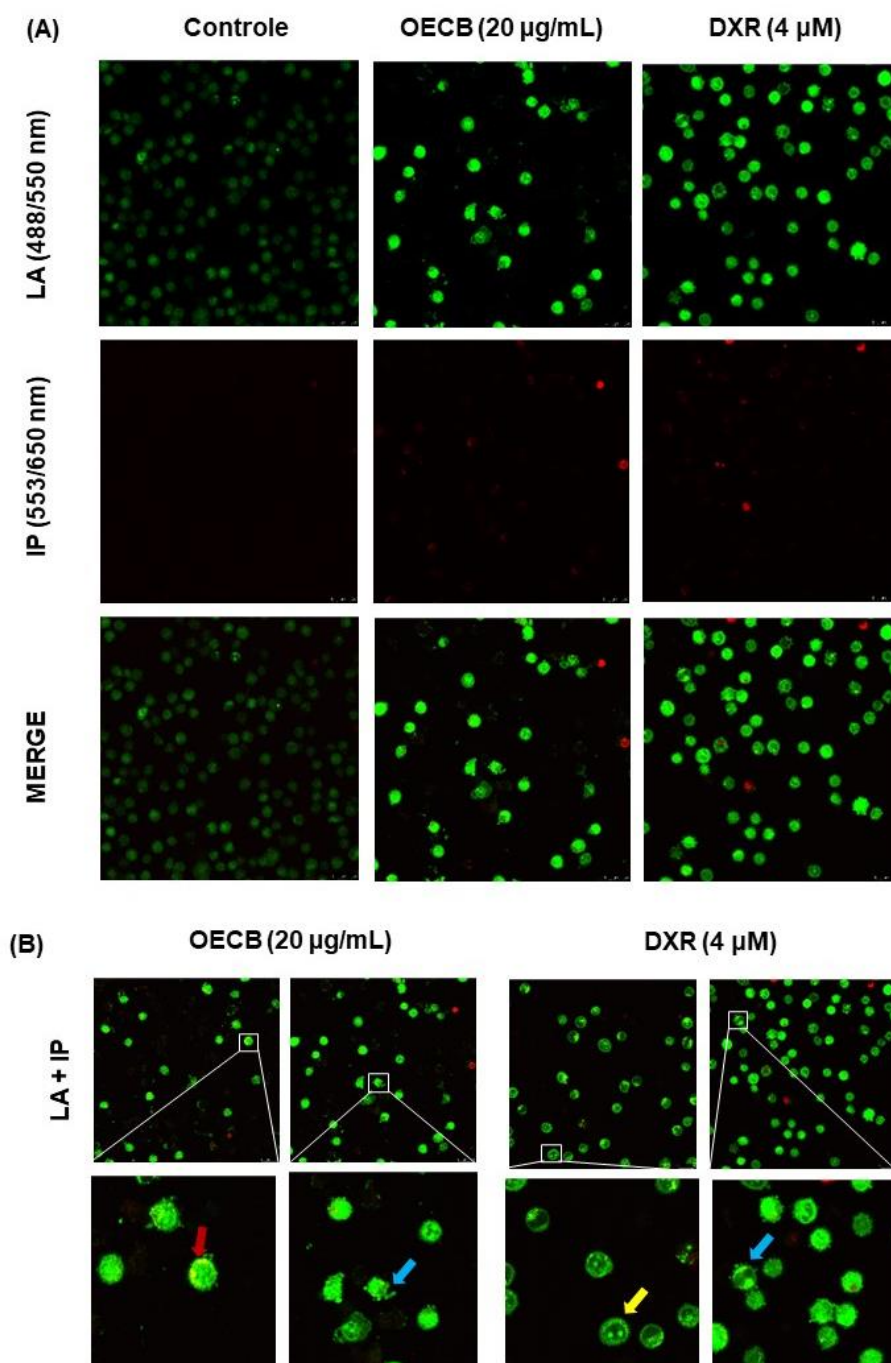


Percentual de células coradas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (IP). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. Letras diferentes denotam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

Fonte: Elaborado pelo autor

A figura 17 apresenta imagens representativas das células dos diferentes grupos experimentais.

Figura 17. Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) de células de melanoma humano SK-MEL-28 incubadas com o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) ou doxorubicina (DXR) por 48 h



Células SK-MEL-28 após 48 h de tratamento com OECB (20 µg/mL) ou DXR (4 µM), marcadas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (PI) e observadas por microscopia confocal a laser. Em **(A)**, as células viáveis apresentam núcleo verde claro e uma estrutura intacta. As células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde brilhante mostrando condensação da cromatina. As células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana enquanto as células necróticas apresentam núcleo vermelho. Em **(B)**, a seta amarela indica condensação da cromatina; seta azul indica *blebs* de membrana e seta vermelha indica fragmentação do DNA. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

Fonte: Elaborado pelo autor

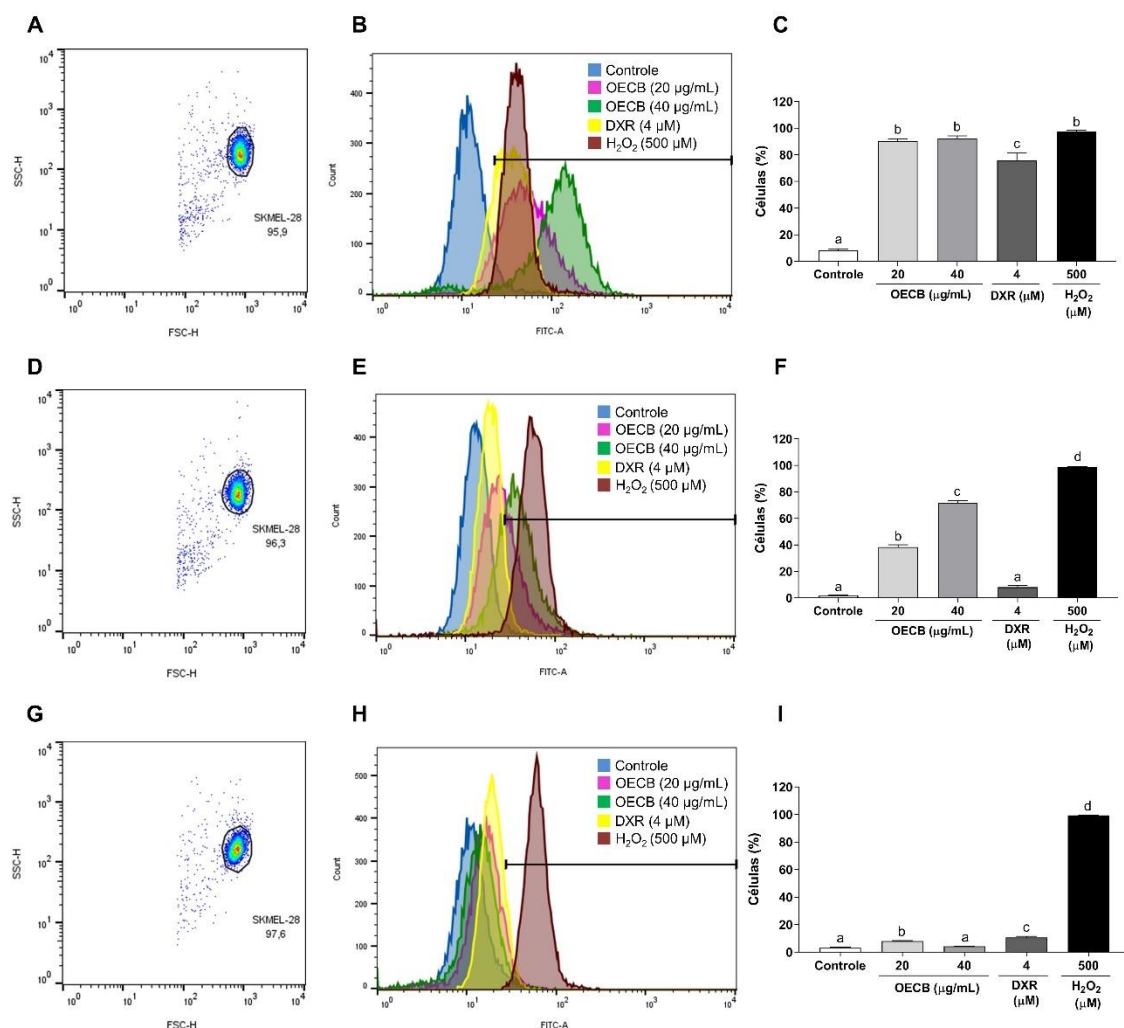
5.2.3.3 Efeito do OEGB sobre o estado redox celular

5.2.3.3.1 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) utilizando o 2'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA)

Neste ensaio, o tratamento com OEGB (20 e 40 µg/mL) induziu aumento significativo do percentual de células fluorescentes após 30 minutos (20 µg/mL: $90,32 \pm 1,64\%$; 40 µg/mL: $92,33 \pm 1,96\%$, $p < 0,05$ para ambos), 1 h (20 µg/mL: $38,36 \pm 1,82\%$; 40 µg/mL: $71,60 \pm 1,78\%$, $p < 0,05$ para ambos) e 3 h (20 µg/mL: $8,05 \pm 0,36\%$, $p < 0,05$) de tratamento, quando comparado ao grupo controle (30 minutos: $8,22 \pm 1,26\%$; 1 h: $2,18 \pm 0,16\%$; e 3 h: $3,15 \pm 0,63\%$) (Figura 18).

Ainda, como observado na figura 18, a DXR (4 µM), utilizada como droga padrão, induziu aumento significativo do percentual de células fluorescentes após 30 minutos ($75,64 \pm 6,02\%$, $p < 0,05$) e 3 h ($10,64 \pm 0,92\%$, $p < 0,05$), em comparação ao grupo controle. Como esperado, no grupo exposto ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 500 µM), observou-se aumento significativo, quando comparado ao grupo controle, do percentual de células fluorescentes em 30 minutos ($97,65 \pm 0,86\%$, $p < 0,05$), 1 h ($98,87 \pm 0,17\%$, $p < 0,05$) e 3 h de exposição ($99,45 \pm 0,23\%$, $p < 0,05$).

Figura 18. Percentual de células fluorescentes após incubação com o 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) e o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) ou doxorrubicina (DXR) em diferentes tempos de tratamento



Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em células SK-MEL-28 após 30 minutos, 1 h ou 3 h de incubação com *Conyza bonariensis* (20 e 40 µg/mL) ou DXR (4 µM) e 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFDA). (A), (D) e (G): a população de células SK-MEL-28 foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-Forward Scatter, eixo X) e granulosidade ou complexidade citoplasmática (SSC-Side Scatter, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. (B), (E) e (H): *overlay* dos histogramas representativos mostrando a fluorescência do 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (FITC, eixo X) e o número de células/eventos (eixo Y) nos diferentes grupos experimentais após seus respectivos tratamentos. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 500 µM) foi usado como controle positivo. (C), (F) e (I): representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes em duplicata, analisado por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor

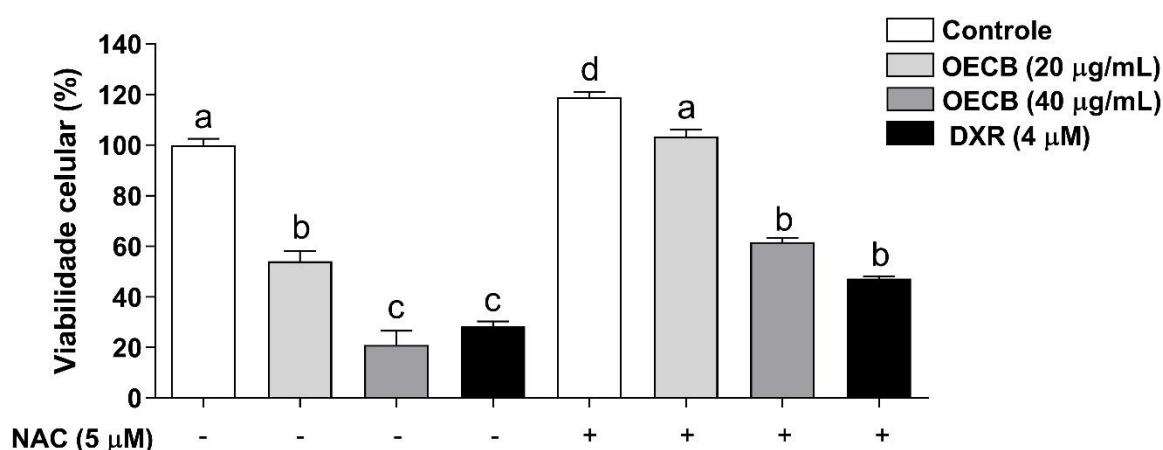
5.2.3.3.2 Citotoxicidade do OECB na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Após 72 h de tratamento com o OECB, na ausência de N-acetilcisteína (NAC), foi observada redução significativa da viabilidade celular (20 µg/mL na ausência de NAC: $54,06 \pm 3,96\%$; 40 µg/mL na ausência de NAC: $20,97 \pm 5,60\%$, $p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($100,00 \pm 2,47\%$) (Figura 19).

Como visto na figura 19, o pré-tratamento de 3 h com NAC (5 µM), preveniu significativamente o efeito citotóxico do OECB, quando comparado aos grupos tratados com o OECB na ausência de NAC, nas respectivas concentrações testadas (20 µg/mL na presença de NAC: $103,3 \pm 2,82\%$; 40 µg/mL na presença de NAC: $61,63 \pm 1,52\%$, $p < 0,05$ para ambos).

Ainda, para o grupo tratado com a DXR na ausência de NAC, foi observada redução significativa da viabilidade celular ($28,45 \pm 1,86\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Como esperado, o efeito citotóxico da DXR foi significativamente prevenido na presença do NAC ($47,23 \pm 0,81\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo tratado com DXR na ausência deste antioxidante (Figura 19).

Figura 19. Citotoxicidade do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) ou doxorrubicina (DXR) na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) após 72 h de tratamento



Viabilidade celular (%) após 72 h de tratamento com OECB ou DXR na presença ou ausência de NAC. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições. $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.3.4 Docking Molecular

A previsão de acoplamento molecular está apresentada na tabela 4, que exhibe as energias médias (MolDock score e Rerank score) associadas às interações intermoleculares obtidas na ligação entre o EZ, a DXR ou ligantes disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) ou em referências bibliográficas, e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK1), a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1), a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK), a Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B; p50/p65), juntamente com seus respectivos valores de probabilidade de afinidade (p).

Tabela 4. Valores de energia de ligação (kJ/mol) entre o éster (Z)-2-lacnofilum (EZ), a doxorubicina (DXR) ou outros ligantes e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK1), a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1), a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK), a Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B; p50/p65)

Alvo	Ligantes	MolDock score*	(p) [†] MolDock score	Rerank score*	(p) [†] Rerank score	(p) [†] Total
ERK1	EZ	-63,2634	0,5106	-52,153	0,7704558	0,6405279
	DXR	-110,085	0,8886	-67,6911	1	0,9443
	PDBL ^a	-123,881	1	-66,5335	0,9828988	0,9914494
JNK1	EZ	-70,0612	0,5941	-61,538	0,7443	0,6692
	DXR	-117,919	1	-82,6781	1	1
	PDBL ^b	-67,8571	0,5754	-57,9951	0,7014	0,6384
p38 α MAPK	EZ	-76,5248	0,739384	-62,4631	0,987851	0,863618
	DXR	-100,213	0,96826	-63,2313	1	0,98413
	CTL ^c	-103,498	1	-59,1131	0,934871	0,967435
PKB/AKT	EZ	-107,102	0,727012	-90,3473	0,806392	0,766702
	DXR	-142,547	0,967614	-112,039	1	0,983807
	CTL ^d	-147,318	1	-83,2668	0,743195	0,871597
NF- κ B (p50/p65)	EZ	-83,0295	0,720536	-69,7697	0,844223	0,782379
	DXR	-115,233	1	-82,6437	1	1
	CTL ^e	-100,634	0,873309	15,8197	0	0,436654

^aPDBL (Ligante do *Protein Data Bank*): [(1R,4Z)-ciclooct-4-en-1-il]-N-[4-[4-[[5-cloro-4-[[2-(propanoilamino)fenil]amino]pirimidin-2-il]amino]piridin-2-il]but-3-inil]carbonato; ^bPDBL (Ligante do *Protein Data Bank*): 6-cloro-9-hidroxi-1,3-dimetil-1,9-di-hidro-4H-pirazolo(3,4-b)quinolin-4-ona; ^cCTL (Ligante controle da p38 α MAPK): 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-imidazol; ^dCTL (Ligante controle da PKB/AKT): 8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f][1,6]naftiridina-3(2H)-ona; ^eCTL (Ligante controle do NF- κ B (p50/p65)): 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina.

*Valores de energia expressos em kJ/mol.

[†]Valor de probabilidade de afinidade.

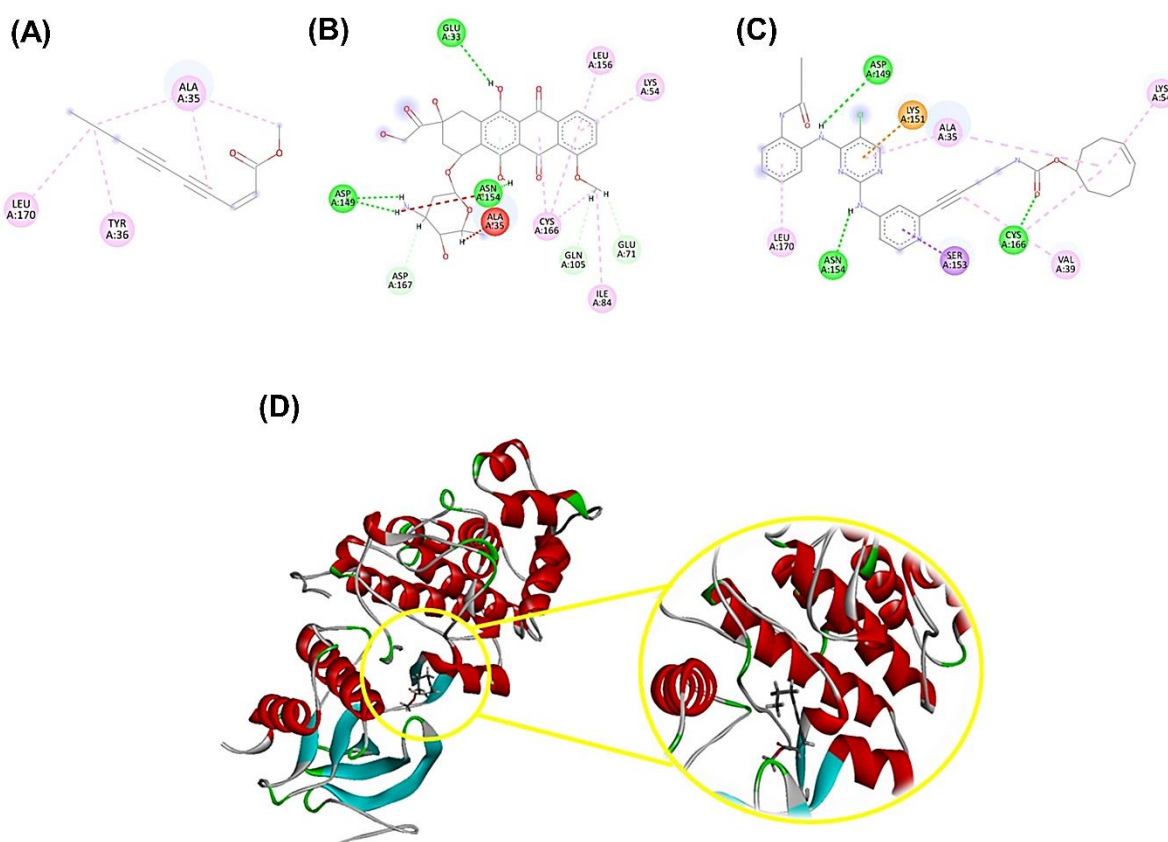
Fonte: Elaborador pelo autor

EZ apresentou energias de interação ligante-receptor negativas para os alvos moleculares, exibindo valores de probabilidade de afinidade acima de 0,60 com ERK1

($p=0,6405279$), JNK1 ($p=0,6692$), p38 α MAPK ($p=0,863618$), PKB/AKT ($p=0,766702$) e NF- κ B (p50/p65) ($p=0,8910$). As melhores orientações de encaixe para os ligantes com os alvos investigados podem ser observadas nas figuras 20 a 24, nas quais as interações das moléculas com os resíduos de aminoácidos das proteínas alvo estão representadas por diferentes cores, sendo: interações do tipo ligações de hidrogênio (linha tracejada em verde), interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa: π -alquil; roxo: π - σ ; azul: halogênios – Br, Cl e I) e interações estéricas (linhas tracejadas vermelhas: doador-doador; linhas tracejadas laranjas: π -ânion).

Na figura 20A, considerando o composto EZ, observa-se que a interação com a proteína ERK1 ocorre por meio de três interações hidrofóbicas com os resíduos alanina 35 (Ala35), leucina 170 (Leu170) e tirosina 36 (Tyr36) desta proteína. A DXR, interagiu por formação de interações hidrofóbicas com os resíduos Leu156, lisina 54 (Lys54), cisteína 166 (Cys166) e isoleucina 84 (Ile84). Ainda, na interação da DXR com a proteína ERK1 foram observadas ligações de hidrogênio nos resíduos ácido glutâmico 33 (Glu33), ácido aspártico 149 (Asp149), asparagina 154 (Asn154), Asp167, glutamina 105 (Gln105), Glu71, e uma interação estérica com o resíduo Ala35 (Figura 20B). Já o ligante do PDB apresenta interações hidrofóbicas com Leu170, Ala35, serina 153 (Ser153), valina 39 (Val39), Lys54 e uma interação estérica em Lys151 da proteína ERK1 (Figura 20C).

Figura 20. Interações moleculares entre o éster (Z)-2-lacnofilum, a doxorubicina ou o ligante do *Protein Data Bank* (PDB) e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK1)



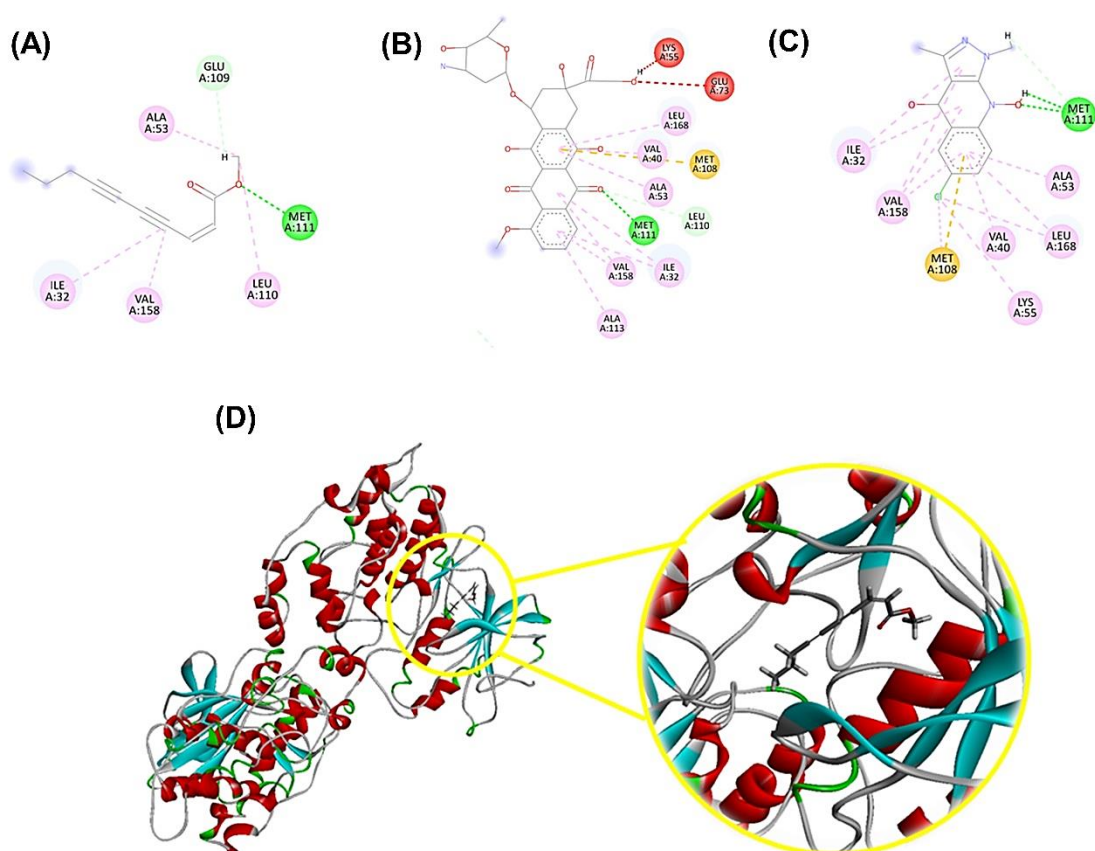
Interações moleculares em 2D entre (A) o éster (Z)-2-lacnofilum, (B) a doxorubicina e (C) o ligante do PDB, [(1~{R},4~{Z})-ciclooct-4-en-1-il]~{N}-[4-[4-[[5-cloranil-4-[[2-(propanoilamino)fenil]amino]pirimidin-2-il]amino]piridin-2-il]but-3-inil]carbamato, com os resíduos de aminoácidos da proteína ERK1 (ID do PDB 5LCJ), e em 3D (D) entre o éster (Z)-2-lacnofilum e o sítio ativo da ERK1.

Legenda: Em vermelho estão indicadas as interações estéricas, em azul e rosa as interações hidrofóbicas e em verde as interações de hidrogênio; Resíduos: Asp (ácido aspártico), Glu (ácido glutâmico), Lys (lisina), Ile (isoleucina), Thr (treonina), Met (metionina), Cys (cisteína), Ala (alanina), Leu (leucina), Gln (glutamina) Val (valina), Asn (asparagina), Ser (serina), Tyr (tirosina), Trp (triptofano), His (histidina) e Phe (fenilalanina).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação a proteína JNK1, foram observadas interações hidrofóbicas com o EZ em resíduos Ala53, Ile32, Val158, Leu110 e interações por ligações de hidrogênio em metionina 111 (Met111) e Glu109 (Figura 21A). Para a DXR também foram observadas interações hidrofóbicas (resíduos Leu168, Val40, Ala53, Val158, Ile32, Ala113) e três interações estéricas com os resíduos Lys55, Glu73 e Met108 (Figura 21B). O ligante do PDB apresentou interações hidrofóbicas em Ile32, Val158, Val40, Lys55, Leu168, Ala53 e ligações de hidrogênios em Met111 e Met108 (Figura 21C).

Figura 21. Interações moleculares entre o éster (Z)-2-lacnofilum, a doxorubicina ou o ligante *do Protein Data Bank* (PDB) e a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1)



Interações moleculares em 2D entre (A) o éster (Z)-2-lacnofilum, (B) a doxorubicina e (C) e o ligante do PDB, 6-cloro-9-hidroxi-1,3-dimetil-1,9-di-hidro-4h-pirazolo(3,4-b)quinolin-4-ona, com os resíduos de aminoácidos da proteína JNK1 (ID do PDB: 2G01), e em 3D (D) entre o éster (Z)-2-lacnofilum e o sítio ativo da JNK1.

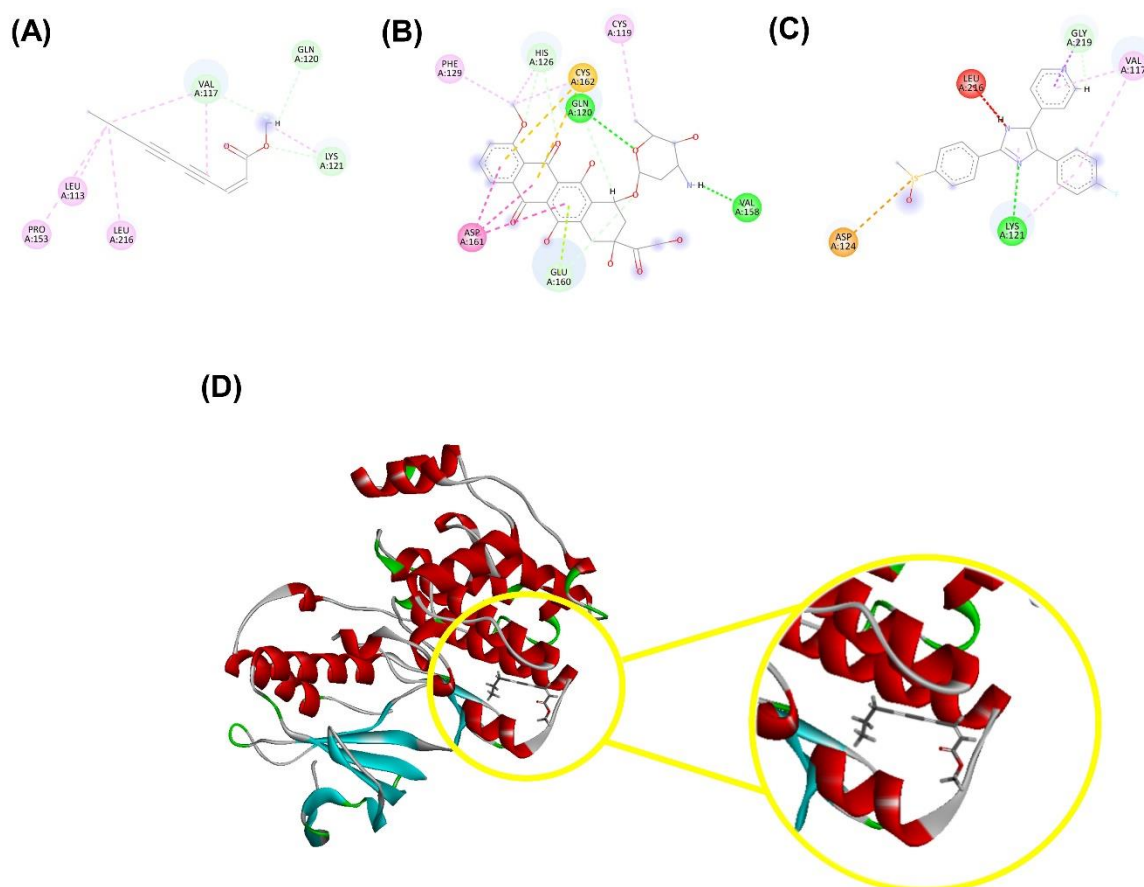
Legenda: Em vermelho estão indicadas as interações estéricas, em azul e rosa as interações hidrofóbicas e em verde as interações de hidrogênio; Resíduos: Asp (ácido aspártico), Glu (ácido glutâmico), Lys (lisina), Ile (isoleucina), Thr (treonina), Met (metionina), Cys (cisteína), Ala (alanina), Leu (leucina), Gln (glutamina) Val (valina), Asn (asparagina), Ser (serina), Tyr (tirosina), Trp (triptofano), His (histidina) e Phe (fenilalanina).

Fonte: Elaborado pelo autor.

As interações entre p38 α MAPK e o composto EZ foram do tipo ligações entre carbono e hidrogênio (Lys121, Val117 e Gln120) e interações hidrofóbicas (Leu113, Leu216 e prolina 153 - Pro153) (Figura 22A). Para a DXR foram observadas interações do tipo ligações de hidrogênio entre os resíduos Cys162, Val158 e Gln120, interações hidrofóbicas entre os resíduos fenilalanina 129 (Phe129), Cys119 e Asp161, e ligações entre carbono e hidrogênio e os resíduos histidina 126 (His126) e Glu160 (Figura 22B). Para o ligante 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-imidazol foram observadas interações do tipo estérica em Leu216, hidrofóbica em

Val117, ligações de hidrogênio em Lys121 e Asp124, e ligação entre carbono e hidrogênio com o resíduo Gly219 (Figura 22C).

Figura 22. Interações moleculares entre o éster (Z)-2-lacnofilum, a doxorubicina ou o ligante 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-imidazol e a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK)



Interações moleculares em 2D entre (A) o éster (Z)-2-lacnofilum, (B) a doxorubicina e (C) o ligante 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-imidazol, tirosina, e os resíduos de aminoácidos da proteína p38 α MAPK (ID do PDB: 1R39), e em 3D (D) entre o éster (Z)-2-lacnofilum e o sítio ativo da p38 α MAPK.

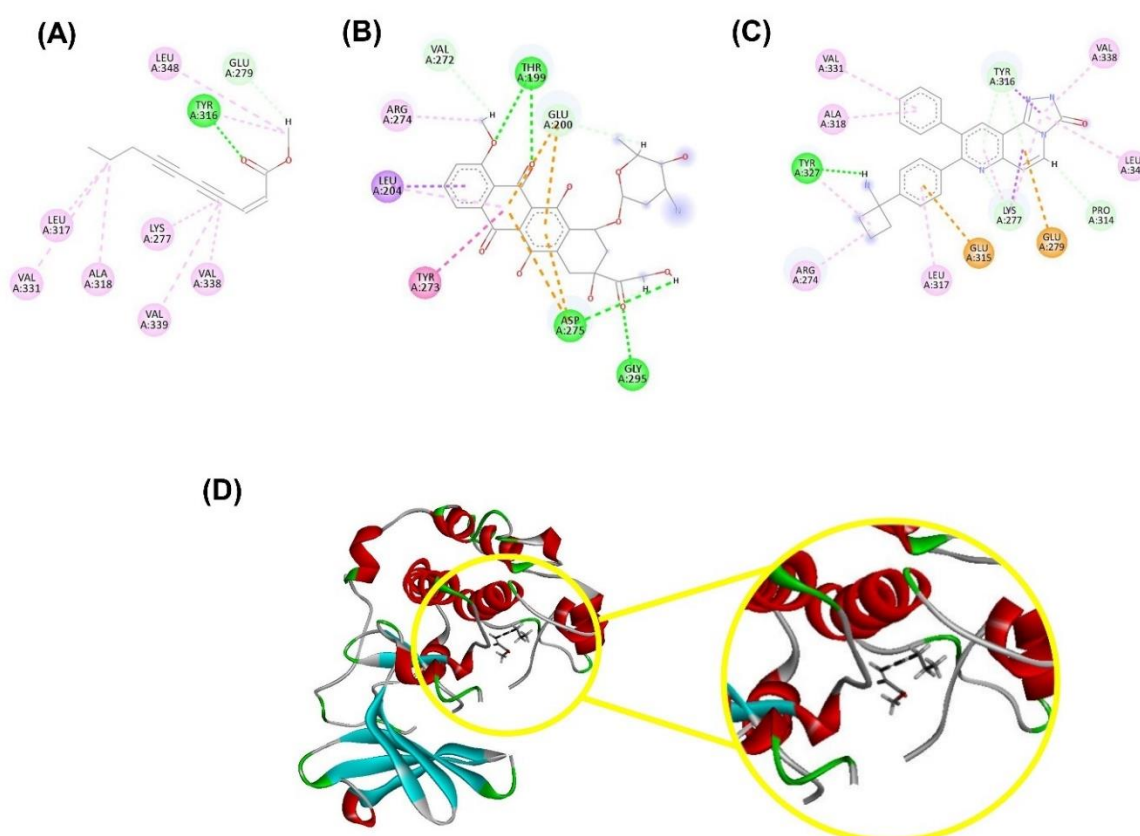
Legenda: Em vermelho estão indicadas as interações estéricas, em azul e rosa as interações hidrofóbicas e em verde as interações de hidrogênio; Resíduos: Asp (ácido aspártico), Glu (ácido glutâmico), Lys (lisina), Ile (isoleucina), Thr (treonina), Met (metionina), Cys (cisteína), Ala (alanina), Leu (leucina), Gln (glutamina) Val (valina), Asn (asparagina), Ser (serina), Tyr (tirosina), Trp (triptofano), His (histidina), Pro (prolina) e Phe (fenilalanina).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a proteína PKB/AKT, o composto EZ mostrou ligação de hidrogênio com Tyr316 e ligações hidrofóbicas com Leu348, Leu317, Val331, Ala318, Lys277, Val338, Val339 e Glu279 (Figura 23A). A DXR exibiu ligação de hidrogênio com Thr199, Asp275 e Gly295. Também foram observadas ligações hidrofóbicas com Glu200, Val272, Arg274, Leu204 e Tyr273 (Figura 23B). Para o ligante 8-[4-(1-

aminociclobutil)fenil]-9-fenil-2*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,6]naftiridina-3-ona foram observadas ligação de hidrogênio com Tyr327, Glu315, Glu279. Ligações hidrofóbicas também foram observadas em Val338, Leu348, Leu317, Arg274, Ala318, Val331, Pro314, Lys277 e Tyr316 (Figura 23C).

Figura 23. Interações moleculares entre o éster (*Z*)-2-lacnofilum, a doxorubicina ou o ligante 8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil-2*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,6]naftiridina-3-ona e a Proteína Cinase B (PKB/AKT)



Interações moleculares 2D entre (A) o éster (*Z*)-2-lacnofilum, (B) a doxorubicina e (C) o ligante 8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil-2*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,6]naftiridina-3-ona com os resíduos de aminoácidos da proteína PKB/AKT (ID do PDB: 1GZN), e em 3D (D) entre o éster (*Z*)-2-lacnofilum e a PKB/AKT.

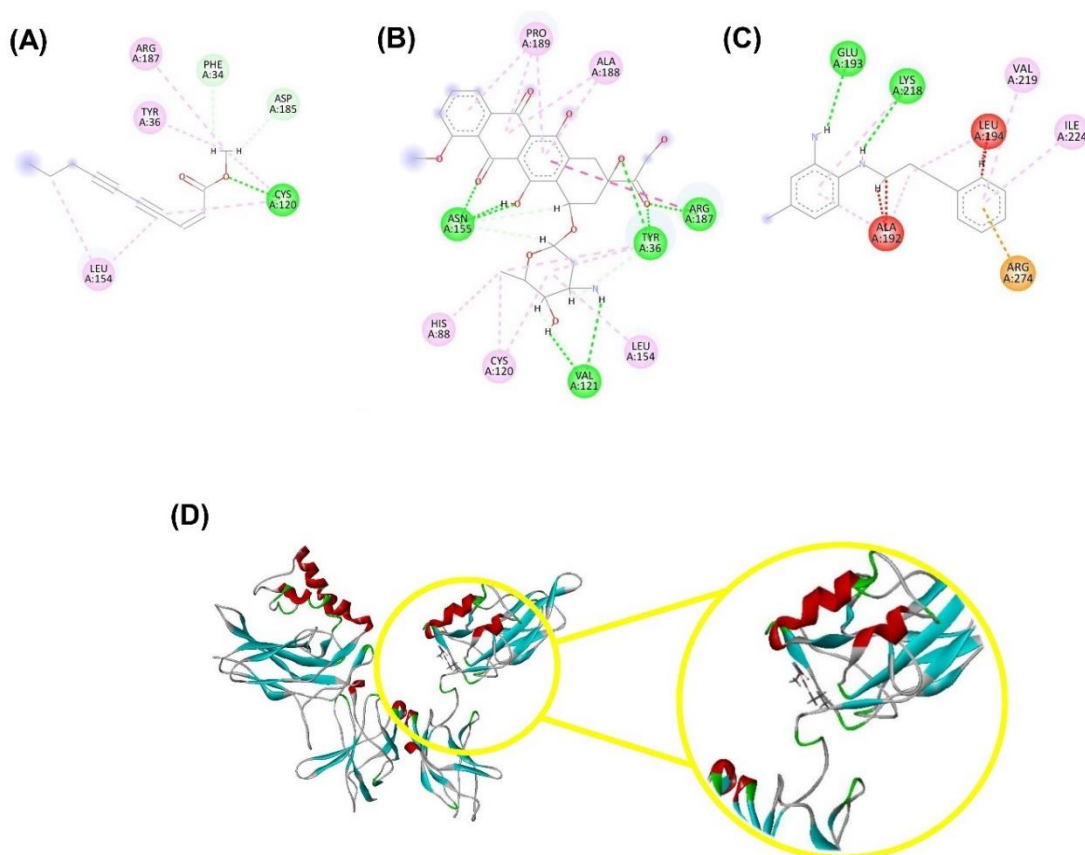
Legenda: Em vermelho estão indicadas as interações estéricas, em azul e rosa as interações hidrofóbicas e em verde as interações de hidrogênio; Resíduos: Asp (ácido aspártico), Glu (ácido glutâmico), Lys (lisina), Ile (isoleucina), Thr (treonina), Met (metionina), Cys (cisteína), Ala (alanina), Leu (leucina), Gln (glutamina) Val (valina), Asn (asparagina), Ser (serina), Tyr (tirosina), Trp (triptofano), His (histidina) e Phe (fenilalanina).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ligação de hidrogênio foi observada entre o EZ e a proteína NF- κ B no resíduo CYS120. Em adição, também foram observadas ligações hidrofóbicas com Arg187, Tyr36, Leu154, Phe34 e Asp185 (Figura 24A). A DXR mostrou ligações de hidrogênio com Arg187, Tyr36, Val121 e Asn155, além de ligações hidrofóbicas com Ala188,

Pro189, Leu154, Cys120 e His88 (Figura 24B). Para o ligante 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina foram observadas ligações de hidrogênio com Glu193, Lys218 e Arg274. Ligações hidrofóbicas também foram observadas com os resíduos Val219 e Ile224 e interações estéricas com Leu194 e Ala192 (Figura 24C).

Figura 24. Interações moleculares entre o éster (Z)-2-lacnofilum, a doxorubicina ou o ligante 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina e o Fator Nuclear κ B (NF- κ B; p50/p65)



Interações moleculares em 2D entre (A) o éster (Z)-2-lacnofilum, (B) a doxorubicina e (C) o ligante 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina, e os resíduos de aminoácidos da proteína NK- κ B (p50/p65) (ID do PDB: 1VKX), e em 3D (D) entre o éster (Z)-2-lacnofilum e o sítio ativo do NF- κ B (p50/p65).

Legenda: Em vermelho estão indicadas as interações estéricas, em azul e rosa as interações hidrofóbicas e em verde as interações de hidrogênio; Resíduos: Asp (ácido aspártico), Glu (ácido glutâmico), Lys (lisina), Ile (isoleucina), Thr (treonina), Met (metionina), Cys (cisteína), Ala (alanina), Leu (leucina), Gln (glutamina) Val (valina), Asn (asparagina), Ser (serina), Tyr (tirosina), Trp (triptofano), His (histidina) e Phe (fenilalanina).

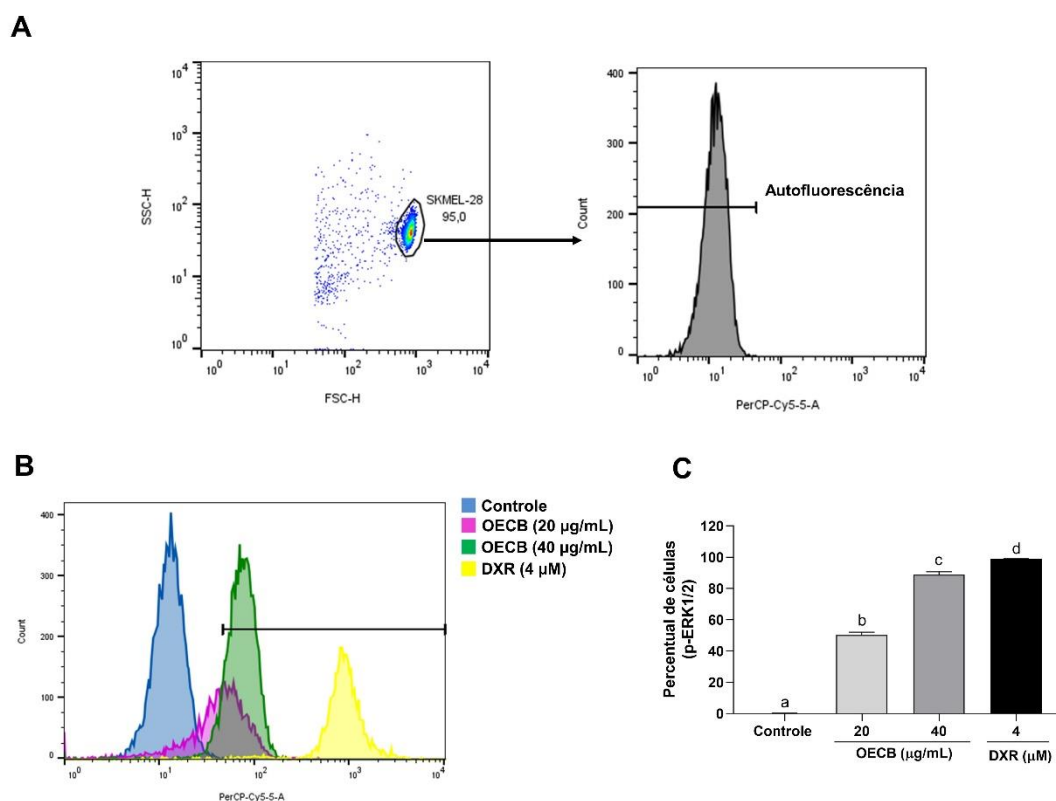
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3.5 Efeito do OECB sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)

5.2.3.5.1 Marcação com anticorpos anti-MAPKs e análise por citometria de fluxo

A marcação com anticorpos anti-ERK1/2 e posterior análise por citometria de fluxo demonstrou o aumento significativo do percentual de células marcadas após 48 h de tratamento com o OEGB (20 µg/mL: $50,20 \pm 1,83\%$; 40 µg/mL: $88,75 \pm 1,87\%$, $p < 0,05$ para ambos), em comparação ao grupo controle ($0,19 \pm 0,03\%$). Também, o tratamento com a DXR induziu aumento significativo no percentual de células marcadas com os anticorpos anti-ERK1/2 ($98,87 \pm 0,16\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (Figura 25).

Figura 25. Modulação das Proteínas Cinases Reguladas por Sinal Extracelular 1 e 2 (ERK1/2) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OEGB, 20 ou 40 µg/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 µM)

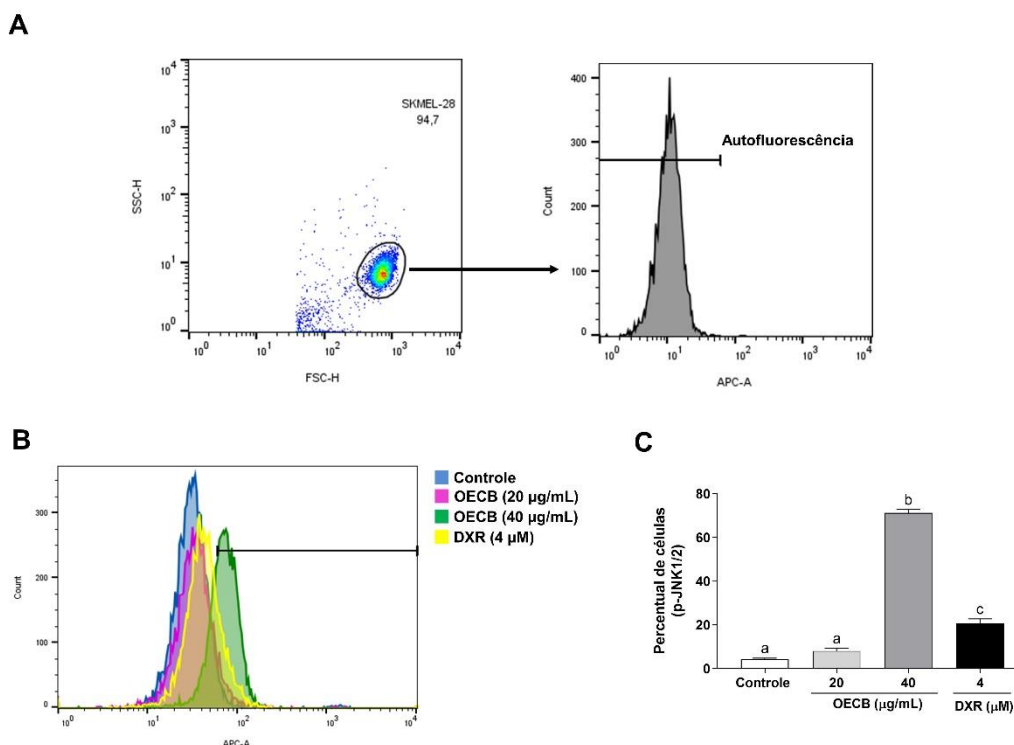


Efeito do tratamento com o OEGB sobre a atividade das proteínas ERK1/2. **(A)** A população celular foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-Forward Scatter, eixo X) e granulosidade citoplasmática (SSC-Side Scatter, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. Para a análise dos histogramas de fluorescência de ERK1/2 (PerCP-Cy5.5), inicialmente foi delimitada uma região correspondente à autofluorescência das células não marcadas com o anticorpo. Somente a porcentagem de células fluorescentes após essa região demarcada foi considerada positiva. **(B)** Sobreposição de histogramas representativos mostrando a fluorescência de ERK1/2 (PerCP-Cy5.5, eixo X) e o número de células/eventos (eixo Y) em diferentes grupos experimentais. **(C)** Representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM), analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quanto à marcação das células com o anticorpo anti-JNK, foi observado aumento significativo do percentual de células marcadas após tratamento com o OECB (40 µg/mL: $71,25 \pm 1,60\%$, $p < 0,05$) ou DXR (16,19 ± 1,33%, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($4,32 \pm 0,45\%$) (Figura 26).

Figura 26. Modulação das Proteínas Cinases N-terminal c-Jun 1 e 2 (JNK1/2) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB, 20 ou 40 µg/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 µM)

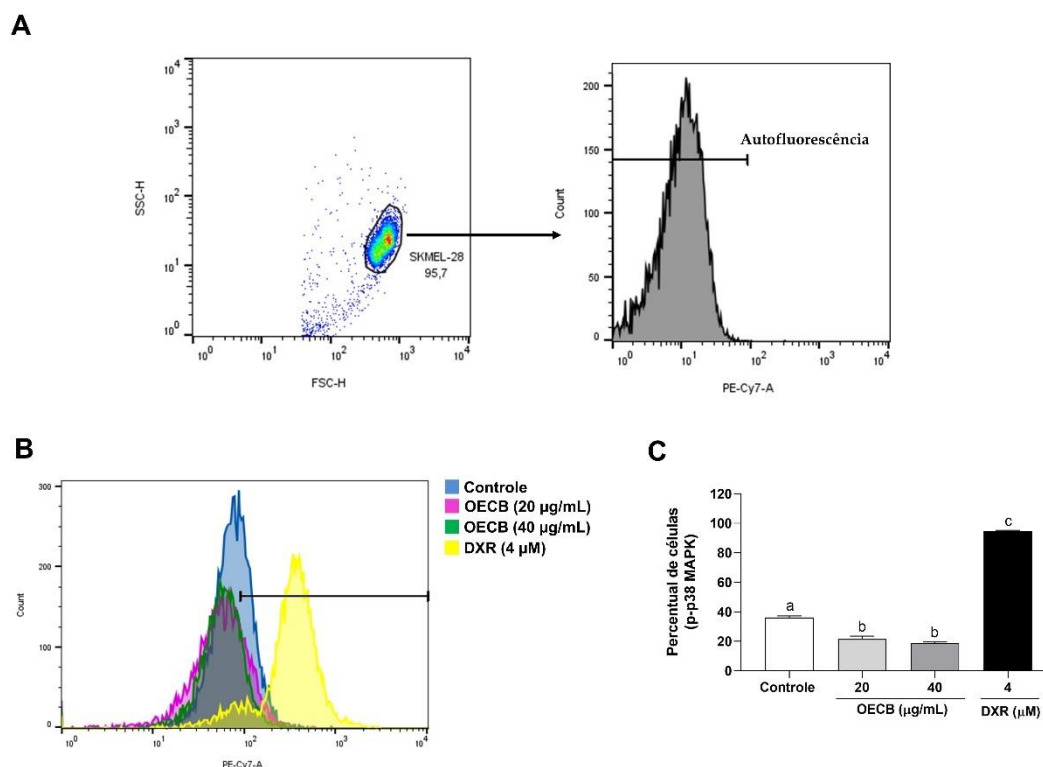


Efeito do tratamento com o OECB sobre a atividade das proteínas JNK1/2. **(A)** A população celular foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-Forward Scatter, eixo X) e granulosidade citoplasmática (SSC-Side Scatter, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. Para a análise dos histogramas de fluorescência de JNK1/2 (APC), inicialmente foi delimitada uma região correspondente à autofluorescência das células não marcadas com o anticorpo. Somente a porcentagem de células fluorescentes após essa região demarcada foi considerada positiva. **(B)** Sobreposição de histogramas representativos mostrando a fluorescência de JNK1/2 (APC, eixo X) e o número de células/eventos (eixo Y) em diferentes grupos experimentais. **(C)** Representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata e expressos como média ± erro padrão da média (SEM), analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A marcação das células com o anticorpo anti-p38 MAPK mostrou que o tratamento com o OECB reduziu significativamente o percentual de células marcadas (20 µg/mL: $21,67 \pm 1,92\%$; 40 µg/mL: $18,82 \pm 0,72\%$, $p < 0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($36,30 \pm 1,00\%$) (Figura 27).

Figura 27. Modulação da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 (p38 MAPK) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB, 20 ou 40 µg/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 µM)



Efeito do tratamento com o OECB sobre a atividade da proteína p38 MAPK. **(A)** A população celular foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-Forward Scatter, eixo X) e granulosidade citoplasmática (SSC-Side Scatter, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. Para a análise dos histogramas de fluorescência de p38 MAPK (PE-Cy7), inicialmente foi delimitada uma região correspondente à autofluorescência das células não marcadas com o anticorpo. Somente a porcentagem de células fluorescentes após essa região demarcada foi considerada positiva. **(B)** Sobreposição de histogramas representativos mostrando a fluorescência de p38 MAPK (PE-Cy7, eixo X) e o número de células/eventos (eixo Y) em diferentes grupos experimentais. **(C)** Representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM), analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

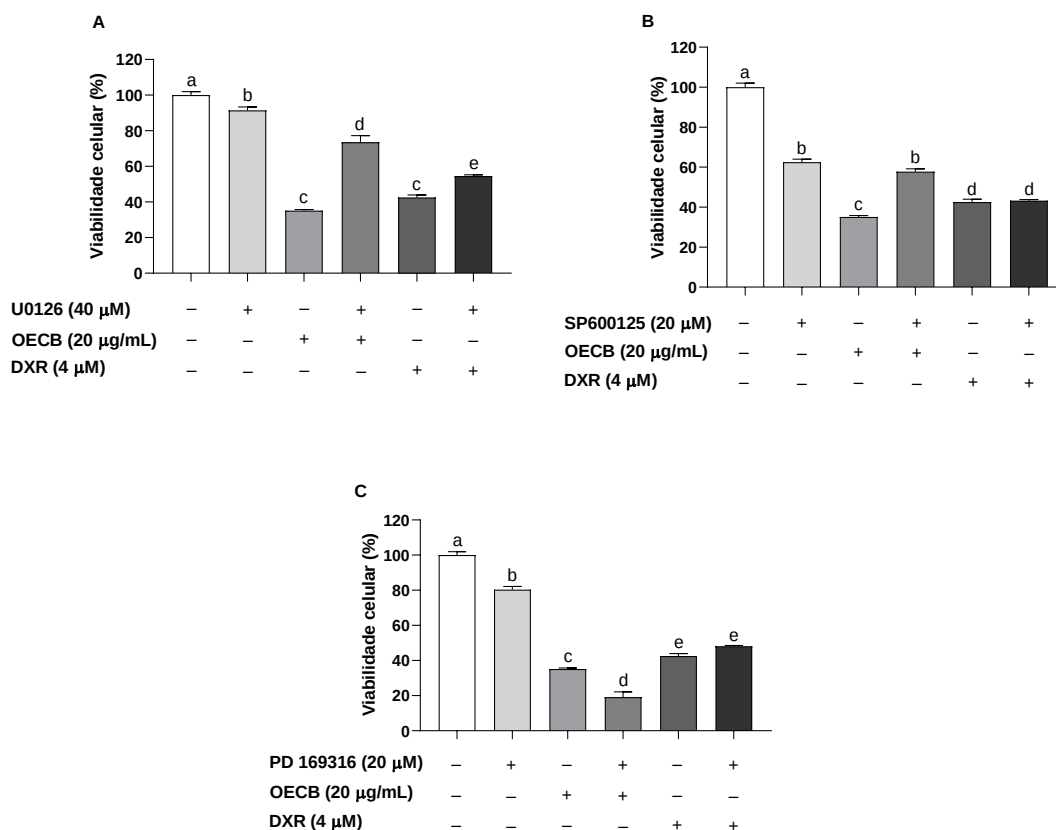
5.2.3.5.2 Citotoxicidade do OECB na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)

Quanto à avaliação do efeito do OECB na presença ou ausência de inibidores das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs), obteve-se a figura 28. Observa-se que após 72 h de tratamento com o OECB, na ausência dos inibidores de MAPKs, verificou-se redução significativa da viabilidade celular ($35,13 \pm 0,65\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($100,00 \pm 1,97\%$).

O uso do inibidor de ERK1/2 (U0126) preveniu significativamente o efeito citotóxico do OEGB elevando a viabilidade celular para $73,54 \pm 3,68\%$ ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo tratado com o OEGB na ausência desse inibidor (Figura 28A). O inibidor de JNK (SP600125) também preveniu significativamente o efeito citotóxico do OEGB (viabilidade celular: $57,74 \pm 1,41\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo tratado com esse óleo essencial na ausência do inibidor de JNK (Figura 28B). Já o pré-tratamento com o inibidor de p38 MAPK (PD 169316), conforme observado na figura 28C, aumentou significativamente o efeito citotóxico do OEGB (viabilidade celular: $19,19 \pm 2,94\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo tratado com o OEGB na ausência do inibidor PD 169316.

Ao observar o efeito citotóxico da droga padrão, a DXR, o uso do inibidor de ERK1/2 preveniu significativamente a citotoxicidade desta droga ($54,54 \pm 0,73\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo tratado com a DXR na ausência desse inibidor ($42,59 \pm 1,37\%$) (Figura 28A). Não foram observadas diferenças significativas na citotoxicidade da DXR na ausência ou presença dos inibidores de JNK (SP600125) e p38 MAPK (PD 169316) (Figuras 28B e 28C).

Figura 28. Efeito do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) ou doxorrubicina (DXR), na presença ou ausência de inibidores de ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) ou p38 MAPK (PD 169316), sobre a viabilidade de células da linhagem de melanoma humano SK-MEL-28 após 72 h de tratamento



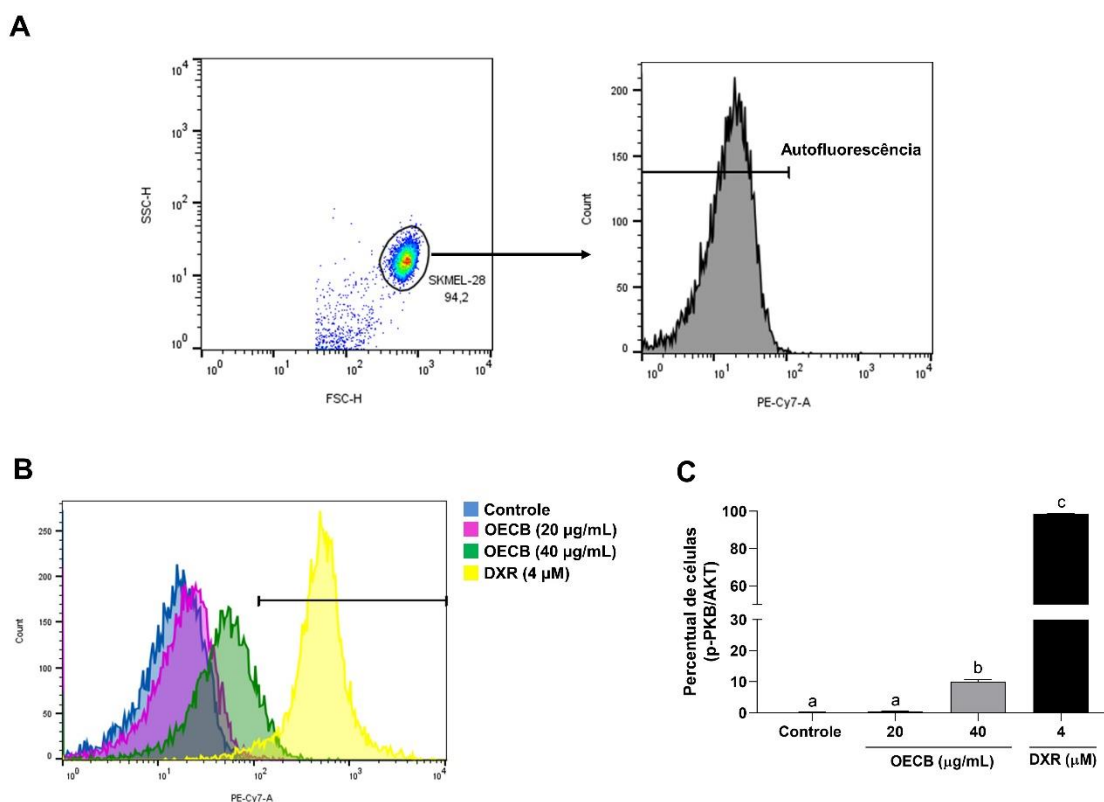
Viabilidade celular (%) após 72 h de tratamento com OECB (20 μ g/mL) ou DXR (4 μ M) na presença ou ausência dos inibidores de **(A)** ERK1/2 (U-0126), **(B)** JNK (SP600125); ou **(C)** p38 MAPK (PD 169316). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições. $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.3.6 Marcação de células SK-MEL-28 com anticorpos anti-PKB/AKT e análise por citometria de fluxo

Como observado na figura 29, houve aumento significativo do percentual de células marcadas com os anticorpos anti-PKB/AKT após 48 h de tratamento com o OECB na concentração de 40 μ g/mL ($10,03 \pm 0,71\%$, $p < 0,05$) ou DXR (4 μ M) ($98,73 \pm 0,12\%$, $p < 0,05$), em comparação ao grupo controle ($0,50 \pm 0,01\%$).

Figura 29. Modulação da Proteína Cinase B (PKB/AKT) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB, 20 ou 40 µg/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 µM)



Efeito do tratamento com o OECB sobre a atividade da proteína PKB/AKT. **(A)** A população celular foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-Forward Scatter, eixo X) e granulosidade citoplasmática (SSC-Side Scatter, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. Para a análise dos histogramas de fluorescência da PKB/AKT (PE-Cy7), inicialmente foi delimitada uma região correspondente à autofluorescência das células não marcadas com o anticorpo. Somente a porcentagem de células fluorescentes após essa região demarcada foi considerada positiva. **(B)** Sobreposição de histogramas representativos mostrando a fluorescência da PKB/AKT (PE-Cy7, eixo X) e o número de células/eventos (eixo Y) em diferentes grupos experimentais. **(C)** Representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM), analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

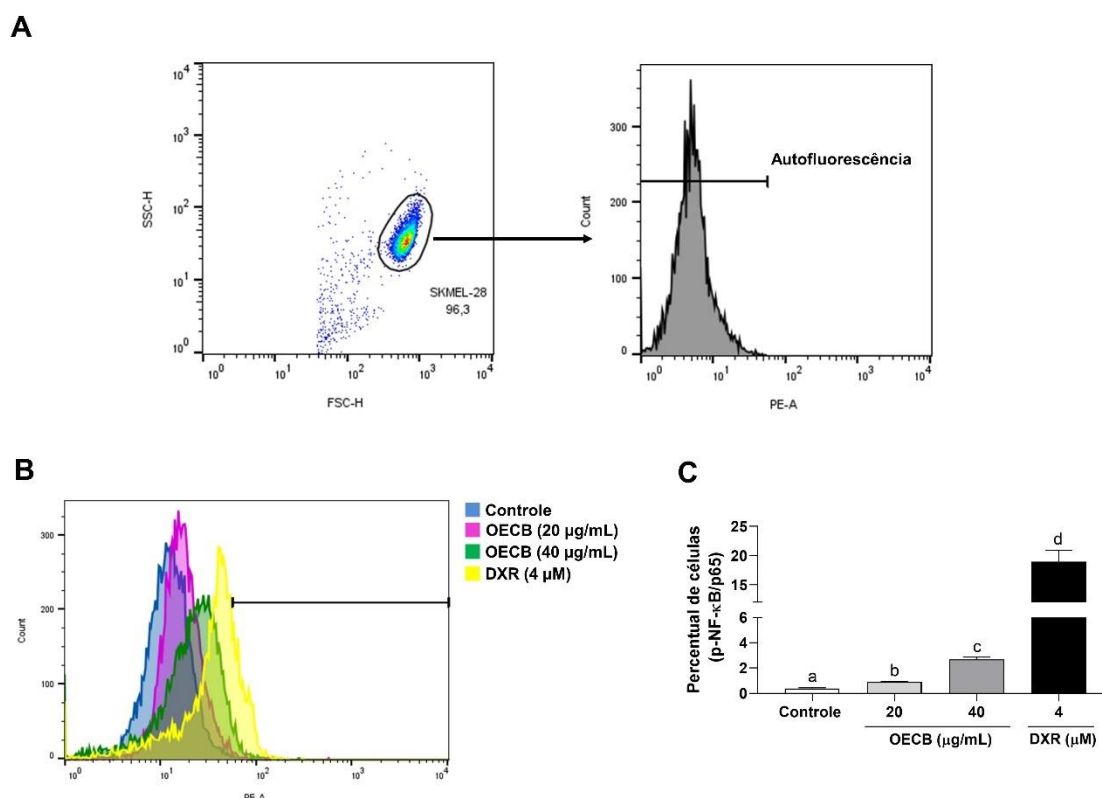
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3.7 Marcação de células SK-MEL-28 com anticorpos anti-NF-κB (p65) e análise por citometria de fluxo

A marcação das células com anticorpos anti-NF-κB (p65) e posterior análise por citometria de fluxo permitiu a observação do aumento significativo do percentual de células marcadas após 48 h de tratamento com o OECB (20 µg/mL: $0,90 \pm 0,06\%$; 40 µg/mL: $2,69 \pm 0,17\%$, $p < 0,05$ para ambos), em comparação ao grupo controle ($0,39 \pm 0,05\%$) (Figura 30).

O tratamento com a DXR (4 μ M) induziu aumento significativo do percentual de células marcadas com os anticorpos anti-NF- κ B (p65) ($18,95 \pm 1,94\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (Figura 30).

Figura 30. Modulação do Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B; p65) em células SK-MEL-28 após tratamento com o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB, 20 ou 40 μ g/mL) ou doxorubicina (DXR, 4 μ M)



Efeito do tratamento com o OECB sobre a atividade do NF- κ B. **(A)** A população celular foi determinada a partir da análise dos *dotplots* de tamanho celular (FSC-Forward Scatter, eixo X) e granulosidade citoplasmática (SSC-Side Scatter, eixo Y) obtidos por citometria de fluxo. Para a análise dos histogramas de fluorescência do NF- κ B (p65) (PE), inicialmente foi delimitada uma região correspondente à autofluorescência das células não marcadas com o anticorpo. Somente a porcentagem de células fluorescentes após essa região demarcada foi considerada positiva. **(B)** Sobreposição de histogramas representativos mostrando a fluorescência do NF- κ B (p65) (PE, eixo X) e o número de células/eventos (eixo Y) em diferentes grupos experimentais. **(C)** Representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM), analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

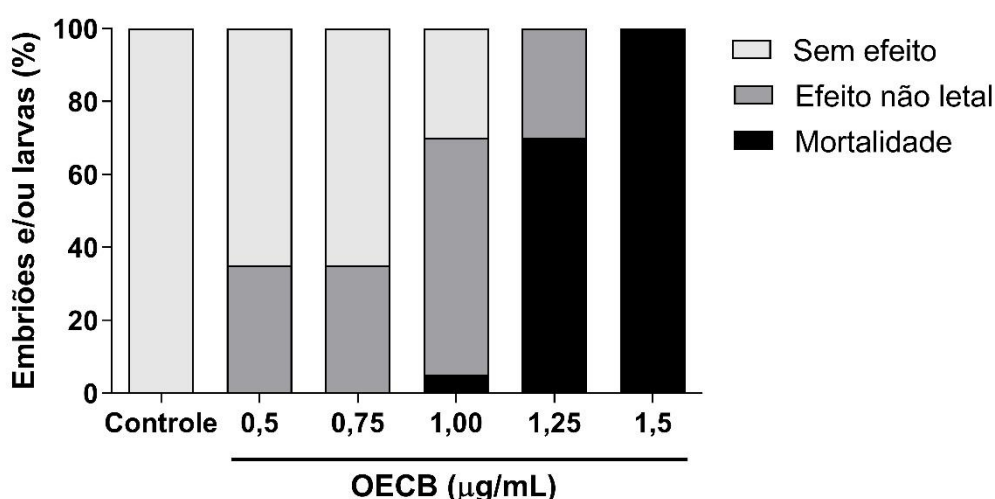
5.2.4 Embriotoxicidade do OECB em modelo de peixe-zebra

5.2.4.1 Toxicidade aguda do OECB em embriões de peixe-zebra

Os ensaios de embriotoxicidade foram realizados em dois conjuntos de experimentos. No primeiro conjunto, os embriões foram expostos ao OECB em

concentrações que variaram de 12,5 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (aproximadamente 10 vezes o valor da Cl_{50} do OECEB em SK-MEL-28). Como resultado, após 24 h de exposição, foi observada a morte de 100% dos embriões em todas as concentrações testadas. Portanto, no segundo conjunto de experimentos, foram utilizadas concentrações menores que variaram de 0,12 a 1,5 $\mu\text{g/mL}$ do OECEB. Após 96 h de exposição, observou-se a morte de todos os embriões e/ou larvas na maior concentração do OECEB testada (1,5 $\mu\text{g/mL}$), com as duas menores concentrações utilizadas (0,5 e 0,75 $\mu\text{g/mL}$) não induzindo mortalidade (Figura 31).

Figura 31. Efeitos cumulativos da exposição de embriões e/ou larvas de peixe-zebra ao óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECEB) após 96 h



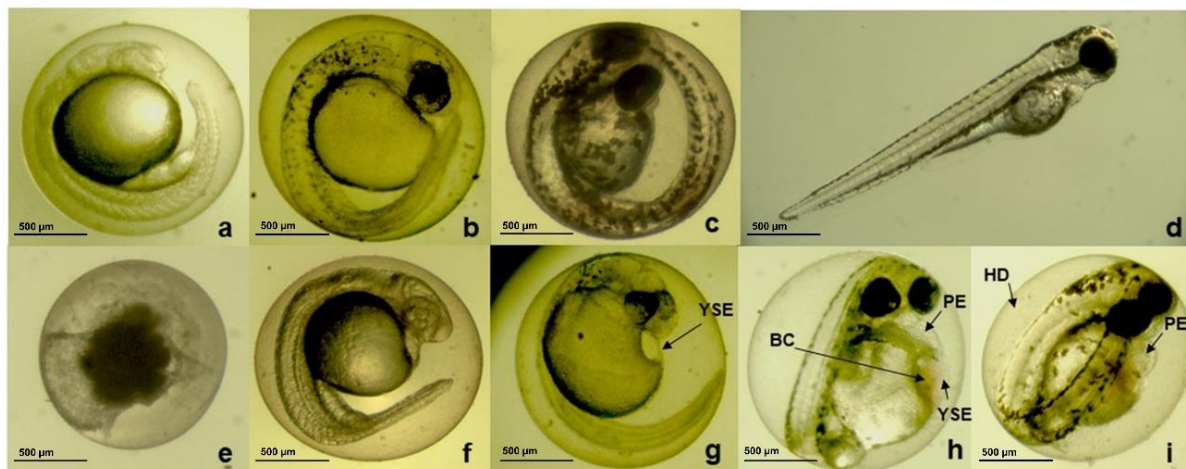
Efeitos da exposição de embriões e/ou larvas de peixe-zebra ao óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) (OECEB) após 96 h ($n = 20$ embriões/concentração).

Legenda: Sem efeito: características morfológicas comparáveis aos organismos do grupo controle; efeito não letal: presença de desfechos não letais (malformação ocular; malformação do otólito, malformação da boca, malformação da espinha, pigmentação corporal, atraso na eclosão, edema do saco vitelino, deformação do saco vitelino, edema pericárdico, edema craniano, coagulação sanguínea e tamanho insuficiente); mortalidade: presença de desfechos de letalidade (coagulação do ovo; falta de formação de somitos; falta de separação do botão caudal do saco vitelino e falta de batimento cardíaco).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os embriões e larvas tratados com as concentrações que produziram menor ou nenhuma mortalidade (0,5, 0,75 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram os seguintes efeitos não letais predominantes: edema pericárdico, edema do saco vitelino, atraso na eclosão do ovo e coagulação sanguínea. Coagulação e ausência de batimentos cardíacos foram os únicos desfechos de letalidade observados para a amostra nas três maiores concentrações testadas (Figura 32).

Figura 32. Efeitos letais e não letais observados em embriões de peixe-zebra após exposição a diferentes concentrações do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB)



Imagens representativas dos efeitos letais e não letais observados em embriões e larvas de peixe-zebra expostos a diferentes concentrações do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) (OECB) no teste de embriotoxicidade. Em **(a-d)**, organismos do grupo controle com desenvolvimento normal após 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente, expostos apenas ao meio E3; **(e)** embrião após 24 h de exposição ao OECB (1,5 µg/mL) apresentando coagulação do ovo; **(f)** embrião após 24 horas de exposição ao OECB (0,75 µg/mL) sem efeitos letais ou não letais; **(g)** embrião após 48 h de exposição ao OECB (1,0 µg/mL) apresentando edema do saco vitelino (YSE); **(h)** embrião após 72 h de exposição ao OECB (1,25 µg/mL) apresentando edema do saco vitelino (YSE), edema pericárdico (PE) e coagulação sanguínea (BC); e **(i)** embrião após 96 h de exposição ao OECB (1,25 µg/mL) apresentando eclosão retardada (HD) e edema pericárdico (PE). Ampliação de 50×.

Conforme observado na tabela 5, o OECB apresentou concentração letal 50% (LC₅₀) de 1,20 µg/mL. Os valores de LOAEL (do inglês “lowest observable adverse effect level”) foram 0,5 µg/mL para atraso na eclosão e 1,0 µg/mL para edema do saco vitelino, edema do pericárdio e coagulação sanguínea. O valor de NOAEL (do inglês “no observed adverse effect level”) foi de 0,7 µg/mL para edema do saco vitelino, edema pericárdico e coagulação sanguínea. A concentração efetiva 50% (EC₅₀) para os efeitos não letais encontrados foram 0,99 µg/mL (atraso de eclosão) e 1,36 µg/mL (edema pericárdico).

Tabela 5. Efeitos da exposição ao óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) sobre os parâmetros de desenvolvimento dos estágios iniciais de peixe-zebra após 96 h

Endpoints de embriotoxicidade	NOAEL^a	LOAEL^b	EC₅₀^c (µg/mL)
Má formação ocular	s.e. [†]	s.e. [†]	s.e. [†]
Má formação otolítica	s.e. [†]	s.e. [†]	s.e. [†]
Má formação da boca	s.e. [†]	s.e. [†]	s.e. [†]
Má formação da coluna	s.e. [†]	s.e. [†]	s.e. [†]
Pigmentação corporal	s.e. [†]	s.e. [†]	s.e. [†]
Atraso de eclosão	s.e. [†]	0,5	0,99 (0,69-1,42)
Edema de saco vitelino	0,75	1,0	s.e. [†]
Edema pericárdico	0,75	1,0	1,36 (1,10-1,70)
Edema de cabeça	s.e. [†]	s.e. [†]	s.e. [†]
Coagulação sanguínea	s.e. [†]	1,0	s.e. [†]
Redução de tamanho	0,75	s.e. [†]	s.e. [†]
Mortalidade (LC₅₀^d - µg/mL)	-	-	1,20 (1,12-1,30)

^aNOAEL: No observed adverse effect level; ^bLOAEL: Lowest observable adverse effect level; ^cEC₅₀: concentração efetiva 50%; ^dLC₅₀: concentração letal 50%; [†]s.e: sem efeito ou menos de 20% dos embriões afetados no parâmetro analisado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

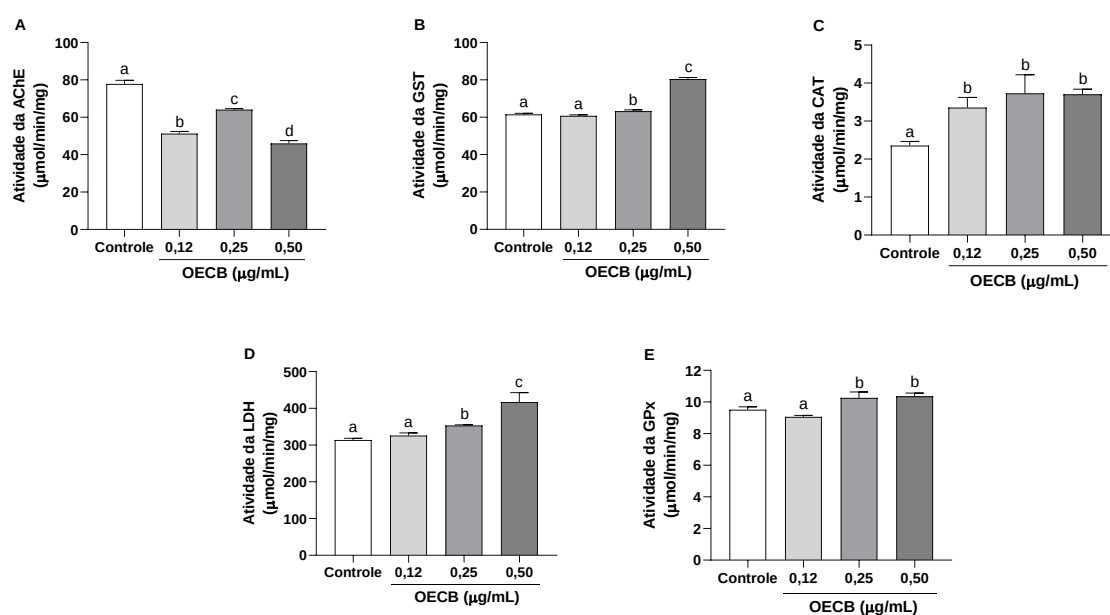
5.2.4.2 Atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra expostas ao OECB

Conforme demonstrado na figura 33, observou-se redução significativa da atividade da acetilcolinesterase (AChE) nas larvas do peixe-zebra, após tratamento com OECB nas concentrações de 0,12 µg/mL ($51,27 \pm 0,70$ µmol/min/mg, $p < 0,05$), 0,25 µg/mL ($64,12 \pm 0,27$ µmol/min/mg, $p < 0,05$) e 0,50 µg/mL ($46,01 \pm 0,87$ µmol/min/mg, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($77,87 \pm 1,12$ µmol/min/mg). Ainda, foi observado aumento significativo da atividade da glutathione transferase (GST) após tratamento com OECB nas concentrações de 0,25 µg/mL ($63,30 \pm 0,36$, $p < 0,05$) e 0,50 µg/mL ($80,43 \pm 0,50$ µmol/min/mg, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($61,56 \pm 0,34$ µmol/min/mg). A avaliação da atividade da catalase (CAT) permitiu observar o aumento significativo da atividade desta enzima nos embriões tratados nas três concentrações utilizadas (0,12 µg/mL: $3,36 \pm 0,16$ µmol/min/mg; 0,25 µg/mL: $3,73 \pm 0,28$ µmol/min/mg; e 0,50 µg/mL: $3,71 \pm 0,08$ µmol/min/mg, $p < 0,05$ para todos), quando comparado ao grupo controle ($2,36 \pm 0,06$ µmol/min/mg).

Em adição, o tratamento das larvas com 0,25 e 0,50 µg/mL do OECB induziu aumento significativo da atividade da lactato desidrogenase (LDH) ($353,6 \pm 0,96$ µmol/min/mg e $417,4 \pm 14,57$ µmol/min/mg, respectivamente, $p < 0,05$ para ambos) e glutathione peroxidase (GPx) ($10,26 \pm 0,22$ µmol/min/mg e $10,37 \pm 0,12$ µmol/min/mg,

respectivamente, $p < 0,05$ para ambos), ao comparar com o grupo controle ($314,00 \pm 2,65 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e $9,52 \pm 0,10 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectivamente) (Figura 33).

Figura 33. Atividade de enzimas marcadoras de estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra após 96 h de exposição a diferentes concentrações do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB)



Avaliação da atividade das enzimas **(A)** acetilcolinesterase (AChE), **(B)** glutathione transferase (GST), **(C)** catalase (CAT), **(D)** lactato desidrogenase (LDH) e **(E)** glutathione peroxidase (GPx) em larvas de peixe-zebra após exposição a diferentes concentrações do OECB. Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média e analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições. $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor

Discussão

6 DISCUSSÃO

A natureza representa uma fonte significativa de produtos bioativos e isso tem estimulado pesquisas em todo o mundo com o objetivo de descobrir e investigar os efeitos biológicos de produtos naturais contra diversas doenças, dentre elas o câncer (Sairazi; Sirajudeen, 2020). No presente estudo, foram descritas a obtenção e caracterização química, a atividade antitumoral *in vitro* e a toxicidade em modelo de peixe-zebra de um óleo essencial de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae).

As propriedades biológicas dos óleos essenciais devem-se à sua composição química (Piasecki *et al.*, 2021) e diversas variáveis, como origem geográfica (Marino *et al.*, 2019) e condições ambientais, a exemplo de temperatura, precipitação, umidade relativa e intensidade da luz (Stefanakis *et al.*, 2022), influenciam a biossíntese e o acúmulo das substâncias químicas nos óleos essenciais (Li; Zidorn, 2022). Assim, variações nos perfis químicos destes produtos naturais podem ocorrer de planta para planta e até mesmo dentro da mesma espécie (Piasecki *et al.*, 2021).

A análise química do OECEB revelou o éster (Z)-2-lacnofilum (EZ) como composto majoritário (57,24%), uma molécula do grupo dos poliacetilenos comumente encontrada em plantas da família Asteraceae e do gênero *Conyza* (Azeem *et al.*, 2019; Minteguiaga *et al.*, 2022; Adande *et al.*, 2023). Porém, vale ressaltar que o perfil químico dos óleos essenciais das partes aéreas de *Conyza bonariensis*, assim como de outras espécies, pode variar dependendo do país e da região onde a planta cresce. Até agora, o (E)- β -farneseno (Maia *et al.*, 2020), o germacreno D (Urdampilleta *et al.*, 2005), o óxido de cariofileno (Benzarti *et al.*, 2013), o limoneno (Amaral *et al.*, 2018), o 1H-indeno-3-carboxaldeído,2,6,7,7a-tetrahidro-1,5-dimetil (Musembi; Kiplimo, 2017) e o *allo*-aromadendreno (Hoi *et al.*, 2020) foram identificados como compostos majoritários de óleos essenciais das partes aéreas de *Conyza bonariensis*.

Lundgren e colaboradores (2021) obtiveram a caracterização do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* cultivada no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM/UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brasil. Esses autores obtiveram um perfil químico diferente do obtido neste trabalho, tendo o sesquicineol como composto majoritário (48,46%). Isso demonstra a influência de condições como injúrias mecânicas ou químicas, fatores genéticos e de evolução, armazenamento, irrigação, herbivoria, ataque de fungos patógenos e atividade dos polinizadores na produção e

composição de óleos essenciais, conforme já descrito na literatura (Figueiredo *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2022). Finalmente, o éster (Z)-2-lacnofilum também foi descrito como o componente principal (21,2%) do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* cultivada na Universidade de Atenas, Atenas, Grécia (Tzakou *et al.*, 2005). Assim, o presente estudo apresenta um óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (L.) com perfil químico inédito.

Atualmente, o câncer representa um importante problema de saúde pública em todo o mundo (Sharaf; Ziaee; Dahmardeh, 2023), e muitos esforços são feitos na busca de novas terapias. Considerando a composição química do OECEB, alguns de seus constituintes químicos apresentam propriedades antitumorais, como o α -pineno (Hou *et al.*, 2019), o β -pineno (Machado *et al.*, 2022), o *p*-cimeno (Wang *et al.*, 2021), o limoneno (Ye *et al.*, 2020; Mandal *et al.*, 2022), o terpinen-4-ol (Nakayama *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2022), o timol (Li *et al.*, 2017; Elbe *et al.*, 2020), o carvacrol (Moradipour *et al.*, 2022), o α -humuleno (Chen *et al.*, 2019), o β -sesquifelandreno (Tyagi *et al.*, 2015), o óxido de cariofileno (Delgado *et al.*, 2021; Jo; Kim, 2022; Xiu *et al.*, 2022) e o composto majoritário, o éster (Z)-2-lacnofilum (Satyal *et al.*, 2015). Contudo, a literatura reporta a vantagem de obtenção de um efeito sinérgico dos componentes de óleos essenciais em comparação aos efeitos biológicos desses constituintes individualmente (Baptista-Silva *et al.*, 2020). Assim, a atividade antitumoral *in vitro* do OECEB foi investigada em diferentes linhagens de células malignas humanas.

Para tal, foi realizado o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), um dos testes colorimétricos mais utilizados para avaliar citotoxicidade (Deepthi *et al.*, 2023). O MTT é um sal amarelo hidrossolúvel que, em células viáveis, é convertido por ação enzimática ao sal formazan de cor púrpura e insolúvel em água. Desta forma, a quantidade de formazan formado é proporcional ao número de células vivas (Manimegalai *et al.*, 2023).

No presente trabalho, a doxorrubicina (DXR) foi utilizada como droga padrão. A DXR é uma antraciclina isolada da espécie *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, utilizada na quimioterapia antineoplásica, incluindo o tratamento de leucemias e câncer de mama (Rawat *et al.*, 2021). Além disso, esse fármaco é amplamente utilizado como droga padrão em vários estudos *in vitro*, incluindo a investigação dos efeitos antitumorais de óleos essenciais (Ihsan *et al.*, 2017; Aranha *et al.*, 2019; Sousa

et al., 2020; Salama *et al.*, 2021; Tabanca *et al.*, 2020). Entre os seus mecanismos de ação antitumorais incluem-se a inibição da enzima topoisomerase II, indução de parada do ciclo celular, indução de estresse oxidativo (Sritharan; Sivalingam, 2021) e modulação da atividade das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) (Brantley-Finley *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2008; Wei; Xiaojunb; Peilong, 2020), do Fator Nuclear κ B (NF- κ B) (Chougule *et al.*, 2011) e da Proteína Cinase B (PKB/AKT) (Li *et al.*, 2005).

No ensaio do MTT, o OEGB apresentou significativo efeito antitumoral para todas as linhagens celulares utilizadas, com a maior citotoxicidade sendo observada em células de melanoma humano SK-MEL-28 (concentração inibitória média – CI_{50} : $18,65 \pm 1,16$ μ g/mL). Células SK-MEL-28 são melanócitos malignos com mutação em B-Raf^{V600E} (Scatena *et al.*, 2019), obtidas inicialmente de um paciente de 51 anos (Bonamy *et al.*, 2023) e que são amplamente utilizadas para a investigação de novos candidatos a drogas antimelanoma (Santos *et al.*, 2020).

O melanoma cutâneo é o tumor maligno de maior relevância entre os cânceres de pele, sendo responsável pela maioria das mortes (Abarca; Chávez, 2023). Em 2020, aproximadamente 325.000 pessoas foram diagnosticadas com melanoma cutâneo e aproximadamente 57.000 pacientes morreram desta doença (Arnold *et al.*, 2022). Assim, novas terapias são necessárias para o combate ao melanoma e, nesse cenário, óleos essenciais têm sido investigados para o tratamento dessa doença.

Petrelli e colaboradores (2016) investigaram o efeito antitumoral *in vitro* do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza floribundus* e observaram significativa citotoxicidade em linhagem de células de melanoma humano A375 com CI_{50} de 22,5 μ g/mL. Também, os óleos essenciais obtidos das folhas e raízes de *Conyza canadensis* induziram significativo efeito antitumoral em um painel de linhagens de células tumorais humanas, incluindo as células de melanoma UACC-62 com valores de inibição total do crescimento celular (TGI) entre 42,2 e 73,0 μ g/mL (Aragão *et al.*, 2019). Em adição, o óleo essencial das folhas de *Etlingera elatior* (Zingiberaceae) apresentou citotoxicidade contra as linhagens de células de melanoma humano A375 e murino B16F10, com CI_{50} de 241,13 μ g/mL e 214,85 μ g/mL, respectivamente (Sangthong *et al.*, 2022).

Apesar de ser a forma de tratamento mais utilizada contra o câncer, a quimioterapia antineoplásica não é seletiva (Muhamad *et al.*, 2018), ou seja, além de

causar efeitos danosos às células tumorais, células saudáveis que se proliferam rapidamente também podem ser afetadas (Blagosklonny, 2023) acarretando efeitos adversos como perda de pelos, náusea, vômito, diminuição da fertilidade e mielossupressão (Asqarov; Bekmirzaeva; Usmanova, 2023). Desta forma, o desenvolvimento de terapias seletivas para as células tumorais é crucial para a redução da toxicidade associada ao tratamento (Saleh *et al.*, 2023). Diante disso, a avaliação da citotoxicidade do OECB na linhagem de células saudáveis de pele humana HaCaT (queratinócitos) permitiu a obtenção do índice de seletividade, a partir do qual pode-se observar que o efeito citotóxico do OECB foi aproximadamente três vezes mais seletivo para células SK-MEL-28, quando comparado ao efeito deste óleo sobre as células saudáveis de pele utilizadas.

Assim, considerando as linhagens celulares utilizadas neste trabalho, os dados obtidos permitem inferir que o OECB possui significativo efeito antitumoral *in vitro* mais seletivo para linhagem de células de melanoma humano, quando comparado ao seu efeito citotóxico em linhagem de células saudáveis de pele humana. Por outro lado, a doxorrubicina, um fármaco de ampla utilização clínica no tratamento de diferentes tipos de câncer, apresentou um índice de seletividade menor que um. De fato, por mais que as pesquisas busquem drogas antitumorais com um melhor balanço entre toxicidade e atividade biológica, a toxicidade desses compostos contra células não tumorais é uma característica inerente dessas drogas que ainda precisa ser superada. Isto explica a quantidade de efeitos adversos que são observados em pacientes em tratamento do câncer. Portanto, a citotoxicidade de novas drogas em células não tumorais não limita a continuidade dos estudos na pesquisa da caracterização de seus efeitos contra o câncer (Sousa *et al.*, 2023).

Ainda, considerando a toxicidade dos agentes antineoplásicos em células saudáveis, sabe-se que diversos agentes quimioterápicos utilizados clinicamente induzem hematotoxicidade, a exemplo da cisplatina (Cao *et al.*, 2021). Para melhor caracterização da toxicidade do OECB, foi investigado o seu efeito em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas. As PBMCs, incluindo monócitos e linfócitos, são frequentemente isoladas para uso em pesquisas não-clínicas (Betsou *et al.*, 2019), bem como em estudos de novos candidatos para a terapia antitumoral (Hołota *et al.*, 2019; Ciftci *et al.*, 2022), sendo esta investigação um

indicador relevante da toxicidade sistêmica de produtos naturais em humanos (Mektrirat *et al.*, 2020).

A investigação dos efeitos de óleos essenciais em PBMCs tem sido frequentemente realizada (Silva *et al.*, 2021; Yazdanian *et al.*, 2022; Cappelli *et al.*, 2023), mostrando que este modelo experimental é útil na investigação de toxicidade em células humanas saudáveis. O OEGB induziu citotoxicidade contra PBMCs de maneira dependente de concentração. No entanto, esse efeito tóxico foi menor comparado ao efeito observado para a droga padrão DXR. Alguns óleos essenciais compostos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos mostram citotoxicidade contra PBMCs, como o óleo essencial das folhas de *Duguetia pycnastera* (Annonaceae) (CI_{50} : 21,28 $\mu\text{g/mL}$) (Costa *et al.*, 2022), o óleo essencial das partes aéreas de *Satureja khuzistanica* (Lamiaceae) (CI_{50} : 28,21 $\mu\text{g/mL}$) (Khakzad *et al.*, 2019) e o óleo essencial das folhas de *Xylopi laevigata* (Annonaceae) (CI_{50} : 35,30 $\mu\text{g/mL}$) (Quintans *et al.*, 2013). Assim, o maior efeito citotóxico do OEGB, rico em monoterpenos e sesquiterpenos, em PBMCs (CI_{50} : 2,68 $\mu\text{g/mL}$) pode estar relacionado ao composto majoritário, o éster (Z)-2-lacnofilum, cuja citotoxicidade neste modelo experimental não é relatada na literatura, ou ao fitocomplexo. Em adição, até o presente momento, não foram encontrados relatos na literatura sobre a citotoxicidade de óleos essenciais das partes aéreas de espécies do gênero *Conyza* em PBMCs.

Para melhor caracterizar o efeito antimelanoma do OEGB foram investigados os possíveis mecanismos de ação antitumorais deste óleo essencial na linhagem celular mais sensível a sua citotoxicidade, a SK-MEL-28. Considerando que a CI_{50} após 72 h de tratamento ($18,65 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$) representa o efeito citotóxico máximo do OEGB nesta linhagem celular, o seu valor aproximado (20 $\mu\text{g/mL}$) e do seu dobro (40 $\mu\text{g/mL}$) foram considerados como as concentrações do OEGB para tratamento das células SK-MEL-28. Ainda, sabendo que 72 h é o tempo de observação do efeito final (morte celular), considerou-se, para a investigação do processo de indução de morte, um tempo de tratamento reduzido, de 48 h.

O efeito antimelanoma de diversos óleos essenciais e de alguns de seus componentes ocorre por diversos mecanismos, incluindo alteração da distribuição celular nas diferentes fases do ciclo celular, indução da apoptose e modulação do estresse oxidativo (Di Martili *et al.*, 2020).

O ciclo celular, dividido nas fases G1 e G2 (*gap* ou intervalo), S (síntese de DNA) e M (mitose) (Johnson; Cook, 2023), é um processo rigidamente controlado que leva a divisão celular. No câncer, este evento encontra-se desregulado resultando em proliferação celular descontrolada. Assim, agentes que interferem no ciclo celular são considerados promissores para a quimioterapia antitumoral (Panda *et al.*, 2019). Para a investigação do efeito do tratamento do OEGB sobre a progressão do ciclo celular, realizou-se a marcação das células SK-MEL-28 com o intercalador de DNA iodeto de propídeo (IP) seguido de análise por citometria de fluxo, o método mais utilizado para analisar a transição do ciclo celular (Di Martili *et al.*, 2020). A intensidade de fluorescência emitida pelo IP ligado ao DNA permite a quantificação de DNA nas células em cada fase do ciclo celular (Jayat; Ratinaud, 1993), sendo consideradas células na fase G0/G1 aquelas com conteúdo de DNA 2n, na fase S aquelas com conteúdo de DNA maior que 2n e menor que 4n, na fase G2/M as células com conteúdo de DNA 4n e a população sub-G1 as células com DNA sub-diplóide (< 2n) (Hodroj *et al.*, 2018).

O tratamento com o OEGB por 48 h não induziu aumento significativo do percentual de células em nenhuma das fases do ciclo celular. Contudo, observou-se aumento significativo da população sub-G1, como evidenciado para outros óleos essenciais (Bhagat *et al.*, 2020; Hashem-Dabaghian *et al.*, 2020; Trang *et al.*, 2020). As células da população sub-G1 apresentam menor conteúdo de DNA devido a fragmentação do material genético (Chainumnim *et al.*, 2022), o que é característico de células apoptóticas (Zhang *et al.*, 2023b). Desta forma, considerando que o aumento da fração sub-G1 na análise do ciclo celular está relacionado à apoptose, investigou-se também a possível indução de apoptose pelo OEGB.

A apoptose é um processo regulado de morte celular (Bock; Tait, 2020) caracterizado por alterações celulares como degradação de proteínas, *blebbing* de membrana e clivagem do DNA (Carneiro; El-Deiry, 2020). No câncer, as células apresentam resistência à apoptose (Hanahan, 2022) e, desta forma, a indução deste tipo de morte celular tem sido um dos principais objetivos na terapia antitumoral (Jan; Chaudhry, 2019). Nessa perspectiva, a detecção da apoptose é uma importante ferramenta no processo de desenvolvimento de novos fármacos anticâncer (Carneiro; El-Deiry, 2020) e, para isto, diversas técnicas podem ser utilizadas como a

microscopia e a citometria de fluxo por marcação com anexina V-FITC e IP (D'arcy, 2019).

Em células viáveis, a fosfatidilserina, um fosfolípídeo de membrana plasmática, encontra-se voltada para a face interna da membrana celular (Shin; Takatsu, 2020). Células apoptóticas externalizam a fosfatidilserina e isto é considerado uma característica marcante da apoptose (Shlomovitz; Speir; Gerlic, 2019). A anexina V possui alta afinidade para a fosfatidilserina (Kira *et al.*, 2023), enquanto o IP interage diretamente com o DNA de células que perderam a integridade de membrana, permitindo, desta forma, distinguir células em apoptose ou necrose (Hussain *et al.*, 2019). As células viáveis são negativas para marcação com anexina V-FITC e IP, enquanto as células em apoptose inicial são marcadas apenas com anexina V-FITC e as células em apoptose tardia/necrose exibem dupla marcação (anexina V-FITC/IP). Já as células necróticas marcam-se apenas com o IP (Twair *et al.*, 2021).

Como observado na análise por citometria de fluxo, o tratamento com o OEGB induziu aumento do percentual de células em apoptose (apoptose inicial + apoptose tardia/necrose). Esse tipo de morte celular é compartilhado por diversos óleos essenciais da família Asteraceae. A apoptose induzida pelo óleo essencial das folhas de *Tridax procumbens* foi observada em células de melanoma murino B16-F10 e em modelo de melanoma *in vivo* (camundongos) (Manjamalai; Kumar; Grace, 2012). Os óleos essenciais das flores e folhas de *Artemisia arborescens* foram capazes de induzir o processo apoptótico (Russo *et al.*, 2023). Em adição, o óleo essencial de *Carpesium abrotanoides* induz a apoptose pela via intrínseca em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) (Wang *et al.*, 2018). Por fim, o óleo essencial de *Conyza canadensis* induziu apoptose em células da linhagem de câncer cervical humano HeLa (Si *et al.*, 2022).

Para corroborar a apoptose induzida pelo OEGB, células expostas a este óleo essencial foram analisadas por microscopia confocal a *laser*. As principais funções de um microscópio confocal são produzir uma fonte pontual de luz e rejeitar a luz fora de foco (Elliott, 2019). Para isto, o microscópio confocal utiliza *lasers* como fonte de luz, substituindo a luz branca por um comprimento de onda específico, restringindo a iluminação a um pequeno ponto dentro do campo de visão (Jayamohan, 2022), e pontos focais estratégicos que garantem que apenas a fluorescência originada no ponto focal seja capturada pelo detector, criando uma imagem com alta resolução.

Assim, a microscopia confocal pode ser usada para quantificar as intensidades e investigar o arranjo espacial de moléculas fluorescentes com alta precisão, o que é útil para atribuir a localização de moléculas a compartimentos celulares específicos (Jonkman *et al.*, 2020). A análise das imagens obtidas na microscopia confocal a *laser*, após tratamento das células SK-MEL-28 com o OEGB, permitiu a visualização de alterações morfológicas características do processo apoptótico, como condensação da cromatina, *blebs* de membrana e fragmentação do DNA. A condensação da cromatina e a formação de *blebs* de membranas culminam em formação dos corpos apoptóticos que podem ser fagocitados. Como uma das vantagens da apoptose, a fagocitose dos corpos apoptóticos previne o desenvolvimento de um processo inflamatório, o que mantém a integridade do tecido subjacente (Kakarla *et al.*, 2020). Diante destes resultados, pode-se inferir que o efeito antimelanoma do OEGB envolve indução da apoptose.

Prosseguindo com a elucidação dos mecanismos antimelanoma do OEGB, investigou-se o estado redox das células SK-MEL-28 após tratamento com esse óleo essencial. Fisiologicamente, as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) atuam como moléculas sinalizadoras em vias de transdução de sinais intracelulares (Checa; Aran, 2022). No câncer, as células tumorais têm altos níveis de ROS (Yang; Chen; Shi, 2019) envolvidos em processos como a indução da proliferação celular e metástase, inibição da apoptose (Sajadimajd; Khazaei, 2019) e estimulação da angiogênese (Huang; Nan, 2019).

No melanoma, o estresse oxidativo está envolvido em todas as fases do desenvolvimento tumoral e modula as vias intracelulares relacionadas à proliferação e morte celular (Di Martili *et al.*, 2020). No entanto, aumentos adicionais na concentração intracelular de ROS estão envolvidos com danos irreparáveis e morte de células tumorais (Kirtonia; Sethi; Garg, 2020). Agentes antineoplásicos como doxorrubicina, metotrexato, cisplatina e topotecana induzem a apoptose de células tumorais por indução de estresse oxidativo (Davalli *et al.*, 2018; Albasher *et al.*, 2019; Sinha; Tokar; Bushel, 2020).

Para avaliar a indução de estresse oxidativo pelo OEGB foi realizado o ensaio com o diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), que permite a quantificação de ROS intracelulares a partir da fluorescência celular (Foo *et al.*, 2019). O DCFH-DA é uma sonda apolar e não fluorescente, que atravessa livremente as

membranas celulares. As esterases intracelulares clivam o DCFH-DA em DCFH, que é oxidado por ROS a DCF, uma molécula altamente fluorescente. Portanto, o número de células fluorescentes é proporcional à quantidade de ROS intracelular (Jávega *et al.*, 2023). Em adição, também foi realizado o ensaio de MTT na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC), uma molécula antioxidante (Sahasrabudhe; Terluk; Kartha, 2023). No ensaio do DCFH-DA, após 48 h de tratamento com OECEB, não foi observada alteração significativa da produção de ROS (dados não apresentados). Assim, reduziu-se o tempo de incubação das células SK-MEL-28 com o OECEB para 30 minutos, 1 h e 3 h. Como resultado, observou-se rápido e transitório aumento do nível de ROS após o tratamento com o OECEB. Para o ensaio na presença ou ausência de NAC foi considerado o tempo de 72 h de tratamento, tendo em vista que o efeito citotóxico máximo do OECEB foi observado após esse tempo de incubação. O pré-tratamento com NAC na citotoxicidade do OECEB, investigou-se reduziu significativamente a citotoxicidade do OECEB, corroborando o envolvimento de ROS no efeito antitumoral induzido por este óleo essencial.

Tem sido relatado que o aumento da produção de ROS é um evento comum na morte de células tumorais induzida por óleos essenciais (Thalappil *et al.*, 2022). De fato, a indução do estresse oxidativo foi observada em células tumorais após o tratamento com esses produtos naturais. O óleo essencial de *Pinus mugo* (Pinaceae) induziu redução dos níveis intracelulares de glutathione (GSH) e aumento da concentração de ROS em células da linhagem de adenocarcinoma de próstata humano DU145, o que foi parcialmente prevenido pelo pré-tratamento com NAC (Thalappil *et al.*, 2022). Catalani e colaboradores (2017) observaram que a citotoxicidade do óleo essencial das partes aéreas de *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) em células FTC-133 (carcinoma folicular da tireoide humano) é dependente do aumento da produção intracelular de ROS. Ainda, Poma e colaboradores (2018) demonstraram que o efeito do óleo essencial dos ramos com folhas de *Grevillea rosmarinifolia* (Proteaceae) sobre a viabilidade celular das linhagens de células de carcinoma hepatocelular humano (HA22T/VGH, HepG2 e Hep3B) e de câncer de mama triplo negativo humano (SUM 149 e MDA-MB-231) foi reduzido após pré-tratamento com NAC. Assim, o aumento na produção de ROS induzido pelo tratamento com o OECEB é um mecanismo envolvido com o efeito antitumoral deste óleo essencial em células SK-MEL-28.

Em adição, tem sido evidenciado que o aumento de ROS está envolvido com o efeito antitumoral por ativação ou inativação de vias de sinalização intracelulares, incluindo a via das MAPKs (Zhao *et al.*, 2023c), do NF- κ B (Ahmadian *et al.*, 2017) e da PKB/AKT (Hussain *et al.*, 2011). Diante disso, como análise preliminar do possível envolvimento destas vias de sinalização intracelulares com o efeito antitumoral do OEGB, realizou-se o *docking* molecular em estruturas cristalográficas dessas proteínas para obter os complexos proteína-ligante com o composto majoritário do OEGB, o EZ.

Docking molecular é a aplicação computacional que pode prever a interação e a energia de ligação de certas moléculas a um alvo proteico específico permitindo identificar, dentre duas ou mais moléculas, aquela que apresenta maior afinidade de ligação ao alvo. Na área de produtos naturais, este método torna-se uma ferramenta interessante a ser usada para triagem virtual da possível interação entre compostos naturais e alvos envolvidos com doenças (Zubair *et al.*, 2020), como o câncer (Cava; Castiglioni, 2020). Diante disso, essa ferramenta foi utilizada para investigar a probabilidade de ligação e as formas de interação entre o EZ, composto majoritário do OEGB, a DXR, utilizada como droga padrão, ou os ligantes disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) ou encontrados na literatura (Barančík *et al.*, 2001; Gorlick *et al.*, 2012; Homme *et al.*, 2019; Paw *et al.*, 2021), e as proteínas ERK1, JNK1, p38 α MAPK, PKB/AKT e NF- κ B (p50/p65).

As vias de sinalização das MAPKs estão envolvidas em diversos processos celulares, incluindo proliferação e sobrevivência (Ullah *et al.*, 2023). No câncer, tem sido relatado o papel dual dessas proteínas. Logo, o estímulo à atividade dessas cinases pode estar envolvido a efeito pró ou antitumoral (Stefani *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2020).

As proteínas ERK1 e ERK2 são expressas de forma ubíqua e não há diferenças significativas de regulação e localização celular entre elas (Buscà; Pouysségur; Lenormand, 2016). Neste trabalho, foi realizada a análise do *docking* molecular entre o EZ e a proteína ERK1. O resultado do estudo *in silico* mostrou que há interação favorável entre o EZ e essa proteína por meio de resíduos de aminoácidos que também contribuem para a interação desse alvo com a droga padrão DXR (Ala35) ou com o ligante do PDB (Ala35 e Leu170). Não foram encontrados dados de *docking* molecular entre ERK1 e o éster metílico de matricaria ou outros compostos

estruturalmente semelhantes ao EZ. Contudo, a literatura reporta estes dados para compostos de outras classes químicas. Nagalakshamma e colaboradores (2021) desenharam e sintetizaram compostos derivados da bisuréia 1,4-diisocianatobenzeno, nomeadamente 3a-3j. Os compostos apresentaram significativo efeito antitumoral *in vitro* frente a linhagem de células tumorais HeLa. No estudo de *docking* molecular foi observado que os derivados 3d e 3e, os mais citotóxicos frente a linhagem celular utilizada, apresentaram encaixe com a proteína ERK por meio de resíduos de aminoácidos que incluem Ala35 e Leu170. Assim, com base nos dados dessa técnica, a interação entre o EZ e ERK demonstra que esta proteína é um potencial alvo para a investigação dos possíveis mecanismos de ação antimelanoma do OEGB.

O papel da JNK no crescimento e na sobrevivência do melanoma tem sido relatado, com a JNK1 emergindo como a principal isoforma na regulação da progressão do ciclo celular e da apoptose (Alexaki; Javelaud; Mauviel, 2008). Assim, investigou-se as possíveis interações moleculares entre o EZ e esta proteína. Os resultados do estudo *in silico* mostraram que o EZ foi capaz de interagir com a proteína JNK1 em resíduos de aminoácidos que também estão envolvidos no acoplamento da DXR (Ala53, Ile32 e Val158) ou do ligante do PDB (Ala53, Ile32, Val158 e Met111) a esse alvo. Em adição, o EZ apresentou maior valor de probabilidade de ligação quando comparado ao ligante do PDB. Não foram encontrados na literatura dados de interação molecular *in silico* entre JNK1 e o éster metílico de matricaria ou outros compostos estruturalmente semelhantes ao EZ. Contudo, a literatura reporta estes dados para outras substâncias. Semelhante ao observado no presente trabalho, os resultados de Sugara e colaboradores (2021), evidenciaram que novas haloxantonas, codificadas como 3CX, 10CX, 5BX e 4BX, projetadas visando potencial atividade antitumoral, acoplaram a JNK e que essa interação envolveu aminoácidos que participaram da interação entre o EZ e essa proteína (Ala53, Ile32, Val158, Leu110, Met111 e Glu109). Assim, diante dos resultados apresentados no presente trabalho, a proteína JNK1 mostra-se um potencial alvo para a investigação dos possíveis mecanismos de ação antitumorais do OEGB.

Atualmente, são conhecidas quatro isoformas da p38 MAPK, sendo p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ (Ma; Nicolet, 2023). A p38 γ possui uma distribuição tecidual consideravelmente restrita, sendo encontrada principalmente na musculatura estriada

esquelética (Denkert *et al.*, 2002). Em células do melanoma, a isoforma p38 δ MAPK não é expressa (López-Bergami, 2011). Por fim, as isoformas p38 α e p38 β são encontradas em todos os tecidos (Qi; Chen, 2023). A análise do papel das isoformas p38 α e p38 β na linhagem celular de melanoma humano A375, evidenciou que apenas a p38 α MAPK desempenha um papel crucial na regulação da proliferação e migração dessas células (Wen *et al.*, 2019). Assim, considerando-se o potencial da p38 α MAPK no desenvolvimento e manutenção do melanoma, investigou-se as possíveis interações moleculares entre o EZ e esta isoforma da p38 MAPK. Foi observada uma interação favorável entre o EZ e a p38 α MAPK no resíduo de aminoácido Gln120, que está envolvido na interação do DXR com essa proteína. Da mesma forma, Leu216 e Val117, envolvidos na ligação do EZ, também estão envolvidos na interação entre a p38 MAPK e o (4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-imidazol) (SB203580), um inibidor específico dessa proteína (Barančík *et al.*, 2001). Não foram encontrados dados de *docking* molecular entre compostos estruturalmente similares ao EZ. Contudo, encontram-se dados na literatura da interação da p38 α MAPK e outros compostos. Shankar *et al.* (2021) investigaram a interação entre a agastisflavona, um composto fitoquímico encontrado em *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), e a p38 α MAPK. Esses pesquisadores observaram que há ligação entre a agastisflavona e a p38 α MAPK por meio da interação com o Pro153, que também participa da ligação entre o EZ e essa proteína. Assim, diante do exposto, pode-se sugerir que a proteína p38 MAPK também é um potencial alvo para a ação antitumoral do OECEB.

A proteína PKB/AKT regula diversos eventos celulares, incluindo proliferação celular e angiogênese (Iida *et al.*, 2020). No câncer, tem sido relatado o seu efeito pró ou antitumoral (Li *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2019). Para este alvo, o EZ apresentou valores significativos de energia de interação, indicando acoplamento favorável. Esta interação envolveu resíduos de aminoácidos que também participam da interação entre a molécula 8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil-2*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,6]naftiridina-3-ona (MK-2206), utilizada no presente estudo como molécula padrão de interação com a PKB/AKT, e essa proteína (Tyr316, Leu348, Leu317, Val331, Ala318, Lys277, Val338 e Glu279). Não foram encontrados dados de *docking* molecular da interação entre o éster metílico de matricaria ou outros compostos estruturalmente relacionados ao EZ, e a PKB/AKT. Entretanto, encontram-se

disponíveis resultados de testes *in silico* desta interação para outros compostos, como a Brevilina A. Esta molécula foi isolada do *Centipeda minima* (Asteraceae) e possui significativa atividade antitumoral, interagindo com a PKB/AKT em resíduos de aminoácidos como Lys277 (Ramdhani; Mustarichie, 2021) que também integra o grupo de aminoácidos que participam da interação entre o EZ e esse alvo. Esse resíduo de aminoácido também participa da interação entre a epirrubicina, uma antraciclina utilizada para o tratamento de cânceres como o de mama (Vallathol *et al.*, 2023), e a PKB/AKT (Ramdhani; Mustarichie, 2023a). Outro composto com significativa atividade antitumoral, a pelargonidina, encontrada em frutas vermelhas ou rosadas, interage com PKB/AKT em resíduos que incluem Leu317 e Lys277 (Ramdhani; Mustarichie, 2023b). Assim, diante dos dados de *docking* molecular apresentados no presente trabalho, pode-se inferir que o OEGB também apresenta como potencial alvo a proteína PKB/AKT.

O NF- κ B é um fator de transcrição que participa de importantes funções celulares como proliferação, diferenciação e apoptose (Wang *et al.*, 2023b). As subunidades do NF- κ B formam homo ou heterodímeros, sendo o heterodímero p50/p65 o mais comum (Catheline *et al.*, 2021). Atualmente, diversas evidências apontam para o papel dual do NF- κ B no câncer (Wu; Sun; Xu, 2023). Diante disso, investigou-se as possíveis interações moleculares entre o EZ e o NF- κ B em sua forma heterodimérica p50/p65. Quanto à predição de acoplamento entre o EZ e o NF- κ B (p50/p65), foi possível observar que houve interação favorável entre esse ligante e o alvo investigado, com resíduos de aminoácidos envolvidos neste acoplamento também participando da interação entre a DXR e o NF- κ B (p50/p65) (Cys120, Arg187 e Tyr36). O EZ apresentou maior afinidade de ligação com o NF- κ B (p50/p65), quando comparado à afinidade de ligação do ligante 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina, utilizado em nosso estudo como molécula padrão de interação com o NF- κ B (p50/p65), a essa proteína. Não foram encontrados na literatura resultados de *docking* molecular entre o NF- κ B e o éster metílico de matricaria ou outros compostos estruturalmente semelhantes ao EZ. Todavia, existem dados de estudos *in silico* da interação entre o NF- κ B e outros tipos de compostos. No trabalho de Shiroma e colaboradores (2020), após triagem virtual, o composto A55 (ácido 2-(3-carbamoyl-6-hidroxi-4-metil-2-oxopiridin-1(2H)-il)acético) foi identificado como um inibidor seletivo da ligação RelA(p65)-DNA. O resultado de *docking* molecular, mostrou que esse

composto interagiu com o resíduo Tyr36 de NF- κ B, que também está envolvido com a interação entre o EZ e esse alvo proteico.

Zazeri e colaboradores (2020), na busca por sintetizar análogos estruturais da piperina e piperlongumina (PPL), alcaloides encontrados em *Piper longum* (Kumar; Saini; Kumari, 2022) e que apresentam diversas atividades biológicas como efeito antitumoral (Quijia; Chorilli, 2022; Lin *et al.*, 2023), obtiveram uma série de novas substâncias. No estudo *in silico*, além dos compostos naturais piperina e PPL, os compostos sintetizados exibiram interação com o NF- κ B. A interação entre a PPL e o NF- κ B envolveu todos os resíduos que também estão relacionados com a interação do EZ e essa proteína (Cys120, Arg187, Tyr36, Leu154, Phe34 e Asp185). Sabe-se que a atividade antitumoral da PPL envolve modulação do NF- κ B (Ginzburg *et al.*, 2014). Já a interação da piperina com essa proteína envolveu apenas o resíduo Arg187. Dentre os análogos, destacou-se o composto nomeado 4a, cuja interação com o alvo molecular envolveu os resíduos Cys120, Arg187, Tyr36, Leu154 e Asp185. Diante dos resultados de *docking* molecular obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir que a proteína NF- κ B é um potencial alvo para a investigação do efeito citotóxico do OECEB.

Os resultados obtidos no estudo de *docking* molecular mostraram-se promissores. Diante disso, para a continuidade dos ensaios de investigação dos possíveis mecanismos de ação antimelanoma do OECEB, foram realizados testes *in vitro* para avaliar o efeito desse óleo essencial sobre a atividade dessas proteínas.

Para a investigação sobre a modulação da atividade das MAPKs induzida pelo OECEB, as células SK-MEL-28 foram marcadas com anticorpos anti-MAPKs e analisadas por citometria de fluxo após 48 h de tratamento com esse óleo essencial. Em adição, para melhor caracterizar o envolvimento da modulação das vias de sinalização dessas proteínas no efeito citotóxico desse óleo essencial, realizou-se o ensaio do MTT na presença ou ausência de inibidores dessas proteínas. Neste ensaio, assim como no ensaio na presença ou ausência de NAC, foi considerado o tempo de 72 h de tratamento, tendo em vista que o efeito citotóxico máximo do OECEB foi observado após esse tempo de incubação.

O tratamento das células SK-MEL-28 com o OECEB induziu a ativação das proteínas ERK1/2 e JNK1/2, conforme evidenciado pelo aumento do percentual de células fluorescentes, marcadas com os anticorpos anti-ERK1/2 e anti-JNK1/2. Em

adição, confirmando que o efeito antitumoral do OECEB envolve a ativação dessas vias de sinalização intracelulares, o pré-tratamento com os inibidores de ERK (U0126) e JNK (SP600125), preveniu parcialmente a citotoxicidade desse óleo essencial.

Tal mecanismo de ação antitumoral também é compartilhado com outros óleos essenciais. Após tratamento de células de linhagem de carcinoma epidermóide oral humano (KB) com o óleo essencial das partes aéreas de *Artemisia lavandulaefolia* (Asteraceae) foi evidenciada indução de apoptose, tendo sido observado aumento da fosforilação de ERK e JNK (Cha; Kim; Kim, 2010). Também, o óleo essencial das folhas de *Pinus densiflora* (Pinaceae) induziu apoptose de células de linhagem de câncer oral humano (YD-8), o que envolveu a ativação de ERK e JNK, geração de ROS e ativação de caspases (Jo *et al.*, 2012). Ainda, o óleo essencial das folhas de *Teucrium alopecurus* (Poaceae) induziu citotoxicidade em células de linhagem de câncer de cólon humano (HCT-116) por ativação de ERK e JNK (Guesmi *et al.*, 2021a), o que também foi observado no efeito antitumoral *in vitro* do óleo essencial das partes aéreas de *Thymus hirtus* sp. *algeriensis* (Lamiaceae) sobre essa linhagem celular (Guesmi *et al.*, 2021b). Tem sido reportado na literatura que ROS estão envolvidas com a ativação de ERK1/2 (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021) e de JNK (Wang *et al.*, 2022) e que o efeito pró- ou antiapoptótico das MAPKs é dependente do tipo celular e da natureza dos estímulos ativadores dessas proteínas (Yue; López, 2020; Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021). A apoptose induzida por ERK1/2 pode estar associada à liberação do citocromo c e ativação da caspase-9, ativação da caspase-8, promoção da expressão de ligantes do receptor de morte da via extrínseca da apoptose (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021) e aumento dos níveis de p53 e a modulação positiva dessa proteína (Persons *et al.*, 2000; Yue; López, 2020). A JNK pode induzir apoptose por ativação da p53 (Fuchs *et al.*, 1998; Yue; López, 2020) e ativação da apoptose extrínseca por indução da expressão do ligante Fas (FasL) e ativação do receptor de morte Fas. Também, JNK pode induzir a degradação de Bcl-2 e a ativação da caspase 9 (Xu; Hu, 2020). Assim, pode-se sugerir que a apoptose induzida pelo OECEB em células SK-MEL-28 está envolvida a ativação das proteínas ERK1/2 e JNK1/2 que, por sua vez, estão sendo moduladas positivamente pelas ROS geradas após tratamento com esse óleo essencial.

Quanto a proteína p38 MAPK, o tratamento com o OECEB reduziu o percentual de células marcadas com os anticorpos anti-p38 MAPK e, no ensaio do MTT, o pré-

tratamento com o inibidor de p38 MAPK (PD 169316) aumentou significativamente a citotoxicidade do OEGB. A inibição da atividade da p38 MAPK envolvida com o efeito antitumoral de óleos essenciais tem sido relatada na literatura. O efeito antitumoral dos óleos essenciais de bergamota, obtidos a partir da raspagem da casca do fruto da espécie *Citrus bergamia* (Rutaceae), sobre células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y, envolve a inibição de p38 MAPK (Navarra *et al.*, 2015). De forma semelhante, o óleo essencial das raízes de *Saussurea lappa* (Asteraceae) induziu apoptose de células de linhagens de carcinoma hepatocelular humano (SMMC-7721 e Hep3B) por inibição da p38 MAPK, de forma dependente de concentração (Lin *et al.*, 2016). Por fim, a literatura reporta um *crosstalk* entre as proteínas JNK e p38 MAPK, esta última sendo regulada negativamente pela JNK (Yue; López, 2020). Diante disso, e considerando o efeito antiapoptótico da p38 MAPK (Yue; López, 2020), pode-se sugerir que a apoptose das células SK-MEL-28 após o tratamento com o OEGB pode envolver mecanismo inibitório da p38 MAPK pela JNK.

Prosseguindo com a elucidação dos mecanismos de ação antimelanoma do OEGB, a marcação das células SK-MEL-28 com anticorpos anti-PKB/AKT e citometria de fluxo, foi evidenciada ativação da proteína PKB/AKT após o tratamento com o OEGB. Este mecanismo de ação antitumoral também foi observado para diferentes frações do óleo essencial de resinas de goma de *Boswellia sacra* (Burseraceae) em células Panc-28 (adenocarcinoma pancreático humano). Neste trabalho, observou-se que os níveis da expressão de PKB/AKT fosforilada aumentaram rapidamente, com pico em 15 minutos de tratamento. Posteriormente, foram observadas diminuições graduais dessa expressão e, após 2 horas de tratamento, os níveis de PKB/AKT ativa foram estatisticamente iguais aos grupos não tratados (Ni *et al.*, 2012). Tem sido evidenciado que a ativação de PKB/AKT pode ser mediada por ROS e que esta proteína está envolvida com indução de estresse oxidativo em células tumorais (Shiau *et al.*, 2022). Diante disso, é possível sugerir que a ativação da via de sinalização da proteína PKB/AKT está envolvida com o efeito antitumoral *in vitro* do OEGB.

Por fim, a marcação das células SK-MEL-28 com anticorpos anti-NF- κ B (p65) e posterior análise por citometria de fluxo, mostrou que este óleo essencial induz a ativação dessa proteína. Tal efeito também foi observado em células KB após tratamento com o óleo essencial de *Artemisia capillaris* (Asteraceae). Neste estudo, observou-se a degradação do I κ B α citosólico, o aumento da translocação nuclear da

proteína RelA (p65), bem como o aumento da ligação do NF- κ B ao DNA após tratamento das células KB com esse óleo essencial (Cha *et al.*, 2009). Em adição, moléculas isoladas de óleos essenciais também têm demonstrado efeito antitumoral por indução da ativação do NF- κ B. O efeito antitumoral do limoneno, um dos monoterpenos constituintes do OECEB, em células da linhagem de linfoma murino BW5147 envolveu o aumento da translocação nuclear do NF- κ B (Manuele *et al.*, 2009). Ainda, o álcool patchouli obtido do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) apresentou significativa citotoxicidade frente células das linhagens HCT-116 e SW480 (adenocarcinoma de cólon humano) por aumento da atividade transcricional do NF- κ B. Em adição, por *western blot*, também foi observado aumento significativo do nível de p65 no núcleo de células HCT-116, corroborando o envolvimento da ativação da via do NF- κ B no efeito antitumoral do álcool patchouli (Jeong *et al.*, 2013). Dados da literatura demonstram que o estresse oxidativo está envolvido com a ativação do NF- κ B (Wei *et al.*, 2016) e que a ativação dessa via de sinalização está envolvida com a indução de apoptose em células tumorais por envolvimento da via extrínseca após induzir do aumento da expressão do receptor de morte 4 (DR4) (Jin *et al.*, 2005). Por fim, reporta-se que a PKB/AKT modula positivamente o NF- κ B (Lingappan, 2018). Diante disso, pode-se sugerir que o estresse oxidativo causado pelo tratamento com o OECEB pode estar envolvido à ativação da via do NF- κ B e que este efeito também pode estar associado a atividade da PKB/AKT, ativada após tratamento com esse óleo essencial.

Diante do exposto, é possível sugerir que o OECEB exerça efeito antimelanoma *in vitro* por indução da apoptose mediada pela modulação, dependente de estresse oxidativo, da atividade de ERK1/2, JNK, p38 MAPK, PKB/AKT e NF- κ B.

O desenvolvimento de novos medicamentos é um processo de múltiplas etapas, baseado na identificação de candidatos a drogas e na avaliação da eficácia terapêutica e segurança, o que inclui ensaios da pesquisa não-clínica (Deore *et al.*, 2019). Neste contexto, os testes de toxicidade não-clínica de compostos bioativos permitem a investigação de efeitos tóxicos em células e/ou modelos animais, destacando-se o modelo de peixe-zebra (Adhish, Manjubala, 2023).

Os peixe-zebra (*Danio rerio*), do inglês *zebrafish*, são organismos nativos do sul asiático (Aleström *et al.*, 2020), pertencentes à família Cyprinidae (Campos-Sánchez, Esteban, 2020). O genoma destes animais possui cerca de 70% de

homologia com o genoma humano (Howe *et al.*, 2013; Patton; Zon; Langenau, 2021), apresentando-se como um ensaio de toxicidade altamente sensível (Dubey *et al.*, 2013) e adequado para investigação da ação de substâncias químicas no organismo (Macrae; Peterson, 2023).

Atualmente, diversos ensaios de toxicidade em peixe-zebra encontram-se disponíveis e incluem o teste de toxicidade aguda de embrião de peixe (FET) (Chahardehi; Arsad; Lim, 2020) validado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, do inglês “Organisation for Economic Co-operation and Development”) sob teste nº 236 (OECD, 2013). Neste teste, para avaliação da toxicidade aguda, as larvas de peixe-zebra, com algumas horas pós-fertilização (hpf) são acondicionadas em placas de 96 poços (Deore *et al.*, 2019) e expostas a candidatos a fármacos ou outras substâncias químicas por um período de 96 h. A cada 24 h de exposição, *endpoints* de letalidade são avaliados. No final do período de exposição, a Concentração Letal média (LC₅₀) pode ser calculada (OECD, 2013).

O presente estudo fornece a avaliação da toxicidade do OEGB em embriões e larvas de peixe-zebra. Nenhuma mortalidade de embriões ou larvas foi observada para as menores concentrações do OEGB (0,50 e 0,75 µg/mL) após 96 h de exposição. No entanto, concentrações crescentes desse óleo essencial foram relacionadas à mortalidade de maneira dependente da concentração, conforme observado para outros óleos essenciais (Mektrirat *et al.*, 2020; Akermi *et al.*, 2022).

Além disso, a concentração letal mediana (CL₅₀) foi considerada baixa (1,20 µg/mL). No entanto, resultados semelhantes relacionados à alta toxicidade no modelo peixe-zebra foram registrados para outros óleos essenciais de diferentes espécies, incluindo *Zingiber ottensii* (Zingiberaceae) (CL₅₀: 1,00 µg/mL), composto principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (Thitinarongwate *et al.*, 2021), e *Cupressus sempervirens* (Cupressaceae) (CL₅₀: 6,60 µg/mL) cujo composto majoritário é o α-pineno, um monoterpeno (Howe *et al.*, 2013). Não foram encontrados resultados de embriotoxicidade em peixe-zebra em relação ao EZ, o principal composto do OEGB. Além disso, este é o primeiro relato de toxicidade do óleo essencial da espécie *Conyza bonariensis* neste modelo experimental.

Em adição, eclosão retardada, edema de saco vitelino, edema pericárdico e coagulação sanguínea foram observados em embriões expostos a concentrações de

0,5-1,25 µg/mL do OEGB. Da mesma forma, o óleo essencial das partes aéreas de *Leonurus japonicus* (Lamiaceae), rico em fitol e óxido de (–)-cariofileno, induziu efeitos como edema do saco vitelino, coluna curvada, hemorragias dispersas no saco vitelino edemaciado, desenvolvimento cardíaco incompleto e edema pericárdico (HE et al., 2018). Piasecki e colaboradores (2021) observaram caudas encurtadas após exposição de embriões ao óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (Poaceae). Além disso, embriões tratados com óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (Poaceae) mostraram caudas ligeiramente encurtadas e alterações cardíacas leves. Em adição, embriões tratados com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Poaceae) e *Cymbopogon martini* (Poaceae) mostraram desenvolvimento ligeiramente retardado e caudas encurtadas, respectivamente. Todos esses óleos essenciais possuem monoterpenos como compostos majoritários, como o geraniol e o citronelol. Em concentrações mais baixas, todos eles contêm limoneno (0,7-10%) (Piasecki et al., 2021). Nota-se, portanto, a significativa sensibilidade desses organismos à ação de substâncias químicas, facilitando a busca de informações sobre a toxicidade dos óleos essenciais, o que contribui para o desenvolvimento de potenciais medicamentos.

Também foi investigado o efeito do OEGB na atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH), glutatona transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) em larvas de peixe-zebra.

A AChE é responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) (Asghar et al. 2020), uma molécula neurotransmissora que desempenha um papel importante nos sistemas nervoso central e periférico (Haridevamuthu et al., 2022). O OEGB (0,12, 0,25 ou 0,50 µg/mL) reduziu a atividade da AChE, indicando uma provável toxicidade no sistema colinérgico. A diminuição da atividade dessa enzima é relatada quando há aumento do estresse oxidativo (Pullaguri et al., 2019).

As células precisam de energia para reparar o estresse oxidativo. A LDH envolve uma via anaeróbica para atender à demanda de energia, portanto, o aumento da atividade da LDH pode ser usado como um biomarcador para o estresse oxidativo (Haridevamuthu et al., 2022). O OEGB (0,25 ou 0,50 µg/mL) aumentou a atividade da LDH, o que pode estar relacionado ao alto requerimento de energia nas larvas de peixe-zebra expostas ao tratamento (Lisboa et al., 2020).

A CAT é uma enzima antioxidante que converte peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio (Loughland et al., 2022). CAT é uma eliminadora de ROS que

reduz a concentração intracelular de H_2O_2 (Félix *et al.*, 2021). O OEGB (0,12, 0,25 ou 0,50 $\mu\text{g/mL}$) induziu aumento na atividade da CAT, sugerindo um mecanismo protetor contra um possível efeito oxidativo tóxico (Félix *et al.*, 2023).

As enzimas GPx e GST pertencem à família de enzimas relacionadas à glutathione presentes no sistema de defesa antioxidante do organismo (Haridevamuthu *et al.*, 2022). Portanto, o aumento da atividade de GPx e GST, observado após a exposição ao OEGB (0,25 ou 0,50 $\mu\text{g/mL}$, para ambas), pode estar associado ao aumento da capacidade antioxidante (Lisboa *et al.*, 2020).

Juntos, estes resultados indicam um desequilíbrio redox com modulação da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, possivelmente na tentativa de contrabalancear um possível aumento na produção de ROS induzido pelo OEGB.

Os resultados apresentados mostram a significativa atividade antitumoral *in vitro* de um óleo essencial inédito de *Conyza bonariensis* contra linhagens de células malignas humanas e toxicidade em modelo de peixe-zebra. Essas descobertas encorajam mais testes para a melhor caracterização do perfil de toxicidade e da atividade antimelanoma desse óleo essencial.

Conclusões

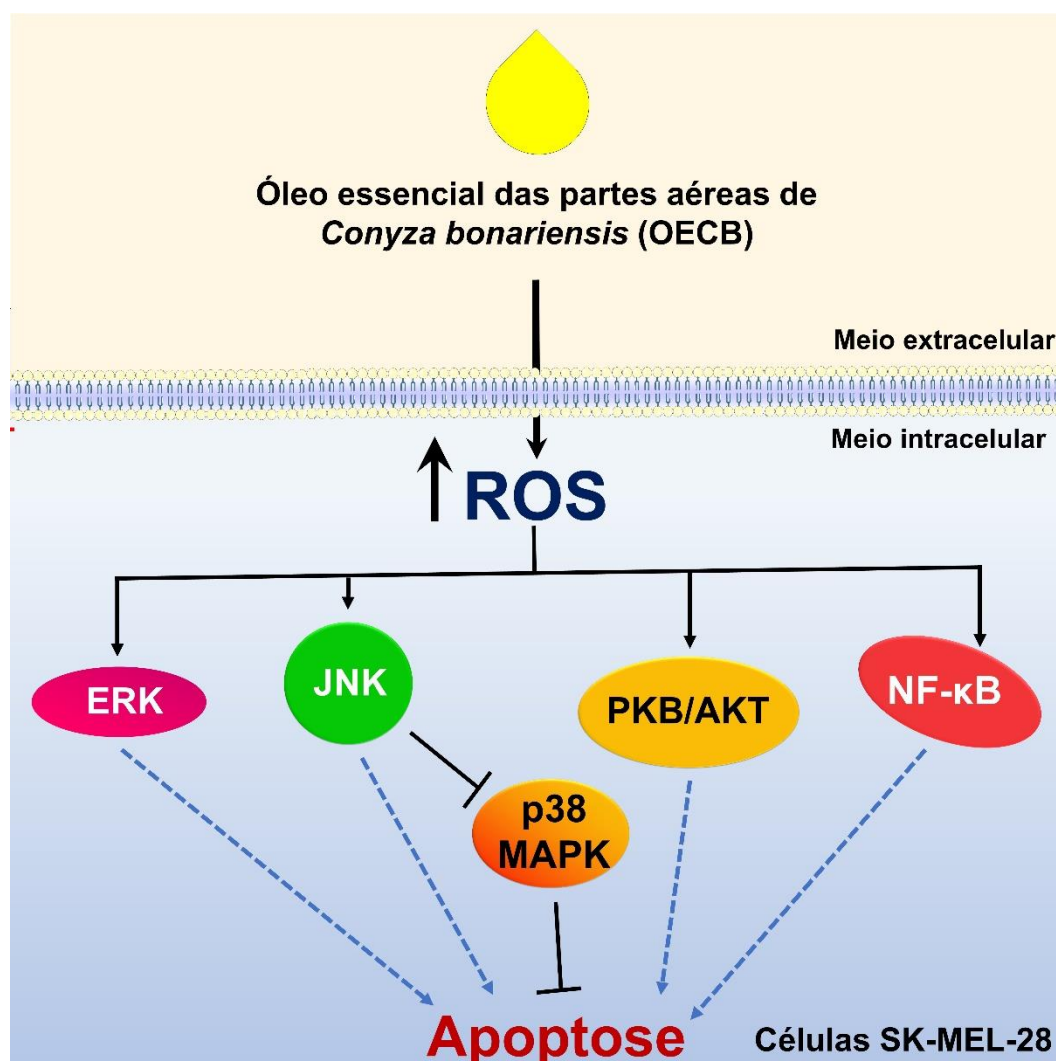
7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) apresentou como composto majoritário o éster (Z)-2-lacnofilum e efeito antitumoral *in vitro*, em especial em linhagem celular SK-MEL-28 (melanoma humano), e que a citotoxicidade foi mais seletiva para a linhagem de células SK-MEL-28 em comparação com a linhagem não tumoral HaCaT (queratinócitos humanos). Em adição, é possível concluir que este óleo essencial apresentou citotoxicidade dependente de concentração em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas.

Conclui-se que o OECB apresentou efeito antimelanoma *in vitro* por indução de apoptose dependente da indução de estresse oxidativo via aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). No estudo do *docking* molecular, o composto majoritário do OECB, éster (Z)-2-lacnofilum, apresentou interação favorável com as Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs) ERK1, JNK1 e p38 α MAPK, com a proteína cinase B (PKB/AKT) e com o Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B; p50-p65). Em adição, experimentos de citometria de fluxo e a utilização de inibidores das MAPKs permitem concluir que o efeito antimelanoma *in vitro* do OECB está associado ao aumento da atividade das proteínas ERK, JNK, PKB/AKT e NF- κ B, e redução da atividade de p38 MAPK (Figura 34).

Por fim, conclui-se que o OECB induziu toxicidade aguda em embriões e larvas do peixe-zebra e alteração da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra.

Figura 34. Mecanismos de ação do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB) em células SK-MEL-28



O OECB induz apoptose em células SK-MEL-28 (melanoma humano) dependente da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). O efeito antimelanoma *in vitro* do OECB é dependente da indução da atividade da Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK), da Proteína Cinase N-terminal c-Jun (JNK), da Proteína Cinase B (PKB/AKT) e do Fator Nuclear *kappa* B (NF-κB), e inibição da atividade da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 (p38 MAPK). Sugere-se que a ativação das proteínas ERK, JNK, p38 MAPK e NF-κB seja mediada pelas ROS geradas após o tratamento com o OECB. Em adição, sugere-se que a ativação da JNK module negativamente a atividade antiapoptótica da p38 MAPK.

Fonte: Elaborado pelo autor

Referências

REFERÊNCIAS

- AASHAQ, S.; BATOOL, A.; ANDRABI, K. I. TAK1 mediates convergence of cellular signals for death and survival. **Apoptosis**, v. 24, p. 3-20, 2019.
- ABARCA, J.M.H.; CHÁVEZ, A.J.P. Malignant nail melanoma in a case report. **J. Pharm. Negat.**, v. 14, p. 67-72, 2023
- ABD-ELGAWAD, A. M.; ASSAEED, A. M.; AL-ROWAILY, S. L.; ALSHAHRI, M. S.; BONANOMI, G.; ELSHAMY, A. I. Influence of season and habitat on the essential oils composition, allelopathy, and antioxidant activities of *Artemisia monosperma* Delile. **Separations**, v. 10, n. 4, p. 263, 2023.
- ABDELRAHMAN, K.; HASSAN, H.; ABDEL-AZIZ, S.; MARZOUK, A.; NARUMI, A.; KONNO, H.; ABDEL-AZIZ, M. JNK signaling as a target for anticancer therapy. **Pharmacol. Rep.**, v. 73, p. 405-434, 2021.
- ABDULLAH, L.; HILLS, L. B.; WINTER, E. B.; HUANG, Y. H. Diverse Roles of Akt in T cells. **Immunometabolism**, v. 3, n. 1, 2021.
- ADANDE, K.; ELOH, K.; SIMALOU, O.; BAKAÏ, M.F.; CABONI, P. Chemical composition of different extracts of *Conyza bonariensis*: insecticidal and nematocidal activities. **Am. J. Anal. Chem.**, v. 14, p. 95-120, 2023
- ADHISH, M.; MANJUBALA, I. Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases—A review of models. **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. E14557, 2023.
- AFSHIN, F.; BOHLOOLI, M.; MAGHSOUDI, A.; SHEIKHNEJAD, R.; KHAJEH, M.; KHATIBI, A.; GHAFFARI-MOGHADDAME, M.; GHAMARI, F.; SHEIBANI, N. Anti-tumor activity of ginger extracts in MCF-7 breast cancer cells. **J. Food Bioprocess. Eng.**, 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 6^a ed., Brasil, 2019.
- AHMAD, A.; AHSAN, H. Ras-mediated activation of NF-κB and DNA damage response in carcinogenesis. **Cancer Invest.**, v. 38, n. 4, p. 185-208, 2020.
- AHMAD, T.; EAPEN, M. S.; ISHAQ, M.; PARK, A. Y.; KARPINIEC, S. S.; STRINGER, D. N.; SOHAL, S. S.; FITTON, J. H.; GUVEN, N.; CARUSO, V.; ERI, R. Anti-inflammatory activity of fucoidan extracts *in vitro*. **Mar. Drugs**, v. 19, n. 12, p. 702, 2021.
- AHMADIAN, E.; EFTEKHARI, A.; BABAEI, H.; NAYEBI, A. M.; EGHBAL, M. A. Anti-cancer effects of citalopram on hepatocellular carcinoma cells occur via cytochrome C release and the activation of NF-κB. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 17, n. 11, p. 1570-1577, 2017.
- AHN, S.; KWON, A.; OH, Y.; RHEE, S.; SONG, W. K. Microtubule acetylation-specific inhibitors induce cell death and mitotic arrest via JNK/AP-1 activation in triple-negative breast cancer cells. **Mol. Cells**, v. 46, n. 6, p. 387, 2023.

AKERMI, S.; SMAOUI, S.; ELHADEF, K.; FOURATI, M.; LOUHICHI, N.; CHAARI, M.; MTIBAA, A.C.; BAANANNOU, A.; MASMOUDI, S.; MELLOULI, L. *Cupressus sempervirens* essential oil: exploring the antibacterial multitarget mechanisms, chemcomputational toxicity prediction, and safety assessment in zebrafish embryos. **Molecules**, v. 27, p. 2630, 2022.

ALBASHER, G.; ALKAHTANE, A.A.; SAUD ALARIFI, D.A.; ALESSIA, M.S.; ALMEER, R.S.; ABDEL-DAIM, M.M.; AL-SULTAN, N.K.; AL-QAHTANI, A.A.; ALI, H.; ALKAHTANI, S. Methotrexate-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma SKOV-3 cells via ROS-mediated bax/bcl-2-cyt-c release cascading. **OncoTargets Ther.**, v. 12, p. 21, 2019.

AL-BEDEARY, S.; GETTA, H. A.; AL-SHARAFI, D. The hallmarks of cancer and their therapeutic targeting in current use and clinical trials. **Iraqi J. Hematol.**, v. 9, n. 1, p. 1, 2020.

ALESTRÖM, P.; D'ANGELO, L.; MIDTLYNG, P. J.; SCHORDERET, D. F.; SCHULTE-MERKER, S.; SOHM, F.; WARNER, S. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. **Lab. Anim.**, v. 54, n. 3, p. 213-224, 2020.

ALEXAKI, V.; JAVELAUD, D.; MAUVIEL, A. JNK supports survival in melanoma cells by controlling cell cycle arrest and apoptosis. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v. 21, n. 4, p. 429-438, 2008.

ALHARTHI, F. S.; QARI, A.; EDRESS, A.; ABEDALTHAGAFI, M. Familial/inherited cancer syndrome: a focus on the highly consanguineous Arab population. **NPJ Genom. Med.**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2020.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, M.; MALUMBRES, M. Preparing a cell for nuclear envelope breakdown: spatio-temporal control of phosphorylation during mitotic entry. **Bioessays**, v. 36, n. 8, p. 757-765, 2014.

AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L.A.; BIZZO, H.R.; MACHADO, M.P.; SILVA, L.E. Yield and chemical composition of the essential oil of species of the Asteraceae family from Atlantic Forest, South of Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v. 30, p. 278-284, 2018.

AN, Z.; FENG, X.; SUN, M.; WANG, Y.; WANG, H.; GONG, Y. Chamomile essential oil: chemical constituents and antitumor activity in MDA-MB-231 cells through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Chem. Biodivers.**, v. 20, p. e202200523, 2023.

ARAGÃO, L. W.; FERNANDES, S. S. L.; MALLMANNA, V.; FACCO, J. T.; MATOS, M. F. C.; CABRAL, M. R. P.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; CARDOSO, C. A. L.; SILVA, R. C. L.; ANJOS, A.; SIMIONATTO, E. Chemical composition and evaluation of antitumoral activity of leaf and root essential oils of *Conyza canadensis* (Asteraceae). **Electron. J. Chem.**, p. 284-291, 2019.

ARANHA, E.S.P.; AZEVEDO, S.G.; REIS, G.G.; LIMA, E.S.; MACHADO, M.B.; VASCONCELLOS, M.C. Essential oils from *Eugenia* spp.: *In vitro* antiproliferative potential with inhibitory action of metalloproteinases. **Ind. Crops Prod.**, v. 141, p. 111736, 2019.

ARAÚJO, L.; MOUJIR, L.M.; ROJAS, J.; ROJAS, L.; CARMONA, J.; RONDÓN, M. chemical composition and biological activity of *Conyza bonariensis* essential oil collected in Mérida, Venezuela. **Nat. Prod. Commun.**, v. 8, p. 1175-1178, 2013.

ARNOLD, M.; SINGH, D.; LAVERSANNE, M.; VIGNAT, J.; VACCARELLA, S.; MEHEUS, F.; CUST, A.E.; VRIES, E.; WHITEMAN, D.C.; BRAY, F. Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040. **JAMA Dermatol.**, v. 158, p. 495-503, 2022.

ASGHAR, A.; YOUSUF, M.; FAREED, G.; NAZIR, R.; HASSAN, A.; MAALIK, A.; NOOR, T.; IQBAL, N.; RASHEED, L. Synthesis, acetylcho-linesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) activities, and molecular docking studies of a novel compound based on combination of flurbiprofen and isoniazide. **RSC Adv.**, 10, 19346-19352, 2020.

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

ASHIKAWA, K.; SHISHODIA, S.; FOKT, I.; PRIEBE, W.; AGGARWAL, B. B. Evidence that activation of nuclear factor- κ B is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. **Biochem. Pharmacol.**, v. 67, n. 2, p. 353-364, 2004.

ASQAROV, A. N.; BEKMIRZAEVA, N. B.; USMANOVA, Z. U. MAIN SIDE EFFECTS OF ANTITUMOR CHEMOTHERAPY. **Int. J. Med. Sci. Clin. Res.**, v. 3, n. 3, p. 107-109, 2023.

AZEEM, M.; ZAMAN, T.; TAHIR, M.; HARIS, A.; IQBAL, Z.; BINYAMEEN, M.; MOZŪRAITIS, R. Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. **Ind. Crops Prod.**, v. 140, p. 111609, 2019.

AZMANOVA, M.; PITTO-BARRY, A. Oxidative stress in cancer therapy: friend or enemy?. **Chem Biochem.**, v. 23, n. 10, p. e202100641, 2022.

BAE, E. S.; BYUN, W. S.; OCK, C. W.; KIM, W. K.; PARK, H. J.; LEE, S. K. Periplocin exerts antitumor activity by regulating Nrf2-mediated signaling pathway in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. **Biomed. Pharmacother.**, v. 157, p. 114039, 2023.

BAHAR, E.; HAN, S. Y.; KIM, J. Y.; YOON, H. Chemotherapy resistance: Role of mitochondrial and autophagic components. **Cancers**, v. 14, n. 6, p. 1462, 2022.

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

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

BALUAPURI, A.; WOLF, E.; EILERS, M. Target gene-independent functions of MYC oncoproteins. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 21, n. 5, p. 255-267, 2020.

BANKÓ, C., NAGY, Z. L., NAGY, M., SZEMÁN-NAGY, G. G., REBENKU, I., IMRE, L., TIBA, A.; HAJDU, A.; SZÖLLŐSI, J.; KÉKI, S.; BACSO, Z. Isocyanide substitution in acridine orange shifts DNA damage-mediated phototoxicity to permeabilization of the lysosomal membrane in cancer cells. **Cancers**, v. 13, n. 22, p. 5652, 2021.

BAPTISTA-SILVA, S.; BORGES, S.; RAMOS, O.L.; PINTADO, M.; SARMENTO, B. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. **J. Essent. Oil Res.**, v. 32, p. 279-295, 2020.

BARADARAN, P. C.; KOZOVSKA, Z.; FURDOVA, A.; SMOLKOVA, B. Targeting epigenetic modifications in uveal melanoma. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 15, p. 5314, 2020.

BARANČÍK, M.; BOHÁČOVÁ, V.; KVAČKAJOVÁ, J.; HUDEC OVÁ, S.; KRIŽANOVÁ, O. G.; BREIER, A. SB203580, a specific inhibitor of p38-MAPK pathway, is a new reversal agent of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 14, n. 1, p. 29-36, 2001.

BARROSO-SOUSA, R.; SHAPIRO, G. I.; TOLANEY, S. M. Clinical development of the CDK4/6 inhibitors ribociclib and abemaciclib in breast cancer. **Breast Care**, v. 11, n. 3, p. 167-173, 2016.

BASTIDA, F.; MENÉNDEZ, J.; CAMACHO, D.; GONZÁLEZ-ANDÚJAR, J. L. Season-long seed dispersal patterns of the invasive weed *Erigeron bonariensis* in south-western Spain. **Crop Protection**, v. 148, p. 105720, 2021.

BENDRIS, N.; LEMMERS, B.; BLANCHARD, J. M. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. **Cell Cycle**, v. 14, n. 12, p. 1786-1798, 2015.

BENZARTI, A.; HAMMAMI, S.; PIRAS, A.; FALCONIERI, D.; ELMOKNI, R.; M'HENNI, M.F.; MIGHRI, Z. Effects of different ecological conditions and extraction techniques on the quality of volatile oils from flaxleaf fleabane (*Erigeron bonariensis* L.). **J. Med. Plant Res.**, v. 7, p. 3059-3065, 2013.

BETSOU, F.; GAIGNAUX, A.; AMMERLAAN, W.; NORRIS, P.J.; STONE, M. Biospecimen science of blood for peripheral blood mononuclear cell (PBMC) functional applications. **Curr. Pathobiol. Rep.**, v. 7, p. 17-27, 2019.

BHAGAT, J.; ZANG, L.; NISHIMURA, N.; SHIMADA, Y. Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. **Sci. Total Environ.**, v. 728, p. 138707, 2020.

BISHOP, D. T.; DEMENAI, F.; ILES, M. M.; HARLAND, M.; TAYLOR, J. C.; CORDA, E.; BISHOP, J. A. N. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. **Nat. Genet.**, v. 41, n. 8, p. 920-925, 2009.

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

BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 21, n. 2, p. 85-100, 2020.

- BODEGA, G.; ALIQUE, M.; PUEBLA, L.; CARRACEDO, J.; RAMÍREZ, R. M. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. **J. Extracell. Vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1626654, 2019.
- BOICE, A.; BOUCHIER-HAYES, L. Targeting apoptotic caspases in cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, p. 118688, 2020.
- BOMAR, L.; SENITHILNATHAN, A.; AHN, C. Systemic therapies for advanced melanoma. **Dermatol. Clin.**, v. 37, n. 4, p. 409-423, 2019.
- BONAMY, C.; PESNEL, S.; BEN HADDADA, M.; GORGETTE, O.; SCHMITT, C.; MOREL, A. L.; SAUVONNET, N. Impact of green gold nanoparticle coating on internalization, trafficking, and efficiency for photothermal therapy of skin cancer. **ACS Omega**, v. 8, n. 4, p. 4092-4105, 2023.
- BOTTERI, E.; BORRONI, E.; SLOAN, E. K.; BAGNARDI, V.; BOSETTI, C.; PEVERI, G.; SANTUCCI, C.; SPECCHIA, C.; VAN DEN BRANDT, P.; GALLUS, S.; LUGO, A. Smoking and colorectal cancer risk, overall and by molecular subtypes: a meta-analysis. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 115, n. 12, p. 1940-1949, 2020.
- BOUTRY, J.; TISSOT, S.; UJVARI, B.; CAPP, J. P.; GIRAUDEAU, M.; NEDELCO, A. M.; THOMAS, F. The evolution and ecology of benign tumors. **Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer**, v. 1877, n. 1, p. 188643, 2022.
- BRAICU, C.; BUSE, M.; BUSUIOC, C.; DRULA, R.; GULEI, D.; RADULY, L.; RUSU, A.; IRIMIE, A.; ATANASOV, A. G.; SLABY, O.; IONESCU, C.; BERINDAN-NEAGOE, I. A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer. **Cancers**, v. 11, n. 10, p. 1618, 2019.
- BRANDMAIER, A.; HOU, S-Q; SHEN, W. H. Cell cycle control by PTEN. **J. Mol. Biol.**, v. 429, n. 15, p. 2265-2277, 2017.
- BRANTLEY-FINLEY, C.; LYLE, C. S.; DU, L.; GOODWIN, M. E.; HALL, T.; SZWEDO, D.; KAUSHAL, G. P.; CHAMBERS, T. C. The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, n. 3, p. 459-469, 2003.
- BUCHBINDER, E. I.; GIOBBIE-HURDER, A.; OTT, P. A. A phase I/II study of MCS110 with BRAF/MEK inhibition in patients with melanoma after progression on BRAF/MEK inhibition. **Invest. New Drug**, v. 41, n. 3, p. 365-370, 2023.
- BUSCÀ, R.; POUYSSÉGUR, J.; LENORMAND, P. ERK1 and ERK2 map kinases: specific roles or functional redundancy?. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 4, p. 53, 2016.
- CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and risk factors of melanoma. **Surg. Clinics**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2020.
- CABRERA-PÉREZ, C.; ROYO-ESNAL, A.; RECASENS, J. Herbicidal effect of different alternative compounds to control *Conyza bonariensis* in vineyards. **Agronomy**, v. 12, n. 4, p. 960, 2022.

CAMPOS-SÁNCHEZ, J.; ESTEBAN, M. Review of inflammation in fish and value of the zebrafish model. **J. Fish Dis.**, v. 44, n. 2, p. 123-139, 2021.

CANOVAS, B.; NEBRED, A. R. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 22, n. 5, p. 346-366, 2021.

CAO, W.; TIAN, R.; PAN, R.; SUN, B.; XIAO, C.; CHEN, Y.; LEI, S. Terpinen-4-ol inhibits the proliferation and mobility of pancreatic cancer cells by downregulating Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2. **Bioengineered**, v. 13, p. 8643-8656, 2022.

CAO, Y.; ZHANG, Q.; HAN, Y.; HUANG Z.; CHAI, Z.; LIU, J.; WANG, J.; SUN, Z.; ZHAO, T.; WANG, G.; CHEN, G.; LI, Q.; HONG, X. VHL expression level in the pathological tissue is significantly associated with hematotoxicity of platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. **Res. Sq.**, v. 2021, p. 1-14, 2021.

CAPPELLI, G.; GIOVANNINI, D.; VILARDO, L.; BASSO, A.; IANNETTI, I.; MASSA, M.; RUBERTO, G.; MUIR, R.; PASTORE, C.; D'AGNANO, I.; MARIANI, F. *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil inhibits metastatic melanoma cell proliferation by triggering an in-complete tumour cell stress response. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, p. 5698, 2023.

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

CARRASCO, N.; GARRIDO, M.; MONTENEGRO, I.; MADRID, A.; HARTLEY, R.; GONZÁLEZ, I.; RUBILAR, M.; VILLENA J.; VALENZUELA-VALDERRAMA, M. Antitumoral activity of *Leptocarpha rivularis* flower extracts against gastric cancer cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 1439, 2023.

CATALANI, S.; PALMA, F.; BATTISTELLI, S.; BENEDETTI, S. Oxidative stress and apoptosis induction in human thyroid carcinoma cells exposed to the essential oil from *Pistacia lentiscus* aerial parts. **PloS one**, v. 12, p. e0172138, 2017.

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

CAULFIELD, S. E.; DAVIS, C. C.; BYERS, K. F. Olaparib: a novel therapy for metastatic breast cancer in patients with a BRCA_{1/2} mutation. **J. Adv. Pract. Oncol.**, v. 10, n. 2, p. 167, 2019.

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

CENTENO, P. P.; PAVET, V.; MARAIS, R. The journey from melanocytes to melanoma. **Nat. Rev. Cancer**, p. 1-19, 2023.

CHA, J. D.; MOON, S. E.; KIM, H. Y.; CHA, I. H.; LEE, K. Y. Essential oil of *Artemisia capillaris* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase

activation mediated by MAPK-stimulated signaling pathway. **J. Food Sci.**, v. 74, n. 9, p. T75-T81, 2009.

CHA, J-D; KIM, Y-H; KIM, J-Y. Essential oil and 1, 8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 19, p. 185-191, 2010.

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

CHAMALI, S.; BOUAJILA, J.; BEN DAOUD, H.; CAMY, S.; SAADAOUI, E.; CONDORET, J. S.; ROMDHANE, M. Variation in chemical composition and biological properties of two Tunisian *Eucalyptus* essential oils under three eco-friendly extraction techniques. **J. Essent. Oil Res.**, v. 34, n. 1, p. 36-53, 2022.

CHAN, S. H.; CHIANG, J.; NGEOW, J. CDKN2A germline alterations and the relevance of genotype-phenotype associations in cancer predisposition. **Hered. Cancer Clin. Pract.**, v. 19, p. 1-9, 2021.

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

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

CHEN, H.; YUAN, J.; HAO, J.; WEN, Y.; LV, Y.; CHEN, L.; YANG, X. α -Humulene inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and induces apoptosis through the inhibition of Akt signaling. **Food Chem. Toxicol.**, v. 134, p. 110830, 2019.

CHEN, H-F.; CHUANG, H-C.; TAN, T-H. Regulation of dual-specificity phosphatase (DUSP) ubiquitination and protein stability. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 11, p. 2668, 2019.

CHEN, L.; LIU, S.; TAO, Y. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. **Signal Transduct. Target Ther.**, v. 5, n. 1, p. 1-25, 2020.

CHENG, C. H.; MA, H. L.; DENG, Y. Q.; FENG, J.; JIE, Y. K.; GUO, Z. X. Oxidative stress, cell cycle arrest, DNA damage and apoptosis in the mud crab (*Scylla paramamosain*) induced by cadmium exposure. **Chemosphere**, v. 263, p. 128277, 2021.

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

CHOI, J.; YIP-SCHNEIDER, M.; ALBERTIN, F.; WIESENAUER, C.; WANG, Y.; SCHMIDT, C. M. The effect of doxorubicin on MEK-ERK signaling predicts its efficacy in HCC. **J. Surg. Res.**, v. 150, n. 2, p. 219-226, 2008.

CHOUGULE, M. B.; PATEL, A. R.; JACKSON, T.; SINGH, M. Antitumor activity of Noscapine in combination with Doxorubicin in triple negative breast cancer. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17733, 2011.

CIFTCI, H.; SEVER, B.; BAYRAK, N.; YILDIZ, M.; YILDIRIM, H.; TATEISHI, H.; OTSUKA, M.; FUJITA, M.; TUYUN, A.F. *In vitro* cytotoxicity evaluation of plastoquinone analogues against colorectal and breast cancers along with *in silico* insights. **Pharmaceuticals**, v. 15, p. 1266, 2022.

CIVES, M.; MANNAVOLA, F.; LOSPALLUTI, L.; SERGI, M. C.; CAZZATO, G.; FILONI, E.; TUCCI, M. Non-melanoma skin cancers: Biological and clinical features. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 15, p. 5394, 2020.

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

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

COSTA, E.V.; SOUZA, C.A.S.; GALVÃO, A.F.C.; SILVA, V.R.; SANTOS, L.S.; DIAS, R.B.; ROCHA, C.A.G.; SOARES, M.B.P.; SILVA, F.M.A.; KOOLEN, H.H.F.; BEZERRA, D.P. *Duguetia pycnastera* Sandwith (Annonaceae) leaf essential oil inhibits HepG2 cell growth *in vitro* and *in vivo*. **Molecules**, v. 27, p. 5664, 2022.

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

DAS, A.; SARKAR, S.; BHATTACHARYYA, S.; GANTAIT, S. Biotechnological advancements in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 104, p. 4811-4835, 2020.

DATASUS. Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS)/Plataforma DATASUS-NET. Disponível em: <tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def> Acesso em setembro de 2023.

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

DAVIS, L.; SHALIN, S.; TACKETT, A. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biol. Ther.**, v. 20, n. 11, p. 1366-1379, 2019.

DEEPTHI, M.; JAYASHEELA, M.; TRIVENI, M. G.; GAYATHRI, G. V. Oral wound healing efficacy of 1% *Myristica fragrans* (nutmeg) determined using MTT assay: An *in vitro* study. **Int. J. Herb. Med.**, v. 11, n. 2, 2023.

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

DELGADO, C.; MENDEZ-CALLEJAS, G.; CELIS, C. Caryophyllene oxide, the active compound isolated from leaves of *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) with antiproliferative and apoptotic effects on PC-3 androgen-independent prostate cancer cell line. **Molecules**, v. 26, n. 20, p. 6142, 2021.

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

DENKERT, C.; SIEGERT, A.; LECLERE, A.; TURZYNSKI, A.; HAUPTMANN, S. An inhibitor of stress-activated MAP-kinases reduces invasion and MMP-2 expression of malignant melanoma cells. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 19, p. 79-85, 2002.

DEORE, A. B.; DHUMANE, J. R.; WAGH, R.; SONAWANE, R. The stages of drug discovery and development process. **Asian J. Pharm. Res. Dev.**, v. 7, n. 6, p. 62-67, 2019.

DHYANI, P.; QUISPE, C.; SHARMA, E.; BAHUKHANDI, A.; SATI, P.; ATTRI, D. C.; SZOPA, A.; SHARIF-RAD, J.; DOCEA, A. O.; MARDARE I.; CALINA, D.; CHO, W. C. Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. **Cancer Cell Int.**, v. 22, n. 1, p. 1-20, 2022.

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

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

DOMINGUES, I.; OLIVEIRA, R.; LOURENÇO, J.; GRISOLIA, C.K.; MENDO, S.; SOARES, A.M.V.M. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comp. Biochem.**, v. 152, p. 338-345, 2010.

DONG, L.; JIN, L.; TSENG, H. Y.; WANG, C. Y.; WILMOTT, J. S.; YOSUFI, B.; GUO, S. T. Oncogenic suppression of PHLPP1 in human melanoma. **Oncogene**, 33, 39, p. 4756-4766, 2014.

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

DRZEWIECKA, M.; GAJOS-MICHNIEWICZ, A.; HOSER, G.; JAŚNIAK, D.; BARSZCZEWSKA-PIETRASZEK, G.; SITAREK, P.; CZARNY, P.; PIEKARSKI, J.; RADEK, M.; CZYŻ, M.; SKORSKI, T.; ŚLIWIŃSKI, T. Histone deacetylases (HDAC) inhibitor—valproic acid sensitizes human melanoma cells to dacarbazine and PARP inhibitor. **Genes**, v. 14, n. 6, p. 1295, 2023.

DUARTE, S.S.; SILVA, D.K.F.; LISBOA, T.M.H.; GOUVEIA, R.G.; ANDRADE, C.C.N.; SOUSA, V.M.; FERREIRA, R.C.; MOURA, R.O.; GOMES, J.N.S.; SILVA, P.M. AZEVEDO, F.L.A.A.; KEESSEN, T.S.L.; GONÇALVES, J.C.R.; BATISTA, L.M.

SOBRAL, M.V. Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06. **Pharmacol. Rep.**, v. 74, p. 545-554, 2022.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S.A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. **Adv. Pharmacol. Sci.**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

EDIRIWEERA, M. K.; TENNEKOON, K.H.; SAMARAKOON, S. R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. **Semin. Cancer Biol.**, 147-160, 2019.

ELBE, H.; YIGITTURK, G.; CAVUSOGLU, T.; UYANIKGIL, Y.; OZTURK, F. Apoptotic effects of thymol, a novel monoterpene phenol, on different types of cancer. **Bratisl. Lek. Listy**, v. 121, p. 122-128, 2020.

ELDEHNA, W. M.; ABO-ASHOUR, M. F.; AL-WARHI, T.; AL-RASHOOD, S. T.; ALHARBI, A.; AYYAD, R. R.; AL-KHAYAL, K.; ABDULLA, M.; ABDEL-AZIZ, H.; AHMAD, R.; EL-HAGGAR, R. Development of 2-oindolin-3-ylidene-indole-3-carbohydrazide derivatives as novel apoptotic and anti-proliferative agents towards colorectal cancer cells. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 36, n. 1, p. 319-328, 2021.

ELGAMAL, A.M.; AHMED, R.F.; ABD-ELGAWAD, A.M.; EL GENDY, A.E.N.G.; ELSHAMY, A.I.; NASSAR, M.I. Chemical profiles, anti-cancer, and anti-aging activities of essential oils of *Pluchea dioscoridis* (L.) DC. and *Erigeron bonariensis* L. **Plants**, v. 10, p. 667, 2021.

EL-HUSSEIN, A.; MANOTO, S. L.; OMBINDA-LEMBOUMBA, S.; ALROWAILI, Z. A.; MTHUNZI-KUFA, P. A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung cancer treatment. **Anti-Cancer Agents Med. Chem.**, v. 21, n. 2, p. 149-161, 2021.

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

ELLISON, P. M.; ZITELLI, J. A.; BRODLAND, D. G. Mohs micrographic surgery for melanoma: a prospective multicenter study. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 81, n. 3, p. 767-774, 2019.

ERICKSON, C. A.; TESSIER, C. R.; GROSS, C.; PEDAPATI, E. V.; WINK, L. K.; DOMINICK, K. C.; SHAFFER, R. C.; ROSSELOT, H.; HONG, M. P.; BANTEL, A. P.; BERRY-KRAVIS, E.; HORN, P. S.; ADAMS, R.; SWEENEY, J. A. Lymphocytic extracellular signal-regulated kinase dysregulation in autism spectrum disorder. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, v. 62, n. 5, p. 582-592. e2, 2023.

ESPINOZA, R. V.; PEÑARRETA, J.; QUIJANO-AVILÉS, M.; LUCAS, A. B.; CHÓEZ-GUARANDA, I.; SANTANA, P. M. Antioxidant activity and GC-MS profile of *Conyza bonariensis* L. leaves extract and fractions. **Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín**, v. 73, n. 3, p. 9305-9313, 2020.

FÉLIX, L. M.; LUZIO, A.; ANTUNES, L.; COIMBRA, A.M.; VALENTIM, A.M. Malformations and mortality in zebrafish early stages associated with elevated caspase activity after 24 h exposure to MS-222. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 412, p. 115385, 2021.

FÉLIX, L.; CARREIRA, P.; PEIXOTO, F. Effects of chronic exposure of naturally weathered microplastics on oxidative stress level, behaviour, and mitochondrial function of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 310, p. 136895, 2023.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **Int. J. Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778-789, 2021.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour Fragr. J.**, v. 23, p. 213-226, 2008.

FILHO, W. E. M., ALMEIDA-SOUZA, F., VALE, A. A. M., VICTOR, E. C., ROCHA, M. C. B., SILVA, G. X., TELES A. M.; NASCIMENTO, F. R. F.; MORAGAS-TELLIS, C. J.; CHAGAS, M. S. S.; BEHRENS, M. D.; HARDOIM, D. J.; TANIWAKI, N. N.; LIMA, J. A.; ABREU-SILVA, A. L.; COSTA, R. M. G.; CALABRESE, K. S.; AZEVEDO-SANTOS, A. P. S.; NASCIMENTO, M. D. D. S. B. Antitumor effect of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract in LNCaP cells and in the solid Ehrlich carcinoma model. **Cancers**, v. 15, n. 9, p. 2544, 2023.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3rd ed.; Cambridge University Press, Cambridge, London, 1971.

FLORENT, L.; SABY, C.; SLIMANO, F.; MORJANI, H. BRAF V600-Mutated metastatic melanoma and targeted therapy resistance: an update of the current knowledge. **Cancers**, v. 15, n. 9, p. 2607, 2023.

FOO, J. B.; NG, L. S.; LIM, J. H.; TAN, P. X.; LOR, Y. Z.; LOO, J. S. E.; HOW, C. W. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by copper complex Cu (SBCM) 2 towards oestrogen-receptor positive MCF-7 breast cancer cells. **RSC advances**, v. 9, n. 32, p. 18359-18370, 2019.

FUCHS, S.Y.; ADLER, V.; PINCUS, M.R.; RONAI, Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, n. 18, p. 10541–10546, 1998.

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

GAO, W.; GUO, X. M.; WANG, H. L.; ZHAO, R. H.; XIE, G. S.; LI, C.; HUANG, J. A double staining method using calcofluor white and acridine orange to differentiate life stages of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) on hepatopancreatic sections. **Aquaculture**, v. 528, p. 735628, 2020.

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

GAŠPAROVIĆ, A. C. **Free Radic. Res. Cancer**. v. 9, n. 2, p. 157, 2020.

GHAVAM, M. *Heracleum persicum* Desf. ex Fisch., CA Mey. & Avé-Lall. fruit essential oil: content, antimicrobial activity and cytotoxicity against ovarian cancer cell line. **BMC Complement. Med. Ther.**, v. 23, p. 87, 2023.

GINZBURG, S.; GOLOVINE, K. V.; MAKHOV, P. B.; UZZO, R. G.; KUTIKOV, A.; KOLENKO, V. M. Piperlongumine inhibits NF- κ B activity and attenuates aggressive growth characteristics of prostate cancer cells. **Prostate**, v. 74, n. 2, p. 177-186, 2014.

GIRMA, Y.; JIRU, T. Evaluation of antimicrobial activity of *Conyza bonariensis* leaf extracts against clinically isolated fungi causing superficial infection. **J. Chem.**, v. 2021, p. 1-8, 2021.

GONG, G.; GANESAN, K.; XIONG, Q.; ZHENG, Y. Anti-invasive and anti-migratory effects of ononin on human osteosarcoma cells by limiting the MMP2/9 and EGFR-Erk1/2 pathway. **Cancers**, v. 15, n. 3, p. 758, 2023.

GONG, L.; ZHANG, Y.; LIU, C.; ZHANG, M.; HAN, S. Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy. **Int. J. Nanomedicine**, p. 1083-1102, 2021.

GORLICK, R.; MARIS, J. M.; HOUGHTON, P. J.; LOCK, R.; CAROL, H.; KURMASHEVA, R. T.; KOLB, E. A.; KEIR, S. T.; REYNOLDS, P.; KANG, M. H.; BILLUPS, C. A.; SMITH, M. A. Testing of the Akt/PKB inhibitor MK-2206 by the pediatric preclinical testing program. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 59, n. 3, p. 518-524, 2012.

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

GUESMI, F.; PRASAD, S.; ALI, M. B.; ISMAIL, I. A.; LANDOULSI, A. *Thymus hirtus* sp. *algeriensis* Boiss. and Reut. volatile oil enhances Trail/Apo2l induced apoptosis and inhibits colon carcinogenesis through upregulation of death receptor pathway. **Aging (Albany NY)**, v. 13, n. 18, p. 21975, 2021b.

GUESMI, F.; PRASAD, S.; TAHRI, W.; DRIDI, I.; ALI, M. B.; HEDFI, A.; ISMAIL, A. I.; LANDOULSI, A. Volatile oil of *Teucrium alopecurus* sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced cell death. **Front. Biosci.**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2021a.

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

GUO, W.; WANG, H.; LI, C. Signal pathways of melanoma and targeted therapy. **Signal Transduct. Target Ther.**, v. 6, n. 1, p. 424, 2021.

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

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

- HAN, P.; MO, S.; WANG, Z.; XU, J.; FU, X.; TIAN, Y. UXT at the crossroads of cell death, immunity and neurodegenerative diseases. **Front. Oncol.**, v. 13, p. 1179947, 2023.
- HANAHAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discov.**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.
- HANIF, M. A.; NAWAZ, H.; AYUB, M. A.; TABASSUM, N.; KANWAL, N.; RASHID, N.; SALEEM, M.; AHMAD, M. Evaluation of the effects of Zinc on the chemical composition and biological activity of basil essential oil by using Raman spectroscopy. **Ind. Crops Prod.**, v. 96, p. 91-101, 2017.
- HARIDEVAMUTHU, B.; GURU, A.; MURUGAN, R.; SUDHAKARAN, G.; PACHAIAPPAN, R.; ALMUTAIRI, M. H.; JULIET, A.; AROCKIARAJ, J. Neuroprotective effect of biochanin a against bisphenol A-induced prenatal neurotoxicity in zebrafish by modulating oxidative stress and locomotory defects. **Neurosci. Lett.**, v. 790, p. 136889, 2022.
- HASHEM-DABAGHIAN, F.; SHOJAI, A.; ASGARPAHAH, J.; ENTEZARI, M. Anti-mutagenicity and apoptotic effects of *Teucrium polium* L. essential oil in HT29 cell line. **Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.**, v. 15, n. 3, 2020.
- HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen per-oxide production of neutrophils in whole blood. **J. Immunol. Methods**, v. 117, p. 53-58, 1989.
- HAWRYLUK, E. B.; TSAO, H. Melanoma: clinical features and genomic insights. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** v. 4, p. a015388, 2014.
- HE, Y.L.; SHI, J.Y.; PENG, C.; HU, L.J.; LIU, J.; ZHOU, Q.M.; GUO, L.; XIONG, L. Angiogenic effect of motherwort (*Leonurus japonicus*) alkaloids and toxicity of motherwort essential oil on zebrafish embryos. **Fitoterapia**, v. 128, p. 36-42, 2018.
- HOANG, V. T.; NYSWANER, K.; TORRES-AYUSO, P.; BROGNARD, J. The protein kinase MAP3K19 phosphorylates MAP2Ks and thereby activates ERK and JNK kinases and increases viability of KRAS-mutant lung cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 295, n. 25, p. 8470-8479, 2020.
- HODROJ, M. H.; JARDALY, A.; ABI RAAD, S.; ZOUEIN, A.; RIZK, S. Andrographolide potentiates the antitumor effect of topotecan in acute myeloid leukemia cells through an intrinsic apoptotic pathway. **Cancer Manag. Res.**, p. 1079-1088, 2018.
- HOI, T.M.; HUONG, L.T.; CHINH, H.V.; HAU, D.V.; SATYAL, P.; TAI, T.A.; DAI, D.N.; HUNG, N.H.; HIEN, V.T.; SETZER, W.N. Essential oil compositions of three invasive *Conyza* species collected in Vietnam and their larvicidal activities against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus*. **Molecules**, v. 25, p. 4576, 2020.
- HOŁOTA, M.; MAGIERA, J.; MICHLEWSKA, S.; KUBCZAK, M.; OLMO, N.S.; GARCÍA-GALLEGO, S.; ORTEGA, P.; MATA, F.J.; IONOV, M.; BRYSEWSKA, M. *In vitro* anticancer properties of copper metallodendrimers. **Biomolecules**, v. 9, p. 155, 2019.

HOMME, R. P.; ANEWESHA, L.; MAJUMDER, A.; GEORGE, A.; SINGH, M.; TYAGI, S. NF- κ B p65 subunit inhibitor: JSH-23 mitigates diabetic retinopathy via reducing oxidative stress. **FASEB J.**, v. 33, n. S1, p. 685.5-685.5, 2019.

HOORZAD, P.; MOUSAVINASAB, F.; TOFIGH, P.; KALAHROUD, E. M.; AGHAEI-ZARCH, S. M.; SALEHI, A.; FATTAHI, M.; LE, B. N Understanding the lncRNA/miRNA-NF κ B regulatory network in diabetes *mellitus*: From function to clinical translation. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, p. 110804, 2023.

HOU, J.; ZHANG, Y.; ZHU, Y.; ZHOU, B.; REN, C.; LIANG, S.; GUO, Y. α -Pinene induces apoptotic cell death via caspase activation in human ovarian cancer cells. **Med. Sci. Monit.**, v. 25, p. 6631, 2019.

HOWE, K.; CLARK, M.D.; TORROJA, C.F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498-503, 2013.

HU, W.; FANG, L.; NI, R.; ZHANG, H.; PAN, G. Changing trends in the disease burden of non-melanoma skin cancer globally from 1990 to 2019 and its predicted level in 25 years. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 836, 2022.

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

HUSSAIN, A. R.; UDDIN, S.; BU, R.; KHAN, O. S.; AHMED, S. O.; AHMED, M.; AL-KURAYA, K. S. Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24703, 2011.

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

IHSAN, S.A.; WANG, M.; ZAKI, A.A.; KHAN, S.I.; KHAN, I.A. Chemical analysis and biological activities of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oil. **Chem. Anal.**, v. 7, p. 71-78, 2017.

IIDA, M.; HARARI, P. M.; WHEELER, D. L.; TOULANY, M. Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors. **Mutat. Res-Fund. Mol. M.**, v. 819, p. 111690, 2020.

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

IMPERIAL, R.; TOOR, O.; HUSSAIN, A.; SUBRAMANIAN, J.; MASOOD, A. Comprehensive pancancer genomic analysis reveals (RTK)-RAS-RAF-MEK as a key dysregulated pathway in cancer: Its clinical implications. **Semin. Cancer Biol.**, v. 54, p. 14-28, 2019.

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

<<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>> Acesso em setembro de 2023.

ISLAMI, F.; SAUER, A. G.; MILLER, K. D.; FEDEWA, S. A.; MINIHAN, A. K.; GELLER, A. C.; LICHTENFELD, J. L.; JEMAL, A. Cutaneous melanomas attributable to ultraviolet radiation exposure by state. **Int. J. Cancer**, v. 147, n. 5, p. 1385-1390, 2020.

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

JÁVEGA, B.; HERRERA, G.; MARTÍNEZ-ROMERO, A.; O'CONNOR, J.E. Flow cytometry of oxygen and oxygen-related cellular stress. **Oxygen**, v. 3, p. 222-255, 2023.

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

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

JEONG, J.B.; CHOI, J.; LOU, Z.; JIANG, X.; LEE, S. H. Patchouli alcohol, an essential oil of *Pogostemon cablin*, exhibits anti-tumorigenic activity in human colorectal cancer cells. **Int. Immunopharmacol.**, v. 16, n. 2, p. 184-190, 2013.

JESSURUN, J. *Helicobacter pylori*: an evolutionary perspective. **Histopathology**, v. 78, n. 1, p. 39-47, 2021.

JIANG, H.; JIANG, Q.; HE, Y.; LI, X.; XU, Y.; LIU, X. XBP1s promotes the development of lung adenocarcinoma via the p-JNK MAPK pathway. **Int. J. Mol. Med.**, v. 49, n. 3, p. 1-13, 2022.

JIANG, Y.; SOHAL, D. P. S. Pancreatic adenocarcinoma management. **J. Oncol. Pract.**, v. 19, n. 1, p. 19-32, 2023.

JIN, F.; LIU, X.; ZHOU, Z.; YUE, P.; LOTAN, R.; KHURI, F. R.; LELAND W. K. CHUNG; SUN, S. Y. Activation of Nuclear Factor-KB contributes to induction of death receptors and apoptosis by the synthetic retinoid CD437 in DU145 human prostate cancer cells. **Cancer Res.**, v. 64, n. 16, 2005.

JO, H.W.; KIM, M.M. β -Caryophyllene oxide inhibits metastasis by downregulating MMP-2, p-p38 and p-ERK in human fibrosarcoma cells. **J. Food Biochem.**, v. 46, p. e14468, 2022.

JO, J. R.; PARK, J. S.; PARK, Y. K.; CHAE, Y. Z.; LEE, G. H.; PARK, G. Y.; JANG, B. C. *Pinus densiflora* leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. **Int. J. Oncol.**, v. 40, n. 4, p. 1238-1245, 2012.

JOHNSON, M. S.; COOK, J. G. Cell cycle exits and U-turns: Quiescence as multiple reversible forms of arrest. **Fac. Rev.**, v. 12, 2023.

- JONKMAN, J.; BROWN, C. M.; WRIGHT, G. D.; ANDERSON, K. I.; NORTH, A. J. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. **Nat. Protoc.**, v. 15, n. 5, p. 1585-1611, 2020.
- JUNG, J. H.; LEE, H.; ZENG, S. X.; LU, H. RBM10, a New Regulator of p53. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2107, 2020.
- JÚNIOR, R. R. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers. **Pharmacol. Res.**, v. 142, p. 151-168, 2019.
- JÚNIOR, V. F. O.; RAJÃO, A.; FERNANDES, M.; OLIVEIRA, E.; SANTOS, M., & GUIMARÃES, P. Influência dos Anestésicos locais na imunomodulação e recorrência do câncer: uma revisão de literatura. **Mater. Methods**, v. pt4, 2014.
- KAKARLA, R.; HUR, J.; KIM, Y. J.; KIM, J.; CHWAE, Y. J. Apoptotic cell-derived exosomes: Messages from dying cells. **Exp. Mol. Med.**, v. 52, n. 1, p. 1-6, 2020.
- KALININ, R. E.; IGOR'A, S.; KLIMENTOVA, E. A.; EGOROV, A. A.; POVAROV, V. O. Apoptosis in vascular pathology: present and future. **I.P. Pavlov Russ. Med. Biol. Her.**, v. 28, n. 1, p. 79-87, 2020.
- KANG, Y. J.; KWON, Y. H.; JANG, J. Y.; LEE, J. H.; LEE, S.; PARK, Y.; MOON, H. R.; CHUNG, H. Y.; KIM, N. D. MHY2251, a new SIRT1 inhibitor, induces apoptosis via JNK/p53 pathway in HCT116 human colorectal cancer cells. **Biomol. Ther.**, v. 31, n. 1, p. 73, 2023.
- KASALA, E. R.; BODDULURU, L. N.; MADANA, R. M.; GOGOI, R.; BARUA, C. C. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. **Toxicol. Lett.**, v. 233, n. 2, p. 214-225, 2015.
- KCIUK, M.; GIELECIŃSKA, A.; BUDZINSKA, A.; MOJZYCH, M.; KONTEK, R. Metastasis and MAPK pathways. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, n. 7, p. 3847, 2022.
- KESAVARDHANA, S.; MALIREDDI, R. K. S.; KANNEGANTI, T-D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 38, p. 567-595, 2020.
- KHAKZAD, S.; RAHMANI, F.; HOJJATI, M.; TABANDEH, M.R. Anti-carcinogenic effects of *Satureja khuzistanica* and *Zataria multiflora* essential oils on K562 cell line proliferation. **J. Food Process. Eng.**, v. 2, p. 127-132, 2019.
- KHEZRI, M. R.; YOUSEFI, K.; ESMAEILI, A.; GHASEMNEJAD-BERENJI, M. The role of ERK1/2 pathway in the pathophysiology of Alzheimer's disease: an overview and update on new developments. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 43, n. 1, p. 177-191, 2023.
- KHOURY, T. Metaplastic breast carcinoma revisited; subtypes determine outcomes: comprehensive pathologic, clinical, and molecular review. **Clin. Lab. Med.**, v. 43, n. 2, p. 221-243, 2023.
- KILBAS, P. O.; SONMEZ, O.; UYSAL-ONGANER, P.; GURKAN, A. C.; YERLIKAYA, P. O.; ARISAN, E. D. Specific c-Jun N-terminal kinase inhibitor, JNK-IN-8 suppresses mesenchymal profile of PTX-resistant MCF-7 cells through modulating PI3K/Akt, MAPK and Wnt signaling pathways. **Biology**, v. 9, n. 10, 2020.

KIM, K. I.; KIM, S. M.; LEE, Y. Y.; LEE, Y.; KIM, C. D.; YOON, T. J. Pitavastatin induces apoptosis of cutaneous squamous cell carcinoma cells through geranylgeranyl pyrophosphate-dependent c-Jun N-terminal kinase activation. **Ann. Dermatol.** v. 35, n. 2, p. 116, 2023.

KIM, K. W.; LEE, Y. S.; YOON, D.; KIM, G. S.; LEE, D. Y. The ethanolic extract of *Curcuma longa* grown in Korea exhibits anti-neuroinflammatory effects by activating of nuclear transcription factor erythroid-2-related factor 2/heme oxygenase-1 signaling pathway. **BMC Complement. Med. Ther.**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2022.

KIRA, A.; TATSUTOMI, I.; SAITO, K.; MURATA, M.; HATTORI, I.; KAJITA, H.; MURAKI, N.; ODA, Y.; SATOH, S.; TSUKAMOTO, Y.; KIMURA, S.; ONOUE, K.; YONEMURA, S.; ARAKAWA, S.; KATO, H.; HIRASHIMA, T.; KAWANE, K. Apoptotic extracellular vesicle formation via local phosphatidylserine exposure drives efficient cell extrusion. **Dev. Cell**, v. 58, p. 1-17, 2023.

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

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

KULKARNI, Y. G. A review on volatile oil. **Int. Res. J. Mod. Eng. Technol. Sci.**, v. 5, n. 4, 2023.

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

KUMAR, H. B.; MANANDHAR, S.; RATHI, E.; KABEKKODU, S. P.; MEHTA, C. H.; NAYAK, U. Y.; KINI, S. G.; PAI, K. S. R. Identification of potential Akt activators: a ligand and structure-based computational approach. **Mol. Divers.**, p. 1-19, 2023.

KUMAR, S.; ATANGANA, A. A numerical study of the nonlinear fractional mathematical model of tumor cells in presence of chemotherapeutic treatment. **Int. J. Biomath.**, v. 13, n. 03, p. 2050021, 2020.

KUMARI, S.; BADANA, A. K.; MOHAN, G. M.; SHAILENDER, G.; MALLA, R. R. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. **Biomark. Insights**, v. 13, p. 1177271918755391, 2018.

KWAK, A. W.; LEE, J. Y.; LEE, S. O.; SEO, J. H.; PARK, J. W.; CHOI, Y. H.; CHO, S.-S.; LEE, M.-H.; SHIM, J. H. Echinatin induces reactive oxygen species-mediated apoptosis via JNK/p38 MAPK signaling pathway in colorectal cancer cells. **Phytother. Res.**, v. 37, n. 2, p. 563-577, 2023.

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

- LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 21, n. 10, p. 607-632, 2020.
- LAZAROTO, C.; FLECK, N.; VIDAL, R. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Cienc. Rural**, v. 38, p. 852-860, 2008.
- LEE, E.; KIM, H.; CHUN, S.; CHUNG, J.; CHOI, S.; LEE, J.; HA, Y. Role of the JNK Pathway in Bladder Cancer. **Onco Targets Ther.**, v. 5, n. 15, p. 963-971, 2022.
- LEE, Y. J.; KIM, W. I.; PARK, T. H.; BAE, J. H.; NAM, H. S.; CHO, S. W.; CHOI, Y. J.; LEE, S. H.; CHO, M. K. Upregulation of DJ-1 expression in melanoma regulates PTEN/AKT pathway for cell survival and migration. **Arch. Dermatol. Res.**, 313, 7, 583-591, 2021.
- LI, B.; YANG, Z.; MAO, F.; WANG, Q.; FANG, H.; GU, X.; ZHENG, K.; ZHENG, Y. ZHAO, Y.; JIANG, J. Phytochemical profile and biological activities of the essential oils in the aerial part and root of *Saposhnikovia divaricata*. **Sci. Rep.**, v. 13, n. 1, p. 8672, 2023.
- LI, L.; ZHANG, S.; LI, H.; CHOU, H. FGFR3 promotes the growth and malignancy of melanoma by influencing EMT and the phosphorylation of ERK, AKT, and EGFR. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2019.
- LI, B.; ZHOU, P.; XU, K.; CHEN, T.; JIAO, J.; WEI, H.; YANG, X.; XU, W.; XIAO, J. W. W. Metformin induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy through ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 16, n. 1, p. 74, 2020b.
- LI, X.; HOU, Y.; ZHAO, J.; LI, J.; WANG, S.; FANG, J. Combination of chemotherapy and oxidative stress to enhance cancer cell apoptosis. **Chem. Sci.**, v. 11, n. 12, p. 3215-3222, 2020a.
- LI, X.; LU, Y.; LIANG, K.; LIU, B.; FAN, Z. Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells. **Breast Cancer Res.**, v. 7, p. 1-9, 2005.
- LI, Y.; WEN, J.M.; DU, C.J.; HU, S.M.; CHEN, J.X.; ZHANG, S.G.; DING, K.F. Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 491, p. 530-536, 2017.
- LI, Y.; ZIDORN, C. Seasonal variations of natural products in european herbs. **J. Food Process. Eng.**, v. 21, p. 1549-1575, 2022.
- LIN, T. H.; KUO, C. H.; ZHANG, Y. S.; CHEN, P. T.; CHEN, S. H.; LI, Y. Z.; LEE, Y. R. Piperlongumine induces cellular apoptosis and autophagy via the ROS/AKT signaling pathway in human follicular thyroid cancer cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, n. 9, p. 8048, 2023.
- LIN, X.; PENG, Z.; FU, X.; LIU, C.; XU, Y.; JI, W.; FAN, J.; CHEN, L.; FANG, L.; HUANG, Y.; SU, C. Volatile oil from *Saussurea lappa* exerts antitumor efficacy by

inhibiting epithelial growth factor receptor tyrosine kinase-mediated signaling pathway in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 48, p. 79761, 2016.

LINGAPPAN, K. NF- κ B in oxidative stress. **Curr. Opin. Toxicol.**, v. 7, p. 81-86, 2018.

LISBOA, T.; SILVA, D.; DUARTE, S.; FERREIRA, R.; ANDRADE, C.; LOPES, A. L.; RIBEIRO, J.; FARIAS, D.; MOURA, R.; REIS, M.; MEDEIROS, K.; MAGALHÃES, H.; SOBRAL, M. Toxicity and antitumor activity of a thiophene–acridine hybrid. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 64, 2020.

LIU, D.; ZHONG, Z.; KARIN, M. NF- κ B: A double-edged sword controlling inflammation. **Biomedicines**, v. 10, n. 6, p. 1250, 2022.

LIU, Y.; YIN, T.; FENG, Y.; CONA, M. M.; HUANG, G.; LIU, J.; SONG, S.; JIANG, Y.; XIA, Q.; SWINNEN, J. V.; BORMANS, G.; HIMMELREICH, U.; OYEN, R.; NI, Y. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quant. Imaging. Med. Surg.**, v. 5, n. 5, p. 708, 2015.

LOPES, J.; RODRIGUES, C.M.; GASPAR, M.M.; REIS, C.P. Melanoma management: from epidemiology to treatment and latest advances. **Cancers**, v. 14, p. 4652, 2022.

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

LOPEZ-BERGAMI, P. The role of mitogen-and stress-activated protein kinase pathways in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v. 24, n. 5, p. 902-921, 2011.

LOPEZ-BIGAS, N.; GONZALEZ-PEREZ, A. Are carcinogens direct mutagens?. **Nat. Genet.**, v. 52, n. 11, p. 1137-1138, 2020.

LOUGHLAND, I.; LAU, G.Y.; JOLLY, J.; SEEBACHER, F. Rates of warming impact oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). **J. Exp. Biol.**, v. 225, p. jeb243740, 2022.

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

LUNDGREN, G.A.; BRAGA, S.D.P.; ALBUQUERQUE, T.M.R.; TAVARES, J.F.; VIEIRA, W.A.D.S.; CÂMARA, M.P.S.; SOUZA, E.L. Antifungal effects of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist essential oil against pathogenic *Colletotrichum musae* and its incorporation in gum Arabic coating to reduce anthracnose development in banana during storage. **J. Appl. Microbiol.**, v. 132, p. 547-561, 2021.

LUO, H.; ZHAO, L.; OU, Z.; LI, T.; LIU, Y.; YU, Z. Novel lncRNA LNC_000113 Drives the Activation of Pulmonary Adventitial Fibroblasts through Modulating PTEN/Akt/FoxO1 Pathway. **J. Cardiovasc. Dev. Dis.**, v. 10, n. 6, p. 262, 2023.

MA, J., WANG, H., GUO, S., YI, X., ZHAO, T., LIU, Y., SHI, Q.; GAO, T.; LI, C.; GUO, W. A20 promotes melanoma progression via the activation of Akt pathway. **Cell Death Dis.**, 11, 9, 794, 2020.

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

MACHADO, T.Q.; FELISBERTO, J.R.S.; GUIMARÃES, E.F.; QUEIROZ, G.A.D.; FONSECA, A.C.C.D.; RAMOS, Y.J.; ROBBS, B.K. Apoptotic effect of β -pinene on oral squamous cell carcinoma as one of the major compounds from essential oil of medicinal plant *Piper rivinoides* Kunth. **Nat. Prod. Res.**, v. 36, p. 1636-1640, 2022.

MACRAE, C; PETERSON, R. Zebrafish as a mainstream model for in vivo systems pharmacology and toxicology. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 63, p. 43-64, 2023.

MAFI, A.; REZAEI, M.; HEDAYATI, N.; HOGAN, S. D.; REITER, R. J.; AARABI, M. H.; ASEMI, Z. Melatonin and 5-fluorouracil combination chemotherapy: opportunities and efficacy in cancer therapy. **Cell Commun. Signal.**, v. 21, n. 1, p. 33, 2023.

MAIA, J.G.S.; SILVA, M.H.L.; ZOGHBI, M.D.G.B.; ANDRADE, E.H.A. Composition of the essential oils of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. **J. Essent. Oil Res.**, v. 14, p. 325-326, 2020.

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

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

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, n. 11, p. 630-641, 2005.

MALYARENKO, O.S.; MALYARENKO, T.V.; USOLTSEVA, R.V.; KICHA, A.A.; IVANCHINA, N.V.; ERMAKOVA, S.P. Combined radiomodifying effect of fucoidan from the brown alga *Saccharina cichorioides* and pacificusoside D from the starfish *Solaster pacificus* in the model of 3D melanoma cells. **Biomolecules**, v. 13, p. 419, 2023.

MANDAL, D.; PATEL, P.; VERMA, S.K.; SAHU, B.R.; PARIJA, T. Proximal discrepancy in intrinsic atomic interaction arrests G2/M phase by inhibiting Cyclin B1/CDK1 to infer molecular and cellular biocompatibility of d-limonene. **Sci. Rep.**, v. 12, p. 18184, 2022.

MANIMEGALAI, P.; SELVAM, K.; LOGANATHAN, S.; KIRUBAKARAN, D.; SHIVAKUMAR, M. S.; GOVINDASAMY, M.; RAJAJI, U.; BAHAJAJ, A. A. A. Green synthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles using aqueous leaf extract of *Hardwickia binata*: their characterizations and biological applications. **Biomass Convers. Biorefin.**, p. 1-16, 2023.

MANJAMALAI, A.; KUMAR, M. J.; GRACE, V. M. Essential oil of *Tridax procumbens* L induces apoptosis and suppresses angiogenesis and lung metastasis of the B16F-10 cell line in C57BL/6 mice. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 13, n. 11, p. 5887-5895, 2012.

MANUELE, M. G.; BARREIRO ARCOS, M. L. DAVICINO, R.; FERRARO, G.; CREMASCHI, G.; ANESINI, C. Limonene exerts antiproliferative effects and increases nitric oxide levels on a lymphoma cell line by dual mechanism of the ERK pathway: relationship with oxidative stress. **Cancer Investig.**, v. 28, n. 2, p. 135-145, 2009.

MAREI, H. E.; HASAN, A.; POZZOLI, G.; CENCIARELLI, C. Cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs): potential, mechanisms of resistance, and strategies for reinvigorating T cell responsiveness when resistance is acquired. **Cancer Cell Int.**, v. 23, n. 1, p. 64, 2023.

MARINO, S.; AHMAD, U.; FERREIRA, M.I.; ALVINO, A. Evaluation of the effect of irrigation on biometric growth, physiological response, and essential oil of *Mentha spicata* (L.). **Water**, v. 11, p. 2264, 2019.

MARQUES, M.P.; NEVES, B.G.; VARELA, C.; ZUZARTE, M.; GONÇALVES, A.C.; DIAS, M.I.; AMARAL, J.S.; BARROS, L.; MAGALHÃES, M.; CABRAL, C. Essential oils from Côa Valley Lamiaceae species: cytotoxicity and antiproliferative effect on glioblastoma cells. **Pharmaceutics**, v. 15, p. 341, 2023.

MARRONE, M.; CATERINO, C.; MUSCI, G.; CAZZATO, G.; INGRAVALLO, G.; LUPO, C.; ARMENIO, A. Photography as the sole means of proof: medical liability in dermatology. **Diagnostics**, v. 13, n. 6, p. 1033, 2023.

MARTÍNEZ-LIMÓN, A.; JOAQUIN, M.; CABALLERO, M.; POSAS, F.; NADAL, E. The p38 pathway: from biology to cancer therapy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 6, p. 1913, 2020.

MARTINS, R.X.; VIEIRA, L.; SOUZA, J.A.C.R.; SILVA, M.G.F.; MUNIZ, M.S.; SOUZA, T.; QUEIROGA, F.R.; MACHADO, M.R.F.; SILVA, P.M.; FARIAS, D. Exposure to 2, 4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae. **Comp. Biochem. Physiol. Part - C: Toxicol. Pharmacol.**, v. 248, p. 109110, 2021.

MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; BRUIN, R. A. M. Cell cycle control in cancer. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 23, n. 1, p. 74-88, 2022.

MEKTRIRAT, R.; YANO, T.; OKONOGI, S.; KATIP, W.; PIKULKAEW, S. Phytochemical and safety evaluations of volatile terpenoids from *Zingiber cassumunar* Roxb. on mature carp peripheral blood mononuclear cells and embryonic zebrafish. **Molecules**, v. 25, p. 613, 2020.

MICHALCZYK, K.; PAWLIK, J.; CZEKAWY, I.; KOZŁOWSKI, M.; CYMBALUK-PŁOSKA, A. complementary methods in cancer treatment-cure or curse?. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 18, n. 1, p. 356, 2021.

MILIGI, L. Ultraviolet radiation exposure: Some observations and considerations, focusing on some Italian experiences, on cancer risk, and primary prevention. **Environments**, v. 7, n. 2, p. 10, 2020.

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

MINTEGUIAGA, M.; UMPIERREZ, N.; GONZÁLEZ, A.; DELLACASSA, E.; CATALÁN, C. A. New C9-polyacetylenes from the essential oil of the highly endangered species *Baccharis palustris* Heering (Asteraceae). **Phytochem. Lett.**, v. 48, p. 106-113, 2022.

MIRICESCU, D.; TOTAN, A.; STANESCU-SPINU, I. I.; BADOIU, S. C.; STEFANI, C.; GREABU, M. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects. **Int. J. Mol. Sci.**, 22, 1, 173, 2020.

MODARRESI CHAHARDEHI, A.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1345, 2020.

MÖLLER, M.; WASEL, J.; SCHMETZER, J.; WEIß, U.; MEISSNER, M.; SCHIFFMANN, S.; NIEDERBERGER, E. The specific IKK ϵ /TBK1 inhibitor Amlexanox suppresses human melanoma by the inhibition of autophagy, NF- κ B and MAP kinase pathways. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 13, p. 4721, 2020.

MORADIPOUR, A.; DARIUSHNEJAD, H.; AHMADIZADEH, C.; LASHGARIAN, H.E. Dietary flavonoid carvacrol triggers the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via the p53/Bax/Bcl-2 axis. **Med. Oncol.**, v. 40, p. 46, 2022.

MORAN, B.; SILVA, R.; PERRY, A. S.; GALLAGHER, W. M. Epigenetics of malignant melanoma. **Semin. Cancer Biol.** v. 51, p. 80–88, 2018.

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

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

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

MUSEMBEI, R.; KIPLIMO, J.J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from Kenyan *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. **Sci. Lett.**, v. 5, p. 180-185, 2017.

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

MUSSIN, J. E.; MANZANO, P.; MANGIATERRA, M.; GIUSIANO, G. Inhibitory activity of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist tincture against fungi and bacteria causing superficial infections. **Rev. Cuba. de Plantas Medicinales**, v. 22, n. 3, 2017.

NAFFA, R.; VOGEL, L.; HEGEDŰS, L.; PÁSZTY, K.; TÓTH, S.; KELEMEN, K.; SINGH, N.; REMÉNYI, A.; KÁLLAY, E.; CSEREPES, M.; TÓVÁRI, J.; GRUSCH, M.; ENYEDI, Á. P38 MAPK promotes migration and metastatic activity of BRAF mutant melanoma cells by inducing degradation of PMCA4b. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1209, 2020.

NAGALAKSHMAMMA, V.; VENKATASWAMY, M.; PASALA, C.; MAHESWARI, A. U.; RAJU, K. T.; NAGARAJU, C.; CHALAPATHI, P. V. A study on MAPK/ERK and CDK2-Cyclin-E signal switch “on and off” in cell proliferation by bis urea derivatives of 1, 4-Diisocyanatobenzene. **Bioorg. Chem.**, v. 112, p. 104940, 2021.

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

NAKAYAMA, K.; MURATA, S.; ITO, H.; IWASAKI, K.; VILLAREAL, M.O.; ZHENG, Y.W.; OHKOHCHI, N. Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species. **Oncol. Lett.**, v. 14, p. 2015-2024, 2017.

NAVARRA, M.; FERLAZZO, N.; CIRMI, S.; TRAPASSO, E.; BRAMANTI, P.; LOMBARDO, G. E.; MINCIULLO, P. L.; CALAPAI, G.; GANGEMI, S.; GANGEMI, S. Effects of bergamot essential oil and its extractive fractions on SH-SY5Y human neuroblastoma cell growth. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 67, n. 8, p. 1042-1053, 2015.

NEGI, R. R.; RANA, S. V.; GUPTA, R.; GUPTA, V.; CHADHA, V. D.; DHAWAN, D. K. Increased nuclear factor- κ B/RelA expression levels in human colorectal carcinoma in North Indian patients. **Indian J. Clin. Biochem.**, v. 33, p. 473-478, 2018.

NI, X.; SUHAIL, M. M.; YANG, Q.; CAO, A.; FUNG, K. M.; POSTIER, R. G.; WOOLLEY, C.; YOUNG, G.; ZHANG, J.; LIN, H. K. Frankincense essential oil prepared from hydrodistillation of *Boswellia sacra* gum resins induces human pancreatic cancer cell death in cultures and in a xenograft murine model. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2012.

NI, Z. J.; WANG, X.; SHEN, Y.; THAKUR, K.; HAN, J.; ZHANG, J. G.; HU, F.; WEI, Z. J. Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 110, p. 78-89, 2021.

NI, Z.; SUN, P.; ZHENG, J.; WU, M.; YANG, C.; CHENG, M.; LI, Y. JNK signaling promotes bladder cancer immune escape by regulating METTL3-mediated m6A modification of PD-L1 mRNA. **Cancer Res.**, v. 82, n. 9, p. 1789-1802, 2022.

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

NIKOO, M.; RABIEE, F.; MOHEBBI, H.; EGHBALIFARD, N.; RAJABI, H.; YAZDANI, Y.; AKHAVAN-SIGARI, R. Nivolumab plus ipilimumab combination therapy in cancer: Current evidence to date. **Int. Immunopharmacol.**, v. 117, p. 109881, 2023.

- NUSSINOV, R.; ZHANG, M.; MALONEY, R.; JANG, H. Ras isoform-specific expression, chromatin accessibility, and signaling. **Biophys. Rev.**, v. 13, p. 489-505, 2021.
- OPDENBOSCH, N. V.; LAMKANFI, M. Caspases in cell death, inflammation, and disease. **Immunity**, v. 50, n. 6, p. 1352-1364, 2019.
- OPIYO, S.A.; NJOROGGE, P.W.; KURIA, K.M. Chemical composition and biological activity of extracts from *Conyza* species. **J. Appl. Chem.**, v. 16, p. 61-71, 2023.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals: Fish Embryo Acute Toxicity (FET)**. Test nº. 236. Paris, France. p. 1-22., 2013.
- OSTROWSKI, S; FISHER, D. Biology of melanoma. **Hematol. Oncol. Clin.**, v. 35, n. 1, p. 29-56, 2021.
- OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93, 2017.
- ÖZERKAN, D. The Determination of Cisplatin and Luteolin Synergistic Effect on Colorectal Cancer Cell Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction by Fluorescence Labelling. **J. Fluoresc.**, p. 1-9, 2023.
- PALMA, T.; BIANCHIN, N.; DE OLIVEIRA, J.; ASSMANN, C.; DAS NEVES OLIVEIRA, M.; SCHETINGER, M.; ANDRADE, C. Berberine increases the expression of cytokines and proteins linked to apoptosis in human melanoma cells. **Mol. Biol. Rep.**, v. 49, n. 3, p. 2037-2046, 2022.
- PANDA, S. K.; RAY, S.; NAYAK, S.; BEHERA, S.; BHANJA, S.; ACHARYA, V. A review on cell cycle checkpoints in relation to cancer. **J. Med. Sci**, v. 5, p. 88-95, 2019.
- PARK, H-B.; BAEK, K-H. E3 ligases and deubiquitinating enzymes regulating the MAPK signaling pathway in cancers. **Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer**, v. 1877, n. 3, p. 188736, 2022.
- PATEL, A. Benign vs malignant tumors. **JAMA Oncol.**, v. 6, n. 9, p. 1488-1488, 2020.
- PATERGNANI, S.; DANESE, A.; BOUHAMIDA, E.; AGUIARI, G.; PREVIATI, M.; PINTON, P.; GIORGI, C. Various aspects of calcium signaling in the regulation of apoptosis, autophagy, cell proliferation, and cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 21, p. 8323, 2020.
- PATTON, E.E.; ZON, L.I.; LANGENAU, D.M. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 20, p. 611-628, 2021.
- PAULA, C. C.; MARTINS, D. T. D. O.; ARUNACHALAM, K.; BALOGUN, S. O.; BORGES, Q. I.; PICONE, M. G.; BARROS, W. M.; SILVA PRADO, R. M. Antimicrobial screening of medicinal plants popularly used in Mato Grosso for

treating infections: Advances on the evaluation of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities. **Pharmacogn. J.**, v. 10, n. 6s, 2018.

PAW, M.; WNUK, D.; NIT, K.; BOBIS-WOZOWICZ, S.; SZYCHOWSKI, R.; ŚLUSARCZYK, A.; MICHALIK, M. SB203580—A Potent p38 MAPK inhibitor reduces the profibrotic bronchial fibroblasts transition associated with asthma. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 23, p. 12790, 2021.

PENG, X.; SHI, J.; ZHAO, Z.; TONG, R.; ZHANG, X.; ZHONG, L. Emetine, a small molecule natural product, displays potent anti-gastric cancer activity via regulation of multiple signaling pathways. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 91, n. 4, p. 303-315, 2023.

PERILLO, B.; Di DONATO, M.; PEZONE, A.; DI ZAZZO, E.; GIOVANNELLI, P.; GALASSO, G.; CASTORIA, G.; MIGLIACCIO, A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Exp. Mol. Med.**, p. 1-12, 2020.

PERSONS, D.L.; YAZLOVITSKAYA, E.M.; PELLING, J.C. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 46, p. 35778–35785, 2000.

PETRELLI, R.; ORSOMANDO, G.; SORCI, L.; MAGGI, F.; RANJBARIAN, F.; NYA, P. C. B.; PETRELLI, D.; VITALI, L. A.; LUPIDI, G.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; HOFER, A.; CAPPELLACCI, L. Biological activities of the essential oil from *Erigeron floribundus*. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1065, 2016.

PHAM, J. P.; JOSHUA, A. M.; SILVA, I. P.; DUMMER, R.; GOLDINGER, S. M. Chemotherapy in cutaneous melanoma: is there still a role?. **Curr. Oncol. Rep.**, v. 25, n. 6, p. 609-621, 2023.

PHAN, T.; ZHANG, X. H.; ROSEN, S.; MELSTROM, L. G. P38 kinase in gastrointestinal cancers. **Cancer Gene Ther.**, p. 1-9, 2023.

PIASECKI, B.; BIERNASIUK, A.; SKIBA, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; LUDWICZUK, A. Composition, anti-MRSA activity and toxicity of essential oils from *Cymbopogon* species. **Molecules**, v. 26, p. 7542, 2021.

PILAVAKI, P.; ARDAKANI, A. G.; GIKAS, P.; CONSTANTINIDOU, A. Osteosarcoma: current concepts and evolutions in management principles. **J. Clin. Med.**, v. 12, n. 8, p. 2785, 2023.

PISSA, M.; LAPINS, J.; SKÖLDMARK, C.; HELGADOTTIR, H. Melanoma-specific survival before and after inclusion in a familial melanoma dermatologic surveillance program in CDKN2A mutation carriers and non-carriers. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 37, n. 2, p. 284-292, 2023.

PITTS, T. M.; DAVIS, S. L.; ECKHARDT, S. G.; BRADSHAW-PIERCE, E. L. Targeting nuclear kinases in cancer: development of cell cycle kinase inhibitors. **Pharmacol. Ther.**, v. 142, n. 2, p. 258-269, 2014.

PIZZIMENTI, S.; RIBERO, S.; CUCCI, M. A.; GRATTAROLA, M.; MONGE, C.; DIANZANI, C.; BARRERA, G.; MUZIO, G. Oxidative stress-related mechanisms in

melanoma and in the acquired resistance to targeted therapies. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 1942, 2021.

POMA, P.; LABBOZZETTA, M.; NOTARBARTOLO, M.; BRUNO, M.; MAGGIO, A.; ROSSELLI, S.; SAJEVA, M.; ZITO, P. Chemical composition, *in vitro* antitumor and pro-oxidant activities of *Glandora rosmarinifolia* (Boraginaceae) essential oil. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0196947, 2018.

POPMIHAJLOV, Z. et al. CC-90001, a c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor, in patients with pulmonary fibrosis: design of a phase 2, randomised, placebo-controlled trial. **BMJ Open Respir. Res.**, v. 9, n. 1, p. e001060, 2022.

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

POWIS, G.; MEUILLET, E. J.; INDARTE, M.; BOOHER, G.; KIRKPATRICK, L. Pleckstrin Homology [PH] domain, structure, mechanism, and contribution to human disease. **Biomed. Pharmacother.**, v. 165, p. 115024, 2023.

PRADO, N. S.; BONAN, R. F.; LEONEL, A. C. L. S.; CASTRO, J. F. L.; CARVALHO, E. J. A.; SILVEIRA, F. M. M.; PEREZ, D. E. C. Awareness on oral cancer among patients attending dental school clinics in Brazil. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 25, n. 1, p. e89, 2020.

PRADO, V.M.J. JESUS, R.A.; OLIVEIRA, J.M.A.; BLANK, A.F. BEZERRA, D.P.; SOARES, M.B.P.; SILVA, V.R.; SANTOS, L.S.; CARDOSO, C.L. VILELA, A.F.L.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Biological studies and chromatograms aided by chemometric analysis in evaluation of seasonality and extraction method of *Croton grewoides* extracts. **Rev. Bras. Bot.**, v. 45, p. 607-618, 2022.

PRANTEDA, A.; PIASTRA, V., STRAMUCCI, L., FRATANTONIO, D.; BOSSI, G. The p38 MAPK signaling activation in colorectal cancer upon therapeutic treatments. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 8, p. 2773, 2020.

PRASAD, B.; GRIMM, D.; STRAUCH, S. M.; ERZINGER, G. S.; CORYDON, T. J.; LEBERT, M.; MAGNUSSON, N. E.; INFANGER, M.; RICHTER, P.; KRÜGER, M. Influence of microgravity on apoptosis in cells, tissues, and other systems *in vivo* and *in vitro*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 24, p. 9373, 2020.

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

PRIOR, I. A.; HOOD, F. E.; HARTLEY, J. L. The frequency of Ras mutations in cancer. **Cancer Res.**, v. 80, n. 14, p. 2969-2974, 2020.

PUA, L. J. W.; MAI, C. W.; CHUNG, F. F. L.; KHOO, A. S. B.; LEONG, C. O.; LIM, W. M.; HII, L. W. Functional roles of JNK and p38 MAPK signaling in nasopharyngeal carcinoma. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, n. 3, p. 1108, 2022.

PULLAGURI, N.; NEMA, S.; BHARGAVA, Y.; BHARGAVA, A. Triclosan alters adult zebrafish behavior and targets acetylcholinesterase activity and expression. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 75, p. 103311, 2019.

QASEM, J. R. Prospects of wild medicinal and industrial plants of saline habitats in the Jordan valley. **Pak. J. Bot.**, v. 47, n. 2, p. 551-570, 2015.

QI, X.; CHEN, G. p38 γ MAPK Inflammatory and Metabolic Signaling in Physiology and Disease. **Cells**, v. 12, n. 13, p. 1674, 2023.

QUIJIA, C. R.; CHORILLI, M. Piperine for treating breast cancer: A review of molecular mechanisms, combination with anticancer drugs, and nanosystems. **Phytother. Res.**, v. 36, n. 1, p. 147-163, 2022.

QUINTANS, J.S.S.; SOARES, B.M.; FERRAZ, R.P.C.; OLIVEIRA, A.C.A.; SILVA, T.B.; MENEZES, L.R.A.; SAMPAIO, M.F.C.; PRATA, A.P.N.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ANTONIOLLI, A.R.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopi laevigata*. **Planta Med.**, v. 79, p. 123-130, 2013.

RAMDHANI, D.; MUSTARICHIE, R. Anticancer activity of brevilin a by molecular docking method. **World J. Pharm. Res.**, v. 10, p. 142-149, 2021.

RAMDHANI, D.; MUSTARICHIE, R. Anticancer mechanism of epirubicin by molecular docking method. **World J. Pharm. Res.**, v. 12, p. 12-19, 2023a.

RAMDHANI, D.; MUSTARICHIE, R. Anticancer mechanism of pelargonidin compound from berry fruits by molecular docking method. **World J. Pharm. Res.**, v. 13, p. 12-19, 2023b.

RANTAPERO, T.; WAHLFORS, T.; KÄHLER, A.; HULTMAN, C.; LINDBERG, J.; TAMMELA, T. L.; NYKTER, M.; SCHLEUTKER, J.; WIKLUND, F. Inherited DNA repair gene mutations in men with lethal prostate cancer. **Genes**, v. 11, n. 3, p. 314, 2020.

RATHORE, M., GIRARD, C., OHANNA, M., TICHET, M., BEN JOUIRA, R., GARCIA, E., LARBRET, F.; GESSON, M.; AUDEBERT, S.; LACOUR, J-P.; MONTAUDIÉ, H.; PROD'HOMME, V.; TARTARE-DECKERT, S.; DECKERT, M. Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B signaling pathway. **Oncogene**, v. 38, n. 30, p. 5873-5889, 2019.

RAUT, P.; LEE, H.; JOO, S.; CHUN, K. Thymoquinone induces oxidative stress-mediated apoptosis through downregulation of Jak2/STAT3 signaling pathway in human melanoma cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 157, p. 112604, 2021.

RAWAT, P. S.; JAISWAL, A.; KHURANA, A.; BHATTI, J. S.; NAVIK, U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. **Biomed. Pharmacother.**, v. 139, p. 111708, 2021.

RAYAN, A.; RAIYN, J.; FALAH, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. **PloS One**, v. 12, n. 11, p. e0187925, 2017.

REBECCA, V. W.; SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. **Nat. Commun.**, v. 11, n. 1, p. 2858, 2020.

REHM, J.; SHIELD, K. D.; WEIDERPASS, E. Alcohol consumption. A leading risk factor for cancer. **Chem. Biol. Interact.**, p. 109280, 2020.

REN, K.; ZHOU, M.; LI, L.; WANG, C.; YUAN, S.; LI, H. C118P exerted potent anti-tumor effects against melanoma with induction of G2/M arrest via inhibiting the expression of BUB1B. **J. Dermatol. Sci.**, v. 108, n. 2, p. 58-67, 2022.

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

REVATHIDEVI, S.; MUNIRAJAN, A. K. Akt in cancer: Mediator and more. **Semin. Cancer Biol.**, v. 59, p. 80-91, 2019.

RIGANTI, C.; DOUBLIER, S.; COSTAMAGNA, C.; ALDIERI, E.; PESCARMONA, G.; GHIGO, D.; BOSIA, A. Activation of nuclear factor- κ B pathway by simvastatin and RhoA silencing increases doxorubicin cytotoxicity in human colon cancer HT29 cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 74, n. 2, p. 476-484, 2008.

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

ROLNIK, A.; OLAS, B. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 6, p. 3009, 2021.

ROSEN, C.; MAYES, T.; OVERHOLT, C.; LUCKE-WOLD, B. Treatment of melanoma metastasis: surgical, chemotherapy, and innovation. **Med Discov.**, v. 2, n. 4, 2023.

ROSSI, M.; PELLEGRINI, C.; CARDELLI, L.; CICIARELLI, V.; DI NARDO, L.; FARGNOLI, M. C. Familial melanoma: diagnostic and management implications. **Dermatol. Pract. Concept.**, v. 9, n. 1, p. 10, 2019.

ROY, P.; SARKAR, U. A.; BASAK, S. The NF- κ B activating pathways in multiple myeloma. **Biomedicines**, v. 6, n. 2, p. 59, 2018.

RUSSO, A.; GRAZIANO, A.; BRUNO, M.; CARDILE, V.; RIGANO, D. Apoptosis induction of essential oils from *Artemisia arborescens* L. in human prostate cancer cells. **J. Ethnopharmacol.**, v. 303, p. 115929, 2023.

RUTKOWSKI, P.; WYSOCKI, P. J.; NASIEROWSKA-GUTTMEJER, A.; JEZIORSKI, A.; WYSOCKI, W. M.; KALINKA, E.; KRZAKOWSKI, M. Cutaneous melanoma. **Oncol. Clin. Pract.**, v. 16, n. 4, p. 163-182, 2020.

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

SAFWAN-ZAITER, H.; WAGNER, N.; WAGNER, K-D. P16INK4A-more than a senescence marker. **Life**, v. 12, n. 9, p. 1332, 2022.

SAGINALA, K.; BARSOUK, A.; ALURU, J. S.; RAWLA, P.; BARSOUK, A. Epidemiology of melanoma. **Med. Sci.**, v. 9, n. 4, p. 63, 2021.

SAHANA, T. G.; ZHANG, K. Mitogen-activated protein kinase pathway in amyotrophic lateral sclerosis. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, p. 969, 2021.

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

SAID, S. S.; IBRAHIM, W. N. Cancer resistance to immunotherapy: comprehensive insights with future perspectives. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, p. 1143, 2023.

SAIKIA, B.; BURAGOHAIN, L.; BARUA, C. C.; SARMA, J.; TAMULI, S. M.; KALITA, D. J.; BARUA, A. G.; BARUA, I. C.; ELANCHERAN, R. Evaluation of anti-amnesic effect of *Conyza bonariensis* in rats. **Indian J. Pharmacol.**, v. 54, n. 2, p. 102, 2022.

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

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

SALAMA, Y.; JARADAT, N.; HATTORI, K.; HEISSIG, B. *Aloysia citrodora* essential oil inhibits melanoma cell growth and migration by targeting HB-EGF-EGFR signaling. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, p. 8151, 2021.

SALAZAR-ROA, M.; MALUMBRES, M. Fueling the cell division cycle. **Trends Cell Biol.**, v. 27, n. 1, p. 69-81, 2017.

SALEEM, M.; NASEER, F.; AHMAD, S.; NAZISH, A.; BUKHARI, F. R.; REHMAN, A. U.; KHAN, I. M.; SADIQ, S.; JAVED, F. Hepatoprotective activity of ethanol extract of *Conyza bonariensis* against paracetamol induced hepatotoxicity in swiss albino mice. **Am. J. Med. Biol. Res.**, v. 2, n. 6, p. 124-127, 2014.

SALEEM, M.; SCHINI-KERTH, V. B.; HUSSAIN, K.; KHALID, S. H.; ASIF, M.; ALHOSIN, M.; AKHTAR, M. F.; AHMAD, B.; RAZA, A. Molecular mechanisms responsible for in vitro cytotoxic attributes of *Conyza bonariensis* extract against lymphoblastic leukaemia jurkat cells. **Anti-Cancer Agents Med. Chem.**, v. 22, n. 9, p. 1793-1801, 2022.

SALEEM, M.; SHAHID, H.; AKHTAR, M. F.; SALEEM, A.; SHARIF, A.; AKHTAR, B.; TUFAIL, B.; HAMID, I.; JAVAID, Z.; IQBAL, R. Pharmacological, phytochemical and histopathological basis of *Conyza bonariensis* in the potential management of diabetes mellitus. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 34, n. 6, p. 2371-2377, 2021.

- SALEH, E. A. M.; AL-DOLAIMY, F.; BAYMAKOV, S.; ULLAH, M. I.; KHLEWEE, I. H.; BISHT, Y. S.; ALSAALAMY, A. H. Oxidative stress affects the beginning of the growth of cancer cells through a variety of routes. **Pathol. Res. Pract.**, p. 154664, 2023.
- SAMIRY, I.; PINON, A.; LIMAMI, Y.; RAIS, S.; ZAID, Y.; OUDGHIRI, M.; LIAGRE, B.; MTAIRAG, E. M. Antitumoral activity of *Caralluma europaea* on colorectal and prostate cancer cell lines. **J. Toxicol. Environ. Health Part A**, v. 86, n. 7, p. 230-240, 2023.
- SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; GELBERT, L. M.; LALLENA, M. J.; DIOS, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. **Bioorganic Med. Chem. Lett.**, v. 25, n. 17, p. 3420-3435, 2015.
- SANGTHONG, S.; PROMPUTTHA, I.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P. Chemical constituents, antioxidant, anti-tyrosinase, cytotoxicity, and anti-melanogenesis activities of *Etlintera elatior* (Jack) leaf essential oils. **Molecules**, v. 27, p. 3469, 2022.
- SANTANA, P. M.; MIRANDA, M.; GUTIÉRREZ, Y.; GARCÍA, G.; ORELLANA, T.; ORELLANA-MANZANO, A. Anti-inflammatory and antimitotic effect of the alcoholic extract and chemical composition of the oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (deer shinbone) leaves. **Rev. Cuba. de Plantas Medicinales**, v. 16, n. 1, p. 13-23, 2011.
- SANTOS, L. K. B.; VERAS, M. D. A.; MARQUES, K. K. G.; ALVES, M. M. D. M.; MENDES, A. N.; CARVALHO, F. A. D. A.; GONÇALVES, J. C. R. Assessment of *in vitro* anti-melanoma potential of *Ephedranthus pisocarpus* RE Fr. **Anticancer Res.**, v. 40, n. 9, p. 5015-5024, 2020.
- SATOH, R.; HAMADA, N.; YAMADA, A.; KANDA, Y.; ISHIKAWA, F.; TAKASAKI, T.; SUGIURA, R. Discovery of new benzhydrol biscarbonate esters as potent and selective apoptosis inducers of human melanomas bearing the activated ERK pathway: SAR studies on an ERK MAPK signaling modulator, ACA-28. **Bioorg. Chem.**, v. 103, p. 104137, 2020.
- SATYAL, P.; CHHETRI, B.K.; DOSOKY, N.S.; SHRESTHA, S.; POUDEL, A.; SETZER, W.N. Chemical composition of *Blumea lacera* essential oil from Nepal. Biological activities of the essential oil and (Z)-lachnophyllum ester. **Nat. Prod. Commun.**, v. 10, p. 1934578X1501001028, 2015.
- SAVOIA, P.; FAVA, P.; CASONI, F.; CREMONA, O. Targeting the ERK signaling pathway in melanoma. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 6, p. 1483, 2019.
- SCATENA, C.; FRANCESCHI, S.; FRANZINI, M.; SANGUINETTI, C.; ROMITI, N.; CAPONI, L.; NACCARATO, A. G. Dabrafenib and Trametinib prolong coagulation through the inhibition of tissue factor in BRAF^{V600E} mutated melanoma cells *in vitro*. **Cancer Cell Int.**, v. 19, p. 1-8, 2019.
- SEILER, C.; STAINTHORP, A. K.; KETCHEN, S.; JONES, C. M.; MARKS, K.; QUIRKE, P.; LADBURY, J. E. The Grb2 splice variant, Grb3-3, is a negative regulator of RAS activation. **Commun. Biol.**, v. 5, n. 1, p. 1029, 2022.

SENAPATI, J.; JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H.; SHORT, N. J. Pathogenesis and management of accelerated and blast phases of chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 37, n. 1, p. 5-17, 2023.

SHANKAR, A.; GOPINATH, S.M.; KOLLUR, S.P.; SUSHMA, P.; JAIN, A.S.; PATIL, S.S.; SRINIVASA, C.; SHIVAMALLU, C. Structural diversity and role of phytochemicals against p38- α Mitogen-Activated Protein Kinase and Epidermal Growth Factor Receptor Kinase domain: a privileged computational approach. **J. Pure Appl. Microbiol.**, v. 15, n. 4, p. 2263-2269, 2021

SHARAF, S.; ZIAEE, A.; DAHMARDEH, H. What are the outcomes of hospice care for cancer patients? A systematic review. **Support. Cancer Ther.**, v. 31, p. 64, 2023.

SHARIFI-RAD, J.; QUISPE, C.; KUMAR, M.; AKRAM, M.; AMIN, M.; IQBAL, M.; CHO, W. Hyssopus essential oil: an update of its phytochemistry, biological activities, and safety profile. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2022, 2022.

SHIAU, J. P.; CHUANG, Y. T.; TANG, J. Y.; YANG, K. H.; CHANG, F. R.; HOU, M. F.; CHANG, H. W. The impact of oxidative stress and AKT pathway on cancer cell functions and its application to natural products. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, p. 1845, 2022.

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

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

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

SHIROMA, Y.; FUJITA, G.; YAMAMOTO, T.; TAKAHASHI, R. U.; KUMAR, A.; ZHANG, K. Y.; ITO, A.; OSADA, H.; YOSHIDA, M.; TAHARA, H. Identification of a selective RelA inhibitor based on DSE-FRET screening methods. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 23, p. 9150, 2020.

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

SHORNING, B. Y.; DASS, M. S.; SMALLEY, M. J.; PEARSON, H. B. The PI3K-AKT-mTOR pathway and prostate cancer: At the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling. **Int. J. Mol. Sci.**, 21, 12, 4507, 2020.

SI, C.; OU, Y.; MA, D.; HEI, L.; WANG, X.; DU, R.; ZHAO, J. Cytotoxic effect of the essential oils from *Erigeron Canadensis* L. on human cervical cancer HeLa cells *in vitro*. **Chem. Biodivers.**, v. 19, n. 9, p. e202200436, 2022.

SIES, H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 852, 2020.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, p. 1-21, 2020.

SILVA, B.O.; ORLANDO, J.B.; PIRES, C.L.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GAIVÃO, I.M.; PERAZZO, F.F.; MAISTRO, E.L. Genotoxicity induced by nerol, an essential oil present in citric plants using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and HepG2/C3A cells as a model. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 84, p. 518-528, 2021.

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

SMITH, M. T.; GUYTON, K. Z.; KLEINSTREUER, N.; BORREL, A.; CARDENAS, A.; CHIU, W. A.; FELSHER, D. W.; GIBBONS, C. F.; GOODSON III, W. H.; HOUCK, K. A.; KANE, A.; MERRILL, M. A.; LEBREC, H.; LOWE, L.; MCHALE, C. M.; MINOCHERHOMJI, S.; RIESWIJK, L.; SANDY, M. S.; SONE, H.; WANG, A.; ZHANG, L.; ZEISE, L.; FIELDEN, M. The key characteristics of carcinogens: relationship to the hallmarks of cancer, relevant biomarkers, and assays to measure them. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 29, n. 10, p. 1887-1903, 2020.

SNEZHKINA, A. V.; KUDRYAVTSEVA, A. V.; KARDYMON, O. L.; SAVVATEEVA, M. V.; MELNIKOVA, N. V.; KRASNOV, G. S.; DMITRIEV, A. A. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2019, 2019.

SOTO, K. M.; PÉREZ BUENO, J. D. J.; MENDOZA LÓPEZ, M. L.; APÁTIGA-CASTRO, M.; LÓPEZ-ROMERO, J. M.; MENDOZA, S.; MANZANO-RAMÍREZ, A. Antioxidants in traditional mexican medicine and their applications as antitumor treatments. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 4, p. 482, 2023.

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

SOUSA, M.H.; MORGAN, J.M.; CESCO, K.; FLACH, A.; MOURA, N.F. Cytotoxic activity of *Cunila angustifolia* essential oil. **Chem. Biodivers.**, v. 17, p. e1900656, 2020.

SRIMONGKOL, P.; SONGSERM, P.; KUPTAWACH, K.; PUTHONG, S.; SANGTANOO, P.; THITIPRASERT, S.; KARNCHANATAT, A. Sulfated polysaccharides derived from marine microalgae, *Synechococcus* sp. VDW, inhibit the human colon cancer cell line Caco-2 by promoting cell apoptosis via the JNK and p38 MAPK signaling pathway. **Algal Res.**, v. 69, p. 102919, 2023.

SRITHARAN, S.; SIVALINGAM, N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. **Life Sci.**, v. 278, p. 119527, 2021.

STANSEL, T.; WICKLINE, S. A.; PAN, H. NF- κ B inhibition suppresses experimental melanoma lung metastasis. **J. Cancer Sci. Clin. Ther.**, v. 4, n. 3, p. 256, 2020.

STEFANAKIS, M.K.; PAPAIOANNOU, C.; LIANOPOULOU, V.; PHILOTHEOU-PANOU, E.; GIANNAKOULA, A.E.; LAZARI, D.M. Seasonal variation of aromatic plants under cultivation conditions. **Plants**, v. 11, p. 2083, 2022.

STEFANI, C.; MIRICESCU, D.; STANESCU-SPINU, I. I.; NICA, R. I.; GREABU, M.; TOTAN, A. R.; JINGA, M. Growth factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling

pathways in colorectal cancer pathogenesis: where are we now?. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 19, p. 10260, 2021.

STRASHILOV, S.; YORDANOV, A. Aetiology and pathogenesis of cutaneous melanoma: current concepts and advances. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 12, p. 6395, 2021.

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

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

SUN, J.; CARR, M. J.; KHUSHALANI, N. I. Principles of targeted therapy for melanoma. **Surg. Clin.**, v. 100, n. 1, p. 175-188, 2020.

SUN, P.; GU, L.; LUO, J.; QIN, Y.; SUN, L.; JIANG, S. ROS-mediated JNK pathway critically contributes to PFOS-triggered apoptosis in SH-SY5Y cells. **Neurotoxicol Teratol.**, v. 75, p. 106821, 2019.

SUN, R.; ZHAI, R.; MA, C.; MIAO, W. Combination of aloin and metformin enhances the antitumor effect by inhibiting the growth and invasion and inducing apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma through PI3K/AKT/mTOR pathway. **Cancer Med.**, v. 9, n. 3, p. 1141-1151, 2020.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin.**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SUNG, Y.; PARK, S.; PARK, S. J.; JEONG, J.; CHOI, M.; LEE, J.; KWON, W.; JANG, S.; LEE, M-H.; KIM, D. J.; LIU, K.; KIM, S-H.; LEE, J-H.; HA, Y-S.; KWON, T. G.; LEE, S.; DONG, Z.; RYOO, Z. Y.; KIM, M. O. Jazf1 promotes prostate cancer progression by activating JNK/Slug. **Oncotarget**, v. 9, n. 1, p. 755, 2018.

SWITZER, B.; PUZANOV, I.; SKITZKI, J. J.; HAMAD, L.; ERNSTOFF, M. S. Managing metastatic melanoma in 2022: a clinical review. **J. Oncol. Pract.**, v. 18, n. 5, p. 335-351, 2022.

SZTANDERA, K.; GORZKIEWICZ, M.; KLAJNERT-MACULEWICZ, B. Gold nanoparticles in cancer treatment. **Mol. Pharmaceutics**, v. 16, n. 1, p. 1-23, 2018.

TABANCA, N.; NALBANTSOY, A.; KENDRA, P.E.; DEMIRCI, F.; DEMIRCI, B. Chemical characterization and biological activity of the mastic gum essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia from Turkey. **Molecules**, v. 25, p. 2136, 2020.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Res.**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.

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

TERRA, S. B.; FERREIRA, B. P. Conhecimento de plantas alimentícias não convencionais em assentamentos rurais. **Cad. Verde Agroecol. Desenvol. Sustent.**, v. 15, n. 2, p. 221-228, 2020.

TERRA, S. B.; VIERA, C. T. R. Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs): levantamento em zonas urbanas de Santana do Livramento, RS. **Ambiência**, v. 15, n. 1, 2019.

THABIT, S.; ABDULMAJID, R.; CHENG, X. R.; TANG, X.; SUN, J.; SHI, Y. H.; LE, G. W. Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Conyza bonariensis* growing in Yemen. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 28, n. 1, 2015.

THALAPPIL, M.A.; BUTTURINI, E.; PRATI, A.C.; BETTIN, I.; ANTONINI, L.; SAPIENZA, F.U.; GARZOLI, S.; RAGNO, R.; MARIOTTO, S. *Pinus mugo* essential oil impairs STAT3 activation through oxidative stress and induces apoptosis in prostate cancer cells. **Molecules**, v. 27, p. 4834, 2022.

THATIKONDA, S.; POOLADANDA, V.; TOKALA, R.; NAGULA, S.; GODUGU, C. Niclosamide inhibits epithelial-mesenchymal transition with apoptosis induction in BRAF/NRAS mutated metastatic melanoma cells. **In Vitro Toxicol.**, v. 89, p. 105579, 2023.

THITINARONGWATE, W.; MEKTRIRAT, R.; NIMLAMOO, W.; KHONSUNG, P.; PIKULKAEW, S.; OKONOGI, S.; KUNANUSORN, P. Phytochemical and safety evaluations of *Zingiber ottensii* Valetton essential oil in zebrafish embryos and rats. **Toxics**, v. 9, p. 102, 2021.

TONOOKA, A.; OHASHI, R. Current trends in anti-cancer molecular targeted therapies: renal complications and their histological features. **J. Nippon Med. Sch.**, v. 89, n. 2, p. 128-138, 2022.

TRANG, D. T.; HOANG, T. K. V.; NGUYEN, T. T. M.; VAN CUONG, P.; DANG, N. H.; DANG, H. D.; QUANG, T. N.; DAT, N. T. Essential oils of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 lung cancer cells. **Biomed Res. Int.**, v. 2020, 2020.

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

TYAGI, A.K.; PRASAD, S.; YUAN, W.; LI, S.; AGGARWAL, B.B. Identification of a novel compound (β -sesquiphellandrene) from turmeric (*Curcuma longa*) with anticancer potential: comparison with curcumin. **Invest. New Drugs**, v. 33, p. 1175-1186, 2015.

TZAKOU, O.; VAGIAS, C.; GANI, A.; YANNITSAROS, A. Volatile constituents of essential oils isolated at different growth stages from three *Conyza* species growing in Greece. **Flavour Fragr. J.**, v. 20, p. 425-428, 2005.

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

URDAMPILLETA, J.D.; AMAT, A.G.; BIDAÚ, C.J.; KOSLOBSKY, N.K. Biosystematic and chemosystematic studies in five South American species of *Conyza* (Asteraceae). **Bol. Soc. Argent. Bot.**, v. 40, p. 2, 2005.

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

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

VALLATHOL, D. H.; BABU, T.; KUTTY, S. V.; NTK, T.; WARRIER, N. Small cell neuroendocrine carcinoma of the breast-case series of a common tumour at a rare location. **Braz. J. Oncol.**, v. 19, p. 1-5, 2023.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VAN HUIZEN, E.; MCINERNEY, G. M. Activation of the PI3K-AKT pathway by old world alphaviruses. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 970, 2020.

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

VIDAL, S.; BOUZAHER, Y. H.; MOTIAM, A. E.; SEOANE, R.; RIVAS, C. Overview of the regulation of the class IA PI3K/AKT pathway by SUMO. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 132, p. 51-61, 2022.

VOSS, A. K.; STRASSER, A. The essentials of developmental apoptosis. **F1000Res.**, v. 9, 2020.

WADA, M.; CANALS, D.; ADADA, M.; COANT, N.; SALAMA, M. F.; HELKE, K. L.; ARTHUR, J. S.; SHROYER, K. R.; KITATANI, K.; OBEID, L. M.; Hannun, Y. A. P38 delta MAPK promotes breast cancer progression and lung metastasis by enhancing cell proliferation and cell detachment. **Oncogene**, v. 36, n. 47, p. 6649-6657, 2017.

WAGSTAFF, W.; MWAMBA, R. N.; GRULLON, K.; ARMSTRONG, M.; ZHAO, P.; HENDREN-SANTIAGO, B.; HAYDON, R. C. Melanoma: molecular genetics, metastasis, targeted therapies, immunotherapies, and therapeutic resistance. **Genes Dis.**, v. 9, n. 6, p. 1608-1623, 2022.

WANG, Z.; SHAN, J.; ZHOU, X.; WANG, J.; YU, G.; DONG, W.; LIU, H. Surgery, radiotherapy, chemotherapy, targeted therapy, and immunotherapy of rectal adenocarcinoma with penile metastasis: a case report. **J. Gastrointest. Oncol.**, v. 14, n. 2, p. 1155, 2023a.

WANG, F.; WU, P.; QIN, S.; DENG, Y.; HAN, P.; LI, X.; FAN, C.; XU, Y. Curcin C inhibit osteosarcoma cell line U2OS proliferation by ROS induced apoptosis,

autophagy and cell cycle arrest through activating JNK signal pathway. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 195, p. 433-439, 2022.

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

WANG, L.; WANG, C.; TAO, Z.; ZHAO, L.; ZHU, Z.; WU, W.; CHEN, T. Curcumin derivative WZ35 inhibits tumor cell growth via ROS-YAP-JNK signaling pathway in breast cancer. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 38, n. 1, p. 1-17, 2019.

WANG, Q.; BODE, A. M.; ZHANG, T. Targeting CDK1 in cancer: mechanisms and implications. **NPJ Precis. Oncol.**, v. 7, n. 1, p. 58, 2023.

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

WANG, Q.; PAN, L. H.; LIN, L.; ZHANG, R.; DU, Y. C.; CHEN, H.; HUANG, M.; GUO, K. W.; YANG, X-Z. Essential oil from *Carpesium abrotanoides* L. Induces apoptosis via activating mitochondrial pathway in hepatocellular carcinoma cells. **Curr. Med. Sci.**, v. 38, n. 6, p. 1045-1053, 2018.

WANG, S.; WANG, X.; WANG, Y.U.; LENG, Q.; SUN, Y.U.; HOFFMAN, R.M.; JIN, H. The anti-oxidant monoterpene p-cymene reduced the occurrence of colorectal cancer in a hyperlipidemia rat model by reducing oxidative stress and expression of inflammatory cytokines. **Anticancer Res.**, v. 41, p. 1213-1218, 2021.

WARD, K. A.; LAZOVICH, D.; HORDINSKY, M. K. Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 67, p. 1055–1067, 2012.

WATANABE, Y.; OIKAWA, R.; KODAKA, Y.; SATO, Y.; ONO, S.; KENMOCHI, T.; SUZUKI, H.; FUTAGAMI, S.; KATO, M.; YAMAMOTO, H.; ITOH, F. Cancer-related genetic variants of *Helicobacter pylori* strains determined using gastric wash-based whole-genome analysis with single-molecule real-time technology. **Int. J. Cancer**, v. 148, n. 1, p. 178-192, 2021.

WEI, B.; HUANG, Q.; HUANG, S.; MAI, W.; ZHONG, X. Trichosanthin-induced autophagy in gastric cancer cell MKN-45 is dependent on reactive oxygen species (ROS) and NF- κ B/p53 pathway. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 131, n. 2, p. 77-83, 2016.

WEI, C-Y.; WANG, L.; ZHU, M-X.; DENG, X-Y.; WANG, D-H.; ZHANG, S-M.; YING, J-H.; YUAN, X.; WANG, Q.; XUAN, T-F.; HE, A-Q.; QI, F-Z.; GU, J. Y. TRIM44 activates the AKT/mTOR signal pathway to induce melanoma progression by stabilizing TLR4. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, 38, 1-13, 2019.

WEI, J.; CHEN, X.; LI, Y.; LI, R.; BAO, K.; LIAO, L.; LI, J. Cucurbitacin B-induced G2/M cell cycle arrest of conjunctival melanoma cells mediated by GRP78–FOXM1–KIF20A pathway. **Acta Pharm. Sin. B.**, v. 12, n. 10, p. 3861-3876, 2022.

- WEI, T.; XIAOJUN, X.; PEILONG, C. Magnoflorine improves sensitivity to doxorubicin (DOX) of breast cancer cells via inducing apoptosis and autophagy through AKT/mTOR and p38 signaling pathways. **Biomed. Pharmacother.**, v. 121, p. 109139, 2020.
- WEN, S. Y.; CHENG, S. Y.; NG, S. C.; ANEJA, R.; CHEN, C. J.; HUANG, C. Y.; KUO, W. W. Roles of p38 α and p38 β mitogen-activated protein kinase isoforms in human malignant melanoma A375 cells. **Int. J. Mol. Med.**, v. 44, n. 6, p. 2123-2132, 2019.
- WILSON, B. A.; THORNBURG, C. C.; HENRICH, C. J.; GRKOVIC, T.; O'KEEFE, B. R. Creating and screening natural product libraries. **Nat. Prod. Rep.**, v. 37, n. 7, p. 893-918, 2020.
- WOO, J.; CHOO, G.; YOO, E.; KIM, S.; LEE, J.; HAN, S.; JUNG, J. Apigenin induces apoptosis by regulating Akt and MAPK pathways in human melanoma cell A375SM. **Mol. Med. Rep.**, v. 22, n. 6, p. 4877-4889, 2020.
- WU, J.; LI, Y.; HE, Q.; YANG, X. Exploration of the use of natural compounds in combination with chemotherapy drugs for tumor treatment. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1022, 2023.
- WU, P.; BECKER, A.; PARK, J. Growth inhibitory signaling of the Raf/MEK/ERK pathway. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 15, p. 5436, 2020.
- WU, Q.; DENG, J.; FAN, D.; DUAN, Z.; ZHU, C.; FU, R.; WANG, S. Ginsenoside Rh4 induces apoptosis and autophagic cell death through activation of the ROS/JNK/p53 pathway in colorectal cancer cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 148, p. 64-74, 2018.
- WU, X.; SUN, L.; XU, F. NF- κ B in Cell Deaths, Therapeutic resistance and nanotherapy of tumors: recent advances. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 6, p. 783, 2023.
- XIE, Y-H.; CHEN, Y-X.; FANG, J-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduct. Target Ther.**, v. 5, n. 1, p. 22, 2020.
- XIU, Z.; ZHU, Y.; HAN, J.; LI, Y.; YANG, X.; YANG, G.; JIN, N. Caryophyllene oxide induces ferritinophagy by regulating the NCOA4/FTH1/LC3 pathway in hepatocellular carcinoma. **Front. Pharmacol.**, v. 13, p. 930958, 2022.
- XU, R.; HU, J. The role of JNK in prostate cancer progression and therapeutic strategies. **Biomed. Pharmacother.**, v. 121, p. 109679, 2020.
- XU, Y-R.; LEI, C-Q. TAK1-TABs complex: a central signalosome in inflammatory responses. **Front. Immunol.**, v. 11, p. 608976, 2021.
- YAN, G.; ELBADAWI, M.; EFFERTH, T. Multiple cell death modalities and their key features. **World Acad. Sci. J.**, v. 2, n. 2, p. 39-48, 2020.
- YANG, B.; CHEN, Y.; SHI, J. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. **Chem. Rev.**, v. 119, p. 4881-4985, 2019.

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

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

YAZDANIAN, M.; ROSTAMZADEH, P.; ALAM, M.; ABBASI, K.; TAHMASEBI, E.; TEBYANIYAN, H.; RANJBAR, R.; SEIFALIAN, A.; MOGHADDAM, M.M.; KAHNAMOEI, M.B. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic effects of Echinacea and Arctium extracts and Zataria essential oil. **AMB Express**, v. 12, p. 1-13, 2022.

YE, Z.; LIANG, Z.; MI, Q.; GUO, Y. Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. **J. BUON**, v. 25, p. 280-285, 2020.

YU, W.; CHEN, Y.; PUTLURI, N.; COARFA, C.; ROBERTSON, M.J.; PUTLURI, V.; STOSS, F.; DUBRULLE, J.; MANCINI, M.A.; PANG, J.C.; NGUYEN, T.; BALUYA, D.; MYERS, J.N.; LAI, S.Y.; SANDULACHE, V.C. Acquisition of cisplatin resistance shifts head and neck squamous cell carcinoma metabolism toward neutralization of oxidative stress. **Cancers**, v. 12, p. 1670, 2020.

YUAN, Y.; LONG, H.; ZHOU, Z.; FU, Y.; JIANG, B. PI3K–AKT-Targeting breast cancer treatments: Natural products and synthetic compounds. **Biomolecules**, v. 13, n. 1, p. 93, 2023.

YUDA, J.; DOKI, N.; MATSUOKA, H.; YOKOTA, T.; TOMITA, A.; TAKAHASHI, N.; MATSUMURA, I.; KUBO, K.; GOTO, T.; KIRITO, K.; MAKI, A.; AOKI, M.; ALLEPUZ, A.; MINAMI, Y. Asciminib vs bosutinib in CML patients pretreated with ≥ 2 tyrosine kinase inhibitors: Results from the Japanese subgroup analysis of ASCEMBL study. **Cancer Med.**, v. 12, n. 3, p. 2990-2998, 2023.

YUE, J.; LÓPEZ, J. M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 7, p. 2346, 2020.

ZAMBRANO-NAVEA, C.; BASTIDA, F.; GONZALEZ-ANDUJAR, J. L. A cohort-based stochastic model of the population dynamic and long-term management of *Conyza bonariensis* in fruiting tree crops. **Crop Prot.**, v. 80, p. 15-20, 2016.

HAZERI, G.; POVINELLI, A. P. R.; LE DUFF, C. S.; TANG, B.; CORNELIO, M. L.; JONES, A. M. Synthesis and spectroscopic analysis of piperine-and piperlongumine-inspired natural product scaffolds and their molecular docking with IL-1 β and NF- κ B proteins. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2841, 2020.

ZHANG, D.; FU, Y.; LIU, Y.; WU, Y.; CHEN, J.; ZHANG, L.; WANG, R.; CHEN, Z.; LIU, T. 8-methoxyflindersine-induced apoptosis and cell cycle disorder involving MAPK signaling activation in human colorectal cancer cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, n. 9, p. 8039, 2023a.

ZHANG, H.; CHEN, R.; WANG, X.; ZHANG, H.; ZHU, X.; CHEN, J. Lobaplatin-induced apoptosis requires p53-mediated p38MAPK activation through ROS generation in non-small-cell lung cancer. **Front. Oncol.**, v. 9, p. 538, 2019a.

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

ZHANG, M.; LAI, J.; WU, Q.; LAI, J.; SU, J.; ZHU, B.; LI, Y. Naringenin induces hepg2 cell apoptosis via ROS-mediated JAK-2/STAT-3 signaling pathways. **Molecules**, v. 28, n. 11, p. 4506, 2023b.

ZHANG, M.; QU, J.; GAO, Z.; QI, Q.; YIN, H.; ZHU, L.; WU, Y.; LIU, W.; YANG, J.; HUANG, X. Timosaponin AIII induces G2/M arrest and apoptosis in breast cancer by activating the ATM/Chk2 and p38 MAPK signaling pathways. **Front. Pharmacol.**, v. 11, p. 601468, 2021a.

ZHANG, T.; MA, C.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; HU, H. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **MedComm**, v. 2, n. 4, p. 618-653, 2021b.

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

ZHAO, N.; GAO, Y.; JIA, H.; JIANG, X. Anti-apoptosis effect of traditional Chinese medicine in the treatment of cerebral ischemia–reperfusion injury. **Apoptosis**, p. 1-28, 2023a.

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

ZHAO, T.; ZOU, Y.; YAN, H.; CHANG, Y.; ZHAN, Y. Non-coding RNAs targeting NF- κ B pathways in aquatic animals: A review. **Front. Immunol.**, v. 14, p. 1091607, 2023b.

ZHAO, X.; SUI, T.; FU, Z.; ZHANG, L.; GAO, Y.; WANG, L.; ZHANG, H. Anticancer activity and mechanisms of action of Taisui fermentation broth in human colorectal cancer HCT116 cells *in vitro* and *in vivo*. **J. Funct. Foods**, v. 106, p. 105592, 2023c.

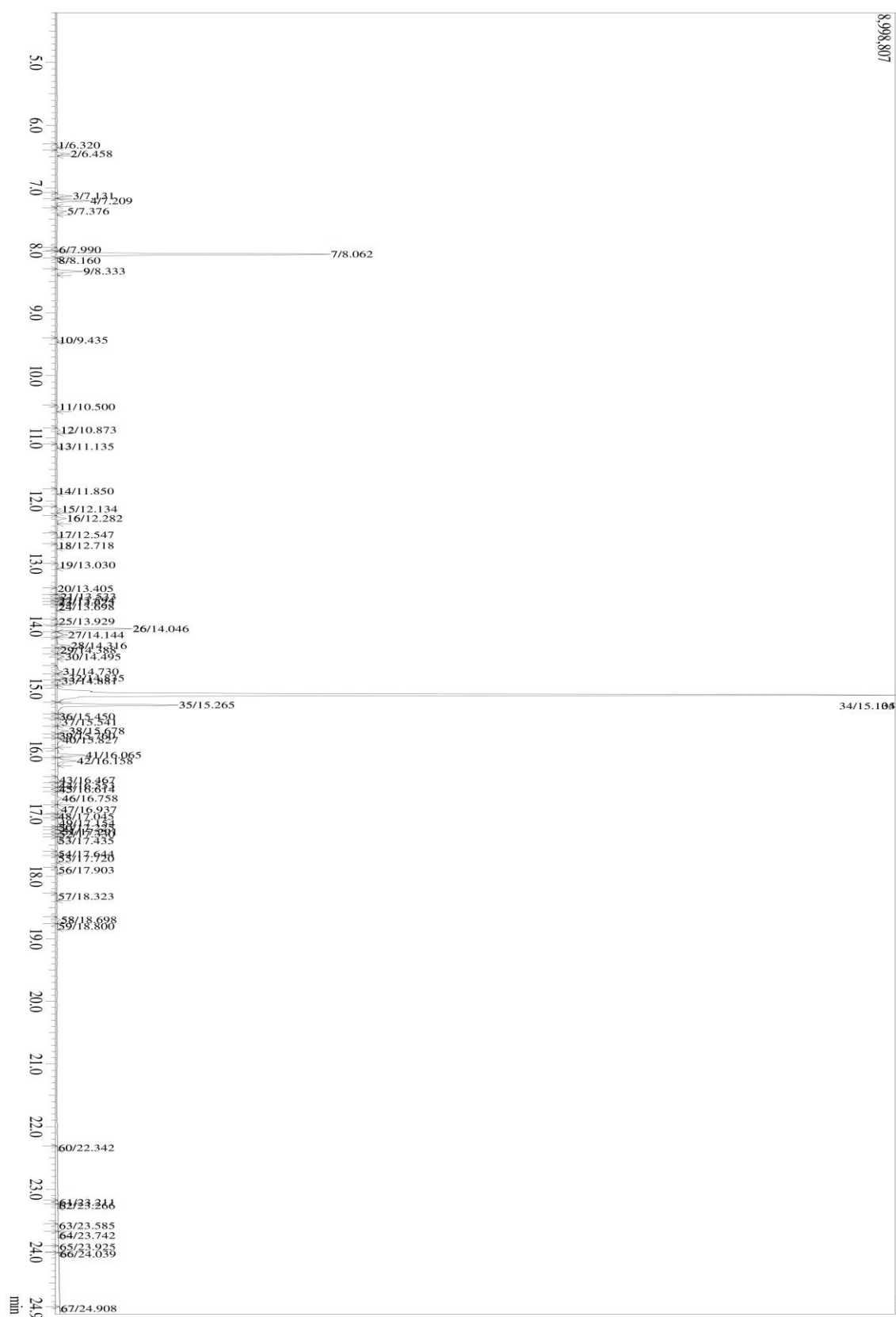
ZHENG, G. Z.; ZHANG, Q. H.; CHANG, B.; XIE, P.; LIAO, H.; DU, S. X.; LI, X. D. Dioscin induces osteosarcoma cell apoptosis by upregulating ROS-mediated P38 MAPK signaling. **Drug Dev. Res.**, v. 84, n. 1, p. 25-35, 2023.

ZHOU, S.; OUYANG, W.; ZHANG, X.; LIAO, L.; PI, X.; YANG, R.; MEI, B.; XU, H.; XIANG, S.; LI, J. UTRN inhibits melanoma growth by suppressing p38 and JNK/c-Jun signaling pathways. **Cancer Cell Int.**, v. 21, p. 1-11, 2021.

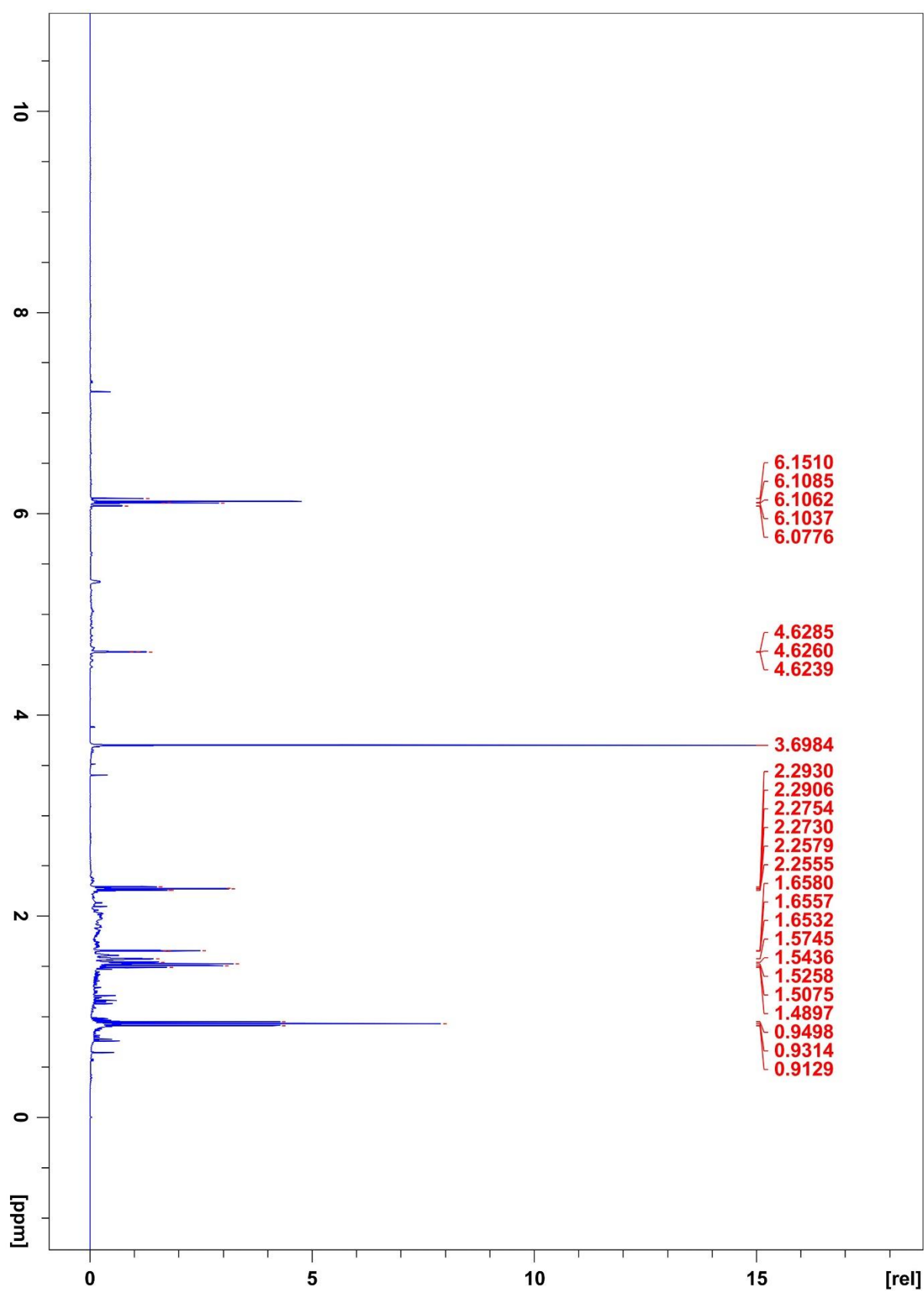
ZUBAIR, M. S.; MAULANA, S.; WIDODO, A.; MUKADDAS, A.; PITOPANG, R. Docking study on anti-HIV-1 activity of secondary metabolites from Zingiberaceae plants. **J. Pharm. Bioallied Sci.**, v. 12, n. Suppl 2, p. S763, 2020.

Apêndices

APÊNDICE 1 – Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB)



APÊNDICE 2 – ^1H RMN do óleo essencial das partes aéreas de *Conyza bonariensis* (OECB)



Anexos

ANEXO 1 - Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) para peixe-zebra (*Danio rerio*)



Universidade
Federal da
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELO DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)", protocolada sob o CEUA nº 5391250222 (ID 001570), sob a responsabilidade de **Marianna Vieira Sobral e equipe; Rafael Carlos Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 25/03/2022.

We certify that the proposal "TOXICITY ASSESSMENT OF BIOACTIVE NATURAL AND SYNTHETIC PRODUCTS WITH POTENTIAL ANTITUMOR ACTIVITY IN ZEBRAFISH MODEL (*Danio rerio*)", utilizing 1600 Fishes (males and females), protocol number CEUA 5391250222 (ID 001570), under the responsibility of **Marianna Vieira Sobral and team; Rafael Carlos Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 03/25/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 03/2022 a 02/2025 Área: Ciências Farmacêuticas

Origem: Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais (UniPOM)

Espécie: Peixes

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 1 a 3 horas

Quantidade: 1600

Linhagem: *Danio rerio*

Peso: 0 a 0 g

João Pessoa, 02 de maio de 2023

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba



ANEXO 2 - Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa para PBMC (1/2)

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE VOLUNTÁRIOS SADIOS

Pesquisador: MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22986519.0.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: O relatório é referente aos dados do trabalho "Toxicidade e atividade antitumoral de

Data do Envio: 28/11/2019

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.760.437

Apresentação da Notificação:

Bem apresentada

Objetivo da Notificação:

Bem definido

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Realizada

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Está de acordo com as normas vigentes

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou documento de recepção do relatório pelo Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar)

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

ANEXO 2 - Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa para PBMC (2/2)

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 3.760.437

do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Recomendações:

nenhum

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O relatório parcial desta parte do projeto é válido e está aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	DECLARACAO_PPgPNSB.PDF	28/11/2019 19:18:26	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Postado
Envio de Relatório Parcial	RELATORIO_PARCIAL_PBMC_CEP_2 019.pdf	28/11/2019 19:18:57	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 11 de Dezembro de 2019

Assinado por:

Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (1/16)



Communication

Chemical Composition, In Vitro Antitumor Effect, and Toxicity in Zebrafish of the Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae)

Rafael Carlos Ferreira ¹, Yuri Manguera do Nascimento ¹, Paulo Bruno de Araújo Loureiro ¹, Rafael Xavier Martins ², Maria Eduarda de Souza Maia ², Davi Felipe Farias ², Josean Fechine Tavares ¹, Juan Carlos Ramos Gonçalves ¹, Marcelo Sobral da Silva ¹ and Marianna Vieira Sobral ^{1,*}

¹ Postgraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil

² Laboratory of Risk Assessment for Novel Technologies (LabRisk), Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil

* Correspondence: mariannavbs@gmail.com



Citation: Ferreira, R.C.; do Nascimento, Y.M.; de Araújo Loureiro, P.B.; Martins, R.X.; de Souza Maia, M.E.; Farias, D.F.; Tavares, J.F.; Gonçalves, J.C.R.; da Silva, M.S.; Sobral, M.V. Chemical Composition, In Vitro Antitumor Effect, and Toxicity in Zebrafish of the Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae). *Biomolecules* **2023**, *13*, 1439. <https://doi.org/10.3390/biom13101439>

Academic Editor: Anna Sparatore

Received: 26 August 2023

Revised: 13 September 2023

Accepted: 17 September 2023

Published: 24 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The essential oil from *Conyza bonariensis* (Asteraceae) aerial parts (CBEO) was extracted by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus and was characterized by gas chromatography–mass spectrometry. The antitumor potential was evaluated against human tumor cell lines (melanoma, cervical, colorectal, and leukemias), as well as non-tumor keratinocyte lines using the MTT assay. The effect of CBEO on the production of Reactive Oxygen Species (ROS) was evaluated by DCFH-DA assay, and a protection assay using the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) was also performed. Moreover, the CBEO toxicity in the zebrafish model was assessed. The majority of the CBEO compound was (Z)-2-lachnophyllum ester (57.24%). The CBEO exhibited selectivity towards SK-MEL-28 melanoma cells (half maximal inhibitory concentration, $IC_{50} = 18.65 \pm 1.16 \mu\text{g/mL}$), and induced a significant increase in ROS production. In addition, the CBEO's cytotoxicity against SK-MEL-28 cells was reduced after pretreatment with NAC. Furthermore, after 96 h of exposure, $1.5 \mu\text{g/mL}$ CBEO induced death of all zebrafish embryos. Non-lethal effects were observed after exposure to 0.50 – $1.25 \mu\text{g/mL}$ CBEO. Additionally, significant alterations in the activity of enzymes associated with oxidative stress in zebrafish larvae were observed. These results provide evidence that CBEO has a significant in vitro antimelanoma effect by increasing ROS production and moderate embryotoxicity in zebrafish.

Keywords: essential oil; antiproliferative effect; embryotoxicity

1. Introduction

Cancer is a relevant public health problem worldwide [1]. In 2020, approximately 19 million people were diagnosed with cancer and about 10 million deaths were recorded [2].

Currently, cancer treatment mainly includes surgery, radiotherapy, chemotherapy, and targeted therapy [2]. Nevertheless, limitations regarding therapeutic success have been observed, including patients relapsing or without an adequate response to therapy [3], in addition to significant adverse effects and chemoresistance [4]. Therefore, the search for new therapeutic opportunities for the treatment of this disease continues to grow globally [5].

Natural products or their derivatives represent more than 60% of the molecules used for cancer treatment [6]. In this context, essential oils (EOs) have been widely investigated for their pharmacological effects, including antimicrobial [7,8], anti-inflammatory [9], and antitumor effects [10–15]. EOs are aromatic oily liquids obtained from many parts of plants such as flowers, seeds, leaves, twigs, and roots. EO is composed of numerous volatile constituents such as sesquiterpenes, monoterpenes, aldehydes, alcohols, esters, and

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (2/16)



pharmaceuticals



Article

The Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) Exerts an In Vitro Antimelanoma Effect by Inducing Apoptosis and Modulating the MAPKs, NF- κ B, and PKB/AKT Signaling Pathways

Rafael Carlos Ferreira , Sâmia Sousa Duarte, Valgrícia Matias de Sousa, Ramon Ramos Marques de Souza, Karinne Kelly Gadelha Marques, Renata Albuquerque de Abrantes, Yuri Manguera do Nascimento , Natália Ferreira de Sousa, Marcus Tullius Scotti , Luciana Scotti , Josean Fachine Tavares , Juan Carlos Ramos Gonçalves , Marcelo Sobral da Silva and Marianna Vieira Sobral *

Postgraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil; ramonramos.rm@gmail.com (R.R.M.d.S.); karinnegadelha@hotmail.com (K.K.G.M.)

* Correspondence: mariannavbs@gmail.com



Citation: Ferreira, R.C.; Duarte, S.S.; de Sousa, V.M.; de Souza, R.R.M.; Marques, K.K.G.; de Abrantes, R.A.; do Nascimento, Y.M.; de Sousa, N.E.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; et al. The Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) Exerts an In Vitro Antimelanoma Effect by Inducing Apoptosis and Modulating the MAPKs, NF- κ B, and PKB/AKT Signaling Pathways. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1553. <https://doi.org/10.3390/ph16111553>

Academic Editor: Riccardo Petrelli

Received: 5 October 2023

Revised: 21 October 2023

Accepted: 25 October 2023

Published: 2 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The characterization and cytotoxicity of the essential oil from *Conyza bonariensis* (L.) aerial parts (CBEO) were previously conducted. The major compound was (Z)-2-lachnophyllum ester (EZ), and CBEO exhibited significant ROS-dependent cytotoxicity in the melanoma cell line SK-MEL-28. Herein, we employed the Molegro Virtual Docker v.6.0.1 software to investigate the interactions between the EZ and Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), the Nuclear Factor κ B (NF- κ B), and the Protein Kinase B (PKB/AKT). Additionally, in vitro assays were performed in SK-MEL-28 cells to assess the effect of CBEO on the cell cycle, apoptosis, and these signaling pathways by flow cytometry and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay using MAPKs inhibitors. CBEO induced a significant increase in the sub-G1 peak, as well as biochemical and morphological changes characteristic of apoptosis. The in-silico results indicated that EZ interacts with Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1), c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1), p38 α MAPK, NF- κ B, and PKB/AKT. Moreover, CBEO modulated the ERK1/2, JNK, p38 MAPK, NF- κ B, and PKB/AKT activities in SK-MEL-28 cells. Furthermore, CBEO's cytotoxicity against SK-MEL-28 cells was significantly altered in the presence of MAPKs inhibitors. These findings support the in vitro antimelanoma effect of CBEO through apoptosis induction, and the modulation of ERK, JNK, p38 MAPK, NF- κ B, and PKB/AKT activities.

Keywords: natural products; essential oil; antitumor effect

1. Introduction

Cutaneous melanoma is the most aggressive type of skin cancer [1], originating from the malignant transformation of melanocytes [2]. This cancer represents a global public health problem, with 57,000 recorded deaths in 2020 [3].

Chemotherapy remains a significant pharmacological modality for the treatment of many cancer types [4], including melanoma [5]. However, issues are associated with antineoplastic chemotherapy, such as chemoresistance [6–8]. Therefore, research should be conducted to obtain new therapeutic agents [9]. In this context, natural products stand out as a valuable source of molecules with potential applications for cancer treatment [10].

Essential oils (EOs) are oily and volatile liquids [11], isolated from various parts of plants such as bark, flowers, and leaves [12,13]. The components of EOs include terpenes, terpenoids, esters, and aromatic phenols [14,15]. *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) is a common weed in South America [16]. EOs from *Conyza bonariensis* exhibit

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (3/16)



Article

α -Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*

Daniela Bomfim de Barros ^{1,2,3}, Luanna de Oliveira e Lima ², Larissa Alves da Silva ², Mariana Cavalcante Fonseca ², Rafael Carlos Ferreira ⁴, Hermes Diniz Neto ⁵, Danielle da Nóbrega Alves ⁶, Walicyranison Plinio da Silva Rocha ², Luciana Scotti ⁷, Edeltrudes de Oliveira Lima ², Marianna Vieira Sobral ⁴, Lúcio Roberto Cançado Castellano ³, Juliana Moura-Mendes ^{8,*}, Felipe Queiroga Sarmiento Guerra ^{2,*} and Márcia Vanusa da Silva ¹

- ¹ Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil
 - ² Department of Pharmaceutical Sciences, Paraíba Federal University, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
 - ³ Human Immunology Research and Education Group-GEPIH, Technical School of Health, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
 - ⁴ Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
 - ⁵ University Hospital Julio Muller, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá 78060-900, MT, Brazil
 - ⁶ Department of Clinical and Social Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
 - ⁷ Cheminformatics Laboratory, Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Quality Management, University Hospital, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
 - ⁸ Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo 111421, Paraguay
- * Correspondence: jmendes@rec.una.py (J.M.-M.); fqsg@academico.ufpb.br (F.Q.S.G.)



Citation: Bomfim de Barros, D.; de Oliveira e Lima, L.; Alves da Silva, L.; Cavalcante Fonseca, M.; Ferreira, R.C.; Diniz Neto, H.; da Nóbrega Alves, D.; da Silva Rocha, W.P.; Scotti, L.; de Oliveira Lima, E.; et al. α -Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*. *Antibiotics* **2023**, *12*, 480. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030480>

Academic Editors: Claudia Cafarchia and Domenico Schillaci

Received: 18 January 2023

Revised: 17 February 2023

Accepted: 23 February 2023

Published: 28 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Candida albicans* is associated with serious infections in immunocompromised patients. Terpenes are natural-product derivatives, widely studied as antifungal alternatives. In a previous study reported by our group, the antifungal activity of α -pinene against *C. albicans* was verified; α -pinene presented an MIC between 128–512 $\mu\text{g/mL}$. In this study, we evaluate time-kill, a mechanism of action using in silico and in vitro tests, anti-biofilm activity against the *Candida albicans*, and toxicity against human cells (HaCaT). Results from the molecular-docking simulation demonstrated that thymidylate synthase ($-52 \text{ kcal mol}^{-1}$), and δ -14-sterol reductase ($-44 \text{ kcal mol}^{-1}$) presented the best interactions. Our in vitro results suggest that α -pinene's antifungal activity involves binding to ergosterol in the cellular membrane. In the time-kill assay, the antifungal activity was not time-dependent, and also inhibited biofilm formation, while rupturing up to 88% of existing biofilm. It was non-cytotoxic to human keratinocytes. Our study supports α -pinene as a candidate to treat fungal infections caused by *C. albicans*.

Keywords: natural product; terpenes; fungicidal activity; biofilm; candidiasis; in silico; in vitro

1. Introduction

The advance of medicine has increased life expectancy and aided in the treatment of many diseases, yet this has also caused much greater susceptibility to opportunistic fungal diseases [1]. Patients hospitalized and receiving chemotherapy, bone marrow transplants, and those with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and other immune-deficiency diseases are often exposed to invasive fungal infections (IFI) [2]. IFIs are frequently associated with *Aspergillus*, *Cryptococcus*, and *Candida* [1]. *Candida* species are responsible for many cases of septicemia, bringing high mortality rates and medical costs as well [3,4]. *Candida albicans*, a fungus that inhabits the gastrointestinal and genitourinary tracts, and the oral and conjunctive microbiota is the species most isolated as an etiological agent of candidiasis [2,5]. *Candida albicans* is the third most-commonly isolated microorganism in bloodstream infections in hospitalized patients [6]. The World Health Organization

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (4/16)



ISSN 1519-6984 (Print)
ISSN 1678-4375 (Online)

Original Article

Antifungal effect of (R) and (S)-citronellal enantiomers and their predictive mechanism of action on *Candida albicans* from voriconazole-resistant onychomycoses

Efeito antifúngico dos enantiômeros (R) e (S)-citronelal e seu mecanismo de ação preditivo sobre *Candida albicans* de onicomicoses resistentes ao voriconazol

R. G. Gouveia^a, N. R. Oliveira^a, F. P. Andrade-Júnior^a, R. C. Ferreira^a, G. M. W. Amorim^b, D. K. F. Silva^a, S. S. Duarte^a, C. I. S. Medeiros^{a*}, A. A. Oliveira-Filho^c and E. O. Lima^{a,b}

^aUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^bUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Departamento de Ciências Farmacêuticas – DCF, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^cUniversidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CTSR, Patos, Paraíba, Brasil

Abstract

Onychomycosis is the most common disease affecting the nail unit and accounts for at least 50% of all nail diseases. In addition, *Candida albicans* is responsible for approximately 70% of onychomycoses caused by yeasts. This study investigated the antifungal effect of (R) and (S)-citronellal enantiomers, as well as its predictive mechanism of action on *C. albicans* from voriconazole-resistant onychomycoses. For this purpose, *in vitro* broth microdilution and molecular docking techniques were applied in a predictive and complementary manner to the mechanisms of action. The main results of this study indicate that *C. albicans* was resistant to voriconazole and sensitive to the enantiomers (R) and (S)-citronellal at a dose of 256 and 32 µg/mL respectively. In addition, there was an increase in the minimum inhibitory concentration (MIC) of the enantiomers in the presence of sorbitol and ergosterol, indicating that these molecules possibly affect the integrity of the cell wall and cell membrane of *C. albicans*. Molecular docking with key biosynthesis proteins and maintenance of the fungal cell wall and plasma membrane demonstrated the possibility of (R) and (S)-citronellal interacting with two important enzymes: 1,3-β-glucan synthase and lanosterol 14α-demethylase. Therefore, the findings of this study indicate that the (R) and (S)-citronellal enantiomers are fungicidal on *C. albicans* from onychomycoses and probably these substances cause damage to the cell wall and cell membrane of these micro-organisms possibly by interacting with enzymes in the biosynthesis of these fungal structures.

Keywords: (R) and (S)-citronellal, voriconazole, onychomycosis, mechanism of action.

Resumo

A onicomicose é a doença mais comum que afeta a unidade ungueal e representa pelo menos 50% de todas as doenças ungueais. Além disso, a *Candida albicans* é responsável por aproximadamente 70% das onicomicoses causadas por leveduras. Nesse estudo, foi investigado o efeito antifúngico dos enantiômeros (R) e (S)-citronelal, bem como seu mecanismo de ação preditivo sobre *C. albicans* de onicomicoses resistentes ao voriconazol. Para este propósito, foram aplicadas técnicas *in vitro* de microdiluição em caldo e docking molecular de forma preditiva e complementar para os mecanismos de ação. Os principais resultados deste estudo indicam que *C. albicans* foi resistente ao voriconazol e sensível aos enantiômeros (R) e (S)-citronelal na dose de 256 e 32 µg/mL respectivamente. Além disso, houve aumento da concentração inibitória mínima (CIM) dos enantiômeros na presença do sorbitol e do ergosterol, indicando que estas moléculas possivelmente afetem a integridade da parede e da membrana celular de *C. albicans*. O docking molecular com proteínas chave da biossíntese e manutenção da parede celular e da membrana plasmática fúngica, demonstraram a possibilidade do (R) e (S)-citronelal interagir com duas importantes enzimas: 1,3-β-glucan sintase e lanosterol 14α-demetilase. Portanto, os achados desse estudo indicam que os enantiômeros (R) e (S)-citronelal são fungicidas sobre *C. albicans* de onicomicoses e provavelmente essas substâncias causem danos a parede e a membrana celular desses microrganismos possivelmente por interagir com as enzimas da biossíntese destas estruturas fúngicas.

Palavras-chave: (R) e (S)-citronelal, voriconazol, onicomicose, mecanismo de ação.

*e-mail: medeirosccassio4@gmail.com

Received: January 27, 2023 – Accepted: April 14, 2023



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (5/16)

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
<https://doi.org/10.1007/s00210-023-02686-0>

BRIEF REPORT



Cytotoxicity of a new spiro-acridine derivative: modulation of cellular antioxidant state and induction of cell cycle arrest and apoptosis in HCT-116 colorectal carcinoma

Valgrícia Matias de Sousa¹ · Sâmia Sousa Duarte¹ · Daiana Karla Frade Silva¹ · Rafael Carlos Ferreira¹ · Ricardo Olímpio de Moura² · Miguel Angelo Santos Pinheiro Segundo³ · Davi Farias⁴ · Leonardo Vieira⁴ · Juan Carlos Ramos Gonçalves^{1,5} · Marianna Vieira Sobral^{1,5}

Received: 20 June 2023 / Accepted: 21 August 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Introduction

Colorectal cancer (CRC) ranks as the third most common primary malignancy. Epidemiological data projected approximately 1.9 million new cases and 0.9 million deaths globally in 2020. Moreover, it is anticipated that by 2030, there will be around 2.2 million new cases of CRC diagnosed and 1.1 million deaths (Biller and Schrag 2021; Sawicki et al. 2021; Xi and Xu 2021).

CRC treatment has significantly advanced in recent decades, incorporating various approaches such as surgery, immunotherapy, targeted therapy and cytotoxic chemotherapy, either individually or in combination. Despite these advancements, CRC continues to be the second leading cause of cancer-related deaths globally (Bray et al. 2018; Sung et al. 2021; Xi and Xu 2021). As a result, the substantial morbidity and mortality associated with CRC present a significant public health challenge, prompting ongoing efforts to explore and develop novel therapeutic strategies.

Compounds containing the acridine scaffold have been recognized for their potential anticancer agents. Amsacrine and pyrazoloacridine are notable examples of acridine-based drugs employed in cancer treatment (Sing et al. 2022). Due to the high versatility of the acridine ring, researchers have focused on obtaining new derivatives primarily through the introduction of lateral groups (Zhang et al. 2014; de Almeida et al. 2017). Acridines are known for their ability to induce cell cycle arrest and apoptosis by intercalating into DNA and inhibiting topoisomerases due to the planar aromatic structure of the acridine ring (de Almeida et al. 2017; Mangueira et al. 2017; Chen et al. 2018, 2019; Haider et al. 2019; Sing et al. 2022). Moreover, acridine derivatives have been considered multitargeted inhibitory compounds for cancer therapy. Their actions include inhibition of histone deacetylase (Chen et al. 2018) and poly (ADP-ribose) polymerases (Dai et al. 2020), in addition to acting as multitarget inhibitors of VEGFR-2 and EGFR, and Src and MEK kinase (Luan et al. 2011; Cui et al. 2016, 2017; Hu et al. 2022). Multitarget agents modulate different targets simultaneously; which can provide a greater therapeutic advantage than single-target agents for cancer treatment (Morphy et al. 2004; Morphy and Rankovic 2005; Makhoba et al. 2020).

Spiro-acridine compounds are a new and promising class of acridine derivatives. They are synthesized through cyclization reactions, resulting in a five- or six-membered spiro ring attached to acridine C-9 carbon (Vilková et al. 2014). These compounds have been reported in the literature as inhibitors of topoisomerase and tyrosinase enzymes, DNA binders, and cytostatic and antiproliferative agents (Almeida et al. 2016; de Almeida et al. 2017; Salem et al. 2017; Gouveia et al. 2018; Menezes et al. 2019; Gobinath et al. 2020). In addition, our previous studies have demonstrated the antitumor effects of two spiro-acridine compounds, AMTAC-17 and AMTAC-06, which were

✉ Marianna Vieira Sobral
 mariannavbs@gmail.com

¹ Postgraduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³ Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴ Laboratory for Risk Assessment of Novel Technologies, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁵ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (6/16)

Pharmacological Reports
<https://doi.org/10.1007/s43440-022-00357-0>

SHORT COMMUNICATION



Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06

Sâmia Sousa Duarte¹ · Daiana Karla Frade Silva¹ · Thaís Mangeon Honorato Lisboa¹ · Rawny Galdino Gouveia¹ · Camyla Carolyn Neves de Andrade¹ · Valgrícia Matias de Sousa¹ · Rafael Carlos Ferreira¹ · Ricardo Olimpio de Moura² · Joilly Nilce Santana Gomes² · Patrícia Mirella da Silva³ · Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo⁴ · Tatjana S. L. Keesen⁵ · Juan Carlos Ramos Gonçalves⁶ · Leônia Maria Batista^{1,6} · Marianna Vieira Sobral^{1,6,7}

Received: 27 October 2021 / Revised: 5 February 2022 / Accepted: 7 February 2022
 © The Author(s) under exclusive licence to Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences 2022

Abstract

Background Acridine compounds have been described as promising anticancer agents. Previous studies showed that (*E*)-1'-((4-chlorobenzylidene)amino)-5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-06), a spiro-acridine compound, has antitumor activity on Ehrlich tumor and low toxicity. Herein, we investigated its antitumor effect against human cells in vitro.

Methods MTT assay was used to assess cytotoxicity of AMTAC-06 (3.125–200 μ M) against tumor and non-tumor cells, and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) and the selectivity index (SI) were calculated. The effects on the cell cycle (propidium iodide—PI—staining), apoptosis (Annexin V-FITC/PI double staining by flow cytometry), and production of reactive oxygen species, ROS (DCFH assay) were also evaluated. Statistical analysis was achieved using ANOVA followed by Tukey's post-test.

Results AMTAC-06 showed higher cytotoxicity against colorectal carcinoma HCT-116 cells (IC₅₀: 12.62 μ M). The SI showed that AMTAC-06 was more selective for HCT-116 cells (HaCaT SI: 1.41; PBMC SI: 0.62) than doxorubicin (HaCaT SI: 0.10; PBMC SI: 0.01). AMTAC-06 (15 and 30 μ M) induced an increase in the sub-G1 peak ($p < 0.000001$) and cell cycle arrest in S phase ($p = 0.003547$). Moreover, treatment with this compound (15 and 30 μ M) resulted in increased early ($p < 0.000001$) and late apoptotic cells ($p < 0.000001$). In addition, there was a reduction on ROS production ($p < 0.000001$).

Conclusions AMTAC-06 presents anticancer activity against HCT-116 cells by regulating the cell cycle, inducing apoptosis and an antioxidant action.

Keywords Spiro-acridine · Antioxidant action · Antitumor activity · Cell cycle · Apoptosis · Colorectal cancer

✉ Marianna Vieira Sobral
 mariannavbs@ltf.ufpb.br

¹ Postgraduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³ Invertebrate Immunology and Pathology Laboratory, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴ Cardiovascular Pharmacology Laboratory, Postgraduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁵ Immunology of Infectious Diseases Laboratory, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁶ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁷ Laboratório de Oncofarmacologia (Oncofar), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM), Cidade Universitária, Campus I, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

Published online: 17 March 2022

Springer

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (7/16)



OPEN ACCESS

EDITED BY
Raquel Montenegro,
Federal University of Ceara, Brazil

REVIEWED BY
Mohammad Taghi Mansouri,
Columbia University Irving Medical
Center, United States
Gopal Chandru Senadi,
SRM Institute of Science and
Technology, India
Ganesh Kumar Dhandabani,
Chang Gung University, Taiwan

*CORRESPONDENCE
Marianna V. Sobral,
mariannavbs@gmail.com

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Pharmacology of Anti-Cancer Drugs,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

RECEIVED 07 June 2022
ACCEPTED 29 September 2022
PUBLISHED 17 October 2022

CITATION
Mangueira VM, de Sousa TKG,
Batista TM, de Abrantes RA, Moura APG,
Ferreira RC, de Almeida RN, Braga RM,
Leite FC, Medeiros KCdP,
Cavalcanti MAT, Moura RO,
Silvestre GFG, Batista LM and Sobral MV
(2022), A 9-aminoacridine derivative
induces growth inhibition of Ehrlich
ascites carcinoma cells and
antinociceptive effect in mice.
Front. Pharmacol. 13:963736.
doi: 10.3389/fphar.2022.963736

COPYRIGHT
© 2022 Mangueira, de Sousa, Batista, de
Abrantes, Moura, Ferreira, de Almeida,
Braga, Leite, Medeiros, Cavalcanti,
Moura, Silvestre, Batista and Sobral. This
is an open-access article distributed
under the terms of the Creative
Commons Attribution License (CC BY).
The use, distribution or reproduction in
other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

A 9-aminoacridine derivative induces growth inhibition of Ehrlich ascites carcinoma cells and antinociceptive effect in mice

Vivianne M. Mangueira¹, Tatyanna K. G. de Sousa¹,
Tatianne M. Batista¹, Renata A. de Abrantes¹,
Ana Paula G. Moura¹, Rafael C. Ferreira¹,
Reinaldo N. de Almeida¹, Renan M. Braga¹,
Fagner Carvalho Leite¹, Karina C. de P. Medeiros²,
Misaél Azevedo T. Cavalcanti³, Ricardo O. Moura³,
Geovana F. G. Silvestre¹, Leônia M. Batista^{1,4} and
Marianna V. Sobral^{1,4*}

¹Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, ²Department of Morphology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, ³Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, ⁴Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Acridine derivatives have been found with anticancer and antinociceptive activities. Herein, we aimed to evaluate the toxicological, antitumor, and antinociceptive actions of N'-(6-chloro-2-methoxyacridin-9-yl)-2-cyanoacetohydrazide (ACS-AZ), a 9-aminoacridine derivative with antimalarial activity. The toxicity was assessed by acute toxicity and micronucleus tests in mice. The *in vivo* antitumor effect of ACS-AZ (12.5, 25, or 50 mg/kg, intraperitoneally, i.p.) was determined using the Ehrlich tumor model, and toxicity. The antinociceptive efficacy of the compound (50 mg/kg, i.p.) was investigated using formalin and hot plate assays in mice. The role of the opioid system was also investigated. In the acute toxicity test, the LD₅₀ (lethal dose 50%) value was 500 mg/kg (i.p.), and no detectable genotoxic effect was observed. After a 7-day treatment, ACS-AZ significantly ($p < 0.05$) reduced tumor cell viability and peritumoral microvessels density, suggesting antiangiogenic action. In addition, ACS-AZ reduced ($p < 0.05$) IL-1 β and CCL-2 levels, which may be related to the antiangiogenic effect, while increasing ($p < 0.05$) TNF- α and IL-4 levels, which are related to its direct cytotoxicity. ACS-AZ also decreased ($p < 0.05$) oxidative stress and nitric oxide (NO) levels, both of which are crucial mediators in cancer known for their angiogenic action. Moreover, weak toxicological effects were recorded after a 7-day treatment (biochemical, hematological, and histological parameters). Concerning antinociceptive activity, ACS-AZ was effective on hotplate and formalin (early and late phases) tests ($p < 0.05$), characteristic of analgesic agents with central action. Through pretreatment with the non-selective

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (8/16)



SCIENTIA PLENA
www.scientiaplenu.org.br

VOL. 17, NUM. 03

2021

doi: 10.14808/sci.plena.2021.034901

Valores de referência de parâmetros bioquímicos e hematológicos de *Rattus norvegicus* (Wistar) da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba

Reference values of biochemical and hematological parameters of *Rattus norvegicus* (Wistar) from the Animal Production Unit of the Research Institute for Drugs and Medicines of the Federal University of Paraíba

F. A. S. Oliveira¹; R. C. Ferreira²; R. N. Parentoni³; C. C. N. Andrade²; A. L. O. Lopes²; A. L. G. Cruz⁴; S. S. Duarte²; D. K. F. Silva²; V. M. de Sousa²; T. M. Batista²; I. B. S. Gomes⁵; M. V. Sobral^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-Pernambuco, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa-Paraíba, Brasil

³Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa-Paraíba, Brasil

⁴Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa-Paraíba, Brasil

⁵Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa-Paraíba, Brasil

*mariannavbs@gmail.com

(Recebido em 01 de outubro de 2020; aceito em 22 de março de 2021)

Animais de diferentes criadouros podem apresentar variações em seus parâmetros fisiológicos. Os objetivos desse trabalho foram determinar o intervalo de valores de referência de parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos e ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (UPA/IPeFarM/UFPB), bem como comparar os dados encontrados com dados publicados para outras unidades de produção animal nacionais e internacionais. Foram utilizados animais saudáveis (n=40/gênero), com 8 a 12 semanas de idade e peso entre 150 e 300 g. Amostras de sangue total foram obtidas por punção intracardiaca e utilizadas para a quantificação de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e dos índices hematimétricos. Foram determinadas as concentrações séricas de glicose, triglicérides, colesterol, proteínas totais, ureia, albumina, creatinina, ácido úrico e a atividade enzimática da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Ao comparar os gêneros, foram observadas diferenças significativas entre todos os parâmetros avaliados. Além disso, foram encontradas discrepâncias entre os valores obtidos (exceto proteínas totais, ácido úrico e hemácias) e resultados de outros criadouros. É necessário, portanto, que cada biotério determine os valores de referência do perfil fisiológico de seus animais, considerando os fatores intrínsecos e extrínsecos na homeostase dos mesmos, a fim de fornecer dados reais para os experimentos de suas instituições. Palavras-chave: ratos Wistar, bioquímica, hematologia.

Animals from different breeding sites may show variations in their physiological parameters. The aims of this study were to determine the range of reference values for biochemical and hematological parameters of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Animal Production Unit of the Research Institute for Drugs and Medicines at the Federal University of Paraíba (UPA/IPeFarM/UFPB), as well as comparing the data found with published data for other national and international animal production units. Healthy animals (n=40/gender) with 8 to 12 weeks of age and weight between 150 and 300 g were used. Whole blood samples were obtained by intracardiac puncture and used for the quantification of erythrocytes, leukocytes, platelets and hematimetric indices. Serum concentrations of glucose, triglycerides, cholesterol, total proteins, urea, albumin, creatinine, uric acid and the enzymatic activity of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase were determined. When comparing the genders, significant differences were observed between all parameters evaluated. In addition, discrepancies were found between the values obtained (except total proteins, uric acid and red blood cells) and results from other breeding sites. Therefore, it is necessary that each bioterium determines the reference values of the physiological profile of

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (9/16)

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2022) 395:267–274
<https://doi.org/10.1007/s00210-021-02185-0>

BRIEF COMMUNICATION



Antitumor and antiangiogenic effects of Tonantzitlolone B, an uncommon diterpene from *Stillingia loranthacea*

Renata A. de Abrantes¹ · Tatianne M. Batista¹ · Vivianne M. Mangueira¹ · Tatyanna K. G. de Sousa¹ · Rafael C. Ferreira¹ · Ana Paula G. Moura¹ · Lucas S. Abreu¹ · Adriano F. Alves² · Eudes S. Velozo³ · Leônia M. Batista^{1,4} · Marcelo S. da Silva^{1,4} · Josean F. Tavares^{1,4} · Marianna V. Sobral^{1,4}

Received: 11 August 2021 / Accepted: 14 November 2021 / Published online: 2 December 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Natural products have played a pivotal role for the discovery of anticancer drugs. Tonantzitlolones are flexibilan-type diterpenes rare in nature; therefore, few reports have shown antiviral and cytotoxic activities. This study aimed to investigate the *in vivo* antitumor action of Tonantzitlolone B (TNZ-B) and its toxicity. Toxicity was evaluated in mice (acute and micronucleus assays). Antitumor activity of TNZ-B (1.5 or 3 mg/kg intraperitoneally — i.p.) was assessed in Ehrlich ascites carcinoma model. Angiogenesis and reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production were also investigated, in addition to toxicological effects after 7-day treatment. The LD₅₀ (lethal dose 50%) was estimated at around 25 mg/kg (i.p.), and no genotoxicity was recorded. TNZ-B reduced the Ehrlich tumor's volume and total viable cancer cell count ($p < 0.001$ for both). Additionally, TNZ-B reduced peritumoral microvessel density ($p < 0.01$), suggesting antiangiogenic action. Moreover, a decrease was observed on ROS ($p < 0.05$) and nitric oxide ($p < 0.001$) levels. No significant clinical findings were observed in the analysis of biochemical, hematological, and histological (liver and kidney) parameters. In conclusion, TNZ-B exerts antitumor and antiangiogenic effects by reducing ROS and NO levels and has weak *in vivo* dose-repeated toxicity. These data contribute to elucidate the antitumor action of TNZ-B and point the way for further studies with this natural compound as an anticancer drug.

Keywords Tonantzitlolone B · Ehrlich tumor · Angiogenesis · Toxicity

Introduction

Cancer is characterized by mutations that disrupt normal cell growth and function, in addition to the promotion of angiogenesis which induces the tumor growth by providing oxygen and nutrients and favors metastasis (Hanahan and Weinberg 2011). Therefore, angiogenesis inhibitors have

been suggested as a strategy for treating cancer (Rajabi and Mousa 2017; Qiang et al 2020).

Natural products have historically been a source of medicinal agents, particularly as anticancer. Vinca alkaloids and the diterpene paclitaxel are some of the best-known plant-derived anticancer drugs (Newman and Cragg 2020). Literature reports have revealed antiangiogenic and anti-metastatic activities of many anticancer natural products, including phenolic compounds, alkaloids, and terpenoids. The molecular mechanisms are varied and involve down-regulating different angiogenesis and metastasis-associated signaling pathways or molecules (Guan et al. 2016; Ghauri et al. 2021; Ribeiro et al. 2018). Therefore, natural compounds can be considered as viable options to develop new strategies or drugs for targeting pathological angiogenesis in the fight against cancer.

Tonantzitlolones (TNZ) A and B are diterpenes based on a rare 15-membered flexibilane skeleton obtained from *Stillingia* species, and few literature reports describe their

✉ Marianna V. Sobral
 mariannavbs@gmail.com; mariannavbs@lft.ufpb.br

¹ Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

² Department of Physiology and Pathology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

³ Research Laboratory in Materia Medica, School of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (10/16)



Communication

Antitumor Effect of a Novel Spiro-Acridine Compound is Associated with Up-Regulation of Th1-Type Responses and Antiangiogenic Action

Daiana K. Frade Silva ¹, Sâmia S. Duarte ¹, Thaís M. H. Lisboa ¹, Rafael C. Ferreira ¹, Ana Luíza de O. Lopes ¹, Deyse C. M. Carvalho ², Sandra Rodrigues-Mascarenhas ^{1,2}, Patricia Mirella da Silva ³, Miguel A. S. Pinheiro Segundo ⁴, Ricardo O. de Moura ⁵, Karina C. P. Medeiros ⁶ and Marianna V. Sobral ^{1,7,*}

¹ Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil; daiana.frade@gmail.com (D.K.F.S.); samiasduarte@gmail.com (S.S.D.); thaimangeon@gmail.com (T.M.H.L.); rafaelcarlos@ltf.ufpb.br (R.C.F.); ana.lopes0407@gmail.com (A.L.d.O.L.); sandra@cbiotec.ufpb.br (S.R.-M.)

² Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil; deysecmc@gmail.com

³ Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil; mirella_dasilva@hotmail.com

⁴ Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil; miguelsegundo@gmail.com

⁵ Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, João Pessoa, PB 58070-450, Brazil; ricardo.olimpiodemoura@gmail.com

⁶ Department of Morphology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN 59078-970, Brazil; karinapm@yahoo.com

⁷ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil

* Correspondence: mariannavbs@gmail.com; Tel.: +55-83-98812-3555

Received: 26 November 2019; Accepted: 13 December 2019; Published: 20 December 2019



Abstract: Tumor cells have specific features, including angiogenesis induction, cell cycle dysregulation, and immune destruction evasion. By inducing a T helper type 2 (Th2) immune response, tumor cells may favor immune tolerance within the tumor, which allows progression of cancer growth. Drugs with potential antitumor activity are the spiro-acridines, which is a promising new class of acridine compounds. Herein, the novel spiro-acridine (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimethoxybenzylidene)amino)-1',5'-dihydro-10*H*-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-17) was synthesized and tested for antitumor effects. Toxicity evaluation was performed in mice after acute treatment (2000 mg/kg, intraperitoneally, i.p.). The Ehrlich ascites carcinoma model was used to investigate the antitumor activity of AMTAC-17 (12.5, 25, or 50 mg/kg, i.p.) after seven days of treatment. Effects on the cell cycle, angiogenesis, and inflammatory responses were investigated. LD₅₀ (lethal dose 50%) was estimated to be higher than 5000 mg/kg. AMTAC-17 reduced the Ehrlich tumor's total viable cancer cells count and peritumoral micro-vessels density, and induced an increase in the sub-G1 peak. Additionally, there was an increase of Th1 cytokine profile levels (IL-1 β , TNF- α , and IL-12). In conclusion, the spiro-acridine compound AMTAC-17 presents low toxicity, and its *in vivo* antitumor effect involves modulation of the immune system to a cytotoxic Th1 profile and a reduction of tumor angiogenesis.

Keywords: spiro-acridine compound; angiogenesis; antitumor activity; immune response

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (11/16)



Communication

Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid

Thaís Lisboa ¹, Daiana Silva ¹, Sâmia Duarte ¹, Rafael Ferreira ¹, Camyla Andrade ¹, Ana Luiza Lopes ¹, Juliana Ribeiro ², Davi Farias ² , Ricardo Moura ³, Malu Reis ³, Karina Medeiros ⁴, Hemerson Magalhães ^{1,5} and Marianna Sobral ^{1,5,*}

¹ Postgraduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil; thaismangeon@gmail.com (T.L.); daiana.frade@gmail.com (D.S.); samiasduarte@gmail.com (S.D.); rafaelcarlos@lft.ufpb.br (R.F.); camyla.andrade03@gmail.com (C.A.); ana.lopes0407@gmail.com (A.L.L.); hemersoniury@gmail.com (H.M.)

² Laboratory for Risk Assessment of Novel Technologies, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900 João Pessoa, Brazil; julianaacrs@hotmail.com (J.R.); daviffarias@gmail.com (D.F.)

³ Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, 58070-450 João Pessoa, PB, Brazil; ricardo.olimpiodemoura@gmail.com (R.M.); malureis_farmacia@hotmail.com (M.R.)

⁴ Department of Morphology, Federal University of Rio Grande do Norte, 59078-970 Natal, RN, Brazil; karinapm@yahoo.com

⁵ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil

* Correspondence: mariannavbs@gmail.com; Tel.: +55-83-98812-3555

Received: 2 December 2019; Accepted: 18 December 2019; Published: 24 December 2019



Abstract: The antitumor effects of thiophene and acridine compounds have been described; however, the clinical usefulness of these compounds is limited due to the risk of high toxicity and drug resistance. The strategy of molecular hybridization presents the opportunity to develop new drugs which may display better target affinity and less serious side effects. Herein, 2-((6-Chloro-2-methoxy-acridin-9-yl)amino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]-thiophene-3-carbonitrile (ACS03), a hybrid thiophene–acridine compound with antileishmanial activity, was tested for toxicity and antitumor activity. The toxicity was evaluated in vitro (on HaCat and peripheral blood mononuclear cells) and in vivo (zebrafish embryos and acute toxicity in mice). Antitumor activity was also assessed in vitro in HCT-116 (human colon carcinoma cell line), K562 (chronic myeloid leukemic cell line), HL-60 (human promyelocytic leukemia cell line), HeLa (human cervical cancer cell line), and MCF-7 (breast cancer cell line) and in vivo (Ehrlich ascites carcinoma model). ACS03 exhibited selectivity toward HCT-116 cells (Half maximal inhibitory concentration, IC₅₀ = 23.11 ± 1.03 μM). In zebrafish embryos, ACS03 induced an increase in lactate dehydrogenase, glutathione S-transferase, and acetylcholinesterase activities. The LD₅₀ (lethal dose 50%) value in mice was estimated to be higher than 5000 mg/kg (intraperitoneally). In vivo, ACS03 (12.5 mg/kg) induced a significant reduction in tumor volume and cell viability. In vivo antitumor activity was associated with the nitric oxide cytotoxic effect. In conclusion, significant antitumor activity and weak toxicity were recorded for this hybrid compound, characterizing it as a potential anticancer compound.

Keywords: colorectal cancer; thiophene–acridine compound; antitumor; cytotoxicity; toxicity

1. Introduction

Cancer in the broader sense refers to more than 277 different types of cancer disease [1] and is a leading cause of death and disability, with 18.1 million people diagnosed globally and more than

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (12/16)

Biomedicine & Pharmacotherapy 128 (2020) 110247



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph

Original article

A novel piperine analogue exerts *in vivo* antitumor effect by inducing oxidative, antiangiogenic and immunomodulatory actions



Rafael Carlos Ferreira^a, Tatianne Mota Batista^a, Sâmia Sousa Duarte^a, Daiana Karla Frade Silva^a, Thaís Mangeon Honorato Lisboa^a, Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti^a, Fagner Carvalho Leite^a, Vivianne Mendes Mangueira^a, Tatyanna Kélvia Gomes de Sousa^a, Renata Albuquerque de Abranches^a, Emmely Oliveira da Trindade^b, Petrônio Filgueiras de Athayde-Filho^b, Maria Cláudia Rodrigues Brandão^b, Karina Carla de Paula Medeiros^c, Davi Felipe Farias^d, Marianna Vieira Sobral^{a,*}

^a Postgraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^b Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^c Department of Morphology, Center of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Norte, 59078-970, Rio Grande do Norte, Brazil

^d Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Piperine analogue
Non-clinical toxicity
Zebrafish
Oxidative stress
Angiogenesis
Tumor microenvironment.

ABSTRACT

Structural diversity characterizes natural products as prototypes for design of lead compounds. The aim of this study was to synthesize, and to evaluate the toxicity and antitumor action of a new piperine analogue, the butyl 4-(4-nitrobenzoate)-piperinoate (DE-07). Toxicity was evaluated against zebrafish, and in mice (acute and micronucleus assays). To evaluate the DE-07 antitumor activity Ehrlich ascites carcinoma model was used in mice. Angiogenesis, Reactive Oxygen Species (ROS) production and cytokines levels were investigated. Ninety-six hours exposure to DE-07 did not cause morphological or developmental changes in zebrafish embryos and larvae, with estimated LC₅₀ (lethal concentration 50%) higher than 100 µg/mL. On the acute toxicity assay in mice, LD₅₀ (lethal dose 50%) was estimated at around 1000 mg/kg, intraperitoneally (i.p.). DE-07 (300 mg/kg, i.p.) did not induce increase in the number of micronucleated erythrocytes in mice, suggesting no genotoxicity. On Ehrlich tumor model, DE-07 (12.5, 25 or 50 mg/kg, i.p.) induced a significant decrease on cell viability. In addition, there was an increase on ROS production and a decrease in peritumoral microvessels density. Moreover, DE-07 induced an increase of cytokines levels involved in oxidative stress and antiangiogenic effect (IL-1β, TNF-α and IL-4). No significant clinical toxicological effects were recorded in Ehrlich tumor transplanted animals. These data provide evidence that DE-07 presents low toxicity, and antitumor effect *via* oxidative and antiangiogenic actions by inducing modulation of inflammatory response in the tumor microenvironment.

1. Introduction

Cancer is a group of diseases whose cells proliferate uncontrollably and induce metastasis, causing significant morbidity and mortality [1–3].

During carcinogenesis, tumor cells acquire malignant characteristics, including sustained proliferation even in the absence of external stimuli [4]; angiogenesis, for the supply of oxygen and nutrients [5]; and chronic inflammation associated with the release of several inflammatory mediators that regulate the extensive networks implicated in several cancer hallmarks [6,7].

Angiogenesis, a process of forming new blood vessels from pre-existing vessels, also allows the removal of tumor metabolism products [5,8], genetic instability, inflammation, microenvironmental rupture, invasion and metastasis [9]. Thus, various agents in clinical practice and others in clinical development interfere with the signals that promote angiogenesis [10], constituting one of the most important anti-tumor strategies [11].

Tumor cells coexist and coevolve with their stroma, and they together create the tumor microenvironment [12,13]. Direct interaction established between tumor cells and other components of the tumor microenvironment occurs through direct contact or release of soluble

* Corresponding author.

E-mail address: mariannavbs@lbf.ufpb.br (M.V. Sobral).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2020.110247>

Received 16 December 2019; Received in revised form 1 May 2020; Accepted 10 May 2020

0753-3322/ © 2020 The Author(s). Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (13/16)

This is an open access article published under an ACS AuthorChoice License, which permits copying and redistribution of the article or any adaptations for non-commercial purposes.



<http://pubs.acs.org/journal/acsodf>

Article

Dolichocarpols A-F, Unprecedented Macrocyclic Humulene-Type Sesquiterpenoids from *Anaxagorea dolichocarpa*

Kaio Aragão Sales, Anderson Angel Vieira Pinheiro, Diego Igor Alves Fernandes de Araújo, Lucas Silva Abreu, Rodrigo Silva de Andrade, Maria de Fátima Agra, Marianna Vieira Sobral, Rafael Carlos Ferreira, Raimundo Braz-Filho, Marcus Tullius Scotti, Josean Fechine Tavares,* and Marcelo Sobral da Silva



Cite This: *ACS Omega* 2020, 5, 13656–13663



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

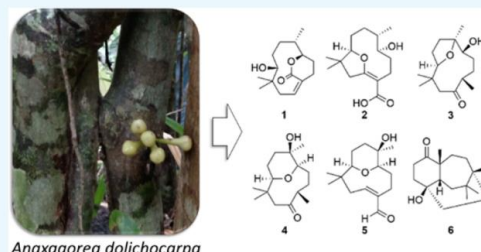


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Six sesquiterpenoids with unprecedented macrocyclic humulene-type structures, namely, dolichocarpols A–E (1–5) with ether-bridged bicyclic rings between C-10 and C-2, C-10 and C-7, C-10 and C-6 (×2), and C-6 and C-3 and dolichocarpol F (6) cyclized between C-7 and C-2 and with an ether bridge between C-10 and C-3, were isolated from *Anaxagorea dolichocarpa* roots. The structures of the compounds were elucidated by NMR, MS, and IR data. Absolute configurations of compounds 1–3 and 6 were established on the basis of data from electronic circular dichroism, whereas relative configurations of compounds 4 and 5 were suggested by the NOESY spectrum. In addition, a putative biosynthetic pathway of the compounds is proposed. Furthermore, the cytotoxicity of 3, 4, and 6 against HCT-116 (human colorectal carcinoma) and L929 (murine fibroblast) was evaluated.



Anaxagorea dolichocarpa

INTRODUCTION

Sesquiterpenoids are considered to be the most diverse group of terpenoids containing a large variety of chemical structures that present different forms of derivation and cyclization from farnesyl diphosphate (FPP).^{1,2} The humulene-type, an 11-membered macrocyclic sesquiterpenoid, is broadly found in plants, and previous reports have demonstrated various kinds of biological activities such as antitumor, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, and other bioactivities.^{3–5}

The genus *Anaxagorea* (Annonaceae) comprises 30 species distributed in the neotropics and tropical Asia.⁶ Previous phytochemical studies with plants of this genus revealed the presence of xanthenes, flavonoids,^{7–9} neolignans,¹⁰ terpenoids, and alkaloids,^{11–13} with some of them exhibiting remarkable biological activities. The analysis of the essential oil from the leaves of *Anaxagorea brevipes* has revealed the presence of mono- and sesquiterpenes such as α -, β -, and γ -eudesmol, guaiol, and caryophyllene oxide. In addition, its biological evaluation showed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria and yeast and antiproliferative activity against breast, lung, and prostate cancer cell lines.¹¹ An interesting sesquiterpene called nordine besides copyrine alkaloids has been isolated from *A. javanica*, and some of these compounds have been assayed for nitric oxide (NO) inhibition.¹³ *A. dolichocarpa*, widely distributed in South America,¹⁴ is found in Brazil mainly in the North and Northeast regions.¹⁵ Previous

works exploring different parts of this plant reported the isolation of aporphine and azaphenanthrene alkaloids,^{16,17} the identification of mono- and sesquiterpenes,^{12,18} the phenolic quantification and determination of its antioxidant activity,¹⁹ and a phytochemical screening and cytotoxicity evaluation of its extract.²⁰

The gradual emergence of active agents derived from the plant kingdom into the fight against cancer has gained importance in the last decade.²¹ These compounds have the potential to be harnessed for preventative strategies, standalone treatments, or complementary therapeutics in combination with traditional pharmacological interventions.²² In addition, the literature has shown exciting data with respect to potential of natural compounds and their analogues in cancer prevention and treatment.²³

In a continuing effort to isolate active compounds from plants in Brazil's semiarid area and motivated by the promising bioactivities and diversity of sesquiterpenoid structures, the

Received: February 15, 2020

Accepted: April 15, 2020

Published: June 2, 2020



ACS Publications

© 2020 American Chemical Society

13656

<https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c00690>
ACS Omega 2020, 5, 13656–13663

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (14/16)



Ionic Channels as Potential Therapeutic Targets for Erectile Dysfunction: A Review

Anderson Fellyp Avelino Diniz^{1†}, Rafael Carlos Ferreira^{1†}, Iara Leão Luna de Souza² and Bagnólia Araújo da Silva^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ² Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Roraima, Boa Vista, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Domenico Tricarico,
University of Bari Aldo Moro, Italy

Reviewed by:

Ulf Simonsen,
Aarhus University, Denmark
Heike Wulff,
University of California,
Davis, United States

*Correspondence:

Bagnólia Araújo da Silva
bagnolia@lff.ufpb.br

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmacology of Ion Channels
and Channelopathies,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 06 May 2020

Accepted: 10 July 2020

Published: 24 July 2020

Citation:

Diniz AFA, Ferreira RC, de Souza ILL
and da Silva BA (2020) Ionic Channels
as Potential Therapeutic Targets for
Erectile Dysfunction: A Review.
Front. Pharmacol. 11:1120.
doi: 10.3389/fphar.2020.01120

Erectile dysfunction (ED) is a prevalent condition, especially in men over 40 years old, characterized by the inability to obtain and/or maintain penile erection sufficient for satisfactory sexual intercourse. Several psychological and/or organic factors are involved in the etiopathogenesis of ED. In this context, we gathered evidence of the involvement of Large-conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels (BK_{Ca}), Small-conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels (SK_{Ca}), KCNQ-encoded voltage-dependent K^{+} channels ($\text{K}_{\text{v}7}$), Transient Receptor Potential channels (TRP), and Calcium-activated Chloride channels (CaCC) dysfunctions on ED. In addition, the use of modulating agents of these channels are involved in relaxation of the cavernous smooth muscle cell and, consequent penile erection, suggesting that these channels are promising therapeutic targets for the treatment of erectile dysfunction.

Keywords: canalopathies, erectile dysfunction, Ca^{2+} -activated K^{+} channels, KCNQ-encoded voltage-dependent K^{+} channels, transient receptor potential channels, calcium-activated chloride channels

INTRODUCTION

Erectile dysfunction (ED) is a persistent inability to achieve and/or maintain a penile erection enough for satisfactory sexual intercourse (McCabe et al., 2016). Predominantly a vascular disorder, ED affects both physical and psychological health, having a direct impact on men's life quality and their sexual partners, mainly due to a reduction in self-esteem and impairment of interpersonal

Abbreviations: ED, Erectile dysfunction; BK_{Ca} , Large-conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels; TRP, Transient Receptor Potential; CaCC, Calcium-activated Chloride channels; $\text{K}_{\text{v}7}$, KCNQ-encoded voltage-dependent K^{+} channels; SK_{Ca} , Small-conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels; ROS, Reactive Oxygen Species; eNOS, RhoA, Endothelial nitric oxide synthase; Small G protein GTP-binder; ROCK, Rho-associated protein kinase; MS, Metabolic Syndrome; NO, Nitric Oxide; CNS, Central Nervous System; NA, Norepinephrine; NANC, Non-adrenergic, Non-cholinergic; PGI_2 , Prostacyclin; $\text{PGE}_{1/2}$, Prostaglandins E type 1 and 2; CaM, Calmodulin; Ca_v , Voltage-dependent Ca^{2+} channels; AC, Adenyl cyclase; PKA, cAMP dependent protein kinase; PKG, cGMP-dependent protein kinase; ATP, Adenosine triphosphate; GTP, Guanosine triphosphate; cAMP, Cyclic adenosine monophosphate; cGMP, Cyclic guanosine monophosphate; IP_3 , Inositol 1,4,5-triphosphate; SR, Sarcoplasmic reticulum; SERCA, Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase; MLCK, Myosin light chain kinase; NCX, $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger; PMCA, Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase; SHIM, Male Sexual Health Inventory; IIFE, International Index of Erectile Function; PKC, Protein kinase C; $\text{RCK}_{1/2}$, Regulator of potassium conductance; TRPA, Transient Receptor Potential Ankyrin; TRPC, Transient Receptor Potential Canonical; TRPM, Transient Receptor Potential Melastatin; TRPML, Transient Receptor Potential Mucopolipine; TRPP, Transient Receptor Potential Polycystin; TRPV, Transient Receptor Potential Vanilloid; AA, Arachidonic acid; TMEM16, Transmembrane protein with unknown function 16A; DNDS, 4,4-dithiostyrene-2,2-disulfonic acid; NFA, Niflumic acid; A9C, Anthracene-9-carboxylic acid.

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (15/16)

ANTICANCER RESEARCH 40: 5049-5057 (2020)
doi:10.21873/anticancerres.14508

Anticancer Effect of a Spiro-acridine Compound Involves Immunomodulatory and Anti-angiogenic Actions

SÂMIA SOUSA DUARTE¹, DAIANA KARLA FRADE SILVA¹, THAÍS MANGEON HONORATO LISBOA¹,
RAWNY GALDINO GOUVEIA¹, RAFAEL CARLOS FERREIRA¹,
RICARDO OLÍMPIO DE MOURA², JAMIRE MURIEL DA SILVA³,
ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA⁴, SANDRA RODRIGUES-MASCARENHAS^{1,4},
PATRICIA MIRELLA DA SILVA⁵, DAVI FELIPE FARIAS⁶,
JULIANA ALVES DA COSTA RIBEIRO SOUZA⁶, KARINA CARLA DE PAULA MEDEIROS⁷,
JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES⁸ and MARIANNA VIEIRA SOBRAL^{1,8}

¹Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

²Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy,
State University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

³Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁴Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

⁵Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

⁶Laboratory of Risk Assessment for Novel Technologies,
Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

⁷Department of Morphology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil;

⁸Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Abstract. *Background/Aim:* Studies with acridine compounds have reported anticancer effects. Herein, we evaluated the toxicity and antitumor effect of the (E)-1'-((4-chlorobenzylidene)amino)-5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-06), a promising anticancer spiro-acridine compound. *Materials and Methods:* The toxicity of AMTAC-06 was evaluated on zebrafish and mice. Antitumor activity was assessed in Ehrlich ascites carcinoma model. *Effects on angiogenesis, cytokine levels and cell cycle were also investigated. Results:* AMTAC-06 did not induce toxicity on zebrafish and mice (LD₅₀ approximately 5000 mg/kg, intraperitoneally). No genotoxicity was observed on micronucleus assay. AMTAC-06 significantly reduced the total viable Ehrlich tumor cells

and increased sub-G₁ peak, suggesting apoptosis was triggered. Moreover, the compound significantly decreased the density of peritumoral microvessels, indicating an anti-angiogenic action, possibly dependent on the cytokine modulation (TNF- α , IL-1 β and IFN- γ). No significant toxicological effects were recorded for AMTAC-06 on tumor transplanted animals. *Conclusion:* AMTAC-06 has low toxicity and a significant antitumor activity.

The mechanisms underlying the transformation of normal cells into malignant cells have been thoroughly studied, aiming to better understand the biology of cancer and develop new treatments. Researchers have described common traits acquired during tumorigenesis, including sustaining proliferative signaling, induction of angiogenesis, deregulation of cell cycle, resistance to cell death and tumor-promoting inflammation (1-3). These hallmarks are important therapeutic targets for new antitumor drug development (3, 4).

Acridines are heterocyclic molecules containing a planar ring, which have shown anti-inflammatory, anticancer, antiparasitic, antiviral, and antimicrobial activities, among others (5). Their antitumor action is based on DNA binding and topoisomerase inhibition (6), which may cause apoptosis and cell cycle arrest (7). Nevertheless, acridine compounds

Correspondence to: Dr. Marianna Vieira Sobral, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba - Campus I, Jardim Universitário, S/N, Castelo Branco, CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil. Tel: + 55 83988123555, e-mail: mariannavbs@gmail.com

Key Words: Spiro-acridine, antitumor activity, anti-angiogenic activity, immunomodulation, zebrafish, Ehrlich ascites carcinoma model.

ANEXO 3 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (16/16)

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
<https://doi.org/10.1007/s00210-020-01884-4>

ORIGINAL ARTICLE



Coumarin derivative 7-isopentenylcoumarin induces in vivo antitumor activity by inhibit angiogenesis via CCL2 chemokine decrease

Ryldene Marques Duarte da Cruz¹ · Tatianne Mota Batista¹ · Tatyanna Kevlia Gomes de Sousa¹ · Vivianne Mendes Mangueira¹ · Jephesson Alex Floriano dos Santos¹ · Renata Albuquerque de Abrantes¹ · Rafael Carlos Ferreira¹ · Fagner Carvalho Leite¹ · Monalisa Taveira Brito¹ · Leônia Maria Batista^{1,2} · Robson Cavalcante Veras² · Giciane Carvalho Vieira³ · Francisco Jaime Bezerra Mendonça Jr⁴ · Rodrigo Santos Aquino de Araújo⁴ · Marianna Vieira Sobral^{1,2}

Received: 10 October 2019 / Accepted: 24 April 2020
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Cancer is one of the most urgent problems in medicine. In recent years, cancer is the second leading cause of death globally. In search for more effective and less toxic treatment against cancer, natural products are used as prototypes in the synthesis of new anticancer drugs. The aim of this study was to investigate the in vivo toxicity and the mechanism of antitumor action of 7-isopentenylcoumarin (UMB-07), a coumarin derivative with antitumor activity. The toxicity was evaluated in vitro (hemolysis assay), and in vivo (micronucleus and acute toxicity assays). Ehrlich ascites carcinoma model was used to evaluate in vivo antitumor activity of UMB-07 (12.5, 25, or 50 mg/kg, intraperitoneally, i.p.), after 9 days of treatment, as well as toxicity. UMB-07 (2000 µg/mL) induced only 0.8% of hemolysis in peripheral blood erythrocytes of mice. On acute toxicity assay, LD₅₀ (50% lethal dose) was estimated at around 1000 mg/kg (i.p.), and no micronucleated erythrocytes were recorded after UMB-07 (300 mg/kg, i.p.) treatment. UMB-07 (25 and 50 mg/kg) reduced tumor volume and total viable cancer cells. In the mechanism action investigation, no changes were observed on the cell cycle analysis; however, UMB-07 reduced peritumoral microvessels density and CCL2 chemokine levels. In addition, UMB-07 showed weak toxicity on biochemical, hematological, and histological parameters after 9 days of antitumor treatment. The current findings suggest that UMB-07 has low toxicity and exerts antitumor effect by inhibit angiogenesis via CCL2 chemokine decrease.

Keywords Cancer chemotherapy · Coumarin derivative · Angiogenesis · CCL2 · Toxicity

Introduction

Cancer is a disease characterized by the exacerbated growth of malignant cells with potential to induce metastasis (Hanahan and Weinberg 2011). It remains one of the major health concerns as one of the leading causes of morbidity and mortality in the world (Rageh et al. 2018; Siegel et al. 2018). Several hallmarks are involved on cancer, such as unlimited multiplication, angiogenesis induction, and tumor-promoting inflammation. These characteristics of tumor cells represent pharmacological targets for the cancer treatment (Hanahan and Weinberg 2011).

Unlimited multiplication is related to cell cycle dysregulation, and is involved with changes on the homeostatic levels of growth factors and the increase of the expression of its

✉ Marianna Vieira Sobral
 mariannavbs@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-970, Brazil

² Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-970, Brazil

³ Departamento de Morfologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-970, Brazil

⁴ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58071-160, Brazil